



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

**ESTUDIO TEÓRICO DE LA ACCIÓN ANTIOXIDANTE
DE DIFERENTES COMPUESTOS QUÍMICOS
PRESENTES EN EL CAFÉ Y DE SUS METABOLITOS**

Tesis que presenta

Jorge Rafael León Carmona

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias (Química)

Asesora

Dra. Annia Galano Jiménez

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA.

México, D.F. Noviembre del 2012

Agradecimientos.

A Dios, por hacer todo posible.

A mi familia, por ser mi apoyo incondicional y por su comprensión.

A mi papá, por qué con tu buen ejemplo siempre me impulsaste a seguir adelante.

A mi mamá, por todo tu amor, por siempre estar allí y ser indispensable en mi vida.

A mi hermana, gracias por entender un poco lo mucho que te quiero.

A mi asesora Annia, muchas gracias por tu ejemplo y por amistad.

A la Dra. María Teresa, por ser la primera persona en confiar en mí al inicio de esta gran aventura.

A mis compañeras Adriana y Mariana, por su amistad, entendimiento y apoyo.

A mis amigos, a todos, incondicionales, afectuosos y sinceros, en especial a René, Manuel, Angélica, Anhel, Nelly, Xilo y Alfredo.

A mi otra familia, los Salinas-Ruiz, en especial a José Reyes (Q.E.P.D.) por recibirme en su casa y apoyarme siempre.

A mis profesores, muchas gracias por su dedicación y empeño en su enseñanza.

A mis conocidos, ya que en mayor o menor medida siempre han sido una notable influencia en mi vida.

A nuestra parcela de caña, nuestra tierra, sustento de nuestra familia.

Agradezco al CONACyT por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de esta investigación a través de la beca de posgrado (224987) y de los proyectos de investigación SEP-CONACyT(167491) y (167430)

Tabla de Contenidos

Tabla de Abreviaturas.....	2
Resumen	3
Abstract.....	4
1. Introducción.....	5
2. Marco Teórico	13
3. Hipótesis de trabajo.	16
4. Objetivos.....	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos particulares	16
5. Metodología de cálculo	17
6. Antecedentes.....	22
7. Resultados y discusión.....	24
7.1 Análisis previos.....	24
7.2 Cafeína y metabolitos	29
6.2 Ácidos Fenólicos y metabolitos	63
6.3 Eficiencia antioxidante relativa de los compuestos estudiados	78
7. Conclusiones.....	82
8. Perspectivas	84
9. Referencias	85
10. Anexos.....	91
ANEXO I. Teoría de funcionales de la densidad.....	91
ANEXO II. Conjuntos de funciones de base.	93
ANEXO III. Datos incluidos en la parametrización del funcional M05-2X.....	96

ANEXO IV. Errores absoluto promedio (kcal/mol) de propiedades energéticas calculadas con diferentes funcionales.....	98
ANEXO V. Errores absoluto promedio (kcal/mol) para energías libres de solvatación obtenidos con diferentes modelos de solvente.....	99
ANEXO VI. Cálculos termodinámicos con el programa Gaussian y descripción de los modelos de solvatación PCM y SMD.....	100
ANEXO VII. Publicaciones.....	107

Tabla de Abreviaturas

AMU	Ácido 1-metilúrico.
H ₂ Cfc	Ácido cafeico.
H ₂ Cmc	Ácido <i>p</i> -cumárico.
H ₂ Dhc	Ácido dihidrocafeico.
H ₂ Frc	Ácido ferúlico
CAF	Cafeína.
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente en Trolox.
HCAD	Derivados del ácido hidroxicianámico
DPPH	Difenil-picril-hidracil
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
RAF	Formación de aducto radicalico.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
MXT	1-Metilxantina.
PAR	Paraxantina
THB	Teobromina.
THP	Teofilina.
TST	Teoría convencional del estado de transición.
DFT	Teoría de los funcionales de la densidad.
HT	Transferencia de hidrógeno.
SET	Transferencia electrónica simple.

Resumen

En el presente trabajo teórico se investigó el posible papel de diferentes compuestos presentes en el café como protectores químicos contra el estrés oxidativo. Para ello se estudiaron las reacciones de dos familias de compuestos. La de la cafeína que incluye además a teobromina, teofilina, paraxantina, 1-metilxantina, y ácido 1-metil úrico; y la de los ácidos fenólicos que incluye al ácido cafeico, a su metabolito el ácido dihidrocafeico, al ácido ferúlico y al ácido p-cumárico. Este estudio se realizó para medios acuoso y lipídico y teniendo en cuenta diferentes mecanismos de reacción, entre los que destacan la transferencia de H, la transferencia electrónica y la formación de aductos. Además se investigó la capacidad depuradora con respecto a diferentes radicales libres incluyendo los más representativos del daño a los organismos vivos ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, $\cdot\text{OOH}$ y $\cdot\text{OOCH}_3$). Se encontró que tanto la polaridad del medio, como el pH en solución acuosa y la naturaleza química del radical libre que reaccionan juegan un papel en la actividad antioxidante global de los compuestos estudiados y también en la importancia relativa de los diferentes mecanismos de reacción en esta actividad. Se cuantificaron las contribuciones de los diferentes mecanismos y sitios de reacción a la actividad global de los compuestos estudiados. Se realizó además un análisis detallado del orden de actividad protectora para estos compuestos entre sí y comparados con otros antioxidantes, basado en consideraciones cinéticas. El orden de actividad de los compuestos del café estudiados en el presente trabajo cuando actúan en medio no polar es: ácido dihidrocafeico > ácido cafeico > ácido ferúlico > ácido p-cumárico > ácido 1-metil úrico > teobromina > cafeína > teofilina > 1- metilxantina > paraxantina. En medio acuoso, a pH fisiológico, este orden cambia a: ácido ferúlico > ácido cafeico > ácido dihidrocafeico > ácido p-cumárico > ácido 1-metil úrico > cafeína > teobromina > 1- metilxantina > teofilina > paraxantina. En este último caso los ácidos fenólicos se encuentran entre los mejores protectores reportados hasta el momento. Con base a los datos obtenidos, se puede llegar a pensar que la actividad antioxidante del café es debida en mayor medida a los ácidos fenólicos que a los compuestos de la familia de la cafeína.

Abstract

This theoretical work presents the potential role of different compounds present in coffee as chemical protectors against oxidative stress. Two families of compounds were studied to that purpose. The first one is the caffeine family, including caffeine, theobromine, theophylline, paraxantine, 1-methylxanthine, and 1-methyl uric acid. The second one includes the following phenolic acids: caffeic acid, its metabolite dihydrocaffeic acid, ferulic acid, and p-coumaric acid. The study was carried out modeling aqueous and lipid media, and considering different reaction mechanism including H transfer, electron transfer, and radical adduct formation; the scavenging activity was studied with respect to different free radicals which are representative of those involved in oxidative damage to living organisms ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, $\cdot\text{OOH}$ and $\cdot\text{OOCH}_3$). It was found that the polarity of the environment, the pH in aqueous solution, and the chemical nature of the reacting free radicals, all influence the overall antioxidant activity of the studied compounds, as well as the relative importance of the different reaction mechanism on such activity. The contributions of the different mechanisms and reaction sites to the overall activity of the studied compounds were quantified. A detailed analysis of the order of protection among the above-mentioned compounds, and also compared with other antioxidants, is provided based on kinetic considerations. The activity order in non-polar media was found to be: dihydrocaffeic acid > caffeic acid > ferulic acid > p-coumaric acid > 1-methyl uric acid > theobromine > caffeine > theophylline > 1- methylxanthine > paraxantine. In aqueous solution, at physiological pH the order changes to: ferulic acid > caffeic acid > dihydrocaffeic acid > p-coumaric acid > 1-methyl uric acid > caffeine > theobromine > 1- methylxanthine > theophylline > paraxantine. In the last case the phenolic acids are among the best protectors reported so far. Considering the gathered data altogether it can be concluded that the role of the phenolic acids on the antioxidant activity of coffee is more important than that of the caffeine-related compounds.

1. Introducción

Ante el incremento de la esperanza de vida a nivel mundial se han elevado los costos de servicios médicos y asistenciales, puesto que muchas personas en edad avanzada sufren un proceso de envejecimiento patológico ligado a enfermedades crónico-degenerativas y déficits funcionales de larga duración. Por otro lado, numerosos estudios sugieren que se podría combatir dicho envejecimiento, o al menos muchos de sus efectos, si se consumieran dietas ricas en antioxidantes. Así sería posible proteger más eficazmente al organismo contra el estrés oxidativo, que contribuye al envejecimiento tanto normal como acelerado y tiene un papel importante en una gran cantidad de procesos degenerativos ligados a éste.

El estrés oxidativo no es más que un estrés químico causado por un desbalance del delicado equilibrio entre los procesos que producen radicales libres y aquellos que los consumen, causando daños a moléculas de indiscutible importancia biológica como proteínas o ADN. El primer trabajo que aborda el tema de los radicales libres se debe a Raab¹, que mostró que algunos colorantes, inocuos en condiciones normales, se vuelven tóxicos en presencia de oxígeno y luz intensa. Esta observación llevó a Mulliken² a proponer que el oxígeno puede adoptar un “estado de excitación” o activación mediante un cambio de su estructura electrónica. Este cambio pasa al oxígeno de su estado base triplete a un estado excitado singulete, el cual en reacciones posteriores produce especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), entre las que se incluyen, entre otras, al anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$), los radicales peroxilo ($\bullet OOR$), alcoxilo ($\bullet OR$), etc.³

Las ROS tienen un papel esencial en diversos procesos biológicos benéficos, como, por ejemplo, en el proceso de maduración de las estructuras celulares.⁴ También están involucrados en el sistema de defensa; los fagocitos los liberan para destruir microbios patógenos,^{5,6} participan en sistemas de señalización celular,^{5,7,8} en la apoptosis de las células defectuosas,^{9,10} entre muchos otros. En resumen, los radicales libres cuando se encuentran en concentraciones de bajas a moderadas son esenciales para el buen funcionamiento del organismo humano y a estas concentraciones se les llama saludables.

Sin embargo, las células de los organismos aerobios requieren que éstos dispongan de numerosos mecanismos antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, para regular la relación producción-consumo de las ROS, protegiendo contra los posibles daños causados por reacciones oxidativas no programadas. Ya en 1945 Dam y Granados¹¹ habían demostrado la importancia de los mecanismos antioxidantes para prevenir la excesiva peroxidación de las grasas, al observar que se acumulan peróxidos de lípido en el tejido adiposo de animales deficientes de vitamina E. Por otra parte, la identificación de lípidos peroxidados en aortas humanas tiene gran interés en relación con el papel de la peroxidación de grasas en el envejecimiento patológico.¹² Casi simultáneamente Dubouloz y Dumas^{13,14} demostraron que los lípidos peroxidados también se forman en la piel expuesta a agentes físicos agresivos externos como son las radiaciones X y ultravioleta, llegando a la conclusión de que estos peróxidos están estrechamente ligados a los procesos inflamatorios, lo que explica por qué casi todos los antioxidantes muestran una marcada acción antiinflamatoria.

Desde el punto de vista fisiológico, el daño causado por las ROS a moléculas de alta importancia biológica tales como el ADN,¹⁵ puede causar mutaciones del genoma nuclear y procesos neoplásicos,¹⁶ los cuales están ligados a alteraciones propias de procesos neurodegenerativos tales como la arteriosclerosis,¹⁷⁻²⁰ la enfermedad de Parkinson,²¹ y el mal de Alzheimer.²²⁻²⁷ Aunado a lo anterior, este daño ha sido identificado como una de las principales causas de ciertos tipos de cáncer,²⁸⁻³¹ y de muchas enfermedades cardiovasculares.³²⁻³⁶ Todo esto contribuye al gradual descenso del rendimiento bioenergético y funcional, disminuyendo la calidad de vida.^{37,38} Por todo ello, los mecanismos prooxidantes y antioxidantes tienen una gran importancia en el envejecimiento y procesos patológicos relacionados. Es por esto que la búsqueda de formas eficientes para combatir el estrés oxidativo es un tema de gran interés y actualidad.

Una de las formas de combatir este estrés químico es mediante la acción antioxidante de compuestos que actúen como atrapadores de radicales libres, ya que la mayor parte de las ROS tienen esta naturaleza química. Muchos productos naturales aportan estos beneficios. Entre ellos destaca la infusión obtenida a partir del café, que además de ser una de las bebidas más consumidas en el mundo, tiene también propiedades antioxidantes.³⁹⁻⁴² De hecho se ha propuesto que es la fuente fundamental de aporte de

antioxidantes en la dieta humana a nivel mundial.⁴³ Sin embargo, como es el caso de muchos productos naturales, en el café hay presentes una gran variedad de compuestos químicos que podrían o no ser responsables de su acción antioxidante. Por lo que es deseable identificar cuáles de estos compuestos pueden actuar de forma más eficiente para combatir el estrés oxidativo, así como cuantificar su actividad. Una de las formas de contrastar la eficiencia antioxidante es mediante el uso de las siguientes propiedades deseables en un antioxidante ideal:^{44,45}

- No puede ser tóxico; ni antes ni después de reaccionar.
- Debe ser versátil, capaz de reaccionar con una gran variedad de radicales libres.
- Debe ser de amplia distribución en el organismo y estar presente en cantidades adecuadas, ser capaz de cruzar barreras fisiológicas y ser de fácil transporte a través de las células.
- Debe encontrarse disponible, ya sea que se produzca de forma endógena o sea adquirido por medio de fuentes exógenas, como la dieta o suplementos alimenticios.
- Debe reaccionar con números pares de radicales libres para así detener la cadena de reacción, o bien que sus productos de oxidación sean menos perjudiciales que el radical que está combatiendo.
- Es deseable que la acción antioxidante continúe después de ser metabolizado.

Debido a la gran variedad de compuestos presentes en el café, se espera que algunos de ellos cumplan con la mayoría de estas propiedades. Dentro de los compuestos más abundantes en el café se encuentran cafeína, ácidos fenólicos, proteínas, amino ácidos, carbohidratos, lípidos y polifenoles.⁴⁶ Es importante señalar que la cantidad en que los diferentes compuestos se encuentran en las bebidas que consumimos dependerá de la variedad de cultivo, del tostado del grano e incluso de la preparación de la infusión. Esta diferencia se hace muy notable para la cantidad presente de cafeína, ya que los granos de la variedad robusta contiene 2.2% de peso en promedio, mientras la arábica contiene el 1.20%,⁴⁷ de ahí el mayor amargor de la primera (Tabla 1). Además durante el proceso de tostado de los granos, requerido para la elaboración de las bebidas de café, el ácido clorogénico, que es considerado un excelente antioxidante,⁴⁸ se degrada formando ácido

cafeico y ácido quínico. Se ha propuesto que el primero continua presentando una acción antioxidante, no así el segundo.⁴⁶

Tabla 1. % (en peso) de los compuestos del café⁴⁷

% (en peso) de los compuestos del café	Variedad Arábica	Variedad Robusta
Polifenoles	5.90	7.75
Aminoácidos totales	0.21	0.22
Acido clorogénico	3.60	4.30
Cafeína	1.23	2.36

La cafeína (CAF), que es probablemente el compuesto más representativo del café, fué descubierta en 1819 por Ruge⁴⁹ y su estructura química (Figura 1) determinada por Robiquet en 1821.⁵⁰ Su fórmula global es $C_8H_{10}N_4O_2$, su nombre IUPAC es: 1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6(3H,7H)-diona. Es un alcaloide de la familia de las xantinas, y en estado puro es un polvo blanco muy amargo. Se ha propuesto que la función de la cafeína en el reino vegetal es actuar como pesticida natural.⁵¹ Cuando la cafeína es metabolizada en el hígado se forman sus metabolitos paraxantina (PAR; 1,7-dimetil-3H-purina-2,6-diona), teobromina (THB; 3,7-dimetilpurina-2,6-diona) y teofilina (THP; 1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona). Por su parte, la 1-metilxantina (MXT; 1,-metil-7H-purina-2,6-diona) y el ácido 1-metil úrico (MUA; 1-Metil-2,6,8-trihidroxipurina-2,6-diona), se forman a partir de PAR (Figura 1).^{52,53}

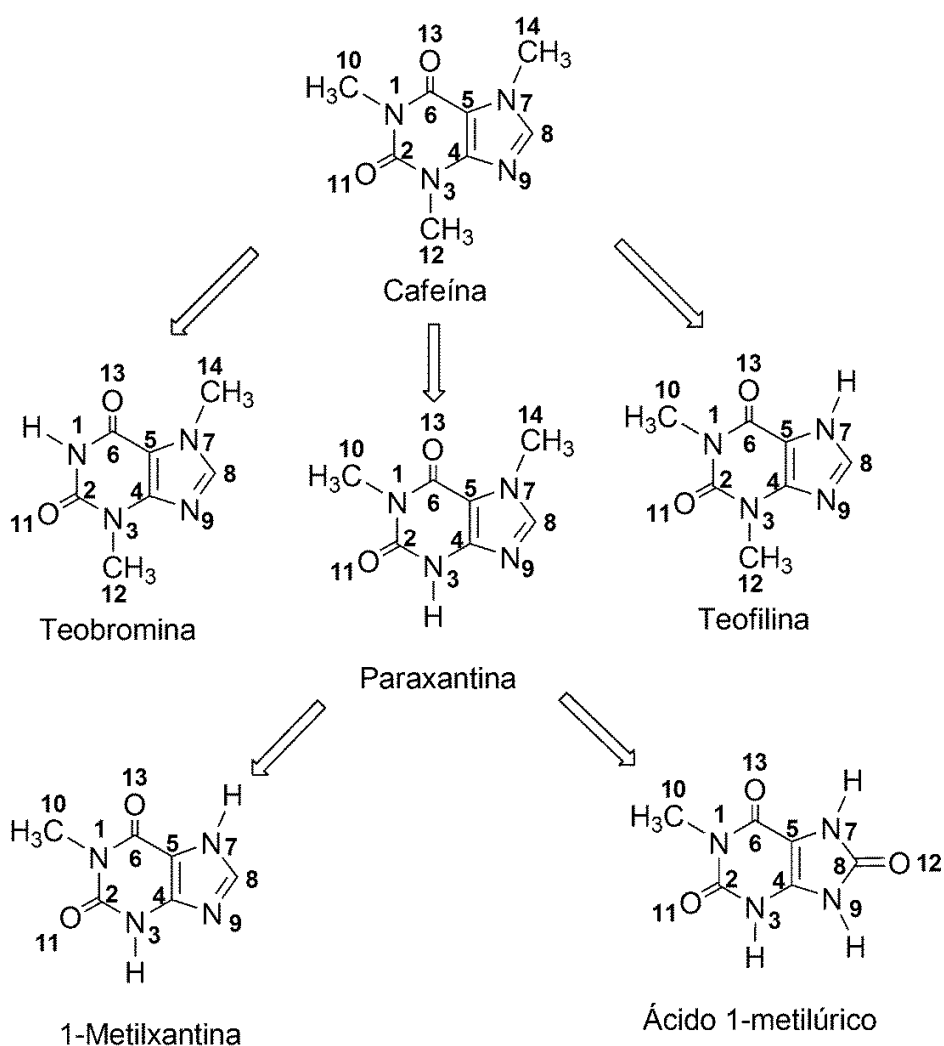


Figura 1. La cafeína y sus metabolitos.

Aunque estudios previos³⁹⁻⁴⁰ han propuesto que los componentes del café y sus metabolitos pueden actuar eficientemente como antioxidantes, aun no hay un consenso al respecto. De hecho las conclusiones de Lee,⁵⁴ las cuales deslindan a la CAF de una posible acción antioxidante, entran en franca contradicción con la propuesta de que este compuesto pueda jugar este papel como antioxidante.³⁹⁻⁴⁰ Esto indica que son necesarios más estudios, no sólo para intentar elucidar la aparente contradicción con respecto a CAF, sino además para identificar cuáles de los compuestos presentes en el café tienen la mayor actividad. Otro aspecto relacionado con la actividad antioxidante de los compuestos presentes en el

café del que aún no se tiene suficiente información es el mecanismo mediante el cual éstos actúan.

Hasta el momento sólo hay dos trabajos en este sentido que han identificado a la 8-oxocafeína⁴² y al ácido N-dimetilparabinoico⁵⁵ como productos de oxidación de la cafeína. El único trabajo hasta el momento que propone un posible mecanismo para la reacción entre la cafeína y el radical $\bullet\text{OH}$ se debe a Dalmázio y colaboradores.⁵⁵ Estos autores propusieron que la oxidación inicial ocurre por adición del $\bullet\text{OH}$ al doble enlace $\text{C}_4=\text{C}_5$ de CAF (Figure 1). Sin embargo en el mismo trabajo hacen énfasis en no descartar otras posibilidades y en la necesidad de realizar más estudios en el tema.

Adicionalmente a los compuestos de la familia de la cafeína, también se ha propuesto que los ácidos fenólicos presentes en el café son buenos antioxidantes.⁵⁶⁻⁵⁷ Entre éstos se encuentran los que se estudian en el presente trabajo: el ácido cafeico (H_2Cfc ; 3-(3,4-dihidroxifenil) 2- ácido propenoico), el ácido ferúlico (H_2Frc ; (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) ácido 2-propenoico), y el ácido *p*-cumárico (H_2Cmc ; (E)-3-(4-hidroxifenil) ácido 2-propenoico). Estos compuestos también se conocen como derivados del ácido hidroxicinámico (HCAD, por sus siglas en inglés). Los HCAD se han reportado como inhibidores de la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), con el siguiente orden de reactividad para los compuestos estudiados en este trabajo: ácido caféico (H_2Cfc) > ácido ferúlico (H_2Frc) > ácido cumárico (H_2Cmc).⁵⁸⁻⁶² El mismo orden de reactividad se encontró para su capacidad de reducción^{63,64} y sus reacciones con los radicales peroxilo ($\text{ROO}\bullet$),^{62,65,66} oxígeno singulete,⁶⁷ anión radical superóxido,⁶⁸ y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).^{69,70}

En otros estudios, que no incluían H_2Cmc , también se propone que el H_2Cfc tiene una mayor capacidad antioxidante que H_2Frc .⁷¹⁻⁷⁴ La mayor actividad de H_2Cfc en comparación con la de H_2Frc y H_2Cmc se ha explicado con base a la presencia del grupo catecol.^{58,60,71} En contraste, se ha reportado que en solución acuosa la capacidad antioxidante, referida como equivalente en Trolox (TEAC) de H_2Frc es aproximadamente 1.5 veces mayor que la de H_2Cfc .⁷⁵ También se encontró que el H_2Frc reacciona más rápidamente que H_2Cfc en solución de ácido linoléico y con el método de blanqueo de β -caroteno.^{63,68,69} Además, se ha demostrado que se pueden obtener diferentes órdenes de reactividad según el método particular utilizado para estimar la capacidad antioxidante

relativa.^{26,76} Más aún, algunas de estas pruebas sólo miden la actividad antioxidante a través de la transferencia de un átomo de H (HT), mientras que otras miden dicha actividad por su capacidad de transferencia electrónica (SET).⁷⁷ Por lo tanto, la comparación de la actividad relativa de diferentes compuestos no siempre es sencilla.

El ácido dihidrocafeico (H₂Dhc; 3-(3,4-dihidroxifenil) ácido propionico), si bien no es un compuesto presente en el café, sí es uno de los principales metabolitos del H₂Cfc. Se ha reportado que su actividad es mayor que la del H₂Cfc para mejorar la estabilidad oxidativa de la manteca de cerdo, menos eficaz para prevenir la oxidación de LDL, y similar para desactivar DPPH y radicales peroxilo.⁷⁸ Por el contrario, Silva y col.⁷⁹ encontraron la tendencia opuesta para DPPH, es decir que H₂Dhc es más potente que H₂Cfc. Más recientemente, se reportó que la reactividad de H₂Cfc y H₂Dhc hacia radicales peroxilo es casi idéntica en solución homogénea de clorobenceno, mientras que en vesículas grandes de fosfatidilcolina unilaminar, a *pH* = 7.2, el H₂Cfc reacciona 5 veces más rápido.⁸⁰

Dado que la principal diferencia estructural entre H₂Cfc y H₂Dhc es la cadena lateral (Figura 2), la influencia de esta cadena en la reactividad de estos dos compuestos parece ser de vital importancia. Moon y Terao⁷⁸ encontraron que dicha diferencia estructural puede afectar a la eficacia antioxidante, dependiendo del medio, pero que no es responsable de la actividad inherente de estos compuestos. Los resultados reportados por Silva y col.⁷⁹ también apoyan que la cadena etilénica lateral puede no ser un factor importante sobre la capacidad antirradicálica de estos compuestos. Sin embargo, Amorati y col.⁸⁰ propusieron que puede tener alguna relevancia, ya que juega un papel en la fortaleza del enlace O-H fenólico. Un efecto similar fue descrito en el mismo trabajo para el grupo -CH₂-CH₂-. Por lo tanto, el papel de la cadena lateral en la actividad antirradicálica de los HCAD, si lo hubiera, todavía no ha sido completamente establecido.

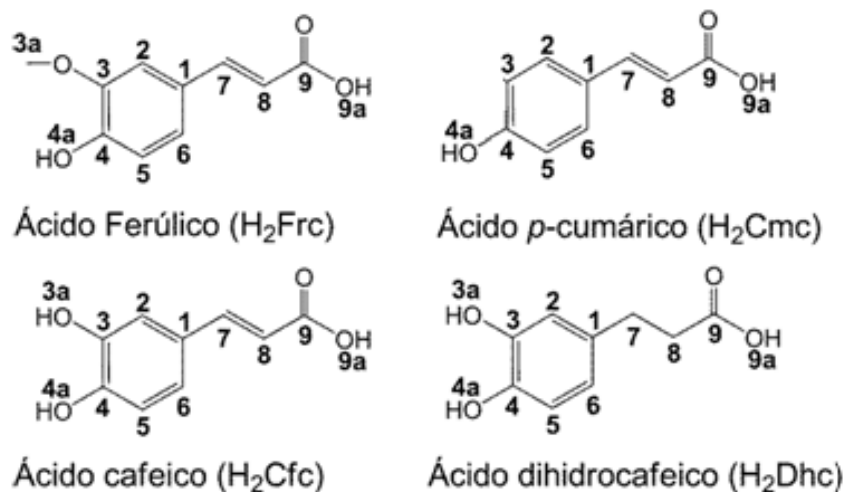


Figura 2. Ácidos fenólicos presentes en el café.

Analizando lo descrito anteriormente se hace evidente que aún quedan muchas incógnitas sin resolver en cuanto a la actividad antioxidante de los compuestos de café se refiere. Es por ello, que la presente investigación está dirigida a aportar nueva información fisicoquímica al respecto. Principalmente nos enfocaremos a identificar la capacidad antioxidante relativa de los compuestos anteriormente mencionados (Figuras 1 y 2). Investigaremos además los mecanismos de reacción más importantes involucrados en su actividad protectora, así como la reactividad de los posibles sitios de reacción. También estudiaremos la influencia del medio sobre todos los aspectos anteriores, tanto la polaridad de la solución como el *pH* en solución acuosa.

2. Marco Teórico

Para el estudio de sistemas químicos, lo que se necesita obtener son valores promedio o esperados de las propiedades de interés. Actualmente se disponen de métodos teóricos para este propósito. Ellos componen una rama de la química relativamente nueva conocida como *química teórica*, y de ella se desprende una rama que se encarga de llevar a cabo los cálculos, conocida como *química computacional*, con la cual casi cualquier aspecto de la química puede ser descrito de manera cualitativa o semi- cuantitativa mediante un esquema computacional adecuado.

Los métodos de cálculo mecánico-cuánticos más empleados en química suelen dividirse en dos grandes grupos, atendiendo a que empleen o no parámetros empíricos en sus algoritmos. Los primeros son los conocidos como métodos semiempíricos y los segundos como *ab-initio*. Por otra parte la división en semiempíricos y *ab-initio* no es siempre clara, en el caso concreto de los métodos basados en la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) es un asunto polémico su clasificación en uno de los dos grupos anteriores, pues si bien muchos de ellos emplean parámetros empíricos para el cálculo de las energías de intercambio y correlación, todas las integrales electrónicas se calculan sin emplear parámetros, y además hay aproximaciones dentro de esta teoría que no usan ningún parámetro empírico. Es por esta razón que en esta revisión los tratamos en epígrafe aparte sin incluirlos ni en un grupo ni en otro.

Sobre la base del desarrollo de la mecánica cuántica, los primeros cálculos teóricos en química fueron los de Walter Heitler y Fritz London en 1927. Entre los libros que influenciaron los inicios de la química computacional se incluyen: *Introduction to Quantum Mechanics – with Applications to Chemistry* de Linus Pauling y E. Bright Wilson, 1935; *Quantum Chemistry* de Henry Eyring, John Walter y George Kimball, 1944; *Elementary Wave Mechanics – with Applications to Quantum Chemistry* de Walter Heitler, 1945 y más tarde el libro *Valence* de Charles Coulson, los cuales sirvieron de referencia primaria para los químicos en décadas posteriores.

Con el desarrollo de tecnología computacional eficiente en los años cuarenta, las soluciones de ecuaciones de onda elaboradas para sistemas atómicos complejos comienzan

a ser un objetivo realizable. A comienzos de los años cincuenta se llevaron a cabo los primeros cálculos de orbitales atómicos semi-empíricos y un buen número de usuarios de las primeras computadoras digitales fueron los químicos teóricos. El primer cálculo molecular *ab initio* fue realizado con el método de Hartree-Fock para moléculas diatómicas, el cual se llevó a cabo en 1956 en el Instituto Tecnológico de Massachusetts usando un conjunto de funciones de base del tipo orbitales de Slater. El primer cálculo poliatómico usando funciones Gaussianas se llevó a cabo a finales de los años cincuenta. Los primeros cálculos de interacción de configuraciones fueron realizadas en Cambridge en el computador EDSAC en los años cincuenta por S. Francis Boys y sus colaboradores, usando funciones Gaussianas.⁸¹ Las moléculas más grandes calculadas hasta 1971, fueron la naftalina y el azuleno.⁸²⁻⁸⁴

A principios de los años setenta, comienzan a ser utilizados programas computacionales eficientes tales como ATMOL, Gaussian, IBMOL y POLYAYTOM para acelerar los cálculos *ab initio* de orbitales moleculares. De estos programas sólo Gaussian, masivamente expandido, está aún en uso, siendo uno de los tantos utilizados hoy en día.

Una de las primeras veces que se usó el término "química computacional" fue en el libro *Computers and Their Role in the Physical Sciences* de 1970, escrito por Sidney Fernbach y Abraham Haskell Taub, donde dicen: "Parece, por lo tanto, que la 'química computacional' puede finalmente ser más y más una realidad".⁸⁵ El primer volumen de la revista *Computers and Chemistry* fue publicado en 1976.

Actualmente, una de las mejores opciones para realizar los cálculos de estructura electrónica es la Teoría de Funcionales de la Densidad (Anexo I), la cual representa un excelente compromiso entre tiempo de cómputo y calidad de los resultados. Si bien es cierto que para dicho efecto se debe tener en cuenta que los cálculos también dependen de los conjuntos de funciones de base (Anexo II) que se utilicen, así como el funcional de la densidad que se utilice en cada caso.

En el presente trabajo se utilizó el funcional M05-2x,⁸⁶ el cual es un funcional que puede ser clasificado como meta-GGA ya que incorpora la densidad de espín-electrón, el gradiente de la densidad, el laplaciano de la densidad, la densidad de la energía cinética y el

intercambio exacto o Hartree-Fock (HF). El funcional M05-2X es un funcional altamente no local, con más del 50% de intercambio HF, y fue parametrizado esencialmente para no metales. En la parametrización de este funcional se incluyeron una gran cantidad de propiedades (Anexo III). A partir de dichas propiedades se obtuvieron los parámetros propios de este funcional, el cual contiene 23 parámetros empíricos, uno de los cuales es precisamente la cantidad de intercambio HF. Este funcional ha sido recomendado por sus desarrolladores para cálculos de propiedades termodinámicas y cinéticas, ya que los resultados obtenidos para la descripción de dichas propiedades muestran errores pequeños con respecto a los datos experimentales y menores que los de otros funcionales (Anexo IV). El M05-2X también se ha utilizado con éxito por autores independientes para estudiar una amplia variedad de sistemas químicos.⁸⁷⁻⁹³ Es importante destacar que el funcional M05-2X se encuentra dentro de los funcionales con mejor desempeño para describir sistemas de capa abierta,^{91,94,95} que son el objeto de estudio central del presente trabajo.

3. Hipótesis de trabajo.

En base a la estructura de la cafeína y sus metabolitos, así como de los ácidos fenólicos presentes en el café, se asume que estos compuestos pueden ser eficientes como antioxidantes.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar la acción antioxidante de diferentes compuestos presentes en el café y de algunos de sus principales metabolitos.

4.2 Objetivos particulares

1. Identificar el mecanismo predominante en la acción antioxidante de la cafeína, sus metabolitos así como de los ácidos fenólicos presentes en el café.
2. Establecer la eficiencia relativa como antioxidantes de la cafeína y sus metabolitos, así como de los ácidos fenólicos presentes en el café.
3. Establecer la influencia del medio en el mecanismo predominante de la acción antioxidante de los compuestos antes mencionados, incluyendo tanto la polaridad, como el *pH* en solución acuosa.
4. Proponer un orden para la eficiencia antioxidante los compuestos estudiados, identificando aquellos mayormente responsables de la actividad antioxidante del café.
5. Proponer un orden para la eficiencia antioxidante de los compuestos presentes en el café con respecto a otros antioxidantes.

5. Metodología de cálculo

Para la cafeína y sus metabolitos las optimizaciones de geometría y los cálculos de frecuencias fueron realizados usando el paquete computacional Gaussian 03⁹⁶ haciendo uso del funcional M05-2X y la base 6-31+G(d). Los puntos estacionarios fueron modelados en fase gas, y los efectos de solvente se incluyeron *a posteriori* mediante cálculos de punto simple, usando el modelo de solvatación continuo PCM.⁹⁷ Éste modela los efectos del solvente utilizando cargas electrostáticas puntuales e incluye en el modelado, entre otras propiedades, constantes dieléctricas y el área superficial accesible al solvente. Estos cálculos se realizaron a nivel HF/6-31+G(d, p), con las opciones SCFVAC y radii=UAHF que era la estrategia óptima recomendada para obtener energías libres de solvatación en el manual de usuario del programa utilizado. Esta recomendación se basa en el desempeño obtenido en el estudio de una amplia variedad de sistemas en solución y se debe probablemente a que la parametrización de PCM implementada en este código se realizó a este nivel de cálculo. Se utilizó agua y benceno como solventes, para modelar ambientes polares y no polares, que son los medios en los cuales ocurrirían las reacciones en los organismos vivos. Si bien el benceno no es el mejor de los disolventes posibles para imitar el ambiente lipídico era la mejor opción en el momento en que se realizó esta parte del estudio. Además tampoco está tan alejado de lo que se quiere modelar e incluso se utiliza en algunas investigaciones experimentales.

Para el caso de los ácidos fenólicos, todos los cálculos se realizaron con el paquete de programas Gaussian 09.⁹⁸ Tanto las optimizaciones de geometría como los cálculos de frecuencias se realizaron en solución con agua y pentiletanoato como solventes. El uso del pentiletanoato como solvente es para modelar de mejor manera el medio lipídico presente en los organismos vivos. Este solvente es mejor modelo que el benceno para este propósito (tanto en lo que se refiere a constante dieléctrica como a tamaño y densidad), pero no estaba disponible en Gaussian 03. Todos los cálculos se realizaron a nivel M05-2X/6-311++G(d, p) con el modelo de solvatación continuo SMD.⁹⁷ En este modelo, una de las características principales es que los valores de los parámetros de la tensión superficial son optimizados de forma semiempírica contra una gran cantidad de datos experimentales (en diferentes solventes y para especies de diferente carga); también se toman en cuenta los valores de conectividad de los enlaces entre átomos, cuya definición requiere del uso de

campos de fuerza; adicionalmente toma en cuenta una gran cantidad de propiedades como la densidad de carga, índice de refracción, energía libre en solución en base a parámetros de acidez, entre otras. Además en lugar de usar cargas puntuales en la superficie de la cavidad (como PCM) utiliza densidades de carga.

El uso de diferentes metodologías de cálculo se debe a que al inicio de la presente investigación aún no se contaba con el Gaussian 09. En su versión anterior (Gaussian 03) la implementación para realizar cálculos de optimización de geometrías y frecuencias en solución, era relativamente ineficiente. Estos cálculos eran computacionalmente muy costosos y con frecuencia presentaban errores de convergencia. De hecho el manual de usuario de Gaussian 03 recomendaba justamente la metodología usada en la primera parte de este trabajo (cafeína y sus metabolitos), es decir realizar las optimizaciones de geometría y los cálculos de frecuencias en fase gas y obtener las energías de solvatación mediante el cálculo de puntos simples en solución (con las opciones antes mencionadas). Además en la versión 03 aún no estaba implementado el modelo SMD. Para la segunda parte de este trabajo (ácidos fenólicos) ya se contaba con la versión 09 por lo que se cambió a la mejor estrategia de cálculo disponible. Nuevamente utilizando las recomendaciones de los desarrolladores, que en este caso son obtener las energías en solución con el modelo SMD. La forma detallada en la que el programa calcula las correcciones termodinámicas está descrita en el Anexo V, en donde también se hace una revisión de la forma en que se calculan las energías libres de solvatación con los modelos continuos utilizados.

Vale la pena destacar que los resultados directamente obtenidos de los códigos disponibles corresponden siempre al estado estándar 1 atm aunque se realicen en solución, sin embargo para el estudio de sistemas en solución el estado estándar relevante es 1M. Por lo que dicha conversión es necesaria en nuestro caso. Dado que K_p y K_c están relacionadas por medio de:

$$K_p = K_c (V_M)^{\Delta n}, \quad \text{Ec. 1}$$

donde Δn representa el cambio de molaridad a través de la reacción, V_m representa el volumen molar y K_p y K_c son las constantes de equilibrio en unidades de presión y concentración respectivamente. En nuestro caso $\Delta n = -1$ para reacciones bimoleculares de adición y para la formación de los TSs por lo que:

$$K_C = K_P V_M, \quad \text{Ec. 2}$$

$$e^{-\Delta G^{1M}/RT} = e^{-\Delta G^{1atm}/RTV_m}, \quad \text{Ec. 3}$$

donde R es la constante universal de los gases y T la temperatura en K. De la expresión anterior es evidente que:

$$\Delta G^{1M} = \Delta G^{1atm} - RT \ln(V_M), \quad \text{Ec. 4}$$

Dicha conversión disminuye las ΔG s en 1.89 kcal/mol a 298.15 K. Adicionalmente, se incluyeron las correcciones propuestas por Benson para fase líquida,⁹⁹ que es necesaria para evitar sobreestimar las pérdidas de entropía en los casos antes mencionados y es conocida como corrección de volumen libre. Esta corrección en particular no está incluida en ninguno de los métodos de solvente disponibles. De acuerdo a esta aproximación, el cociente entre las reacciones en fase gas y en solución en solventes está dada por:

$$r \cong \frac{n10^{(2n-2)}}{e^{(n-1)}}, \quad \text{Ec. 5}$$

donde n representa el número de moles totales de los reactivos ($n=2$ para el caso de reacciones bimoleculares). Dado que el autor asume previamente que:

$$r \cong \frac{K_x^{sol}}{K_x^{gas}} \equiv \frac{e^{-\Delta G^{sol}/RT}}{e^{-\Delta G^{gas}/RT}}, \quad \text{Ec. 6}$$

La combinación de las expresiones anteriores lleva a:

$$\Delta G^{sol} \cong \Delta G^{gas} - RT \{ \ln[n10^{(2n-2)}] - (n-1) \}, \quad \text{Ec. 7}$$

y de acuerdo con la expresión anterior ΔG^{sol} decrece 2.54 kcal/mol para reacciones bimoleculares a 298.15 K, con respecto a la ΔG^{gas} tomando en cuenta la corrección del volumen libre. Esta aproximación es idéntica a la corrección conocida como efecto caja del solvente propuesta por Okuno¹⁰⁰ y ha sido usada de forma exitosa por otros autores.¹⁰¹⁻¹⁰³

Para los cálculos de constantes de velocidad se utilizó la teoría convencional del estado de transición (TST):^{104,105}

$$k = \sigma \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-(\Delta G^\ddagger)/RT}, \quad \text{Ec. 8}$$

donde k_B y h son las constantes de Boltzman y Planck, ΔG^\ddagger es la energía libre de activación, σ es la degeneración de caminos de reacción y κ la corrección de tunelaje. Las correcciones de tunelaje, definidas como el promedio de Boltzmann del radio de las probabilidades cuánticas y clásicas, fueron calculadas usando la aproximación de cero-curvatura.¹⁰⁶

En el caso de los mecanismos que involucran transferencias electrónicas se utilizó la teoría de Marcus¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ para obtener ΔG^\ddagger según:

$$\Delta G_{ET}^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{ET}^0}{\lambda} \right)^2, \quad \text{Ec. 9}$$

donde λ es la energía de reorganización nuclear.

Algunas de las constantes calculadas (k) fueron encontradas cercanas al límite por difusión. De acuerdo a esto, la constante de velocidad aparente (k_{app}) no puede obtenerse directamente de cálculos de TST, sino que hay que tener en cuenta los efectos de la difusión de los reactivos a través del solvente. En este trabajo se usó la teoría de Collins-Kimball para dicho propósito.¹¹⁰

$$k_{app} = \frac{k_D k_{act}}{k_D + k_{act}}, \quad \text{Ec. 10}$$

donde k_{act} es la constante de velocidad térmica (la obtenida de los cálculos de TST), y k_D es la constante de difusión que se obtuvo usando la aproximación del estado estacionario de Smoluchowski¹¹¹ para una reacción bimolecular irreversible controlada por difusión:

$$k_D = 4\pi R D_{AB} N_A, \quad \text{Ec. 11}$$

donde R denota la distancia de reacción, N_A es el número de Avogadro, y D_{AB} es el coeficiente de difusión mutua de los reactivos A (Radical) y B (Antioxidante). D_{AB} se calculó a partir de los coeficientes de difusión individuales D_A y D_B de acuerdo a la referencia.¹¹² D_A and D_B se obtuvieron a partir de la aproximación de Stokes-Einstein^{113,114}:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}, \quad \text{Ec. 12}$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, a es el radio del soluto y η denota la viscosidad del solvente. Para los cálculos aquí realizados, sus valores son: agua ($\eta = 8.91 \times 10^{-4}$ Pa s), benceno ($\eta = 6.04 \times 10^{-4}$ Pa s) y pentiletanoato ($\eta = 8.62 \times 10^{-4}$ Pa s).

6. Antecedentes.

La teoría de funcionales de la densidad ha demostrado ser una herramienta muy eficiente para el estudio de las reacciones químicas relacionadas con el estrés oxidativo. Sólo en nuestro grupo ha servido para numerosas investigaciones en este campo. Algunos ejemplos son: para elucidar el mecanismo antioxidante de la curcumina;¹¹⁵ para identificar el sitio más probable de daño oxidativo a la guanosina;¹¹⁶ para estudiar la acción antioxidante relativa de los carotenoides ante diferentes radicales libres;^{117,118} para demostrar la eficiencia de nuevos fármacos propuestos como excelentes antioxidantes;¹¹⁹ e incluso para proponer a los nanotubos de carbono como trampas de radicales libres.¹²⁰ En cuanto a los compuestos que deseamos estudiar, hay un trabajo previo que utiliza una metodología similar a la aquí propuesta, en el cual se evaluó la capacidad atrapadora de radicales $\bullet\text{OH}$ del ácido cafeico.¹²¹

Para demostrar la confiabilidad la metodología utilizada, en la obtención de datos cinéticos que es en lo que se basan los análisis comparativos de esta investigación, a continuación se muestran de algunas constantes de velocidad calculadas comparadas con respecto a las obtenidas experimentalmente (Tabla 2).

Como se aprecia en los valores de la tabla, el acuerdo entre los valores experimentales y calculados es excelente. Para cuantificar este acuerdo se hizo la correlación entre los logaritmos de estos valores (Figura 3). Se encontró una muy buena correlación, en la que no sólo $R^2=0.99$, sino que su pendiente es cercana a uno (1.02) y su ordenada al origen cercana a cero (-0.16). Esto demuestra la confiabilidad de esta metodología para el estudio teórico detallado de la actividad antioxidante de diferentes compuestos químicos.

Tabla 2. Comparación entre las k experimentales y teóricas (usando el funcional M05-2X).

Reacción	Base	Calc.	Exp.	Cociente	Ref.
1 Glutación + \bullet OH	6-311+G(d,p)	7.68E+09	1.35E+10	1.8 (-)	122
2 Glutación + \bullet OCH ₃	6-311+G(d,p)	5.89E+08	9.00E+08	1.5 (-)	122
3 Sesamol + \bullet OH	6-311+G(d,p)	2.37E+10	1.10E+10	2.2 (+)	123
4 Sesamol + \bullet OOCCl ₃	6-311+G(d,p)	5.41E+08	3.70E+08	1.5 (+)	123
5 Melatonina + \bullet OH	6-31+G(d)//	1.85E+10	3.04E+10	1.6 (-)	124
	6-311++G(d,p)				
6 Melatonina + \bullet OOCCl ₃	6-31+G(d)//	4.40E+08	2.70E+08	1.6 (+)	124
	6-311++G(d,p)				
7 Capsaicina + ROO \bullet	6-31G(d)//	6.50E+03	5.60E+03	1.2 (+)	125
	6-311+G(d,p)				
8 Tirosoles + ROO \bullet	6-311+G(d,p)	4.30E+03	9.40E+03	2.2 (-)	126
9 Mercaptoetanol + 2'-deoxyuridin-1'-il	6-31+G(d,p)	2.65E+06	2.60E+06	1.02 (+)	127
10 Edaravone + \bullet OH	6-311++G(d,p)	1.35E+10	8.50E+09	1.6 (+)	119

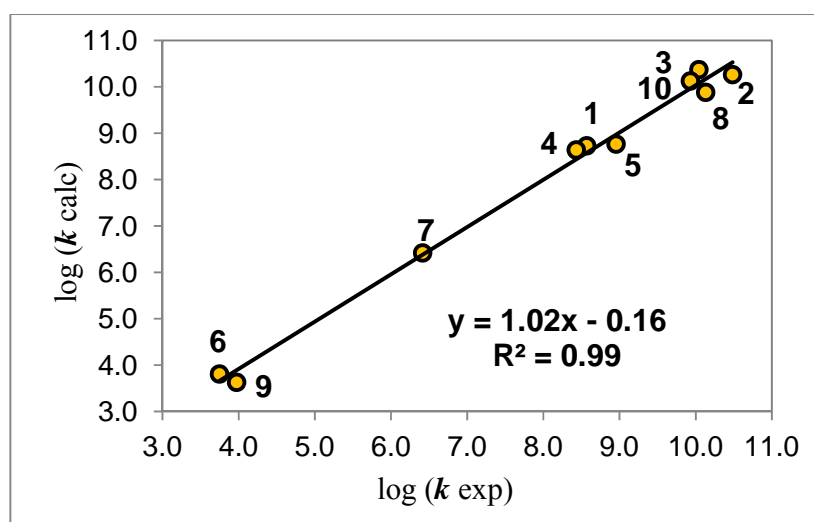


Figura 3. Correlación entre las constantes de velocidad experimentales y teóricas.

7. Resultados y discusión

7.1 Análisis previos.

Uno de los principales aspectos a considerar al realizar este tipo de estudios es verificar si la metodología que se emplea lleva a la obtención de resultados confiables. Como ya se analizó en la sección anterior, los resultados de estudios previos realizados utilizando el funcional M05-2X para otros sistemas están en muy buen acuerdo con los resultados experimentales. Si bien la comparación realizada se basó en resultados cinéticos, es de esperar que otros aspectos, como las geometrías, también fueran descritos correctamente por dicho funcional. Sin embargo, esto debe ser demostrado. En nuestro caso particular se utilizaron 2 estrategias diferentes para la optimización de geometrías, y no se encontraron reportes en la literatura con respecto a la calidad de las geometrías obtenidas con M05-2X para los sistemas a estudiar ni para otros similares. Es por ello que se realizó una investigación previa al respecto, utilizando como especies representativas a la cafeína y el ácido cafeico.

Primeramente se realizó un estudio de las diferencias entre las geometrías obtenidas con el funcional M05-2X y el método de función de onda MP2, que es un método con el cual se obtienen buenas geometrías para sistemas con el tamaño que estudiamos en un tiempo de cómputo razonable, si bien mayor que con DFT. La primera comparación entre los parámetros geométricos se llevó a cabo con el conjunto de funciones base 6-311++G(d,p), para optimizaciones en fase gas. Los valores de desviación absoluta promedio, su porcentaje, así como los valores de las desviaciones máximas y su ubicación dentro de la estructura se reportan en la Tabla 3. Los parámetros geométricos analizados son distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros. Se encontró que las diferencias para las distancias de enlace son prácticamente despreciables, mucho menores a 0.02 Å, lo que representa errores menores al 1% para ambos compuestos. En el caso de la cafeína, la desviación máxima (0.016) se encontró para átomos de los anillos y en el caso del ácido cafeico (0.011) para la distancia del enlace C=O en el grupo carboxilo. Para los ángulos de enlace, si bien las diferencias que se observan son mayores en valor absoluto, éstas siguen siendo pequeñas (menores a 0.5%). La desviación máxima para la cafeína (3.744) se observa entre átomos que se encuentran en la estructura cíclica, y en el ácido cafeico dicha desviación (1.619) corresponde a los carbonos que unen a la estructura

fenólica con la cadena lateral. Finalmente para los ángulos diedros, las desviaciones absolutas promedio son un poco más significativas (aunque < 1.5%) que para los otros dos casos analizados. Aún así estas desviaciones continúan siendo muy pequeñas. Aquí es de notar que para las desviaciones máximas, se observa que el valor mayor (21.902) corresponde al diedro que le da la forma a la unión entre las dos estructuras planas del ácido cafeico (fenol y cadena lateral). Para la cafeína la desviación máxima (9.390) corresponde a un ángulo diedro que da la forma a una unión entre un grupo metilo y la estructura principal. Este análisis demuestra que las geometrías obtenidas para los compuestos estudiados con el funcional M05-2X son confiables y equivalentes a las que se obtendrían con el método MP2 a un costo computacional mucho menor.

Tabla 3. Diferencias entre parámetros geométricos M05-2X/6-311++G(d,p) vs. MP2/6-311++G(d,p) para la cafeína (CAF) y el ácido cafeico (H₂Cfc).

	CAF	H ₂ Cfc
Distancias de enlace		
DAP ^(a)	0.011 (0.87%)	0.007 (0.58%)
DM ^(b)	0.016 (C2,N1)	0.011 (C9,O)
Ángulos de enlace		
DAP	0.920 (0.51%)	0.556 (0.31%)
DM	3.744 (N1,C2,N3)	1.619 (C2,C1,C7)
Ángulos diedros		
DAP	5.287 (1.47%)	4.090 (1.14%)
DM	9.390 (C6,N1,C10,H)	21.902 (C6,C1,C7,C8)

^(a) DAP = Desviación Absoluta Promedio

^(b) DM =Desviación Máxima

Posteriormente se analizó la influencia del tamaño del conjunto de funciones de base en la optimización de las geometrías. Dicha comparación se hizo entre el funcional M05-2X con la base 6-31+G(d), y el mismo funcional con la base 6-311++g(d,p), todos optimizados en fase gas. Los valores de desviación absoluta promedio, su porcentaje, así como los valores de las desviaciones máximas y su ubicación dentro de la estructura se

reportan en la Tabla 4 para los distintos parámetros geométricos. Las desviaciones en promedio son también muy pequeñas. Para las distancias de enlace las desviaciones promedio son menores al 1%. La diferencia máxima (0.015) en el caso de las distancias de enlace en la cafeína corresponde a un enlace C-C en la estructura cíclica, mientras que para el ácido cafeico esta desviación (0.007) corresponde a la distancia C=O en el grupo carboxílico. En el caso de los ángulos de enlace, las desviaciones promedio son menores que las de las distancias de enlace (<0.5%).

Tabla 4. Diferencias entre parámetros geométricos M05-2X 6-31+G(d) vs. M05-2X 6-311++G(d,p) para la cafeína (CAF) y el ácido cafeico (H₂Cfc).

	CAF	H ₂ Cfc
Distancias de enlace		
DAP ^(a)	0.007 (0.60%)	0.003 (0.27%)
DM ^(b)	0.015 (C4,C5)	0.007 (C9,O9a)
Ángulos de enlace		
DAP	0.958(0.53%)	0.053 (0.03%)
DM	1.963 (N1,C2,N3)	0.154 (C3,O4a,H)
Ángulos diedros		
DAP	0.402 (0.11%)	0.005 (0.01%)
DM	0.339 (H,C14,N7,C8)	0.015 (C4, C3,O4a,H)

^(a) DAP = Desviación Absoluta Promedio

^(b) DM =Desviación Máxima

La desviación máxima para la cafeína (1.963) se observa entre átomos que se encuentran en la estructura cíclica, y en el ácido cafeico dicha desviación (0.154) corresponde a los carbonos que unen a la estructura fenólica con la cadena lateral. Para los ángulos diedros las desviaciones promedio son menores que para los casos de los otros parámetros (<0.2%). En la cafeína, la desviación máxima (0.339) corresponde al sitio de la comparación anterior, el cual describe la forma de la estructura en la unión del grupo metilo de la cafeína y la estructura cíclica, mientras que la desviación máxima del ácido cafeico (0.015) corresponde al ángulo que describe la forma de la unión de un grupo fenol con la

estructura cíclica. En base a los datos discutidos podemos concluir que las diferencias de geometrías que surgen al aumentar la base de 6-31+G(d) a 6-311++G(d,p) son prácticamente despreciables, lo que hace que incluso las geometrías obtenidas con la base más pequeña de las aquí utilizadas sean confiables. Esto es congruente con el conocimiento previo que los funcionales de la densidad son menos sensibles al cambio de base que los métodos de función de onda y con el hecho de para la optimización de los parámetros del funcional M05-2X se utilizaron conjuntos de base de tamaño intermedio como los aquí utilizados.

Por último se analizó la influencia del uso del solvente para la optimización de geometrías no sólo de la cafeína y el ácido cafeico, sino también del anión y di-anión de este último, ya que se espera que sus geometrías sean más sensibles a la presencia del solvente. Dicha comparación se hizo entre las geometrías obtenidas con el funcional M05-2X y la base 6-311++G(d,p) en fase gas y en solución acuosa con el modelo SMD (Tabla 5). Las diferencias promedio en el caso de las distancias de enlace son menores para la cafeína que para el resto de los compuestos analizados, y esto se puede atribuir a que los compuestos fenólicos son más susceptibles a la estabilización por la acción de solvatación del agua, debido a la polaridad de este grupo funcional. En cualquiera de los casos anteriores, las diferencias son pequeñas (<0.5% para las distancias, <0.6% para los ángulos y <2% para los diedros). En particular, para el caso de los fenoles, se puede observar una tendencia al incremento en la medida que aumenta el grado de deprotonación, en concordancia con lo reportado por Liptak y col.¹²⁸ para el caso de las distancias de enlace C-O en los sitios fenólicos.

