



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**“ESTUDIO TEÓRICO DEL EDARAVONE
Y SUS DERIVADOS COMO AGENTES QUÍMICOS
PARA COMBATIR EL ESTRÉS OXIDATIVO”**

Tesis que presenta

Q.I. ADRIANA PÉREZ GONZÁLEZ

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS (QUÍMICA)

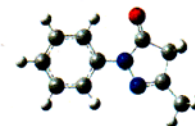
ASESORA:

DRA. ANNIA GALANO JIMÉNEZ

JURADO CALIFICADOR:

Presidente:	DR. JOSÉ LUIS GÁZQUEZ MATEOS	UAM-I
Secretario:	DR. JORGE GARZA OLGUÍN	UAM-I
Vocal:	DR. ALBERTO VELA AMIEVA	CINVESTAV
Vocal:	DR. ROBÍN PREENJA SAGAR	UAM-I
Vocal:	DRA. ZAIRA JULIETA DOMÍNGUEZ ESQUIVEL	Universidad Veracruzana

México, D.F., Abril 2013



DEDICATORIA

De manera muy especial a mi amado esposo José Luis Jiménez Bernavé y a mi amado hijo José Luis Jiménez Pérez, por ser la alegría de mi vida y mi fortaleza de día a día y por que sin su apoyo incondicional y gran amor este triunfo en nuestras vidas no sería posible.

De manera muy especial a mis queridos padres Benigna González Castro y Esteban Pérez García, a mis queridos hermanos Irma Pérez González y Abraham Pérez González, por su gran ejemplo de lucha, esfuerzo y dedicación necesarios para obtener un triunfo más de vida. Y sobre todo por su gran cariño.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme vivir y estar conmigo en cada paso que doy, por haberme permitido cumplir mis metas junto con mi familia, por toda la salud que nos ha regalado y sobre todo por su infinito amor.

A mi amado esposo, José Luis Jiménez Bernavé, por todo su amor, compañía, amistad y apoyo incondicional, por toda la felicidad que me ha dado y porque los dos unidos hacemos un excelente equipo para seguir cumpliendo cada uno de nuestros objetivos; TE AMO.

A mi hijo adorado, José Luis Jiménez Pérez, porque tú eres mi principal motivo para seguir adelante, eres la luz de mi vida; TE AMO.

A mis padres, Benigna González Castro y Esteban Pérez García, por darme la vida, por todo su amor y compañía en los buenos y en los malos momentos y por su incondicional apoyo, los quiero mucho.

A mis hermanos, Irma Pérez González y Abraham Pérez González, por todo su cariño, por el ejemplo de esfuerzo y lucha que me brindan, por su compañía y apoyo en los buenos y difíciles momentos, los quiero mucho.

A mi asesora, Dra. Annia Galano Jiménez, por su excelente asesoría, su gran apoyo y motivación, por todos sus consejos, observaciones y enseñanza, por impulsar mi formación profesional.

A mis amigos y compañeros, por el apoyo que me brindaron en cada día de nuestra experiencia académicamente, por todas sus palabras de motivación y sobre todo por su amistad.

A mis maestros, por cada una de sus enseñanzas, observaciones y consejos, por compartirme sus experiencias.

Al Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo de UAM - Iztapalapa por el acceso a sus facilidades de cómputo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo y patrocinio para la realización de esta tesis doctoral.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
CAPITULO 1	6
1.1 INTRODUCCIÓN	6
1.2 OBJETIVOS	11
1.2.1 General	11
1.2.2 Particulares	11
1.3 HIPÓTESIS	12
CAPITULO 2	13
MARCO TEÓRICO	13
2.1 Teoría de Funcionales de la Densidad (TFD)	13
2.2 Teoremas de Hohenberg y Kohn	14
2.3 Método Kohn-Sham	15
2.4 Aproximaciones a la TFD	17
2.5 Ventajas y desventajas de la TFD	18
2.6 Funcional M05-2X	19
2.7 Teoría del propagador del electrón (TPE)	20
2.8 Geometría molecular	22
2.9 Modelo de solvatación	24
2.10 Correcciones	27
2.10.1 Estado estándar 1M	27
2.10.2 Corrección de volumen libre	27
CAPITULO 3	29
METODOLOGÍA	29
3.1 Cálculos termodinámicos y cinéticos	29
3.2 Descriptores químicos	31
3.3 Mecanismos considerados	34
CAPITULO 4	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35

4.1	Confiabilidad de M05-2X	35
4.2	Edaravone	40
4.2.1	Tautómeros y forma aniónica	40
4.3	Reactividad de Edaravone y sus derivados	42
4.3.1	Propuesta de derivados de Edaravone	42
4.3.2	Capacidad electrodonadora	44
4.3.3	Afinidad protónica	51
4.3.4	<i>p</i> Kas y fracciones molares a <i>p</i> H fisiológico	53
4.3.5	Propuesta de eficiencia antioxidante según descriptores químicos	55
4.4	Mecanismo de transferencia electrónica	60
4.4.1	Termodinámica	60
4.4.2	Cinética	65
4.5	Comparación de la actividad antioxidante total de Edaravone y sus derivados	71
4.5.1	Reacción de EDA + $\cdot\text{OH}$	71
4.5.2	Reacción del derivado A2 (piridil) con $\cdot\text{OH}$	83
4.5.3	Actividad antioxidante relativa de Edaravone y sus derivados	89
CAPITULO 5		100
CONCLUSIONES		100
CAPITULO 6		102
PERSPECTIVAS		102
REFERENCIAS		103
ANEXOS		116
ARTÍCULOS RELACIONADOS CON LA TESIS		135

ABREVIATURAS

AP:	Afinidad protónica.
CE:	Capacidad electrodonadora.
DAP:	Diferencia absoluta promedio.
EAP:	Error absoluto promedio.
EDA:	Edaravone.
EMA:	Errores máximos absolutos
ET:	Estado de transición.
f_a :	Fracción molar de la forma aniónica.
FAR:	Formación de aducto radicalico.
FD:	Facilidad de desprotonación.
FP:	Fuerza polar.
GGA:	Aproximación de gradiente generalizado.
HF:	Hartree Fock.
Hyper-GGA:	Hiper-aproximación de gradiente generalizado.
IRC:	Coordenada de reacción intrínseca.
KS:	Kohn-Sham.
LDA:	Aproximación de densidad local.
Meta-GGA:	Meta-aproximación de gradiente generalizado.
OVGF:	Aproximación de la función de Green de capa de valencia (TPE).
P3:	Aproximación parcial de tercer orden (TPE).
P-EAP:	Promedio de EAP.
PI:	Potenciales de ionización.
ROS:	Especies oxigenadas reactivas.

RPA:	Aproximación de fase aleatoria.
SASA:	Área superficial accesible al solvente.
SCRF:	Campo de reacción autoconsistente.
SEP:	Superficie de energía potencial.
TES:	Transferencia electrónica simple.
TFD:	Teoría de funcionales de la densidad.
TH:	Transferencia de hidrógeno.
TPE:	Teoría del propagador del electrón.
TSPE:	Transferencia secuencial protón-electrón.
TST:	Teoría convencional del estado de transición.
ZCT:	Tunelaje de curvatura cero.

RESUMEN

Se estudió la actividad antirradicálica de Edaravone (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona, EDA) y 26 de sus derivados usando la teoría de funcionales de la densidad, en particular el funcional M05-2X. En todos los casos se consideraron tanto la forma aniónica como neutra. Reportamos por primera vez sus potenciales de ionización, afinidades protónicas y pK_a s con la finalidad de evaluar sus capacidades electrodonadoras y de desprotonación. Se confirmó que la teoría de propagador del electrón conduce a los mejores resultados para potenciales de ionización, en particular la aproximación parcial de tercer orden produjo el error absoluto promedio más bajo. Según sus capacidades electrodonadoras y facilidades de desprotonación se propusieron derivados que deben actuar tan eficientemente, o incluso mejor, que EDA. Se estudiaron las reacciones de transferencia electrónica de EDA y sus 26 derivados hacia 11 radicales libres. La mayor parte de los compuestos se reportan como capaces de depurar eficientemente los radicales libres estudiados con constantes de velocidad en el rango de límite por difusión. Se encontró que el equilibrio ácido-base juega un rol importante en sus actividades. Se comparó la actividad antirradicálica de EDA y su derivado A2 hacia el radical $\cdot\text{OH}$, considerando todos los mecanismos de reacción posibles. Las constantes de velocidad globales de ambos están en el límite por difusión en solución acuosa y se encuentran en excelente acuerdo con los datos experimentales disponibles. Se comparó la actividad antirradicálica de EDA y sus derivados A2, C1 y D1 hacia radicales $\cdot\text{OOH}$. Se encontró que en medio polar la actividad depuradora de radicales peroxilo de estos compuestos es sobresaliente y se debe principalmente a sus formas aniónicas. El medio circundante de la reacción es muy importante para la actividad antirradicálica, tanto la polaridad como el pH en solución acuosa. Se propone que la actividad de estos compuestos se puede incrementar en medio lipídico, por funcionalización en la estructura de EDA. Se propone al mecanismo de transferencia secuencial protón electrón como el determinante en la actividad depuradora de radicales libres para EDA y sus derivados en solución acuosa.

ABSTRACT

The radical scavenging activity of Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, EDA) and 26 derivatives has been studied using the density functional theory, in particular the M05-2X functional. In all cases both, the neutral and anionic forms were considered. We report for the first time their ionization potentials, proton affinities and pK_a s in order to assess their electron-donating capabilities and the easies of deprotonation. It was confirmed that electron propagator theory leads to the best results of ionization potentials; in particular the partial third-order approximation has the lowest mean unsigned error. According to their electron-donating capabilities and the easies of deprotonation ideal candidates to perform as efficiently as, or even better than, EDA itself are proposed. The single electron transfer reactions from EDA and its 26 derivatives to 11 free radicals have been studied. All of the studied compounds were found to be able of efficiently scavenging the radicals with rate constants near the diffusion-limited regime. The acid-base equilibrium was found to play an important role in such activity. The $\cdot\text{OH}$ scavenging activities of EDA and its derivative A2 have been compared, considering all possible reaction mechanisms. Their overall rate coefficients were found to be diffusion-limited, in aqueous solution and are in excellent agreement with the available experimental results. The $\cdot\text{OOH}$ scavenging activity of EDA and its derivatives A2, C1, and D1 has also been analyzed. It was found to be outstanding in polar media and it is mainly attributed to the presence of the anionic forms under such conditions. The surrounding environment is very important for the scavenging activity, both the polarity and the pH in aqueous solution. It is proposed that the activity of these compounds in lipid medium can be increased by functionalization of the EDA structure. For EDA and its derivatives the sequential proton-electron transfer mechanism was found to be the largest contributor to their scavenging reactivity in aqueous solution.

CAPITULO 1

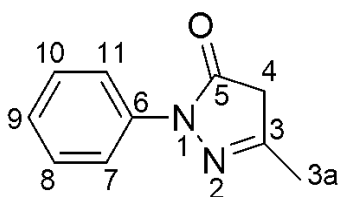
1.1 INTRODUCCIÓN

Diariamente en nuestro entorno existen factores tales como los psicológicos, genéticos, nutricionales y ambientales que generan en nuestras células especies oxigenadas reactivas (ROS). Estas incluyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidro-peróxidos orgánicos (ROOH), el ácido hipocloroso (HClO), el oxígeno singulete 1O_2 y radicales libres tales como el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radicales peroxilo ($ROO\cdot$), radicales alcoxilo ($RO\cdot$), y radicales lípido-peroxilo ($LOO\cdot$).¹⁻⁵ Todos ellos pueden llegar a ser dañinos hacia especies biológicas, por ejemplo el radical hidroxilo es particularmente inestable y reacciona rápidamente y de forma no específica con la mayoría de las moléculas biológicas, dañando severamente las células o incluso provocando muerte celular. Cuando la concentración de ROS en nuestro organismo es mayor a los límites saludables, ocurre el llamado “estrés oxidativo” que no es más que el daño provocado por estas especies a componentes celulares y moléculas biológicas tales como el ADN, carbohidratos, lípidos, proteínas y membranas celulares.^{6,7} Por los daños que causan las ROS se producen algunas alteraciones en nuestro organismo como desordenes metabólicos, inhibición de la replicación celular e incluso inhibición de la expresión genética.

Esto ha generado gran atención en las últimas décadas debido al incremento de evidencias sobre el papel que juega el estrés oxidativo en el desarrollo de un gran número de enfermedades, tales como el cáncer,⁸⁻¹¹ desordenes cardiovasculares,¹²⁻¹⁶ arterioesclerosis,¹⁷⁻²⁰ y Alzheimer.²¹⁻²⁵ Como el estrés oxidativo frecuentemente involucra reacciones entre moléculas biológicas y radicales libres, el estudio de compuestos antirradicálicos ó depuradores de radicales libres, también conocidos como antioxidantes, es un área importante de investigación para prevenir el estrés oxidativo y el daño molecular que éste ocasiona.