La diferencia máxima en las distancias de enlace se corresponde a uno de los enlaces C-N para la cafeína, mientras que para el ácido cafeico se corresponde al sitio C-O tanto para la forma neutra como para la di-aniónica, y a un enlace C-C de la cadena lateral del mono-anión. Los valores de las desviaciones encontradas en el caso de los ángulos de enlace son similares a las que fueron reportados para las distancias de enlace, sólo se observa una diferencia mayor en la desviación absoluta promedio del anión. Las desviaciones máximas involucran a los mismos sitios que para el caso de las distancia de enlace. Finalmente, el análisis de los ángulos diedros nos lleva a corroborar que las mayores diferencias entre geometrías en fase gas y solución acuosa se corresponden al di-

anión. Las desviaciones máximas involucran ángulos diedros de la unión del grupo metilo con la estructura principal para el caso de la cafeína, y el enlace que describe la unión entre las dos estructuras planas del ácido cafeico, que son la parte fenólica y la cadena lateral. Esto demuestra la importancia de realizar las optimizaciones de geometría de los compuestos de la familia del ácido cafeico en solución acuosa, especialmente cuando la especie reactiva es una forma deprotonada (fenóxido).

Tabla 5. Diferencias entre parámetros geométricos de la optimización en fase gas vs solución a nivel M05-2X 6 -311++g(d,p) (CAF, H₂Cfc, HCfc⁻ y Cfc⁻²).

	CAF	H ₂ Cfc	HCfc ⁻	Cfc ⁻²
Distancias de enlace				
DAP ^(a)	0.003 (0.19%)	0.002 (0.39%)	0.005 (0.39%)	0.007 (0.39%)
DM ^(b)	0.009 (C2,O)	0.006 (C9,O9a)	0.037 (C8,C9)	0.012 (C4,O4a)
Ángulos de enlace				
DAP	0.256 (0.14%)	0.012 (0.53%)	0.968 (0.54%)	1.079 (0.53%)
DM	0.929 (C6,N7,C14)	0.379 (C8,C9,O)	5.167 (O,C9,O9a)	4.399 (C4,O4a,H)
Ángulos diedros				
DAP	0.952 (0.27%)	0.307 (1.53%)	0.308 (0.09%)	0.817 (1.53%)
DM	4.095 (C4,N3,C12,H)	2.189 (C6,C1,C7,C8)	1.228 (C7--C1--C6--H)	4.276 (C6,C1,C7,C8)

^(a) DAP = Desviación Absoluta Promedio

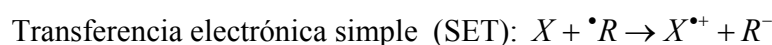
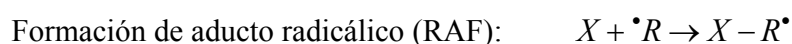
^(b) DM =Desviación Máxima

En base a los datos reportados, puede concluirse que aún en el caso de la familia de la cafeína, para la cual se realizaron las optimizaciones de geometría en fase gas y con una base más pequeña, las geometrías obtenidas son confiables. También es importante destacar

que para compuestos fenólicos la mejor estrategia involucra optimizaciones de geometría en solución (tal como se hizo en la presente investigación) en particular debido a la presencia de aniones en las condiciones de interés.

7.2 *Cafeína y metabolitos*

Las reacciones entre la cafeína y sus principales metabolitos con 4 radicales libres diferentes ($\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OOH}$, $\bullet\text{OCH}_3$, $\bullet\text{OOCH}_3$) han sido modeladas en medios polares y no polares. Estas reacciones representan la posible capacidad atrapadora de radicales libres de estos compuestos, también conocida como actividad antioxidante. Dicha actividad puede llevarse a cabo través de diferentes mecanismos de reacción. Los más comunes para los antioxidantes en general, que son también los que se consideran en este trabajo, son:



(donde X representa al antioxidante y $\bullet R$ al radical libre)

El análisis de la termoquímica de los diferentes mecanismos y sitios de reacción fue lo primero que se investigó para determinar la viabilidad de los procesos químicos. Las energías libres de Gibbs de reacción (ΔG) para todos los canales estudiados se presentan en la Tabla 6. La HT del sitio C8 no ha sido incluida para los compuestos en los que en dicho sitio presentan un H, dado que las energías de disociación de enlace C-H de los enlaces tipo $C(sp_2)\text{-H}$ son alrededor de 10 kcal/mol más altos que los de los enlaces $C(sp_3)\text{-H}$.¹²⁹ Además, según los datos reportados para las reacciones de etileno¹³⁰ y etano¹³¹ con los radicales $\bullet\text{OOH}$, la constante de velocidad para el primero es ~1650 veces más lenta que para el segundo.

Se encontró que el proceso SET es endergónico, tanto en entornos no-polares como polares, para las reacciones de CAF y sus metabolitos con casi todos los radicales estudiados. El único caso en el que se encontró una diferencia marcada con respecto a esta

tendencia es la reacción del AMU con el radical $\bullet\text{OH}$ en medio acuoso, en este caso $\Delta G = -16.66$ kcal/mol. En consecuencia, este mecanismo ha sido descartado para la posible actividad de atrapamiento de radicales libres frente a los radicales hidroxilo, peroxilo, metoxilo y metil-metoxilo, salvo el caso del AMU. Por otra parte, dado que $\bullet\text{OH}$ es el más electrofílico de los radicales centrados en oxígeno¹³², esta conclusión puede ser extendida a cualquier otro radical peroxilo o alcoxilo.

Los procesos RAF han sido modelados para los sitios: C₂, C₄, C₅, C₆ y C₈ (Figura 1), mientras que los procesos HT han sido considerados desde los sitios C₁₀, C₁₂ y C₁₄ y en aquellos en que la estructura de referencia (CAF) presenta desmetilación, siendo entonces procesos HT a partir de los sitios N₁, N₃, N₇ y N₉ (Figura 1). A pesar de que las adiciones radicales a los sitios con N fueron consideradas al principio como posibles canales RAF, todos los intentos realizados para localizar los productos correspondientes, invariablemente condujeron a estructuras que corresponden a complejos débilmente enlazados, en lugar de aductos radicálicos, ya que no hay formación de enlaces entre los fragmentos. Por tanto, estos canales han sido descartados como viables.

Se encontró que las energías de reacción de Gibbs son más dependientes de la naturaleza del radical libre reaccionante, que del metabolito con el cual los radicales están reaccionando. La mayoría de los canales RAF y HT que implican $\bullet\text{OH}$ resultaron ser exergónicos. Para el mecanismo RAF, las excepciones son las adiciones al sitio C₆ para todos los compuestos excepto AMU, y a los sitios C₂ de THB para ambos medios y de CAF y AMU en medio no polar. Para las reacciones HT estudiadas con $\bullet\text{OH}$ el único proceso con $\Delta G > 0$ es el que corresponde al sitio N₁ en THB. Para las reacciones con $\bullet\text{OCH}_3$ se reduce el número de canales exergónicos, en comparación con $\bullet\text{OH}$. Para las reacciones HT de todos los compuestos estudiados con $\bullet\text{OCH}_3$ sólo uno se encontró con $\Delta G > 0$, el que involucra al N₁ en THB, similar a lo que se discutió para las reacciones HT con $\bullet\text{OH}$. Para el caso de RAF, todos los compuestos presentan un sitio de reacción en común para los medios estudiados, el cual es C₈, para el caso de THB se encontró que en medio polar también el sitio C₂ puede ser viable y para el caso del AMU, también se encontraron como sitios posibles de reacción C₄ para ambos medios y C₅ para medio no polar, si bien el valor reportado en esta última reacción en medio polar es apenas endergónico. Si

analizamos esta última consideración, para los demás compuestos también se observa que el sitio C4 es de los que presentan energías libres apenas endergónicas.

Tabla 6. Energías libres de Gibbs de reacción (ΔG , kcal/mol), para los compuestos estudiados frente a los diferentes radicales, a 298.15 K. (*I*) Benceno, (*II*) solución acuosa

	$\bullet\text{OH}$		$\bullet\text{OCH}_3$		$\bullet\text{OOH}$		$\bullet\text{OOCH}_3$	
	(<i>I</i>)*	(<i>II</i>)*	(<i>I</i>)	(<i>II</i>)	(<i>I</i>)	(<i>II</i>)	(<i>I</i>)	(<i>II</i>)
CAF								
<i>SET</i>	80.93	5.61	93.73	26.36	104.68	40.92	106.16	43.45
<i>RAF</i>								
C2	1.27	-0.09	14.17	20.42	26.15	27.21	30.82	36.33
C4	-13.47	-11.54	3.33	6.50	15.39	17.34	20.44	23.66
C5	-12.08	-9.23	2.77	4.23	15.44	18.09	20.92	22.17
C6	3.21	0.31	16.23	24.01	38.91	41.83	45.04	46.76
C8	-28.63	-28.49	-15.56	-10.85	-1.08	-1.17	2.37	7.06
<i>HT</i>								
R1	-22.63	-22.56	-9.78	-7.01	10.14	6.51	7.29	11.69
R2	-22.56	-22.94	-10.15	-7.53	9.61	6.13	6.91	11.16
R3	-23.05	-23.21	-10.42	-8.02	9.12	5.86	6.64	10.67

PAR								
<i>SET</i>	85.38	10.69	98.25	31.74	107.06	41.99	109.06	44.81
<i>RAF</i>								
C2	-7.20	-3.72	20.48	16.82	35.87	32.74	35.54	33.95
C4	-12.98	-12.04	0.66	1.85	15.28	17.28	18.28	20.11
C5	-13.14	-10.78	3.41	6.49	15.60	18.40	17.50	20.64
C6	6.92	6.86	19.82	20.01	39.04	40.83	41.59	42.64
C8	-28.58	-29.18	-15.76	-16.41	-0.53	-0.36	2.94	2.45
<i>HT</i>								
N3	-19.34	-20.37	-4.23	-7.02	13.05	9.93	14.61	10.48
R1	-21.76	-22.16	-6.66	-8.82	10.63	8.14	12.18	8.68
R3	-22.82	-22.74	-7.72	-9.41	9.57	7.56	11.13	8.11

THB								
<i>SET</i>	83.36	9.64	96.24	30.70	105.04	40.94	107.04	43.76
<i>RAF</i>								

C2	1.26	0.75	-0.88	1.49	29.00	27.55	31.63	29.36
C4	-12.27	-11.49	1.39	2.58	15.65	17.52	17.28	18.83
C5	-11.75	-9.25	3.14	6.33	15.52	18.55	18.07	21.42
C6	5.42	5.74	19.45	19.76	32.78	33.59	36.43	36.24
C8	-29.04	-29.52	-15.91	-16.34	-0.79	-0.40	2.67	2.48
<i>HT</i>								
N1	4.88	6.36	19.99	19.71	37.27	36.66	38.83	37.21
R2	-22.72	-23.03	-7.62	-9.69	9.67	7.27	11.22	7.81
R3	-23.02	-22.87	-7.91	-9.52	9.37	7.43	10.93	7.98

THP								
<i>SET</i>	84.75	10.22	97.63	31.28	106.44	41.53	108.44	44.35
<i>RAF</i>								
C2	-7.57	-4.70	7.12	9.20	27.36	29.27	32.17	29.63
C4	-12.38	-11.71	0.96	2.24	15.17	16.97	18.20	19.77
C5	-13.13	-10.30	2.45	5.83	14.61	19.06	17.18	20.38
C6	7.82	6.94	20.92	21.01	34.83	34.68	39.04	37.87
C8	-30.25	-30.75	-17.13	-17.58	0.19	0.47	1.60	1.38
<i>HT</i>								
N7	-23.54	-21.42	-8.43	-8.07	8.86	8.89	10.41	9.43
R1	-22.05	-22.35	-6.95	-9.01	10.34	7.95	11.89	8.49
R2	-22.38	-22.66	-7.28	-9.32	10.01	7.64	11.56	8.18

MXT								
<i>SET</i>	89.57	12.02	102.45	33.08	111.26	43.33	113.26	46.15
<i>RAF</i>								
C2	-7.97	-5.12	6.61	9.86	36.43	33.23	37.05	35.09
C4	-13.13	-12.39	0.03	1.48	15.03	17.14	18.10	20.06
C5	-14.05	-10.91	2.25	5.52	14.64	18.95	17.30	20.47
C6	8.01	7.83	20.28	20.75	40.47	42.89	43.56	45.69
C8	-28.63	-29.24	-14.85	-15.38	0.41	0.49	3.68	3.15
<i>HT</i>								
R1	-21.83	-22.25	-6.73	-8.91	10.56	8.05	12.11	8.59
N3	-18.68	-19.92	-3.58	-6.58	13.71	10.38	15.27	10.93
N7	-22.10	-20.58	-7.00	-7.24	10.29	9.72	11.84	10.26

AMU								
<i>SET</i>	78.04	-16.66	90.92	4.40	99.73	14.64	101.73	17.46
<i>RAF</i>								
C2	10.94	-8.55	26.63	6.72	20.17	18.38	12.00	22.91

C4	-30.72	-13.79	-17.17	-1.34	-1.76	16.26	0.58	16.56
C5	-20.33	-12.95	-5.21	0.89	8.57	15.31	11.33	16.86
C6	-1.08	-11.59	14.90	3.89	31.40	18.89	35.08	21.43
C8	-24.59	-16.66	-10.27	-3.90	17.16	11.37	20.45	11.28
<i>HT</i>								
C1a	-21.61	-24.31	-6.51	-10.97	10.78	5.99	12.33	6.53
N3	-34.86		-19.75		-2.47		-0.91	
N7	-29.68	-38.14	-14.58	-24.80	2.71	-7.84	4.27	-7.30
N9	-35.41	-33.91	-20.31	-20.56	-3.02	-3.61	-1.47	-3.06

La baja reactividad de radicales peroxilo, comparada con la de los radicales $\cdot\text{OH}$ y alcóxido, se refleja en los valores reportados en la Tabla 6. Para el radical $\cdot\text{OOCH}_3$ casi todos los canales de reacción estudiados resultaron ser endergónicos, no así para los sitios N3 y N9 en benceno y los sitios N7 y N9 en agua del AMU. Esto indica que los compuestos estudiados no son eficientes para atrapar este radical. Esto también sugiere que no son buenos frente a radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) en general, particularmente aquellos con R = grupos alquilo o alqueno. Para las reacciones de $\cdot\text{OOH}$, se encontró que todos los procesos HT tienen valores de $\Delta G > 0$ para todos los compuestos estudiados salvo el AMU. En este caso, los canales de reacción N3 y N9 en medio no polar, y los canales N7 y N9 en medio acuoso son exergónicos. En consecuencia, no se espera que este mecanismo desempeñe un papel significativo en la actividad atrapadora de $\cdot\text{OOH}$ de CAF, PAR, THB, THP y MXT, pero sí pudiera serlo para AMU. Para el mecanismo RAF, por otro lado, las adiciones de $\cdot\text{OOH}$ a los sitios C8 de CAF, PAR y THB son ligeramente exergónicas, mientras que en el mismo sitio para THP, MXT y AMU son endergónicas. Teniendo en cuenta la imprecisión inherente a cualquier método de cálculo, estos seis canales realmente pueden ser considerados como sitios viables para la reacción. La alta selectividad de esta reacción de $\cdot\text{OOH}$ en los sitios indica que sólo un producto debe ser formado en gran medida, y que el aducto formado por adición de $\cdot\text{OOH}$ al sitio C8 es el sitio de reacción primordial. Estos resultados concuerdan con los reportados por Devasagayam y colaboradores¹³³ quienes reportan que CAF no puede directamente actuar contra $\text{ROO}\cdot$, y que sólo es un inhibidor pobre de la peroxidación inducida por $\cdot\text{OOH}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$. Para el caso de los metabolitos de la cafeína se observa que estos siguen dicha tendencia en cuanto a las reacciones con los radicales $\cdot\text{OOH}$. Esta diferencia es significativa porque, en etapas

posteriores de la investigación, las reacciones con el radical $\bullet\text{OOH}$ serán las que se tomen en cuenta cuando se hagan las comparativas entre la eficiencia como atrapadores de radicales libres con otros antioxidantes. Una vez que se ha obtenido suficiente información sobre cuáles son los sitios de reacción de los compuestos estudiados, lo siguiente es realizar el estudio de la cinética de las reacciones radical-antioxidante.

Los canales de reacción descritos anteriormente como endergónicos no son considerados en el estudio cinético. Esto se basa en el hecho de que incluso si ocurrieran a una velocidad significativa, dichos procesos serían reversibles y por lo tanto los productos formados no se observarían experimentalmente. Todavía podrían representar canales importantes, siempre que sus productos reaccionen rápidamente con otras especies a través de reacciones que sean suficientemente exergónicas y con bajas barreras de reacción. Sin embargo, el presente trabajo se centra solamente en la primera etapa de oxidación.

Las geometrías totalmente optimizadas de los estados de transición (TS) que participan en los procesos RAF de los compuestos de la familia de la cafeína con los diferentes radicales estudiados, se muestran en las figuras 4 a la 8. El parámetro geométrico más importante es la distancia C---O, que corresponde a la formación del enlace entre los radicales y el antioxidante, y se encontró en general que su valor se encuentra alrededor de 2 Å para todos los TSs modelados. Además se encontraron interacciones tipo puente de H para los estados de transición con OH TS-C4 (R1) y TS-C8 (R1), entre el átomo de H en el radical $\bullet\text{OH}$ y el átomo N9 de los compuestos estudiados. Sin embargo este tipo de interacción no se presenta en los TSs de las adiciones al sitio C8 con $\bullet\text{OOH}$ y $\bullet\text{OCH}_3$.

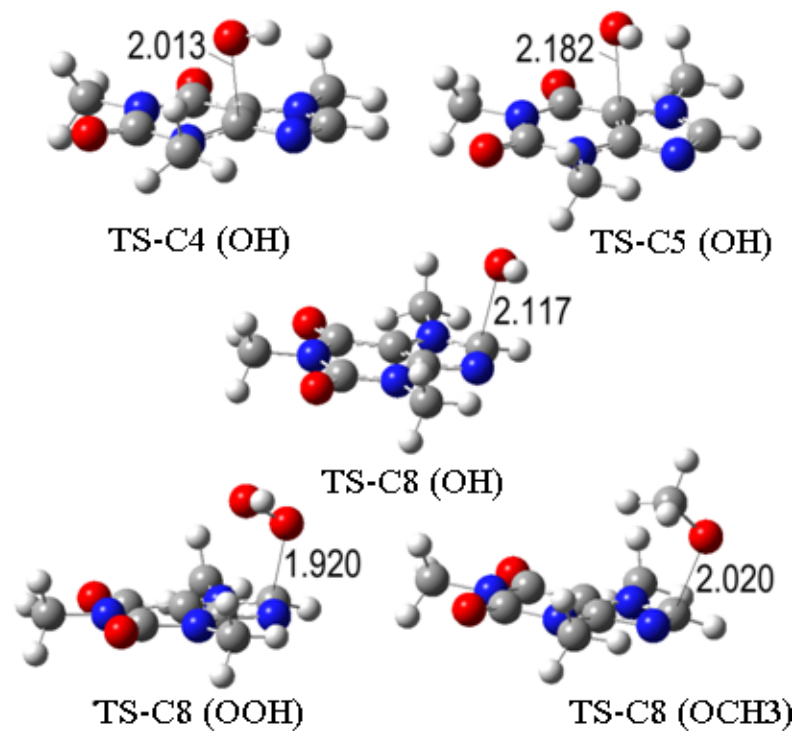


Figura 4. Geometrías optimizadas de los estados de transición de CAF correspondientes a mecanismos RAF (distancias en Å) con los diferentes radicales.

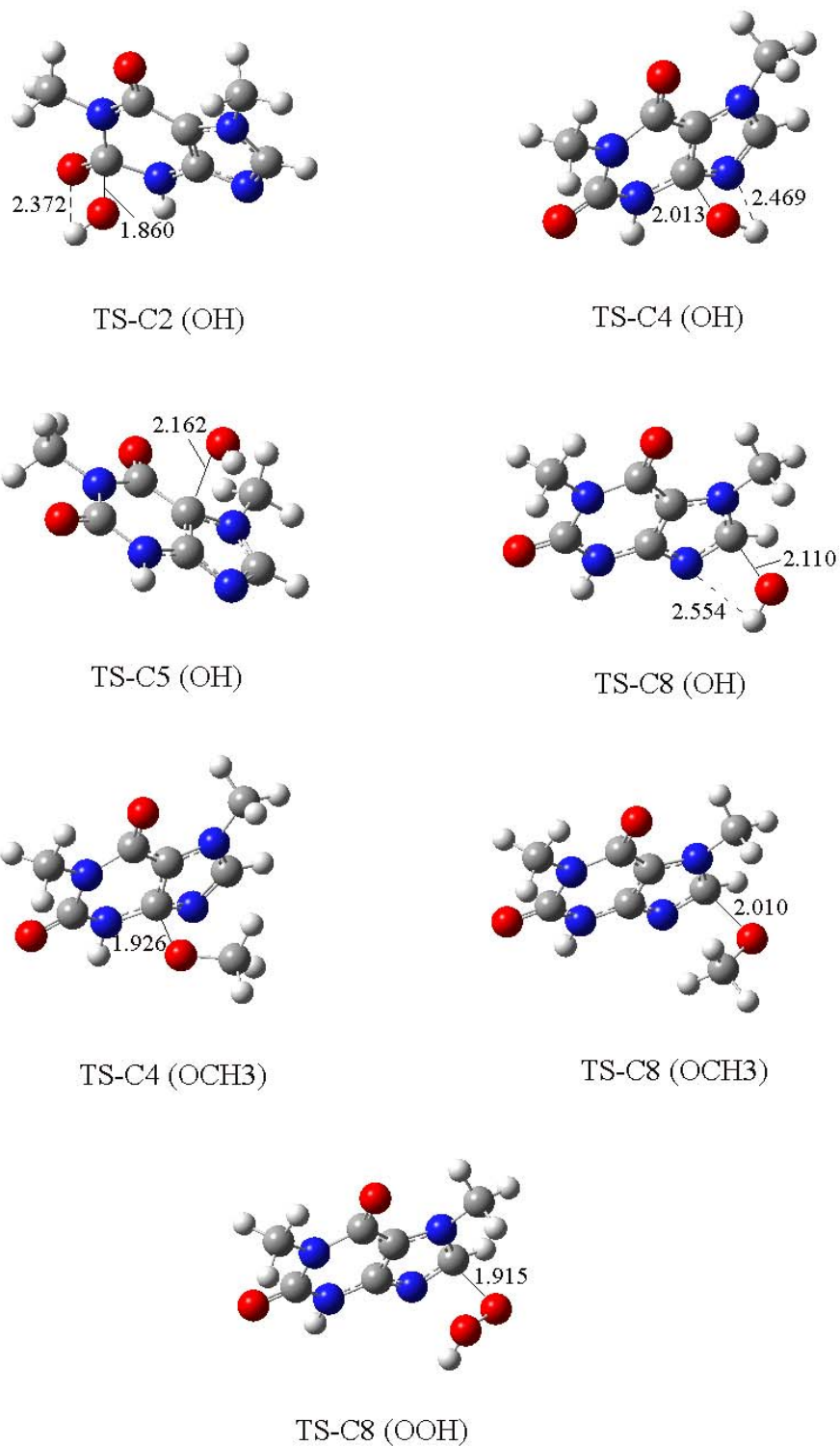


Figura 5. Geometrías optimizadas de los estados de transición de PAR correspondientes a mecanismos RAF (distancias en Å) con los diferentes radicales.

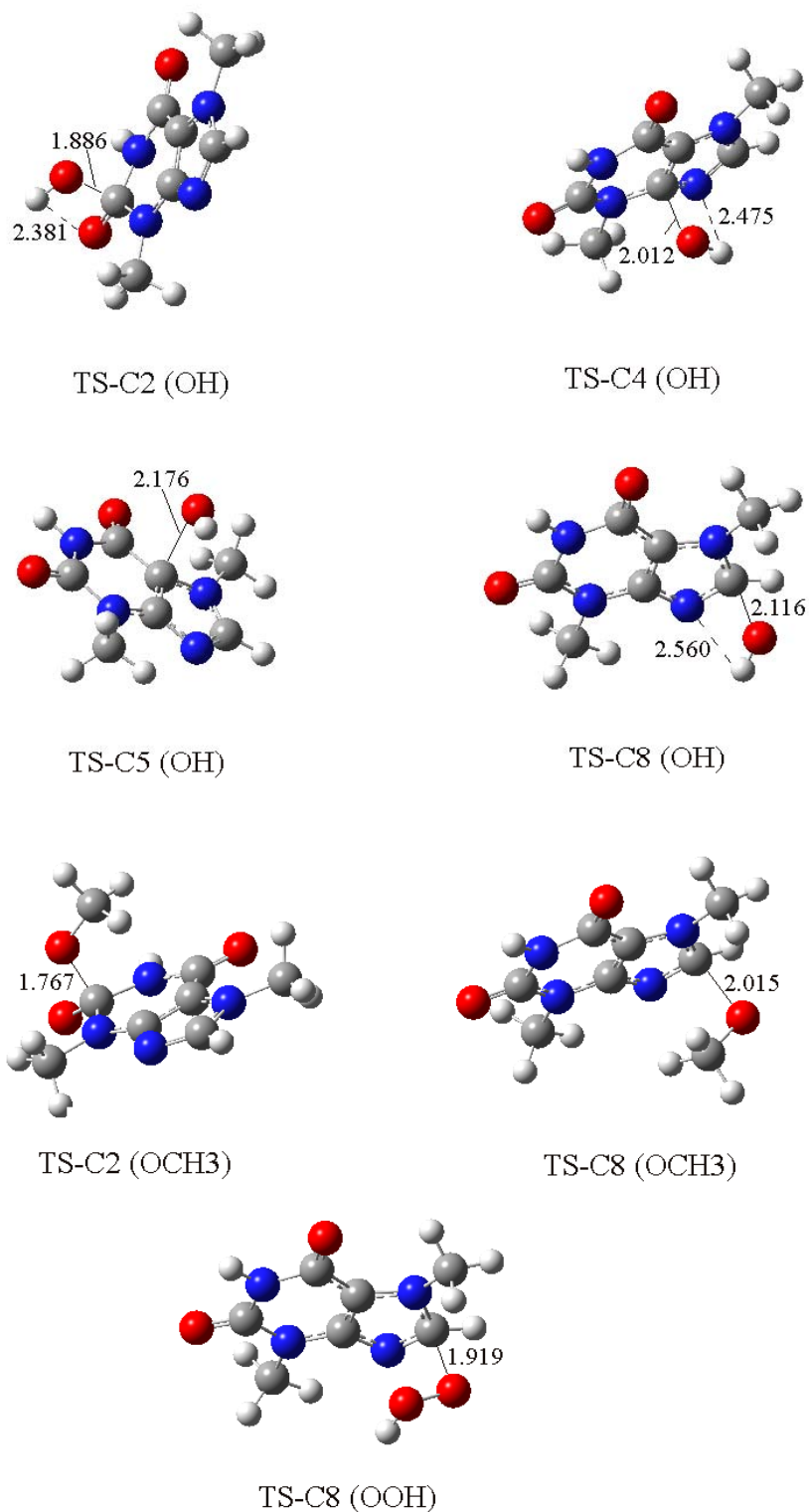


Figura 6. Geometrías optimizadas de los estados de transición de THB correspondientes a mecanismos RAF (distancias en Å) con los diferentes radicales.

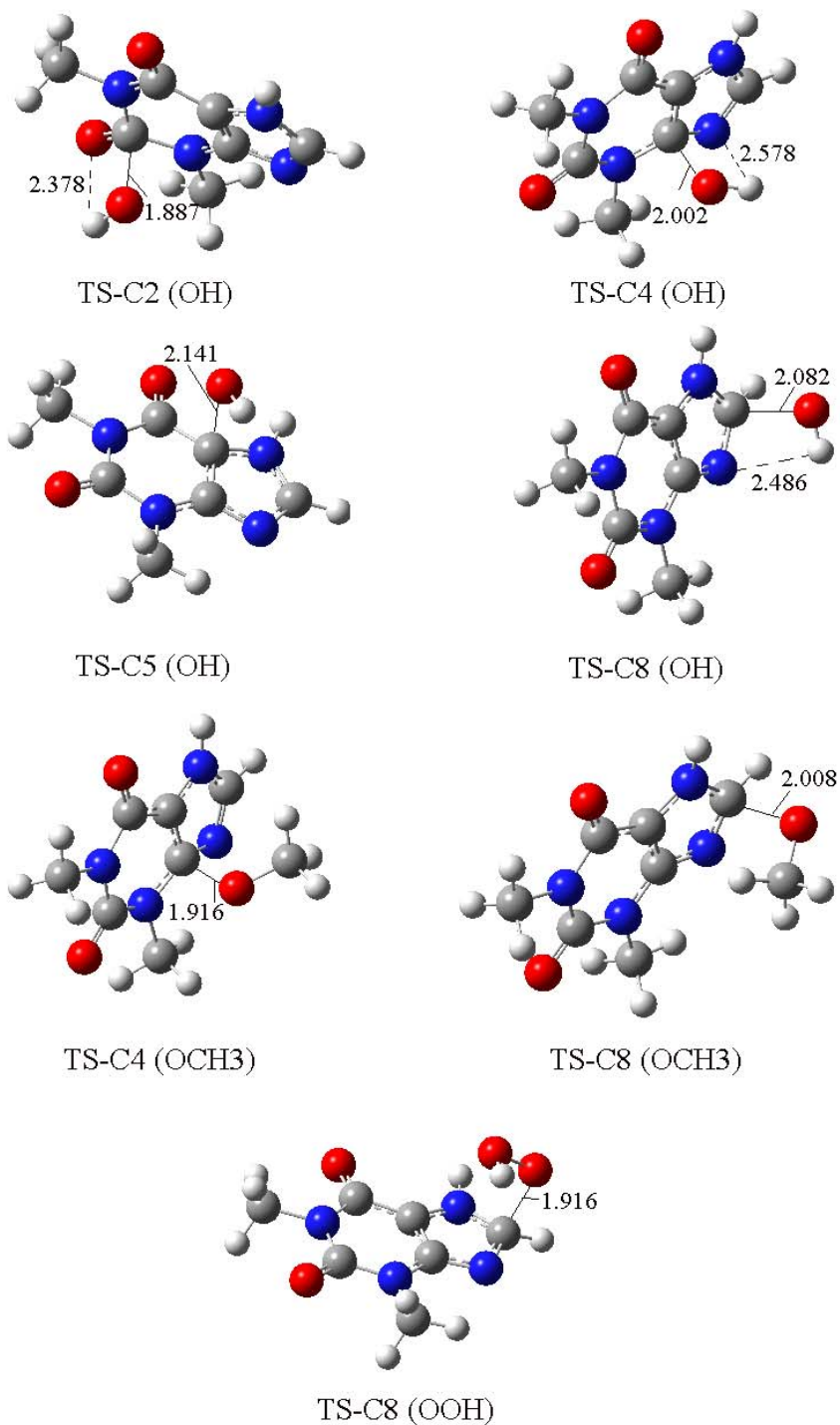


Figura 7. Geometrías optimizadas de los estados de transición de THP correspondientes a mecanismos RAF (distancias en Å) con los diferentes radicales.

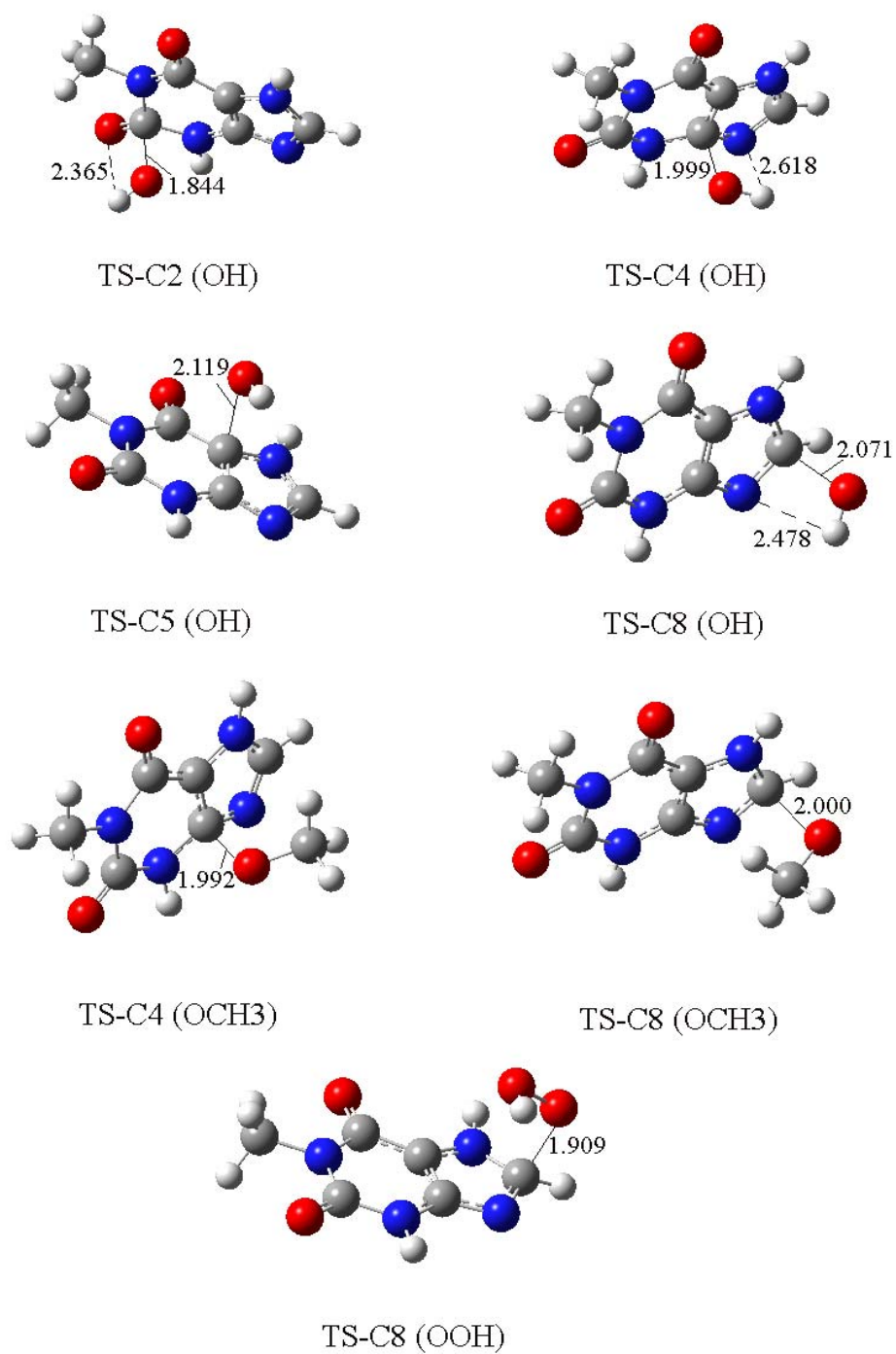


Figura 8. Geometrías optimizadas de los estados de transición de MXT correspondientes a mecanismos RAF (distancias en Å) con los diferentes radicales.

Las geometrías de los estados de transición que participan en los procesos de transferencia H se muestran en las Figuras de la 9 a la 13. Todos los estados de transición que involucran al radical $\bullet\text{OH}$ muestran interacciones tipo puente de H. Para el caso del TS de HT de la CAF en el sitio 10, se estudiaron 2 configuraciones diferentes: TS-C10a (R1) y el TS-C10b (R1) que se diferencian justamente en los átomos involucrados en dicha interacción. Para ambas configuraciones la interacción consiste en la estabilización del átomo de H en el $\bullet\text{OH}$ y uno de los átomos de O en cada caso. Sin embargo para el TS-C10a (R1) involucra al átomo O13 mientras que en TS-C10b (R1) involucra al átomo O11. Las distancias de interacción son ligeramente diferentes, con $d(\text{H}\cdots\text{O})$ igual a 2.145 y 2.140 Å, respectivamente. Estos valores deben estar directamente relacionados con la fortaleza de la interacción, por lo que se espera que ésta sea muy similar en ambas conformaciones.

Para los TS de HT desde el sitio C12 en la CAF al $\bullet\text{OH}$, también se analizó esta posibilidad, y en este caso las diferencias entre los puentes de H son más grandes (aunque siguen siendo pequeñas), ya que el átomo de hidrógeno en el radical $\bullet\text{OH}$ interactúa con átomos de distinta naturaleza, es decir, con N9 en el TS-C12a (R1) y con O11 en el TS-C12b (R1). Las distancias de interacción en este caso son $d(\text{H}\cdots\text{N}) = 2.250$ Å y $d(\text{H}\cdots\text{O}) = 2.162$ Å. Dado que la diferenciación entre las configuraciones de las estructuras de los TS de HT de la cafeína no llevó a valores muy diferentes de los esperados, para los demás metabolitos, sólo la configuración de menor energía fue considerada en cada caso.

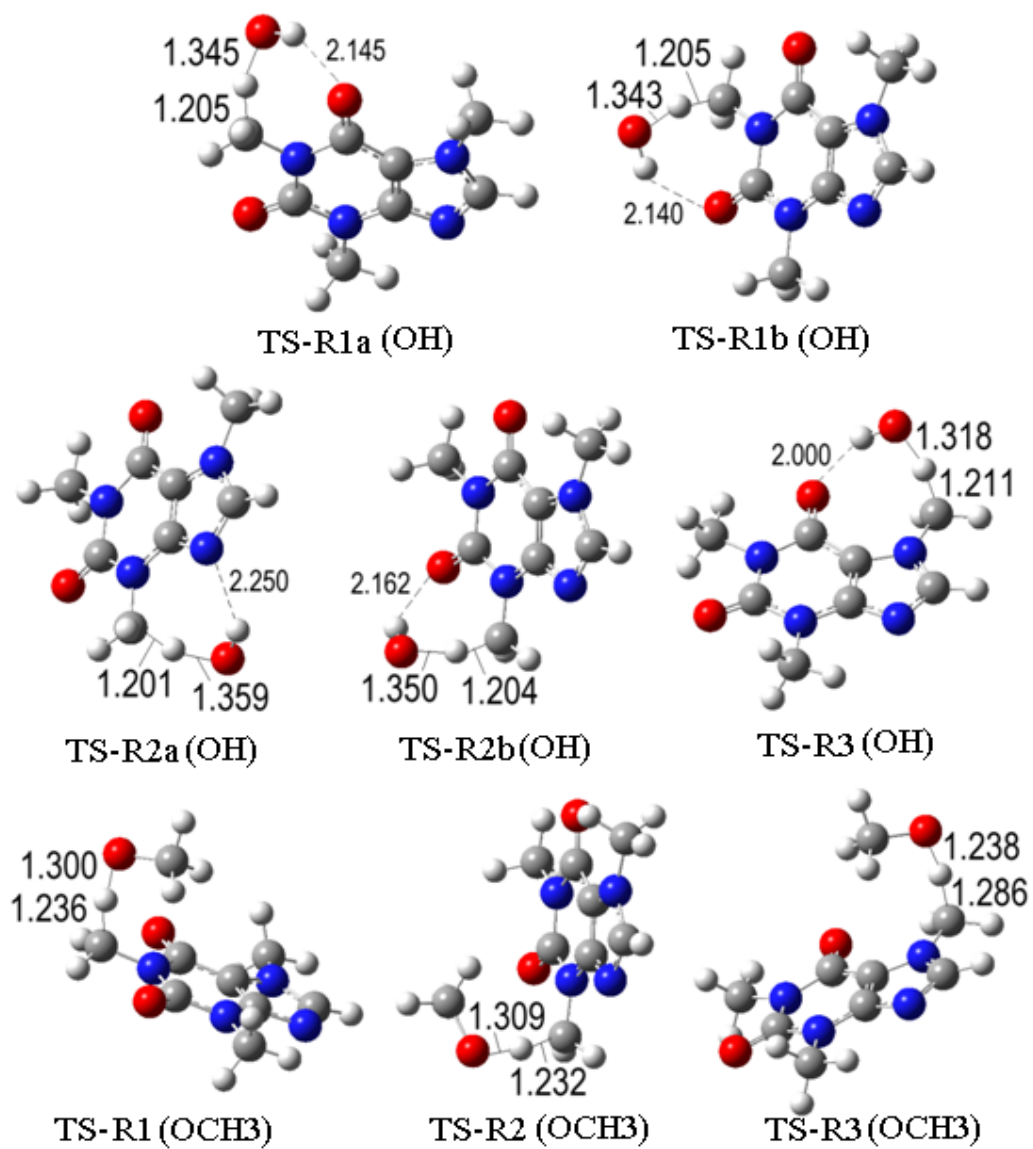
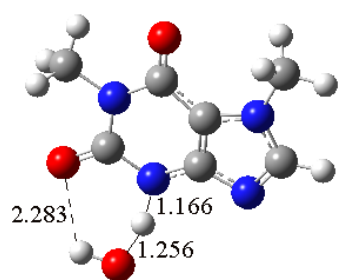
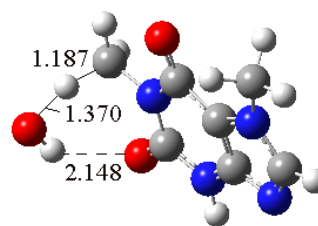


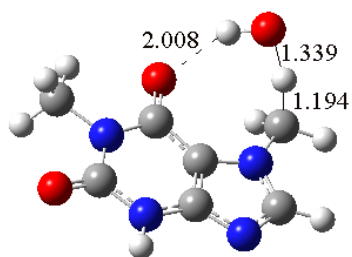
Figura 9. Geometrías optimizadas de los estados de transición de CAF correspondientes a mecanismos HT (distancias en Å) con los diferentes radicales.



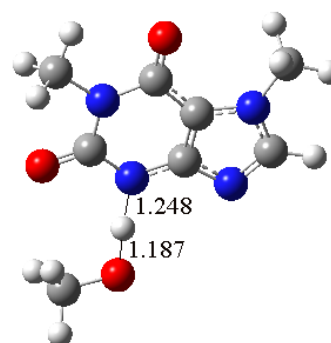
TS-N3 (OH)



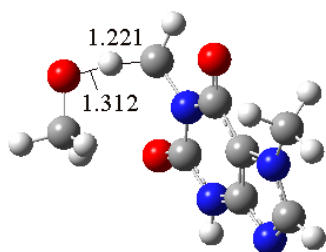
TS-R1 (OH)



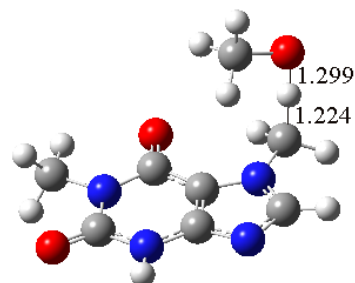
TS-R3 (OH)



TS-N3 (OCH3)



TS-R1 (OCH3)



TS-R3 (OCH3)

Figura 10. Geometrías optimizadas de los estados de transición de PAR correspondientes a mecanismos HT (distancias en Å) con los diferentes radicales.

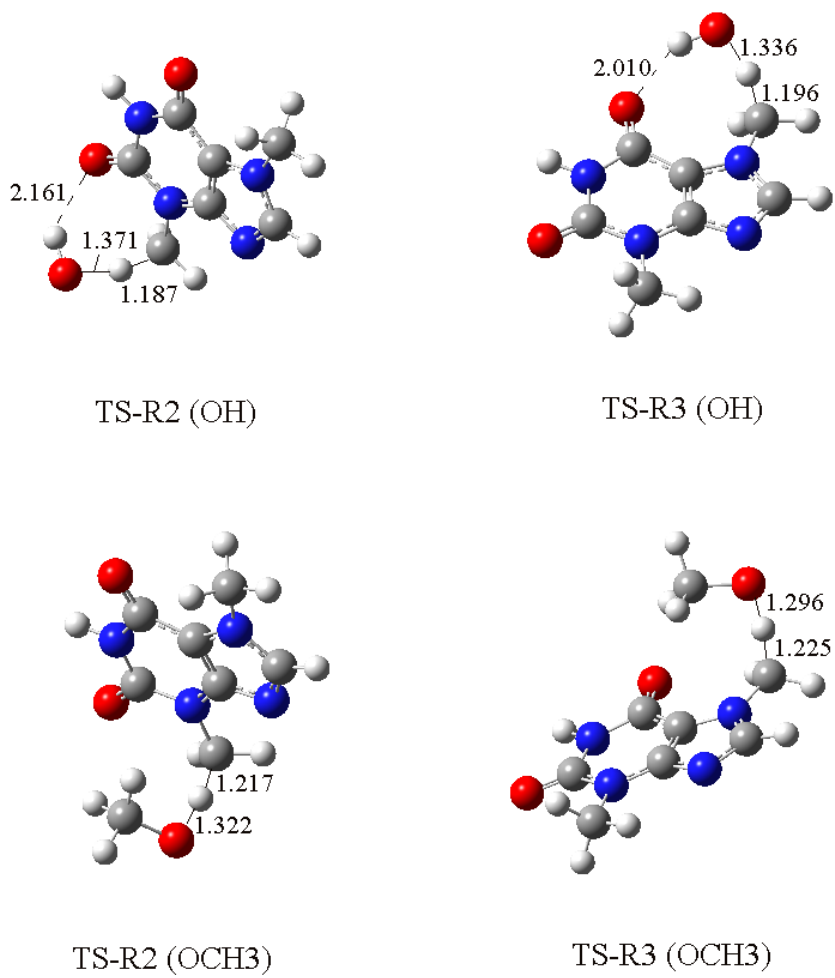
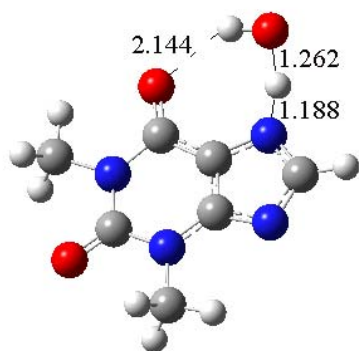
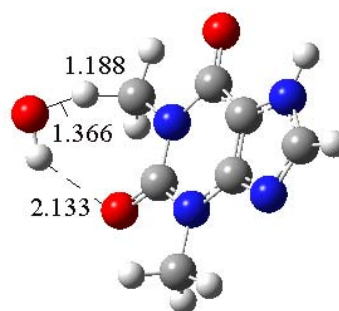


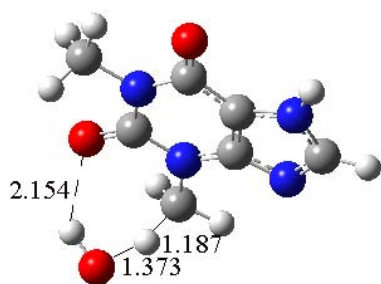
Figura 11. Geometrías optimizadas de los estados de transición de THB correspondientes a mecanismos HT (distancias en Å) con los diferentes radicales.



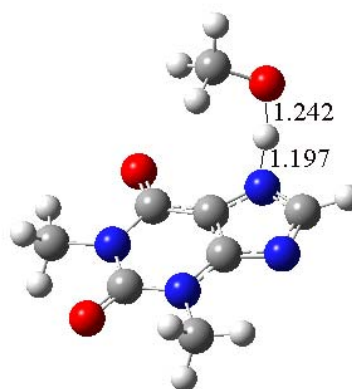
TS-N7 (OH)



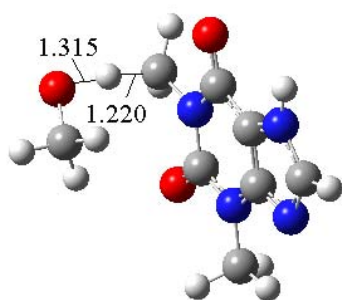
TS-R1 (OH)



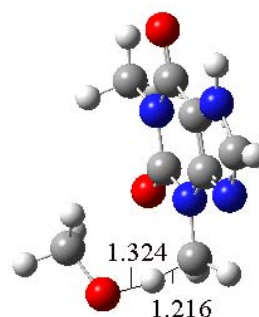
TS-R2 (OH)



TS-N7 (OCH3)

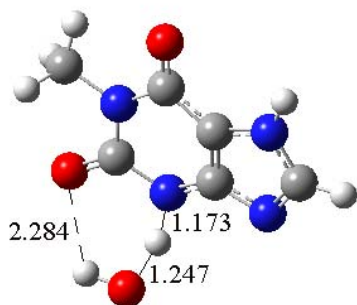


TS-R1 (OCH3)

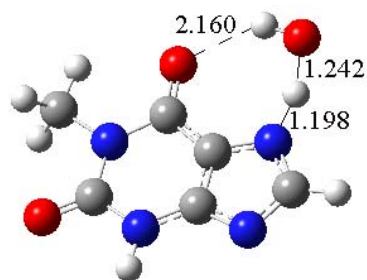


TS-R2 (OCH3)

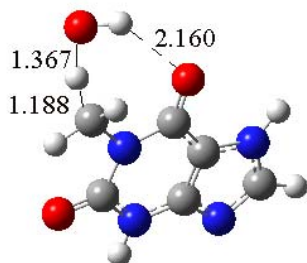
Figura 12. Geometrías optimizadas de los estados de transición de THP correspondientes a mecanismos HT (distancias en Å) con los diferentes radicales.



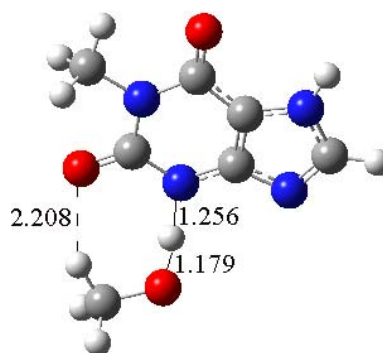
TS-N3 (OH)



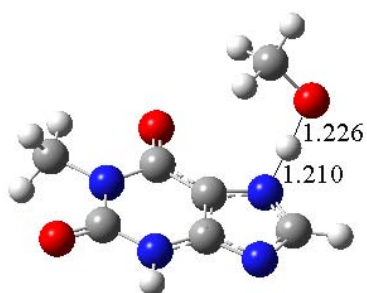
TS-N7 (OH)



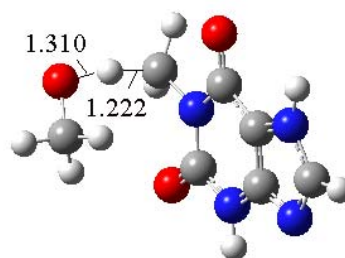
TS-R1 (OH)



TS-N3 (OCH3)



TS-N7 (OCH3)



TS-R1 (OCH3)

Figura 13. Geometrías optimizadas de los estados de transición de MXT correspondientes a mecanismos HT (distancias en Å) con los diferentes radicales.

Para el caso de AMU, dado que esta especie presenta 2 formas ácido-base diferentes dependiendo del medio y del pH en el cual se está llevando la reacción, los estados de transición se muestran en un esquema diferente, en el cual, se observan las reacciones con cada radical y no por cada mecanismo de reacción, ya que esta es una manera más práctica para su análisis. Sus estructuras se muestran en las figuras 14 – 21 y se observa que en los casos de las reacciones con $\bullet OH$ es frecuente encontrar interacciones tipo puentes de H.

En el caso particular del estado de transición de HT en el sitio N9 de la especie aniónica en solución acuosa dicho estado de transición no se pudo localizar para la reacción con el radical $\bullet OH$. Sin embargo, teniendo en cuenta la similitud entre los valores de ΔG para los canales de reacción N7 y N9 en solución acuosa, conjuntamente con la similitud entre los valores de ΔG^\ddagger de estos mismos canales de reacción en medio no polar, la barrera de reacción y por tanto la constante de velocidad de la reacción de HT en el sitio N9 se espera que sea muy similar a la del sitio N7. Basándonos en este razonamiento, usamos los valores de ΔG^\ddagger y k correspondientes a N7 como los valores aproximados para N9 en solución acuosa. Aún cuando esto pudiera considerarse una aproximación cruda, no se espera que afecte las principales conclusiones relacionadas con el ácido metil úrico, ya que el mecanismo de reacción HT no tiene un papel importante en la reactividad de este compuesto hacia el radical $\bullet OH$.

En el caso de la reacción de adición de $\bullet OH$ al sitio C5 del anión de AMU tampoco se puede localizar un estado de transición, pero en este caso es porque no existe. O este canal de reacción ocurre sin barrera. Esto queda demostrado con la superficie de energía potencial mostrada en la figura 22.

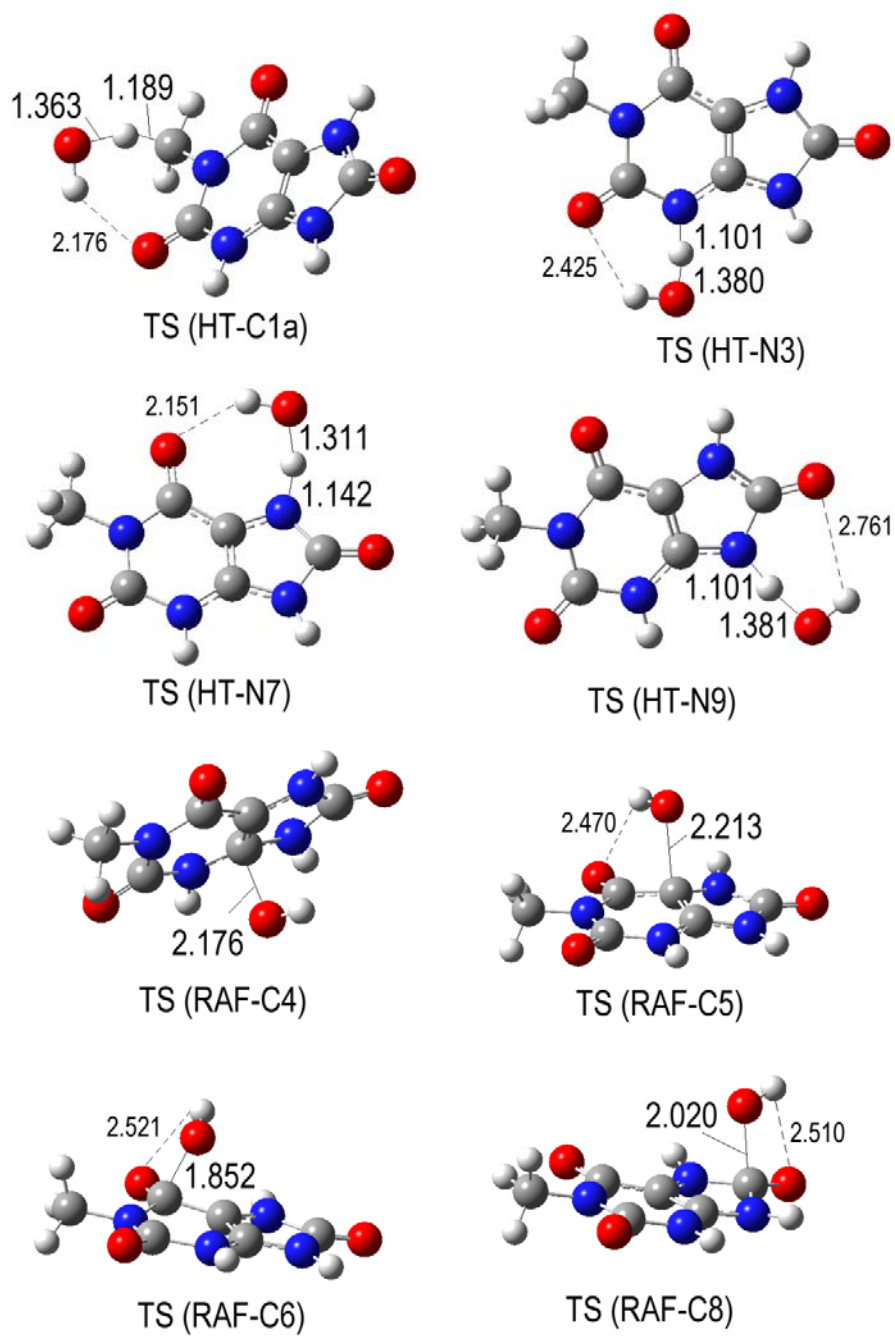


Figura 14. Geometrías optimizadas de los estados de transición para los diferentes canales de reacción de HAMU + $\cdot\text{OH}$, con benceno como solvente.

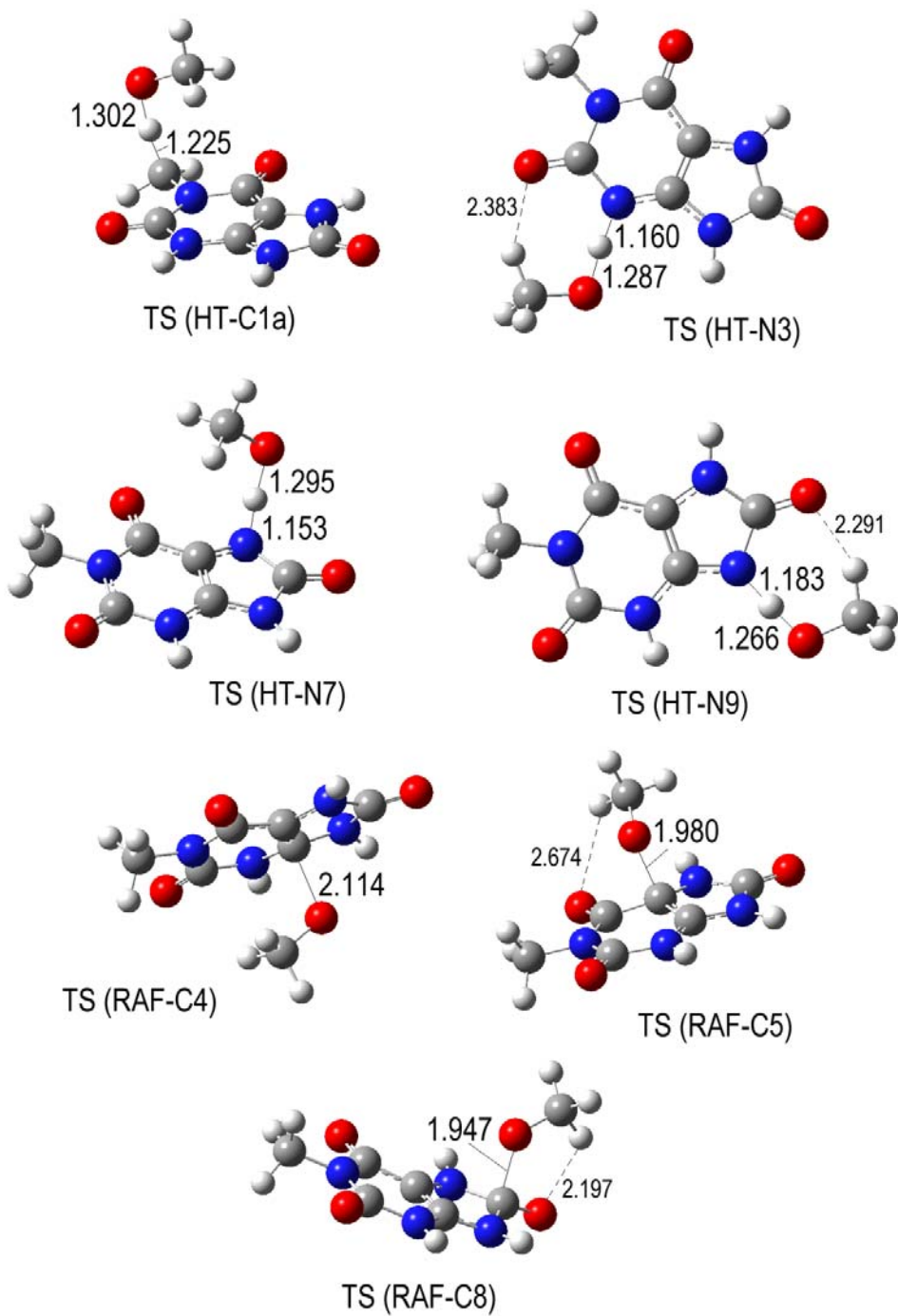


Figura 15. Geometrías optimizadas de los estados de transición para los diferentes canales de reacción de HAMU + $\cdot\text{OCH}_3$, con benceno como solvente.

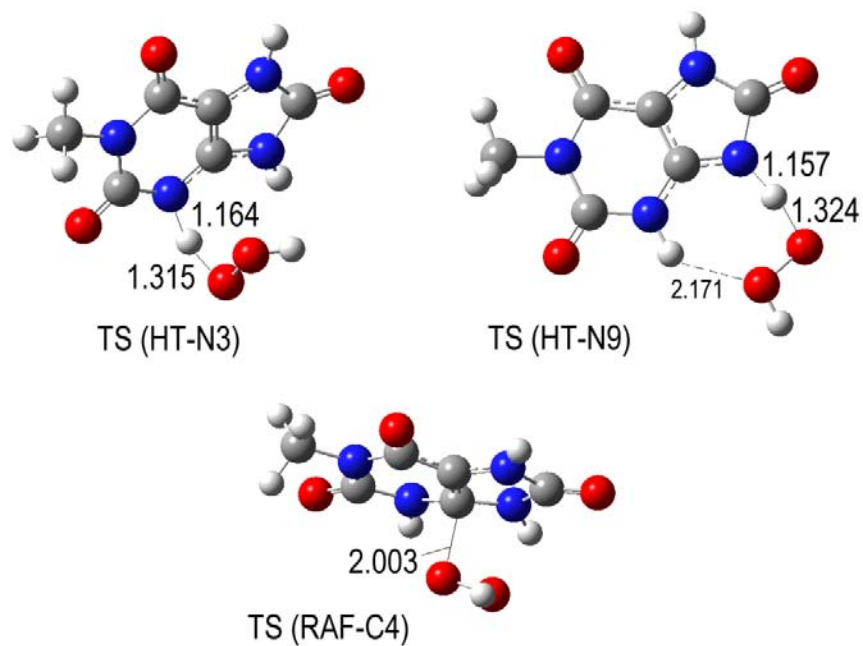


Figura 16. Geometrías optimizadas de los estados de transición para los diferentes canales de reacción de HAMU + $\cdot\text{OOH}$, con benceno como solvente.

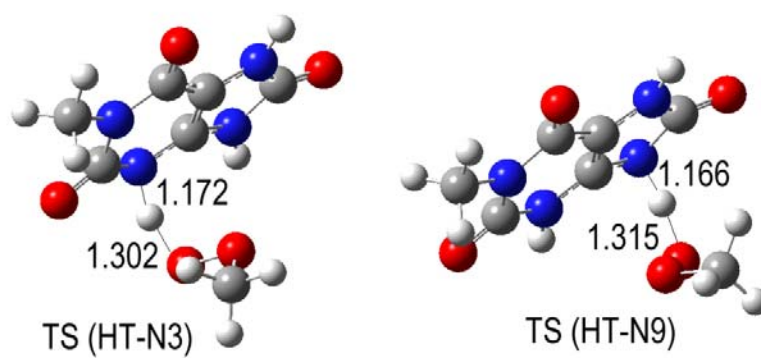


Figura 17. Geometrías optimizadas de los estados de transición para los diferentes canales de reacción de HAMU + $\cdot\text{OOCH}_3$, con benceno como solvente.

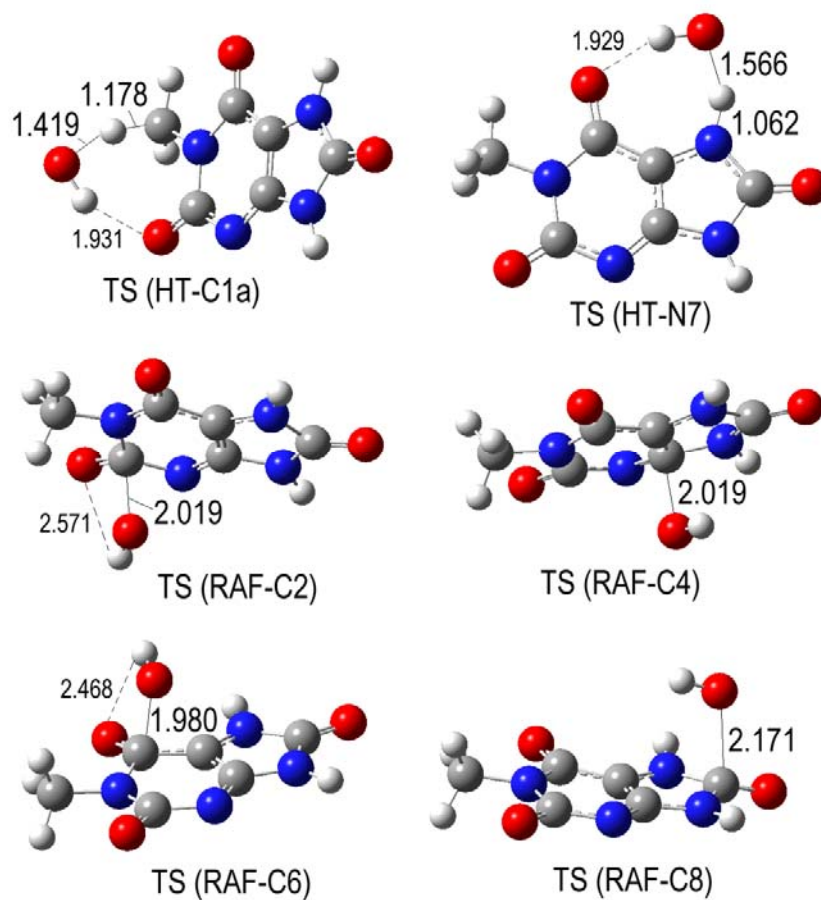


Figura 18. Geometrías optimizadas de los estados de transición para los diferentes canales de reacción de $\text{AMU}^+ + \cdot\text{OH}$, con agua como solvente.

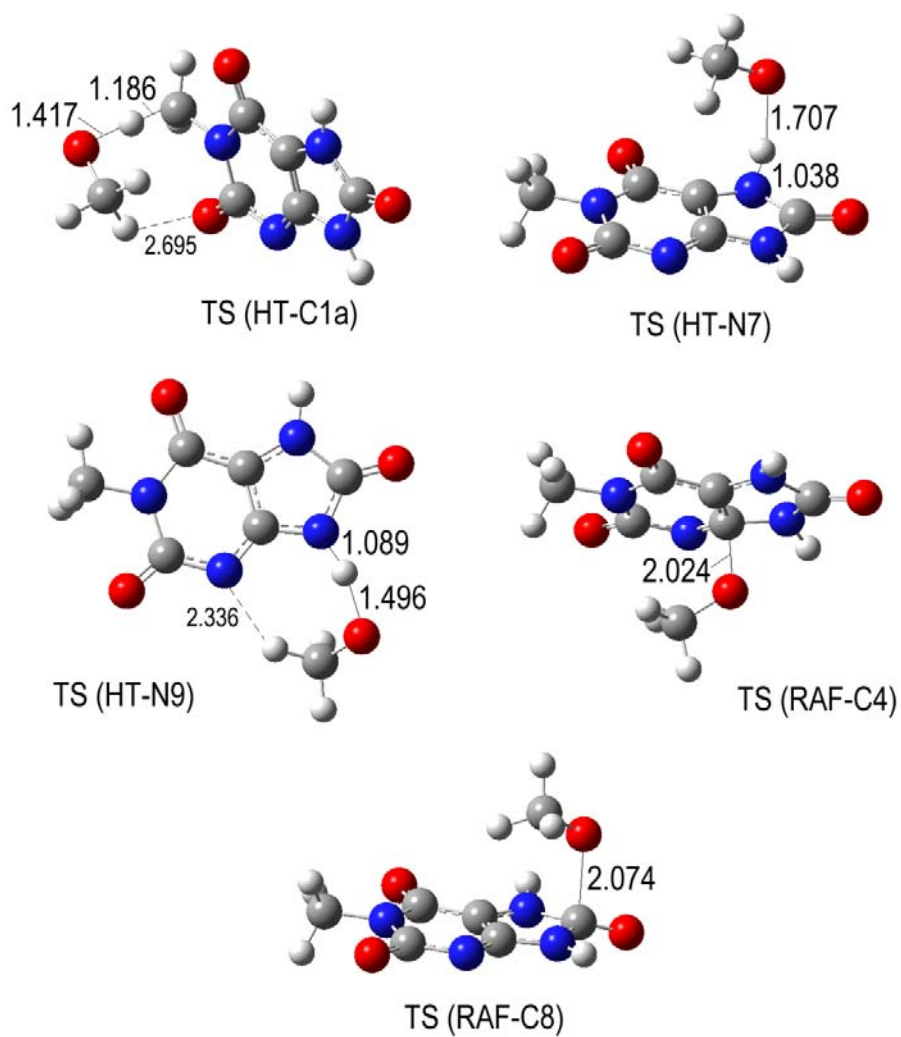


Figura 19. Geometrías optimizadas de los estados de transición para los diferentes canales de reacción de $\text{AMU}^+ + \cdot\text{OCH}_3$, con agua como solvente.

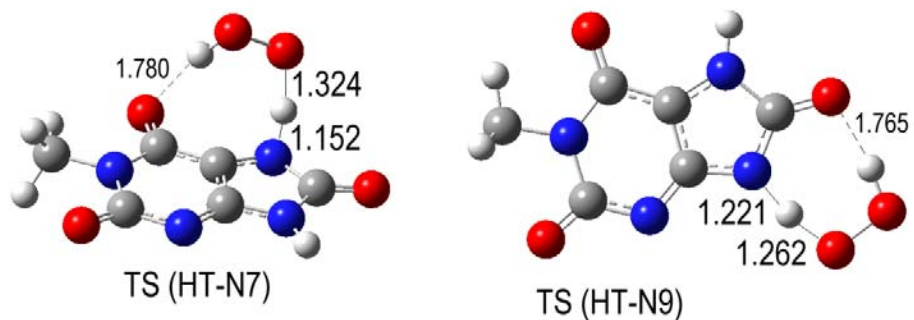


Figura 20. Geometrías optimizadas de los estados de transición para los diferentes canales de reacción de AMU⁺ + HO₂, con agua como solvente.

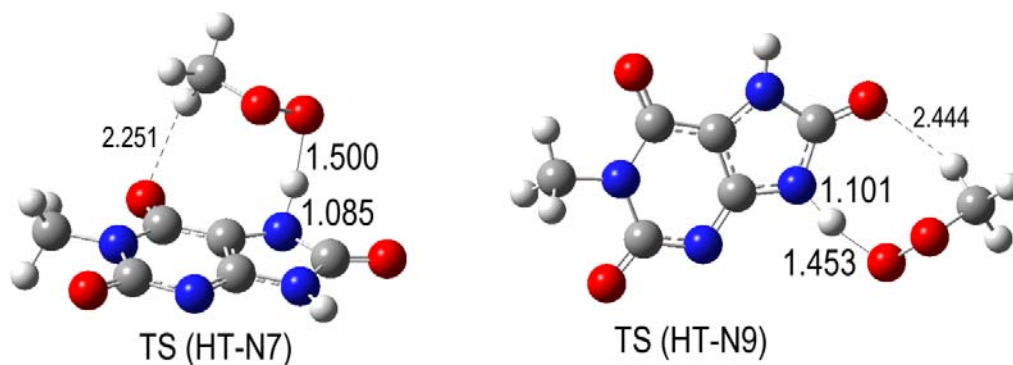


Figura 21. Geometrías optimizadas de los estados de transición para los diferentes canales de reacción de AMU⁺ + OCH₃O, con agua como solvente.

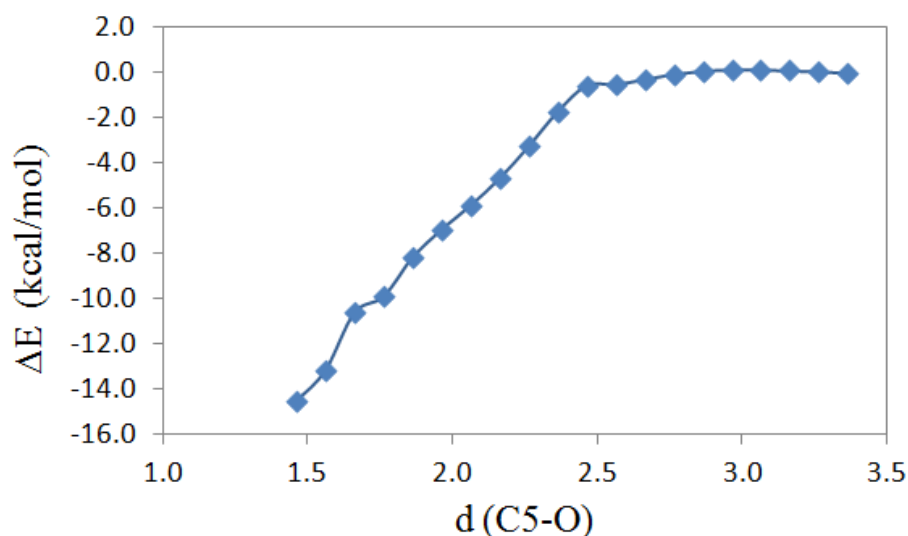


Figure 22. Superficie de energía potencial en función de la distancia del enlace que se forma en la reacción de adición de $\cdot\text{OH}$ a AMU^- en el sitio C5.

Las barreras de la reacción, en términos de la energía libre de Gibbs (ΔG^\ddagger), a temperatura ambiente (298.15 K), correspondientes a estos mecanismos, se reportan en la Tabla 7. Los valores que muestran las barreras de las reacciones que implican $\cdot\text{OH}$, son sistemáticamente inferiores a los de las reacciones con otros radicales. Esto está en concordancia con la mayor reactividad conocida del $\cdot\text{OH}$. Otra tendencia general es que los valores de ΔG^\ddagger son menores en entornos no polares que en solución acuosa, salvo para el caso de AMU , en donde se observa una tendencia inversa. Para las reacciones con $\cdot\text{OCH}_3$, la menor barrera corresponde sistemáticamente a la adición de radicales a los sitios C8. Este canal de reacción tiene un valor de ΔG^\ddagger al menos 3 kcal/mol más bajo que los del mecanismo de HT. Para la reacción con $\cdot\text{OH}$, las barreras menores se corresponden al mecanismo de la RAF, en particular, a las adiciones a los sitios de C5 y C8, en ese orden para ambos medios. La mayor barrera resultó ser la de la RAF en los sitios C4. Las barreras de los canales de HT de sitios metilados se encontraron casi indistintas para el sitio de reacción, no así cuando dicha abstracción se llevaba a cabo desde los sitios NH, observándose mayores en estos casos. En general, las reacciones de HT se ven más favorecidas en medio no polar que en medio polar.

Tabla 7. Energías libres de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger), a 298.15 K, en kcal/mol. **(I)** Benceno, **(II)** solución acuosa

	$\bullet\text{OH}$		$\bullet\text{OCH}_3$		$\bullet\text{OOH}$		$\bullet\text{OOCH}_3$	
	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
CAF								
<i>RAF</i>								
C4	7.76	10.46						
C5	1.45	3.54						
C8	2.56	5.56	11.29	13.58	15.81	18.52		
<i>HT</i>								
C10a	5.67	10.69	15.01	16.27				
C10b	5.26	10.19						
C12a	5.78	10.76	15.00	16.62				
C12b	5.11	10.49						
C14	5.36	11.10	15.28	17.56				

PAR								
<i>RAF</i>								
C2	19.30	19.39						
C4	7.40	8.93	16.21	17.21				
C5	1.12	3.05						
C8	3.17	6.31	11.19	12.86	17.83	19.74		
<i>HT</i>								
N3	9.42	14.55	16.82	20.44				
C10	5.23	9.42	14.94	16.08				
C14	5.15	9.51	15.30	17.34				

THB								
<i>RAF</i>								
C2	17.20	18.28	28.13	26.52				
C4	7.00	8.63						
C5	0.69	2.58						
C8	2.74	5.99	10.99	12.91	15.51	18.63		
<i>HT</i>								
N1								
C12	4.64	8.95	14.30	15.62				
C14	4.90	9.33	14.90	17.08				

THP								
<i>RAF</i>								
C2	16.76	17.46						
C4	6.84	8.03	15.82	16.82				
C5	1.97	3.29						

C8	4.40	6.73	12.28	14.06	17.01	19.79		
<i>HT</i>								
N7	8.55	20.10	15.57	22.14				
C12	5.31	9.51	14.94	16.16				
C14	4.99	9.33	14.62	16.02				

MXT								
<i>RAF</i>								
C2	20.14	19.89						
C4	7.20	8.33	16.01	16.85				
C5	1.94	2.91						
C8	4.71	6.93	12.62	14.21	17.30	19.80		
<i>HT</i>								
C10	5.45	9.51	13.71	14.84				
N3	9.73	14.70	16.30	21.29				
N7	9.62	21.88	17.08	20.55				

AMU								
<i>SET</i>		0.03		6.45				
<i>RAF</i>								
C2		0.85						
C4	0.42	~0.00	9.91	11.13	13.77			
C5	2.44	0.00	9.55					
C6	7.11	~0.00						
C8	12.19	~0.00	20.59	12.71				
<i>HAT</i>								
C1a	5.68	7.49	15.20	14.89				
N3	5.39		10.09		21.73		21.20	
N7	5.76	8.53	13.40	10.98		16.77		20.49
N9	6.79	8.51	11.39	21.43	19.65	14.01	22.57	17.06

Las constantes de velocidad para los distintos canales de reacción, en soluciones acuosas y en medio no polar (benceno), se presentan en la Tabla 8, junto con los coeficientes de la reactividad global. Se considera que no se producen mezclas ni cruce entre diferentes caminos y por lo tanto, el coeficiente de velocidad global (k_{global}) se ha calculado como la suma de las constantes de velocidad de cada canal. Por ejemplo para la reacción de la CAF + •OH:

$$k_{global} = k_{app}^{HT} + k_{app}^{RAF}$$

donde:

$$k_{app}^{HT} = k_{app}^{C10} + k_{app}^{C12} + k_{app}^{C14} \quad y$$

$$k_{app}^{RAF} = k_{app}^{C4} + k_{app}^{C5} + k_{app}^{C8}$$

De acuerdo con los coeficientes de la reactividad global, CAF se prevé que reaccione 4, 97, y 37 veces más rápido en medios no polares que en solución acuosa, con $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OOH}$ y $\bullet\text{OCH}_3$, respectivamente (Tabla 8). La reacción global de CAF hacia radicales $\bullet\text{OH}$ se encontró que es controlada por difusión en ambos medios, apoyando la excelente actividad atrapadora de la CAF hacia este radical, en acuerdo con la evidencia experimental disponible. El coeficiente de velocidad global calculado es sólo 1.2 veces menor que el valor más reciente estimado experimentalmente,¹³⁴ que es además 3.4 y 3.2 veces menor que los otros valores obtenidos mediante técnicas experimentales, o sea que la diferencia con nuestro cálculo es menor que entre diferentes valores experimentales. Este acuerdo apoya la excelente fiabilidad de los cálculos realizados. La eficacia de CAF para atrapar $\bullet\text{OCH}_3$ y $\bullet\text{OOH}$ se prevé que sea mucho más baja que la del $\bullet\text{OH}$. De hecho, CAF se propone como un modesto atrapador de $\bullet\text{OCH}_3$, y probablemente de otros radicales alcoxilo, y pobre ante $\bullet\text{OOH}$ y probablemente ante otros peroxilos no halogenados. Este hallazgo está de acuerdo con los resultados reportados por Devasagayam y colaboradores,¹³³ quienes encontraron que la cafeína es un pobre inhibidor de la peroxidación inducida por $\bullet\text{OOH}$. Los resultados presentados sugieren que la cafeína es más reactiva frente a radicales alcoxilo ($\text{RO}\bullet$) que hacia los radicales peroxilo ($\text{ROO}\bullet$). Sin embargo, hay que señalar que esta tendencia es válida para grupos R idénticos, ya que el carácter electro-aceptor del grupo R influye fuertemente en la reactividad de estos radicales. Por ejemplo los radicales alcoxilo y peroxilo con $\text{R}=\text{CCl}_3$ han demostrado ser mucho más reactivos que los que tienen grupos alquilo o alquenilo como R.¹¹⁷

Se predice que PAR reaccione en medios no polares alrededor de 4.3, 16.3 y 25.1 veces más rápido que en solución acuosa, con $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OCH}_3$, and $\bullet\text{OOH}$, respectivamente. Para THB, se encontraron estos radios igual a 3.5, 25.5 y 193.5; mientras que para THP se encontraron de 3.4 y 18.0 y para MXT de 109.1; 2.7, 13.3 y 68.0. Según estos valores, la

magnitud de la reactividad disminuye cuando la polaridad del medio aumenta, así como cuando la reactividad relativa del radical que reacciona disminuye, donde la mayor reducción corresponde a las reacciones con $\bullet\text{OOH}$.

Las reacciones de los metabolitos estudiados con $\bullet\text{OH}$ resultaron ser controladas por difusión ($k > 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) en ambos medios, apoyando su excelente actividad atrapadora frente al $\bullet\text{OH}$. Las constantes de velocidad globales de las reacciones con $\bullet\text{OCH}_3$ son considerablemente más bajas que aquellas con $\bullet\text{OH}$, pero todavía son lo suficientemente rápidas como para proteger significativamente frente a este radical. El mejor atrapador de $\bullet\text{OCH}_3$, entre los compuestos estudiados se encontró que es THB, mientras MXT está previsto que tenga la actividad más baja. THB y PAR se predijeron que reaccionan con este radical más rápido que la CAF, mientras que las reacciones de THP y MXT se predicen más lentas.

Los valores más bajos de las constantes de velocidad sistemáticamente corresponden a las reacciones con $\bullet\text{OOH}$, en concordancia con su baja reactividad relativa. Precisamente es debido a esta baja reactividad relativa que las reacciones con $\bullet\text{OOH}$ han sido elegidas para evaluar la reactividad relativa de los compuestos estudiados. Si las reacciones con radicales más reactivos, como $\bullet\text{OH}$ fueran utilizadas en su lugar, podríamos llegar a concluir erróneamente que todos tienen reactividad similar, ya que las reacciones con este radical a menudo son controladas por difusión. Tal comparación podría ser engañosa y se prefiere y recomienda utilizar el menos reactivo de los radicales estudiados ($\bullet\text{OOH}$).

En ambientes no polares, la actividad de depuración del radical peroxilo de THB ($k = 53.4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) resultó para ser mayor que las de THP ($k = 4.21 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), MXT ($k = 2.57 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y PAR ($k = 1.05 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). También se encontró que THB reaccionará 1.7 veces más rápido con $\bullet\text{OOH}$ que su precursor CAF ($31.9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Por el contrario se predice que THB reaccione con $\bullet\text{OOH}$ a tasas significativamente más lentas que el otro metabolito de CAF, AMU ($k = 1.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Además, teniendo en cuenta que las constantes correspondientes a los daños a ácidos grasos insaturados por el $\bullet\text{OOH}$ están en el rango de $(1.18 - 3.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})^{135}$ ninguno de los metabolitos de la cafeína estudiados en este trabajo se predice como buen protector contra la peroxidación de lípidos (y tampoco su precursor, CAF), mientras que AMU se espera que tenga efectos protectores moderados

pero perceptibles ($k = 1.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). En consecuencia no se espera que los efectos protectores de la CAF disminuyan después de que ésta sea metabolizada, sino que se incrementen, particularmente debido a la formación de AMU.

Tabla 8. Constantes de velocidad (k) de los diferentes canales y radicales de los metabolitos de la CAF, y coeficientes totales ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), a 298.15 K. **(I)** Benceno, **(II)** solución acuosa.

	$\bullet\text{OH}$		$\bullet\text{OCH}_3$		$\bullet\text{OOH}$		$\bullet\text{OOCH}_3$	
	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
CAF								
<i>RAF</i>								
C4	2.65E+05	2.50E+07						
C5	1.52E+09	2.34E+09						
C8	6.31E+08	2.32E+09	1.38E+03	6.59E+04	3.29E-01	3.19E+01		
<i>HT</i>								
R1a	8.99E+04	3.47E+08	4.03E+02	3.44E+03				
R1b	4.18E+05	8.81E+08						
R2a	7.99E+05	2.98E+08	1.96E+02	3.02E+03				
R2b	2.54E+05	9.99E+08						
R3	1.35E+05	9.89E+08	4.43E+01	2.08E+03				
Global	2.15E+09	8.20E+09	2.02E+03	7.44E+04	3.29E-01	3.19E+01		

PAR								
<i>RAF</i>								
C2	8.75E-02	7.52E-02						
C4	4.62E+07	3.54E+06	1.65E+01	3.01E+00				
C5	2.94E+09	1.94E+09						
C8	2.80E+09	2.56E+08	7.75E+04	4.63E+03	1.05E+00	4.18E-02		
<i>HT</i>								
R1	1.13E+09	1.55E+06	1.50E+03	2.19E+02				
R3	1.72E+09	2.64E+06	5.45E+01	1.74E+00				
N3	7.67E+05	1.33E+02	2.89E+00	6.42E-03				
Global	9.40E+09	2.20E+09	7.91E+04	4.85E+03	1.05E+00	4.18E-02		

THB								

RAF

C2	3.05E+00	4.92E-01	2.99E-08	4.52E-07		
C4	8.85E+07	5.81E+06				
C5	2.94E+09	1.97E+09				
C8	2.87E+09	4.02E+08	1.08E+05	4.25E+03	5.34E+01	2.76E-01

HT

R2	1.34E+09	1.71E+06	2.05E+02	2.21E+01		
R3	1.53E+09	1.79E+06	1.59E+03	4.02E+01		
Global	8.76E+09	2.38E+09	1.10E+05	4.31E+03	5.34E+01	2.76E-01

THP

RAF

C2	6.46E+00	1.98E+00				
C4	1.16E+08	1.47E+07	1.57E+01	2.90E+00		
C5	2.92E+09	1.91E+09				
C8	2.10E+09	1.34E+08	1.24E+04	5.82E+02	4.21E+00	3.86E-02

HT

R1	1.03E+09	1.33E+06	6.93E+01	8.84E+00		
R2	9.30E+08	8.95E+05	2.55E+03	2.40E+02		
N7	3.33E+06	1.14E-02	3.49E+01	5.33E-04		
Global	7.10E+09	2.07E+09	1.50E+04	8.34E+02	4.21E+00	3.86E-02

MXT

RAF

C2	2.13E-02	3.25E-02				
C4	6.41E+07	9.68E+06	2.30E+01	5.57E+00		
C5	2.92E+09	1.95E+09				
C8	1.75E+09	9.76E+07	6.97E+03	4.76E+02	2.57E+00	3.78E-02

HT

R1	7.89E+08	1.32E+06	1.87E+00	5.35E-03		
N3	1.83E+06	4.17E+02	8.01E+02	1.19E+02		
N7	5.47E+05	5.63E-04	1.51E+02	3.33E-02		
Global	5.53E+09	2.06E+09	7.95E+03	6.00E+02	2.57E+00	3.78E-02

AMU

<i>SET</i>		7.79E+09		1.14E+08		
------------	--	----------	--	----------	--	--

RAF

C2		2.04E+09				
C4	3.00E+09	2.04E+09	6.79E+05	8.63E+04	1.00E+03	

C5	2.95E+09	2.04E+09	1.24E+06					
C6	7.46E+07	2.04E+09						
C8	1.43E+04	2.04E+09	1.00E-02	5.93E+03				
<i>HT</i>								
R1	3.71E+08	1.97E+07	2.40E+03	1.65E+02				
N3	5.67E+08		2.50E+05		4.58E-01		7.15E-01	
N7	3.33E+08	3.45E+06	2.02E+04	5.52E+04		3.16E+00		5.91E-03
N9	6.36E+07	3.45E+06	4.05E+04	1.73E-03	7.82E+01	1.82E+03	2.22E-01	2.11E+01
Global	7.92E+09	1.80E+10	2.23E+06	1.14E+08	1.08E+03	1.83E+03	9.37E-01	2.11E+01

Las contribuciones de los diferentes canales de la reacción en soluciones acuosas y el benceno se reportan en la Tabla 9. Representan la contribución porcentual de los diferentes canales de la reacción global, y se han calculado como:

$$\Gamma_i = \frac{k_i}{k_{global}} \times 100$$

Dado que sólo un canal de reacción resultó ser termoquímicamente viable para la reacción de los primeros 4 compuestos estudiados con $\bullet\text{OOH}$ (RAF en C8), se supone que este canal representa la reactividad total de estos compuestos frente a este radical, y por lo tanto, el mecanismo RAF es el único que contribuye a la reactividad global en este caso. Para el caso de AMU, se presentan más canales posibles para la reacción con $\bullet\text{OOH}$. Para las reacciones con $\bullet\text{OH}$, las contribuciones del mecanismo de la RAF son de ~100% a la actividad antioxidante de este compuesto en solución acuosa, pero sólo ~57%, en ambientes no polares, donde la HT se espera que contribuya con otro 43%. Para la reacción CAF + $\bullet\text{OCH}_3$, por el contrario, ambos canales contribuyen a la reactividad general de la cafeína de forma significativa, independientemente de la polaridad del medio ambiente. Se estimó que estas contribuciones son de ~68% (RAF) y ~32% (HAT) en solución acuosa, y ~88,5% (RAF) y ~11,5% (HT) en medios no polares. Con base en estos resultados se puede afirmar que en general el principal mecanismo involucrado en la actividad de captación de ROS directa de estos compuestos es la formación de aductos radicálicos (RAF).¹³⁶

En cuanto al sitio de reacción, para la reacción CAF + •OH en agua, se propone que ~70,6% de la reactividad general se debe a la RAF en C5 sitio, mientras que el otro ~29,5% proviene del sitio C8. Estos resultados apoyan la propuesta de Dalmazio y colaboradores.⁵⁵ Cuando esta reacción tiene lugar en un ambiente no polar se espera una distribución más amplia de productos, con poblaciones importantes de los productos obtenidos a partir de la RAF en los sitios de C5 y C8; y de HAT de los sitios C10, C12 y C14. Por lo tanto la distribución de productos formados se espera que sea influenciada no sólo por la naturaleza de los radicales, sino también por la polaridad del medio ambiente.

Tabla 9. Contribuciones porcentuales (I) de los diferentes caminos de reacción a la reactividad global, a 298.15 K. (I) Benceno, (II) solución acuosa

	•OH		•OCH ₃		•OOH	
	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
CAF						
<i>RAF</i>						
C4	~0	0.3				
C5	70.6	28.6				
C8	29.4	28.2	68.2	88.5	100	100
<i>HAT</i>						
C10	~0	14.9	19.9	4.6		
C12	~0	15.8	9.7	4.1		
C14	~0	12.1	2.2	2.8		

PAR						
<i>RAF</i>						
C2	~0.00	~0.00				
C4	0.53	0.16	0.02	0.06		
C5	34.01	88.01				
C8	32.44	11.64	98.01	95.38	100.00	100.00
<i>HAT</i>						
R1	13.07	0.07	1.90	4.52		
R3	19.93	0.12	0.07	0.04		
N3	0.01	~0.00	~0.00	~0.00		

THB						
<i>RAF</i>						
C2	~0.00	~0.00	~0.00	~0.00		

C4	1.01	0.24				
C5	33.52	82.70				
C8	32.20	16.91	98.37	98.55	100.00	100.00
<i>HAT</i>						
R2	15.31	0.07	0.19	0.51		
R3	17.41	0.08	1.45	0.93		

THP						
<i>RAF</i>						
C2	~0.00	~0.00				
C4	1.63	0.71	0.10	0.35		
C5	41.12	92.67				
C8	29.57	6.51	82.25	69.84	100.00	100.00
<i>HAT</i>						
R1	14.53	0.06	0.46	1.06		
R2	13.09	0.04	16.96	28.15		
N7	0.05	~0.00	0.23	~0.00		

MXT						
<i>RAF</i>						
C2	~0.00	~0.00				
C4	1.16	0.47	0.29	0.93		
C5	52.82	94.73				
C8	31.72	4.74	87.71	79.27		
<i>HAT</i>						
R1	14.26	0.06	0.02	~0.00		
N3	0.03	~0.00	10.08	19.80		
N7	0.01	~0.00	1.91	0.01		

AMU						
<i>SET</i>		43.18		99.87		
<i>RAF</i>						
C2		11.29				
C4	38.02	11.29	30.42	0.08	92.71	
C5	37.49	11.29	55.54	~0.00		
C6	0.95	11.29				
C8	~0.00	11.29	~0.00	0.01		
<i>HAT</i>						
R1	11.31	0.32	0.11	~0.00		
N3	7.19		11.22		0.04	
N7	4.23	0.02	0.90	0.05		0.17
N9	0.81	0.02	1.82	~0.00	7.24	99.83

Para la reacción de la CAF con radicales $\bullet\text{OCH}_3$, se espera que se formen cuatro productos en ambientes polares y no polares (Tabla 9). Ellos son los tres radicales posibles generados por HT de los grupos metilo, y el formado por la adición de radicales $\bullet\text{OCH}_3$ a C8. La proporción en que se forman es influenciada sólo moderadamente por la polaridad del medio ambiente, en contraste con lo que se encontró para la reacción $\text{CAF} + \bullet\text{OH}$. Se propone que el producto principal de la reacción $\text{CAF} + \bullet\text{OCH}_3$ se forma a través del canal RAF-C8. Este canal en particular, se espera que contribuya a la actividad de atrapamiento del $\bullet\text{OCH}_3$ por la CAF en un 68.2 y 88.5% en soluciones acuosas y benceno, respectivamente. Las contribuciones de los canales de HT son similares en medios no polares, aunque el canal menos favorecido es sistemáticamente el que corresponde al sitio C14. En solución acuosa este canal es también el menos favorecido entre los canales de HT, mientras que las abstracciones de H del sitio C10 es el canal de HT que más contribuye a la reactividad global de la CAF hacia radicales $\bullet\text{OCH}_3$.

6.2 Ácidos Fenólicos y metabolitos

Dado que los compuestos fenólicos contenidos en el café que fueron estudiados en este trabajo presentan además el grupo funcional carboxilo (ácido), lo primero que hay que tener en cuenta es la forma ácido-base de estos compuestos que predomina en el organismo. Los dos primeros pK_a s de los HCAD estudiados se reportan en la Tabla 10, así como las fracciones molares de las especies neutra (H_2X), mono-aniónica (HX^-) y di-aniónica (X^{2-}) a pH fisiológico (7.4). Dichas fracciones se estimaron utilizando las expresiones de las constantes correspondientes a los equilibrios de acidez y los valores experimentales de pK_a s. En los casos en los que se encontró más de un pK_a reportado para el mismo equilibrio ácido-base se utilizaron los valores promedio. Según los valores en la Tabla 10, la forma principal de los HCAD estudiados a pH fisiológico es la mono-aniónica, con poblaciones (P%) iguales a 94.5%, 94.9%, 92.5% y 98.5% para los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y dihidrocafeico, respectivamente. Por lo tanto, se podría asumir que los mono-aniones son las especies claves relacionadas con la actividad antirradicálica de estos compuestos a pH fisiológico. En consecuencia, en este trabajo hemos utilizado la especie neutra para las reacciones en entornos no polares (lípidos), donde las deprotonaciones son

insignificantes o no existentes debido a que no existiría solvatación suficiente para las especies iónicas, sin embargo, en solución acuosa los mono-aniones son las principales formas consideradas en este trabajo, salvo que se especifique lo contrario. De modo que las reacciones generales corresponderían a:

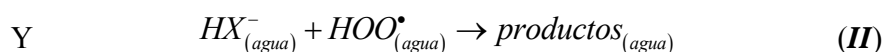
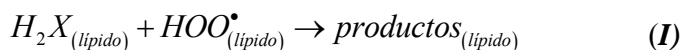


Tabla 10. Valores de los dos primeros *pK*as de los ácidos fenólicos estudiados y sus fracciones molares a *pH* = 7.4

	Ref.	<i>pK</i> a1	<i>pK</i> a2	<i>mF</i> (H ₂ X) [*]	<i>mF</i> (HX ⁻) [*]	<i>mF</i> (X ⁻²) [*]
H ₂ Frc	137	4.56	8.65	0.001	0.945	0.053
H ₂ Cmc	137	4.39	8.37			
	138	4.360	8.982			
	Promedio	4.38	8.68	0.001	0.949	0.050
H ₂ Cfc	79	4.36	8.48			
	137	4.47	8.32			
	139	4.43	8.69			
	Promedio	4.42	8.50	0.001	0.925	0.074
H ₂ Dhc	79	4.43	9.24	0.001	0.985	0.014

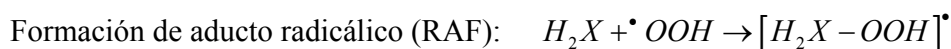
* X=Frc, Cmc, Cfc, Dhc

El radical hidroperoxilo (•OOH) ha sido elegido para esta parte del trabajo, porque es el más simple de los radicales peroxilo (ROO•), los cuales se encuentran entre los radicales libres de importancia biológica que pueden ser efectivamente capturados para retardar el estrés oxidativo. Esto es porque tienen tiempos de vida media no muy cortos, que es un requisito indispensable para la intercepción eficiente por compuestos fenólicos.¹⁴⁰ Por lo tanto, se han propuesto a los ROO• como contrapartes importantes en las reacciones de los compuestos fenólicos en medios biológicos.¹⁴⁰ Los ROO• también se han propuesto como partícipes en la oxidación de lipoproteínas y membranas biológicas y han sido encontrados responsables de daño microvascular.¹⁴¹ Incluso se ha llegado a proponer que la función principal de los compuestos fenólicos en los organismos vivos es atrapar radicales

ROO•.^{142,143} En el caso particular del •OOH, se sugiere a éste como central en los efectos tóxicos secundarios de la respiración aeróbica.¹³⁵ También se ha señalado que es necesaria más información sobre la reactividad de esta especie.¹³⁵ Además, los radicales de reactividad intermedia a baja se han recomendado para el estudio de la actividad antioxidante relativa de diferentes compuestos,^{44,45} ya que, como se mencionó anteriormente y se demostró para la familia de la CAF, los radicales altamente reactivos como el •OH reaccionan generalmente a velocidades limitadas por difusión con todos los compuestos comparados, lo que puede llevar a concluir erróneamente que todos son igualmente eficientes como antioxidantes. Además, se ha propuesto que estos radicales altamente reactivos no pueden ser interceptados en los sistemas biológicos con una eficiencia razonable por agentes químicos.¹³⁵

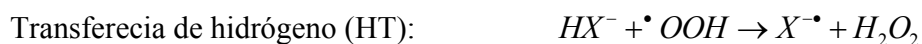
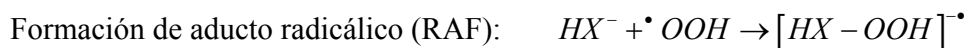
Con respecto a los mecanismos de reacción, la actividad atrapadora de radicales libres de los HCAD puede tener lugar por una gran variedad de ellos, como es el caso de muchos otros antioxidantes.¹⁴⁴⁻¹⁴⁸ Las consideradas en este trabajo son:

- *En medio lipídico (I):*



El mecanismo SET no se ha incluido en este caso, dado que los entornos no polares no promueven la solvatación necesaria de las especies iónicas intermedias generadas por este mecanismo. Sin embargo, sólo para demostrar este punto se calcularon las energías de reacción para el proceso SET y se encontró que son mayores de 70 kcal/mol en todos los casos. Esto confirma la no viabilidad de este mecanismo en medios no polares.

- *En medio acuoso (II):*



Además, en solución acuosa para las especies di-aniónicas también ha sido considerada la

Transferencia electrónica del dianión (SET-2): $X^- + \cdot OOH \rightarrow X^\cdot + HOO^-$

Este camino de reacción se ha incluido porque los di-aniones, si bien tienen poblaciones relativamente bajas, éstas no son despreciables, ($P\%(Frc^{-2})=5.3\%$, $P\%(Cmc^{-2})=5.0\%$, $P\%(Cfc^{-2})=7.4\%$, and $P\%(Dhc^{-2})=1.4\%$) y basados en consideraciones de carga, se espera que los di-aniones sean mejores donadores de electrones que los mono-aniones. Por lo tanto, aunque HX^- es la especie dominante bajo condiciones fisiológicas; en base a sus poblaciones relativas, las contribuciones de los dianiones a la actividad antioxidante global de los compuestos estudiados podrían ser significativas, siempre y cuando reaccionen con la suficiente rapidez.

Las energías libres de Gibbs de reacción de todos los sitios estudiados se reportan en la Tabla 11. Los procesos SET de los mono-aniones (SET-1) se encontraron endergónicos con valores de ΔG que van desde 23 hasta 28 kcal/mol, lo que significa que la reacción inversa es la que es espontánea. En consecuencia, este mecanismo de reacción no se espera que contribuya significativamente a la actividad depuradora del radical $\cdot OOH$ de los HCAD. El mismo comportamiento se espera también para otros ROO^\cdot donde R es un grupo alquilo o alquenilo. Sin embargo, el mecanismo SET puede ser viable para las reacciones de estos compuestos con otros radicales libres de mayor carácter electrofílico. Abordaremos este último punto al analizar los datos cinéticos.

Por otro lado se encontró que los procesos SET de los di-aniones (SET-2) son exergónicos para los ácidos dihidrocafeico y ferúlico, casi isoergónicos para el ácido cafeico y ligeramente endergónico para el ácido *p*-cumárico. Esto sugiere que los di-aniones pueden contribuir a la reactividad global de los HCAD hacia radicales peroxilos a través de SET.

Para el mecanismo RAF sólo un camino de reacción resultó ser termoquímicamente viable, independientemente del HCAD involucrado y de la polaridad del medio ambiente, el que corresponde a la adición de $\cdot OOH$ al sitio 8 en la cadena lateral etilénica. Como este fragmento funcional no está presente en el ácido dihidrocafeico, para este compuesto en particular no hay caminos de reacción correspondiente al mecanismo RAF que contribuyan a su reactividad global hacia $\cdot OOH$. Para el mecanismo HT, se encontró que los caminos que involucran a los grupos OH fenólicos son exergónicos, excepto el que corresponde a H_2Cmc en medio lipídico, que es casi isoergónico. Todas las rutas HT no fenólicas tienen

valores positivos de ΔG , excepto la que corresponde al sitio 7 en la cadena lateral de HDhc⁻ en solución acuosa. Además, la HT desde el OH fenólico en la posición 4a resultó ser la más exergónica de los sitios de reacción, independientemente de la polaridad del medio y del HCAD particular involucrado en la reacción. La única excepción a esta tendencia corresponde al ácido *p*-cumárico. En este caso particular, la exergonicidad más grande corresponde a la adición de [•]OOH al sitio 8. Por lo tanto, la presencia de otro grupo OH o de un grupo OCH₃ en posición *orto* favorece la reactividad del sitio 4a desde un punto de vista termoquímico. Así, mientras para los ácidos ferúlico, cafeico y dihidrocafeico los efectos de la cadena lateral etilénica pueden no ser importantes, para el ácido *p*-cumárico podría ser de cierta relevancia. Evaluaremos la importancia relativa de los diferentes mecanismos y canales de reacción en base a consideraciones cinéticas.

Tabla 11. Energías libres de Gibbs de reacción (kcal/mol), a 298.15 K.

	H ₂ Frc	HFrc ⁻	H ₂ Cmc	HCmc ⁻	H ₂ Cfc	HCfc ⁻	H ₂ Dhc	HDhc ⁻
	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
SET-1		23.67		27.30		24.95		25.29
SET-2		-1.77		1.59		-0.05		-4.79
<i>HT</i>								
Sitio 3a	14.12	11.27			-4.27	-5.75	-4.42	-7.08
Sitio 4a	-1.18	-7.16	0.12	-3.53	-6.24	-8.27	-6.27	-7.99
Sitio 7							2.42	-0.88
Sitio 8							7.41	4.68
Sitio 9a	27.33		37.90		37.69		26.88	
<i>RAF</i>								
Sitio 1	17.76	15.47	19.70	17.34	18.90	16.75	12.90	10.56
Sitio 2	14.30	12.31	14.35	11.96	13.26	11.92	15.42	12.78
Sitio 3	13.96	12.42	15.65	15.30	12.71	12.18	11.43	10.06
Sitio 4	7.94	5.47	9.86	9.30	7.17	8.56	10.86	10.28
Sitio 5	17.90	15.34	16.22	14.59	17.31	15.64	15.52	12.96
Sitio 6	8.81	8.01	12.90	11.76	10.07	9.71	15.83	13.21
Sitio 7	5.96	0.44	5.97	0.81	5.68	0.53		
Sitio 8	-0.61	-6.37	-0.29	-5.53	-0.73	-5.84		

(I) pentiletanoato, (II) agua

Al igual que en el caso de la familia de la cafeína, para los ácidos fenólicos no hemos incluido los canales de reacción descritos como endergónicos para el estudio cinético, porque incluso si se producen a una velocidad importante, serían reversibles y por lo tanto no se observarían los productos correspondientes. Sin embargo, debe notarse que éstos aún podrían representar canales importantes si los productos formados reaccionaran muy rápidamente. Esto sería especialmente importante si las etapas de reacción posteriores fueran suficientemente exergónicas para proporcionar una fuerza impulsora y si sus barreras de reacción fueran bajas. Se espera que éste sea el caso para el mecanismo SET, dado que el intermediario formado puede deprotonarse o protonarse espontáneamente.

Las geometrías totalmente optimizadas de los estados de transición (TS) se muestran en las figuras de la 23 a la 26. Todos los TS de las reacciones del ácido ferúlico presentan interacciones tipo puente de H (HB). Para el TS-4a esta interacción involucra al H en el radical $\cdot\text{OOH}$ y al O en el grupo metoxilo, mientras que para el TS-8 implica al átomo de O carboxílico en medios no polares y al O en el carboxilato en solución acuosa (Figura 23). La distancia HB es mayor en solución acuosa para el TS-4a que para el TS-8, lo que sugiere que esta interacción puede contribuir a aumentar la importancia relativa de los procesos RAF en medios polares.

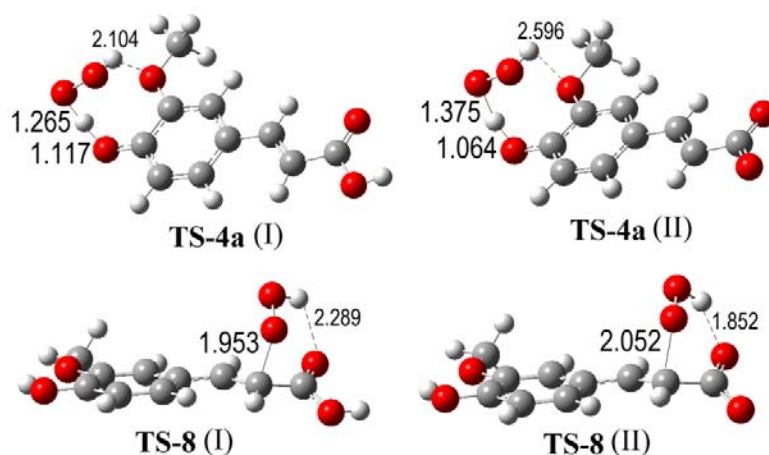


Figura 23. Geometrías optimizadas de los estados de transición del ácido ferúlico con el radical $\cdot\text{OOH}$.

(I) pentiletanoato, (II) solución acuosa.

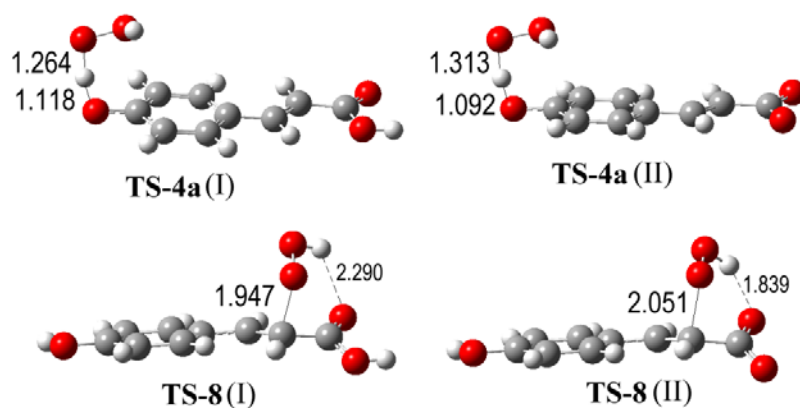


Figura 24. Geometrías optimizadas de los estados de transición del ácido *p*-cumárico con el radical $\cdot\text{OOH}$. (I) pentiletanoato, (II) solución acuosa.

Para el ácido *p*-cumárico sólo el TS-8 presenta interacciones de tipo HB (Figura 24), mientras que para el TS-4a tales interacciones no son posibles dado que en este caso no hay grupos polares en las proximidades del sitio de reacción. Como fue descrito para el ácido ferúlico, en este caso las HB son también más fuertes en solución acuosa que en entornos no polares. Por lo tanto, para este HCAD, las HB en los TS también favorecen la RAF sobre la HT, y se espera que esta diferencia sea más notoria en solución acuosa.

Para los ácidos cafeico y dihidrocafeico, las distancias de los HB en los estados de transición de HT (TS-3a y TS-4a) son demasiado largas (≥ 2.6 Å) para esperar una interacción importante, y son reportadas en las figuras 25 y 26 sólo para fines de comparación. Por el contrario, para el otro estado de transición de HT con el ácido dihidrocafeico (TS-7) y el correspondiente a la adición de $\cdot\text{OOH}$ al ácido cafeico en el sitio 8, las distancias de HB sugieren un efecto de estabilización. De manera similar a lo que se discutió para los otros HCAD, la interacción de tipo HB se predice como más fuerte en solución acuosa para TS-8 que para TS-4a. Esto puede explicarse basándose en el hecho de que en medios no polares el grupo carboxílico es neutro, mientras que en solución acuosa lleva una carga negativa debido a la deprotonación y por tanto su carácter electro-aceptor disminuye.

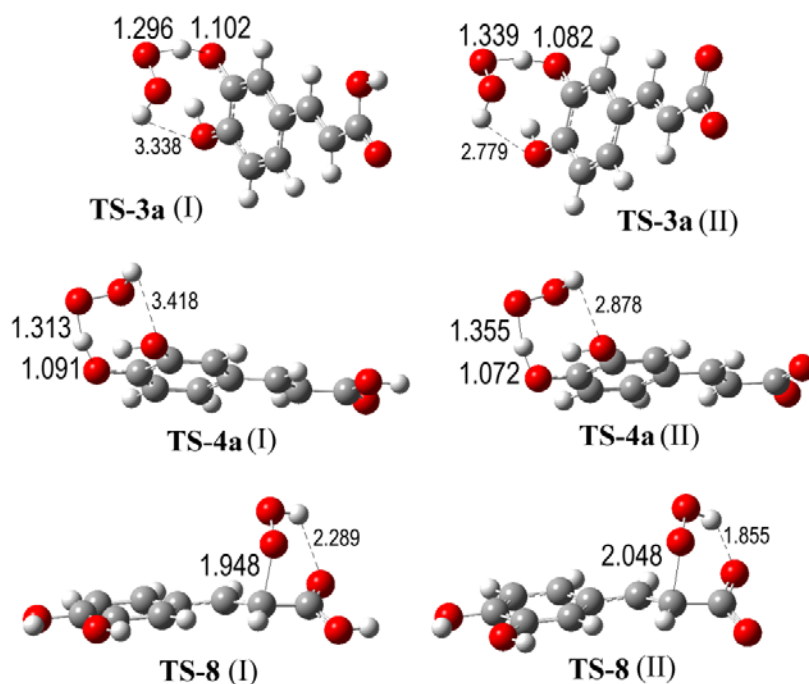


Figura 25. Geometrías optimizadas de los estados de transición del ácido cafeico con el radical $\cdot\text{OOH}$. (I) pentiletanoato, (II) solución acuosa.