El edaravone (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona, EDA, Esquema I), también conocido como MCI-186, es un nuevo fármaco neuroprotector, recientemente desarrollado en Japón, donde fue el primer depurador de radicales libres aprobado para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares agudos causados por trombosis cerebral y embolia.²⁶ Este compuesto ha sido utilizado con éxito en pacientes diversos desde Abril del 2001.²⁶ Se han

realizado numerosos estudios dedicados a investigar el efecto preventivo del EDA contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Por ejemplo Yamamoto y col.²⁷ mostraron que el tratamiento con EDA reduce el daño celular oxidativo en cerebros de rata. Sus efectos benéficos en procesos de arterioesclerosis y en pacientes con enfermedades cardiovasculares se estudió recientemente por Higashi y col.²⁸ EDA ha probado tener efecto protector contra el daño renal causado por estrés oxidativo, *in vitro* y *in vivo*.²⁹ Además atenúa el estrés ocasionado por radicales $\cdot\text{OH}$ en ratas diabéticas.^{30,31} Se mostró que EDA también suprime eficientemente la peroxidación^{32,33} y el daño oxidativo del ADN,³² al igual que tiene una gran eficiencia para bloquear radicales libres en el hígado.³⁴



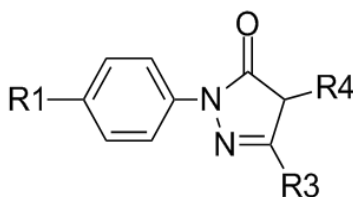
Esquema I. Edaravone

En cuanto a la actividad antioxidante de EDA la información es realmente escasa. Se ha sugerido que la forma aniónica de EDA es más reactiva que la forma no iónica,^{35,36} por tanto si este es el caso, es importante considerar el análisis de la facilidad de desprotonación (FD) de su especie no iónica. En el caso particular de su actividad depuradora ante radicales $\cdot\text{OH}$, se reportó que EDA reacciona produciendo un producto de oxidación estable (ácido butanoico-2-oxo-3-(fenilhidrazona)) a través de un intermediario radicalico.^{35,37} Lin y col.³⁸ propusieron aductos $\cdot\text{OH}$ como el principal producto intermediario. También reportaron que la constante de velocidad de la reacción entre EDA y $\cdot\text{OH}$ es $8.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este resultado está limitado por difusión y es 3.5 veces más bajo que el previamente reportado por Abe y col.³⁹ ($3.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

También hay estudios teóricos sobre la actividad depuradora de EDA hacia radicales libres. Ono y col.³⁷ estudiaron la factibilidad termoquímica de las reacciones entre diferentes radicales y un compuesto modelo en el cual el anillo fenólico de EDA fue

remplazado por un grupo metil. Wang y Zang⁴⁰ estudiaron la reacción entre \cdot DPPH y la forma neutra de EDA, y concluyeron que la transferencia del átomo de hidrógeno (TH) es más favorable que la transferencia electrónica (TES). Sin embargo, no hay estudios cinéticos previos que permitan tener las contribuciones de los diferentes mecanismos sobre la reactividad general de EDA hacia diferentes radicales ni la proporción de los productos formados.

Por todos los efectos benéficos de EDA sobre diversos padecimientos, hay un creciente interés en la síntesis de sus derivados, diseñados para potenciar la actividad antioxidante. Además se reportó que los derivados de EDA, obtenidos por funcionalización en su estructura (Esquema II), ofrecen una amplia variedad de posibilidades farmacéuticas. Por ejemplo algunos de ellos han probado tener una excelente actividad antiviral,^{41,42} para inhibir el agente de la tuberculosis,⁴³ para actuar como agentes antitumorales,^{44,45} y para ser útiles en el tratamiento médico del cáncer y enfermedades relacionadas.⁴⁶



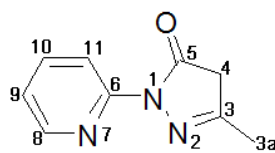
Esquema II. EDA: R1=H, R3=CH₃, y R4=H.

Nakagawa y col.⁴⁷ sintetizaron una gran variedad de derivados de EDA con sustituyentes de diferente naturaleza (grupos electro-atractores, grupos electro-donadores, y grupos π -conjugados) en los sitios 1, 3, y 4 de la estructura de EDA (Esquema II). Encontraron un derivado (3-metil-1-(piridin-2-il)-5-pirazolona, piridil, Esquema III) con mejor actividad antioxidante que EDA cuando reacciona con el radical \cdot OH por TES, en solución acuosa. Para llegar a esta conclusión se basaron en la concentración necesaria para reducir el efecto oxidativo al 50 %, es decir, en el valor de IC₅₀, que según Nakagawa para el piridil es 13.9 veces más bajo que el del EDA. También propusieron que existen dos factores influenciando tal actividad: el potencial de oxidación y la cantidad de forma aniónica. Por tanto se encuentra en total acuerdo con reportes que proponen que la forma

aniónica tiene mayor actividad antioxidante que la forma neutra, cuando reacciona con radicales libres a través del mecanismo de transferencia electrónica en medio polar.^{35,36,39}

Por su parte Hata y col.⁴⁸ determinaron las constantes de velocidad de las reacciones de este mismo compuesto (piridil) y del EDA con $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{N}_3$, usando la técnica de pulso de radiólisis. Los valores reportados para la reacción del piridil con $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{N}_3$ fueron $7.8 \pm 0.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $4.1 \pm 0.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. Para la reacción del EDA con $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{N}_3$ las constantes de velocidad reportadas fueron $8.5 \pm 0.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $5.8 \pm 0.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente. Así ellos sugieren que la actividad antioxidante del EDA es ligeramente mayor que la del piridil, contrario a lo propuesto por Nakagawa y col.⁴⁷ Sin embargo las constantes de velocidad mencionadas anteriormente corresponden a reacciones controladas por difusión. Esto significa que ambos compuestos son excelentes depuradores de $\cdot\text{OH}$, pero también significa que por su alta reactividad este radical no es la mejor opción para comparar la actividad antioxidante de las especies. De hecho sus constantes de velocidad son muy similares y las pequeñas diferencias podrían deberse incluso a errores inherentes al experimento. Además se ha propuesto que el radical $\cdot\text{OH}$ frecuentemente reacciona en el rango de límite por difusión con una gran variedad de compuestos químicos, lo cual podría conducir a conclusiones erróneas con respecto a la capacidad antioxidante relativa de los compuestos comparados.^{49,50}

Un aspecto muy importante del estudio de la actividad antioxidante de compuestos químicos es precisamente identificar aquellos que posean mayor actividad, por tanto se recomienda realizar las comparaciones basándose en radicales menos reactivos. Para tal propósito se propuso el radical hidropéroxilo ($\cdot\text{OOH}$), el cual es significativamente menos reactivo que $\cdot\text{OH}$, y entonces se espera que exista una gran diferencia entre la reactividad relativa de los compuestos estudiados, es decir, que la diferencia entre los valores de sus constantes de velocidad sea mayor.



Piridil

Esquema III. Estructura y numeración del piridil.

Por otra parte Chegaev y col.⁵¹ obtuvieron una serie de derivados del EDA con grupos NO-donadores, y los encontraron con alto poder antioxidante junto con propiedades NO-dependientes. Propusieron que la actividad antioxidante es principalmente modulada por la lipofilidad, pues sustituyentes lipofílicos en los derivados del EDA incrementan la actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica. Es decir, los derivados de EDA con grupos NO-donadores son capaces de proteger membranas de la autoxidación en una manera proporcional a su habilidad de absorberse en la bicapa lipídica. Con lo cual se considera importante analizar la influencia de la polaridad de los ambientes en los que se realice el estudio de la actividad antirradicálica de EDA y sus derivados, es decir, si pueden ser más eficaces en medios polares como los acuosos, o medios no polares como los lipídicos.

En cuanto a los mecanismos de reacción involucrados en la actividad antirradicálica del EDA y sus derivados existen diferentes propuestas, entre las cuales está la TES como uno de los mecanismos que más contribuye a la reactividad total del EDA en solución acuosa.^{35,36,38,39,47} Por su parte, el derivado piridil según Hata y col.⁴⁸ actúa por TES y por formación de aducto radicálico (FAR), y según Nakagawa y col.⁴⁷ actúa por TES. Sin embargo, estas propuestas no se han comparado y además no existe ninguna para el resto de los derivados.

En base a toda la información antes mencionada se hace evidente la necesidad de realizar más estudios termodinámicos y cinéticos que nos permitan elucidar el o los mecanismos de acción antirradicálica del EDA y sus derivados hacia diferentes especies radicálicas, así como las contribuciones que puedan tener cada uno de ellos. Los mecanismos más comúnmente asociados a la actividad antioxidante de compuestos químicos son: TES, FAR, TH y transferencia secuencial protón-electrón (TSPE).

Así mismo no se ha considerado hasta el momento el efecto que pueda tener el medio circundante en la actividad de este tipo de compuestos, es decir, si su actividad se incrementa en ambientes polares (acuoso) o no polares (lipídico). Tampoco hay información con respecto a cuán importantes son los diferentes mecanismos dependiendo de que la especie que reacciona sea iónica o no iónica. Otro aspecto que falta por explorar más a fondo es el efecto de los sustituyentes en la actividad antirradicálica de este tipo de compuestos y su posible relación estructura actividad. Además no se ha cuantificado la

reactividad relativa de las especies iónicas y no iónicas, por lo cual la mayor actividad de los aniones sigue siendo una hipótesis sin demostrar. Asimismo hasta el momento no se han reportado propiedades fundamentales de estos compuestos tales como potenciales de ionización, afinidades protónicas y constantes de acidez (pK_a). Es por ello que el presente trabajo está dedicado principalmente a aportar nueva información que permita ampliar el conocimiento en estos aspectos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 General

Estudiar la acción antirradicálica relativa del EDA y sus derivados, hacia diferentes radicales libres, considerando diferentes mecanismos de reacción y medios circundantes.

1.2.2 Particulares

- Identificar los mecanismos principales involucrados en la reacción del EDA y el radical $\cdot\text{OH}$ en medio polar y no polar.
- Estimar potenciales de ionización, afinidades protónicas y pK_a s de los derivados del EDA.
- Cuantificar la capacidad antioxidante del EDA y sus derivados frente a radicales libres de diferente naturaleza química, con base a la información termodinámica y cinética de las reacciones.
- Identificar los derivados del EDA más eficientes para actuar como depuradores de radicales libres.
- Evaluar la influencia del medio en la actividad depuradora.
- Establecer la importancia relativa de las especies iónicas y neutras en la actividad depuradora de especies radicálicas en medio acuoso.

1.3 HIPÓTESIS

Sabiendo que el Edaravone es un nuevo fármaco eficaz con propiedades antirradicálicas, es de suponer que sus derivados también lo sean. Además se asume que cambios estructurales como la presencia de diferentes sustituyentes puedan utilizarse para modular su actividad. También se espera que ésta se vea influenciada por el radical particular involucrado en la reacción, así como por el medio circundante.

CAPITULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Teoría de Funcionales de la Densidad (TFD)

La Química Teórica ha demostrado ser muy útil en el estudio de la reactividad química y si bien existen numerosas metodologías disponibles para sistemas de tamaño mediano como es el caso del EDA, los métodos que han probado ser la mejor opción son los desarrollados dentro del marco de la teoría de funcionales de la densidad (TFD). Esto se debe al excelente compromiso calidad-tiempo de cómputo que los caracteriza.

La base de la TFD son los teoremas de Hohenberg y Kohn,⁵² los cuales establecen que la energía electrónica del estado basal está determinada completamente por la densidad electrónica (ρ). Es decir, existe una correspondencia unívoca entre la densidad electrónica del sistema y la energía. Una demostración intuitiva del por qué la densidad define completamente al sistema fue dada por E. B. Wilson, quién según N. C. Handy, le realizó los siguientes comentarios a W. Kohn cuando presentaba su primer artículo sobre la TFD en una conferencia de 1965:⁵³

- La integral de la densidad define el número de electrones.
- La cúspide en la densidad define la posición del núcleo.
- La forma de la cúspide determina los núcleos específicos.

La relevancia de los teoremas de Hohenberg y Kohn es tal vez mejor ilustrada al compararla con el enfoque de la función de onda. Una función de onda para un sistema de N electrones contiene $4N$ variables, tres espaciales y una coordenada de espín para cada electrón. La densidad electrónica es el módulo al cuadrado de la función de onda integrada sobre $N-1$ electrones. Cada densidad electrónica únicamente depende de tres coordenadas espaciales independiente del número de electrones. Así mientras la complejidad de una función de onda incrementa considerablemente con respecto al número de electrones, la densidad electrónica tiene el mismo número de variables, independiente del tamaño del sistema.