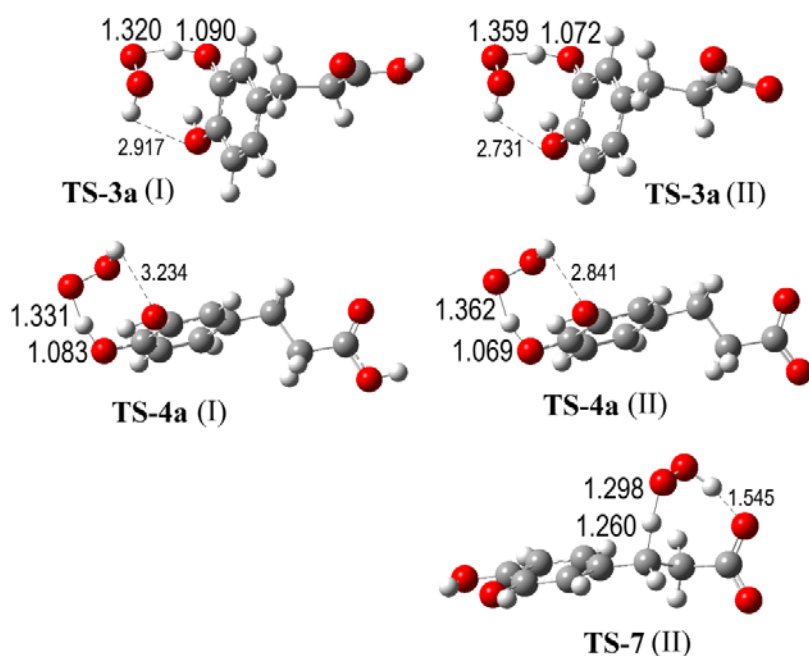


Figura 26. Geometrías optimizadas de los estados de transición del ácido dihidrocafeico con el radical $\cdot\text{OOH}$. (I) pentiletanoato, (II) solución acuosa.

Las energías libres de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger) se reportan en la Tabla 12. En solución acuosa, las correspondientes a los procesos SET de los di-aniones son las más bajas. Se encontró que dichas energías son mayores que 10 kcal/mol para todas las rutas HT y RAF. En medios no polares los valores de las ΔG^\ddagger de los caminos HT son sistemáticamente inferiores a los de las rutas RAF para todos los HCAD estudiados con la cadena lateral etilénica. Por el contrario, en solución acuosa los valores más bajos de ΔG^\ddagger corresponden a RAF en el sitio 8. Esta inversión está en concordancia con las características estructurales de los TS, en particular con las interacciones HB mencionadas anteriormente. En el caso del ácido dihidrocafeico, en el que no hay sitios RAF exergónicos, el valor de ΔG^\ddagger para la HT de la cadena lateral (sitio 7) resultó ser mayor que los correspondientes a las HT desde los OHs fenólicos.

Tabla 12. Energías libres de Gibbs de activación (kcal/mol), a 298.15 K.

	H ₂ Frc	HFrc ⁻	H ₂ Cmc	HCmc ⁻	H ₂ Cfc	HCfc ⁻	H ₂ Dhc	HDhc ⁻
	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
<i>SET-2</i>		3.10		4.72		4.04		2.39
<i>HT</i>								
Sitio 3a					13.52	14.74	14.23	12.90
Sitio 4a	15.51	14.80	15.57	17.01	13.80	14.16	12.63	11.64
Sitio 7								15.02
<i>RAF</i>								
Sitio 8	17.22	13.90	16.61	14.16	16.68	13.21		

(I) pentiletanoato, (II) solución acuosa.

Las constantes de velocidad de cada ruta de reacción, así como los coeficientes de velocidad globales (k_{global}), a pH fisiológico, se reportan en la Tabla 13. Los valores de k_{global} se calcularon como la suma de las constantes de velocidad de cada ruta, teniendo en cuenta las fracciones molares de las especies que reaccionan. En solución acuosa los procesos más rápidos fueron la transferencia de electrones de los di-aniones al radical [•]OOH (mecanismo SET-2). Por otro lado, en medios no polares donde dicho proceso no puede tener lugar, las reacciones más rápidas corresponden a HT de los grupos OH fenólicos, mientras que el proceso RAF (sitio 8) fue encontrado como el más lento,

independientemente de la polaridad del medio y del HCAD particular que es atrapador del radical peroxilo.

Tabla 13. Constantes de velocidad y coeficientes de velocidad globales ($M^{-1} s^{-1}$), a 298.15 K, para las reacciones de ácidos fenólicos con $\cdot OOH$.

	H ₂ Frc	HFrc ⁻	H ₂ Cmc	HCmc ⁻	H ₂ Cfc	HCfc ⁻	H ₂ Dhc	HDhc ⁻
	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
<i>SET-2</i>		3.36E+08		8.51E+07		2.69E+08		1.03E+08
<i>HT</i>								
Sitio 3a					2.53E+04	1.51E+04	3.84E+03	1.99E+05
Sitio 4a	9.12E+03	2.30E+04	4.34E+03	2.58E+03	1.40E+04	2.58E+04	4.56E+04	7.92E+05
Sitio 7								4.67E+03
<i>RAF</i>								
Sitio 8	2.94E+00	8.05E+02	8.25E+00	5.17E+02	7.36E+00	2.57E+03		
<i>Global</i>	9.13E+03	3.36E+08	4.35E+03	8.51E+07	3.93E+04	2.69E+08	4.95E+04	1.04E+08

(I) pentiletanoato (II) solución acuosa a pH=7.4

De acuerdo a los valores de k_{global} en entornos no polares el orden de reactividad de los compuestos estudiados hacia radicales peroxilo es: ácido dihidrocafeico > ácido cafeico > ácido ferúlico > ácido *p*-cumárico. Este orden está de acuerdo con los datos experimentales obtenidos en medios no acuosos para H₂Cfc, H₂Frc, y H₂Cmc, así como con el mayor efecto protector de H₂Dhc en medio lipídico,⁷⁸ comparado con H₂Cfc, y también con los resultados de Silva y col.⁷⁹ para estos dos compuestos. Se encontró que los coeficientes de velocidad globales, en medios no polares, están en el rango de 4×10^3 a $5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$. Por lo tanto, teniendo en cuenta que las constantes de velocidad correspondientes al daño que causa el $\cdot OOH$ a los ácidos grasos insaturados están en el rango de $1.18 - 3.05 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$, todos los compuestos estudiados se predicen como eficientes protectores contra la peroxidación lipídica, siendo el ácido cafeico y su metabolito, el ácido dihidrocafeico, los más eficientes. Esto apoya firmemente el papel del grupo catecol en la actividad de los HCAD como atrapadores de ROO• en fase lipídica, en los organismos vivos. También apoya la hipótesis de que en estas condiciones, la cadena lateral es de menor importancia. En comparación con otros antioxidantes, en entornos no polares, la actividad atrapadora de peroxilos de los ácidos cafeico y dihidrocafeico se

encontró inferior a la de los carotenos ($\sim 10^5$ - $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^{149,150} canolol ($6.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹⁵¹ e hidroxitirosol ($6.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$);¹²⁶ similar a la de la α -mangostina ($7.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹⁵² y sesamol ($3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²³ ligeramente superior a la del ácido sinapínico ($1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹⁵³ y considerablemente mayor que la de tirosol ($7.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²⁶ melatonina ($3.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹⁵⁴ y cafeína ($3.2 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹⁴⁸

En solución acuosa, a *pH* fisiológico, el orden de la actividad atrapadora cambia a ácido ferúlico > ácido cafeico > ácido dihidrocafeico > ácido *p*-cumárico, también de acuerdo con la evidencia experimental en tal medio. Además se encontró que el ácido ferúlico reacciona aproximadamente 1.25 veces más rápido que el ácido cafeico bajo tales condiciones, lo que correlaciona bien con la relación de reactividad (1.5) que encontraron Miller y col.⁷⁵ Con respecto a la actividad del ácido cafeico en solución acuosa, en comparación con su metabolito, encontramos que es 2.6 veces superior a *pH* = 7.4 lo cual está en acuerdo con los resultados reportados por Amorati y col.⁸⁰ a *pH* = 7.2 en vesículas unilaminares. En consecuencia, se puede afirmar que el ambiente tiene una influencia significativa en el orden de reactividad, en acuerdo con la propuesta de Moon y col.⁷⁸ Se encontró que en comparación con otros antioxidantes, en solución acuosa, la actividad frente a radicales peroxilo de estos compuestos es mucho mayor que la de melatonina ($2.0 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹⁵⁴ cafeína $3.3 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹⁴⁸ alicina ($7.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹⁵⁵ y tioacroleina ($2.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹⁵⁵ superior a la de la α -mangostina ($1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹⁵² y similar a la de ácido 2-propenilsulfénico ($2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹⁵⁵ glutatión ($2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹⁵⁶ y sesamol ($2.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²³ que son excelentes atrapadores de $\cdot\text{OOH}$. Basándonos en estos resultados se puede afirmar que los HCAD se encuentran entre los mejores atrapadores del radical hidroperoxilo en solución acuosa, a *pH* fisiológico. Se espera que esta misma tendencia se cumpla para otros radicales peroxilo donde R=grupos alquilo o alquenido.

Para realizar un análisis más detallado sobre la relación de la actividad y la estructura de los compuestos estudiados, se calcularon las contribuciones de los diferentes canales de reacción a la reactividad total. Éstas representan la contribución porcentual de cada sitio de reacción a la actividad global antirradicálica y se obtuvieron según la Ec. 70. Estas contribuciones (Tabla 14) permiten establecer la importancia relativa de los diferentes mecanismos y rutas de reacción, de acuerdo a los datos cinéticos. En solución acuosa, a *pH* fisiológico, se encontró que la transferencia de electrones desde los di-aniones de los

HCAD (SET-2) es el mecanismo más importantes de reacción a pesar de que la población de estas especies es bastante baja a $pH = 7.4$ (Tabla 14). Se encontró que este mecanismo es responsable de más del 99% de la reactividad global de los HCAD estudiados hacia $\cdot OOH$, aunque este radical tiene un carácter electrofílico más bien moderado. Estos hallazgos sugieren que los aniones fenóxido son el factor clave para la actividad antioxidante frente a radicales peroxilo de los HCAD en fase acuosa a pH fisiológico, lo que está de acuerdo con la propuesta de Amorati y col.⁸⁰ Además, la mayor actividad antioxidante del ácido cafeico bajo tales condiciones, con respecto al ácido dihidrocafeico, se puede atribuir a la menor población de Dhc^{2-} (1.4%), comparada con la de Cfc^{2-} (7.4%). También se puede concluir que en solución acuosa, a $pH = 7.4$, el papel de la cadena lateral es casi insignificante.

En entornos no polares, se encontró que las rutas de reacción más importantes son las correspondientes a HT desde los grupos OH fenólicos. Para H_2Frc y H_2Cmc , que tienen sólo uno de estos grupos, el sitio 4a es responsable de la mayor parte de la actividad antioxidante frente al $\cdot OOH$. Para H_2Cfc y H_2Dhc , que tienen un grupo catecol, ambos OHs contribuyen significativamente a la actividad global. Sin embargo, su importancia relativa es diferente en ambos compuestos. Para H_2Dhc la HT del OH ubicado en la posición *para* con respecto a la cadena lateral (sitio 4a) es el sitio de reacción principal con una contribución a la reactividad global superior al 92%. Por el contrario para H_2Cfc , la HT del sitio 3a (*meta* OH) es el canal principal de reacción. La inversión en la importancia relativa de estos dos canales puede explicarse por la naturaleza química de la cadena lateral. En el caso de H_2Cfc la cadena etilénica causa que se extienda la conjugación, lo que permite la propagación del efecto electro-aceptor del grupo carboxílico terminal. Esto hace que el OH *para* sea más afectado que el OH *meta*, disminuyendo la reactividad relativa del sitio 4a hacia los radicales electrofílicos. Por el contrario, en H_2Dhc el efecto electro-donador de la cadena lateral $-CH_2-CH_2-R$ aumenta la reactividad relativa de los OH *para* hacia los radicales electrofílicos. Por lo tanto puede concluirse que mientras los efectos de la cadena lateral en la reactividad general, y en el mecanismo de reacción preponderante de los compuestos estudiados es casi insignificante, éstos efectos pueden ser notorios en la importancia relativa de los diferentes caminos de reacción del mecanismo HT, en entornos no polares, para los HCAD con más de un OH fenólico.

Tabla 14. Contribuciones a la reactividad global (%), a 298.15 K.

	H ₂ Frc	HFrc ⁻	H ₂ Cmc	HCmc ⁻	H ₂ Cfc	HCfc ⁻	H ₂ Dhc	HDhc ⁻
	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
<i>SET-2</i>		99.99		100.00		99.98		99.05
<i>HT</i>								
Sitio 3a					64.38	0.01	7.75	0.19
Sitio 4a	99.97	0.01	99.81	~0.00	35.60	0.01	92.25	0.76
Sitio 7								~0.00
<i>RAF</i>								
Sitio 8	0.03	~0.00	0.19	~0.00	0.02	~0.00		

(I) pentiletanoato (II) solución acuosa a pH=7.4

Ya que en solución acuosa, a pH fisiológico, SET es el principal mecanismo de reacción de los HCAD con [•]OOH, ampliamos el estudio de dicho mecanismo a un conjunto mayor de radicales libres con diferente carácter electrofílico. En este conjunto extendido se incluyeron el radical hidroxilo ([•]OH) porque es el más electrofílico¹³² y el más reactivo de los radicales oxigenados; una serie de radicales peroxilos incluyendo Cl₃COO[•], que es uno de los más electrofílicos y CH₂CHCH₂OO[•] para imitar los radicales peroxilo de lípidos. Se incluyó también un conjunto equivalente de radicales alcoxilo, ya que su reactividad es intermedia entre los radicales [•]OH y peroxilos; y DPPH porque es uno de los más frecuentemente utilizados en experimentos relacionados con el comportamiento antioxidante. También se incluyeron N₃[•], SO₄^{•-}, Br₂^{•-}, NO₂[•], y el catión radical 2'-deoxiguanosina (2dG^{•+}) ya que hay datos experimentales disponibles para ellos.

Las constantes de velocidad para las reacciones SET con estos radicales, teniendo en cuenta las fracciones molares de las formas ácido-base de los HCAD a pH = 7.4, se reportan en la Tabla 15. Los datos experimentales disponibles también se incluyeron en esta tabla. Según estos valores, los HCAD estudiados son excelentes atrapadores de radicales libres mediante SET. Sus constantes de velocidad resultaron ser del orden de 10⁷-10⁹ M⁻¹s⁻¹ con una gran variedad de radicales libres, lo que indica que los HCAD son antioxidantes versátiles.

Tabla 15. Constantes de velocidad calculadas para las reacciones vía SET a 298.15 K en solución acuosa a pH=7.4. Los valores experimentales disponibles están en paréntesis.*

	HFrc ⁻ /Frc ²⁻	HCmc ⁻ /Cmc ²⁻	HCfc ⁻ /Cfc ²⁻	HDhc ⁻ /Dhc ²⁻
·OH	1.13E+09	8.90E+08	1.09E+09	1.15E+09
CH ₃ O·	5.75E+07	5.44E+07	8.01E+07	1.54E+07
CCl ₃ O·	9.21E+08	9.27E+08	9.02E+08	9.61E+08
CH ₂ CHCH ₂ O·	5.31E+07	5.02E+07	7.40E+07	1.42E+07
HOO·	5.80E+07	3.72E+07	7.16E+07	1.59E+07
CH ₃ OO·	4.76E+07	1.13E+07	3.92E+07	1.44E+07
CCl ₃ OO·	1.61E+08 (2.8E+07) ¹⁵⁹	5.12E+07	1.03E+08 (2.0E+07) ¹⁵⁹	3.29E+07
CH ₂ CHCH ₂ OO·	4.70E+07	1.66E+07	4.62E+07	1.36E+07
DPPH	4.26E+07	4.03E+07	5.94E+07	1.14E+07
Br ₂ ⁻	5.43E+07 (1.8E+08) ¹⁵⁷	5.12E+07	7.55E+07	1.45E+07
SO ₄ ⁻	9.60E+08 (3.2E+09) ⁷³ (3.8E+09) ⁷¹	9.63E+08	9.39E+08 (3.9E+09) ⁷³ (5.6E+09) ⁷¹	1.00E+09
NO ₂ ⁻	6.01E+07 (7.4E+08) ¹⁵⁸	5.56E+07	8.23E+07 (8.6E+08) ¹⁵⁸	1.60E+07
N ₃ ⁻	8.19E+08 (4.25E+09) ¹⁵⁷	2.12E+06	2.79E+08	1.98E+08
2dG ⁺⁺	7.99E+08 (1.0E+09) ⁷¹	8.20E+08	8.15E+08 (1.7E+09) ⁷¹	8.28E+08

* Ref. 71, 157 y 158 (pH=7)

Ref. 73 y 159 (pH sin especificar)

Comparando los datos calculados con los experimentales, puede observarse que existe un acuerdo excelente para la reacción con 2dG⁺⁺, siendo la constante calculada sólo 1.22 y 2.05 veces inferior. Para las reacciones con N₃⁻, SO₄⁻, Br₂⁻, y NO₂⁻ la diferencia es mayor pero todavía pequeña y en la misma dirección, siendo la mayor diferencia la correspondiente a la reacción con NO₂⁻. La explicación para estas diferencias es que a pesar de que en los informes experimentales se supuso que SET es el único proceso que contribuye a desactivar los radicales libres; otros mecanismos, en particular la HT, pueden tener una contribución pequeña pero significativa a la reactividad global de los HCAD hacia los radicales libres. Si nuestra hipótesis es correcta, estas contribuciones serían

mayores para las reacciones con NO_2^\bullet que para aquellas con N_3^\bullet , $\text{SO}_4^{\bullet-}$ y $\text{Br}_2^{\bullet-}$. En el caso particular de las reacciones con $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$ los valores calculados son mayores que los obtenidos experimentalmente.¹⁵⁹ Ya que el *pH* en el que se realizaron estos experimentos no se especifica en la referencia 159, la hipótesis es que se realizaron a *pH* inferior a 7.4. Esta hipótesis se soporta mediante la comparación de las constantes experimentales para $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$ con las de los otros radicales libres que se sabe que tienen un menor carácter electrofílico, y que sin embargo son mayores.

Ya que el *pH* parece ser uno de los factores clave que influyen en la reactividad de los HCAD hacia los radicales libres, y que se reportó previamente que su eficiencia antioxidante se hace sustancialmente mayor a medida que aumenta el *pH* de 4 a 8,⁸⁰ este punto también ha sido abordado en el presente trabajo. La dependencia de los coeficientes de velocidad global de las reacciones entre los HCAD estudiados y $^\bullet\text{OOH}$ se muestra en la Figura 27 para el mismo rango de *pH* que se estudió experimentalmente. Se encontró que el aumento en la reactividad cuando la acidez del medio disminuye es considerable, en acuerdo con las observaciones de Amorati y col.⁸⁰ En el intervalo de *pH* estudiado, se encontró que el ácido *p*-cumárico presenta la menor constante de velocidad de todos los HCAD estudiados, mientras que las reactividades de los ácidos cafeico y ferúlico son muy similares entre sí. Por lo tanto, se propone que la reactividad relativa de estos tres HDCA en solución acuosa no está influenciada por el *pH* del medio.

Por el contrario el *pH* parece tener fuertes efectos sobre la reactividad relativa del ácido dihidrocafeico. A *pHs* ácidos ($\leq 4,5$) la actividad atrapadora de $^\bullet\text{OOH}$ del ácido dihidrocafeico es considerablemente más alta que la de los de ácidos cafeico, ferúlico y *p*-cumárico. A *pH* ≈ 5.2 resulta similar a la de los ácidos cafeico y ferúlico, mientras que a *pH* ≥ 6 es menor. Esto puede explicarse en función de las constantes de velocidad de los diferentes mecanismos de reacción (Tabla 14). Mientras que para el ácido dihidrocafeico la HT desde el OH fenólico está en el orden de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en solución acuosa, las de los otros HCAD son uno o dos órdenes de magnitud menores. Esto significa que a *pHs* ácidos, donde las aportaciones del proceso SET-2 se vuelven menos importante debido a la disminución significativa de las poblaciones de la forma di-aniónica, es decir, el HT se convierte en el principal mecanismo de reacción, H_2Dhc exhibe la mejor actividad antioxidante frente a peroxilos entre los HCAD estudiados. La mayor reactividad de H_2Dhc a través del mecanismo HT puede explicarse por el carácter electro-donador de su cadena lateral. Por lo

tanto, a pesar de que en solución acuosa a pH fisiológico la importancia de la cadena lateral es menor o incluso insignificante, puede ser importante para la eficacia antioxidante relativa de los compuestos estudiados a pH s ácidos, tales como las que se encuentran en algunas partes del tracto digestivo.

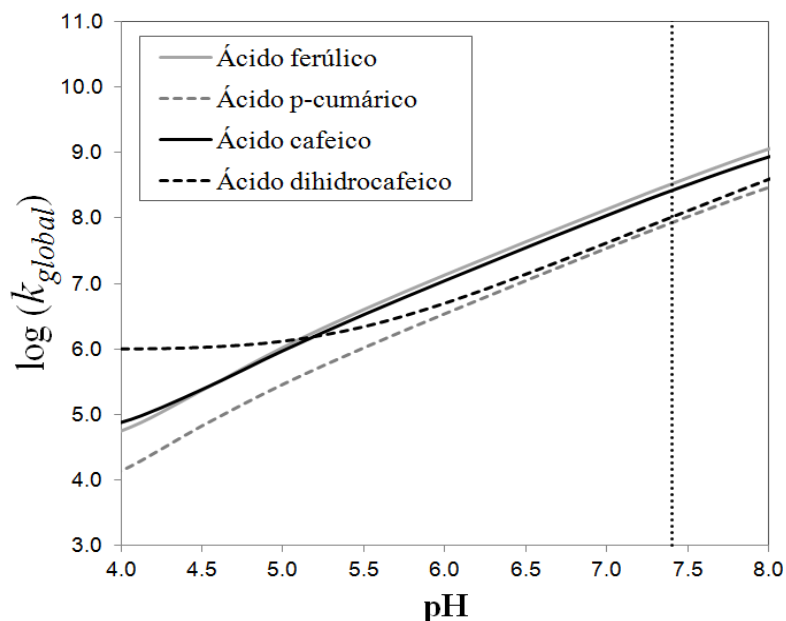


Figura 27. Variación de las constantes de velocidad globales con el pH , para las reacciones de los HCAD + $\cdot OOH$ en solución acuosa.

6.3 Eficiencia antioxidante relativa de los compuestos estudiados

Los valores obtenidos de las constantes de velocidad globales pueden servir como referencia para comparar la capacidad antioxidante de los compuestos estudiados frente a otros compuestos que se hayan reportado como antioxidantes. Para tal efecto, dichas comparaciones deben establecerse con criterios que permitan una correcta diferenciación entre los valores reportados por lo que se necesita una comparación sin ambigüedades, es decir, entre reacciones que se lleven a cabo en condiciones similares (mismo solvente, mismo radical, misma temperatura). Por ello, la eficiencia en este caso se suele reportar en base a los valores obtenidos de las constantes de velocidad globales para las reacciones de los antioxidantes con el radical $\cdot OOH$, ya que dicho radical está dentro de los menos

reactivos, lo que permite ampliar la diferenciación en una escala más marcada entre la actividad antioxidante de los diferentes compuestos.

En la Tabla 16 se muestran los valores de algunos coeficientes de velocidad globales para las reacciones con el radical $\bullet\text{OOH}$ en medio lipídico de una serie de compuestos propuestos como antioxidantes junto con los compuestos estudiados en este trabajo. En dicha comparación se puede observar que los ácidos fenólicos del café se encuentran entre los compuestos que reportan una buena eficiencia para el atrapamiento de radicales $\bullet\text{OOH}$, no así los compuestos de la familia de la cafeína, siendo el AMU el único que con un coeficiente que refleja una acción antioxidante moderada. En esta tabla se observa que es el ácido dihidrocafeico el que presenta un mejor coeficiente de actividad global frente a los demás compuestos estudiados presentes en el café.

Tabla 16. Comparación de los coeficientes globales de reacción de algunos antioxidantes con $\bullet\text{OOH}$ en medio lipídico.

Antioxidante	$k_{\text{global}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
Licopeno	1.69×10^6
Toruleno	9.45×10^5
Canolol	6.82×10^5
Hidroxitirosol	6.42×10^5
β -caroteno	2.81×10^5
Ácido dihidrocafeico	4.95×10^4
Sesamol	3.33×10^4
Ácido sinápinico	1.66×10^4
Ácido cafeico	3.93×10^4
Ácido ferúlico	9.13×10^3
α -mangostina	7.19×10^3
Capsaicina	6.54×10^3
Alcohol vainillínico	5.67×10^3

Ácido protocatequico	5.14×10^3
Ácido <i>p</i>-cumárico	4.35×10^3
Eugenol	2.49×10^3
Ácido 1-metilúrico	1.08×10^3
Tirosol	7.13×10^2
Melatonina	3.11×10^2
Vainillina	9.75×10^1
Teobromina	5.34×10^1
Cafeína	3.19×10^1
Teofilina	4.21
1-Metilxantina	2.57
Paraxantina	1.05
Edaravone	7.81×10^{-1}

Para los casos en que las reacciones con el radical $\bullet\text{OOH}$ se lleven a cabo en medio acuoso, los valores de los coeficientes de velocidad globales se reportan en la Tabla 17. En estos casos, se puede notar que los ácidos fenólicos del café se encuentran entre los compuestos con mejor eficiencia reportada para el atrapamiento de radicales $\bullet\text{OOH}$, y en el caso del ácido ferúlico, su coeficiente sólo es superado por el edaravone, el cual es un compuesto que fue especialmente diseñado para actuar como atrapador de radicales libres. Mientras que entre los compuestos de la familia de la cafeína, de forma similar que para medio lipídico, el AMU es el único que reporta un coeficiente que refleja una acción antioxidante moderada, no así los demás. En esta tabla se observa que es el ácido dihidrocafeico el que presenta un mejor coeficiente de actividad global frente a los demás compuestos estudiados dentro de esta familia. En base a esto, podemos concluir que todos los compuestos fenólicos del café, incluyendo el metabolito del ácido cafeico, se encuentran entre los mejores atrapadores de radicales libres en medio acuoso. Esto es importante ya que es de esperarse entonces que la actividad del ácido cafeico no se reduzca luego de ser metabolizado. De esta forma, se puede concluir que los ácidos fenólicos son

los responsables en mayor medida de la acción antioxidante de la infusión del café que los compuestos de la familia de la cafeína.

Tabla 17. Comparación de los coeficientes globales de reacción de algunos antioxidantes con $\bullet\text{OOH}$ en medio acuoso.

Antioxidante	$k_{\text{global}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
Edaravone	4.30×10^8
Ácido ferúlico	3.36×10^8
Ácido cafeico	2.69×10^8
Sesamol	2.44×10^8
Ácido dihidrocafeico	1.04×10^8
Ácido <i>p</i>-cumárico	8.51×10^7
Glutatión	2.69×10^7
Ácido vainillínico	1.65×10^7
Ácido protocatéquico	1.26×10^7
Álcohol vainillínico	4.12×10^6
Canolol	2.47×10^6
Guaiacol	2.38×10^6
α -mangostina	1.42×10^6
Hidroxitirosol	7.49×10^5
Ácido sinápinico	5.39×10^5
β -caroteno	5.69×10^4
Tioacroleina	2.87×10^4
Capsaicina	2.07×10^4
Alicina	7.38×10^3
Ácido 1-metilúrico	1.08×10^3
Melatonina	1.99×10^1
Cafeína	3.29×10^{-1}
Teobromina	2.76×10^{-1}
1-Metilxantina	3.78×10^{-2}
Teofilina	3.82×10^{-2}
Paraxantina	4.18×10^{-2}

7. Conclusiones

La actividad antirradicálica de 10 compuestos presentes en el café ha sido estudiada utilizando diferentes herramientas de la química computacional. Este estudio se ha realizado para medios acuoso y lipídico y teniendo en cuenta diferentes mecanismos de reacción, entre los que destacan la transferencia de H, la transferencia electrónica y la formación de aductos. Además se investigó la capacidad atrapadora con respecto a diferentes radicales libres incluyendo los más representativos del daño a los organismos vivos ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, $\cdot\text{OOH}$, y $\cdot\text{OOCH}_3$).

En general puede concluirse que tanto la polaridad del medio, como el pH en solución acuosa, y la naturaleza química del radical libre que reaccionan juegan un papel en la actividad antioxidante global de los compuestos estudiados y también en la importancia relativa de los diferentes mecanismos de reacción en esta actividad.

Para la familia de la cafeína, con excepción del ácido 1-metil úrico, se encontró que el mecanismo de SET no contribuye a la actividad global, siendo los mecanismos más importantes RAF y HT, en ese orden. Para estos compuestos se encontró que tienen mejor actividad en ambientes no polares que polares y que son excelentes atrapadores de radicales $\cdot\text{OH}$, moderados para desactivar radicales alcoxilos e ineficientes para radicales peroxilo (no halogenados).

El cido 1-metil úrico tiene un comportamiento particular dentro de esta serie de compuestos. En este caso el mecanismo SET se vuelve el más importante en medio acuoso para radicales $\cdot\text{OH}$ y alcoxilo, mientras que RAF sigue siendo el mecanismo principal con estos mismos radicales pero en medio no polar. En cuanto a la actividad atrapadora de radicales peroxilo, ésta tiene lugar mayoritariamente via HT sin importar la polaridad del medio. Además la actividad protectora de este metabolito de la cafeína en particular es mayor en medio acuoso que en medio lipídico. Su actividad es excelente para $\cdot\text{OH}$, buena para alcoxilos y moderada para peroxilo. De hecho es el único de los compuestos de esta serie capaz de atrapar con eficiencia razonable a los radicales peroxilo.

Teniendo en cuenta lo analizado hasta el momento puede concluirse que lejos de perder capacidad protectora luego de metabolizarse, la cafeína incrementa su actividad debido en particular a la formación del ácido 1-metil rico.

Como es el caso para muchos antioxidantes las reacciones de estos compuestos con el radical $\cdot\text{OH}$ ocurren limitadas solamente por la difusión. Esto hace que realizar comparaciones basadas en la reactividad hacia ese radical no sea una buena estrategia ya que las diferencias suelen ser muy pequeñas en todos los casos. Es por ello que se recomienda utilizar radicales menos reactivos, como los peroxilos, para este propósito, de modo que se maximicen las diferencias de actividad entre los diferentes compuestos comparados.

Es por ello que para el estudio de los ácidos fenólicos sólo se estudiaron las reacciones con el radical $\cdot\text{OOH}$. Se encontró que para los cuatro compuestos estudiados la reactividad se incrementa en medio acuoso, debido a la formación de los aniones fenóxido que son identificadas como las especies clave en la actividad protectora de estos compuestos en este medio.

En medio no polar y en medio acuoso a pHs ácidos (donde las poblaciones de los aniones fenóxido son despreciables) se encontró que el mecanismo fundamental de acción es la HT justamente de los H fenólicos. Por el contrario a pHs más altos, como es el caso del pH fisiológico (7.4) el mecanismo preponderante es la SET desde el anión hacia los radicales $\cdot\text{OOH}$.

Se encontró que todos los ácidos fenólicos estudiados son capaces de evitar eficientemente la peroxidación lipídica y además que estos compuestos se encuentran dentro de los mejores protectores en solución acuosa reportados hasta el momento.

El orden de actividad de los compuestos del café estudiados en el presente trabajo cuando actúan en medio no polar es: ácido dihidrocaféico > ácido caféico > ácido ferúlico > ácido p-cumárico > ácido 1-metil úrico > teobromina > cafeína > teofilina > 1- metilxantina > paraxantina.

En medio acuoso este orden cambia a: ácido ferúlico > ácido caféico > ácido dihidrocaféico > ácido p-cumárico > ácido 1-metil úrico > cafeína > teobromina > 1- metilxantina > teofilina > paraxantina.

Con base a todo el estudio realizado puede concluirse que la actividad antioxidante del café es debida en mayor medida a los ácidos fenólicos que a los compuestos de la familia de la cafeína.

El buen acuerdo con los datos experimentales disponibles soporta la confiabilidad de los resultados obtenidos en la presente investigación.

8. Perspectivas

Entre las perspectivas en un futuro cercano, está contemplado ampliar el estudio de la capacidad antioxidante en medio acuoso y lipídico a otros compuestos presentes en el café, de modo que el estudio de los componentes activos para este propósito sea lo más completo posible.

Además se pretende ampliar el estudio, incluyendo la capacidad de estos compuestos no sólo como protectores químicos, sino también como posibles reparadores de moléculas biológicas ya dañadas como proteínas y DNA, contemplando para esta actividad dos mecanismos de reacción fundamentales HT y SET.

Otro aspecto interesante que se pretende estudiar es la posible regeneración del grupo catecol para los ácidos fenólicos que lo contienen (en particular para los ácidos cafeico y dihidrocafeico) en medio acuoso. Esta atractiva propiedad ha sido propuesta en nuestro grupo de investigación para el ácido protocatequico y sería interesante comprobar si es una generalidad que se cumple también para otros compuestos con esta característica estructural.

9. Referencias

- ¹ Raab, O. Z. *Biol.* **1900**, 39, 524.
- ² Mulliken, R. S. *Physiol. Rev.* **1929**, 32, 880.
- ³ Singh, A. En: *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants*, Miquel J.; Quintanilha.; A.T.; Weber H. (Eds), vol. I CRC Press; **1989**, p.17.
- ⁴ Pham-Huy, LA.; He, H.; Pham-Huy, C.; *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**; 10, 89.
- ⁵ Droge, W.; *Physiol. Rev.* **2002**; 82, 47.
- ⁶ Young, I.; Woodside, J.; *J. Clin. Pathol.* **2001**; 54,176.
- ⁷ Halliwell, B.; *Biochem. Soc.Trans.* **2007**; 35, 1147.
- ⁸ Valkom, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin M.T.; Mazur M.; Telser J. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, 39, 44.
- ⁹ Matsuura, R.; Moriyama, H.; Takeda, N Yamamoto K.; Morita Y.; Shimamura T.; Ukeda H. *J Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 544.
- ¹⁰ Khomdram, S.; Devi, G. A. S. *Bioscan* **2010**, 5, 501.
- ¹¹ Dam, H.; Granados, G. H. *Acta. Physiol. Scand.* **1945**, 10, 162.
- ¹² Glavind, J.; Hartmann, S.; Clemmensens, J.; Jensen, K.E.; Dam, H. *Acta Pathol. Microb. Scand.* **1952**, 30, 1.
- ¹³ Dubouloz, F.; Dumas, J. *Bull. Soc. Chem. Biol.* **1954**, 36, 983.
- ¹⁴ Dubouloz, F.; Dumas, J. *J. Radiol. Electrol.* **1955**, 36, 343.
- ¹⁵ Mukai, F. H.; Goldstein B. D. *Science* **1976**, 191, 868.
- ¹⁶ Ames, B. N. *Science* **1983**, 221, 1256.
- ¹⁷ Panasenko, O. M.; Nova, T. V.; Azizova, O. A.; Vladimirov, Y. A. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, 10, 137.
- ¹⁸ Steinberg, D. *Circulation* **1991**, 84, 1421.
- ¹⁹ Janero, D. R. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, 11, 129.
- ²⁰ Hodis, H. N.; Mack, W. J.; LaBree, L.; Cashin-Hemphill, L.; Sevanian, A.; Johnson, R.; Azen, S. *J. Am. Med. Asoc.* **1995**, 273, 1849.
- ²¹ Jenner, P. *Movement Disorders* **1998** 13 (Suppl 1), 24
- ²² Butterfield, D. A.; Hensley, K.; Harris, M.; Mattson, M.; Carney, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 200, 710.
- ²³ Hensley, K.; Carney, J. M.; Mattson, M. P.; Aksenova, M.; Harris, M.; Wu, J. F.; Floyd, R. A.; Butterfield, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, 91, 3270.
- ²⁴ Butterfield, D. A.; Martin, L.; Carney, J. M.; Hensley, K. *Life Sci.* **1996**, 58, 217.
- ²⁵ Butterfield, D. A. *Chem. Res.Toxicol.* **1997**, 10, 495.
- ²⁶ Mattson, M. P. *Alz. Dis. Rev.* **1997**, 2, 1.
- ²⁷ Fay, D. S.; Fluet, A.; Johnson, C. J.; Link, C. D. *J. Neurochem.* **1998**, 71, 1616.
- ²⁸ Boyd, N. F.; McGuire, V.; *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, 10, 185.

-
- ²⁹ Nelson, R. L. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *12*, 161.
- ³⁰ Knekt, P.; Reunanen, A.; Takkunen, H.; Aromaa, A.; Heliovarara, M.; Hakulinen, T. *Int. J. Cancer* **1994**, *56*, 379.
- ³¹ Omenn, G. S.; Goodman, G. E.; Thornquist, M. D. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1150.
- ³² Riemersma, R. A.; Wood, D. A.; Macityre, C. C. A.; Elton, R. A.; Gey, K. F.; Oliver, M. F. *Lancet* **1991**, *337*, 1.
- ³³ Salonen, J. T.; Nyyssonen, K.; Korpela, H.; Tuomilehto, J.; Seppanen, R.; Salonen, R. *Circulation* **1992**, *86*, 803.
- ³⁴ Street, D. A.; Comstock, G.; Salkeldy, R.; Klag, M. *Circulation* **1994**, *90*, 1154.
- ³⁵ Kushi, L. H.; Folsom, A. R.; Prineas, R. J.; Mink, P. J.; Wu, Y.; Bostick, R. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1156.
- ³⁶ Stephens, N. G.; Parsons, A.; Schofield, P. M.; Kelly, F.; Cheesman, K.; Mitchinson, M. J.; Brown, M. J. *Lancet* **1996**, *347*, 781.
- ³⁷ Miquel J.; Economos A.C.; Johnson J. E. Jr. *Exp. Gerontol.* **1980**, *15*, 575.
- ³⁸ Miquel J.; Fleming J.E.; En: Johnson J. E. Jr.; Harman D.; Walford R.; Miquel J. (Eds). *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*. Alan R Liss, **1986**. p. 51
- ³⁹ Gómez-Ruiz, J. A.; Ames, J. M.; Leake, D. S. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1017.
- ⁴⁰ Gómez-Ruiz, J. A.; Leake, D. S.; Ames, J. M. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6962.
- ⁴¹ Nishida, Y. *J. Pharm. Pharmacol.* **1991**, *43*, 885.
- ⁴² Stadler R. H., L. B. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1332.
- ⁴³ Clifford, M. N. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 362.
- ⁴⁴ Rose, R. C.; Bode, A. M. *The FASEB Journal* **1993**, *7*, 1135.
- ⁴⁵ Galano, A.; Tan, D. X.; Reiter, R. J. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 1.
- ⁴⁶ de Moraes, S. A. L.; de Aquino, F. J. T.; do Nascimento, E. A., de Oliveira, G. S.; Chang, R.; dos Santos, N. C.; Rosa, G. M.; *Ciênc. Tecnol. Aliment. (Supl.)* **2008**, *28*, 198.
- ⁴⁷ Martín, M. J.; Pablos, F.; González, A. G. *Talanta* **1998**, *46*, 1259.
- ⁴⁸ Natella, F.; Nardini, M.; Giannetti, I.; Dattilo, C.; Scaccini, C. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6211.
- ⁴⁹ Kränzlein, G. *Angewandte Chemie* **1935**, *48*, 1
- ⁵⁰ Warolin, C. *Rev. Hist. Pharm. (Paris)* **1999**, *47*, 321.
- ⁵¹ Nathanson, J. A. *Nature* **1984**, *226*, 184.
- ⁵² Lelo, A.; Miners, J. O.; Robson, R. A.; Birkett, D. J. *Br. J. Clin. Pharm.* **1986**, *22*, 183.
- ⁵³ Kalow, W.; Tang, B. K. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1993**, *53*, 503.
- ⁵⁴ Lee, C. *Clinica Chimica Acta* **2000**, *295*, 141.
- ⁵⁵ Dalmázio, I.; Santos, L. S.; Lopes, R. P.; Eberlin, M. N.; Augusti, R. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 5982.
- ⁵⁶ Serafini, M.; Testa, M. F. *Clinics in Dermatology* **2009**, *27*, 225.
- ⁵⁷ Dorea, J. G.; da Costa, T. H. M. *Br. J. Nutr.* **2005**, *93*, 773.

-
- ⁵⁸ Cuvelier, M. E.; Richard, H.; Berset, C. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 324.
- ⁵⁹ Meyer, A. S.; Donovan, J. L.; Pearson, D. A.; Waterhouse, A. L.; Frankel, E. N.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 783.
- ⁶⁰ Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933.
- ⁶¹ Natella, F.; Nardini, M.; Di Felice, M.; Scaccini, C. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1453.
- ⁶² Cartron, E.; Carbonneau, M. A.; Fouret, G.; Descomps, B.; Leger, C. L. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 480.
- ⁶³ Medina, I.; Gallardo, J. M.; Gonzalez, M. J.; Lois, M. S.; Hedges, N. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3889.
- ⁶⁴ Terpin, P.; Polak, T.; Segatin, N.; Hanzlowsky, A.; Ulrich, N. P.; Abramovic, H. *Food Chem.* **2011**, *128*, 62.
- ⁶⁵ Pino, E.; Campos, A. M.; Lopez-Alarcon, C.; Aspee, A.; Lissi, E.; *J. Phys. Org. Chem.* **2006**, *19*, 759.
- ⁶⁶ Kadoma, Y.; Fujisawa, S. *Molecules* **2008**, *13*, 2488.
- ⁶⁷ Foley, S.; Navaratnam, S.; McGarvey, D. J.; Land, E. J.; Truscott, T. G.; Rice-Evans, C. A. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1202.
- ⁶⁸ Terpin, P.; Abramovic, H. *Food Chem.* **2010**, *121*, 366.
- ⁶⁹ Kikuzaki, H.; Hisamoto, M.; Hirose, K.; Akiyama, K.; Taniguchi, H. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2161.
- ⁷⁰ Foti, M. C.; Daquino, C.; Geraci, C. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2309.
- ⁷¹ Chen, J. H.; Ho, C. T. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2374.
- ⁷² Jiang, Y.; Lin, W.; Yao, S.; Lin, N.; Zhu, D. *Radiat. Phys. Chem.* **1999**, *54*, 349.
- ⁷³ Zhu, H.; Zhao, H.; Zhang, Z.; Wang, W.; Yao, S. *Radiat. Environ. Biophys.* **2006**, *45*, 73.
- ⁷⁴ Wu, W. M.; Lu, L.; Long, Y.; Wang, T.; Liu, L.; Chen, Q.; Wang, R. *Food Chem.* **2007**, *105*, 107.
- ⁷⁵ Miller, N.; Diplock, A. T.; Rice-Evans, C. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1794.
- ⁷⁶ Kristinova, V.; Mozuraityte, R.; Storro, I.; Rustad, T. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10377.
- ⁷⁷ Apak, R.; Guclu, K.; Demirata, B.; Ozyurek, M.; Celik, S. E.; Bektasoglu, B.; Berker, K. I.; Ozyurt D. *Molecules* **2007**, *12*, 1496.
- ⁷⁸ Moon, J.-H.; Terao J. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5062.
- ⁷⁹ Silva, F. A. M.; Borges, F.; Guimaraes, C.; Lima, J. L. F. C.; Matos, C., Reis, S. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2122.
- ⁸⁰ Amorati, R.; Pedulli, G. F.; Cabrini, L.; Zambonin, L.; Landi, L. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2932.
- ⁸¹ Boys, S. F.; Cook, G. B.; Reeves, C. M., Shavitt, I. *Nature* **1956**, *178*, 1207.
- ⁸² Richards, W. G.; Walker, T. E. H.; Hinkley, R. K. *A bibliography of ab initio molecular wave functions.* **1971** Oxford: Clarendon Press.
- ⁸³ Preuss, H. *Int. J. of Quant. Chem.* **1968**, *2*, 651.
- ⁸⁴ Buenker, R. J.; Peyerimhoff S. D. *Chem. Phys. Lett.* **1969**, *3*, 37

-
- ⁸⁵ Allinger, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127.
- ⁸⁶ Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364.
- ⁸⁷ Zavala-Oseguera, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Merino, G.; Galano, A. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13913.
- ⁸⁸ Velez, E.; Quijano, J.; Notario, R.; Pabón, E.; Murillo, J.; Leal, J.; Zapata, E.; Alarcón, G. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 971.
- ⁸⁹ Vega-Rodriguez, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7649.
- ⁹⁰ Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5114.
- ⁹¹ Black, G.; Simmie, J. M. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1236.
- ⁹² Furuncuoglu, T.; Ugur, I.; Degirmenci, I.; Aviyente, V. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1823.
- ⁹³ Galano, A.; Macías-Ruvalcaba, N. A.; Campos, O. N. M.; Pedraza-Chaverri, J. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6625.
- ⁹⁴ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1095.
- ⁹⁵ Markovic, Z. S.; Markovic, J. M. D.; Dolicanin, C. B. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, *127*, 69.
- ⁹⁶ *Gaussian 03, Revision E.01*, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
- ⁹⁷ Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2161.
- ⁹⁸ *Gaussian 09, Revision A.08*, Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C. Iyengar, S. S. Tomasi, J. Cossi, M. Rega, Millam, N. J., Klene, M. Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, O., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., and Fox, D. J., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- ⁹⁹ Benson, S.W. *The foundations of chemical kinetics*. Malabar, Florida: Krieger; 1982.
- ¹⁰⁰ Okuno, Y. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 210.
- ¹⁰¹ Alvarez-Idaboy, J. R.; Reyes, L.; Cruz, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1763.

-
- ¹⁰² Galano, A.; Francisco-Márquez, M. *Chem. Phys.* **2008**, *345*, 87.
- ¹⁰³ Mora-Diez, N.; Keller, S.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3682.
- ¹⁰⁴ Eyring, H. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107.
- ¹⁰⁵ Truhlar, D. G.; Hase, W. L.; Hynes, J. T. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664.
- ¹⁰⁶ Truhlar, D. G.; Kuppermann, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1840.
- ¹⁰⁷ Marcus, R. A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1964**, *15*, 155.
- ¹⁰⁸ Marcus, R. A. *Rev. Mod. Phys.* **1993**, *65*, 599.
- ¹⁰⁹ Marcus, R. A. *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 13.
- ¹¹⁰ Collins, F. C.; Kimball, G. E. *J. Colloid Sci.* **1949**, *4*, 425.
- ¹¹¹ Smoluchowski, M. *Z. Phys. Chem.* **1917**, *92*, 129.
- ¹¹² Truhlar, D. G. *J. Chem. Ed.* **1985**, *62*, 104.
- ¹¹³ Einstein, A. *Ann. Phys. (Leipzig)* **1905**, *17*, 549.
- ¹¹⁴ Stokes, G. G. *Mathematical and Physical Papers* (Cambridge University Press, Cambridge, 1903), Vol. 3 (esp. Sect. IV, p. 55).
- ¹¹⁵ Galano A.; Álvarez-Diduk R., Ramírez-Silva M. T., Alarcón A. G., Rojas-Hernández A. *Chem. Phys.* **2009**, *363*, 13.
- ¹¹⁶ Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 22.
- ¹¹⁷ Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12113.
- ¹¹⁸ Galano, A.; Vargas, R.; Martínez, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 193.
- ¹¹⁹ Pérez-González, A.; Galano A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1306.
- ¹²⁰ Galano, A. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 8922.
- ¹²¹ Leopoldini, M.; Chiodo, S. G.; Russo, N.; Toscano, M. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 4218.
- ¹²² Galano A.; Alvarez-Idaboy J. R. *RSC Advances* **2011**, *1*, 1763.
- ¹²³ Galano A.; Alvarez-Idaboy J. R.; Francisco-Márquez M. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 13101.
- ¹²⁴ Galano A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 7147.
- ¹²⁵ Galano A.; Martínez A. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 1200
- ¹²⁶ Galano A.; Alvarez-Idaboy J. R.; Francisco-Márquez M.; Medina M. E. *Theor. Chem. Acc.* **2012**, *131*, 1173.
- ¹²⁷ Alvarez-Idaboy J. R.; Galano A. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 9316.
- ¹²⁸ Liptak, M. D.; Gross, K. C.; Seybold, P. G.; Feldgus, S.; Shields, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6421.
- ¹²⁹ Blanksby S. J.; Ellison, G. B. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 255.
- ¹³⁰ Tsang, W.; Hampson, R.F. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, *15*, 1087.
- ¹³¹ Atkinson, R. *Atmos. Chem. Phys.* **2003**, *3*, 2233.
- ¹³² Pryor, W. A. *Free Rad. Biol. Med.* **1988**, *4*, 219.

-
- ¹³³ Devasagayam, T. P. A.; Kamat, J. P.; Mohan, H.; Kesavan, P.C. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1282*, 63.
- ¹³⁴ Brezova, V.; Slebodova, A.; Stasko, A. *Food Chem.* **2009**, *114*, 859.
- ¹³⁵ de Grey A. D. N. *J. DNA Cell. Biol.* **2002**, *21*, 251.
- ¹³⁶ Galano, A.; Álvarez-Diduk, R.; Ramírez-Silva, M.T.; Alarcón-Ángeles, G.; Rojas-Hernández, A. *Chem. Phys.* **2009**, *363*, 13.
- ¹³⁷ Erdemgil, F. Z.; Sanli, S.; Sanli, N.; Ozkan, G.; Barbosa, J.; Guiteras, J.; Beltran, J. L. *Talanta* **2007**, *72*, 489.
- ¹³⁸ Beltran, J. L.; Sanli, N.; Fonrodona, G.; Barron, D.; Ozkan, G.; Barbosa, J. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *484*, 253.
- ¹³⁹ IUPAC Ionization Constants of Organic Acids in Aqueous Solutions, Pergamon Press, Oxford, 1979.
- ¹⁴⁰ Sies, H. *Exp. Physiol.* **1997**, *82*, 291.
- ¹⁴¹ Itagaki, S.; Kurokawa, T.; Nakata, C.; Saito, Y.; Oikawa, S.; Kobayashi, M.; Hirano, T.; Iseki, K. *Food Chem.* **2009**, *114*, 466.
- ¹⁴² Masuda, T.; Yamada, K.; Maekawa, T.; Takeda, Y.; Yamaguchi, H. *Food Sci. Technol. Res.* **2006**, *12*, 173.
- ¹⁴³ Masuda, T.; Yamada, K.; Maekawa, T.; Takeda, Y.; Yamaguchi, H. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6069.
- ¹⁴⁴ Belcastro, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. *Theor. Chem. Acc.* **2006**, *115*, 361.
- ¹⁴⁵ Leopoldini, M.; Russo, N.; Chiodo, S.; Toscano, M. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6343.
- ¹⁴⁶ Leopoldini, M.; Rondinelli, F.; Russo, N.; Toscano, M. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8862.
- ¹⁴⁷ Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. *Food Chem.* **2011**, *125*, 288.
- ¹⁴⁸ León-Carmona, J. R.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4538.
- ¹⁴⁹ Galano, A.; Francisco-Marquez, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 11338.
- ¹⁵⁰ Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, *127*, 595.
- ¹⁵¹ Galano, A.; Francisco-Marquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8590.
- ¹⁵² Martínez, A.; Galano, A.; Vargas, R. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12591.
- ¹⁵³ Galano, A.; Francisco-Marquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 11199.
- ¹⁵⁴ Galano, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 7147.
- ¹⁵⁵ Galano, A.; Francisco-Marquez, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16077.
- ¹⁵⁶ Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *RSC Advances* **2011**, *1*, 1763.
- ¹⁵⁷ Lin, W.; Navaratnam, S.; Yao, S.; Lin, N. *Radiat. Phys. Chem.* **1998**, *53*, 425.
- ¹⁵⁸ Zhouen, Z.; Side, Y.; Weizhen, L.; Wenfeng, W.; Yizun, J.; Nianyun, L. *Free Radic. Res.* **1998**, *29*, 13.
- ¹⁵⁹ Pan, J.-X.; Wang, W.-F.; Lin, W.-Z.; Lu, C.-Y.; Han, Z.-H.; Yao, S.-D.; Lin, N.-Y. *Free Radic. Res.* **1999**, *30*, 241.

10. Anexos

ANEXO I. Teoría de funcionales de la densidad

Muchas veces, para calcular las propiedades de un sistema químico, se requiere predecir las propiedades del estado fundamental de un átomo, una molécula, alguna nanoestructura, un sólido, u otro sistema. Es posible que necesitemos la geometría en equilibrio o su estructura, las frecuencias vibracionales, la densidad electrónica, la energía total, y algunas otras energías, tales como la de atomización. Una manera de encontrar las propiedades necesarias es resolver la ecuación de Schrödinger para N -electrones para la función de onda asociada con su estado fundamental. Esta aproximación es potencialmente exacta y completa (siempre que toda la información pueda ser conocida), pero es computacionalmente ineficiente y poco práctica para grandes N . Una segunda manera es resolver esto para más información limitada, como la descrita por una densidad de electrones. Esta aproximación puede ser menos precisa y completa, pero puede lograr una eficiencia computacional útil incluso para un N grande.

Los métodos de la teoría del funcional de la densidad (DFT, del inglés *Density Functional Theory*) son a menudo considerados entre los métodos ab initio para determinar la estructura electrónica molecular, incluso aunque muchos de los funcionales más comunes usen parámetros derivados de datos empíricos, o de cálculos más complejos. Esto significa que podrían ser considerados entre los llamados métodos semi-empíricos, pero probablemente lo mejor sea tratarlos como una clase por sí solos. En la DFT, la energía total es expresada en términos de la densidad electrónica total en lugar de usar la función de onda. La DFT tiene como una primera aproximación el modelo de Thomas-Fermi^{I,II} para átomos, que es una aproximación semiclásica en la que la energía del sistema es escrita como funcional de la densidad electrónica y esta última se obtiene por cálculos variacionales de la ecuación de Euler-Lagrange.

^I Thomas, L. H. *Proc. Cambridge Philos. Soc.* **1927**, *23*, 542.

^{II} Fermi, E. *Z. Phys.* **1928**, *48*, 73.

La DFT actual se basa en el teorema de Hohenberg y Kohn,^{III} que puede resumirse en los siguientes dos puntos:

- Para un sistema multielectrónico estable y aislado, la densidad monoeléctrica exacta del estado base $[\rho_0(\vec{r})]$ determina unívocamente el potencial externo $[v(\vec{r})]$.
- La energía exacta del estado base para un sistema de N electrones con un potencial externo $v(\vec{r})$ es un funcional de la densidad monoeléctrica asociada:

$$E_0 = E_v[\Psi] = \varepsilon[\rho_0(\vec{r})], \quad \text{Ec. 1}$$

donde el subíndice v enfatiza la dependencia de $v(\vec{r})$.

En este contexto, lo que se podría llamar como el funcional de Hohenberg y Kohn, sigue siendo independiente del sistema en cuestión, y es, por tanto, universal. Si fuera conocido, podríamos usarlo para resolver cualquier sistema independiente de su tamaño.

Por su parte Kohn y Sham^{IV} mostraron como puede obtenerse la densidad a partir de la solución de un conjunto de ecuaciones que presentan la relación entre energía y densidad y se resuelven variacionalmente. Estas ecuaciones tienen la forma:

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla^2 + v(\vec{r}) + \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' + \frac{\partial E_{xc}[\rho]}{\partial \rho(\vec{r})} \right] \Phi_i(\vec{r}) = \varepsilon_i \Phi_i(\vec{r}), \quad \text{Ec. 2}$$

donde Φ_i representa los llamados orbitales de Kohn-Sham y E_{xc} representa la energía de intercambio y correlación. Es precisamente en la expresión asignada a éste último término en lo que se diferencian las diferentes aproximaciones de la DFT.

Los métodos DFT pueden ser muy precisos a un costo computacional relativamente pequeño, comparado con métodos de función de onda que incluyen correlación. Algunas aproximaciones dentro de la DFT combinan en el cálculo de la energía de intercambio un término en función de la densidad con el intercambio de Hartree-Fock y son conocidos como métodos híbridos. Tal es el caso de la aproximación utilizada en el presente trabajo, que se conoce como funcional M05-2X.

^{III} Hohenberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev.* **1979**, *B136*, 864.

^{IV} Kohn, W.; Sham, L. J. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133.

ANEXO II. Conjuntos de funciones de base.

Los conjuntos de funciones de base son el conjunto de funciones matemáticas a partir de las cuales se construye la función de onda. Para átomos hidrogenoides se puede obtener la expresión exacta de la función de onda (orbitales atómicos $1s$, $2s$, $2p$, etc) y éstas pueden utilizarse para construir funciones más complejas que representen, por ejemplo, a los orbitales moleculares. Los conjuntos de bases más grandes constituyen una aproximación más exacta de los orbitales por imponer menos restricciones sobre la localización de los electrones en el espacio. La mecánica cuántica nos dice que un electrón tiene una probabilidad finita de encontrarse en alguna región del espacio, este límite corresponde a una expansión infinita del conjunto base. Los conjuntos de base para cálculos de estructura electrónica son combinaciones lineales de funciones para formar cada orbital. El éxito de los cálculos está directamente relacionado con la correcta elección de la base.

Las expresiones matemáticas para orbitales atómicos se definen comúnmente como:

$$\varphi_{\zeta,n,l,m}(r, \theta, \phi) = R_{n,l}(r) Y_{l,m}(\theta, \phi), \quad \text{Ec. 3}$$

donde el primer término corresponde a la parte radial y el segundo a la parte angular. El término angular se obtiene a partir de las expresiones de los armónicos esféricos. Los dos tipos de funciones más utilizadas para obtener la parte radial son las funciones tipo Slater (STO, por sus siglas en inglés: Slater Type Orbitals) y las funciones tipo Gaussianas (GTO, por sus siglas en inglés: Gaussian Type Orbitals). Las funciones STO, tienen la siguiente expresión:

$$R_{n,l} = N |\vec{r} - \vec{A}|^{n-1} e^{-\zeta |\vec{r} - \vec{A}|}, \quad \text{Ec. 4}$$

mientras que para las funciones GTO su expresión es:

$$R_{n,l} = N (x - A_x)^{l_x} (y - A_y)^{l_y} (z - A_z)^{l_z} e^{-\zeta |\vec{r} - \vec{A}|^2}, \quad \text{Ec. 5}$$

donde para ambos casos ζ es el exponente orbital, N es una constante de normalización y n es el número cuántico principal.

Las STO son los tipos de funciones de base que describen mejor las características de los orbitales atómicos, en particular la cúspide nuclear y la forma asintótica correcta; sin embargo, las más empleadas actualmente son las de tipo GTO, ya que éstas son computacionalmente menos costosas. En los cálculos SCF se calculan integrales bielectrónicas de tres y cuatro centros, las cuales no tienen soluciones analíticas en el caso de las funciones STO, y hay que resolverlas numéricamente. En el caso de las GTO, el producto de 2 funciones da como resultado una sola GTO multiplicada por una constante, por lo tanto al usar funciones GTO las integrales bielectrónicas de tres y cuatro centros se reducen a integrales bielectrónicas de dos centros, que pueden calcularse más rápida y eficientemente. Para mejorar la descripción de los orbitales, entonces se utilizan funciones obtenidas como combinación lineal de GTOs de manera que su forma se asemeje lo más posible a una STO. A estas funciones que son una combinación lineal se les conoce como funciones gaussianas contraídas, y a las funciones componentes como gaussianas primitivas (que son las que tienen la forma descrita en la ec. 3).

Los conjuntos de funciones de base pueden clasificarse como:

1. **Base mínima.** Comprende el número mínimo de funciones de base necesarias para cada átomo, este conjunto incluye los orbitales internos y de valencia, por ejemplo para el átomo de carbono, sólo se toman en cuenta las funciones para los orbitales: 1s, 2s y 2p (x , y , z). El conjunto de bases llamado *STO- nG* corresponde a una base mínima donde cada orbital es una función gaussiana contraída formada por n gaussianas primitivas.
2. **Bases dobles y triples.** Las bases dobles utilizan 2 funciones contraídas por cada orbital atómico y las bases triples requieren del uso de 3 funciones contraídas por cada orbital. Generalmente se suelen utilizar conjuntos de base tipo GTO debido a su fácil manejo.
3. **Bases de valencia desdoblada.** En este tipo de funciones, cada electrón de la capa interna se describe con una función contraída, la cual es en general una combinación

lineal de 3 ó 6 funciones primitivas; adicionalmente cada orbital de la capa de valencia se describe con 2 funciones, una interna formada por combinación lineal de 2 ó 3 funciones primitivas, y una externa, la cual es una función primitiva y con ζ más pequeño, multiplicada por un coeficiente. Este es el tipo de función particular que se usó en este trabajo

4. **Bases con polarización.** Para estas bases, a cada átomo diferente del átomo de hidrógeno, se le añade un conjunto de orbitales d o f , según sea el caso. Para el caso de las llamadas bases con *doble polarización* adicionalmente al tratamiento antes descrito, para cada átomo de hidrógeno se añaden un conjunto de orbitales p . Este último planteamiento es particularmente importante si se desean estudiar especies en las cuales, el hidrógeno toma un papel importante dentro del estudio, como puede ser el caso del estudio de reacciones de transferencia de hidrógeno o en el caso de interacciones no covalentes como los llamados *puentes de hidrógeno*. Es importante destacar que incluir funciones de polarización aumenta la flexibilidad de la descripción en cuanto a la forma de los orbitales en entornos químicos.
5. **Bases con funciones difusas.** Para estas bases, a cada átomo diferente del átomo de hidrógeno, se le añade un conjunto de funciones difusas, o sea con coeficientes orbitales muy pequeños, (s, p_x, p_y, p_z) y, para el caso que lo requiera, a cada átomo de hidrógeno se le añade una función gaussiana difusa de tipo s . Este procedimiento permite describir mejor regiones lejanas a los centros nucleares, por lo que es de vital importancia cuando se estudian especies como los aniones.

El éxito de los cálculos dependerán del número de funciones (cuanto mayor sea la base, mejor será la representación) así como del tipo de funciones de base (cuanto mejor esté definida la función matemática, menor será el número de funciones requeridas para alcanzar el mismo nivel de precisión). El tiempo de cómputo requerido para los cálculos será mayor en cuanto mayor sean los conjuntos de bases utilizados. Para los sistemas estudiados en este trabajo se utilizarán conjuntos de funciones de base de valencia desdoblada, con funciones de polarización y difusas.

ANEXO III. Propiedades utilizadas en la parametrización del funcional M05-2X.^V

<i>Propiedad</i>	<i>Base de datos</i>	<i>Aplicado a:</i>	<i>Particularidades</i>
Energías de atomización	MGAE109/05	109 compuestos de los principales grupos	Datos a partir de Database/3 ^(VI) y Database/4 ^(VII)
Potencial de ionización	IP13/3	6 átomos y 7 moléculas	C, S, Cl, O, P, Si, SH, Cl ₂ , OH, O ₂ , PH, PH ₂ , Si ₂
Potencial de ionización	IPEA8	5 átomos	C, O, OH, Cr, Cu
Afinidad electrónica	EA13/3	6 átomos y 7 moléculas	C, S, Cl, O, P, Si, SH, Cl ₂ , OH, O ₂ , PH, PH ₂ , Si ₂
Afinidad electrónica	IPEA8	3 átomos	C, O, OH
Barreras energéticas	HTBH38/04	38 barreras para 19 reacciones	Reacciones de transferencia de H, 18 de las cuales involucran radicales como reactivos y/o productos
Interacciones no covalentes	HB6/04	Energías de enlace de 6 dímeros con enlaces de H	(NH ₃) ₂ , (HF) ₂ , (H ₂ O) ₂ , H ₂ O--NH ₃ , (HCOOH) ₂
	CT7/04	Energías de enlace de 7 complejos de transferencia	C ₂ H ₄ --F ₂ , NH ₂ --F ₂ , C ₂ H ₂ --ClF, HCN--ClF, NH ₃ --Cl ₂ , H ₂ O--ClF, NH ₃ --ClF
	DI6/04	Energías de enlace de 6 complejos de interacción dipolar	(H ₂ S) ₂ , (HCl) ₂ , HCl--H ₂ S, CH ₃ Cl--HCl, CH ₃ SH--HCN, CH ₃ SH--HCl
	W17/05	Energías de enlace de 7 complejos con enlaces débiles	HeNe, HeAr, Ne ₂ , NeAr, CH ₄ --HCl, C ₆ H ₆ --Ne, (CH ₄) ₂
	PPS5/05	Energías de enlace de 5 complejos con enlaces π - π	(C ₂ H ₂) ₂ , (C ₂ H ₄) ₂ , "sandwich" (C ₆ H ₆) ₂ ,

^V Zhao Y.; Schultz N. E.; Truhlar D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, 2, 364.

^{VI} Lynch, B. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 3898.

^{VII} Lynch, B. J.; Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A.* **2005**, 109, 1643.

			Forma "T" (C ₆ H ₆) ₂ , Forma desplazada en paralelo (C ₆ H ₆) ₂
Energías de atomización de metales de transición	TMAE4/05	Energías de atomización de 4 metales	Cr ₂ , Cu ₂ , V ₂ , Zr ₂
	MLBE4/05	Energías de enlace de 6 complejos organometálicos e inorganometálicos	Cr-C, Ni-C, Fe-C con V-S y CrCH ₃ ⁺ , NiCH ₂ ⁺ FE(CO) ₅ con VS
Energías de disociación de enlaces alquílicos	ABDE4/05	Energías de disociación de enlace 4 compuestos	R-X (donde R=Me y X=CH ₃ y OCH ₃)
Momento Dipolar	DM6/05	Momentos dipolares de 6 moléculas con geometría fija	N ₆ , H ₂ CO, CuH, BF, LiCl, H ₂ O
Energía total	AAE5	5 átomos	H, C, O, S, Si
Energía total	AAE4	4 átomos	C, O, S, Si

ANEXO IV. Errores absoluto promedio (kcal/mol) de propiedades energéticas calculadas con diferentes funcionales.^{VIII}

Método	Termoquímica	Cinética	Interacción no covalente	Promedio
M05-2X	0.93	0.99	0.33	0.75
M05	0.99	1.44	0.52	0.98
PW6B95	0.81	1.99	0.62	1.14
PWB6K	1.72	1.42	0.38	1.18
MPWB1K	1.38	1.35	0.61	1.11
MPW1B95	0.98	1.94	0.67	1.20
BMK	0.94	1.12	1.10	1.05
B98	1.00	2.57	0.78	1.45
B97-1	1.07	2.94	0.71	1.57
B97-3	1.02	1.71	1.18	1.30
B1B95	0.96	1.79	1.25	1.33
PBE1PBE	1.31	2.76	0.74	1.60
mPW1PW91	1.32	2.34	0.95	1.54
BB1K	1.70	1.27	1.13	1.37
B97-2	1.02	2.16	1.23	1.47
TPSS1KCIS	1.07	3.16	0.99	1.74
MPW1K	2.59	1.32	0.85	1.58
B3PW91	1.14	2.54	1.38	1.69
B3LYP	1.41	3.09	1.13	1.87
τ -HCTHh	1.17	2.13	1.45	1.92
X3LYP	1.89	3.56	0.92	2.12
TPSSh	1.37	4.31	1.05	2.24
B1LYP	2.89	2.73	1.17	2.26
TPSS	1.36	5.12	1.22	2.57
mPWPW91	2.24	5.20	1.30	2.92
BLYP	1.93	4.90	1.63	2.82
BB95	2.40	4.89	1.67	2.99
PBE	3.01	6.01	1.14	3.39
G96LYP	2.31	4.26	2.75	3.11
SPWL	14.70	12.05	2.18	9.64

^{VIII} Zhao Y.; Schultz N. E.; Truhlar D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, 2, 364.

ANEXO V. Errores absoluto promedio (kcal/mol) para energías libres de solvatación obtenidos con diferentes modelos de solvente.^{IX}

Método	Solutos Neutros en agua	Solutos Neutros en solventes orgánicos	Solutos iónicos ^(a)
SMD/IEF-PCM/G03/M05-2X	0.59	0.65	4.13
SMD/IEF-PCM/G03/mPW1PW	0.62	0.65	4.30
SMD/IEF-PCM/G03/B3LYP	0.80	0.67	4.45
SMD/IEF-PCM/G03/HF	0.91	0.72	4.13
SMD/IEF-PCM/GAMESS/HF	0.85	0.72	4.13
SMD/C-PCM/G03/HF	0.95	0.97	4.15
SMD/C-PCM/GAMESS/HF	0.89	0.95	4.16
SMD/COSMO/NWChem/HF	1.06	1.01	4.60
SM8/M05-2X/CM4	0.58	0.61	4.28
SM8/mPW1PW/CM4	0.55	0.61	4.21
SM8/B3LYP/CM4	0.57	0.62	4.14
IEF-PCM-G03d/mPW1PWe	4.87	5.99	9.53
IEF-PCM/G03(UAHF)/mPW1PWf	1.18	3.94	7.96
IEF-PCM/G03(UAHF)/HFg	1.10	3.71	7.50
IEF-PCM/G03(UAHF)/HF/6-31+G**h	1.36	3.55	7.34
C-PCM-G06d/B3LYPi	1.57	2.78	8.14
COSMO-N06d/B3LYPj	8.17	2.76	12.64

(a) en acetonitrilo, DMSO, metanol, y agua.

^{IX} Marenich A. V.; Cramer C. J.; Truhlar D. G. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378.

ANEXO VI. Cálculos termodinámicos con el programa Gaussian y descripción de los modelos de solvatación PCM y SMD

Para el cálculo de todas las energías relativas, tanto energías de reacción como las barreras, se incluyeron las correcciones termodinámicas a 298.15 K. Estas correcciones se obtienen con Gaussian a partir de las componentes de las funciones de partición traslacional (q_t), electrónica (q_e), rotacional (q_r) y vibracional (q_v , producto de 3N-6 funciones q_{vi} , para sistemas no lineales y de 3N-5 para sistemas lineales, con N igual al número total de grados de libertad):

$$q_t = \left(\frac{2\pi m k_B T}{h^2} \right)^{3/2} \frac{k_B T}{P}, \quad \text{Ec. 6}$$

$$q_e = \text{la multiplicidad de espín} \quad \text{Ec. 7}$$

$$q_r = \frac{8\pi^2 I k_B T}{\sigma h^2} \text{ (para especies lineales),} \quad \text{Ec. 8}$$

$$q_r = \frac{8\pi^2 (8\pi^3 I_A I_B I_C)^{1/2} (k_B T)^{3/2}}{\sigma h^3} \text{ (para especies no lineales),} \quad \text{Ec. 9}$$

$$q_v = \prod_i q_{vi} = \prod_i \left(\frac{1}{1 - e^{-h\nu_i/k_B T}} \right), \quad \text{Ec. 10}$$

con
$$\nu_i = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{K_F}{m_R} \right)^{1/2}, \quad \text{Ec. 11}$$

Luego las componentes de la entropía (S) y de la energía térmica (E) se obtienen según:

$$S_t = R \left(\ln q_t + \frac{5}{2} \right), \quad \text{Ec. 12}$$

$$S_e = R (\ln q_e), \quad \text{Ec. 13}$$

$$S_r = R (\ln q_r + 1) \text{ (para especies lineales),} \quad \text{Ec. 14}$$

$$S_r = R \left(\ln q_r + \frac{3}{2} \right) \text{(para especies no lineales)}, \quad \text{Ec. 15}$$

$$S_v = R \sum_i S_{vi} = R \sum_i \left(\left(\frac{h\nu_i}{k_B T} \right) \left(\frac{1}{e^{h\nu_i/k_B T} - 1} \right) - \ln \left(1 - e^{-h\nu_i/k_B T} \right) \right), \quad \text{Ec. 16}$$

$$E_t = \frac{3}{2} RT, \quad \text{Ec. 17}$$

$$E_e = 0 \text{ (porque la } q_e \text{ no depende de T)}, \quad \text{Ec. 18}$$

$$E_r = RT \text{ (para especies lineales)}, \quad \text{Ec. 19}$$

$$E_r = \frac{3}{2} RT \text{ (para especies no lineales)}, \quad \text{Ec. 20}$$

$$E_v = R \sum_i E_{vi} = R \sum_i \left(\left(\frac{h\nu_i}{k_B} \right) \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{e^{h\nu_i/k_B T} - 1} \right) \right), \quad \text{Ec. 21}$$

Entonces las correcciones que se adicionan a la energía electrónica para obtener la entalpía y la energía libre de Gibbs son:

$$H = E_{tot} + k_B T, \quad \text{Ec. 22}$$

$$G = H - TS_{tot}, \quad \text{Ec. 23}$$

con

$$E_{tot} = E_t + E_e + E_r + E_v, \quad \text{Ec. 24}$$

$$S_{tot} = S_t + S_e + S_r + S_v, \quad \text{Ec. 25}$$

Es importante destacar que todas estas correcciones se corresponden a sistemas en fase gas, de modo que para obtener la energía libre en solución es necesario añadir otro término, la energía libre de solvatación (ΔG_{solv}). Los métodos utilizados en este trabajo para ese propósito todos se corresponden a la estrategia conocida como SCRF (de sus siglas en inglés, Self Consistent Reaction Field), donde el término “campo de reacción” se refiere a al campo eléctrico que surge como consecuencia de los momentos dipolares que inducen las moléculas de solvente en el soluto y viceversa.

La ΔG_{solv} se define como el trabajo reversible necesario para transferir al soluto desde el vacío hacia la solución y puede obtenerse como la suma de varias contribuciones.^{X-XII} La forma más general de descomponer a ΔG_{solv} es:^{XIII}

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{dr}} + \Delta G_{\text{cav}}, \quad \text{Ec. 26}$$

donde:

ΔG_{ele} es el término electrostático, que mide el trabajo necesario para la redistribución de cargas del soluto en solución y tiene a su vez dos componentes: (i) el trabajo necesario para crear la distribución de cargas, que tendría el soluto en el vacío, ahora en el seno del solvente; y (ii) el trabajo requerido para polarizar la distribución de cargas del soluto como consecuencia de la presencia del solvente. Este término incluye no sólo la ganancia de energía debida a las interacciones electrostáticas entre soluto y solvente, sino también el trabajo necesario para generar el campo de reacción en el solvente inducido por la distribución de cargas del soluto.

ΔG_{dr} es el término de dispersión-repulsión y también es conocido como término de van der Waals (ΔG_{vdW}) e incluye los cambios en la energía libre debidos a las fuerzas de dispersión y repulsión. Este término es favorable a la solvatación (negativo) ya que la cavidad se crea en regiones donde las fuerzas dispersivas son más fuertes que las repulsivas.

ΔG_{cav} es el término de cavitación y se refiere a la energía requerida para formar una cavidad de tamaño suficiente para contener al soluto. Esto implica la ruptura de las fuerzas cohesivas entre las moléculas de solvente, por lo que el término ΔG_{cav} es desfavorable a la solvatación (positivo).

Los términos ΔG_{cav} y ΔG_{dr} se conocen también como contribuciones estéricas y no electrostáticas.

^X Huron, M. J.; Claverie, P. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 2123.

^{XI} Huron, M. J.; Claverie, P. *J. Phys. Chem.* **1974**, 78, 1853.

^{XII} Huron, M. J.; Claverie, P. *J. Phys. Chem.* **1974**, 78, 1862.

^{XIII} Orozco, M.; Luque, F. J. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4187.

En el caso de los modelos de solvente utilizados en este trabajo la partición antes descrita se modifica un poco, quedando para PCM como:^{XIV}

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{el} + \Delta G_{cav} + \Delta G_{rep} + \Delta G_{dis} + \Delta G_{tm}, \quad \text{Ec. 27}$$

donde ΔG_{el} es la diferencia entre energía electrónica del soluto en fase gas y en solución, ΔG_{rep} es conocida como la contribución estérica o energía de repulsión y se calcula simulando una distribución de cargas en la superficie externa de la cavidad como:

$$\Delta G_{rep} = k \rho_S \frac{n_{val}^S}{M_S} \sum_{r \neq C} \rho_M(\vec{r}) d^3r, \quad \text{Ec. 28}$$

donde ρ_M es la densidad electrónica del soluto, ρ_S es la densidad del solvente relativa a la del agua a 298 K, M_S es el peso molecular del solvente, y n_{val}^S es el número de electrones de valencia del solvente.

ΔG_{dis} es la energía dispersiva y se obtiene utilizando integrales bielectrónicas, en el espacio de orbitales moleculares, y la integración se realiza sobre la superficie de la cavidad utilizando el potencial y los componentes normales del campo eléctrico calculados en los mismos puntos de la superficie. Este término depende además del índice refractivo del solvente y de su primer potencial de ionización. Es el término más complejo de calcular y el que más depende del conjunto de funciones de base empleado.

ΔG_{tm} es la energía térmica del movimiento nuclear, calculada según:

$$\Delta G_{tm} = RT \left(\ln \left(\frac{q_{r,gas}}{q_{r,sol}} \right) + \ln \left(\frac{q_{v,gas}}{q_{v,sol}} \right) \right), \quad \text{Ec. 29}$$

y ΔG_{cav} se calcula como:

$$\Delta G_{cav} = RT \left\{ -\ln(1-y) + \frac{3y}{1-y} \left(\frac{R_M}{R_S} \right) + \left[\frac{3y}{1-y} + \frac{9}{2} \left(\frac{y}{1-y} \right)^2 \left(\frac{R_M}{R_S} \right)^2 \right] \right\}, \quad \text{Ec. 30}$$

donde R_M es el radio del soluto, R_S es el radio del solvente, y y se obtiene según:

^{XIV} Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999.

$$y = \frac{\pi}{6} (2R_s)^3 \frac{N_A}{V_s}, \quad \text{Ec. 31}$$

donde N_A es el número de Avogadro y V_s es el volumen molar del solvente.

Para SMD, que sigue considerándose una modificación de PCM, la energía libre de solvatación se particiona como:^{XV}

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{ENP}} + \Delta G_{\text{CDS}} + \Delta G_{\text{conc}}, \quad \text{Ec. 32}$$

En este caso el último término, llamado de concentración, introduce una corrección que permite cambiar el estado estándar de 1atm a 1M. Sin embargo si bien este término está incluido en la definición de la Ec. 52 en la implementación de Gaussian no se contempla esta conversión y es responsabilidad del usuario incluirlo.

El término ΔG_{ENP} incluye a su vez tres componentes, la electrónica (E), la nuclear (N) y la de polarización (P). La componente N se refiere a la relajación nuclear cuando el soluto se encuentra en presencia del solvente, con respecto al vacío, por lo tanto si se trabaja con geometrías de fase gas ΔG_{ENP} se convierte en ΔG_{EP} . En SMD el término ΔG_{ENP} se calcula como:

$$\Delta G_{\text{ENP}} = \langle \Psi | H^{(0)} - \frac{e}{2} \phi | \Psi \rangle + \frac{e}{2} \sum_k Z_k \phi_k - \langle \Psi^{(0)} | H^{(0)} | \Psi^{(0)} \rangle, \quad \text{Ec. 33}$$

donde ϕ_k es el campo de reacción evaluado en el átomo k , Z_k es el número atómico del átomo k , $H^{(0)}$ y $\Psi^{(0)}$ son el hamiltoniano electrónico y la función de onda en fase gas y Ψ es la función de onda polarizada en solución. Esta ecuación incluye entonces la polarización del solvente por el soluto y la distorsión del soluto inducida por los efectos de polarización. El campo de reacción ϕ_k en cualquier posición r dentro de la cavidad se obtiene como:

$$\phi(r) = \sum_m \frac{q_m}{|r - r_m|}, \quad \text{Ec. 34}$$

^{XV} Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378.

donde r_m representa la posición de cada elemento m del área superficial de la cavidad (estos elementos son llamados mosaicos o tessarea en inglés), y q_m es la carga superficial aparente de cada elemento m . La discretización de la superficie puede hacerse de varias maneras, en Gaussian se hace usando el método GEPOL.^{XVI}

El término ΔG_{CDS} incluye las contribuciones de cavitación (C), dispersión (D) y una que representa los cambios en la estructura local del solvente causados por la presencia del soluto (S), y se obtiene según:

$$\Delta G_{CDS} = \sum_k \sigma_k A_k \left(R, \{R_{Z_k} + r_S\} \right) + \sigma^{[M]} \sum_k A_k \left(R, \{R_{Z_k} + r_S\} \right) \quad \text{Ec. 35}$$

donde σ_k es la tensión superficial del átomo k , $\sigma^{[M]}$ es la tensión superficial molecular, y A_k es el área superficial accesible al solvente (SASA por sus siglas en inglés, solvent-accessible surface area) correspondiente al átomo k . La SASA depende de la geometría R , que se compone del conjunto $\{R_{Z_k}\}$ de todos los radios atómicos de van der Waals y añadiendo un valor diferente de cero a los radios atómicos del solvente se definen las esferas que se usan para obtener la SASA de cada soluto. Los valores de σ_k se obtienen como:

$$\sigma_k = \tilde{\sigma}_{Z_k} + \sum_k \tilde{\sigma}_{Z_k Z_{k'}} T_k \left(\{Z_{k'}, R_{kk'}\} \right) \quad \text{Ec. 36}$$

donde $\tilde{\sigma}_{Z_k}$ es un parámetro relacionado con el número atómico, $\tilde{\sigma}_{Z_k Z_{k'}}$ es un parámetro que depende de los números atómicos de los átomos k y k' , y $T_k \left(\{Z_{k'}, R_{kk'}\} \right)$ es una función que depende de la geometría del soluto y que sirve para delimitar la región de interés.

La tensión superficial molecular es una función de descriptores del solvente y viene dada por:

$$\sigma^{[M]} = \tilde{\sigma}^{[\gamma]} (\gamma / \gamma_0) + \tilde{\sigma}^{[\chi^2]} \chi^2 + \tilde{\sigma}^{[g^2]} g^2 + \tilde{\sigma}^{[\beta^2]} \beta^2 \quad \text{Ec. 37}$$

^{XVI} Pascual-Ahuir, J. L.; Silla, E. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 1047.

donde γ es la tensión superficial macroscópica del solvente en la interfase aire/solvente a 298 K; χ es la fracción de átomos del solvente que son carbonos aromáticos; ϑ es la fracción de átomos del solvente que son F, Cl, o Br; β es un parámetro asociado con la capacidad de formar puentes de H; y $\tilde{\sigma}^{[\gamma]}$, $\tilde{\sigma}^{[\chi^2]}$, $\tilde{\sigma}^{[\vartheta^2]}$ y $\tilde{\sigma}^{[\beta^2]}$ son parámetros empíricos.

La parametrización del SMD consiste justamente en obtener los valores óptimos de los parámetros $\tilde{\sigma}_{z_k}$ y $\tilde{\sigma}_{z_k z_k'}$ de la ec. 56 y los parámetros $\tilde{\sigma}^{[\gamma]}$, $\tilde{\sigma}^{[\chi^2]}$, $\tilde{\sigma}^{[\vartheta^2]}$ y $\tilde{\sigma}^{[\beta^2]}$ de la ec. 57. Esta parametrización se realizó en base a 2821 datos, incluyendo 112 energías libres de solvatación de especies iónicas en agua, 220 energías libres de solvatación para 166 iones en acetonitrilo, metanol, y dimetilsulfóxido, 2346 energías libres de solvatación para 318 solutos neutros en 91 solventes diferentes (90 orgánicos y agua), y 143 energías libres de transferencia entre agua y 15 solventes orgánicos para 93 solutos neutros. La composición de los solutos utilizados consistió de los siguientes elementos: H, C, N, O, F, S, P, Si, Cl y Br. Con esta parametrización se obtuvieron errores absolutos promedios (con respecto a los valores experimentales de los datos antes mencionados) de 0.6 a 1.0 kcal/mol para los solutos neutros y de ~ 4 kcal/mol para los solutos iónicos. En cuanto a la calidad de los resultados obtenidos con SMD y otros modelos continuos de solvente en el Anexo IV se muestran algunos datos. Basados en éstos se puede concluir que las energías libres de solvatación obtenidas con SMD son de mejor calidad que las obtenidas con PCM o COSMO tanto para especies neutras como iónicas, y tanto para agua como para solventes orgánicos.

ANEXO VII. Publicaciones producto de la tesis

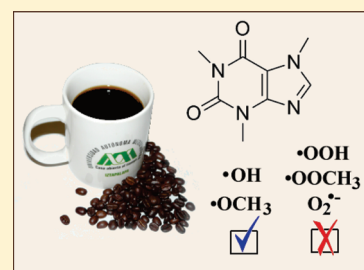
- 1.- León-Carmona, J. R.; Galano, A. J. Phys. Chem. B, 2011, 115, 4538.
- 2.- León-Carmona, J. R.; Galano, A. J. Phys. Chem. B 2011, 115, 15430.
- 3.- León-Carmona, J. R.; Galano, A. International Journal of Quantum Chemistry 2012, DOI: 10.1002 /qua.24084.
- 4.- León-Carmona, J. R.; Alvarez-Idavoy, J.R.; Galano, A. Phys. Chem. Chem. Phys. 2012, 14, 12534.

Is Caffeine a Good Scavenger of Oxygenated Free Radicals?

Jorge Rafael León-Carmona and Annia Galano*

Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina C. P. 09340, México

ABSTRACT: The reactions of caffeine (CAF) with different reactive oxygen species (ROS) have been studied using density functional theory. Five mechanisms of reaction have been considered, namely, radical adduct formation (RAF), hydrogen atom transfer (HAT), single electron transfer (SET), sequential electron proton transfer (SEPT), and proton coupled electron transfer (PCET). The SET, SEPT, and PCET mechanisms have been ruled out for the reactions of CAF with $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, ROO^{\cdot} , and RO^{\cdot} radicals. It was found that caffeine is inefficient for directly scavenging $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\cdot\text{OOCH}_3$ radicals and most likely other alkyl peroxy radicals. The overall reactivity of CAF toward $\cdot\text{OH}$ was found to be diffusion-controlled, regardless of the polarity of the environment, supporting the excellent $\cdot\text{OH}$ scavenging activity of CAF. On the other hand, it is predicted to be a modest scavenger of $\cdot\text{OCH}_3$, and probably of other alkoxy radicals, and a poor scavenger of HOO^{\cdot} . RAF has been identified as the main mechanism involved in the direct ROS scavenging activity of CAF. The excellent agreement with the available experimental data supports the reliability of the present calculations.



INTRODUCTION

Oxidative stress (OS) is a chemical stress arising from the imbalance between production and consumption of reactive oxygen species (ROS).¹ It is involved in the development of a large variety of health disorders.² The OS-related damage involves reactions between biological molecules and free radicals. Therefore, the study of compounds able to scavenge free radicals is an important area of research aiming to prevent OS and the associated molecular damage. In spite of the controversies about the effects of coffee on human health,³ coffee is currently accepted as a rich source of antioxidants.^{4–19}

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine, CAF, Figure 1) is a naturally occurring alkaloid that is present not only in coffee but also in seeds, citrus fruits, olive oil, tea, and cocoa beverages.²⁰ Recent studies have proposed that CAF presents antioxidant activity and therefore protects humans against health disorders associated with OS. For example, Rosso et al.²¹ and Prasanthi et al.²² have suggested that the antioxidant properties of CAF have protective effects on the development of Alzheimer's disease. Varma and Hedge²³ found that CAF is effective at protecting the eye lens against the damage photochemically induced by ROS. Inkielewicz-Stepniak and Czarnowski²⁴ found that CAF administered intragastrically is efficient as an antioxidant, and it alleviates the adverse effect of fluoride. Vignoli et al.¹⁹ reported that the antioxidant activity of CAF is concentration-dependent; that is, the larger the CAF contents are, the greater the antioxidant activity. Brezova et al.¹⁷ have demonstrated that while CAF is inert to ABTS and DPPH oxidants, it is very effective scavenging OH radicals, with a bimolecular rate constant (k) equal to $2.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This is the most recent value of k reported for the CAF + $\cdot\text{OH}$ reaction and is about three times lower than those previously reported, for the same reaction, by Devasagayam et al.²⁵ ($k = 7.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and Kesavan and Powers²⁶ ($k = 6.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). In addition, it has also been

proposed that the antioxidant activity of CAF is similar to that of glutathione and much higher than that of ascorbic acid.^{25–28}

Regarding the mechanism involved in the CAF + $\cdot\text{OH}$ reaction, Dalmázio et al.²⁹ have proposed that CAF is first oxidized by $\cdot\text{OH}$ insertion to the double bond C4C5, according to the numbering shown in Figure 1. After further oxidation, they also identified di(*N*-hydroxymethyl) parabanic acid as an intermediate in the degradation of CAF in water. Stadler and Fay,³⁰ on the other hand, detected 8-oxocaffeine (1,3,7-trimethyluric acid) during the $\cdot\text{OH}$ -mediated oxidation of CAF. Moreover, they observed that 8-oxocaffeine represents up to 60% of the total oxidation products. According to their observations, the first step of the CAF + $\cdot\text{OH}$ reaction can be inferred to be the $\cdot\text{OH}$ addition to C8 (Figure 1).

Even though it seems to be a general agreement on the ability of CAF to scavenge $\cdot\text{OH}$ radicals, there is still scarce, and sometimes contradictory, information about the scavenging activity of CAF toward other ROS. Some rate constants have been reported by Kumar et al.³¹ for the reactions of CAF with the superoxide radical anion ($7.5 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), the deoxyribose peroxy radical ($1.05 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), and hydrogen peroxide ($8.8 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Devasagayam et al.²⁵ did not observe direct quenching of ROO^{\cdot} by CAF, but they did observe a significant inhibition of peroxidation. They also found that CAF is a poor inhibitor of oxidation induced by HOO^{\cdot} and $\text{O}_2^{\cdot-}$.

On the basis of the above detailed information, it becomes evident that further research is still needed to fully understand the ROS scavenging activity of CAF. To that purpose, it is the main goal of the present work to investigate this matter, paying particular

Received: February 11, 2011

Revised: March 12, 2011

Published: March 25, 2011



Figure 1. CAF structure and sites numbering.

attention to those aspects for which there is very little or none information available. Accordingly, we have performed a systematic study including five different mechanisms of reaction. They are radical adduct formation (RAF), hydrogen atom transfer (HAT), single electron transfer (SET), sequential electron proton transfer (SEPT), and proton coupled electron transfer (PCET). Because it has been previously demonstrated that the nature of free radicals plays an important role on the relative importance of competing mechanisms,^{32,33} the reactions of CAF with different ROS ($\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OOH}$, $\bullet\text{OCH}_3$, $\bullet\text{OOCH}_3$, and $\text{O}_2^{\bullet-}$) have been considered. In addition, all possible sites of reaction have been taken into account, and detailed branching ratios are provided.

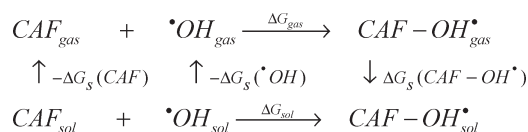
COMPUTATIONAL DETAILS

Geometry optimizations and frequency calculations have been carried out using the M05-2X functional and the 6-31+G(d) basis set. The electronic energies were improved by single point calculations using the 6-311++G(d,p) basis set. The M05-2X functional has been recommended for kinetic calculations by their developers,³⁴ and it also has been successfully used to that purpose by independent authors.^{35–42}

Unrestricted calculations were used for open shell systems and local minima, and TSs were identified by the number of imaginary frequencies (NIMAG = 0 or 1, respectively). Intrinsic reaction coordinate (IRC) calculations have been performed to confirm that the TSs properly connect reactants and products. All of the electronic calculations were performed with Gaussian 03 package of programs.⁴³ We have not corrected interaction energies for BSSE because it has been demonstrated that counterpoise corrections overestimated the BSSE,⁴⁴ and it worsens the results.^{45,46}

Thermodynamic corrections at 298.15 K were included in the calculation of relative energies. The stationary points were first modeled in gas phase (vacuum), and solvent effects were included a posteriori by single point calculations using polarizable continuum model, specifically the integral-equation-formalism (IEF-PCM)^{47–49} and RADII = UAHF, and the option SCFVAC at HF/6-31+G(d) level of theory, as recommended by Gaussian's manual for computing solvation free energies. They have been performed using benzene and water as solvents, to mimic nonpolar and polar environments, respectively. This approach has been successfully used before for describing radical-molecule reactions in solution involved in the antioxidant activity of different compound.^{50–56}

Relative Gibbs free energies in solution have been computed using thermodynamic cycles and the Hess law, explicitly including solvation free energies. For example, for $\bullet\text{OH}$ additions to CAF:



Within this strategy, the Gibbs free energy of reaction in solution (ΔG_{sol}) can be obtained as the sum of the Gibbs free energy of

reaction in vacuum (ΔG_{gas}) and the difference in solvation free energies ($\Delta\Delta G_{\text{s}}$):

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{gas}} + \Delta\Delta G_{\text{s}} \quad (1)$$

where $\Delta\Delta G_{\text{s}}$ is calculated as:

$$\Delta\Delta G_{\text{s}} = \Delta G_{\text{s}}(\text{CAF-OH}\bullet) - \Delta G_{\text{s}}(\text{CAF}) - \Delta G_{\text{s}}(\bullet\text{OH}) \quad (2)$$

with ΔG_{s} representing the free energies of solvation. In all of the cases, the reference state is 1 M. The solvent cage effects have been included according to the corrections proposed by Okuno,⁵⁷ taking into account the free volume theory.⁵⁸ These corrections are in good agreement with those independently obtained by Ardura et al.⁵⁹ and have been successfully used before.^{60–66}

The rate constants (k) were calculated using conventional transition state theory (TST)^{67–69} and 1 M standard state as:

$$k = \sigma \kappa \frac{k_{\text{B}} T}{h} e^{-(\Delta G^{\ddagger})/RT} \quad (3)$$

where k_{B} and h are the Boltzmann and Planck constants, ΔG^{\ddagger} is the Gibbs free energy of activation, σ represents the reaction path degeneracy, accounting for the number of equivalent reaction paths, and κ accounts for tunneling corrections. The tunneling corrections, defined as the Boltzmann average of the ratio of the quantum and the classical probabilities, were calculated using the Eckart barrier.⁷⁰

Some of the calculated rate constants (k) were found to be close to the diffusion limit. Accordingly, the apparent rate constant (k_{app}) cannot be directly obtained from TST calculations. In the present work, we have used the Collins–Kimball theory to that purpose:⁷¹

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

where k_{act} is the thermal rate constant, obtained from TST calculations (eq 3), and k_{D} is the steady-state Smoluchowski⁷² rate constant for an irreversible bimolecular diffusion-controlled reaction:

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

where R denotes the reaction distance, N_{A} is the Avogadro number, and D_{AB} is the mutual diffusion coefficient of the reactants A (radical) and B (CAF). D_{AB} has been calculated from D_{A} and D_{B} according to ref 73, and D_{A} and D_{B} have been estimated from the Stokes–Einstein approach:⁷⁴

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

where k_{B} is the Boltzmann constant, T is the temperature, η denotes the viscosity of the solvent, in our case water ($\eta = 8.91 \times 10^{-4}$ Pa s) and benzene ($\eta = 6.04 \times 10^{-4}$ Pa s), and a is the radius of the solute.

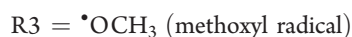
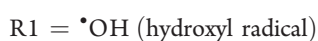
RESULTS AND DISCUSSION

The reactions of CAF with different radicals have been modeled in polar and nonpolar environments. The free radicals

Table 1. Gibbs Free Energies of Reaction, at 298.15 K, in kcal/mol

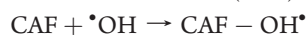
	•OH		•OOH		•OCH ₃		•OOCH ₃		O ₂ ^{•-}	
	water	benzene	water	benzene	water	benzene	water	benzene	water	benzene
SET	5.61	80.93	40.92	104.68	26.36	93.73	43.45	106.16	68.53	207.40
	RAF									
C2	-0.09	1.27	27.21	26.15	20.42	14.17	36.33	30.82	13.97	3.92
C4	-11.54	-13.47	17.34	15.39	6.50	3.33	23.66	20.44	36.20	31.68
C5	-9.23	-12.08	18.09	15.44	4.23	2.77	22.17	20.92	36.36	25.62
C6	0.31	3.21	41.83	38.91	24.01	16.23	46.76	45.04	14.37	2.74
C8	-28.49	-28.63	-1.17	-1.08	-10.85	-15.56	7.06	2.37	20.31	5.27
	HAT									
C10	-22.56	-22.03	6.51	10.14	-7.01	-9.78	11.69	7.29	23.96	32.70
C12	-22.94	-22.56	6.13	9.61	-7.53	-10.15	11.16	6.91	23.58	32.17
C14	-23.21	-23.05	5.86	9.12	-8.02	-10.42	10.67	6.64	23.31	31.68

that have been considered in this work are



The antioxidant activity of CAF can take place through different mechanisms. The most common ones for antioxidants in general, which are also those considered in this work, are

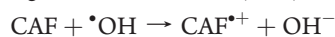
radical adduct formation (RAF) :



hydrogen atom transfer (HAT) :



single electron transfer (SET) :



Additionally, SET can occur rapidly followed by, or simultaneously with, proton transfer, which are known as SEPT and PCET mechanisms, respectively. Even though they yield the same products as HAT, the influence of the solvent on their feasibility is expected to be different. While SET and SEPT are likely to be favored by polar environments that promote solvation of the intermediate ionic species, the PCET also might be viable in nonpolar media since the transfer of the proton and the electron occurs simultaneously in this case, and therefore, no charged intermediaries are formed.

The thermochemical feasibility of the different mechanisms and channels of reaction has been investigated first since it will determine the viability of chemical processes. The Gibbs free energies of reaction (ΔG) for all of the studied channels are reported in Table 1. HAT from site C8 has not been included since the bond dissociation energies of $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-H}$ bonds are about 10 kcal/mol higher than those of $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$ bonds.⁷⁵ Moreover, according to the reported data for the reactions of

ethene⁷⁶ and ethane⁷⁷ with OH radicals, the rate constant for the first one is ~ 1650 times slower than the second one.

The SET process, and therefore the first step of the SEPT mechanism, was found to be endergonic in both nonpolar and polar environments for the reactions of CAF with all of the studied radicals. Accordingly, this mechanism has been ruled out for the possible radical scavenging activity of CAF toward hydroxyl, hydroperoxyl, methoxyl, and methyl peroxy radicals. Moreover, because $\bullet\text{OH}$ is the most electrophilic of the oxygen-centered radicals,⁷⁸ this conclusion can be extended to any other peroxy or alkoxy radical.

For the particular case of $\text{O}_2^{\bullet-}$, it has been recently proposed that this radical becomes the electron donor when reacting via SET; that is, the electron transfer occurs in the opposite direction that the one described above.⁷⁹ Considering such a process for the reaction of $\text{O}_2^{\bullet-}$ with CAF: $\text{CAF} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{CAF}^{\bullet-} + \text{O}_2$, the Gibbs free energies of reaction become 45.84 and 27.62 kcal/mol in water and benzene, respectively. Even though these values are considerably lower than those corresponding to the conventional SET ($\text{CAF} + \bullet\text{OH} \rightarrow \text{CAF}^{\bullet+} + \text{OH}^-$), they still correspond to endergonic processes. The above-discussed results suggest that the SET mechanism is not expected to contribute to the reactivity of CAF toward the studied radicals.

RAF processes have been modeled at sites C2, C4, C5, C6, and C8 (represented in blue in Figure 1), while HAT/PCET processes have been considered from sites C10, C12, and C14 (red, Figure 1). Even though radical additions to N sites were considered at first as possible RAF channels, any attempt to locate the corresponding products invariably led to structures that correspond to weak-bonded complexes rather than to proper radical adducts. Therefore, they have been ruled out as viable products of reaction.

In general, the thermochemical viability of HAT/PCET processes was found to be very similar for the three different sites of reaction, for each ROS. This is a logical finding since all of these channels of reaction correspond to H transfers from methyl groups. For the RAF mechanism, on the other hand, it was found that the Gibbs free energy of reaction shows a significant variation, depending on the reacting site. When CAF reacts with $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OOH}$, $\bullet\text{OCH}_3$, and $\bullet\text{OOCH}_3$, the most reactive site is invariably C8. In contrast, for the $\text{CAF} + \text{O}_2^{\bullet-}$ reaction, the favorite sites of reaction were found to be C6 and C2 in nonpolar and polar environments, respectively.

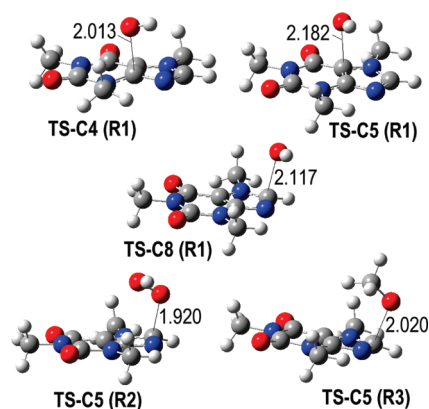


Figure 2. Optimized geometries of the TSs corresponding to RAF mechanism (distances are reported in Å). R1 = $\cdot\text{OH}$, R2 = $\cdot\text{OOH}$, and R3 = $\cdot\text{OCH}_3$.

All modeled reactions of CAF with radicals $\cdot\text{OOCH}_3$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ were found to be endergonic (Table 1), regardless of the reaction site and the polarity of the environment. Therefore, it is concluded that CAF cannot act as a direct scavenger for these ROS. It is also very likely that CAF would also be inefficient for scavenging any peroxy radical but $\cdot\text{OOH}$. For the reaction of CAF with this radical, only one channel was found to be exergonic, and even in this case, the exergonicity is very small (Table 1). This process corresponds to the RAF mechanism at site C8. The high selectivity of this reaction indicates that only one product should be formed to a significant extent and that the radical adduct formed by $\cdot\text{OOH}$ addition to site C8 is an intermediate in the formation of the final product. These results are in agreement with those reported by Devasagayam et al.²⁵ who report that CAF cannot directly quench ROO^\cdot and that it is only a poor inhibitor of peroxidation induced by HOO^\cdot and $\text{O}_2^{\cdot-}$.

For the reaction of CAF with $\cdot\text{OCH}_3$, the radical addition to site C8 is predicted to be the only RAF channel thermochemically viable (Table 1). The exergonicity of this process was found to be larger in nonpolar environments than in aqueous solution. The three channels corresponding to H transfer were found to be exergonic, regardless of the polarity of the environment. However, their exergonicity is slightly larger in nonpolar media. In addition, the H transfer processes are predicted to be systematically less exergonic than RAF at site C8.

OH radical is the most reactive of the studied ROS. This high reactivity is consistent with the finding that the reaction of CAF with this particular radical leads to the highest number of exergonic channels among the studied cases. The reactions involving $\cdot\text{OH}$ also show the highest exergonicity for each particular channel. It was found that all H transfers are thermochemically viable and that their exergonicity is almost unaffected by the polarity of the environment. Among the RAF channels that correspond to $\cdot\text{OH}$ addition, site C8 has the largest exergonicity. However, in this particular case, $\cdot\text{OH}$ additions to sites C4 and C5 are also significantly exergonic. Sites C2 and C6 are the least favored for this mechanism and are described as isoergonic in water solution and slightly endergonic in nonpolar media.

The channels of reaction described above as endergonic are no longer considered in this work. This is based on the fact that even if they take place at a significant rate, they would be reversible,

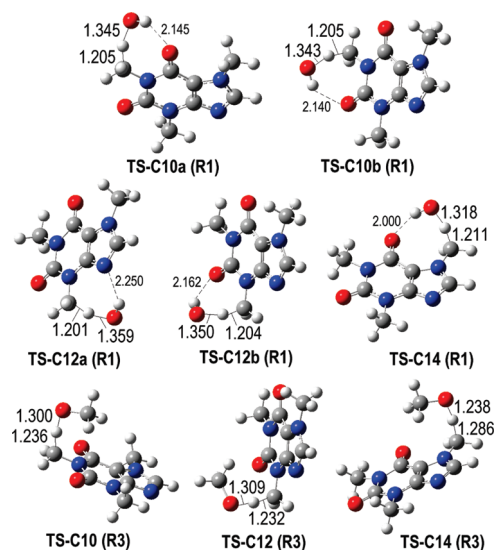


Figure 3. Optimized geometries of the TSs corresponding to H transfer (distances are reported in Å). R1 = $\cdot\text{OH}$, and R3 = $\cdot\text{OCH}_3$.

and therefore, the formed products will not be observed. They might still represent significant channels, provided that their products rapidly react with other species through reactions that are sufficiently exergonic and with low barriers of reactions. In any case, the present work focuses on the first oxidation step of CAF.

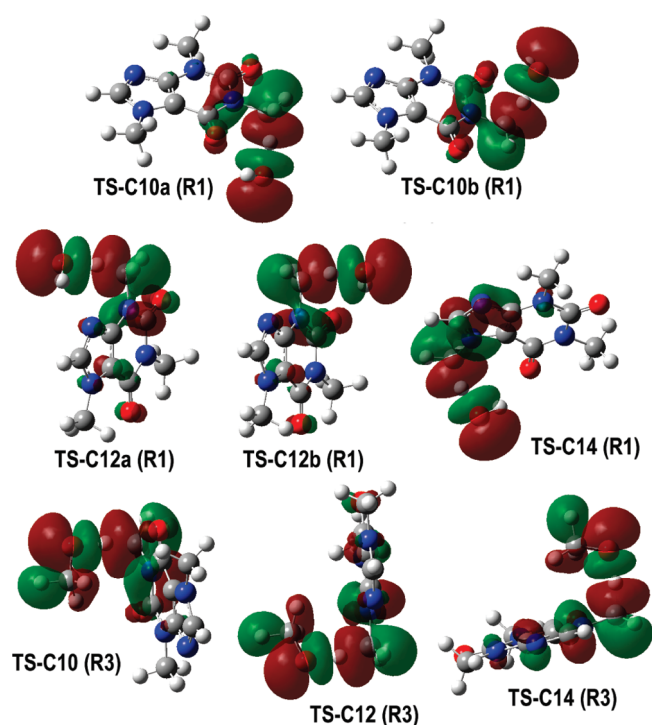
The fully optimized geometries of the transition states (TS) involved in RAF processes are shown in Figure 2. The most relevant geometrical parameter is the $\text{C}\cdots\text{O}$ distance, corresponding to the forming bond, and it was found to be around 2 Å for all modeled TSs. In addition, H-bond-like interactions were found for TS-C4 (R1) and TS-C8 (R1) involving the H atom in the OH radical and N9 in CAF, with the interaction distance equal to 2.45 and 2.58 Å, respectively.

The geometries of the TSs involved in H transfer processes are shown in Figure 3. All TSs involving the $\cdot\text{OH}$ radical show H-bond-like interactions. Moreover, for the H transfers from C10 and C12, the presence of such interactions leads to two different TS structures, which might cause differences in energy. Therefore, they have all been considered in the kinetic calculations. For the TSs involving $\cdot\text{OCH}_3$, there are no such kind of interaction; therefore, only one TS structure was located for the HAT/PCET process from each reaction site. For the TSs involving H transfers from C10 to $\cdot\text{OH}$, the located TSs are TS-C10a (R1) and TS-C10b (R1). For both of them, the stabilizing interaction involves the H atom in the $\cdot\text{OH}$ and one of the O atoms in CAF. However, in TS-C10a (R1), it involves atom O13, while in TS-C10b (R1), it involves atom O11. The interaction distances are slightly different, with $d(\text{H}\cdots\text{O})$ equal to 2.145 and 2.140 Å, respectively. For the TSs involving H transfers from C12 to $\cdot\text{OH}$, the differences are larger since the H atom in the OH radical is interacting with atoms of different nature, that is, with N9 in TS-C12a (R1) and with O11 in TS-C12b (R1). The interaction distances were found to be $d(\text{H}\cdots\text{N}) = 2.250$ Å and $d(\text{H}\cdots\text{O}) = 2.162$ Å.

Because HAT and PCET mechanisms lead to the exact same products of reaction, the TSs are usually used to distinguish between them. Three different analyses have been performed to that purpose. They are based on atomic spin densities (ASP) on

Table 2. ASD and Q, from Natural Orbital Population Analyses

	ASD(*OH)	ASD(*OCH ₃)	Q(*OH)	Q(*OCH ₃)
		TS-C10a		
C10	0.363	0.380		
H	-0.038	-0.037	0.321	0.350
O(OH)	0.644	0.562		
		TS-C10b		
C10	0.365			
H	-0.038		0.322	
O(OH)	0.640			
		TS-C12a		
C12	0.340	0.361		
H	-0.036	-0.036	0.319	0.351
O(OH)	0.637	0.558		
		TS-C12b		
C12	0.350			
H	-0.036		0.323	
O(OH)	0.628			
		TS-C14		
C14	0.378	0.385		
H	-0.041	-0.040	0.329	0.309
O(OH)	0.622	0.554		

Figure 4. SOMO density surfaces of the HAT TS structures, for the CAF reaction with OH radicals. R1 = *OH, and R3 = *OCH₃.

the sites involved in the H transfer, the charge (Q) carried by the H atom that is transferred, and the electronic density of the singly occupied molecular orbital (SOMO). The ASP and Q values, obtained from natural population analysis (NPA) calculations,

Table 3. Gibbs Free Energies of Activation (ΔG^\ddagger), at 298.15 K, in kcal/mol

	*OH		*OOH		*OCH ₃	
	water	benzene	water	benzene	water	benzene
			RAF			
C4	10.46	7.76				
C5	3.54	1.45				
C8	5.56	2.56	18.52	15.81	13.58	11.29
			HAT			
C10a	10.69	5.67			16.27	15.01
C10b	10.19	5.26				
C12a	10.76	5.78			16.62	15.00
C12b	10.49	5.11				
C14	11.10	5.36			17.56	15.28

are reported in Table 2. The coefficients of the natural orbital carrying the unpaired electron indicate that the spin population in all of the studied TSs is concentrated on the two atoms that undergo the H exchange, and a small negative value is found on the H atoms being transferred. This is consistent with a three-center three-electron bond and usually corresponds to HAT processes.⁸⁰ Regarding the charge carried by the H atom that is being transferred, it has been stated that migrating Hs with substantial positive charge are typical of proton migrations.^{81,82} The Q values were found to be all about 0.3. This value is similar to those reported for other systems undergoing HAT processes from C sites.^{41,83} Therefore, the charge criterion also seems to support that these TSs correspond to the HAT mechanism.

Even though the PCET mechanism is commonly defined as a concerted electron proton transfer that is not HAT, it has been reported that this is a difficult distinction to make, and that HAT can be considered a particular case of PCET reactions.⁸⁴ However, it is commonly accepted that the PCET mechanism can be defined as that in which the proton and the electron are transferred between different sets of orbitals.⁷⁹ Therefore, the analysis of the SOMO of the TS seems to be a reliable criterion to differentiate between HAT and PCET processes. The SOMO of HAT TSs is expected to have significant density in atomic orbitals oriented along, or nearly along, the transition vector (donor–H–acceptor). On the contrary, the SOMO of PCET TSs involves p orbitals that are orthogonal to the transition vector.⁷⁹ As the plots in Figure 4 show, the SOMO of all TSs have a node at the migrating H and are mostly localized on the donor–H–acceptor vector, which corresponds to HAT TSs. Therefore, according to all used criteria, it can be stated that all of the H transfer processes studied in this work correspond to the HAT mechanism. Accordingly, the PCET mechanism has been ruled out for the reactions of CAF with the studied ROS. Thus, the only mechanisms that are proposed to contribute to the overall scavenging activity of CAF toward these species are RAF and HAT.