2.2 Teoremas de Hohenberg y Kohn

Los teoremas de Hohenberg y Kohn son los siguientes:

- 1 Para un sistema multielectrónico en su estado basal, la densidad electrónica exacta del estado base $[\rho_0(\vec{r})]$ tiene una relación unívoca con el potencial externo $[v(\vec{r})]$, así dado que ψ es un funcional de v , entonces se puede establecer que la función de onda es un funcional de ρ , y en consecuencia cualquier observable relacionado con el estado basal es un funcional de la densidad, como lo es la energía.

$$\rho(\vec{r}) \rightarrow v(\vec{r}) \rightarrow \psi \rightarrow \hat{H} \rightarrow E \quad (1)$$

En el lenguaje de TFD, la energía es un funcional único de la densidad electrónica:

$$E[\rho(\vec{r})] = F[\rho(\vec{r})] + \int d\vec{r} \rho(\vec{r})v(\vec{r}), \quad (2)$$

$$F[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho], \quad (3)$$

donde F representa el funcional universal de Hohenberg y Kohn, $T[\rho]$ la energía cinética electrónica y $V_{ee}[\rho]$ el potencial de las repulsiones electrón-electrón, como funcionales de la densidad.

- 2 Usando la densidad electrónica como una variable básica, existe un principio variacional análogo al de la mecánica cuántica. Dada una densidad electrónica aproximada $\rho'(\vec{r})$, asumida como una cantidad real positiva que integra al número de electrones, la energía dada por esta densidad es superior a la energía exacta del estado basal:

$$\int \rho(\vec{r}) d\vec{r} = N_{elec}, \quad (4)$$

$$E_0[\rho'(\vec{r})] \geq E_0[\rho(\vec{r})] \quad (5)$$

2.3 Método Kohn-Sham

Sin embargo, Hohenberg y Konh no establecieron cómo calcular E_0 a partir de ρ_0 , ya que el funcional F se desconoce, ni tampoco cómo obtener ρ_0 . Una contribución hacia estos objetivos fue dada por Kohn y Sham en 1965,⁵⁴ quienes presentaron una forma de aproximar al funcional $F[\rho]$. Para lograrlo consideraron un sistema de referencia ficticio, el cual está formado por un sistema de N electrones no interactuantes que experimentan todos ellos la misma función de energía potencial, $v_s(r_i)$, donde $v_s(r_i)$ es tal que hace que la densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental $\rho_s(r)$, del sistema de referencia sea igual a la densidad electrónica del estado fundamental $\rho_0(r)$, del sistema real. Como el sistema de referencia consta de partículas no interactuantes la función de onda del estado fundamental $\psi_{s,0}$, es un producto antisimetrizado, es decir, un determinante de Slater de los espín-orbitales ortonormales de Kohn-Sham (KS) de más baja energía u_i^{KS} , del sistema de referencia:

$$u_i^{KS} = \Phi_i^{KS} \sigma_i \quad (6)$$

KS obtuvieron la densidad de probabilidad electrónica ($\rho(\vec{r})$) del estado fundamental de un sistema de n-partículas como:

$$\rho = \sum_{i=1}^n |\Phi_i^{KS}|^2 \quad (7)$$

La primera propuesta de KS fue reescribir la ecuación de la energía como funcional de la densidad como sigue, primero definieron:

$$\Delta T[\rho] \equiv T[\rho] - T_s[\rho], \quad (8)$$

donde ΔT es la diferencia en la energía cinética electrónica del estado fundamental entre el sistema real y el sistema de referencia con densidad electrónica igual a la del sistema real. Y también:

$$\Delta V_{ee}[\rho] \equiv V_{ee}[\rho] - \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2, \quad (9)$$

donde $\Delta V_{ee}[\rho]$ es la diferencia en el potencial de repulsión electrón-electrón entre el potencial de repulsión y la interacción coulombica clásica interelectrónica. Así con (8) y (9) reescribieron la energía como funcional de la densidad electrónica (ecuación 2) de la siguiente manera:

$$E_0 = E_v[\rho] = \int \rho(r)v(r)dr + T_s[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + \Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho], \quad (10)$$

donde el subíndice v enfatiza la dependencia al potencial externo, los funcionales ΔT y ΔV_{ee} son desconocidos. Con ello definieron el funcional de la energía de intercambio y correlación como:

$$E_{xc}[\rho] \equiv \Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho], \quad (11)$$

por lo cual definieron al funcional F como:

$$F[\rho] = T_s[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{xc}[\rho], \quad (12)$$

así evaluando los términos de la energía (ecuación 10) se tiene la expresión propuesta por Kohn y Sham:⁵⁴

$$E_0 = -\sum_{\alpha} Z_{\alpha} \int \frac{\rho(r_1)}{r_{1\alpha}} dr_1 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \langle \Phi_i^{KS}(1) | \nabla_1^2 | \Phi_i^{KS}(1) \rangle + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{xc}[\rho] \quad (13)$$

Por tanto, se puede obtener la energía a partir de ρ si se obtienen los orbitales KS y si se conoce el funcional E_{xc} . Según el teorema variacional de Hohenberg y Kohn los orbitales KS se pueden variar y se puede demostrar que los orbitales KS que minimizan la expresión de la energía del estado fundamental (ecuación 13) satisfacen:

$$\left[-\frac{1}{2} \nabla^2 + v(\vec{r}) + \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} dr' + \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(\vec{r})} \right] \Phi_i^{KS}(\vec{r}) = \varepsilon_i \Phi_i^{KS}(\vec{r}), \quad (14)$$

donde los tres últimos términos dentro de los corchetes forman el conocido potencial efectivo de KS (v_{eff}^{KS}).

Así, la clave para efectuar un cálculo con precisión TFD-KS de propiedades moleculares es tener una buena aproximación para E_{xc} .

2.4 Aproximaciones a la TFD

El funcional de la energía de intercambio y correlación, el cual es una fracción pequeña de la energía total es el único término desconocido en las ecuaciones de KS, sin embargo actualmente existen aproximaciones que proporcionan modelos muy precisos para este término. La primera aproximación para este funcional se conoce como aproximación de densidad local (LDA, del inglés Local Density Aproximation) y consiste en suponer que en cada punto la energía de intercambio y correlación depende sólo de la densidad en ese punto, este valor se considera como el que tendría un gas de electrones libres. Existen otras aproximaciones más sofisticadas conocidas como aproximaciones de gradiente generalizado (GGA, del inglés Generalized Gradient Aproximation) las cuales son semilocales, ya que consideran en cada punto el valor de la densidad y sus gradientes. Un ejemplo representativo de esta aproximación es el funcional PBE reportado por Perdew, Burke y Ernzerhof.^{55,56} Otra serie de funcionales mucho más sofisticados pueden obtenerse al suponer que la energía de intercambio y correlación dependen explícitamente de los orbitales de Kohn-Sham. El más común de estos funcionales es el de intercambio exacto (EXX), que incluye de manera completa la energía de intercambio electrónico y que puede derivarse desde primeros principios.

La clasificación de estas aproximaciones puede hacerse si se tienen en cuenta las variables fundamentales que se utilizan para definir el funcional de intercambio y correlación. J. P. Perdew ha sugerido la “escalera de Jacob”⁵⁷⁻⁵⁹ para clasificar sistemáticamente los funcionales dependiendo de estas variables que permiten incrementar su precisión o al menos esperar una mejora en cada paso de la escalera (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación de Perdew para los funcionales de intercambio y correlación ⁶⁰			
Nivel	Nombre	Variables	Ejemplos
1	LDA	ρ	LDA, LSDA, X_α
2	GGA	$\rho, \nabla\rho$	BLYP, OPTX, OLYP, PW91, PBE, HCTH
3	Meta-GGA	$\rho, \nabla\rho, \nabla^2\rho$ o τ	BR, B95, VSXC, PKZB, TPSS, τ -HCTH
4	Hyper-GGA	$\rho, \nabla\rho, \nabla^2\rho$ o τ, X_{exacto}	H+H, ACM, B3LYP, B3PW91, O3LYP, PBE0, TPSSh, τ -HCTH-Híbrido
5	RPA Generalizado	$\rho, \nabla\rho, \nabla^2\rho$ o τ, X_{exacto} , Orbitales virtuales	OEP2

La introducción de funcionales GGA y funcionales híbridos (con porcentaje de intercambio exacto, X_{exacto}) durante la década de los 90, produjo una importante mejora en términos de precisión para aplicaciones químicas y dio lugar al premio Nobel en Química (1998) que se otorgó a W. Kohn por su contribución al desarrollo de la TFD y a J. A. Pople por su desarrollo de métodos computacionales en química cuántica.⁶¹

2.5 Ventajas y desventajas de la TFD

El método TFD-KS tiene un costo computacional muy similar a la teoría de Hartree-Fock (HF) sin embargo, a diferencia de este último TFD-KS tiene algunas ventajas como por ejemplo es capaz de obtener buenas geometrías, buenos momentos dipolares, excelentes frecuencias vibracionales, una buena estimación de la termodinámica y barreras de reacción, introduce correlación electrónica a un costo computacional muy reducido, la contaminación de espín en cálculos no restringidos UKS es normalmente inferior a la de los cálculos UHF, proporciona excelentes resultados para moléculas tradicionalmente mal descritas a nivel HF, y es el método más utilizado en la actualidad para tratar sistemas organometálicos y bioinorgánicos, solo por mencionar algunas.⁶² Además con el método TFD-KS se pueden obtener propiedades de interés químico como electronegatividad (χ), dureza (η), blandura (S), funciones de Fukui ($f^\pm(r)$) y los poderes electrodonadores/electroaceptores (ω^\pm);^{63,64} por lo cual TFD-KS se ha convertido en un método muy popular.

Sin embargo, tiene algunas desventajas por ejemplo no existe una forma universal conocida para expresar la energía como funcional de la densidad. Además TFD-KS está formulado para sistemas en su estado base y no existe demasiada experiencia en el tratamiento de estados excitados y estados claramente multideterminantes. Sin embargo, existen grupos de investigación interesados en mejorar los modelos de la teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT, del inglés time-dependent density-functional theory)⁶⁵⁻⁶⁷ que es una herramienta de la química teórica moderna para tratar estados excitados electrónicos y que aun se encuentra en desarrollo. Algunas otras desventajas que tiene el método TFD-KS es que algunas aproximaciones han fallado al

describir ciertas características tales como las interacciones de van der Waals,^{60,68-72} aunque esto puede mejorarse incluyendo términos dispersivos.

2.6 Funcional M05-2X

El funcional empleado en el desarrollo de este trabajo tanto para los cálculos termodinámicos como cinéticos es el M05-2X⁷³ (Minnesota 2005 double- X) (X =intercambio exacto). Es un funcional que se encuentra en el cuarto escalón de la escalera de Jacob y sus desarrolladores (Yan Zhao, Nathan E. Schultz y Donal G. Truhlar, 2005) lo clasifican como un funcional híbrido meta-GGA (del inglés, meta-Generalized Gradient Approximation). Este funcional incorpora la densidad electrónica, el gradiente de densidad, la densidad de energía cinética y el intercambio exacto. Las partes locales de este funcional depende de las variables: densidad electrónica, gradiente de la densidad y densidad de energía cinética, mientras el intercambio exacto proporciona la no localidad del funcional M05-2X.⁷³

El funcional M05-2X es un funcional altamente no local, con 56% de intercambio exacto, y fue parametrizado para no metales.⁷³ En este funcional la correlación electrónica se trata de diferente manera para las correcciones de espín opuesto y espín paralelo. El funcional M05-2X fue parametrizado contra 234 valores de datos experimentales y teóricos. Contiene 20 parámetros optimizados, 11 para los coeficientes de intercambio meta-GGA (a_j), 4 para los coeficientes de correlación de espín opuesto ($Cc_{\alpha\beta,i}$), 4 para los coeficientes de correlación de espín paralelo ($Cc_{\sigma\sigma,i}$) y uno para el porcentaje de intercambio exacto (X) (Anexo I).⁷³