The barriers of reaction, in terms of Gibbs free energy (ΔG^\ddagger), at room temperature, corresponding to these mechanisms are reported in Table 3. As these values show, the barriers of the reactions involving *OH are systematically lower than those of the CAF reactions with other radicals. This is in line with the known higher reactivity of *OH. Another general trend is that the ΔG^\ddagger values are lower in nonpolar environments than in aqueous

Table 4. Apparent Rate Constants (k) of the Different Channels and Overall Rate Coefficient ($M^{-1} s^{-1}$) at 298 K

	$\cdot OH$		$\cdot OOH$		$\cdot OCH_3$	
	water	benzene	water	benzene	water	benzene
	RAF					
C4	2.65×10^5	2.50×10^7				
C5	1.52×10^9	2.34×10^9				
C8	6.31×10^8	2.32×10^9	3.29×10^{-1}	3.19×10^1	1.38×10^3	6.59×10^4
	HAT					
C10a	8.99×10^4	3.47×10^8			4.03×10^2	3.44×10^3
C10b	4.18×10^5	8.81×10^8				
C12a	7.99×10^4	2.98×10^8			1.96×10^2	3.02×10^3
C12b	2.54×10^5	9.99×10^8				
C14	1.35×10^5	9.89×10^8			4.43×10^1	2.08×10^3
overall	2.15×10^9	8.20×10^9	3.29×10^{-1}	3.19×10^1	2.02×10^3	7.44×10^4
	6.9×10^{9a}					
Exp	7.3×10^{9b}					
	2.6×10^{9c}					

^a Ref 26. ^b Ref 25. ^c Ref 17.

solution. For the CAF + $\cdot OCH_3$ reaction, the lowest barrier corresponds to the radical addition to site C8. It is at least 3 kcal/mol lower than those of the HAT mechanism. For the reaction of CAF with $\cdot OH$, the lowest barriers also correspond to the RAF mechanism, in particular to additions to sites C5 and C8, in that order. The highest barrier was found to be that of RAF at site C4. The barriers of the HAT channels were found to be almost independent on the reaction site.

The rate constants for the different channels of reaction, in aqueous and benzene solutions, are reported in Table 4, together with the overall rate coefficients. It has been assumed that neither mixing nor crossover between different pathways occurs; therefore, the overall rate coefficient (k) has been calculated as the sum of the rate constants of each channel. For example, for the CAF + $\cdot OH$ reaction:

$$k = k_{app}^{HAT} + k_{app}^{RAF}$$

where

$$k_{app}^{HAT} = k_{app}^{C10} + k_{app}^{C12} + k_{app}^{C14}$$

$$k_{app}^{RAF} = k_{app}^{C4} + k_{app}^{C5} + k_{app}^{C8}$$

According to the overall rate coefficients, CAF is predicted to react about 4, 97, and 37 times faster in nonpolar media than in aqueous solution, with $\cdot OH$, $\cdot OOH$, and $\cdot OCH_3$, respectively (Table 4). The overall reactivity of CAF toward OH radicals was found to be diffusion-controlled in both media, supporting the excellent $\cdot OH$ scavenging activity of CAF, in agreement with the available experimental evidence. The calculated rate coefficient is only 1.2 times lower than the most recently reported value¹⁷ and 3.4 and 3.2 times lower than the other reported values. This excellent agreement supports the reliability of the present calculations. The efficiency of CAF to scavenge $\cdot OCH_3$ and $\cdot OOH$ is predicted to be much lower than that for scavenging $\cdot OH$. In fact, CAF is predicted to be a modest scavenger of $\cdot OCH_3$ and probably of other alkoxy radicals and a poor scavenger of $HOO\cdot$. This finding is in agreement with the results reported by Devasagayam et al.²⁵ who found that CAF is a poor inhibitor of peroxidation induced by $HOO\cdot$. The presented

Table 5. Branching Ratios (Γ) of the Different Channels, at 298.15 K

	$\cdot OH$		$\cdot OCH_3$	
	water	benzene	water	benzene
	RAF			
C4	~0	0.3		
C5	70.6	28.6		
C8	29.4	28.2	68.2	88.5
	HAT			
C10	~0	14.9	19.9	4.6
C12	~0	15.8	9.7	4.1
C14	~0	12.1	2.2	2.8

results suggest that CAF is more reactive toward alkoxy radicals ($RO\cdot$) than toward peroxy radicals ($ROO\cdot$). However it should be noticed that this trend is valid for identical R groups, since the electron-acceptor character of R strongly influences the reactivity of these radicals. For example, alkoxy and peroxy radicals with R = CCl_3 have been proven to be much more reactive than those with alkyl or alkenyl R groups.^{33,85}

The branching ratios of the different channels of reaction in aqueous and benzene solutions are reported in Table 5. They represent the percent contribution of the different channels to the overall reaction and have been calculated as:

$$\Gamma_i = \frac{k_i}{k_{overall}} \times 100 \quad (7)$$

Because only one channel of reaction was found to be thermochemically viable for the CAF + $\cdot OOH$ reaction (RAF at C8), it is assumed that it accounts for the whole reactivity of CAF toward this radical; therefore, the RAF mechanism is the only one contributing to the overall reaction in this case. For the CAF + $\cdot OH$ reaction, the RAF mechanism is also predicted to contribute ~100% to the overall scavenging activity of CAF in aqueous solution but only ~57% in nonpolar environments, where HAT is expected to account for the other 43%. For the CAF + $\cdot OCH_3$ reaction, on the other hand, both channels significantly contribute to the overall reactivity of CAF, regardless of the polarity of the environment. These contributions were found to be ~68% (RAF) and ~32% (HAT) in aqueous solution and ~88.5% (RAF) and ~11.5% (HAT) in nonpolar media. On the basis of these results, it can be stated that in general the main mechanism involved in the direct ROS scavenging activity of CAF is the RAF. However, the discussed variations are in agreement with previously reported data that demonstrate that the nature of free radicals plays an important role on the relative importance of competing mechanisms.³²

Regarding the site reactivity, for the CAF + $\cdot OH$ reaction in water solution, it is proposed that ~70.6% of the overall reactivity is due to RAF at site C5, while the other ~29.5% arises from $\cdot OH$ addition to site C8. These results support the mechanistic proposal of Dalmázio et al.²⁹ When this reaction takes place in a nonpolar environment, a wider product distribution is expected. Significant populations of products yielded from RAF on sites C5 and C8 and from HAT from sites C10, C12, and C14 are proposed. Therefore, the product distribution is expected to be influenced not only by

Table 6. Gibbs Free Energies of Activation (ΔG^\ddagger) and Rate Constants (k) at 298.15 K

approach	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($M^{-1} s^{-1}$)
1	18.52	0.33
2	19.02	0.14
3	19.12	0.12

the nature of the radical but also by the polarity of the environment.

For the reaction of CAF with the $\bullet\text{OCH}_3$ radical, four products are expected to be formed in both polar and nonpolar environments (Table 5). They are the three possible radicals yielded by HAT from the methyl groups in CAF and that formed by the radical addition to C8. The proportion in which they are formed is only moderately influenced by the polarity of the environment, in contrast to what was found for the CAF + $\bullet\text{OH}$ reaction. The main product of the CAF + $\bullet\text{OCH}_3$ reaction is proposed to be that formed through channel RAF-C8. This particular channel is expected to contribute to the overall $\bullet\text{OCH}_3$ scavenging activity of CAF by 68.2 and 88.5% in aqueous and benzene solutions, respectively. The contributions of the HAT channels are similar in nonpolar media, even though the least favored channel is that involving site C14. In aqueous solution, this is also the least favored among the HAT channels, while H abstraction from site C10 is the HAT channel contributing the most to the overall reactivity of CAF toward the $\bullet\text{OCH}_3$ radical.

Testing the Reliability of the Used Methodology. To test the reliability of the used methodology, two other approaches were used to compute the rate constant of the CAF + $\bullet\text{OOH}$ reaction by RAF at C8 in aqueous solution. This system has been chosen because of its low rate constant, which makes the calculated values more sensitive to the used approach. The aqueous solution has been chosen since geometry differences, with respect to gas phase, are expected to be larger as the polarity of the environment increases. The methodology used for all of the results presented in this work consists of geometry optimizations and frequency calculations in gas phase at M05-2X/6-31+G(d) level of theory, followed by single point (SP) calculations at M05-2X/6-311++G(d,p) level of theory to improve the gas phase energies, and SP calculations in solution using the PCM model with RADII = UAHF, and the option SCFVAC, at HF/6-31+G(d) to obtain the solvation energies (approach 1). The second approach also uses the strategy of optimizing in gas phase and to obtain the Gibbs free energy of reaction in solution (ΔG_{sol}) as the sum of the Gibbs free energy of reaction in vacuum (ΔG_{gas}) and the solvation free energies ($\Delta\Delta G_{\text{S}}$). However, in this case, the solvation free energies have been computed using the PCM model with RADII = UAKS, and the option SCFVAC, at M05-2X/6-311++G(d,p) level of theory (approach 2). The third approach consists of performing all calculations in solution; that is, geometry optimizations and frequency calculations are carried out within the PCM model. In this case, all of the calculations are performed at M05-2X/6-31+G(d,p) level of theory (approach 3).

Regarding the geometry of the TS, it was found that the mean unsigned differences for the distances, angles, and dihedral angles are 0.03 Å, 0.38°, and 1.38°, respectively, when comparing the geometries obtained from optimizations in gas phase (approach 1) and in aqueous solution (approach 3). This agreement supports the implicit assumption made within approach 1 that gas phase

geometries are close enough to water geometries for the studied species. As mentioned before, differences between gas phase geometries and those obtained in nonpolar solutions are expected to be even smaller. The kinetic results obtained from the three approaches are reported in Table 6. As these values show the Gibbs free energies of activation are very similar, they differ by 0.6 kcal/mol or less, which means that the three approaches are equivalent since the currently accepted computational accuracy is 1 kcal/mol. The rate constants are also very similar. k becomes 2.3 times lower when using RADII = UAKS (M05-2X/6-311++G(d,p)) instead of RADII = UAHF (HF/6-31+G(d)) and 3.8 times lower when performing all calculations in solution (approach 3), both with respect to approach 1. The excellent agreement among the tested methodologies supports the reliability of the methodology used along this work. It should be noticed, however, that this coincidence for CAF cannot be extended to systems with different structural characteristics, unless some tests are performed.

CONCLUSIONS

The SET, SEPT, and PCET mechanisms have been ruled out for the reactions of CAF with hydroxyl radical, peroxy radicals, alkoxy radicals, and the superoxide radical anion. The only mechanisms that are expected to significantly contribute to the overall reactivity of CAF toward these ROS are RAF and HAT.

It was found that CAF cannot directly scavenge $\bullet\text{OOCH}_3$ and $\text{O}_2^{\bullet-}$ radicals. It is inferred that CAF would be rather inefficient for scavenging peroxy radicals in general. CAF is predicted to react with ROS faster in nonpolar media than in aqueous solution.

The overall reactivity of CAF toward OH radicals was found to be diffusion-controlled, regardless of the polarity of the environment, supporting the excellent $\bullet\text{OH}$ scavenging activity of this compound. CAF is predicted to be a modest scavenger of $\bullet\text{OCH}_3$, and probably of other alkoxy radicals, and a poor scavenger of $\text{HOO}\bullet$.

The main mechanism involved in the direct ROS scavenging activity of CAF is the RAF. However, its contribution to the overall reactivity of CAF was found to be significantly influenced by the nature of the reacting free radical and also by the polarity of the environment. The excellent agreement with the available experimental data supports the reliability of the present calculations.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: agalano@prodigy.net.mx or agal@xanum.uam.mx.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo at UAM—Iztapalapa for the access to its computer facilities. J.R.L.-C. acknowledges CONACyT for a Doctoral fellowship.

REFERENCES

- (1) Sayre, L. M.; Perry, G.; Smith, M. A. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 172.
- (2) See for example: (a) Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20313. (b) Perry, G.; Raina, A. K.; Nunomura, A.; Wataya, T.; Sayre, L. M.; Smith, M. A. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 831. (c) Aksenov, M. Y.; Aksenov, M. V.; Butterfield, D. A.;

- Geddes, J. W.; Markesbery, W. R. *Neuroscience (Oxford)* **2001**, 163, 373. (d) Giasson, B. I.; Ischiropoulos, H.; Lee, V. M. Y.; Trojanowski, J. Q. *Free Radical Biol. Med.* **2002**, 32, 1264. (e) Schoeneich, C. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1703, 111. (f) Reddy, P. H. *J. Neurochem.* **2006**, 96, 1. (g) Lin, M. T.; Beal, M. F. *Nature* **2006**, 443, 787.
- (3) (a) Hamer, H. J. *Hum. Hypertens.* **2006**, 20, 909. (b) Taylor, S. R.; Demmig-Adams, B. *Nutr. Food Sci.* **2007**, 37, 406.
- (4) Nicoli, M. C.; Anese, M.; Manzocco, L.; Lerici, C. R. *Food Sci. Technol.* **1997**, 30, 292.
- (5) Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. *J. Nutr.* **2003**, 133, 2812.
- (6) Zang, L.-Y.; Cosma, G.; Gardner, H.; Castranova, V.; Vallyathan, V. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, 247, 205.
- (7) Svilaas, A.; Sakhi, A. K.; Andersen, L. F.; Svilaas, T.; Ström, E. C.; Jacobs, D. R., Jr.; Ose, L.; Blomhoff, R. *J. Nutr.* **2004**, 134, 562.
- (8) Del Castillo, M. D.; Gordon, M. H.; Ames, J. M. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, 221, 471.
- (9) Yen, W.-J.; Wang, B.-S.; Chang, L.-W.; Duh, P.-D. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2658.
- (10) Cammerer, B.; Kroh, L. W. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 223, 469.
- (11) Lopez-Galilea, I.; Andueza, S.; di Leonardo, I.; Paz de Pena, M.; Cid, C. *Food Chem.* **2006**, 94, 75.
- (12) Parras, P.; Martinez-Tome, M.; Jimenez, A. M.; Murcia, M. A. *Food Chem.* **2007**, 102, 582.
- (13) Lopez-Galilea, I.; Paz de Peña, M.; Cid, C. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 6110.
- (14) Bichler, J.; Cavin, C.; Simic, T.; Chakraborty, A.; Ferk, F.; Hoelzl, C.; Schulte-Hermann, R.; Kundi, M.; Haidinger, G.; Angelis, K.; Knasmüller, S. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, 45, 1428.
- (15) Lopez-Galilea, I.; Paz de Peña, M.; Cid, C. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227, 141.
- (16) Gomez-Ruiz, J. A.; Ames, J. M.; Leake, D. S. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227, 1017.
- (17) Brezova, V.; Slobodova, A.; Stasko, A. *Food Chem.* **2009**, 114, 859.
- (18) Shin, J.-W.; Wang, J.-H.; Kang, J.-K.; Son, C.-G. *J. Sci. Food. Agric.* **2010**, 90, 450.
- (19) Vignoli, J. A.; Bassoli, D. G.; Benassi, M. T. *Food Chem.* **2011**, 124, 863.
- (20) Nafisi, S.; Manouchehri, F.; Tajmir-Riahi, H.-A.; Varavipour, M. *J. Mol. Struct.* **2008**, 875, 392.
- (21) Rosso, A.; Mossey, J.; Lipka, C. F. *Am. J. Alzheimer's Dis. Other Dementias* **2008**, 23, 417.
- (22) Prasanthi, J. R. P.; Dasari, B.; Marwarha, G.; Larson, T.; Chen, X.; Geiger, J. D.; Ghribi, O. *Free Radical Biol. Med.* **2010**, 49, 1212.
- (23) Varma, S. D.; Hegde, K. R. *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, 340, 49.
- (24) Inkielewicz-Stepniak, I.; Czarnowski, W. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, 48, 1607.
- (25) Devasagayam, T. P. A.; Kamat, J. P.; Mohan, H.; Kesavan, P. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1282, 63.
- (26) Kesavan, P. C.; Powers, E. L. *Int. J. Radiat. Biol.* **1985**, 48, 223.
- (27) Lee, C. *Clin. Chim. Acta* **2000**, 295, 141.
- (28) Kesavan, P. C. *Curr. Sci.* **1992**, 62, 791.
- (29) Dalmázio, I.; Santos, L. S.; Lopes, R. P.; Eberlin, M. N.; Augusti, R. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 5982.
- (30) Stadler, R. H.; Fay, L. B. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1332.
- (31) Kumar, S. S.; Devasagayam, T. P.; Jayashree, B.; Kesavan, P. C. *Int. J. Radiat. Biol.* **2001**, 77, 617.
- (32) Galano, A.; Alvarez-Diduk, R.; Ramirez-Silva, M. T.; Alarcon-Angel, G.; Rojas-Hernández, A. *Chem. Phys.* **2009**, 363, 13.
- (33) Galano, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, DOI: 10.1039/c0cp02801k.
- (34) Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, 2, 364.
- (35) Zavala-Oseguera, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Merino, G.; Galano, A. *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 13913.
- (36) Velez, E.; Quijano, J.; Notario, R.; Pabón, E.; Murillo, J.; Leal, J.; Zapata, E.; Alarcón, G. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, 22, 971.
- (37) Vega-Rodriguez, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 7649.
- (38) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Lett.* **2009**, 11, 5114.
- (39) Black, G.; Simmie, J. M. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 1236.
- (40) Furuncuoglu, T.; Ugur, I.; Degirmenci, I.; Aviyyente, V. *Macromolecules* **2010**, 43, 1823.
- (41) Galano, A.; Macías-Ruvalcaba, N. A.; Campos, O. N. M.; Pedraza-Chaverri, J. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 6625.
- (42) Gao, T.; Andino, J. M.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 9830.
- (43) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, revision E.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2003.
- (44) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *J. Comput. Chem.* **2006**, 27, 1203.
- (45) Alvarez-Idaboy, J. R.; Galano, A. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, 126, 75.
- (46) Wallnoefer, H. G.; Fox, T.; Liedl, K. R.; Tautermann, C. S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 14941.
- (47) Cances, M. T.; Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, 107, 3032.
- (48) Mennucci, B.; Cances, E.; Tomasi, J. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 10506.
- (49) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cances, E. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1999**, 464, 211.
- (50) Belcastro, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. *Theor. Chem. Acc.* **2006**, 115, 361.
- (51) Leopoldini, M.; Russo, N.; Chiodo, S.; Toscano, M. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 6343.
- (52) Leopoldini, M.; Rondinelli, F.; Russo, N.; Toscano, M. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 8862.
- (53) Martinez, A.; Vargas, R.; Galano, A. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, 127, 595.
- (54) Chiodo, S. G.; Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 7662.
- (55) Pérez-González, A.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 1306.
- (56) Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. *Food Chem.* **2011**, 125, 288.
- (57) Okuno, Y. *Chem.—Eur. J.* **1997**, 3, 210.
- (58) Benson, S. W. *The Foundations of Chemical Kinetics*; R. E. Krieger: Malabar, FL, 1982.
- (59) Ardura, D.; Lopez, R.; Sordo, T. L. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 23618.
- (60) Alvarez-Idaboy, J. R.; Reyes, L.; Cruz, J. *Org. Lett.* **2006**, 8, 1763.
- (61) Alvarez-Idaboy, J. R.; Reyes, L.; Mora-Diez, N. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 3682.
- (62) Galano, A. *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 1677.
- (63) Galano, A. *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 8922.
- (64) Galano, A.; Cruz-Torres, A. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 732.
- (65) Galano, A.; Francisco-Márquez, M. *Chem. Phys.* **2008**, 345, 87.

- (66) Mora-Diez, N.; Keller, S.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3682.
- (67) Eyring, H. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107.
- (68) Evans, M. G.; Polanyi, M. *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 875.
- (69) Truhlar, D. G.; Hase, W. L.; Hynes, J. T. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664.
- (70) Eckart, C. *Phys. Rev.* **1930**, *35*, 1303.
- (71) Collins, F. C.; Kimball, G. E. *J. Colloid Sci.* **1949**, *4*, 425.
- (72) Smoluchowski, M. *Z. Phys. Chem.* **1917**, *92*, 129.
- (73) Truhlar, D. G. *J. Chem. Ed.* **1985**, *62*, 104.
- (74) (a) Einstein, A. *Ann. Phys. (Leipzig)* **1905**, *17*, 549. (b) Stokes, G. G. *Mathematical and Physical Papers*; Cambridge University Press: Cambridge, 1903; Vol. 3, esp. Sect. IV, p 55.
- (75) Blanksby, S. J.; Ellison, G. B. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 255.
- (76) Tsang, W.; Hampson, R. F. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, *15*, 1087.
- (77) Atkinson, R. *Atmos. Chem. Phys.* **2003**, *3*, 2233.
- (78) Pryor, W. A. *Free Radical Biol. Med.* **1988**, *4*, 219.
- (79) Galano, A.; Vargas, R.; Martínez, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 193.
- (80) Olivella, S.; Anglada, J. M.; Soly, A.; Bofill, J. M. *Chem.—Eur. J.* **2004**, *10*, 3404.
- (81) Mayer, J. M.; Hrovat, D. A.; Thomas, J. L.; Borden, W. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11142.
- (82) Turecek, F.; Syrstad, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3353.
- (83) Pérez-González, A.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1306.
- (84) Mayer, J. M. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2004**, *55*, 363.
- (85) Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12113.

Free Radical Scavenging Activity of Caffeine's Metabolites

Jorge Rafael León-Carmona and Annia Galano*

The reactions of caffeine's main metabolites [paraxanthine, theobromine, theophylline, and 1-methylxanthine] with $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, $\cdot\text{OOH}$, and $\cdot\text{OOCH}_3$, in nonpolar and polar environments, have been studied using the density functional theory. Different mechanisms of reaction have been taken into account and their relative importance on the antioxidant activity of these compounds has been assessed. The free radical scavenging activity of the studied metabolites was found to be excellent for $\cdot\text{OH}$, moderate for $\cdot\text{OCH}_3$, and negligible for peroxy radicals. The results from the present work indicate that the antioxidant activity of caffeine in our body remains almost the same when metabolized to paraxanthine, theobromine, theophylline, and 1-

methylxanthine, while it is increased after being metabolized to 1-methyluric acid. In addition, the polarity of the environment was found to affect the overall reactivity of the studied compounds, to influence the relative importance of the different mechanisms and channels of reaction, and to have negligible effects on the relative scavenging activity of the studied compounds (theobromine > paraxanthine \approx theophylline \approx 1-methylxanthine). The studied metabolites were found to be better scavengers in nonpolar media than in aqueous solution. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

DOI: 10.1002/qua.24084

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are common intermediaries in the cellular metabolism, where they play important roles in diverse physiological functions. Oxidative stress (OS) is a chemical stress that can be defined as the imbalance between production and removal of ROS. In humans OS has been associated to the onset of diverse degenerative diseases such as arterioscleroses,^[1] Parkinson's and Alzheimer's diseases,^[2] cancer,^[3] cardiovascular diseases,^[4] etc. As OS often involves reactions between free radicals and molecules of high biological importance such as DNA and proteins, the study of compounds able to scavenge these reactive species constitutes an important area of research aiming to prevent OS and the consequent molecular damage. In spite of the controversies about the effects of coffee on human health,^[5] it is currently accepted as a rich source of antioxidants.^[6]

The most representative compound in coffee is caffeine (1,3,7-trimethylxanthine, CAF), although it is also found in seeds, citrus fruits, olive oil, tea, and cocoa beverages.^[7] In humans, it is primarily metabolized into theobromine (3,7-dimethylxanthine, THB), theophylline (1,3-dimethylxanthine, THP), and paraxanthine (1,7-dimethylxanthine, PAR), which in turn is metabolized to 1-methylxanthine (MXT) and 1-methyluric acid. Considering the relatively high amount of caffeine in coffee, significant quantities of its metabolites are anticipated in blood and might be involved in the physiological effects related to coffee consumption, including antioxidant protection.^[8]

The mechanism by which these compounds exert their antioxidant activity is not fully understood yet. So far, only a few works have addressed this point. Standler and Fay^[9] have identified 8-oxocaffeine and acid N-dimethylparabinoic as the main oxidation products of CAF. Whereas Lee^[10] reported that CAF, PAR, THB, and THP do not have antioxidant protective effects at micromolar concentrations. Gomez-Ruiz et al.^[11] make a com-

parative study between different coffee-related compounds and found that both PAR and CAF have a moderate antioxidant activity according to Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. They emphasize on the importance of further researches aiming to provide more detailed information on the action mechanisms of caffeine's metabolites when acting as ROS scavengers. Geraets et al.^[12] found that the TEAC values related to these methylxanthines are very low, which indicates that they do not have significant antioxidant effects. In a previous work from our group, it was proposed that the scavenging efficiency of caffeine is highly influenced by the reacting free radical.^[13] Its free radical scavenging activity was found to be excellent for $\cdot\text{OH}$, moderate for $\cdot\text{OCH}_3$ and probably for other alkoxy radicals; and poor for $\text{HOO}\cdot$ and other peroxy radicals. In addition, it has been previously proven that the nature of the reacting free radicals can have a role on the preponderant mechanisms of reaction, as well as on the site reactivity.^[14–16]

Accordingly, it is the main goal of the present work to investigate the reactions of the main metabolites of CAF with different free radicals ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OOH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, and $\cdot\text{OOCH}_3$), paying particular attention to those aspects for which there is very little or none information available. To that purpose, we have performed a systematic study including different mechanisms of reaction. They are: radical adduct formation (RAF), hydrogen transfer (HT), and single electron transfer (SET). All possible sites of reaction have been taken into account, as well as the influence of the polarity of the environment. In addition, kinetic data and branching ratios are provided for the first time.

J. R. León-Carmona, A. Galano
Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av San Rafael Atlixco
No.186, Col. Vicentina C.P.09340, México D.F.
E-mail: agalano@prodigy.net.mx

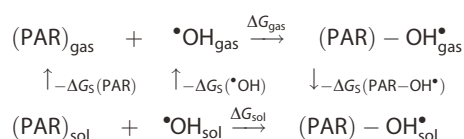
© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Computational Details

Geometry optimizations and frequency calculations have been performed using the M05-2X functional and the 6-31+G(d) basis set. The electronic energies were improved by single point calculations using the 6-311++G(d,p) basis set. The M05-2X functional has been recommended for kinetic calculations by their developers^[17] and it has been also successfully used to that purpose by independent authors.^[18–22] Unrestricted calculations were used for open shell systems and local minima and transition states (TSs) were identified by the number of imaginary frequencies (NIMAG = 0 or 1, respectively). Intrinsic reaction coordinate calculations have been performed to confirm that the TSs properly connect reactants and products. All the electronic calculations were performed with Gaussian 03 package of programs.^[23]

Thermodynamic corrections at 298.15 K were included in the calculation of relative energies. The stationary points were first modeled in gas phase (vacuum), and solvent effects were included *a posteriori* by single point calculations using polarizable continuum model (PCM), specifically the integral-equation-formalism-PCM^[24–26] and RADII = UAHF with the option SCFVAC at HF/6-31+G(d) level of theory, as recommended by Gaussian03 manual for computing solvation free energies. They have been performed using benzene (I) and water (II) as solvents, to mimic nonpolar and polar environments, respectively. This approach has been successfully used before for describing radical–molecule reactions in solution involved in the antioxidant activity of different compound.^[27–33] Moreover, for a very similar system, CAF, it was proven that the results obtained when using this methodology are very similar to those arising from performing all calculations in solution.^[13]

Relative Gibbs free energies in solution have been computed using thermodynamic cycles and the Hess law, explicitly including solvation free energies. For example for $\bullet\text{OH}$ additions to PAR:



Within this strategy the Gibbs free energy of reaction in solution (ΔG_{sol}) can be obtained as the sum of the Gibbs free energy of reaction in vacuum (ΔG_{gas}) and the difference in solvation free energies ($\Delta\Delta G_{\text{S}}$):

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{gas}} + \Delta\Delta G_{\text{S}} \quad (1)$$

where $\Delta\Delta G_{\text{S}}$ is calculated as:

$$\Delta\Delta G_{\text{S}} = \Delta G_{\text{S}}((\text{PAR}) - \text{OH}^{\bullet}) - \Delta G_{\text{S}}(\text{PAR}) - \Delta G_{\text{S}}(\text{OH}^{\bullet}) \quad (2)$$

with ΔG_{S} representing the free energies of solvation. In all the cases, the reference state is 1 M. In addition, the solvent cage effects have been included according to the corrections proposed by Okuno,^[34] taking into account the free volume theory.^[35]

The rate constants (k) were calculated using conventional TS theory (TST)^[36–38] and 1 M standard state as:

$$k = \sigma^k \frac{k_{\text{B}}T}{h} e^{-(\Delta G^{\ddagger})/RT} \quad (3)$$

where k_{B} and h are the Boltzmann and Planck constants, ΔG^{\ddagger} is the Gibbs free energy of activation, σ represents the reaction path degeneracy, accounting for the number of equivalent reaction paths, and κ accounts for tunneling corrections. The tunneling corrections, defined as the Boltzmann average of the ratio of the quantum and the classical probabilities, were calculated using the zero curvature tunneling approach.^[39]

Some of the calculated rate constants (k) were found to be close to the diffusion-limit. Accordingly, the apparent rate constant (k_{app}) cannot be directly obtained from TST calculations. In this work, we have used the Collins–Kimball theory to that purpose^[40]:

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

where k_{act} is the thermal rate constant, obtained from TST calculations (Eq. 3), and k_{D} is the steady-state Smoluchowski^[41] rate constant for an irreversible bimolecular diffusion-controlled reaction:

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

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

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

where k_{B} is the Boltzmann constant, T is the temperature, η denotes the viscosity of the solvent, in our case water ($\eta = 8.91 \times 10^{-4}$ Pa s) and benzene ($\eta = 6.04 \times 10^{-4}$ Pa s); and a the radius of the solute.

Results and Discussion

The reactions of the studied metabolites (MET, Fig. 1) with different free radicals ($\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OOH}$, $\bullet\text{OCH}_3$, and $\bullet\text{OOCH}_3$) have been modeled in polar and nonpolar environments. The scavenging activity of the studied compounds can take place

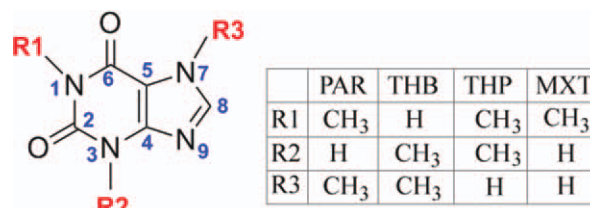
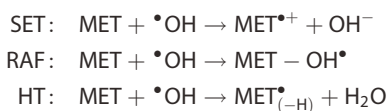


Figure 1. Site numbering and structures. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

through different mechanisms, as it is the case for many other compounds.^[27–29,31–33] Those considered in this work are:



RAF processes have been modeled at sp² C sites, while HT processes have been considered for H atoms bonded to N and sp³ C atoms. Even though radical additions to N sites were considered at first as possible RAF channels, any attempt to locate the corresponding products invariably led to structures that correspond to weak-bonded complexes rather than to proper radical adducts. Therefore, these channels have been ruled out as viable chemical processes.

The thermochemistry of the different mechanisms and channels of reaction has been investigated first, since it will determine their feasibility. The Gibbs free energies of reaction (ΔG) for all the studied channels are reported in Table 1. The SET processes were found to be endergonic both in nonpolar and polar environments for all the studied cases. Accordingly, SET has been ruled out as a viable mechanism for the radical scavenging activity of PAR, THB, THP, and MXT. As $\cdot\text{OH}$ is among the most electrophilic of the oxygen-centered radicals,^[44] this conclusion can be extended to other radicals.

The Gibbs energies of reaction were found to be more dependent on the nature of the reacting free radical than on the particular metabolite that they are reacting with. Most of the RAF and HT channels of the reactions involving $\cdot\text{OH}$ were found to be exergonic. For the RAF mechanism the exceptions are the $\cdot\text{OH}$ additions to site C6 for all MET, and to site C2 of PAR; while among all the studied HT processes the only one with $\Delta G > 0$ is that involving site N1 in THB. For the reactions with $\cdot\text{OCH}_3$ the number of exergonic channels is reduced, compared to $\cdot\text{OH}$. Radical additions were found to be exergonic for all MET only at site C8, and slightly exergonic for site C2 of THB, when the reaction takes place in nonpolar media. This is in line with the higher reactivity of C8 previously described for CAF.^[9,13] Moreover, this particular channels is systematically the

one with the largest exergonicity. For the HT from MET to $\cdot\text{OCH}_3$ there is only one channel with $\Delta G > 0$, that involving site N1 in THB, similarly to what was found for the HT reactions with $\cdot\text{OH}$.

The lower reactivity of peroxy radicals, compared to $\cdot\text{OH}$ and alkoxy radicals, is reflected in the values reported in Table 1. For the $\cdot\text{OOCH}_3$ radical all the studied channels of reaction are predicted to be endergonic. This strongly suggests that the studied compounds are not able of scavenging this radical. This also suggests that they are not good for scavenging peroxy radicals in general, particularly alkyl or alkenyl peroxy

Table 1. Gibbs free energies of reaction, at 298.15 K, in kcal/mol.

	$\cdot\text{OH}$		$\cdot\text{OCH}_3$		$\cdot\text{OOH}$		$\cdot\text{OOCH}_3$	
	(I) ^[a]	(II) ^[a]	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
PAR								
SET	85.38	10.69	98.25	31.74	107.06	41.99	109.06	44.81
RAF								
C2	-7.20	-3.72	20.48	16.82	35.87	32.74	35.54	33.95
C4	-12.98	-12.04	0.66	1.85	15.28	17.28	18.28	20.11
C5	-13.14	-10.78	3.41	6.49	15.60	18.40	17.50	20.64
C6	6.92	6.86	19.82	20.01	39.04	40.83	41.59	42.64
C8	-28.58	-29.18	-15.76	-16.41	-0.53	-0.36	2.94	2.45
HAT								
N3	-19.34	-20.37	-4.23	-7.02	13.05	9.93	14.61	10.48
R1	-21.76	-22.16	-6.66	-8.82	10.63	8.14	12.18	8.68
R3	-22.82	-22.74	-7.72	-9.41	9.57	7.56	11.13	8.11
THB								
SET	83.36	9.64	96.24	30.70	105.04	40.94	107.04	43.76
RAF								
C2	1.26	0.75	-0.88	1.49	29.00	27.55	31.63	29.36
C4	-12.27	-11.49	1.39	2.58	15.65	17.52	17.28	18.83
C5	-11.75	-9.25	3.14	6.33	15.52	18.55	18.07	21.42
C6	5.42	5.74	19.45	19.76	32.78	33.59	36.43	36.24
C8	-29.04	-29.52	-15.91	-16.34	-0.79	-0.40	2.67	2.48
HT								
N1	4.88	6.36	19.99	19.71	37.27	36.66	38.83	37.21
R2	-22.72	-23.03	-7.62	-9.69	9.67	7.27	11.22	7.81
R3	-23.02	-22.87	-7.91	-9.52	9.37	7.43	10.93	7.98
THP								
SET	84.75	10.22	97.63	31.28	106.44	41.53	108.44	44.35
RAF								
C2	-7.57	-4.70	7.12	9.20	27.36	29.27	32.17	29.63
C4	-12.38	-11.71	0.96	2.24	15.17	16.97	18.20	19.77
C5	-13.13	-10.30	2.45	5.83	14.61	19.06	17.18	20.38
C6	7.82	6.94	20.92	21.01	34.83	34.68	39.04	37.87
C8	-30.25	-30.75	-17.13	-17.58	0.19	0.47	1.60	1.38
HT								
N7	-23.54	-21.42	-8.43	-8.07	8.86	8.89	10.41	9.43
R1	-22.05	-22.35	-6.95	-9.01	10.34	7.95	11.89	8.49
R2	-22.38	-22.66	-7.28	-9.32	10.01	7.64	11.56	8.18
MXT								
SET	89.57	12.02	102.45	33.08	111.26	43.33	113.26	46.15
RAF								
C2	-7.97	-5.12	6.61	9.86	36.43	33.23	37.05	35.09
C4	-13.13	-12.39	0.03	1.48	15.03	17.14	18.10	20.06
C5	-14.05	-10.91	2.25	5.52	14.64	18.95	17.30	20.47
C6	8.01	7.83	20.28	20.75	40.47	42.89	43.56	45.69
C8	-28.63	-29.24	-14.85	-15.38	0.41	0.49	3.68	3.15
HT								
R1	-21.83	-22.25	-6.73	-8.91	10.56	8.05	12.11	8.59
N3	-18.68	-19.92	-3.58	-6.58	13.71	10.38	15.27	10.93
N7	-22.10	-20.58	-7.00	-7.24	10.29	9.72	11.84	10.26

[a] (I) benzene solution, (II) aqueous solution.

radicals. For the reactions involving $\bullet\text{OOH}$ all the HT processes were found to have ΔG values >0 . Accordingly, this mechanism is not expected to play a significant role on the $\bullet\text{OOH}$ scavenging activity of the studied MET. For the RAF mechanism, conversely, $\bullet\text{OOH}$ additions to site C8 of PAR and THB are slightly exergonic, while those to the same site in THP and MXT are slightly endergonic. Considering the inaccuracy inherent to any calculation method, these four channels can actually be considered isoergonic. All the other RAF channels involving $\bullet\text{OOH}$ are predicted to be highly endergonic, and therefore, nonviable.

For the kinetic study, we have not included the channels of reaction described above as endergonic because even if they take place at a significant rate, they would be reversible and therefore the formed products will not be observed. However, it should be noticed that they might still represent significant channels if their products rapidly react further. This would be particularly important if these later stages are sufficiently exergonic to provide a driving force, and if they have low barriers of reactions. In addition, even when endergonic processes might play important roles in biological systems, this particular behavior is expected only when there are not parallel reactions more energetically favored. As this might be the case for the $\bullet\text{OOH}$ reactions with THP and MXT, the additions to site C8 in these two cases have also been included in the kinetic study. Moreover, these two channels can be rather described as isoergonic since their ΔG values are very small.

The structures of the TSs are presented in Supporting Information Figures S1–S8, and the values of the Gibbs free energies of activation (ΔG^\ddagger) are reported in Supporting Information Tables S1–S4. The lowest values of ΔG^\ddagger systematically correspond to the reactions with $\bullet\text{OH}$, as expected due to its higher reactivity. Comparing the studied MET, the lowest barriers of reactions are those involving the reactions with THB for all the studied radicals, and regardless of the polarity of the environment. In addition, the ΔG^\ddagger values were found to be systematically lower in nonpolar media than in aqueous solution, suggesting a higher reactivity of the studied compounds toward oxygenated free radicals in nonpolar environments.

The rate constants for the different channels of reaction, in aqueous and benzene solutions, are reported in Table 2, together with the overall rate coefficients, which have been calculated as the sum of

the rate constants of each channel. For example for the PAR + $\bullet\text{OH}$ reaction, in aqueous solution:

$$k_{\text{overall}} = k_{\text{app}}^{\text{HT}} + k_{\text{app}}^{\text{RAF}}$$

where:

$$k_{\text{app}}^{\text{HT}} = k_{\text{app}}^{\text{R1}} + k_{\text{app}}^{\text{R2}} + k_{\text{app}}^{\text{R3}}$$

$$k_{\text{app}}^{\text{RAF}} = k_{\text{app}}^{\text{C2}} + k_{\text{app}}^{\text{C4}} + k_{\text{app}}^{\text{C5}} + k_{\text{app}}^{\text{C8}}$$

The rate constants for all the studied reactions were found to be larger in benzene solution than in aqueous solution as expected based on the values of the Gibbs free energies of activation. This means that the studied MET are better scavengers in nonpolar media than in aqueous solution. This finding can be explained based on the higher dipole moments (DM) of the reactant compared to the formed products. Using

Table 2. Apparent rate constants of the different channels, and overall rate coefficient ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), at 298 K.

	$\bullet\text{OH}$		$\bullet\text{OCH}_3$		$\bullet\text{OOH}$	
	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
PAR						
RAF						
C2	8.75E-02	7.52E-02				
C4	4.62E+07	3.54E+06	1.65E+01	3.01E+00		
C5	2.94E+09	1.94E+09				
C8	2.80E+09	2.56E+08	7.75E+04	4.63E+03	1.05E+00	4.18E-02
HT						
R1	1.13E+09	1.55E+06	1.50E+03	2.19E+02		
R3	1.72E+09	2.64E+06	5.45E+01	1.74E+00		
N3	7.67E+05	1.33E+02	2.89E+00	6.42E-03		
Overall	9.40E+09	2.20E+09	7.91E+04	4.85E+03	1.05E+00	4.18E-02
THB						
RAF						
C2	3.05E+00	4.92E-01	2.99E-08	4.52E-07		
C4	8.85E+07	5.81E+06				
C5	2.94E+09	1.97E+09				
C8	2.87E+09	4.02E+08	1.08E+05	4.25E+03	5.34E+01	2.76E-01
HT						
R2	1.34E+09	1.71E+06	2.05E+02	2.21E+01		
R3	1.53E+09	1.79E+06	1.59E+03	4.02E+01		
Overall	8.76E+09	2.38E+09	1.10E+05	4.31E+03	5.34E+01	2.76E-01
THP						
RAF						
C2	6.46E+00	1.98E+00				
C4	1.16E+08	1.47E+07	1.57E+01	2.90E+00		
C5	2.92E+09	1.91E+09				
C8	2.10E+09	1.34E+08	1.24E+04	5.82E+02	4.21E+00	3.86E-02
HT						
R1	1.03E+09	1.33E+06	6.93E+01	8.84E+00		
R2	9.30E+08	8.95E+05	2.55E+03	2.40E+02		
N7	3.33E+06	1.14E-02	3.49E+01	5.33E-04		
Overall	7.10E+09	2.07E+09	1.50E+04	8.34E+02	4.21E+00	3.86E-02
MXT						
RAF						
C2	2.13E-02	3.25E-02				
C4	6.41E+07	9.68E+06	2.30E+01	5.57E+00		
C5	2.92E+09	1.95E+09				
C8	1.75E+09	9.76E+07	6.97E+03	4.76E+02	2.57E+00	3.78E-02
HT						
R1	7.89E+08	1.32E+06	1.87E+00	5.35E-03		
N3	1.83E+06	4.17E+02	8.01E+02	1.19E+02		
N7	5.47E+05	5.63E-04	1.51E+02	3.33E-02		
Overall	5.53E+09	2.06E+09	7.95E+03	6.00E+02	2.57E+00	3.78E-02

as an example the RAF reactions of PAR on C8, which is the main channel of reaction, while DM (PAR) = 5.56 Debye, the DM values of the products are 2.68, 3.02, 2.61, and 3.21 Debye for $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OCH}_3$, $\bullet\text{OOH}$, and $\bullet\text{OOCH}_3$, respectively. Similar trends were found for all the studied MET. Therefore, regarding solvation effects, the direct reaction (products formation) is favored in nonpolar environments, while the reverse reaction is favored in polar environments.

PAR is predicted to react in nonpolar media about 4.3, 16.3, and 25.1 times faster than in aqueous solution, with $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OCH}_3$, and $\bullet\text{OOH}$, respectively (Table 2). For THB, these ratios were found to be equal to 3.5, 25.5, and 193.5; while they were found to be 3.4, 18.0, and 109.1 for THP; and 2.7, 13.3, and 68.0 for MXT. According to these values, the magnitude of the reactivity lessening with the polarity of the environment increases as the relative reactivity of the reacting radical decreases, with the largest reduction corresponding to the reactions with $\bullet\text{OOH}$.

The reactions of the studied MET with $\bullet\text{OH}$ were found to be diffusion-controlled ($k > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) in both media, supporting their excellent $\bullet\text{OH}$ scavenging activity, which is also the case of their precursor, CAF. The overall rate constants of the reactions with $\bullet\text{OCH}_3$ are considerably lower than those with $\bullet\text{OH}$, but still fast enough for scavenging this radical at significant rates. The best $\bullet\text{OCH}_3$ scavenger, among the studied compounds was found to be THB, while MXT is predicted to have the lowest activity. THB and PAR are predicted to react with this radical faster than CAF,^[13] whereas the reactions of THP and MXT are predicted to be slower. The lowest values of the rate constants systematically correspond to the reactions with $\bullet\text{OOH}$, in line with its relative low reactivity. Precisely because of its relative low reactivity the reactions with $\bullet\text{OOH}$ have been chosen to assess the relative reactivity of the studied compounds. If the reactions with more reactive radicals, such as $\bullet\text{OH}$, were used instead we might conclude that they all have similar reactivity, since the reactions with this radical often are diffusion-controlled.^[45,46] As such comparison might be misleading we prefer, and recommend, to use the less reactive of the studied radicals ($\bullet\text{OOH}$).

In nonpolar environments the peroxy radical scavenging activity of THB ($k = 53.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) was found to be higher than those of THP ($k = 4.21 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), MXT ($k = 2.57 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), and PAR ($k = 1.05 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). THB was also found to react 1.7 times faster with $\bullet\text{OOH}$ than its precursor CAF ($31.9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[13] On the contrary, THB is predicted to react with $\bullet\text{OOH}$ at significantly slower rates than other metabolite of caffeine, 1-methyluric acid ($1.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[48] Moreover, taking into account that the rate constants corresponding to the $\bullet\text{OOH}$ damage to unsaturated fatty acids are in the range $1.18\text{--}3.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,^[47] none of the caffeine's metabolites studied in this work is predicted to protect against the peroxy radical oxidation of lipids (and neither is their precursor CAF), while 1-methyluric acid is expected to have moderate but noticeable protective effects ($k = 1.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[48] These results are in line with those obtained by Lee^[10] from oxygen-radical absorbing capacity assays.

Based on the above discussed trends the free radical scavenging activity of CAF is not expected to decrease after being

metabolized. On the contrary, depending on the relative concentration of the formed metabolites it is expected to remain almost unaltered, or even increased due to the formation of 1-methyluric acid. In addition, even though in aqueous solution the peroxy radical scavenging activity of the analyzed compounds is significantly lower than in nonpolar media, the general trends concerning the relative efficiency of the studied compound remains almost the same. This indicates that their relative efficiency as free radical scavengers is not significantly influenced by the polarity of the environment.

The branching ratios (Γ) of the different channels of reactions between ROS and MET, in aqueous and benzene solutions, are reported in Table 3. They represent the percent contributions of the different channels to the overall reaction, and have been calculated as:

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

Table 3. Branching ratios (Γ) of the different channels of reaction, at 298.15 K.

	$\bullet\text{OH}$		$\bullet\text{OCH}_3$		$\bullet\text{OOH}$	
	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
PAR						
RAF						
C2	~0.00	~0.00				
C4	0.53	0.16	0.02	0.06		
C5	34.01	88.01				
C8	32.44	11.64	98.01	95.38	100.00	100.00
HAT						
R1	13.07	0.07	1.90	4.52		
R3	19.93	0.12	0.07	0.04		
N3	0.01	~0.00	~0.00	~0.00		
THB						
RAF						
C2	~0.00	~0.00	~0.00	~0.00		
C4	1.01	0.24				
C5	33.52	82.70				
C8	32.20	16.91	98.37	98.55	100.00	100.00
HAT						
R2	15.31	0.07	0.19	0.51		
R3	17.41	0.08	1.45	0.93		
THP						
RAF						
C2	~0.00	~0.00				
C4	1.63	0.71	0.10	0.35		
C5	41.12	92.67				
C8	29.57	6.51	82.25	69.84	100.00	100.00
HAT						
R1	14.53	0.06	0.46	1.06		
R2	13.09	0.04	16.96	28.15		
N7	0.05	~0.00	0.23	~0.00		
MXT						
RAF						
C2	~0.00	~0.00				
C4	1.16	0.47	0.29	0.93		
C5	52.82	94.73				
C8	31.72	4.74	87.71	79.27		
HAT						
R1	14.26	0.06	0.02	~0.00		
N3	0.03	~0.00	10.08	19.80		
N7	0.01	~0.00	1.91	0.01		

The contributions of the RAF mechanism to the overall reactivity of the studied MET toward free radicals were found to be larger than those attributed to the HT mechanism. Accordingly, it can be stated that this is the main mechanism involved in the antioxidant activity of these compounds. Moreover for reactions with peroxy radicals RAF is the only viable mechanism. Logically as the reactivity of the free radical increases so does the relative importance of the H transfer. Thus, while in benzene solution the contribution of HT to the overall reactions of PAR, THB, THP, and MXT with $\bullet\text{OCH}_3$ are 19.7, 1.64, 17.65, and 12.01%, respectively; for their reactions with $\bullet\text{OH}$ the HT contributions are 33.01, 32.72, 27.67, and 14.30%.

Among the RAF channels of reaction, that contributing the most to the $\bullet\text{OOH}$ and $\bullet\text{OCH}_3$ radical scavenging of MET is that corresponding to additions to site C8, regardless of the polarity of the environment. Conversely, for the reactions in aqueous solution with $\bullet\text{OH}$, which is more reactive and thus less selective, the contributions of channels C8 and C5 in PAR and THB are very similar, whereas for the reactions with THP and MXT the addition to site C5 becomes the major channel of reaction. In nonpolar media this channel is the one contributing the most to the overall $\bullet\text{OH}$ scavenging activity of all the studied MET. In addition for the reactions with $\bullet\text{OH}$, the contributions of HT were found to be significantly reduced when the reactions take place in aqueous solution in all the studied cases. On the contrary, for the reactions of PAR and THB with $\bullet\text{OCH}_3$ the relative importance of HT is roughly the same in both media, while it is increased in aqueous solution for the reactions of this radical with THP and MXT.

Therefore, the polarity of the environment affect the overall reactivity of the studied compounds, but might also influence the relative importance of the different mechanisms and channels of reaction, depending on the free radical that they are reacting with.

Conclusions

The $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OCH}_3$, $\bullet\text{OOH}$, and $\bullet\text{OOCH}_3$ scavenging activity of caffeine's metabolites PAR, THB, THP, and MXT has been studied in polar and nonpolar environments. Three mechanisms of reaction were initially investigated SET, HT, and RAF. However, the SET mechanism has been ruled out as viable for the antioxidant activity of the studied compounds based on thermodynamical considerations.

The RAF mechanism has been identified as that contributing the most to the overall reactivity of these metabolites, regardless of the polarity of the environment. However, the contributions of the HT mechanism were found to be significant for the reactions of $\bullet\text{OH}$ with all of them in aqueous solution, and for the reactions of $\bullet\text{OCH}_3$ with THP and MXT both in polar and nonpolar media.

The rate constants for all the studied reactions were found to be larger in nonpolar media than in aqueous solution, which suggests that the scavenging activity of the studied metabolites decreases as the polarity of the environment increases. Conversely, it does not alter the order of reactivity, which was found to be $\text{THB} > \text{PAR} \approx \text{THP} \approx \text{MXT}$.

In general, the polarity of the environment was found to affect the overall reactivity of the studied compounds, to influence the relative importance of the different mechanisms and channels of reaction, and to have negligible effects on the relative scavenging activity of the studied compounds.

The four metabolites were found to be excellent $\bullet\text{OH}$ scavengers, which is also the case of their precursor, caffeine, with overall rate constants within the diffusion-control regime ($k > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) in both media. Their $\bullet\text{OCH}_3$ scavenging activity was found to be moderate. In this case, THB and PAR are predicted to react faster than caffeine, while the reactions of THP and MXT are predicted to be slower. On the contrary, none of the caffeine's metabolites studied in this work is predicted to have significant peroxy radical scavenging activity, which is also the case of their precursor caffeine. However, other metabolite, 1-methyluric acid, is expected to have moderate but noticeable protective effects against these radicals.


Accordingly, the protective effects of caffeine are not expected to decrease after being metabolized. On the contrary, depending on the relative concentration of the formed metabolites it is expected to remain almost unaltered, or even increased.

Acknowledgments

The authors thank Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo at UAM - Iztapalapa for the access to its computer facilities and projects SEP-CONACyT 167491 and 167430 for financial support. J. R. L.-C. acknowledges CONACyT for Doctoral fellowship.

Keywords: antioxidant · reactive oxygen species · mechanism · kinetics · branching ratios

How to cite this article: J. R. León-Carmona, A. Galano, *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, DOI: 10.1002/qua.24084

 Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

- [1] (a) O. M. Panasenko, T. V. Nova, O. A. Azizova, Y. A. Vladimirov, *Free Radical Bio. Med.* **1991**, *10*, 137; (b) D. R. Janero, *Free Radic. Bio. Med.* **1991**, *11*, 129; (c) H. N. Hodis, W. J. Mack, L. LaBree, L. Cashin-Hemphill, A. Sevanian, R. Johnson, S. Azen, *J. Am. Med. Assoc.* **1995**, *273*, 1849.
- [2] (a) K. Hensley, J. M. Carney, M. P. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J. F. Wu, R. A. Floyd, D. A. Butterfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3270; (b) D. S. Fay, A. Fluet, C. J. Johnson, C. D. Link, *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 1616; (c) D. A. Butterfield, *Free Radic. Res.* **2002**, *36*, 1307.
- [3] (a) P. Knekt, A. Reunanen, H. Takkunen, A. Aromaa, M. Heliövaara, T. Hakuunen, *Int. J. Cancer* **1994**, *56*, 379; (b) M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, *39*, 44; (c) B. Halliwell, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1147.
- [4] (a) R. A. Riemersma, D. A. Wood, C. C. Macintyre, R. A. Elton, K. F. Gey, M. F. Oliver, *Lancet* **1991**, *337*, 1; (b) D. A. Street, G. Comstock, R. Salkeldy, M. Klag, *Circulation*, **1994**, *90*, 1154; (c) N. G. Stephens, A. Parsons, P. M. Schofield, F. Kelly, K. Cheesman, M. J. Mitchinson, M. J. Brown, *Lancet* **1996**, *347*, 781.
- [5] (a) H. Hamer, *J. Hum. Hypertens.* **2006**, *20*, 909; (b) S. R. Taylor, B. Demmig-Adams, *Nutr. Food Sci.* **2007**, *37*, 406.