En la parametrización de este funcional se incluyeron propiedades tales como distancias de enlace, barreras energéticas, datos cinéticos, energías de formación de complejos no covalentes, energías de disociación de enlace y energías atómicas (Anexo II). Este funcional ha sido recomendado por sus desarrolladores para cálculos termodinámicos y cinéticos, así como para cálculos de energías de disociación de enlace. Truhlar mencionó que, el funcional de intercambio y correlación al depender de la densidad de energía cinética fue la clave para mejorar el rendimiento del funcional M05-2X. En el Anexo III se muestra el funcional M05-2X⁷³ comparado con algunos otros, entre ellos los desarrollados

por el grupo de Truhlar, y como se muestra se encuentra entre los mejores para obtener datos termodinámicos, cinéticos e interacciones no covalentes. Aunque los funcionales de Truhlar más actuales son los que proporcionan los mejores resultados el funcional M05-2X tiene un promedio de los errores absolutos promedio (P-EAP) de sólo 0.2 kcal/mol por encima del funcional M08-HX⁷⁴ (Minnesota 2008 high-X) con el P-EAP más bajo. Así mismo en el Anexo IV se muestran todos los funcionales desarrollados hasta el momento por Truhlar y algunos otros, comparando sus errores absolutos promedio (EAP) para datos termodinámicos, cinéticos e interacciones no covalentes y se observa que los EAP más pequeños corresponden a alguno de los funcionales Minnesota, además el funcional M05-2X da muy buenos resultados para estas propiedades destacando que, de los funcionales de Truhlar es el que tiene menor número de parámetros comparado por ejemplo con los funcionales M08-HX⁷⁴ y M11.⁷⁵ Sumado a ello este funcional también se ha utilizado con éxito por otros autores,⁷⁶⁻⁸² y es importante destacar que el M05-2X se encuentra dentro de los funcionales con mejor desempeño para describir sistemas de capa abierta.^{80,81,83-85}

2.7 Teoría del propagador del electrón (TPE)

Además de la TFD en el presente trabajo se utilizó la Teoría del propagador del electrón (TPE)⁸⁶ para calcular los potenciales de ionización y las afinidades electrónicas, porque se ha propuesto que es una metodología confiable para este propósito. Esta teoría está basada en la ecuación de Dyson,⁸⁷ que puede escribirse como:

$$\left[F + \sum(\varepsilon_i) \right] \phi_i^{Dyson} = \varepsilon_i \phi_i^{Dyson}, \quad (15)$$

donde F es el operador Fock de un electrón, ε_i son los valores propios, los cuales corresponden a las energías de enlace electrónicas del sistema molecular. El operador $\sum(\varepsilon_i)$ incluye correlación electrónica y efectos de relajación orbital que son omitidos por el operador F , ϕ_i^{Dyson} son las funciones propias de estas ecuaciones, es decir, los orbitales de Dyson, los cuales pueden ser interpretados como una función de traslape entre los estados N y $(N\pm 1)$ y están definidos como las siguientes funciones:

Para potenciales de ionización:

$$\phi_i^{Dyson}(x_1) = \sqrt{N} \int \Psi_N(x_1, x_2, x_3, \dots, x_N) \Psi_{i, N-1}^*(x_2, x_3, \dots, x_N) dx_2 dx_3 \dots dx_N, \quad (16)$$

Para afinidades electrónicas:

$$\phi_i^{Dyson}(x_1) = \sqrt{N+1} \int \Psi_{i, N+1}(x_1, x_2, x_3, \dots, x_{N+1}) \Psi_N^*(x_2, x_3, \dots, x_{N+1}) dx_2 dx_3 \dots dx_{N+1}, \quad (17)$$

donde x_j es la coordenada espín-espacial del electrón j , Ψ_N es un estado inicial con N electrones y $\Psi_{i, N\pm 1}$ es el i -ésimo estado final con $N\pm 1$ electrones.

La fuerza polar (FP) es la norma del orbital de Dyson, p_i (número de ocupación del orbital Dyson i):

$$p_i = \int |\phi_i^{Dyson}(x_1)|^2 dx_1, \quad (18)$$

que corresponde a la energía de enlace y su rango de valores posibles va desde 0 hasta 1. La FP es comúnmente usada para diagnosticar la validez de las energías de unión y desprendimiento del electrón, obtenidas de cálculos basados en aproximaciones a la TPE, como por ejemplo OVGF y P3, que son los utilizados en este trabajo. Se considera que estas aproximaciones son válidas solamente si las fuerzas polares son mayores que 0.80-0.85.^{88,89,90}

Los métodos basados en la TPE aportan los potenciales de ionización de cualquier orbital en un único cálculo, además permiten incorporar sistemáticamente los efectos de correlación y relajación.⁹¹ Por estas razones, la TPE se considera como una herramienta eficiente y confiable para cálculos directos de potenciales de ionización en un solo cálculo.⁸⁸ Con ella se pueden realizar evaluaciones eficientes y exactas de potenciales de ionización y afinidades electrónicas verticales para moléculas de considerable tamaño,⁹¹ y ha sido usada frecuentemente para predecir energías de enlace de una gran variedad de sistemas químicos,⁹²⁻⁹⁶ desde moléculas diatómicas hasta nucleótidos^{97,98} y porfirinas sustituidas.^{99,100} Además, los cálculos de TPE han probado ser capaces de predecir potenciales de ionización con errores promedio inferiores a 0.25 eV, con respecto a los obtenidos experimentalmente.^{101,102}

2.8 Geometría molecular

Como nuestro objetivo principal en este trabajo es analizar la capacidad antirradicálica o antioxidante de EDA y sus derivados mediante un estudio termodinámico y cinético, son de nuestro interés las cantidades termodinámicas. En el Anexo V se describe como se calculan las funciones de partición necesarias para obtener las funciones de estado como entalpía (H), entropía (S) y energía libre de Gibbs (G). Las propiedades termodinámicas se calculan a partir de cantidades moleculares como la energía electrónica, la geometría de equilibrio y frecuencias vibracionales,¹⁰³ por lo tanto debemos usar una geometría optimizada que sea o bien un mínimo o un estado de transición.

La geometría de una molécula no lineal con N núcleos se define mediante $3N-6$ coordenadas nucleares independientes $q_1, q_2, \dots, q_{3N-6}$, y su energía electrónica U es una función de esas coordenadas. El número 6 se resta del número total de coordenadas nucleares, debido a que 3 grados de libertad traslacionales y 3 rotacionales dejan a la energía electrónica inalterada. La función U da lo que se llama superficie de energía potencial (SEP) de la molécula, así llamada debido a que U es la energía potencial para el movimiento nuclear. Un factor de complicación es que una molécula grande puede tener muchos mínimos en su SEP, de todos ellos el mínimo global se refiere al punto de energía más bajo de la SEP, y un mínimo local es lo que significa que es más bajo en energía que todos los puntos de la SEP de su vecindad inmediata. Una conformación de una molécula que corresponde a un mínimo de energía (local o global) se llama confórmero.

El proceso de obtención de un mínimo se denomina optimización de la geometría o minimización de la energía, esto es que se encuentra un mínimo local en energía electrónica en las proximidades de la geometría inicialmente supuesta. Para una molécula con varias conformaciones se debe repetir el procedimiento de búsqueda del mínimo local para cada una de las posibles conformaciones, de forma que se localice el mínimo global. Para moléculas grandes, puede haber demasiadas conformaciones como para que todas ellas sean examinadas. La serie de $3N-6$ primeras derivadas parciales de U con respecto a cada una de sus variables constituye un vector (en un espacio de $3N-6$ dimensiones) llamado gradiente de U . En el mínimo local, el gradiente debe ser cero, lo que significa que cada una de las $3N-6$ primeras derivadas parciales de U deben ser cero. Cualquier punto de la

SEP en el que el gradiente es cero, se denomina punto estacionario (o crítico). Un punto estacionario en una SEP puede ser un mínimo, un máximo, o un punto silla

Para asegurar que se ha encontrado un mínimo y no un punto de silla, es esencial comprobar la naturaleza del punto estacionario encontrado por la optimización de geometría. Esto se hace efectuando un cálculo de frecuencia para la geometría encontrada. Para un verdadero mínimo, todas las frecuencias calculadas serán reales. Para un punto de silla de primer orden (estado de transición) una de las frecuencias calculadas será imaginaria.

El cálculo de frecuencias se realiza a partir de las segundas derivadas de U . La serie de las segundas derivadas cuando se disponen en una ordenación cuadrada, forman una matriz denominada hesiana o matriz de constantes de fuerza. Estas segundas derivadas se evalúan en la geometría de equilibrio, es decir, la geometría de la molécula que corresponde a la disposición nuclear que minimiza la energía electrónica molecular incluyendo la repulsión internuclear. Posteriormente se forman los elementos de matriz de la constante de fuerza ponderada por la masa (o hesiana ponderada con la masa):¹⁰³

$$F_{ij} \equiv \frac{1}{(m_i m_j)^{\frac{1}{2}}} \left(\frac{\partial^2 U}{\partial X_i \partial X_j} \right)_e, \quad (19)$$

donde i y j van de 1 a $3N$, y m_i es la masa del átomo correspondiente a la coordenada X_i . Así se resuelve la siguiente serie de $3N$ ecuaciones lineales en las $3N$ incógnitas:

$$\sum_{j=1}^{3N} (F_{ij} - \delta_{ij} \lambda_k) l_{jk} = 0, \quad i = 1, 2, \dots, 3N \quad (20)$$

En esta serie de ecuaciones, δ_{ij} es la delta de Kronecker, λ_k y l_{jk} son parámetros desconocidos todavía. Para que esta serie de ecuaciones homogéneas tenga una solución no trivial, el determinante de los coeficientes debe anularse:

$$\det(F_{ij} - \delta_{ij} \lambda_k) = 0 \quad (21)$$

Este determinante es de orden $3N$ y cuando lo desarrollamos da un polinomio cuya potencia más elevada en λ_k es λ_k^{3N} , de manera que la ecuación determinantal (secular)

tendrá $3N$ raíces para λ_k . Las frecuencias vibracionales armónicas moleculares se calculan, entonces, a partir de:

$$\nu_k = \frac{\sqrt{\lambda_k}}{2\pi} \quad (22)$$

Seis de los valores obtenidos resolviendo el determinante (ecuación 21) serán cero, dando lugar a seis frecuencias que valen cero, correspondientes a los tres grados de libertad traslacional y a los tres grados de libertad rotacional de la molécula. Las $3N-6$ frecuencias vibracionales restantes son las frecuencias vibracionales armónicas moleculares.

Una vez que las λ_k se han obtenido, se resuelve la serie de ecuaciones lineales (ecuación 20) $3N-6$ veces, cada vez con un valor diferente de los λ_k no nulos, para obtener los números l_{jk} . Cabe mencionar que en notación matricial, la ecuación 20 es $\mathbf{FL}^{(k)} = \lambda_k \mathbf{L}^{(k)}$, donde \mathbf{F} tiene los elementos de matriz F_{ij} y $\mathbf{L}^{(k)}$ es un vector columna con elementos l_{jk} . Así las λ_k son los valores propios de la matriz de constantes de fuerza ponderadas con la masa.

Un cálculo de frecuencias vibracionales debe ir precedido por una optimización de la geometría, usando el mismo método y base usada para el cálculo de las frecuencias. Con el cálculo de optimización de geometría y cálculo de frecuencias se pueden obtener las cantidades termodinámicas (Anexo V) para cada uno de los compuestos de interés y de las especies radicálicas a estudiar en este trabajo, para realizar el análisis termodinámico y cinético sobre la actividad antioxidante de EDA y sus derivados.

2.9 Modelo de solvatación

Sin embargo, es importante destacar que hasta el momento nos encontramos en sistemas en fase gas, de modo que siendo de nuestro interés el estudio de la capacidad antioxidante de nuestros compuestos en condiciones fisiológicas adecuadas, es decir, en solución acuosa o lipídica, es importante tener en cuenta que para obtener la función de estado energía libre de Gibbs (G) en solución es necesario añadir otro término, la energía libre de solvatación (ΔG_{solv}).

En el modelo de solvatación SMD,¹⁰⁴ la densidad electrónica total del soluto se utiliza sin definir cargas atómicas puntuales, y el disolvente se representa por un medio dieléctrico con tensión superficial en la frontera soluto-solvente. SMD es considerado un modelo de solvatación universal, debido a su aplicabilidad a cualquier soluto cargado o no cargado en cualquier solvente o medio líquido para el cual pocos descriptores clave son conocidos. Este método corresponde a la estrategia conocida como campo de reacción autoconsistente (SCRf, del inglés Self Consistent Reaction Field), donde el término “campo de reacción” se refiere 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.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷¹⁰⁸ En el caso del modelo de solvatación SMD queda como:

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{ENP}} + \Delta G_{\text{CDS}} + \Delta G_{\text{conc}} \quad (23)$$

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. 23, en la implementación del código computacional usado en este trabajo (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:

$$\Delta G_{\text{ENP}} = \langle \Psi | H^{(0)} - \frac{e}{2} \phi | \Psi \rangle + \frac{e}{2} \sum_k Z_k \phi_k - \langle \Psi^{(0)} | H^{(0)} | \Psi^{(0)} \rangle, \quad (24)$$

donde e es la unidad atómica de carga, ϕ y ϕ_k son el campo de reacción evaluado en el sistema molecular y en el átomo k , respectivamente, 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 en cualquier posición r dentro de la cavidad se obtiene como:

$$\phi(r) = \sum_m \frac{q_m}{|r - r_m|}, \quad (25)$$

donde r_m representa la posición de cada elemento m del área superficial de la cavidad, y q_m es la carga superficial aparente de cada elemento m .

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:

$$\Delta G_{CDS} = \sum_k \sigma_k A_k \left(R, \{R_{Z_k} + r_S\} \right) + \sigma^{[M]} \sum_k A_k \left(R, \{R_{Z_k} + r_S\} \right), \quad (26)$$

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 , del conjunto de todos los radios atómicos de van der Waals $\{R_{Z_k}\}$, y del radio del solvente (r_S) el cual se suma a cada uno de los radios atómicos de van der Waals. Sumando un valor diferente de cero del radio del solvente a los radios atómicos se definen las esferas que se usan para obtener la SASA de cada soluto.

La parametrización de SMD¹⁰⁴ 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 0.6 a 1.0 kcal/mol para los solutos neutros y de ~ 4 kcal/mol para los solutos iónicos.

2.10 Correcciones

2.10.1 Estado estándar 1M

Vale la pena insistir en que, como se mencionó anteriormente, los resultados directamente obtenidos de los códigos disponibles corresponden siempre al estado estándar de 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:

$$K_P = K_C (V_M)^{\Delta n}, \quad (27)$$

donde Δn representa el cambio de molaridad a través de la reacción, V_M representa el volumen molar, K_P y K_C son las constantes de equilibrio en unidades de presión y concentración, respectivamente. En estudios cinéticos para reacciones bimoleculares de adición y para la formación de los estados de transición (ET) $\Delta n = -1$ por lo que:

$$K_C = K_P V_M, \quad (28)$$

$$e^{-\Delta G^{1M}/RT} = e^{-\Delta G^{1atm}/RT} V_M, \quad (29)$$

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

$$\Delta G^{1M} = \Delta G^{1atm} - RT \ln(V_M), \quad (30)$$

dicha conversión disminuye las ΔGs en 1.89 kcal/mol a 298.15 K.

2.10.2 Corrección de volumen libre

Adicionalmente, en el presente trabajo se incluyó la corrección propuesta por Benson para fase líquida,¹⁰⁹ 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 está dada por:

$$r \cong \frac{n10^{(2n-2)}}{e^{(n-1)}}, \quad (31)$$

donde n representa el número de moles totales de los reactivos ($n=2$ para el caso de reacciones bimoleculares). Dado que Benson¹⁰⁹ asume previamente que:

$$r \cong \frac{K_x^{sol}}{K_x^{gas}} \cong \frac{e^{-\Delta G^{sol}/RT}}{e^{-\Delta G^{gas}/RT}}, \quad (32)$$

la combinación de las expresiones anteriores lleva a:

$$\Delta G^{sol} \cong \Delta G^{gas} - RT \{ \ln[n10^{(2n-2)}] - (n-1) \}, \quad (33)$$

y de acuerdo con la ecuación 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.

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Cálculos termodinámicos y cinéticos

Las optimizaciones de geometrías y los cálculos de frecuencia se llevaron a cabo usando el funcional M05-2X y el conjunto de funciones de bases 6-311++G(d,p). Los mínimos locales y estados de transición fueron identificados por el número de frecuencias imaginarias 0 o 1, respectivamente. Además se confirmó que los estados de transición obtenidos conectan correctamente con los reactivos y productos de las reacciones deseadas mediante cálculos de coordenada de reacción intrínseca (IRC). La IRC es el camino de reacción de mínima energía sobre la superficie de energía potencial entre reactivos y productos pasando por el estado de transición, corresponde a un modo normal de vibración local y puede usarse para estudiar las propiedades de puntos intermedios a lo largo del camino de reacción.

Todos los cálculos electrónicos fueron desarrollados con el paquete computacional Gaussian 03¹¹⁰ o Gaussian 09.¹¹¹ Las contribuciones termodinámicas, a una temperatura de 298.15 K, fueron incluidas en el cálculo de energías relativas. Para incluir los efectos del solvente se usaron 2 estrategias diferentes. En la primera los puntos estacionarios fueron modelados primeramente en fase gas (vacío), y los efectos de disolvente se incluyeron a posteriori mediante cálculos de punto simple con el modelo continuo SMD.¹⁰⁴ En la segunda se realizaron todas las optimizaciones y cálculos de frecuencias en solución usando el mismo modelo de solvatación. Los solventes fueron benceno, pentiletanoato y agua, para imitar los ambientes no polar, lipídico y acuoso, respectivamente.

Se incluyeron los efectos de caja del solvente de acuerdo a las correcciones propuestas por Okuno,¹¹² teniendo en cuenta la teoría del volumen libre propuesta por Benson.¹⁰⁹ Estas correcciones están de acuerdo con las obtenidas por Ardura y col.¹¹³ y se han usado con éxito por otros autores.¹¹⁴⁻¹²⁰

Las constantes de velocidad (k) fueron calculadas usando la Teoría del Estado de Transición (TST)¹²¹⁻¹²³ y el estado estándar 1 M como:

$$k = \sigma \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-(\Delta G^\ddagger)/RT}, \quad (34)$$

donde k_B y h son las constantes de Boltzman y Planck, σ es la degeneración de caminos de reacción de acuerdo al número de trayectorias de reacción equivalentes, κ la corrección de tunelaje y ΔG^\ddagger es la energía libre de activación de Gibbs. En el caso particular de las transferencias electrónicas, ΔG^\ddagger se calculó utilizando la Teoría de Marcus^{124,125,126} como:

$$\Delta G_{TES}^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{TES}^0}{\lambda} \right)^2, \quad (35)$$

donde λ es la energía de reorganización, es decir, la energía que se requiere para “reorganizar” la estructura del sistema desde las coordenadas iniciales a las finales, sin cambiar el estado electrónico, y se define como:

$$\lambda = \Delta E_{TES(vertical)} - \Delta G_{TES(adiabática)}^0, \quad (36)$$

donde ΔE_{TES} es la diferencia de energías electrónicas verticales entre productos y reactivos, y ΔG_{TES}^0 es la energía libre de Gibbs de reacción estándar adiabática.

Las correcciones de tunelaje fueron calculadas usando las correcciones de tunelaje de curvatura cero (ZCT).¹²⁷

Algunas de las constantes de velocidad (k) calculadas se encontraron cercanas al límite por difusión. Por lo tanto, la constante de velocidad aparente (k_{app}) no puede ser obtenida directamente de los cálculos de TST. Para incluir este efecto en el presente trabajo utilizamos la teoría de Collins-Kimball:¹²⁸

$$k_{app} = \frac{k_D k_{act}}{k_D + k_{act}}, \quad (37)$$

donde k_{act} es la constante de velocidad obtenida a partir de cálculos TST (ecuación 34), y k_D es la constante de difusión según la aproximación de Smoluchowski¹²⁹ para una reacción bimolecular irreversible controlada por difusión:

$$k_D = 4\pi R D_{AB} N_A, \quad (38)$$

donde R denota la distancia de reacción, es decir, en el caso de la TES corresponde a la suma de los radios de los reactivos, en la FAR es la distancia en el estado de transición a la que se encuentran los átomos que se van a enlazar y en TH es la distancia en el estado de transición a la que se encuentran los átomos involucrados en la transferencia del hidrógeno. 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 la suma entre D_A y D_B de acuerdo a la referencia 130. D_A y D_B se estimaron a partir de la aproximación de Stokes–Einstein.^{131,132}

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}, \quad (39)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η denota la viscosidad del disolvente, en nuestro caso 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) y a es el radio del soluto que se obtiene para cada especie a partir de su volumen calculado.

3.2 Descriptores químicos

Para los potenciales de ionización y afinidades protónicas todos los cálculos fueron desarrollados en fase gas. Para las estimaciones de pK as todos los cálculos fueron realizados en solución, usando el modelo continuo SMD¹⁰⁴ y agua como disolvente.

Potenciales de ionización

Dos modelos exactos y dos aproximaciones de la teoría del propagador del electrón fueron usados para estimar los potenciales de ionización verticales (PI) de los compuestos estudiados.

Modelos exactos:

➤ Δ SCF:

Se realiza la diferencia de energías electrónicas verticales donde la relajación de geometría de las especies ($N-1$) después de la transferencia electrónica es ignorada y el PI se calcula como:

$$PI^{ASCF} = E_{N-1}(g_N) - E_N(g_N), \quad (40)$$

donde $E_N(g_N)$ es la energía del sistema de N -electrones calculada a la geometría g_N y $E_{N-1}(g_N)$ es la energía del sistema de $(N-1)$ electrones calculada a la geometría g_N .

➤ Teorema PI^{P-L} (Teorema de potencial de ionización):

Éste es el análogo a la aproximación del Teorema de Koopmans¹³³ dentro del marco de TFD-KS, y representa un caso particular de PI vertical. Perdew y col.¹³⁴⁻¹³⁶ demostraron que, para el funcional E_{XC} exacto el valor propio del HOMO KS es exactamente el negativo del potencial de ionización:

$$PI^{P-L} = -E_{HOMO}(g_N), \quad (41)$$

donde $E_{HOMO}(g_N)$ representa la energía del orbital molecular más alto ocupado (HOMO) del sistema de N -electrones, del cual un electrón es removido.

Aproximaciones de la TPE:

➤ OVGf y P3:

La aproximación de la función de Green para capa de valencia (OVGF)¹³⁷ y la aproximación de tercer orden parcial (P3)¹³⁸ son métodos basados en la Teoría del Propagador del electrón (TPE).^{86,139,140,141}

Afinidades protónicas

La afinidad protónica (AP) de las especies aniónicas (A^-) está definida como el negativo del cambio de entalpía molar (ΔH), a 298.15K, de la reacción hipotética en fase gas:



A^- y HA representan las formas aniónica y neutra de las especies estudiadas, y se usó la AP para evaluar la facilidad de los derivados de EDA para formar sus correspondientes aniones.

pKas y fracciones molares (fa)

Para el cálculo de las pKas se usó el método de intercambio de protón, también conocido como método isodésmico, o el método relativo.¹⁴² Este involucra la siguiente reacción:



donde $HRef/Ref^-$ es el par ácido/base del compuesto de referencia, que debería ser estructuralmente similar al sistema de interés.

El pKa es calculado como:

$$pKa(HA) = \frac{\Delta G_s}{RT \ln(10)} + pKa(HRef), \quad (44)$$

donde ΔG_s es la energía libre de solvatación y $pKaHRef$ es el valor de pKa experimental del ácido de referencia. En nuestro caso se escogió $HRef = EDA$, que tiene un $pKa = 6.9$.^{28,35,36,38,51}

Para calcular fa , se obtuvieron las constantes ácidas (Ka) a partir de los valores pKa, según:

$$Ka = 10^{-pKa}, \quad (45)$$

entonces, usando la definición de la constante de equilibrio, para el equilibrio de desprotonación ($HA \leftrightarrow A^- + H^+$):

$$Ka = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}, \quad (46)$$

y la fracción del anión se calculó como:

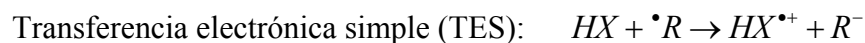
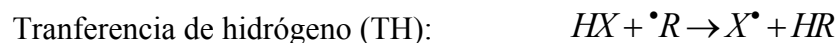
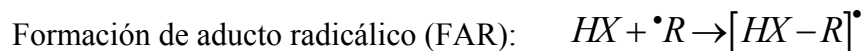
$$fa = \frac{Ka}{Ka + [H^+]}, \quad (47)$$

donde $[H^+]$ está calculado a partir del pH fisiológico (7.4), $[H^+] = 3.98 \times 10^{-8}$ M.

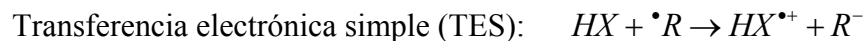
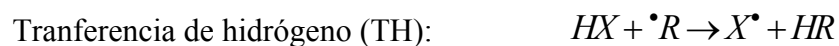
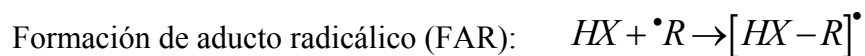
3.3 Mecanismos considerados

Los mecanismos considerados en este trabajo para el estudio de la actividad antioxidante de EDA y sus derivados (X) hacia diferentes especies radicálicas (R) fueron:

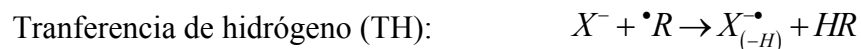
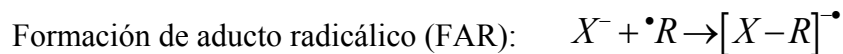
-Para reacciones de las especies neutras, en medio lipídico:



- Para reacciones de las especies neutras, en solución acuosa:



-Para reacciones de mono-aniones, en solución acuosa:



Considerando que la importancia relativa de los mecanismos de reacción puede depender del solvente circundante en el cual se lleva a cabo la reacción así como la naturaleza de las especies involucradas en la reacción.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Confiabilidad de M05-2X

El funcional M05-2X ha sido recomendado por sus desarrolladores para estudios termodinámicos y cinéticos,⁷³ y además se encuentra entre los funcionales con mejor desempeño para sistemas de capa abierta.⁸⁰⁻⁸⁵ Es por ello que ha sido seleccionado para el presente trabajo ya que es de nuestro interés realizar el análisis de la actividad antioxidante de EDA y sus derivados mediante estudios de sus reacciones con radicales libres y basándonos en datos termodinámicos y cinéticos.