- [6] (a) M. C. Nicoli, M. Anese, L. Manzocco, C. R. Lerici, *Food Sci. Technol.* **1997**, *30*, 292; (b) N. Pellegrini, M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, F. Brighenti, *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2812; (c) M. D. Del Castillo, M. H. Gordon, J. M. Ames, *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *221*, 471; (d) P. Parras, M. Martínez-Tome, A. M. Jimenez, M. A. Murcia, *Food Chem.* **2007**, *102*, 582; (e) I. Lopez-Galilea, M. Paz de Peña, C. Cid, *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 141; (f) V. Brezova, A. Slebo-dova, A. Stasko, *Food Chem.* **2009**, *114*, 859; (g) J. A. Vignoli, D. G. Bassoli, M. T. Benassi, *Food Chem.* **2011**, *124*, 863.
- [7] S. Nafisi, F. Manouchehri, H.-A. Tajmir-Riahi, M. Varavipour, *J. Mol. Struct.* **2008**, *875*, 392.
- [8] H. M. Crews, L. Olivier, L. A. Wilson *Food Addit. Contam.* **2001**, *18*, 1075.
- [9] R. H. Standler, L. B. Fay, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1332.
- [10] C. Lee, *Clin. Chim. Acta* **2000**, *295*, 141.
- [11] J. A. Gomez-Ruiz, D. S. Leake, J. M. James, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6962.
- [12] L. Geraets, H. J. J. Moonen, E. F. M. Wouters, A. Bast, G. J. Hageman, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 902.
- [13] J. R. León-Carmona, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4538.
- [14] A. Galano, R. Alvarez-Diduk, M. T. Ramirez-Silva, G. Alarcón-Ángeles, A. Rojas-Hernández, *Chem. Phys.* **2009**, *363*, 13.
- [15] A. Galano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 7147.
- [16] A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, M. Francisco-Márquez, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 13101.
- [17] Y. Zhao, N. E. Schultz, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364.
- [18] E. Velez, J. Quijano, R. Notario, Pabón, E, J. Murillo, J. Leal, E. Zapata, G. Alarcón, *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 971.
- [19] A. Vega-Rodríguez, J. R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7649.
- [20] G. Black, J. M. Simmie, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1236.
- [21] T. Furuncuoğlu, I. Ugur, I. Degirmenci, V. Aviyente, *Macromolecules* **2010**, *43*, 1823.
- [22] T. Gao, J. M. Andino, J. R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 9830.
- [23] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazayev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, Al-M. A. Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. Gill, W. B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian 03, Revision E.01; Gaussian: Wallingford CT, **2004**.
- [24] E. Cancès, B. Mennucci, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032.
- [25] B. Mennucci, E. Cancès, J. Tomasi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10506.
- [26] J. Tomasi, B. Mennucci, E. Cancès. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1999**, *464*, 211.
- [27] M. Belcastro, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, *Theor. Chem. Acc.* **2006**, *115*, 361.
- [28] M. Leopoldini, N. Russo, S. Chiodo, M. Toscano. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6343.
- [29] M. Leopoldini, F. Rondinelli, N. Russo, M. Toscano, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8862.
- [30] A. Martínez, R. Vargas, A. Galano, *Theor. Chem. Acc.* **2010**, *127*, 595.
- [31] S. G. Chiodo, M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 7662.
- [32] A. Pérez-González, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1306.
- [33] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, *Food Chem.* **2011**, *125*, 288.
- [34] Y. Okuno, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 210.
- [35] S. W. Benson. In *The Foundations of Chemical Kinetics*; McGraw-Hill: New York, **1960**; Chapter XV, p. 504.
- [36] H. Eyring, *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107.
- [37] M. G. Evans, M. Polanyi, *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 875.
- [38] D. G. Truhlar, W. L. Hase, J. T. Hynes, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664.
- [39] D. G. Truhlar, A. Kuppermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1840.
- [40] F. C. Collins, G. E. Kimball, *J. Colloid Sci.* **1949**, *4*, 425.
- [41] M. Smoluchowski, *Z. Phys. Chem.* **1917**, *92*, 129.
- [42] D. G. Truhlar, *J. Chem. Educ.* **1985**, *62*, 104.
- [43] (a) A. Einstein, *Ann. Phys. (Leipzig)* **1905**, *17*, 549; (b) G. G. Stokes, *InMathematical and Physical Papers*; Cambridge University Press: Cambridge, **1903**, Vol. 3; p. 55.
- [44] W. A. Pryor, *Free Rad. Biol. Med.* **1988**, *4*, 219.
- [45] R. C. Rose, A. M. Bode, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1135.
- [46] A. Galano, D. X. Tan, R. J. Reiter, *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 1.
- [47] A. D. N. de Grey, *J. DNA Cell. Biol.* **2002**, *21*, 251.
- [48] J. R. Leon-Carmona, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 15430.

Received: 24 January 2012
 Revised: 13 February 2012
 Accepted: 15 February 2012
 Published online on Wiley Online Library

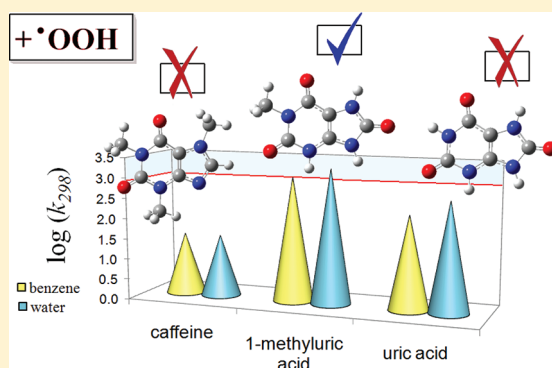
Uric and 1-Methyluric Acids: Metabolic Wastes or Antiradical Protectors?

Jorge Rafael León-Carmona and Annia Galano*

Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco No. 186, Colonia Vicentina C.P. 09340, México D.F.

S Supporting Information

ABSTRACT: The reactions of uric and 1-methyluric acids in nonpolar environments, as well as those of the corresponding urate anions in aqueous solution, with $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, $\cdot\text{OOH}$, and $\cdot\text{OOCH}_3$ have been studied using the density functional theory. Different mechanisms of reactions have been taken into account, and their relative importance on the antiradical activity of these compounds is analyzed. Both uric and methyluric acids are better scavengers in aqueous solution than in nonpolar media, which indicates that the urate anions are the most active species. The free radical scavenging activity of the studied compounds was found to be excellent for $\cdot\text{OH}$, and very good for $\cdot\text{OCH}_3$. In addition, 1-methyluric acid is predicted to moderately protect against peroxy oxidation, while the protective effects of uric acid against these particular species are not expected to be significant. In addition, 1-methyluric acid was found to be a better radical scavenger than its precursor, caffeine, suggesting that the antiradical activity of the latter might be explained by the action of its metabolites, rather than by its direct activity.

that is particularly abundant in humans. The mutation of the uricase gene during human evolution resulted in an average plasma urate concentration that is higher than that in most of the other mammals (~0.3 mM).¹⁰ This has led to the hypothesis that this evolutionary strategy represents a counteracting action against the damaging effects of OS, and that urate has an important role as antioxidant in humans.^{11–14}

INTRODUCTION

At high concentrations, free radicals are harmful to living organisms. Such high concentrations are caused by the imbalance between the production and the consumption of free radicals, which is commonly referred to as oxidative stress (OS). This chemical stress has attracted great deal of attention in the last decades due to the increasing evidence supporting its role in the development of a large number of health disorders such as cancer,¹ cardiovascular disorders,² atherosclerosis,³ and Alzheimer's disease.⁴ Since OS frequently involves reactions between biological molecules and free radicals, the study of compounds with free radical scavenging activity becomes an important area of research aiming to prevent OS and the consequent molecular damage.

Uric acid (HUA) is one of the major degradation products of DNA purines present in blood plasma and has many physiological functions in living organisms.⁵ Several isomers of monomethylated HUA are also found in physiologic media, arising from the metabolism of the purines caffeine, theobromine, and theophylline.^{6,7} Moreover, based on the relatively high amount of caffeine in coffee, significant amounts of its metabolites are anticipated in blood and might be involved in the physiological effects related to coffee.⁸ In particular, 1-methyluric acid (HMUA) is one of the main metabolic products of caffeine in humans, and has been reported to present antioxidant activity.⁹ It was found to be particularly effective in inhibiting human low-density lipoprotein oxidative modification.⁸ Its protective effect has been reported to be equivalent to that of HUA.⁹ HUA is an intriguing compound

that is particularly abundant in humans. The mutation of the uricase gene during human evolution resulted in an average plasma urate concentration that is higher than that in most of the other mammals (~0.3 mM).¹⁰ This has led to the hypothesis that this evolutionary strategy represents a counteracting action against the damaging effects of OS, and that urate has an important role as antioxidant in humans.^{11–14}

According to their pK_a values (Figure 1) at $\text{pH} = 7.4$, the dominant forms of HUA and HMUA are expected to be the corresponding monoanions, UA^- and MUA^- . Therefore, while in lipid media their neutral forms should prevail, in the aqueous phase under physiological conditions, the urate anions are supposed to be the relevant species to the antiradical activity of these compounds.

Meadows and Smith¹⁷ demonstrated that, among purines and pyrimidines, HUA shows the greatest susceptibility to ozone-induced degradation. It has also been demonstrated that this compound protects unsaturated fatty acids from air oxidation,^{18,19} and oxyhemoglobin from sodium nitrite oxidation.²⁰ It has been reported that HUA is able to scavenge single oxygen,^{12,21} peroxynitrite,²² and hydroxyl²³ radicals. It has also been demonstrated that both urate and methylurates inhibit lipid peroxidation induced by ozone,²⁴ hydrogen peroxide,¹⁹ and other radical initiators.^{25,26} HUA has been recently reported to be more

Received: October 11, 2011

Revised: November 17, 2011

Published: November 18, 2011

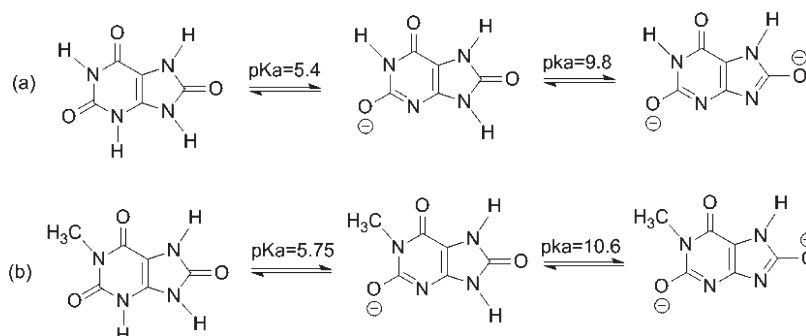


Figure 1. Acid dissociations and pK_a 's of (a) HUA and (b) HMUA. (a) Values from ref 15; (b) values from ref 16.

efficient as a NO radical scavenger than caffeic acid, trolox, genistein, glutathione, and *N*-acetylcysteine.²⁷ In addition, based on the rate of the reaction between HUA and the guanyl radical, Simic and Jovanovic¹⁵ proposed that HUA may also repair oxidative-damaged DNA bases. Differing from these reports, Hershfield et al.²⁸ concluded that urate is not a major factor controlling OS in vivo.

In addition, concentration is a key factor regarding the beneficial effects of HUA. Peden et al.²⁹ showed that HUA has antioxidant activity at concentrations larger than $1.5 \mu\text{M}$, which is significantly below its concentration in human plasma. On the other hand, it has been demonstrated that excessive amounts of HUA in the blood plasma (hyperuricemia) cause gout³⁰ and induces OS in adipocytes.³¹ Moreover hyperuricemia is considered a strong predictor of mortality in women,³² elder persons,³³ and those with cardiovascular diseases.³⁴ In line with this evidence, and with the potential beneficial effects of HUA as free radical scavenger, Ruggiero et al.³⁵ have recently demonstrated that people with intermediate levels of HUA ($0.29\text{--}0.32 \text{ mM}$) have a better physical performance than those with higher or lower levels.

Regarding the reaction mechanism involved in the free radical scavenging activity of HUA and HMUA, the available information is rather scarce. Maples and Mason³⁶ detected the urate free radical using electron spin resonance, and located the unpaired electron on the five-membered ring, based on ¹⁵N isotopic experiments. Simic and Jovanovic¹⁵ proposed that the peroxy free radical scavenging activity of HUA takes place by electron transfer. More recently, Telo³⁷ proposed that HUA and its methyl derivatives react with primary oxidizing radicals by hydrogen abstraction from an NH group. In addition, Allen et al.³⁸ used density functional theory calculations and, based on relative energy considerations, proposed that the radical products most likely to be formed by H transfers are those involving sites 9 and 3 of HUA, and site 7 for UA^- . These authors also proposed that the monoanion corresponds to deprotonation of site N3, and the dianion to deprotonations of sites N3 and N9. The numbering of the reaction sites are shown in Figure 2.

According to the information gathered so far, and discussed above, it seems that the antiradical activity of HUA and HMUA deserves further studies since there still are several related open questions. For example, (a) Are the anions in aqueous phase actually more active? (b) Are the neutral forms also active as antiradicals in the lipid phase? (c) How efficient these species actually are for scavenging free radicals of different nature? (d) Which is the preponderant mechanism of reaction involved in their antiradical activity? (e) Does the preponderant mechanism



Figure 2. Site numbers. HUA: $\text{R}=\text{H}$; and HMUA: $\text{R}=\text{CH}_3$.

change depending on the polarity of the media and on the nature of the reacting radical? Therefore this work presents a systematic study on the reactions of HUA and HMUA with $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, $\cdot\text{OOH}$, and $\cdot\text{OOCH}_3$ radicals, in aqueous solution and in nonpolar environments. The rate constants have been estimated and the contributions of different mechanisms and sites of reaction to the overall radical scavenging activity of these compounds are provided.

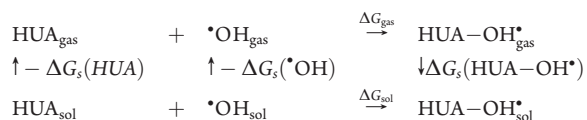
COMPUTATIONAL DETAILS

Geometry optimizations and frequency calculations have been carried out using the M05-2X functional and the 6-31+G(d,p) basis set. The electronic energies were improved by single point calculations using the 6-311++G(d,p) basis set. The M05-2X functional has been recommended for kinetic calculations by their developers,³⁹ and it has been also successfully used to that purpose by independent authors.^{40–46}

Unrestricted calculations were used for open shell systems and local minima and transition states were identified by the number of imaginary frequencies (NIMAG = 0 or 1, respectively). Intrinsic reaction coordinate (IRC) calculations have been performed to confirm that the transition states properly connect reactants and products. All the electronic calculations were performed with the Gaussian 03 package of programs.⁴⁷ Thermodynamic corrections at 298.15 K were included in the calculation of relative energies. They were calculated using the harmonic oscillator/rigid rotator approximation, as implemented in Gaussian 03. The stationary points were first modeled in gas phase (vacuum), and solvent effects were included *a posteriori* by single-point calculations using polarizable continuum model, specifically the integral-equation-formalism (IEF-PCM)⁴⁸ with RADII = UAOKS, at the M05-2X/6-311++G(d,p) level of theory. They have been performed using benzene and water as solvents, to mimic nonpolar and polar environments, respectively. This approach has been successfully used before for describing radical–molecule reactions in solution involved in the free radical scavenging activity of different compound.^{49–55} Moreover, it was demonstrated for a very similar system (caffeine) that the geometries, energies, and rate constants obtained with this

methodology are very similar to those obtained when geometry optimizations are performed in solution.⁵⁶

Relative Gibbs free energies in solution have been computed using thermodynamic cycles and the Hess law, explicitly including solvation free energies. For example, for $\cdot\text{OH}$ additions to HUA,



Within this strategy the Gibbs free energies of reaction in solution (ΔG_{sol}) can be obtained as the sum of the Gibbs free energy of reaction in vacuum (ΔG_{gas}) and the difference in the solvation free energies ($\Delta\Delta G_{\text{S}}$):

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{gas}} + \Delta\Delta G_{\text{S}} \quad (1)$$

where $\Delta\Delta G_{\text{S}}$ is calculated as

$$\Delta\Delta G_{\text{S}} = \Delta G_{\text{S}}(\text{HUA-OH}^*) - \Delta G_{\text{S}}(\text{HUA}) - \Delta G_{\text{S}}(\cdot\text{OH}) \quad (2)$$

with ΔG_{S} representing the free energies of solvation. In all the cases the reference state is 1 M. The solvent cage effects have been included according to the corrections proposed by Okuno,⁵⁷ taking into account the free volume theory.⁵⁸ These corrections are in good agreement with those independently obtained by Ardura et al.⁵⁹ and have been successfully used before.⁶⁰

The rate constants (k) were calculated using conventional transition state theory (TST)⁶¹ and 1 M standard state as

$$k = \sigma \kappa \frac{k_{\text{B}} T}{h} e^{-(\Delta G^{\ddagger})/RT} \quad (3)$$

where k_{B} and h are the Boltzmann and Planck constants, ΔG^{\ddagger} is the Gibbs free energy of activation, σ represents the reaction path degeneracy, accounting for the number of equivalent reaction paths, and κ accounts for tunneling corrections. The latter, which are defined as the Boltzmann average of the ratio of the quantum and the classical probabilities, were calculated using the zero curvature tunneling corrections (ZCT).⁶²

Some of the calculated rate constants (k) were found to be close to, or within, the diffusion-limited control. Accordingly, the apparent rate constant (k_{app}) cannot be directly obtained from TST calculations. In the present work we have used the Collins–Kimball theory to that purpose:⁶³

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

where k_{act} is the thermal rate constant, obtained from TST calculations (eq 3), and k_{D} is the steady-state Smoluchowski⁶⁴ rate constant for an irreversible bimolecular diffusion-controlled reaction:

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

where R denotes the reaction distance, N_{A} is the Avogadro number, and D_{AB} is the mutual diffusion coefficient of the reactants A (radical) and B (scavenger). D_{AB} has been calculated from D_{A} and D_{B} according to ref 65, and D_{A} and D_{B} have been

estimated from the Stokes–Einstein approach:⁶⁶

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

where k_{B} is the Boltzmann constant; T is the temperature; η denotes the viscosity of the solvent, in our case water ($\eta = 8.91 \times 10^{-4}$ Pa s) and benzene ($\eta = 6.04 \times 10^{-4}$ Pa s); and a is the radius of the solute.

RESULTS AND DISCUSSION

Seventy-four different tautomers have been recently identified for HUA.⁶⁷ In this thorough investigation Raczynska et al. found that the tetra-NH species is the lowest in energy, using different levels of theory. At the most accurate one, G2(MP2), this tautomer was found to be 2.7 kcal/mol lower in energy than the following species. This means that the tetra-NH tautomer accounts for more than 98.9% of the total population of HUA. On the basis of these results, this is the only neutral tautomer considered in the present work.

In addition, based on their pK_{a} values, the monoanionic form is the one relevant for estimating the free radical scavenging activity of the studied acids, in aqueous solution, under physiological conditions. According to the molar fractions, at physiological pH (7.4) the monoanions represent 98.62% and 97.75% of HUA and HMUA, respectively (Figure 1S, Supporting Information). Therefore, in this work, the monoanions are the species considered for the study in aqueous solution. On the other hand, nonpolar environments do not promote enough solvation of the ionic species. Moreover, according to our calculations, the deprotonation of HUA in benzene solution requires ~ 80 kcal/mol more than the same process in aqueous solution, which means that in such media the deprotonation of this compound is negligible. Consequently, the neutral forms have been used for the study in nonpolar environments. Accordingly, the overall reactions with different free radicals ($\cdot\text{R}=\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, $\cdot\text{OOH}$, and $\cdot\text{OOCH}_3$) for both HUA and HMUA studied in this work are



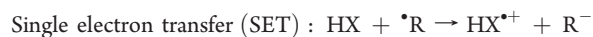
and



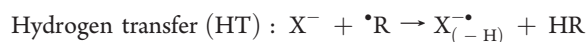
We have estimated the relative energies of the monoanions formed by deprotonation from sites N1, N3, N7, and N9 and found that the most stable one is that arising by deprotonation from site N3. Their relative energies, for HUA in aqueous solution, were found to be N1 (8.81 kcal/mol), N3 (0.00 kcal/mol), N7 (7.90 kcal/mol), and N9 (1.06 kcal/mol). As suggested by one of the Reviewers, the energy difference between N3 and N9 has been recomputed at the G2MP2 level to check the energy difference, which is the smallest one. It was found that at this level the energy difference is even larger, 1.7 kcal/mol. These results are in agreement with the proposal by Allen et al.³⁸ and Kahn et al.⁶⁸ that the monoanion corresponds to the species deprotonated at site N3. Accordingly, this is the one used in this work.

The free radical scavenging activity of the studied compounds (HX, with X = UA and MUA) can take place through different mechanisms, as it is also the case for many other compounds.^{49–51,53–56} Those considered in this work are

For the reaction involving the neutral species, in lipid medium (I):



For the reaction involving the monoanions, in aqueous solution (II):



The Gibbs free energies of reaction (ΔG) corresponding to all the studied paths are reported in Table 1. Even though RAF process on sites 1 to 9 were initially considered, any attempt to obtain the addition products on nitrogen sites (1, 3, 7, and 9) invariably led to structures that correspond to weak-bonded complexes rather than to proper radical adducts. Therefore these channels have been ruled out for yielding viable products of reaction.

As the values in Table 1 show, for the SET mechanism only the reactions with the hydroxyl radical, in aqueous solution, were found to be exergonic. In nonpolar environments, the endergonicity was found to be higher than 75 kcal/mol for the reactions of both scavengers with all the studied radicals. This is a logical result since only polar environments promote enough solvation for the ionic species formed via SET. In addition the electron-donor capability of the anions (UA^{-} and MUA^{-}) is higher than those of the parent protonated species. The finding that electron transfers to the OH radical are the only ones that were found to be exergonic can be explained based on the higher electrophilicity of this radical, compared to the other three.

Regarding the RAF mechanism in nonpolar environments (I), additions to C2 were found to be significantly endergonic for all the scavenger-radical pairs studied in the present work. The additions of $\cdot\text{OH}$ to the other RAF sites were found to be exergonic. However, the exergonicity of channel C6 is small, and therefore it is expected to be reversible for both HUA and HMUA. For the RAF reactions involving $\cdot\text{OCH}_3$, this particular channel becomes endergonic, while additions to sites C4, C5, and C8 remain thermochemically feasible. For the additions of $\cdot\text{OOH}$, only one channel was found to be exergonic, that involving site C4, which is also the channel with the largest exergonicity for the reactions with $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{OCH}_3$. The addition of $\cdot\text{OOH}$ to C4 was found to be slightly more favored for HUA than for HMUA. In the case of the RAF reactions involving $\cdot\text{OOCH}_3$, all the channels were found to be endergonic. Therefore for peroxy radicals, other than $\cdot\text{OOH}$, this mechanism is not expected to contribute to the overall reactivity of HUA and HMUA, in nonpolar environments.

When the RAF processes takes place in aqueous solution (II), channel C2 becomes viable for the reaction with $\cdot\text{OH}$, but remains unfeasible for the other, less reactive, free radicals. For the RAF reactions with $\cdot\text{OCH}_3$, channel C8 was found to be exergonic for both UA^{-} and MUA^{-} , while channel C4 is only viable for the

Table 1. Gibbs Free Energies of Reaction (ΔG , kcal/mol) at 298.15 K

	$\cdot\text{OH}$		$\cdot\text{OCH}_3$		$\cdot\text{OOH}$		$\cdot\text{OOCH}_3$	
	(I) ^a	(II) ^a	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
HUA								
SET	80.29	-14.72	93.17	6.34	101.97	16.58	103.97	19.40
RAF								
C2	10.96	-7.24	26.03	7.62	43.46	22.94	45.89	24.03
C4	-30.35	-12.64	-17.44	0.71	-2.16	16.27	0.41	17.90
C5	-20.13	-12.32	-5.10	1.58	9.53	18.91	12.39	17.87
C6	-1.71	-10.82	14.01	4.11	32.00	18.94	32.52	21.11
C8	-28.96	-16.55	-16.82	-2.05	15.89	12.68	20.80	15.87
HT								
N1	-11.62	-24.61	3.48	-11.26	20.77	5.69	22.32	6.24
N3	-34.63		-19.52		-2.24		-0.68	
N7	-29.37	-37.50	-14.27	-24.15	3.02	-7.20	4.58	-6.65
N9	-35.02	-33.26	-19.92	-19.92	-2.63	-2.96	-1.08	-2.42
HMUA								
SET	78.04	-16.66	90.92	4.40	99.73	14.64	101.73	17.46
RAF								
C2	10.94	-8.55	26.63	6.72	20.17	18.38	12.00	22.91
C4	-30.72	-13.79	-17.17	-1.34	-1.76	16.26	0.58	16.56
C5	-20.33	-12.95	-5.21	0.89	8.57	15.31	11.33	16.86
C6	-1.08	-11.59	14.90	3.89	31.40	18.89	35.08	21.43
C8	-24.59	-16.66	-10.27	-3.90	17.16	11.37	20.45	11.28
HT								
C1a	-21.61	-24.31	-6.51	-10.97	10.78	5.99	12.33	6.53
N3	-34.86		-19.75		-2.47		-0.91	
N7	-29.68	-38.14	-14.58	-24.80	2.71	-7.84	4.27	-7.30
N9	-35.41	-33.91	-20.31	-20.56	-3.02	-3.61	-1.47	-3.06

^a (I) lipid phase, modeled using benzene; (II) aqueous phase.

latter. The rest of the addition channels were found to be endergonic. In addition, for both peroxy radicals all the RAF channels are endergonic. This suggests that the neutral form of the studied acids is more reactive than the anionic one through the RAF mechanism.

The H transfer mechanism was found to be the most favored from a thermochemical point of view. It has the largest exergonicities and presents viable channels of reaction with all the studied free radicals. For the HT reactions involving $\cdot\text{OH}$, all the reaction channels were found to be considerably exergonic for both scavengers, regardless of the polarity of the environment, and therefore of the reacting form (neutral or anion). For the reactions with $\cdot\text{OCH}_3$, the only HT channel that is predicted to be endergonic is that involving site N1 in HUA. For the reactions of $\cdot\text{OOH}$, those channels involving H transfers from sites N3 and N9 in HUA and HMUA were found to be exergonic. The HT processes from sites N7 and N9 in UA^{-} and MUA^{-} were also predicted to be thermochemically viable. For the reactions of $\cdot\text{OOCH}_3$, HT is the only mechanism that was found to be feasible. The viable channels are the same than those previously described for the reactions with $\cdot\text{OOH}$. Moreover, the exergonicity is slightly increased for the reactions of $\cdot\text{OOCH}_3$, compared to $\cdot\text{OOH}$. This strongly suggests that the overall reactivity of HUA and HMUA toward peroxy radicals takes place via HT. On the contrary,

Table 2. Apparent Rate Constants of the Different Channels, and Overall Rate Coefficient ($M^{-1} s^{-1}$) at 298 K

	$\cdot OH$		$\cdot OCH_3$		$\cdot OOH$		$\cdot OOCH_3$	
	(I) [*]	(II) [*]	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
	HUA							
SET		7.47×10^9		1.27×10^8				
RAF								
C2		2.02×10^9						
C4	3.00×10^9	2.04×10^9	4.07×10^5		1.26×10^2			
C5	2.92×10^9	2.04×10^9	1.10×10^6					
C6	3.77×10^7	2.04×10^9						
C8	6.26×10^3	2.04×10^9	1.82×10^{-4}	8.19×10^2				
HT								
N1	4.98×10^2	7.20×10^{-1}		3.32×10^6				
N3	2.20×10^8		2.75×10^5		2.29×10^{-1}		3.39×10^{-1}	
N7	1.43×10^8	3.28×10^5	2.41×10^4	1.01×10^3		4.14×10^{-1}		9.88×10^{-4}
N9	3.06×10^7	$\approx 3.28 \times 10^5$	2.73×10^4	1.70×10^{-2}	5.86×10^1	4.43×10^2	4.00×10^1	1.43×10^3
overall	6.35×10^9	1.76×10^{10}	1.84×10^6	1.30×10^8	1.85×10^2	4.43×10^2	4.03×10^1	1.43×10^3
	HMUA							
SET		7.79×10^9		1.14×10^8				
RAF								
C2		2.04×10^9						
C4	3.00×10^9	2.04×10^9	6.79×10^5	8.63×10^4	1.00×10^3			
C5	2.95×10^9	2.04×10^9	1.24×10^6					
C6	7.46×10^7	2.04×10^9						
C8	1.43×10^4	2.04×10^9	1.00×10^{-2}	5.93×10^3				
HT								
C1a	3.71×10^8	1.97×10^7	2.40×10^3	1.65×10^2				
N3	5.67×10^8		2.50×10^5		4.58×10^{-1}		7.15×10^{-1}	
N7	3.33×10^8	3.45×10^6	2.02×10^4	5.52×10^4		3.16×10^0		5.91×10^{-3}
N9	6.36×10^7	$\approx 3.45 \times 10^6$	4.05×10^4	1.73×10^{-3}	7.82×10^1	1.82×10^3	2.22×10^{-1}	2.11×10^4
overall	7.92×10^9	1.80×10^{10}	2.23×10^6	1.14×10^8	1.08×10^3	1.83×10^3	9.37×10^{-1}	2.11×10^4

^{*} (I) lipid phase, modeled using benzene; (II) aqueous phase.

caffeine is unable to react with $\cdot OOH$ and $\cdot OOCH_3$ by H transfer.⁵⁶ Since peroxy radicals have a relative low reactivity, this suggests that the less methylated analogs of caffeine are more reactive than the parent compound toward free radicals.

The Gibbs free energies of activation (ΔG^\ddagger) of the channels of reaction that were found to be exergonic are reported in Table 1S. Those described above as endergonic are not longer considered in the present work, since even if they take place at a significant rate, they would be reversible and therefore the formed products will not be observed. However, it should be noticed that they might still represent significant channels if their products rapidly react with other species with enough exergonicity and at high enough rates. Since this is expected to be the case for the SET products, the kinetic calculations of the SET channels with low endergonicity have also been performed. In addition we were unable to locate the transition states (TS) corresponding to HT from site N9 in UA^- and MUA^- to the OH radical. However, taking into account the similarity in ΔG for channels N7 and N9 in aqueous solution, together with the similarity in ΔG^\ddagger for channels N7 and N9 in benzene solution, the barriers and the rate constants of HT from N9 in UA^- and MUA^- are expected to be very similar of those corresponding to HT from site N7. Accordingly, we have used them as

approximated estimations for site N9, in the particular case of the reaction with $\cdot OH$ in aqueous solution. Even though this can be considered as a rough approximation, it is not expected to affect the main conclusions of the present work since the HT mechanism has only minor contributions to the overall reactivity of the studied compounds toward $\cdot OH$.

In aqueous solution, where the reactions involve the urate anions, the additions to sites C4, C5, C6 and C8 were found to be barrierless, or close, as well as the SET process from MUA^- to $\cdot OH$ (Table 1S, Supporting Information). Accordingly all of these processes are expected to be diffusion-controlled. In general, the RAF channels have lower barriers in aqueous solution than in nonpolar environments. On the contrary, the barriers of the HT channels increase with the polarity of the surroundings for the reactions with $\cdot OH$ and $\cdot OCH_3$, while they decrease for the reactions with peroxy radicals. The optimized geometries of the transition states are provided as Supporting Information (Figures 2S to 17S). The TS structures corresponding to the RAF channel at site C5 for the reactions of UA^- and MUA^- with $\cdot OH$ are not reported because according to the minimum energy potential surface they do not exist (Figures 18S and 19S, Supporting Information), i.e. they are strictly barrierless reactions.

The rate constants for the different channels of reaction, in aqueous and benzene solutions, are reported in Table 2, together with the overall rate coefficients, which have been calculated as the sum of the rate constants of each channel. For example, for the $\text{UA}^- + \cdot\text{OH}$ reaction, in aqueous solution:

$$k_{\text{overall}} = k_{\text{app}}^{\text{SET}} + k_{\text{app}}^{\text{HT}} + k_{\text{app}}^{\text{RAF}}$$

where:

$$k_{\text{app}}^{\text{HT}} = k_{\text{app}}^{\text{N1}} + k_{\text{app}}^{\text{N7}} + k_{\text{app}}^{\text{N9}}$$

$$k_{\text{app}}^{\text{RAF}} = k_{\text{app}}^{\text{C2}} + k_{\text{app}}^{\text{C4}} + k_{\text{app}}^{\text{C5}} + k_{\text{app}}^{\text{C6}} + k_{\text{app}}^{\text{C8}}$$

According to our results, both HUA and HMUA are better scavengers in aqueous solution than in nonpolar media, suggesting that the urate anions are the most active species. HUA is predicted to react in aqueous solution about 2.8, 70.8, 2.4, and 35.5 times faster than in nonpolar media, with $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, $\cdot\text{OOH}$, and $\cdot\text{OOCH}_3$, respectively (Table 2). For HMUA, these ratios were found to be equal to 2.3, 51.0, 1.7, and 2.2×10^4 . The reactivity of the urate anions toward the OH radical was found to be diffusion-controlled in both media, supporting their excellent $\cdot\text{OH}$ scavenging activity. The overall rate constants of the reactions with $\cdot\text{OCH}_3$ are lower than those with $\cdot\text{OH}$, but they are still very fast. The rate constants of the reactions with the peroxy radicals are significantly lower, as expected based on their lower reactivity.

The efficiency of the studied compounds as free radical scavengers relative to that of other compounds has also been analyzed. In nonpolar environments, the peroxy radical scavenging activity of HMUA was found to be lower than that of carotenes ($\sim 10^5\text{--}10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁶⁹ canolol ($6.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁷⁰ and sinapinic acid ($1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁷¹ On the other hand it was found to be higher than that of melatonin ($3.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁷² caffeine ($3.2 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁵⁶ and HUA ($1.85 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, this work). Moreover, taking into account that the rate constants corresponding to the $\cdot\text{OOH}$ damage to unsaturated fatty acids are in the range $1.18\text{--}3.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,⁷³ HMUA is predicted to moderately protect against peroxy oxidation of lipids, while the protective effects of HUA are not expected to be significant.

In aqueous solution the peroxy radical scavenging activity of MUA^- was found to be higher than that of caffeine ($3.3 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁵⁶ melatonin ($2.0 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁷² and UA^- ($4.4 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, this work); and similar to that of allicin ($7.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁷⁴ On the contrary, it was found to be lower than that of carotenes ($\sim 10^4\text{--}10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁶⁹ canolol ($2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁷⁰ and sinapinic acid ($5.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$);⁷¹ and significantly lower than that of 2-propenesulfenic acid ($2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁷⁴ and glutathione ($2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁷⁵ which are excellent $\cdot\text{OOH}$ scavengers. According to these analyses, it seems that the metabolite of caffeine, HMUA, is a better radical scavenger than its precursor. Moreover, they suggest that the antiradical capacity of caffeine might be explained by the action of its metabolites, rather than by its direct activity.

We have used the reactions with $\cdot\text{OOH}$ for these comparisons due to its relative low reactivity. Using very reactive radicals, such as $\cdot\text{OH}$, might lead one to misconclude that a wide variety of compounds have similar reactivity, since the reactions with this radical are often diffusion-controlled.⁷⁶ Therefore we prefer, and recommend, to use a less reactive free radical ($\cdot\text{OOH}$)

Table 3. Branching Ratios (Γ) of the Different Channels of Reaction at 298.15 K.

	$\cdot\text{OH}$		$\cdot\text{OCH}_3$		$\cdot\text{OOH}$		$\cdot\text{OOCH}_3$	
	(I) ^a	(II) ^a	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
	HUA							
SET		42.35		97.44				
RAF								
C2		11.43						
C4	47.20	11.55	22.17		68.16			
C5	46.00	11.55	60.07					
C6	0.59	11.55						
C8	~ 0.00	11.55	~ 0.00	~ 0.00				
HT								
N1	~ 0.00	~ 0.00		2.56				
N3	3.47	~ 0.00	14.96		0.12		0.84	
N7	2.26	~ 0.00	1.31	~ 0.00		0.09		~ 0.00
N9	0.48	~ 0.00	1.49	~ 0.00	31.72	99.91	99.16	100.00
	HMUA							
SET		43.18		99.87				
RAF								
C2		11.29						
C4	38.02	11.29	30.42	0.08	92.71			
C5	37.49	11.29	55.54	~ 0.00				
C6	0.95	11.29						
C8	~ 0.00	11.29	~ 0.00	0.01				
HT								
C1a	11.31	0.32	0.11	~ 0.00				
N3	7.19		11.22		0.04		76.27	
N7	4.23	0.02	0.90	0.05		0.17		0.00
N9	0.81	0.02	1.82	~ 0.00	7.24	99.83	23.73	100.00

^a(I) lipid phase, modeled using benzene; (II) aqueous phase.

to assess the relative free radical scavenging capacity of chemical compounds.

The branching ratios of the different channels of reaction in aqueous and benzene solutions are reported in Table 3. They represent the percent contributions of the different channels to the overall reaction, and have been calculated as

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

For the reactions with $\cdot\text{OH}$, in nonpolar environments RAF is predicted to be the main mechanism of reaction accounting for 93.8% and 76.5% of the overall reactivity of HUA and HMUA, respectively. The products that are expected to be formed to a larger extent are those corresponding to $\cdot\text{OH}$ additions to sites C4 and C5. This would explain the formation of the oxidation intermediates hydroxyisourate (HIU), with OH at site C5, previously reported.^{68,77} For HUA, the contributions of the other studied mechanisms are small, lower than 10%. For HMUA, on the other hand, the HT mechanism is of minor importance but with significant contributions to the overall reactivity ($\sim 23.5\%$). In this case, the most reactive sites, through HT, were found to be C1a and N3 in that order. In aqueous solution, the branching ratios are quite different. The SET mechanism becomes very important for the reactions of both

UA⁻ and MUA⁻ with [•]OH, accounting for 42.4% and 43.2% of the overall reactivity, respectively. The RAF mechanism remains as a major one, but becomes significantly less important, compared to what was described for nonpolar environments. Its contributions to the overall reactivity lower to 57.6% and 56.5% for UA⁻ and MUA⁻, respectively. In addition, a wide product distribution of the formed radical adducts is expected.

For the reactions involving [•]OCH₃, the change on the relative importance of the different mechanism with the polarity of the environment, and therefore with the active species (neutral or anionic), is more dramatic. In nonpolar media RAF is the main mechanism of reaction for both HUA and HMUA, accounting for 82.2% and 86.0% of the overall reactivity; while in aqueous solution the SET mechanism becomes the most important one with contributions of 97.4% and 99.9%. In addition it should be noticed that after SET, the formed radical might deprotonated, i.e., the observable products of reaction might be the same yielded from HT.

For the reactions with the studied peroxy radicals, the number of reactive sites significantly lowers with respect to the [•]OR species. When the reacting free radical is [•]OOH in nonpolar environments, the RAF mechanism is the major one, accounting for 68.2% and 92.7% of the overall reactivity of HUA and HMUA, respectively. When HUA is the scavenger, the contributions of HT from site N9 are secondary but very significant (~31.7%). In addition, small but not negligible contributions to HT from site N9 were also found for HMUA (~7.2%). In aqueous solution, the formation of the adducts becomes thermochemically unfeasible, and HT becomes the only viable mechanism, with N9 as the most reactive site. For the reactions involving [•]OOCH₃, only HT processes are viable, regardless of the polarity of the environment, with the H transfer taking place almost exclusively from site N9 in aqueous solution for both UA⁻ and MUA⁻. For HMUA, in nonpolar environments HT from site N3 is the major channel of reaction. This particular site is not active in aqueous solution since it is deprotonated due to the formation of the urate anions.

CONCLUSIONS

The reactions of HUA and HMUA in nonpolar environments, as well as those of the corresponding urate anions (UA⁻ and MUA⁻) in aqueous solution, with [•]OH, [•]OCH₃, [•]OOH, and [•]OOCH₃ have been studied. Both HUA and HMUA are better scavengers in aqueous solution than in nonpolar media, which indicates that the urate anions are the most active species.

Different mechanisms of reactions have been taken into account. They are RAF, HT, and SET. For the reactions with [•]OH, RAF is predicted to be the main mechanism in nonpolar environments, while in aqueous solution SET becomes almost equally important. For the reactions with [•]OCH₃, RAF is also the major mechanism in nonpolar media, while in aqueous solution its contributions to the overall reactivity of the studied compounds become almost negligible, and SET becomes the main mechanism. For the reactions involving peroxy radicals, on the other hand, the SET mechanism is not feasible. In particular, for the reactions of [•]OOCH₃, only HT processes are viable, regardless of the polarity of the environment. Therefore it can be stated that the nature of the reacting free radical and the polarity of the environment both influence the relative importance of the different mechanisms of reaction.

The free radical scavenging activity of HUA and HMUA was found to be different depending on the free radical they are reacting with. It is excellent for [•]OH, and very good for [•]OCH₃. Regarding peroxy radicals, HMUA is predicted to moderately protect against peroxy oxidation of lipids, while the protective effects of HUA are not expected to be significant.

In addition, HMUA was found to be a better radical scavenger than its precursor, caffeine, suggesting that the antiradical activity of caffeine might be explained by the action of its metabolites, rather than by its direct activity.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Gibbs free energies of activation. Distribution diagrams including neutral, monoanionic, and dianionic species. Fully optimized geometries of the transition states. Minimum energy potential surfaces for the [•]OH additions to MUA⁻ and UA⁻, at site C5. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: agalano@prodigy.net.mx, agal@xanum.uam.mx.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo at UAM - Iztapalapa for the access to its computer facilities. J.R.L.-C. acknowledges CONACyT for Doctoral fellowship.

REFERENCES

- (1) (a) Boyd, N. F.; McGuire, V. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 185. (b) Nelson, R. L. *Free Radical Biol. Med.* **1992**, *12*, 161. (c) Knekt, P.; Reunanen, A.; Takkunen, H.; Aromaa, A.; Heliovaara, M.; Hakuunen, T. *Int. J. Cancer* **1994**, *56*, 379. (d) Omenn, G. S.; Goodman, G. E.; Thornquist, M. D. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1150.
- (2) (a) Riemmersma, R. A.; Wood, D. A.; Macintyre, C. C. A.; Elton, R. A.; Gey, K. F.; Oliver, M. F. *Lancet* **1991**, *337*, 1. (b) Salonen, J. T.; Nyyssonen, K.; Korpela, H.; Tuomilehto, J.; Seppanen, R.; Salonen, R. *Circulation* **1992**, *86*, 803. (c) Street, D. A.; Comstock, G.; Salkeldy, R.; Klag, M. *Circulation* **1994**, *90*, 1154. (d) Kushi, L. H.; Folsom, A. R.; Prineas, R. J.; Mink, P. J.; Wu, Y.; Bostick, R. N. *Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1156. (e) Stephens, N. G.; Parsons, A.; Schofield, P. M.; Kelly, F.; Cheesman, K.; Mitchinson, M. J.; Brown, M. J. *Lancet* **1996**, *347*, 781.
- (3) (a) Panasenkov, O. M.; Nova, T. V.; Azizova, O. A.; Vladimirov, Y. A. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 137. (b) Steinberg, D. *Circulation* **1991**, *84*, 1421. (c) Janero, D. R. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *11*, 129. (d) Hodis, H. N.; Mack, W. J.; LaBree, L.; Cashin-Hemphill, L.; Sevanian, A.; Johnson, R.; Azen, S. *J. Am. Med. Assoc.* **1995**, *273*, 1849.
- (4) (a) Butterfield, D. A.; Hensley, K.; Harris, M.; Mattson, M.; Carney, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 710. (b) Hensley, K.; Carney, J. M.; Mattson, M. P.; Aksenova, M.; Harris, M.; Wu, J. F.; Floyd, R. A.; Butterfield, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 3270. (c) Butterfield, D. A.; Martin, L.; Carney, J. M.; Hensley, K. *Life Sci.* **1996**, *58*, 217. (d) Butterfield, D. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 495. (e) Fay, D. S.; Fluet, A.; Johnson, C. J.; Link, C. D. *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 1616.
- (5) Becker, B. F. *Free Radical Biol. Med.* **1993**, *14*, 615.
- (6) Telo, J. P.; Vieira, A. J. S. C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 1755.
- (7) Lu, J. F.; Cao, X. M.; Yi, T.; Zhuo, H. T.; Ling, S. S. *Anal. Lett.* **1998**, *31*, 613.
- (8) Gomez-Ruiz, J. A.; Leake, D. S.; Ames, J. M. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6962.

- (9) Lee, C. *Clin. Chim. Acta* **2000**, *295*, 141.
- (10) Wu, X. W.; Muzny, D. M.; Lee, C. C.; Caskey, C. T. *J. Mol. Evol.* **1992**, *34*, 78.
- (11) Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccini, C. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *29*, 1106.
- (12) Ames, B. N.; Cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstein, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 6858.
- (13) Nieto, F. J.; Iribarren, C.; Gross, M. D.; Comstock, G. W.; Cutler, R. G. *Atherosclerosis* **2000**, *148*, 131.
- (14) Glantzounis, G. K.; Tsimoyiannis, E. C.; Kappas, A. M.; Galaris, D. A. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 4145.
- (15) Simic, M. G.; Jovanovic, S. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5718.
- (16) Bergman, F.; Dikstein, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 691.
- (17) Meadows, J.; Smith, R. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *246*, 838.
- (18) Matsushita, S.; Ibuki, F.; Aoki, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1963**, *102*, 446.
- (19) Smith, R. C.; Lawing, L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *223*, 166.
- (20) Smith, R. C.; Nunn, V. *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *232*, 348.
- (21) Kellogg, E. W.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 6721.
- (22) Kean, R. B.; Spitsin, S. V.; Mikheeva, T.; Scott, G. S.; Hooper, D. C. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 6511.
- (23) Hicks, M.; Wong, L. S.; Day, R. O. *Free Radical Res. Commun.* **1993**, *18*, 337.
- (24) Nishida, Y. *J. Pharm. Pharmacol.* **1991**, *43*, 885.
- (25) Niki, E.; Yamamoto, Y.; Kamiya, Y. *Chem. Lett.* **1985**, 1267.
- (26) Smith, R. C.; Nunn, V. *Comp. Biochem. Biophys.* **1986**, *84C*, 79.
- (27) Sueishi, Y.; Hori, M.; Kita, M.; Kotake, Y. *Food Chem.* **2011**, *129*, 866.
- (28) Hershfield, M. S.; Roberts, L. J., II; Ganson, N. J.; Kelly, S. J.; Santisteban, I.; Scarlett, E.; Jaggars, D.; Sundry, J. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 14351.
- (29) Peden, D. B.; Hohman, R.; Brown, M. E.; Mason, R. T.; Berkebile, C.; Fales, H. M.; Kaliner, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 7638.
- (30) (a) Stryer, L. *Biochemistry*; W. H. Freeman: New York, 1995; p 757. (b) Klotz, I. M. *J. Chem. Ed.* **1994**, *71*, 1015.
- (31) Sautin, Y. Y.; Nakawawa, T.; Zharikov, S.; Johnson, R. J. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2007**, *293*, C584.
- (32) (a) Freedman, D. S.; Williamson, D. F.; Gunter, E. W.; Byers, T. *Am. J. Epidemiol.* **1995**, *141*, 637. (b) Fang, J.; Alderman, M. H. *J. Am. Med. Assoc.* **2000**, *283*, 2404. (c) Levine, W.; Dyer, A. R.; Shekelle, R. B.; Schoenberger, J. A.; Stamler, J. *J. Clin. Epidemiol.* **1989**, *42*, 257.
- (33) (a) Goldberg, R. J.; Burchfiel, C. M.; Benfante, R.; Chiu, D.; Reed, D. M.; Yano, K. *Arch. Intern. Med.* **1995**, *155*, 686. (b) Franse, L. V.; Pahor, M.; Di Bari, M.; Shorr, R. I.; Wan, J. Y.; Somes, G. W.; Applegate, W. B. *J. Hypertens.* **2000**, *18*, 1149.
- (34) (a) Alderman, M. H. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, *2*, 126. (b) Langford, H. G.; Blafox, M. D.; Borhani, N. O.; Curb, J. D.; Molteni, A.; Schneider, K. A.; Pressel, S. *Arch. Intern. Med.* **1987**, *147*, 645.
- (35) Ruggiero, C.; Cherubini, A.; Guralnik, J.; Semba, R. D.; Maggio, M.; Ling, S. M.; Lauretani, F.; Bandinelli, S.; Senin, U.; Ferrucci, L. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2007**, *55*, 1206.
- (36) Maples, K. R.; Mason, P. R. *J. Biol. Chem. Soc.* **1988**, *263*, 1709.
- (37) Telo, J. P. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 588.
- (38) Allen, R. N.; Shukla, M. K.; Leszczynski, J. *Int. J. Quantum Chem.* **2004**, *100*, 801.
- (39) Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364.
- (40) Velez, E.; Quijano, J.; Notario, R.; Pabón, E.; Murillo, J.; Leal, J.; Zapata, E.; Alarcón, G. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 971.
- (41) Vega-Rodríguez, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7649.
- (42) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5114.
- (43) Black, G.; Simmie, J. M. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1236.
- (44) Furuncuoglu, T.; Ugur, I.; Degirmenci, I.; Aviyente, V. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1823.
- (45) Galano, A.; Macías-Ruvalcaba, N. A.; Campos, O. N. M.; Pedraza-Chaverri, J. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6625.
- (46) Gao, T.; Andino, J. M.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 9830.
- (47) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, revision E.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
- (48) (a) Cancas, M. T.; Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032. (b) Mennucci, B.; Cancas, E.; Tomasi, J. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10506. (c) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cancas, E. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1999**, *464*, 211.
- (49) Belcastro, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. *Theor. Chem. Acc.* **2006**, *115*, 361.
- (50) Leopoldini, M.; Russo, N.; Chiodo, S.; Toscano, M. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6343.
- (51) Leopoldini, M.; Rondinelli, F.; Russo, N.; Toscano, M. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8862.
- (52) Martinez, A.; Vargas, R.; Galano, A. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, *127*, 595.
- (53) Chiodo, S. G.; Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 7662.
- (54) Pérez-González, A.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1306.
- (55) Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. *Food Chem.* **2011**, *125*, 288.
- (56) León-Carmona, J. R.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4538.
- (57) Okuno, Y. *Chem.—Eur. J.* **1997**, *3*, 210.
- (58) Benson, S. W. *The Foundations of Chemical Kinetics*; Krieger: Malabar, FL, 1982.
- (59) Ardura, D.; Lopez, R.; Sordo, T. L. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23618.
- (60) (a) Alvarez-Idaboy, J. R.; Reyes, L.; Cruz, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1763. (b) Galano, A. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 8922. (c) Galano, A.; Francisco-Márquez, M. *Chem. Phys.* **2008**, *345*, 87. (d) Mora-Diez, N.; Keller, S.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3682.
- (61) (a) Eyring, H. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107. (b) Evans, M. G.; Polanyi, M. *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 875. (c) Truhlar, D. G.; Hase, W. L.; Hynes, J. T. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664.
- (62) Truhlar, D. G.; Kuppermann, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1840.
- (63) Collins, F. C.; Kimball, G. E. *J. Colloid Sci.* **1949**, *4*, 425.
- (64) Smoluchowski, M. *Z. Phys. Chem.* **1917**, *92*, 129.
- (65) Truhlar, D. G. *J. Chem. Educ.* **1985**, *62*, 104.
- (66) (a) Einstein, A. *Ann. Phys. (Leipzig)* **1905**, *17*, 549. (b) Stokes, G. G. *Mathematical and Physical Papers*, Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1903; Vol. 3, p 55.
- (67) Raczynska, E. D.; Makowski, M.; Szela, M.; Kaminska, B.; Zientara, K. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2010**, *947*, 83.
- (68) Kahn, K.; Serfozo, P.; Tipton, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5435.
- (69) Galano, A.; Francisco-Márquez, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 11338.
- (70) Galano, A.; Francisco-Márquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8590.

- (71) Galano, A.; Francisco-Márquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 11199.
- (72) Galano, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 7147.
- (73) de Grey, A. D. N. J. *J. DNA Cell Biol.* **2002**, *21*, 251.
- (74) Galano, A.; Francisco-Márquez, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16077.
- (75) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *RSC Adv.* **2011**, *1*, 1763.
- (76) (a) Rose, R. C.; Bode, A. M. *FASEB J.* **1993**, *7*, 1135. (b) Galano, A.; Tan, D. X.; Reiter, R. J. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 1.
- (77) Kim, K.; Park, J.; Rhee, S. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 23457.

Cite this: DOI: 10.1039/c2cp40651a

www.rsc.org/pccp

PAPER

On the peroxy scavenging activity of hydroxycinnamic acid derivatives: mechanisms, kinetics, and importance of the acid–base equilibrium

Jorge Rafael León-Carmona,^a Juan Raúl Alvarez-Idaboy^b and Annia Galano^{*a}

Received 1st March 2012, Accepted 26th March 2012

DOI: 10.1039/c2cp40651a

The peroxy radical scavenging activity of four hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) has been studied in non-polar and aqueous solutions, using the density functional theory. The studied HCAD are: ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid), *p*-coumaric acid (*trans*-4-hydroxycinnamic acid), caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid), and dihydrocaffeic acid (3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propionic acid). It was found that the polarity of the environment plays an important role in the relative efficiency of these compounds as peroxy scavengers. It was also found that in aqueous solution the pH is a key factor for the overall reactivity of HCAD towards peroxy radicals, for their relative antioxidant capacity, and for the relative importance of the different mechanisms of reaction. The H transfer from the phenolic OH has been identified as the main mechanism of reaction in non-polar media and in aqueous solution at acid pHs. On the other hand, the single electron transfer mechanism from the phenoxide anion is proposed to be the one contributing the most to the overall peroxy scavenging activity of HCAD in aqueous solution at physiological pH (7.4). This process is also predicted to be a key factor in the reactivity of these compounds towards a large variety of free radicals.

Introduction

Hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) are ubiquitous in the plant kingdom and abundant in the human diet.^{1,2} They represent one third of our total intake of phenolic compounds.³ In addition they may also be formed by colon microflora from ingested flavonoids.⁴ The HCAD studied in this work (Fig. 1) are: ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, H₂Frc), *p*-coumaric acid (*trans*-4-hydroxycinnamic acid, H₂Cmc), caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid, H₂Cfc), and dihydrocaffeic acid (3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propionic acid, H₂Dhc). The main dietary sources of H₂Frc are coffee beverages, citrus juices, sugar beet fibre, and cereal brans. H₂Cmc is mainly found in spinach, sugar beet fibre, and cereal brans. Our major intake of H₂Cfc comes from coffee beverages, blueberries, apples, and ciders;⁵ while H₂Dhc is a metabolic product of H₂Cfc.⁶

One of the most appealing properties of these compounds is their free radical scavenging activity. It makes them good protectors against oxidative stress (OS), which is a major health problem currently associated with the development of

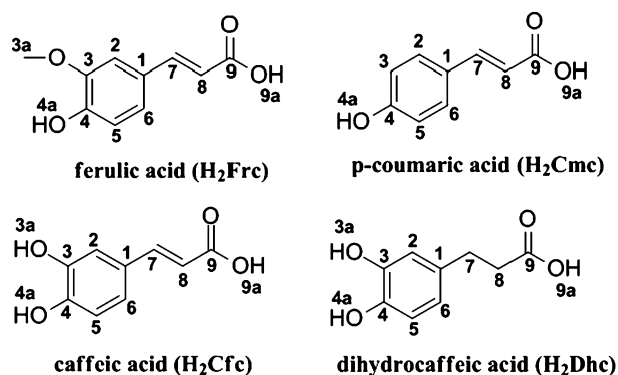


Fig. 1 Structures, site numbering, and acronyms.

numerous diseases such as cancer,⁷ cardiovascular disorders,⁸ atherosclerosis,⁹ fetal growth restriction and preeclampsia,¹⁰ and several neurological disorders including Parkinson's and Alzheimer's diseases.¹¹ This chemical stress is triggered by an excess of reactive oxygen species (ROS) and often involves reactions between free radicals and molecules of high biological importance such as lipids, proteins, and DNA. Therefore, dietary products that behave as good radical scavengers help counteracting the detrimental and cumulative effects of OS in humans. Moreover the study of their mechanisms of action, as well as their relative scavenging ability, is of vital importance to the understanding of their protective activity and to the design of efficient strategies against OS.

^a Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C. P. 09340, México DF, México.

E-mail: agalano@prodigy.net.mx, agal@xanum.uam.mx

^b Departamento de Física y Química Teórica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

HCAD have been reported to inhibit low density lipoprotein (LDL) peroxidation, with the following order of reactivity, for the compounds studied in this work: $H_2Cfc > H_2Frc > H_2Cmc$.^{12–17} The same order of reactivity was found for their reducing capacity^{18,19} and the reactions with peroxy radicals (ROO^\bullet),^{16,19–21} singlet oxygen,²² superoxide radical anions,²³ and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).^{23–25} Other studies, which did not include H_2Cmc , also support that H_2Cfc has a higher antioxidant capacity than H_2Frc .^{26–29} The higher activity of H_2Cfc compared to that of H_2Frc and H_2Cmc has been explained based on the presence of the catechol group.^{12,14,26} In contrast it has been reported that in aqueous solution the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of H_2Frc is about 1.5 times higher than that of H_2Cfc .³⁰ H_2Frc was also found to react faster than H_2Cfc in linoleic acid media and using the β -carotene bleaching method.^{19,23,24} In addition it has been demonstrated that different reactivity orders can be obtained depending on the particular antioxidant capacity assay used to estimate it.^{26,31} Moreover, some of these assays mainly measure the antioxidant activity *via* H atom transfer (HT) while others measure the single electron transfer ability (SET).³² Therefore comparisons of the relative activity of different compounds are not always straightforward.