Sobre la optimización de geometría de EDA y sus derivados con el funcional M05-2X es confiable, ya que se ha reportado que las aproximaciones de TFD-KS pueden dar geometrías moleculares precisas, y que se pueden obtener mucho mejores resultados que por ejemplo el método perturbativo MP2.^{143,144} Sin embargo, las geometrías obtenidas por MP2 son usualmente precisas y han sido comparables con algunos funcionales que se han modificado para describir bien geometrías moleculares, energías conformacionales relativas, momentos dipolares, potenciales electrostáticos moleculares y energías de estabilización de puentes de hidrógeno,^{145,146} por lo tanto se realizó una comparación entre este método perturbativo y el funcional M05-2X. Asumimos que, por la similitud estructural, si un método describe bien al compuesto de referencia (EDA) también lo hará para sus derivados funcionalizados. Se realizó una diferencia energética de un punto simple con CCS(D)/6-311+G(d) a partir de la geometría optimizada de EDA con el funcional M05-2X y con el método MP2, la cual fue de sólo 0.94 kcal/mol.

También se investigó si existen diferencias significativas entre la geometría optimizada de EDA en fase gas y en solución. Esto se hizo con el funcional M05-2X y utilizando el modelo continuo de solvatación SMD. Considerando que en solución acuosa las especies iónicas son importantes, se realizó este análisis tanto para la especie neutra como para la especie aniónica. De dicho análisis se encontró que las diferencias absolutas promedio (DAP) entre las geometrías optimizadas en ambos ambientes son muy pequeñas. Para la especie neutra la DAP para distancias de enlace fue de 0.004 Å, para ángulos de

enlace fue de 0.545° y para ángulos diedros fue de 3.178° . Así mismo para la especie aniónica la DAP para distancias fue de 0.006 \AA , para ángulos de enlace fue de 0.709° y para ángulos diedros fue de 2.981° . Esto quiere decir que para este tipo de sistemas la presencia del solvente no parece alterar significativamente la geometría.

Con respecto al desempeño del funcional M05-2X para estudios cinéticos de las reacciones químicas de diversos compuestos con radicales libres se realizó una comparación contra datos experimentales disponibles en la literatura. Esta comparación se realizó para 14 diferentes reacciones mostradas en la Tabla 2. Se considera que este funcional tiene un excelente desempeño en la obtención de las constantes de velocidad, pues los 14 valores comparados parecen ser suficientes para este propósito especialmente por la diversidad de características estructurales de los antioxidantes (Tabla 3) y radicales estudiados.

En la Tabla 4 se muestra para cada una de las 14 reacciones entre antioxidantes y radicales el nivel de teoría y los modelos de solvatación usados para el cálculo de las constantes de velocidad teóricas, así como las referencias de las constantes de velocidad experimentales. Para cada reacción se obtuvo el cociente entre las constantes de velocidad. Se obtuvo una relación lineal (Figura 1), entre los valores calculados y experimentales con un coeficiente de correlación igual a 0.99, con una pendiente igual a uno y una ordenada al origen muy cercana a cero (0.09), lo cual significa que el funcional M05-2X reproduce muy bien los valores experimentales de constantes de velocidad para reacciones del tipo de las estudiadas en el presente trabajo.

Tabla 2. Reacciones entre antioxidantes y radicales

Antioxidante - Radical
(A) $^{147}\text{glutati3n} + \cdot\text{OH}$
(B) $^{147}\text{glutati3n} + \cdot\text{OCH}_3$
(C) $^{148}\text{sesamol} + \cdot\text{OH}$
(D) $^{148}\text{sesamol} + \cdot\text{OOCCL}_3$
(E) $^{149}\text{cafe3na} + \cdot\text{OH}$
(F) $^{150}\text{melatonina} + \cdot\text{OH}$
(G) $^{150}\text{melatonina} + \cdot\text{OOCCL}_3$
(H) $^{151}\text{capsaicina} + \cdot\text{ROO}$
(I) $^{152}\text{tirosol} + \cdot\text{ROO}$
(J) $^{153}\text{Trolox} + \text{ArO}\cdot$
(K) $^{153}\text{Trolox} + \cdot\text{OH}$
(L) $^{154}\text{mercaptoetanol} + \text{radical } 2'\text{-deoxiuridin-1'-il}$
(M) $^{148}\text{vanillina} + \text{CCl}_3\text{OO}\cdot$
(N) $^{155}\text{eugenol} + \text{CCl}_3\text{OO}\cdot$

Tabla 3. Estructura de antioxidantes (Tabla 2)

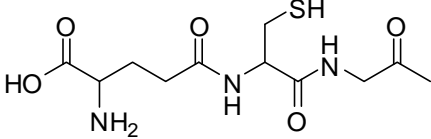
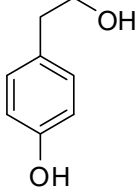
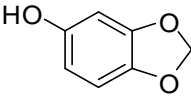
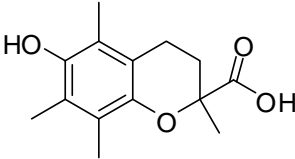
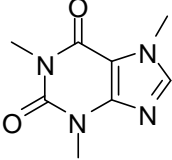
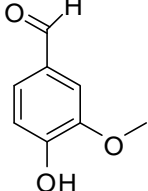
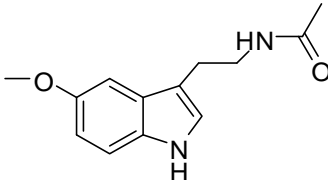
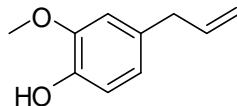
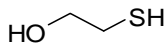
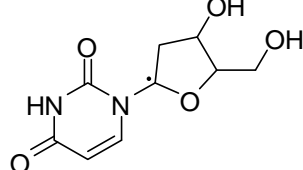
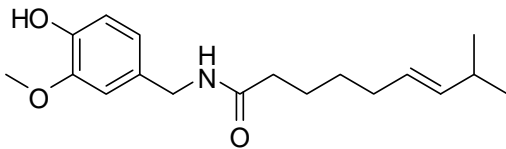
 <p style="text-align: center;">Glutati3n</p>	 <p style="text-align: center;">Tirosol</p>
 <p style="text-align: center;">Sesamol</p>	 <p style="text-align: center;">Trolox</p>
 <p style="text-align: center;">Cafeina</p>	 <p style="text-align: center;">Vanillina</p>
 <p style="text-align: center;">Melatonina</p>	 <p style="text-align: center;">Eugenol</p>
 <p style="text-align: center;">Mercaptoetanol</p>	 <p style="text-align: center;">Radical 2'-deoxiuridin-1'-il</p>
 <p style="text-align: center;">Capsaicina</p>	

Tabla 4. k calculada ($M^{-1}s^{-1}$) y k experimental ($M^{-1}s^{-1}$) de una serie de compuestos antirradicálicos.

Reacción	$k_{calculada}$	Nivel de teoría	Modelo de solvente	Condiciones	k_{exp}	Ref.	Cociente ^(a)
(A)	7.68E+09	M05-2X/6-311+G(d,p)	SMD	Acuoso	8.72E+09	(b)	1.1 ↓
(B)	5.89E+08	M05-2X/6-311+G(d,p)	SMD	Acuoso	9.00E+08	156	1.5 ↓
(C)	2.37E+10	M05-2X/6-311+G(d,p)	SMD	Acuoso, pH=6.8	1.10E+10	157	2.2 ↑
(D)	5.41E+08	M05-2X/6-311+G(d,p)	SMD	Acuoso, pH=6.8	3.70E+08	157	1.5 ↑
(E)	2.15E+09	M05-2X/ 6-311++G(d,p) //M05-2X/ 6-31+G(d)	IEF-PCM	Acuoso	5.60E+09	(c)	2.2 ↓
(F)	1.85E+10	M05-2X/ 6-311++G(d,p) //M05-2X/ 6-31+G(d)	IEF-PCM	Acuoso	3.04E+10	(d)	1.6 ↓
(G)	9.20E+08	M05-2X/ 6-311++G(d,p) //M05-2X/ 6-31+G(d)	IEF-PCM	Acuoso/Lípido	4.35E+08	(e)	2.1 ↑
(H)	6.50E+03	M05-2X/ 6-311+G(d,p) //M05-2X/ 6-31G(d)	SMD	Acuoso/Lípido	5.60E+03	158	1.2 ↑
(I)	4.30E+03	M05-2X/6-311+G(d,p)	SMD	Acuoso	9.40E+03	159	2.2 ↓
(J)	1.70E+04	M05-2X/6-31+G(d,p)	SMD	Acuoso	3.07E+04	160	1.8 ↓
(K)	2.78E+10	M05-2X/6-31+G(d,p)	SMD	Acuoso	8.10E+10	161	2.9 ↓
(L)	2.65E+06 2.74E+06	M05-2X/6-31+G(d,p) M05-2X/6-311++G(d,p)	SMD SMD	Acuoso	2.60E+06	(f)	1.02 ↑ 1.05 ↑
(M)	3.83E+08	M05-2X/6-311+G(d,p)	SMD	Acuoso, pH=7.4	8.0E+08	162	2.1 ↓
(N)	6.16E+08	M05-2X/6-311+G(d,p)	SMD	Acuoso, pH=10.5	7.5E+08	163	1.2 ↓

^(a) Cociente k_{calo}/k_{exp} , ↓= veces más bajo, ↑= veces más alto; ^(b) valor promedio de los reportados en las referencias 164 a 166; ^(c) valor promedio de los reportados en las referencias 167 a 169; ^(d) valor promedio de los reportados en las referencias 170 a 174; ^(e) valor promedio de los reportados en las referencias 175 y 176; ^(f) valor promedio de los reportados en las referencias 177 y 178.

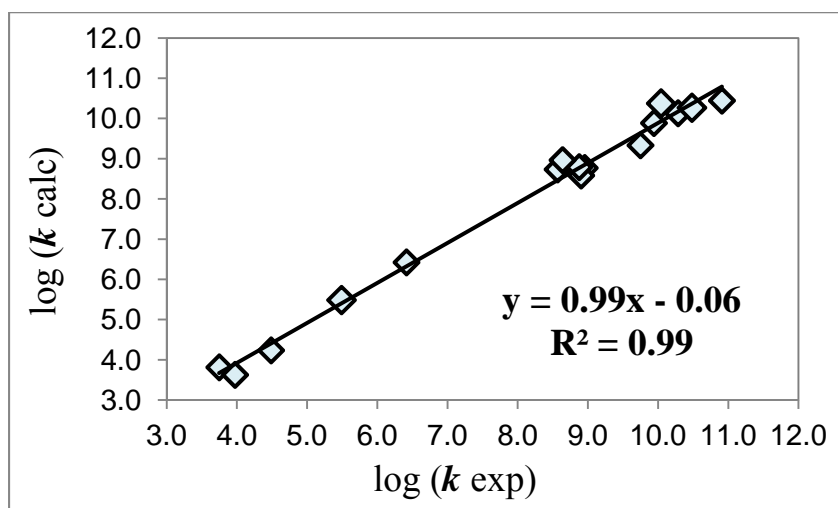
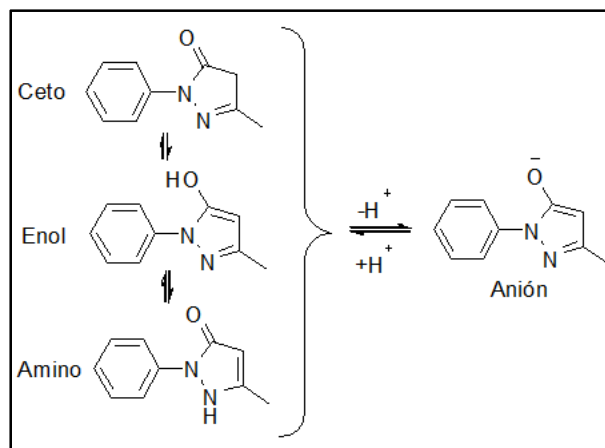


Figura 1. Relación lineal entre k calculada y k experimental de la serie de compuestos antirradicálicos.