With respect to the activity of H_2Dhc it has been reported to be more effective than H_2Cfc for enhancing the oxidative stability of lard, less effective for preventing LDL oxidation, and similarly effective for scavenging DPPH and peroxy radicals.³³ In contrast Silva *et al.*³⁴ found that H_2Dhc is a more potent DPPH scavenger than H_2Cfc . More recently it was reported that the reactivity of H_2Cfc and H_2Dhc towards peroxy radicals is almost identical in homogeneous chloro-benzene solution, while in large unilamellar phosphatidylcholine vesicles, at pH = 7.2, H_2Cfc was found to react ~5 times faster.³⁵ Since the main structural difference between these two compounds is the side chain (Fig. 1) we investigated the information gathered so far with respect to the role of the ethylenic side chain in the antioxidant activity of HCAD. Moon and Terao³³ found that it may affect the antioxidative efficiency, depending on the environment, but that it is not responsible for the inherent activity of these compounds. The results reported by Silva *et al.*³⁴ also support that the ethylenic side chain may not be an important factor to the antiradical capacity of these compounds. In addition, Amorati *et al.*³⁵ proposed that it may have some relevance since it contributes to lowering the strength of the phenolic O–H bond. However a similar effect was described in the same work for the $-CH_2-CH_2-$ group. Therefore, the role of the side chain in the antiradical activity of HCAD, if any, has not been fully established yet.

Regarding the reaction mechanisms involved in the free radical scavenging activity of HCAD, for the reactions with ROO^\bullet it has been proposed that the HT from the phenolic OH is the key mechanism.^{20,35} On the other hand the SET mechanism has been proposed as the most important one for the reactions in aqueous solution with the azide radical (N_3^\bullet),³⁶ bromide radical ion ($Br^{2-\bullet}$),³⁶ trichloromethylperoxy radical (Cl_3COO^\bullet),³⁷ sulfate radical anion ($SO_4^{\bullet-}$),²⁸ nitrogen dioxide radical (NO_2^\bullet),³⁸ DPPH,²⁵ radical cations of 2'-deoxyadenosine-5'-monophosphate (dAMP) and 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (dGMP),²⁶ and also for the reactions with ROO^\bullet

in basic solutions where the phenol moiety is deprotonated.³⁵ For the reaction with the hydroxyl radical ($\bullet OH$), the radical adduct formation has also been found to be significant.³⁹ In addition it was demonstrated that the antioxidant activity of HCAD strongly depends on the pH of the solution, becoming substantially larger as the pH increases from 4 to 8.³⁵ This was attributed to the higher activity of the phenolate anion, compared to that of the neutral phenolic group. However it has also been reported that the antiradical activity and pK_a values of the compounds are not related.³⁴

From a theoretical point of view, there are only a few studies on HCAD and their antiradical activity. Kong *et al.*⁴⁰ calculated the adiabatic ionization energies (IE) of H_2Cfc , H_2Frc , and sinapinic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid), as well as those of their respective mono-anions at the B3LYP/6-31G(d) level of theory. They found that the IE values of the anions correlate well with the experimental evidence for their reactions with NO_2^\bullet , while those of neutral species do not, which supports the role of the phenolate anion in such reactions. Nsangou *et al.*⁴¹ calculated the phenolic O–H bond dissociation enthalpies of H_2Cfc and H_2Cmc at the B3LYP/6-31+G(d,p) level of theory, and proposed that the antioxidant activity of H_2Cfc should be more important than that of H_2Cmc . Very recently Leopoldini *et al.*⁴² performed a thorough investigation on the reaction of H_2Cfc with $\bullet OH$, in benzene and water solutions, at M05-2X/6-31+G(d) and B3LYP/6-31+G(d) levels of theory. They found that the rate constants are within the diffusion-limited regime, which indicates that these compounds are potent $\bullet OH$ scavengers. They also found that when reacting with this radical there are two important mechanisms: the HT and the radical adduct formation (RAF).

Based on the above-discussed data there seems to be no doubts on the efficiency of HCAD as free radical scavengers. However, despite the numerous studies reported so far proving this point, there are still very scarce quantitative kinetics data on the reactions of HCAD with ROS. There is also very little information on the structure–activity relationship of these compounds and on their relative reactivity depending on the polarity of the environment, and on the pH in aqueous solution. In fact the necessity of more studies addressing these points has been recently pointed out.^{20,35} Therefore it is the main goal of the present work to provide new data that help clarifying these aspects that are directly related to the free radical scavenging activity HCAD under physiological conditions.

Computational details

Geometry optimizations and frequency calculations have been carried out using the M05-2X functional⁴³ and the 6-311+G(d,p) basis set, in conjunction with the SMD continuum model⁴⁴ using pentyl ethanoate and water as solvents to mimic lipid and aqueous environments. The M05-2X functional has been recommended for kinetic calculations by their developers,⁴³ and it has also been successfully used by independent authors to that purpose.^{45–50} It is also among the best performing functionals for calculating reaction energies involving free radicals.⁵¹ SMD is considered a universal solvation model, due to its applicability to any charged or uncharged solute

in any solvent or liquid medium for which a few key descriptors are known.⁴⁴

Unrestricted calculations were used for open shell systems and local minima and transition states were identified by the number of imaginary frequencies (NIMAG = 0 or 1, respectively). In the case of the transition states it was verified that the imaginary frequency corresponds to the expected motion along the reaction coordinate, by Intrinsic Coordinate calculations (IRC). All the electronic calculations were performed with Gaussian 09 package of programs.⁵² Thermodynamic corrections at 298.15 K were included in the calculation of relative energies. In addition the solvent cage effects have been included according to the corrections proposed by Okuno,⁵³ taking into account the free volume theory.⁵⁴ Counterpoise corrections (CP) to the basis set superposition error (BSSE) have not been included, since it has been recently demonstrated that for a large variety of systems CP corrected energies systematically differ to a larger extent, from the CBS-extrapolated values, than the uncorrected ones. The main reason for such behavior is that the BSSE and the basis set truncation error systematically cancel.^{55,56} Moreover it has been shown that counterpoise corrections tend to overestimate the BSSE.⁵⁷

The rate constants (k) were calculated using the Conventional Transition State Theory (TST)^{58–60} and 1 M standard state. Reaction path degeneracies and tunneling corrections have been taken into account. The tunneling corrections, defined as the Boltzmann average of the ratio of the quantum and the classical probabilities, were calculated using the Zero Curvature Tunneling corrections (ZCT).⁶¹ For the mechanisms involving electron transfers the barriers of reaction were estimated using the Marcus theory.⁶² Some of the calculated rate constants (k) are close to the diffusion-limit. Accordingly, the apparent rate constant (k_{app}) cannot be directly obtained from TST calculations. In the present work the Collins–Kimball theory is used to include the corresponding corrections.⁶³

Results and discussion

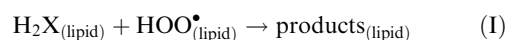
The first two pK_a s of the HCAD studied in this work are reported in Table 1, as well as the molar fractions of the neutral (H_2X), mono-anionic (HX^-), and di-anionic (X^{2-}) species at physiological pH (7.4). They have been estimated from the acid constants calculated from the pK_a values, using the average values when there is more than one pK_a reported for the same acid–base equilibrium. According to the values in

Table 1 Values of the first two pK_a s and molar fractions at pH = 7.4

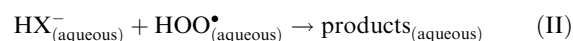
	Ref.	pK_{a1}	pK_{a2}	$mF(H_2X)^a$	$mF(HX^-)^a$	$mF(X^{2-})^a$
H_2Frc	64	4.56	8.65	0.001	0.945	0.053
H_2Cmc	64	4.39	8.37			
	65	4.36	8.98			
	Average	4.38	8.68	0.001	0.949	0.050
H_2Cfc	34	4.36	8.48			
	64	4.47	8.32			
	66	4.43	8.69			
Average	4.42	8.50	0.001	0.925	0.074	
H_2Dhc	34	4.43	9.24	0.001	0.985	0.014

^a X = Frc, Cmc, Cfc, Dhc.

Table 1, the main form of the studied HCAD at physiological pH is the corresponding mono-anion, with populations ($P\%$) equal to 94.5%, 94.9%, 92.5% and 98.5% for ferulic, *p*-coumaric, caffeic, and dihydrocaffeic acids respectively. Therefore the mono-anions are the key species related to the free radical scavenging activity of these compounds under such conditions. Accordingly in this work we have used the neutral species for the reactions in non-polar (lipid) environments, but in aqueous solution the mono-anions are the principal forms considered in this work. Consequently, unless otherwise specified, the overall reactions would correspond to:



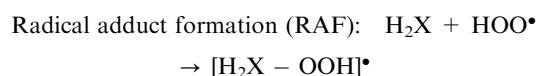
and



The hydroperoxyl radical (HOO^{\bullet}) has been chosen for this study because it is the simplest of the peroxy radicals (ROO^{\bullet}), which are among those free radicals of biological relevance that can be effectively scavenged to retard OS.²³ This is because they do not have too short half-lives, which is a requisite for efficient interception by phenolic compounds.⁶⁷ Therefore ROO^{\bullet} have been proposed as major reaction partners for this kind of compounds.⁶⁷ ROO^{\bullet} have also been proposed to be involved in the oxidation of lipoproteins and biological membranes and have been held responsible for microvascular damage.⁶⁸ They are formed within living organisms, where they are involved in DNA cleavage and protein backbone modification.^{7e} It has even been proposed that the main antioxidant function of phenolic compounds is to trap ROO^{\bullet} .⁶⁹ In the particular case of HOO^{\bullet} it has been suggested to be central to the toxic side effects of aerobic respiration.⁷⁰ It has also been pointed out that more information on the reactivity of this species is needed.⁷⁰ In addition radicals of intermediate to low reactivity have been recommended for studying the relative scavenging activity of different compounds,^{71,72} since using highly reactive radicals that usually react at diffusion-limited rates might lead to misconception that all the tested compounds are equally efficient as antioxidants. Moreover, it has been proposed that such highly reactive radicals cannot be intercepted in biological systems with reasonable efficiency.⁷⁰

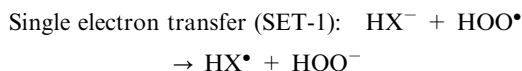
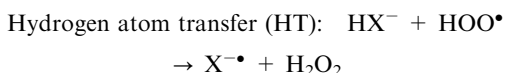
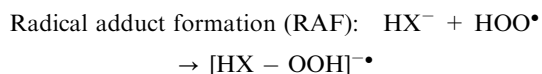
With respect to the reaction mechanisms, the free radical scavenging activity of HCAD can take place through a variety of them, as it is the case for many other scavengers.^{73–78} Those considered in this work are:

-For the reaction in lipid medium (i):



The SET mechanism has not been included in this case since non-polar environments do not promote the necessary solvation of the intermediate ionic species yielded by this mechanism. However just to prove this point the energies of reaction for the SET process were calculated and found to be larger than 70 kcal mol⁻¹ in all the cases.

-For the reaction in aqueous solution (ii):



In addition, in aqueous solution the SET from the di-anionic species has also been considered:



This reaction path has been included because the di-anions have low, but not negligible, populations ($P\%(\text{Frc}^{2-}) = 5.3\%$, $P\%(\text{Cmc}^{2-}) = 5.0\%$, $P\%(\text{Cfc}^{2-}) = 7.4\%$, and $P\%(\text{Dhc}^{2-}) = 1.4\%$) and based on charge considerations they are expected to be better electron donors than the mono-anions. Therefore, albeit HX^- is the dominant species under physiological conditions, based on their relative populations, the contributions of the di-anions to the overall activity of the studied compounds could be significant, provided that they react fast enough.

The Gibbs free energies of reaction of all the studied reaction paths are reported in Table 2. The SET processes from the mono-anions (SET-1) were found to be endergonic with ΔG values ranging from 23 to 28 kcal mol⁻¹. Accordingly, this reaction path is not expected to contribute to the HOO^\bullet radical scavenging activity of HCAD. The same behavior is also expected for other ROO^\bullet where R is an alkyl or alkenyl group. However SET can be viable for the reactions of these compounds with other free radicals with higher electrophilic character. We will address this point later, when discussing the kinetics data. The SET processes from the di-anions (SET-2), on the other hand, were found to be exergonic for dihydrocaffeic and ferulic acids, almost isoergonic for caffeic acid and slightly endergonic for *p*-coumaric acid. This suggests that the

di-anions may contribute to the overall reactivity of HCAD towards peroxy radicals *via* SET.

For the RAF mechanism only one reaction path was found to be thermochemically viable, regardless of the polarity of the environment. It corresponds to the HOO^\bullet additions to site 8 in the ethylenic side chain. Therefore for the dihydrocaffeic acid no RAF paths are expected to contribute to its overall reactivity towards HOO^\bullet . For the HT mechanism the H abstractions from the phenolic OH were all found to be exergonic, except that corresponding to H_2Cmc in lipid media, which is almost isoergonic. All the other HT paths have positive values of ΔG , except that corresponding to the H abstraction from site 7 in the side chain of HDhc^- in aqueous solution. In addition the HT from the phenolic OH in site 4a was found to be the most exergonic reaction path regardless of the polarity of the environment and of the particular HCAD involved in the reaction. The only exception to this trend corresponds to *p*-coumaric acid. In this particular case the largest exergonicity corresponds to the HOO^\bullet addition to site 8. Therefore the presence of another OH or an OCH_3 group in the *ortho* position favors path 4a from a thermochemical point of view. Thus while for the ferulic, caffeic, and dihydrocaffeic acids the effects of the ethylenic side chain may not be important, for *p*-coumaric acid it might be of some relevance. We will assess the relative importance of the different mechanisms and channels of reaction later, based on kinetic considerations.

For the kinetic study we have not included the channels of reaction described above as endergonic because even if they take place at a significant rate, they would be reversible and therefore the formed products will not be observed. However, it should be noted that they might still represent significant channels if their products rapidly react further. This would be particularly important if these later stages are sufficiently exergonic to provide a driving force, and if their barriers of reactions are low. That is expected to be the case for the SET mechanism, since the formed species can spontaneously deprotonate.

The fully optimized geometries of the transition states (TS) are shown in Fig. 2–5. The TS of the reactions involving ferulic acid all present H bonding (HB) like interactions. For TS-4a it involves the H in the HOO radical and the O in the methoxy moiety,

Table 2 Gibbs free energies of reaction (kcal mol⁻¹), at 298.15 K

	H_2Frc (i)	HFrc^- (ii)	H_2Cmc (i)	HCmc^- (ii)	H_2Cfc (i)	HCfc^- (ii)	H_2Dhc (i)	HDhc^- (ii)
SET-1		23.67		27.30		24.95		25.29
SET-2		-1.77		1.59		-0.05		-4.79
HT								
Site 3a	14.12	11.27			-4.27	-5.75	-4.42	-7.08
Site 4a	-1.18	-7.16	0.12	-3.53	-6.24	-8.27	-6.27	-7.99
Site 7							2.42	-0.88
Site 8							7.41	4.68
Site 9a	27.33		37.90		37.69		26.88	
RAF								
Site 1	17.76	15.47	19.70	17.34	18.90	16.75	12.90	10.56
Site 2	14.30	12.31	14.35	11.96	13.26	11.92	15.42	12.78
Site 3	13.96	12.42	15.65	15.30	12.71	12.18	11.43	10.06
Site 4	7.94	5.47	9.86	9.30	7.17	8.56	10.86	10.28
Site 5	17.90	15.34	16.22	14.59	17.31	15.64	15.52	12.96
Site 6	8.81	8.01	12.90	11.76	10.07	9.71	15.83	13.21
Site 7	5.96	0.44	5.97	0.81	5.68	0.53		
Site 8	-0.61	-6.37	-0.29	-5.53	-0.73	-5.84		

(i) Pentyl ethanoate solution, (ii) aqueous solution.

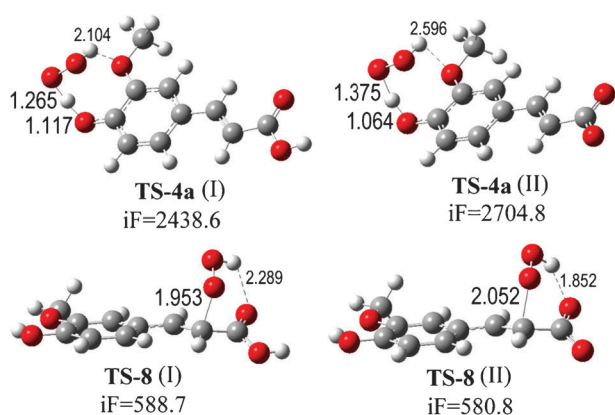


Fig. 2 Optimized geometries of the transition states involving ferulic acid. (I) pentyl ethanoate solution, (II) aqueous solution; and their imaginary frequencies (iF). The distances are reported in Å and the frequencies in cm^{-1} .

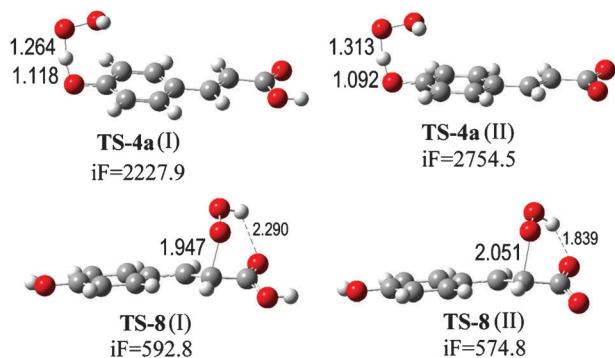


Fig. 3 Optimized geometries of the transition states involving *p*-coumaric acid. (I) pentyl ethanoate solution, (II) aqueous solution; and their imaginary frequencies (iF). The distances are reported in Å and the frequencies in cm^{-1} .

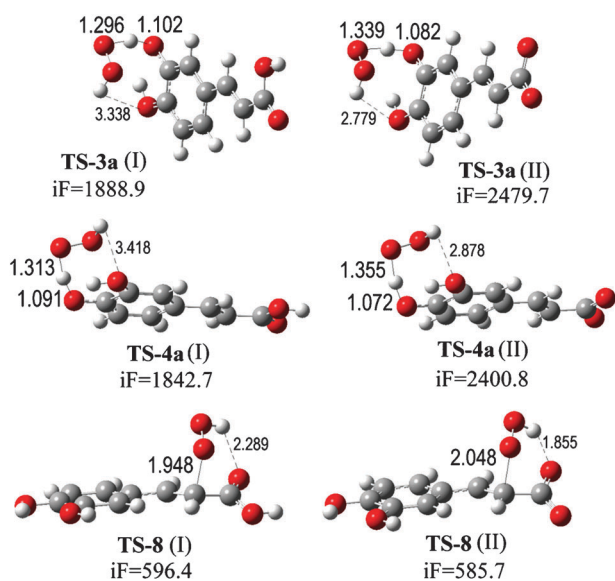


Fig. 4 Optimized geometries of the transition states involving caffeic acid. (I) pentyl ethanoate solution, (II) aqueous solution; and their imaginary frequencies (iF). The distances are reported in Å and the frequencies in cm^{-1} .

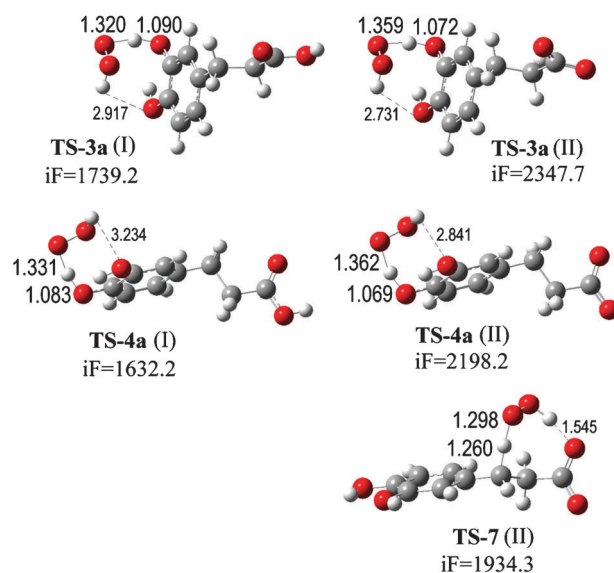


Fig. 5 Optimized geometries of the transition states involving dihydrocaffeic acid. (I) pentyl ethanoate solution, (II) aqueous solution; and their imaginary frequencies (iF). The distances are reported in Å and the frequencies in cm^{-1} .

while for TS-8 it involves the carboxylic O atom in non-polar media and one of the O in the carboxylate in aqueous solution (Fig. 2). The HB distance is larger in aqueous solution for TS-4a and shorter for TS-8, which suggests that this interaction may contribute to increase the relative importance of RAF processes in polar media.

For *p*-coumaric acid only TS-8 presents HB (Fig. 3), while for TS-4a such interactions are not possible since there are no polar groups in the vicinity of the reaction site. As it was described for ferulic acid, in this case the HB is also stronger in aqueous solution than in non-polar environments. Therefore for this particular HCAD the HB in the TS favors RAF over HT, and this difference is expected to be more noticeable in aqueous solution.

For caffeic and dihydrocaffeic acids, the HB distances in the HT transition states (TS-3a and TS-4a) are too long (≥ 2.6 Å) to expect a proper interaction, they are reported in Fig. 4 and 5 only for comparison purposes. In contrast, for the other HT transition state involving dihydrocaffeic acid (TS-7) and for that corresponding to the HOO^\bullet addition to site 8 in caffeic acid the HB distances suggest a stabilization effect. Similarly to what was discussed for the other HCAD, the HB interaction is predicted to be stronger in aqueous solution for TS-8. This can be explained based on the fact that in non-polar media the carboxylic group is neutral, while in aqueous solution it carries a large negative charge because of deprotonation.

The Gibbs free energies of activation (ΔG^\ddagger) are reported in Table 3. In aqueous solution those corresponding to the SET processes from the di-anions are the lowest ones. They were found to be more than 10 kcal mol^{-1} lower than those of any HT or RAF path. In non-polar media the ΔG^\ddagger values of the HT paths are systematically lower than those of the RAF path for all the studied HCAD with the ethylenic side chain. In contrast, in aqueous solution the lowest ΔG^\ddagger values correspond to RAF at site 8. This inversion is in line with the

Table 3 Gibbs free energies of activation (kcal mol⁻¹), at 298.15 K

	H ₂ Frc (i)	HFrc ⁻ (ii)	H ₂ Cmc (i)	HCmc ⁻ (ii)	H ₂ Cfc (i)	HCfc ⁻ (ii)	H ₂ Dhc (i)	HDhc ⁻ (ii)
SET-2		3.10		4.72		4.04		2.39
HT								
Site 3a					13.52	14.74	14.23	12.90
Site 4a	15.51	14.80	15.57	17.01	13.80	14.16	12.63	11.64
Site 7								15.02
RAF								
Site 8	17.22	13.90	16.61	14.16	16.68	13.21		

(i) Pentyl ethanoate solution, (ii) aqueous solution.

Table 4 Rate constants and overall rate coefficients (M⁻¹ s⁻¹), at 298.15 K

	H ₂ Frc (i)	HFrc ⁻ (ii)	H ₂ Cmc (i)	HCmc ⁻ (ii)	H ₂ Cfc (i)	HCfc ⁻ (ii)	H ₂ Dhc (i)	HDhc ⁻ (ii)
SET-2		3.36 × 10 ⁸		8.51 × 10 ⁷		2.69 × 10 ⁸		1.03 × 10 ⁸
HT								
Site 3a					2.53 × 10 ⁴	1.51 × 10 ⁴	3.84 × 10 ³	1.99 × 10 ⁵
Site 4a	9.12 × 10 ³	2.30 × 10 ⁴	4.34 × 10 ³	2.58 × 10 ³	1.40 × 10 ⁴	2.58 × 10 ⁴	4.56 × 10 ⁴	7.92 × 10 ⁵
Site 7								4.67 × 10 ³
RAF								
Site 8	2.94	8.05 × 10 ²	8.25	5.17 × 10 ²	7.36	2.57 × 10 ³		
Overall	9.13 × 10 ³	3.36 × 10 ⁸	4.35 × 10 ³	8.51 × 10 ⁷	3.93 × 10 ⁴	2.69 × 10 ⁸	4.95 × 10 ⁴	1.04 × 10 ⁸

(i) Pentyl ethanoate solution, (ii) aqueous solution at pH = 7.4.

structural characteristics of the TS, in particular the HB interactions, discussed above. In the case of dihydrocaffeic acid, which has no exergonic RAF paths, the ΔG^\ddagger value of the HT from the side chain (site 7) was found to be higher than those corresponding to HT from the phenolic OHs.

The rate constants of each reaction path, as well as the overall rate coefficients (k_{overall}), at physiological pH, are reported in Table 4. The values of k_{overall} have been calculated as the sum of the rate constants of each path, taking into account the molar fractions of the reacting species. In aqueous solution the fastest processes were found to be the electron transfer from the di-anions to the HOO radical (mechanism SET-2). On the other hand, in non-polar media where such process cannot take place the fastest reactions correspond to HT from the phenolic OH group, while the RAF process was found to be the slowest one regardless of the polarity of the environment and of the particular HCAD that is scavenging the peroxy radical.

According to the k_{overall} values in non-polar environments the order of reactivity of the studied compounds towards peroxy radicals is: dihydrocaffeic acid > caffeic acid > ferulic acid > *p*-coumaric acid. This order is in agreement with the experimental data which have been obtained in non-aqueous media for H₂Cfc, H₂Frc, and H₂Cmc.^{12–29} It is also in agreement with the larger protective effects of H₂Dhc in lard, compared to H₂Cfc,³³ and with the results of Silva *et al.*³⁴ for these two compounds. The overall rate coefficients of the studied HCAD, in non-polar media, were found to range from 4×10^3 to 5×10^4 M⁻¹ s⁻¹. Therefore taking into account that the rate constants corresponding to the HOO• damage to polyunsaturated fatty acids are in the range $1.18–3.05 \times 10^3$ M⁻¹ s⁻¹,⁷⁰ all of them are predicted to protect against peroxy oxidation of lipids, caffeic acid and its metabolite, dihydrocaffeic acid, being the most efficient ones. This strongly supports the role of the catechol moiety in the scavenging

activity of the HCAD in the lipid phase of living organisms. It also supports the hypothesis that under such conditions the side chain is of minor importance. Compared to other anti-oxidants, in non-polar environments the peroxy radical scavenging activity of dihydrocaffeic and caffeic acids was found to be lower than that of carotenes ($\sim 10^5–10^6$ M⁻¹ s⁻¹),⁷⁹ canolol (6.8×10^5 M⁻¹ s⁻¹),⁸⁰ and hydroxytyrosol (6.4×10^5 M⁻¹ s⁻¹),⁸¹ similar to that of α -mangostin (7.8×10^3 M⁻¹ s⁻¹)⁸² and sesamol (3.3×10^4 M⁻¹ s⁻¹),⁸³ slightly higher than that of sinapinic acid (1.7×10^4 M⁻¹ s⁻¹),⁸⁴ and considerably higher than that of tyrosol (7.1×10^2 M⁻¹ s⁻¹),⁸¹ melatonin (3.1×10^2 M⁻¹ s⁻¹)⁸⁵ and caffeine (3.2×10^1 M⁻¹ s⁻¹).⁷⁸

In aqueous solution, at physiological pH, the scavenging activity order changes to ferulic acid > caffeic acid > dihydrocaffeic acid > *p*-coumaric acid, also in agreement with the experimental evidence in such media.³⁰ Moreover, it was found that ferulic acid reacts about 1.25 times faster than caffeic acid under such conditions, which correlates well with the reactivity ratio (1.5) reported by Miller *et al.*³⁰ With respect to the activity of caffeic acid in aqueous solution, compared to its metabolite, we found that it is 2.6 times higher at pH = 7.4 which is in line with the results reported by Amorati *et al.*³⁵ at pH = 7.2 in unilamellar vesicles. Accordingly it can be stated that the environment has a significant influence on the reactivity order, which supports the proposal of Moon *et al.*³³ that this aspect may affect the antioxidant activity of HCAD. Compared to other antioxidants, in aqueous solution the peroxy radical scavenging activity of these compounds was found to be much higher than that of melatonin (2.0×10^1 M⁻¹ s⁻¹),⁸⁵ caffeine (3.3×10^{-1} M⁻¹ s⁻¹),⁷⁸ allucin (7.4×10^3 M⁻¹ s⁻¹)⁸⁶ and thioacrolein (2.9×10^4 M⁻¹ s⁻¹),⁸⁶ higher than that of α -mangostin (1.4×10^6 M⁻¹ s⁻¹),⁸² and similar to that of 2-propenesulfenic acid (2.6×10^7 M⁻¹ s⁻¹),⁸⁶ glutathione (2.7×10^7 M⁻¹ s⁻¹),⁸⁷ and sesamol (2.4×10^8 M⁻¹ s⁻¹),⁸³ which are excellent HOO• scavengers. Based on these results

Table 5 Branching ratios (%), at 298.15 K

	H ₂ Frc (i)	HFrc ⁻ (ii)	H ₂ Cmc (i)	HCmc ⁻ (ii)	H ₂ Cfc (i)	HCfc ⁻ (ii)	H ₂ Dhc (i)	HDhc ⁻ (ii)
SET-2		99.99		100.00		99.98		99.05
HT								
Site 3a					64.38	0.01	7.75	0.19
Site 4a	99.97	0.01	99.81	~0.00	35.60	0.01	92.25	0.76
Site 7								~0.00
RAF								
Site 8	0.03	~0.00	0.19	~0.00	0.02	~0.00		

(i) Pentyl ethanoate solution, (ii) aqueous solution at pH = 7.4.

it can be stated that HCAD are among the best peroxy radical scavengers in aqueous solution, at physiological pH.

To perform a more detailed analysis on the structure–activity relationship of the studied compounds, the branching ratios of the different reaction channels have been calculated. They represent the percent contribution of every reaction path to the overall free radical scavenging activity and have been calculated as:

$$\Gamma_i = \frac{k_i}{k_{\text{overall}}} \times 100$$

where i represents each particular path.

These branching ratios (Table 5) allow establishing the relative importance of the different reaction sites and mechanisms, according to the kinetics data. In aqueous solution, at physiological pH, it was found that the electron transfer from the HCAD di-anions (SET-2) is by far the most important mechanism of reaction despite the rather low population of these species at pH = 7.4 (Table 1). This mechanism was found to be responsible for more than 99% of the overall reactivity of the studied HCAD towards HOO•, albeit this radical has a rather moderate electrophilic character. These findings strongly suggest that the phenoxide anions are the key factor for the peroxy radical scavenging activity of HCAD in the aqueous phase at physiological pH, in agreement with the proposal of Amorati *et al.*³⁵ with respect to the higher activity of the phenolate anion. In addition the higher scavenging activity of caffeic acid under such conditions, with respect to dihydrocaffeic acid, is attributed to the lower population of Dhc²⁻ (1.4%), compared to that of Cfc²⁻ (7.4%). It can also be concluded that in aqueous solution, at pH = 7.4, the role of the side chain is almost negligible.

In non-polar environments, the most important reaction paths were found to be those corresponding to HT from the phenolic OH groups. For H₂Frc and H₂Cmc, which have only one of these groups, path 4a is responsible for most of their HOO• scavenging activity. For H₂Cfc and H₂Dhc, which have a catechol moiety, both OHs were found to significantly contribute to their activity. However their relative importance is quite different in both compounds. For H₂Dhc the HT from the OH located in the *para* position with respect to the side chain (site 4a) is the main reaction path with contributions to the overall reactivity of H₂Dhc towards HOO• larger than 92%. In contrast, for H₂Cfc, the HT from site 3a (*meta* OH) is the main channel of reaction. This inversion on the relative importance of these two channels can be explained by the chemical nature of the side chain. In the case of H₂Cfc the

ethylenic chain causes an extended conjugation that allows the propagation of the electron-withdrawing effects of the terminal carboxylic group. This makes the *para* OH more affected by these effects than the *meta* OH, lowering the relative reactivity of site 4a towards electrophilic radicals. In contrast, in H₂Dhc the electron-donating effects of the –CH₂–CH₂–R side chain increase the relative reactivity of the *para* OH towards electrophilic radicals. Therefore it can be concluded that while the effects of the side chain on the overall reactivity, and on the preponderant reaction mechanism, of the studied compounds are rather minor, its effects on the relative importance of the different HT reaction sites, in non-polar environments, can be significant for HCAD with more than one phenolic OH.

Since in aqueous solution, at physiological pH, SET is the main mechanism of reaction of HCAD with HOO•, we have extended the study of such mechanism to a larger set of free radicals with different electrophilic character. We have included the hydroxyl radical (•OH) because it is the most electrophilic⁸⁸ and the most reactive of the oxygen-centered radicals; a series of peroxy radicals including Cl₃COO•, which is one of the most electrophilic among them, and CH₂CHCH₂OO• to mimic lipid peroxy radicals. An equivalent set of alkoxy radicals has also been included, since their reactivity is expected to be in between those of •OH and peroxy radicals; and DPPH because it is frequently used in experiments related to antioxidant behavior. We have also included N₃•, SO₄•⁻, Br₂•⁻, NO₂•, and 2'-deoxyguanosine radical cation (2dG•⁺) since there are experimental data available for them.

The rate constants for the SET reactions with these radicals, taking into account the molar fractions of the HCAD species at pH = 7.4, are reported in Table 6. The available experimental data have also been included in this table. As the values in this table show the studied HCAD are excellent free radical scavengers *via* SET. Their rate constants were found to be in the order of 10⁷–10⁹ M⁻¹ s⁻¹ with a large variety of free radicals, which indicates that HCAD are versatile scavengers.

Upon comparing the calculated data with the experimental one it can be noted that there is an excellent agreement for the reaction with 2dG•⁺, with the calculated values being only 1.22 and 2.05 times lower. For the reactions with N₃•, SO₄•⁻, Br₂•⁻, and NO₂• the difference is larger but still small and in the same direction, with the largest differences corresponding to the reaction with NO₂•. The explanation to these differences is that even though in the experimental reports it was assumed that SET was the only process contributing to deactivate the free radicals; other mechanisms, in particular HT, can have small but significant contributions to the overall reactivity of

Table 6 Calculated rate constants for the SET reactions at 298.15 K in aqueous solution at pH = 7.4. The available experimental values are reported in parenthesis^a

	HFr ⁻ /Frc ²⁻	HCmc ⁻ /Cmc ²⁻	HCfc ⁻ /Cfc ²⁻	HDhc ⁻ /Dhc ²⁻
•OH	1.13 × 10 ⁹	8.90 × 10 ⁸	1.09 × 10 ⁹	1.15 × 10 ⁹
CH ₃ O•	5.75 × 10 ⁷	5.44 × 10 ⁷	8.01 × 10 ⁷	1.54 × 10 ⁷
CCl ₃ O•	9.21 × 10 ⁸	9.27 × 10 ⁸	9.02 × 10 ⁸	9.61 × 10 ⁸
CH ₂ CHCH ₂ O•	5.31 × 10 ⁷	5.02 × 10 ⁷	7.40 × 10 ⁷	1.42 × 10 ⁷
HOO•	5.80 × 10 ⁷	3.72 × 10 ⁷	7.16 × 10 ⁷	1.59 × 10 ⁷
CH ₃ OO•	4.76 × 10 ⁷	1.13 × 10 ⁷	3.92 × 10 ⁷	1.44 × 10 ⁷
CCl ₃ OO•	1.61 × 10 ⁸ (2.8 × 10 ⁷) ³⁷	5.12 × 10 ⁷	1.03 × 10 ⁸ (2.0 × 10 ⁷) ³⁷	3.29 × 10 ⁷
CH ₂ CHCH ₂ OO•	4.70 × 10 ⁷	1.66 × 10 ⁷	4.62 × 10 ⁷	1.36 × 10 ⁷
DPPH	4.26 × 10 ⁷	4.03 × 10 ⁷	5.94 × 10 ⁷	1.14 × 10 ⁷
Br ₂ • ⁻	5.43 × 10 ⁷ (1.8 × 10 ⁸) ³⁶	5.12 × 10 ⁷	7.55 × 10 ⁷	1.45 × 10 ⁷
SO ₄ • ⁻	9.60 × 10 ⁸ (3.2 × 10 ⁹) ²⁸ (3.8 × 10 ⁹) ²⁶	9.63 × 10 ⁸	9.39 × 10 ⁸ (3.9 × 10 ⁹) ²⁸ (5.6 × 10 ⁹) ²⁶	1.00 × 10 ⁹
NO ₂ •	6.01 × 10 ⁷ (7.4 × 10 ⁸) ³⁸	5.56 × 10 ⁷	8.23 × 10 ⁷ (8.6 × 10 ⁸) ³⁸	1.60 × 10 ⁷
N ₃ •	8.19 × 10 ⁸ (4.25 × 10 ⁹) ³⁶	2.12 × 10 ⁶	2.79 × 10 ⁸	1.98 × 10 ⁸
2dG• ⁺	7.99 × 10 ⁸ (1.0 × 10 ⁹) ²⁶	8.20 × 10 ⁸	8.15 × 10 ⁸ (1.7 × 10 ⁹) ²⁶	8.28 × 10 ⁸

^a Ref. 26, 36, and 38 (pH = 7), ref. 28 and 37 (no specification of pH).

HCAD towards free radicals. If our assumption is correct, those contributions would be larger for the reactions with NO₂• than for those with N₃•, SO₄•⁻, and Br₂•⁻. In the particular case of the reactions with CCl₃OO•, the calculated values are larger than those obtained from the experiments. Since the pH at which these experiments were conducted is not specified in ref. 37, it can be hypothesized that they were performed at a pH lower than 7.4. This hypothesis seems to be supported by comparing the experimental rate constants for CCl₃OO• with those of other free radicals that are known to have less electrophilic character.

Since the pH seems to be one of the key factors influencing the reactivity of HCAD towards free radicals, and it was previously reported that their antioxidant efficiency becomes substantially larger as the pH increases from 4 to 8,³⁵ this point has also been addressed in the present work. The dependence of the overall rate coefficients of the reactions between the studied HCAD and HOO• is shown in Fig. 6 for the same range of pH that was experimentally studied. It was

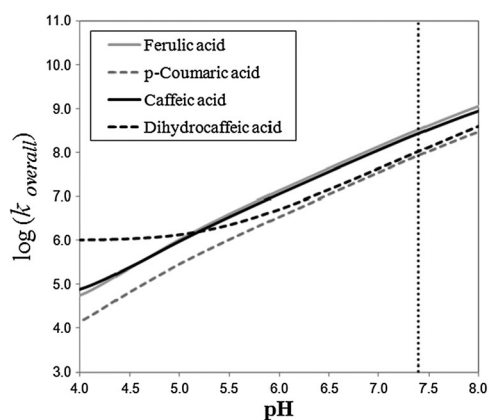


Fig. 6 Variation of the overall rate coefficients with the pH, for the HCAD + HOO• reactions in aqueous solution.

found that the increase in reactivity as the acidity of the environment decreases is quite considerable, in agreement with the observations of Amorati *et al.*³⁵ In the studied range of pH *p*-coumaric acid was found to have a lower rate coefficient, while the reactivities of ferulic and caffeic acids are very similar to each other. Therefore the relative reactivity of these three HDCA in aqueous solution is not expected to be influenced by the pH of the environment.

In contrast it seems to have strong effects on the relative reactivity of dihydrocaffeic acid. At acid pHs (≤ 4.5) the HOO• scavenging activity of dihydrocaffeic acid is considerably higher than those of caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids. At pH ≈ 5.2 it becomes similar to those of caffeic and ferulic acids, while at pH ≥ 6 it is lower. This can be explained based on the rate constants of the different mechanisms of reaction (Table 4). While for dihydrocaffeic acid the HT from the phenolic OHs is in the order of 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ in aqueous solution, those of the other HCAD are one to two orders of magnitude lower. This means that H₂Dhc is expected to exhibit the best peroxy scavenging activity among the studied HCAD at acid pHs. This is because the contributions of the SET-2 process are less important under such conditions due to the significant decrease in the di-anion populations, *i.e.* the HT becomes the main mechanism of reaction. The higher reactivity of H₂Dhc through the HT mechanism can be explained by the electron-donating character of its side chain. Therefore even though in aqueous solution at physiological pH the importance of the side chain is minor, or even negligible, it may be important for the relative scavenging efficiency of the studied compounds at acid pHs, such as those found in some parts of the digestive track.

Conclusions

The peroxy radical scavenging activity of ferulic, *p*-coumaric, caffeic and dihydrocaffeic acids has been studied in lipid and aqueous solutions, using the density functional theory.

To that purpose different mechanisms and reaction sites have been considered as well as the pH in aqueous solution.

It was found that the polarity of the environment plays an important role in the main mechanism leading to the radical scavenging activity of these HCAD. The H transfer from the phenolic OH has been identified as the main mechanism of reaction in non-polar media and in aqueous solution at acid pHs. On the other hand, the single electron transfer mechanism from the phenoxide anion is proposed to be the one contributing the most to the overall peroxyl scavenging activity of HCAD in aqueous solution at physiological (7.4) or more basic pH. This process is also predicted to be a key factor in the reactivity of these compounds towards a large variety of free radicals.

The environment also influences the relative efficiency of the studied compounds. In non-polar environments their order of reactivity was found to be dihydrocaffeic acid > caffeic acid > ferulic acid > *p*-coumaric acid. On the other hand in aqueous solution, at pH = 7.4, this order changes to ferulic acid > caffeic acid > dihydrocaffeic acid > *p*-coumaric acid. However for more acid pHs (≤ 4.5) the HOO \cdot scavenging activity of dihydrocaffeic acid is considerably higher than those of caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids.

The higher reactivity of dihydrocaffeic acid in non-polar media, and in aqueous solution at acid pHs, arises from the HT mechanism and is caused by the electron-donating character of its side chain. Therefore even though in aqueous solution at pH = 7.4 the importance of the side chain is minor, or even negligible, it may be important for the relative scavenging efficiency of the studied compounds in the lipid phase and in the aqueous phase at acid pHs, such as those found in the stomach.

When the H transfer mechanism is the main one, the key factor ruling the order of reactivity of the studied compounds is the other groups in the phenolic moiety. The presence of another OH (catechol group) in caffeic and dihydrocaffeic acids leads to the higher reactivity, the presence of the OCH₃ group (ferulic acid) has an intermediate effect, and the lower reactivity corresponds to the *p*-coumaric acid, which has no other groups in the phenolic moiety. On the other hand when the SET mechanism is the main one, the value of the second pK_a, *i.e.* the relative population of the di-anion, seems to be the key factor since the electron transfer mainly involves the phenoxide anion (SET-2).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo at Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa and the Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGSCA) at Universidad Nacional Autónoma de México. J.R.L.-C. thanks CONACyT for doctoral fellowship. This work was partially supported by a grant from the DGAPA UNAM (PAPIIT-IN209812), and projects SEP-CONACyT 167491 and 167430.

References

- R. J. Robbins, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 2866.
- L.-Z. Lin, J. Harnly, R.-W. Zhang, X.-E. Fan and H.-J. Chen, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 544.
- C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 727.
- P. G. Pietta, *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 1035.
- M. N. Clifford, *J. Sci. Food Agric.*, 1999, **79**, 362.
- D. S. Goldstein, R. Stull, S. P. Markey, E. S. Marks and H. R. Keiser, *J. Chromatogr.*, 1984, **311**, 148.
- See for example: (a) N. F. Boyd and V. McGuire, *Free Radicals Biol. Med.*, 1991, **10**, 185; (b) R. L. Nelson, *Free Radicals Biol. Med.*, 1992, **12**, 161; (c) P. Knekt, A. Reunanen, H. Takkunen, A. Aromaa, M. Heliovaara and T. Hakuunen, *Int. J. Cancer*, 1994, **56**, 379; (d) J. K. Willcox, S. L. Ash and G. L. Catignani, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, **44**, 275; (e) M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncola, M. Izakovic and M. Mazur, *Chem.-Biol. Interact.*, 2006, **160**, 1.
- See for example: (a) R. A. Riemersma, D. A. Wood, C. C. A. Macityre, R. A. Elton, K. F. Gey and M. F. Oliver, *Lancet*, 1991, **337**, 1; (b) J. T. Salonen, K. Nyyssonen, H. Korpela, J. Tuomilehto, R. Seppanen and R. Salonen, *Circulation*, 1992, **86**, 803; (c) D. A. Street, G. Comstock, R. Salkeldy and M. Klag, *Circulation*, 1994, **90**, 1154; (d) N. G. Stephens, A. Parsons, P. M. Schofield, F. Kelly, K. Cheesman, M. J. Mitchinson and M. J. Brown, *Lancet*, 1996, **347**, 781.
- See for example: (a) O. M. Panasenکو, T. V. Nova, O. A. Azizova and Y. A. Vladimirov, *Free Radicals Biol. Med.*, 1991, **10**, 137; (b) D. Steinberg, *Circulation*, 1991, **84**, 1421; (c) D. R. Janero, *Free Radicals Biol. Med.*, 1991, **11**, 129; (d) H. N. Hodis, W. J. Mack, L. LaBree, L. Cashin-Hemphill, A. Sevanian, R. Johnson and S. Azen, *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, 1995, **273**, 1849.
- See for example: (a) K. Braekke, N. K. Harsem and A. C. Staff, *Pediatr. Res.*, 2006, **60**, 560; (b) A. Biri, N. Bozkurt, A. Turp, M. Kavutcu, O. Himmetoglu and I. Durak, *Gynecol. Obstet. Invest.*, 2007, **64**, 187; (c) Z. Hracsko, H. Orvos, Z. Novak, A. Pal and I. S. Varga, *Redox Rep.*, 2008, **13**, 11.
- See for example: (a) Y. Christen, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, **71**, 621S; (b) B. Halliwell, *Drugs Aging*, 2001, **8**, 685; (c) D. A. Butterfield, *Free Radical Res.*, 2002, **36**, 1307.
- M.-E. Cuvelier, H. Richard and C. Berset, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 1992, **56**, 324.
- A. S. Meyer, J. L. Donovan, D. A. Pearson, A. L. Waterhouse and E. N. Frankel, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 783.
- C. A. Rice-Evans, N. J. Miller and G. Paganga, *Free Radicals Biol. Med.*, 1996, **20**, 933.
- F. Natella, M. Nardini, M. Di Felice and C. Scaccini, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 1453.
- E. Cartron, M. A. Carbonneau, G. Fouret, B. Descomps and C. L. Leger, *J. Nat. Prod.*, 2001, **64**, 480.
- J.-C. Cheng, F. Dai, B. Zhou, L. Yang and Z.-L. Liu, *Food Chem.*, 2007, **104**, 132.
- I. Medina, J. M. Gallardo, M. J. Gonzalez, S. Lois and N. Hedges, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 3889.
- P. Terpine, T. Polak, N. Segatin, A. Hanzlowsky, N. P. Ulrih and H. Abramovic, *Food Chem.*, 2011, **128**, 62.
- E. Pino, A. M. Campos, C. Lopez-Alarcon, A. Aspee and E. Lissi, *J. Phys. Org. Chem.*, 2006, **19**, 759.
- Y. Kadoma and S. Fujisawa, *Molecules*, 2008, **13**, 2488.
- S. Foley, S. Navaratnam, D. J. McGarvey, E. J. Land, T. G. Truscott and C. A. Rice-Evans, *Free Radicals Biol. Med.*, 1999, **26**, 1202.
- P. Terpine and H. Abramovic, *Food Chem.*, 2010, **121**, 366.
- H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama and H. Taniguchi, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 2161.
- M. C. Foti, C. Daquino and C. Geraci, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 2309.
- J. H. Chen and C.-T. Ho, *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 2374.
- Y. Jiang, W.-z. Lin, S.-d. Yao, N.-y. Lin and D.-y. Zhu, *Radiat. Phys. Chem.*, 1999, **54**, 349.
- H. Zhu, H. Zhao, Z. Zhang, W. Wang and S. Yao, *Radiat. Environ. Biophys.*, 2006, **45**, 73.
- W.-M. Wu, L. Lu, Y. Long, T. Wang, L. Liu, Q. Chen and R. Wang, *Food Chem.*, 2007, **105**, 107.
- N. Miller, A. T. Diplock and C. Rice-Evans, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 1794.
- V. Kristinova, R. Mozuraityte, I. Storro and T. Rustad, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 10377.
- R. Apak, K. Guclu, B. Demirata, M. Ozyurek, S. E. Celik, B. Bektasoglu, K. I. Berker and D. Ozyurt, *Molecules*, 2007, **12**, 1496.

- 33 J.-H. Moon and J. Terao, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 5062.
- 34 F. A. M. Silva, F. Borges, C. Guimaraes, J. L. F. C. Lima, C. Matos and S. Reis, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 2122.
- 35 R. Amorati, G. F. Pedulli, L. Cabrini, L. Zambonin and L. Landi, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 2932.
- 36 W. Lin, S. Navaratnam, S. Yao and N. Lin, *Radiat. Phys. Chem.*, 1998, **53**, 425.
- 37 J.-X. Pan, W.-F. Wang, W.-Z. Lin, C.-Y. Lu, Z.-H. Han, S.-D. Yao and N.-Y. Lin, *Free Radical Res.*, 1999, **30**, 241.
- 38 Z. Zhouen, Y. Side, L. Weizhen, W. Wenfeng, J. Yizun and L. Nianyun, *Free Radical Res.*, 1998, **29**, 13.
- 39 B. Krimmel, F. Swoboda, S. Solar and G. Reznicek, *Radiat. Phys. Chem.*, 2010, **79**, 1247.
- 40 L. Kong, Z.-L. Sun, L.-F. Wang, H.-Y. Zhang and S.-D. Yao, *Helv. Chim. Acta*, 2004, **87**, 511.
- 41 M. Nsangou, J. J. Fifen, Z. Dhaouadi and S. Lahmar, *THEOCHEM*, 2008, **862**, 53.
- 42 M. Leopoldini, S. G. Chiodo, N. Russo and M. Toscano, *J. Chem. Theor. Comput.*, 2011, **7**, 4218.
- 43 Y. Zhao, N. E. Schultz and D. G. Truhlar, *J. Chem. Theor. Comput.*, 2006, **2**, 364.
- 44 A. V. Marenich, C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 6378.
- 45 C. Zavala-Oseguera, J. R. Alvarez-Idaboy, G. Merino and A. Galano, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 13913.
- 46 E. Velez, J. Quijano, R. Notario, E. Pabón, J. Murillo, J. Leal, E. Zapata and G. Alarcon, *J. Phys. Org. Chem.*, 2009, **22**, 971.
- 47 A. Vega-Rodriguez and J. R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, **11**, 7649.
- 48 A. Galano and J. R. Alvarez-Idaboy, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 5114.
- 49 G. Black and J. M. Simmie, *J. Comput. Chem.*, 2010, **31**, 1236.
- 50 T. Furuncuoglu, I. Ugur, I. Degirmenci and V. Aviyente, *Macromolecules*, 2010, **43**, 1823.
- 51 Y. Zhao and D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112**, 1095.
- 52 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision A.02*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.
- 53 Y. Okuno, *Chem.-Eur. J.*, 1997, **3**, 212.
- 54 *The Foundations of Chemical Kinetics*, ed. S. W. Benson, McGraw-Hill, New York, 1960, ch. XV.
- 55 J. R. Alvarez-Idaboy and A. Galano, *Theor. Chem. Acc.*, 2010, **126**, 75.
- 56 X. W. Sheng, L. Mentel, O. V. Gritsenko and E. J. Baerends, *J. Comput. Chem.*, 2011, **32**, 2896.
- 57 A. Galano and J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Comput. Chem.*, 2006, **27**, 1203.
- 58 H. Eyring, *J. Chem. Phys.*, 1935, **3**, 107.
- 59 M. G. Evans and M. Polanyi, *Trans. Faraday Soc.*, 1935, **31**, 875.
- 60 D. G. Truhlar, W. L. Hase and J. T. Hynes, *J. Phys. Chem.*, 1983, **87**, 2664.
- 61 D. G. Truhlar and A. Kuppermann, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 1840.
- 62 (a) R. A. Marcus, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1965, **16**, 155; (b) R. A. Marcus, *Rev. Mod. Phys.*, 1993, **65**, 599; (c) R. A. Marcus, *Pure Appl. Chem.*, 1997, **69**, 13.
- 63 F. C. Collins and G. E. Kimball, *J. Colloid Sci.*, 1949, **4**, 425.
- 64 F. Z. Erdemgil, S. Sanli, N. Sanli, G. Ozkan, J. Barbosa, J. Guiteras and J. L. Beltran, *Talanta*, 2007, **72**, 489.
- 65 J. L. Beltran, N. Sanli, G. Fonrodona, D. Barron, G. Ozkan and J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **484**, 253.
- 66 IUPAC Ionization Constants of Organic Acids in Aqueous Solutions, Pergamon Press, Oxford, 1979.
- 67 H. Sies, *Exp. Physiol.*, 1997, **82**, 291.
- 68 S. Itagaki, T. Kurokawa, C. Nakata, Y. Saito, S. Oikawa, M. Kobayashi, T. Hirano and K. Iseki, *Food Chem.*, 2009, **114**, 466.
- 69 (a) T. Masuda, K. Yamada, T. Maekawa, Y. Takeda and H. Yamaguchi, *Food Sci. Technol. Res.*, 2006, **12**, 173; (b) T. Masuda, K. Yamada, T. Maekawa, Y. Takeda and H. Yamaguchi, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 6069.
- 70 A. D. N. J. De Grey, *DNA Cell Biol.*, 2002, **21**, 251.
- 71 R. C. Rose and A. M. Bode, *FASEB J.*, 1993, **7**, 1135.
- 72 A. Galano, D. X. Tan and R. J. Reiter, *J. Pineal Res.*, 2011, **51**, 1.
- 73 M. Belcastro, T. Marino, N. Russo and M. Toscano, *Theor. Chem. Acc.*, 2006, **115**, 361.
- 74 M. Leopoldini, N. Russo, S. Chiodo and M. Toscano, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 6343.
- 75 M. Leopoldini, F. Rondinelli, N. Russo and M. Toscano, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 8862.
- 76 M. Leopoldini, N. Russo and M. Toscano, *Food Chem.*, 2011, **125**, 288.
- 77 A. Perez-Gonzalez and A. Galano, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 1306.
- 78 J. R. León-Carmona and A. Galano, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 4538.
- 79 (a) A. Galano and M. Francisco-Marquez, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 11338; (b) A. Martinez, R. Vargas and A. Galano, *Theor. Chem. Acc.*, 2010, **127**, 595.
- 80 A. Galano, M. Francisco-Marquez and J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 8590.
- 81 A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, M. Francisco-Marquez and M. E. Medina, *Theor. Chem. Acc.*, 2012, **131**, 1173.
- 82 A. Martínez, A. Galano and R. Vargas, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 12591.
- 83 A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy and M. Francisco-Marquez, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 13101.
- 84 A. Galano, M. Francisco-Marquez and J. R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 11199.
- 85 A. Galano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 7147.
- 86 A. Galano and M. Francisco-Marquez, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 16077.
- 87 A. Galano and J. R. Alvarez-Idaboy, *RSC Adv.*, 2011, **1**, 1763.
- 88 W. A. Pryor, *Free Radicals Biol. Med.*, 1988, **4**, 219.