4.2 Edaravone

4.2.1 Tautómeros y forma aniónica

Tres formas tautómeras no iónicas de EDA han sido previamente propuestas,^{37,38} que son la ceto, la enol y la amino (Esquema IV). Todas ellas fueron modeladas para estimar su población relativa. De acuerdo con el cálculo de energía libre de Gibbs, en solución (Tabla 5) la forma ceto es la predominante, tanto en ambientes polares como no polares. Se encontró que las energías de las formas enol y amina son mayores en 3 y 4 kcal/mol que la forma ceto, en agua y benceno, respectivamente. Sus poblaciones relativas se estimaron utilizando la distribución de Maxwell-Boltzmann, y se encontró que más del 97% de EDA está en su forma ceto, independientemente de la polaridad del medio ambiente. Por lo tanto, esta es la única forma no iónica de EDA que se considera en el presente trabajo.



Esquema IV. Forma aniónica y tautómeras neutros de EDA.

Tabla 5. Energías libres de Gibbs relativas (ΔG_{rel} , kcal/mol) de las formas tautómeras de EDA neutro, y sus poblaciones en porcentaje (P%).

Forma	Benceno		Agua	
	ΔG_{rel}	P%	ΔG_{rel}	P%
ceto	0.00	99.91	0.00	97.21
enol	4.93	0.02	3.67	0.20
amino	4.30	0.07	2.15	2.59

Dado que se ha propuesto que la forma aniónica de EDA (Esquema IV) es más reactiva que la forma ceto, cuando actúa como depurador de radicales libres, también se ha incluido en el presente estudio. Se han reportado dos valores diferentes para el pK_a de EDA: ~ 7.0 ^{28,35,36,38,51} y 8.1.¹⁷⁹ Cualquiera de ellos dará lugar a una importante población de la forma aniónica de EDA a pH fisiológico (7.4). Suponiendo $pK_a=7.0$ como el valor correcto significa que 28.5% de EDA estaría en la forma ceto y 71.5% en forma aniónica. Asumiendo que $pK_a=8.1$ tendríamos 83.4% (neutro) y 16.6% (aniónica). En cualquier caso, la forma iónica debe considerarse para evaluar adecuadamente la actividad antioxidante de EDA. Sin embargo, dado que la mayoría de los autores están de acuerdo con $pK_a=7.0$, ese

fue el valor que se utilizó en este trabajo. Las fracciones molares de EDA y su anión a diferentes pHs, estimados a este valor de pK_a se muestran en la Figura 2.

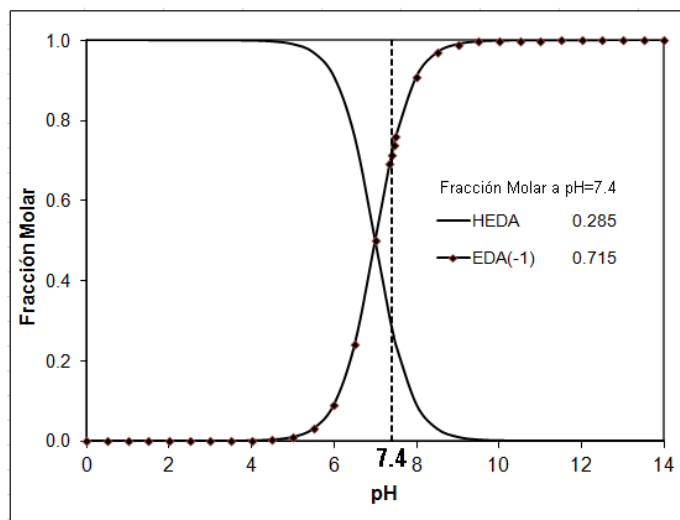


Figura 2. Fracciones molares de EDA y su anión, estimados a pK_a (EDA) = 7

4.3 Reactividad de Edaravone y sus derivados

4.3.1 Propuesta de derivados de Edaravone

Los derivados de EDA estudiados en este trabajo se presentan en la Tabla 6. Se construyeron reemplazando partes de EDA (A1) por varios grupos en los sitios R1 (serie 1) y R3 (serie 2), según Esquema II. Los grupos sustituidos tienen diferente naturaleza química, esto se refleja en sus constantes sigma de Hammett (σ)¹⁸⁰ (Tabla 7). Sus rangos de valores de σ van desde -0.66 para el grupo $-NH_2$ hasta 0.91 para $-NO$. Además los derivados A2, B1 y C1 se incluyeron ya que se han sintetizado,^{47,51} y han sido propuestos como buenos antioxidantes.^{47,51}

Tabla 6. Edaravone y sus derivados.

	R1	R3		R1	R3
A1	H-	-CH ₃	A2	1-(2-Piridinil)-	-CH ₃
B1	OCH ₃ -	-CH ₃	B2	H-	-OCH ₃
C1	O(CH ₂) ₃ ONO ₂ -	-CH ₃			
D1	NH ₂ -	-CH ₃	D2	H-	-NH ₂
E1	CH ₃ -	-CH ₃	E2	H-	-H
F1	Cl-	-CH ₃	F2	H-	-Cl
G1	OH-	-CH ₃	G2	H-	-OH
H1	CH=CH ₂ -	-CH ₃	H2	H-	-CH=CH ₂
I1	SH-	-CH ₃	I2	H-	-SH
J1	CHO-	-CH ₃	J2	H-	-CHO
K1	CN-	-CH ₃	K2	H-	-CN
L1	NO ₂ -	-CH ₃	L2	H-	-NO ₂
M1	CF ₃ -	-CH ₃	M2	H-	-CF ₃
N1	NO-	-CH ₃	N2	H-	-NO

Tabla 7. Constantes sigmas de Hammett (σ) de los grupos usados en la construcción de derivados de EDA.

Grupo	σ^a	Grupo	σ^a
H	0	SH	0.15
NH ₂	-0.66	Cl	0.23
O(CH ₂) ₃ ONO ₂	NA	CHO	0.42
OH	-0.37	CF ₃	0.54
OCH ₃	-0.27	CN	0.66
CH ₃	-0.17	NO ₂	0.78
CH=CH ₂	-0.04	NO	0.91

^a Referencia 181.

4.3.2 Capacidad electrodonadora

Escogiendo la mejor metodología

Como la transferencia electrónica simple (TES) es uno de los principales mecanismos reportados para la acción antioxidante de EDA y sus derivados,^{35,36,38,39,47} uno de los objetivos principales de este trabajo de investigación es predecir de la manera más exacta posible los potenciales de ionización (PI) de estos compuestos. Primero se analizó la exactitud de diferentes modelos y aproximaciones para este tipo de cálculo. Para tal propósito se usó un conjunto de moléculas de referencia, las cuales tienen características estructurales similares a las que presenta EDA (Figura 3). Sus potenciales de ionización calculados verticalmente fueron obtenidos usando: Δ SCF, el Teorema PI^{P-L} y dos aproximaciones de la teoría del propagador del electrón (TPE), OVGf y P3. Los valores de los PI's obtenidos con estas metodologías se muestran en la Tabla 8. Las fuerzas polares para los cálculos de OVGf y P3 a partir de TPE se muestran en la Tabla 9, los resultados presentan valores FP mayores a 0.8, lo que valida el uso de estos métodos. Los valores experimentales de PI del conjunto de moléculas de referencia y las desviaciones de los valores calculados, con respecto a los experimentales, se reportan en la Tabla 10 para todas las aproximaciones usadas.

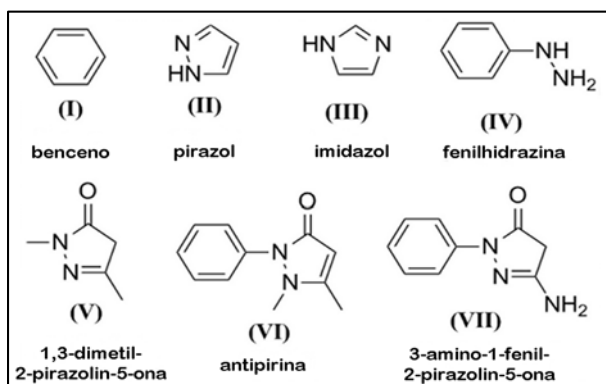


Figura 3. Conjunto de moléculas de referencia.

Tabla 8. Potenciales de ionización (eV) del conjunto de moléculas de referencia

Molécula	Δ SCF	Teorema PI^{P-L}	OVGF	P3
EDA	8.08	8.16	7.76	8.01
I	9.40	9.19	9.16	9.28
II	9.65	9.50	9.35	9.47
III	9.08	8.81	8.86	8.95
IV	7.85	7.92	7.56	7.77
V	8.81	9.33	8.51	8.66
VI	8.05	8.41	7.87	8.10
VII	7.77	7.93	7.47	7.72

Tabla 9. Fuerzas polares (FP) para los PI de las moléculas de referencia

Molécula	OVGF	P3
EDA	0.89	0.88
I	0.90	0.89
II	0.90	0.90
III	0.91	0.91
IV	0.90	0.89
V	0.90	0.89
VI	0.89	0.88
VII	0.89	0.88

Los errores máximos absolutos (EMA) más altos, fueron los correspondientes al modelo Δ SCF y al Teorema PI^{P-L} , para las moléculas II y V con valores iguales a 0.50 y 0.68 eV, respectivamente. Para los métodos basados en TPE los EMA fueron significativamente más bajos. Los EMA más altos para estos métodos resultaron ser para la aproximación P3 con un EMA=0.32 eV, la cual corresponde al PI de la molécula II, y para OVGF un EMA=0.30 eV, la cual corresponde a la molécula IV. En el caso de EDA hay un

estudio teórico previo realizado por Wang y Zang⁴⁰ donde realizan la optimización de geometría con el método PM3, posteriormente realizan un cálculo de punto simple al nivel de teoría (U) B3LYP/6-31G(d) y reportan un PI de 7.14 eV⁴⁰ con un EMA de 0.86 con respecto al dato experimental disponible.¹⁸² Por tanto las aproximaciones usadas en este trabajo tienen EMA más bajos en comparación con la única estimación teórica previa. En particular para EDA el PI obtenido a partir de la aproximación P3 se encuentra en excelente acuerdo con el valor experimental, con un error de sólo 0.01 eV.¹⁸²

Los EAP de los PI verticales para las moléculas de referencia, con las metodologías analizadas se grafican en la Figura 4. Todos los EAP obtenidos son inferiores a 0.3 eV. El teorema PI^{P-L} dio el error promedio absoluto mayor (EAP=0.27 eV) y P3 el más pequeño (EAP=0.10 eV), seguido de OVGf (EAP=0.15 eV). Esto se encuentra en total acuerdo con estudios previos sobre el desempeño de estos dos métodos basados en TPE, los cuales reportan que los errores absolutos promedio de los cálculos de P3 pueden llegar a ser más bajos que los obtenidos por OVGf, para moléculas orgánicas pequeñas.^{138,183} Una vez identificadas las aproximaciones basadas en TPE como las que mejor reproducen los valores experimentales de las moléculas de referencia, con respecto a los modelos exactos analizados, estas se seleccionaron para estimar los potenciales de ionización de EDA y sus derivados, los cuales son reportados por primera vez en este trabajo.

Tabla 10. Errores de PI (eV) con diferentes aproximaciones de moléculas de referencia.

Molécula	Δ SCF	Teorema PI^{P-L}	OVGF	P3	Exp.
EDA	0.08	0.16	-0.24	0.01	8.00 ¹⁸²
I	0.16	-0.05	-0.08	0.04	9.24 ^{184,185}
II	0.50	0.34	0.20	0.32	9.15 ^{186,187}
III	0.21	-0.07	-0.01	0.08	8.87 ^{186,188}
IV	-0.01	0.06	-0.30	-0.09	7.86 ¹⁸⁹
V	0.16	0.68	-0.14	0.01	8.65 ¹⁸²
VI	0.19	0.55	0.01	0.24	7.86 ¹⁸²
VII	0.07	0.23	-0.23	0.02	7.70 ¹⁸²

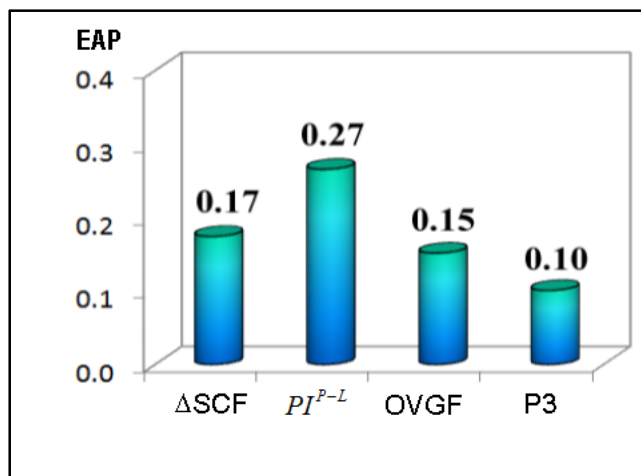


Figura 4. EAP (eV) obtenidos para los PI's de las moléculas de referencia.

Potenciales de ionización (PI) de edaravone y sus derivados

Como se mencionó anteriormente la forma ceto es la forma no iónica predominante de EDA, por tanto es la que se consideró para este análisis. También como se ha propuesto que la forma aniónica puede tener mayor actividad antioxidante que la neutra,^{35,36,38} y basados en consideraciones de pK_a se espera que exista en una cantidad significativa a pH fisiológico (~71.5%), los potenciales de ionización de los aniones también se estimaron.

Se espera que los potenciales de ionización de EDA y sus derivados sean influenciados por la presencia de los sustituyentes utilizados en la funcionalización de la estructura de EDA (Esquema II), de acuerdo con su efecto electrónico. En la medida en que el poder electrodonador del grupo incrementa se espera que los PI bajen, mientras que si el poder electroatractor incrementa, se espera que los PI aumenten. Los compuestos estudiados siguen esta tendencia con sustituciones en ambos sitios R1 y R3. Esto se muestra en la Figura 5, donde se puede observar la relación entre los PI y las constantes sigma de Hammett. Otra regularidad que surge del análisis de resultados presentados en la Tabla 11, es que los PI de los derivados de EDA modificados en el sitio R1 son sistemáticamente más bajos que los que se obtuvieron en los modificados con el mismo sustituyente en el sitio R3. Esta tendencia aparece en ambas formas, neutra y aniónica, de los compuestos estudiados independientemente de la naturaleza del grupo del sustituyente.

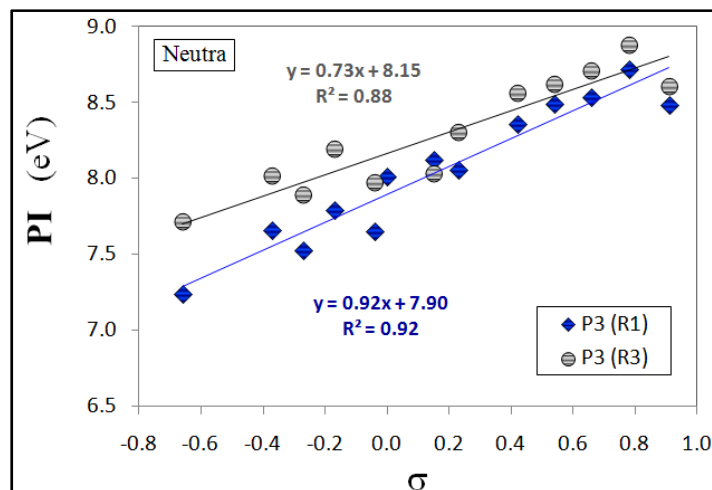


Figura 5. Relación entre los potenciales de ionización (PI (eV)) y las constantes sigma de Hammett (σ)

Las únicas excepciones a esta tendencia son: el derivado I en su forma neutra (PI-I1 > PI-I2) y el derivado H en su forma aniónica (PI-I1 \approx PI-I2). Los valores de PI obtenidos dentro de las aproximaciones de TPE se presentan en la Tabla 11, y los valores de FP correspondientes se reportan en Anexo VI. Los PI obtenidos para las especies neutras y aniónicas de EDA y sus derivados con todas las metodologías analizadas, se reportan en los Anexos VII y VIII respectivamente.

Para analizar en más detalle la capacidad electrodonadora de los derivados con respecto a EDA, en la Figura 6 se han graficado sus diferencias de potenciales de ionización. En general el efecto del sustituyente es independiente del sitio sustituido (R1 o R3). Las únicas excepciones son las estructuras E y G de los derivados neutros. El potencial de ionización de G1 es significativamente más baja que la de EDA (0.36 eV), mientras que el potencial de ionización de G2 es prácticamente el mismo que el de EDA (más alto por 0.01 eV). Por tanto, cuando el sustituyente es el -OH, su influencia en los valores de PI es sustancial cuando la sustitución se lleva a cabo en el anillo fenólico, pero insignificante cuando se lleva a cabo en el anillo pirazol. Para las estructuras E1 y E2 el análisis es diferente; como E1 tiene un grupo metilo en el anillo fenilo y otro en el anillo pirazol, tiene un grupo metilo extra comparado con EDA (R1). Por otro lado E2 tiene un grupo metilo menos que EDA. Como este grupo tiene carácter electrodonador, el valor de PI para E1 es

más bajo que el de EDA, mientras el valor de PI para E2 es más alto. Las excepciones para la forma aniónica son las estructuras D, E y G. El valor de PI para D1 es moderadamente más bajo que el de EDA (~ 0.1 eV), mientras que el PI de D2 es muy similar que el de EDA, pero ligeramente más alto (0.04 eV). El efecto del sustituyente sobre el PI de E1 y E2 son casi insignificantes pero en dirección contraria. Para la estructura G la sustitución en R1 da el PI casi invariante mientras el PI de R2 es más alto que el de EDA por 0.22 eV.

Tabla 11. PI (eV) de EDA y sus derivados.

	Neutro		Anión			Neutro		Anión	
	OVGf	P3	OVGf	P3		OVGf	P3	OVGf	P3
A1	7.76	8.01	2.47	2.64	A2	8.07	8.34	2.33	2.49
B1	7.27	7.53	2.50	2.67	B2	7.64	7.90	2.57	2.75
C1	7.43	7.71	2.65	2.82					
D1	6.99	7.24	2.37	2.55	D2	7.47	7.72	2.52	2.68
E1	7.53	7.79	2.43	2.60	E2	7.93	8.19	2.48	2.68
F1	7.75	8.06	2.66	2.85	F2	8.01	8.31	2.86	3.12
G1	7.38	7.66	2.44	2.63	G2	7.75	8.02	2.67	2.87
H1	7.39	7.65	2.61	2.79	H2	7.71	7.98	2.60	2.79
I1	7.82	8.12	2.65	2.83	I2	7.75	8.03	2.74	2.97
J1	8.00	8.36	2.88	3.08	J2	8.23	8.57	2.89	3.19
K1	8.14	8.53	2.95	3.16	K2	8.37	8.71	3.09	3.42
L1	8.27	8.72	3.07	3.29	L2	8.50	8.88	3.17	3.58
M1	8.15	8.49	2.84	3.03	M2	8.31	8.62	2.98	3.29
N1	8.12	8.48	3.02	3.21	N2	8.30	8.61	3.03	3.34

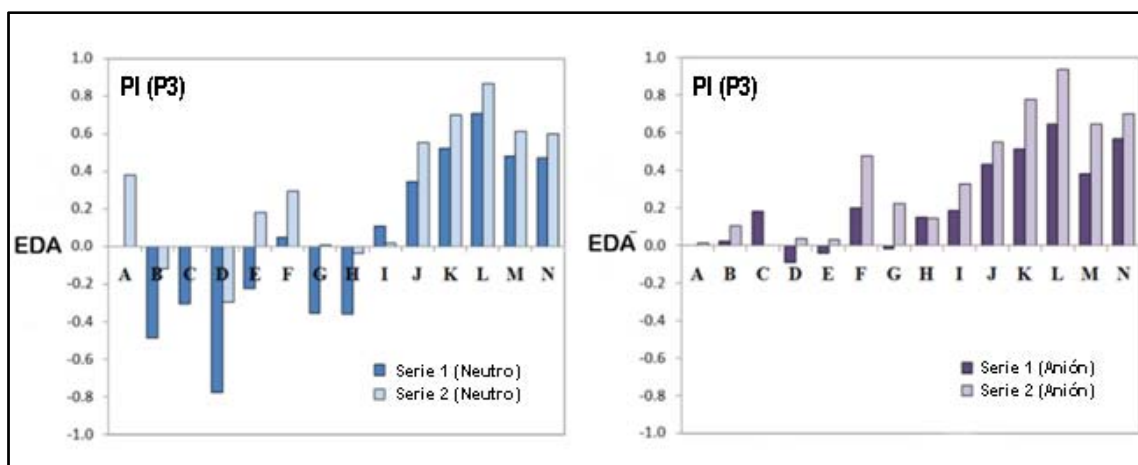


Figura 6. Diferencias de los PI (eV) de los derivados de EDA, respecto a EDA.

Los efectos de los sustituyentes sobre el PI de las especies neutras concuerdan con las constantes sigma de Hammett, es decir, los sustituyentes con valores negativos de σ tienen los PI más bajos de los derivados comparados con EDA, mientras que los grupos con valores positivos de σ incrementan los PI. Para los aniones, por otro lado, tal tendencia no se cumple. Todos los derivados aniónicos, excepto D1, E1 y G1 tienen los PI más altos que el anión de EDA. En el caso particular de los derivados A2 y C1, los cuales no pueden ser caracterizados por las constantes sigma de Hammett, en sus formas neutras A2 tiene el PI más alto que EDA por 0.38 eV mientras que el PI de C1 es 0.31 eV más bajo que el de EDA. Con respecto a sus formas aniónicas el PI de A2 es muy similar al de EDA, mientras que el PI de C1 es más alto por 0.18 eV. Por tanto la facilidad electrodonadora no es responsable de la posible mayor actividad antioxidante de A2 propuesta por Nakagawa y col.⁴⁷ Esta sugerencia se válida por los potenciales de oxidación estimados por sus autores,⁴⁷ que fueron encontrados idénticos para el derivado A2 y EDA. Además estos autores reportaron que la relación entre la actividad antioxidante y el potencial de oxidación no es simplemente proporcional, y proponen que la eficiencia de A2 para secuestrar radicales libres es debida al incremento de su forma aniónica.⁴⁷ Por otro lado, la actividad antioxidante más alta de C1 reportada por Chegaev y col.⁵¹ sí está en concordancia con las tendencias encontradas para el PI.

4.3.3 Afinidad protónica

Una propiedad clave que permite estimar la facilidad relativa de desprotonación de una serie de compuestos es la afinidad protónica (AP) de la base involucrada en el equilibrio de protonación–desprotonación.

Aunque las AP están por definición en fase gas, es decir, los efectos de solvente no son tomados en cuenta, la AP es muy accesible y ha sido ampliamente usada para describir una gran variedad de sistemas químicos.¹⁹⁰⁻¹⁹⁵ Por lo tanto, el número de datos experimentales concernientes a AP se ha incrementado significativamente en las últimas décadas.

Los valores calculados de AP se reportan en la Tabla 12. No se han comparado con otros resultados pues este es el primer reporte de la AP para estos compuestos. En general, por cada par de derivado con sustituyente idéntico, la AP es más alta para el sustituyente colocado en R1. La única excepción a esta tendencia fue encontrada para las estructuras H (sustituyente: $-\text{CH}=\text{CH}_2$), con valores AP prácticamente iguales para H1 y H2 (Tabla 12).

Los valores relativos de la AP, comparados con el de EDA, son graficados en la Figura 7. Como se muestra muchos de los derivados estudiados tienen AP más bajas que EDA, lo cual indica que deberían tener mayor facilidad de desprotonarse. Las excepciones son B1, D1, E1, G1, A2 y D2. Sin embargo, los valores de la AP de A2, E1 y G1 son muy similares al de EDA. Analizando el efecto del sustituyente sobre la AP para cada par de derivados, con grupos sustituyentes idénticos, puede notarse que es el mismo (aumente o disminuya) en muchos de los casos estudiados. Las excepciones son las estructuras B, E, y G. En estos tres casos el sustituyente en R1 aumenta el valor de AP, mientras el sustituyente en R3 disminuye este valor, con respecto al de EDA. Como era de esperarse los valores de la AP de todos los derivados de EDA con sustituyentes electroattractores, es decir, con grupos con valores positivos de σ , son más bajos que el de EDA, y este efecto es más notable para las sustituciones en R3 que para las de R1. Para sustituyentes electrodonadores, el único que tiene el mismo efecto en la AP (incrementa con respecto a EDA) independiente del sitio de sustitución es $-\text{NH}_2$, es decir, el grupo con el valor más negativo de σ . Para los otros grupos con σ negativos, el sustituyente en R1 aumenta la AP, mientras que el sustituyente en R3 disminuye.

Tabla 12. Afinidades protónicas (AP, en kcal/mol) de los derivados de EDA aniónicos.

Especies	AP	Especies	AP
A1	332.03	A2	332.73
B1	333.52	B2	328.66
C1	328.90		
D1	334.80	D2	334.02
E1	332.93	E2	329.73
F1	327.91	F2	322.43
G1	332.55	G2	328.15
H1	329.74	H2	329.77
I1	328.15	I2	327.53
J1	323.63	J2	320.44
K1	321.72	K2	314.06
L1	319.53	L2	311.51
M1	324.22	M2	317.46
N1	320.58	N2	312.60

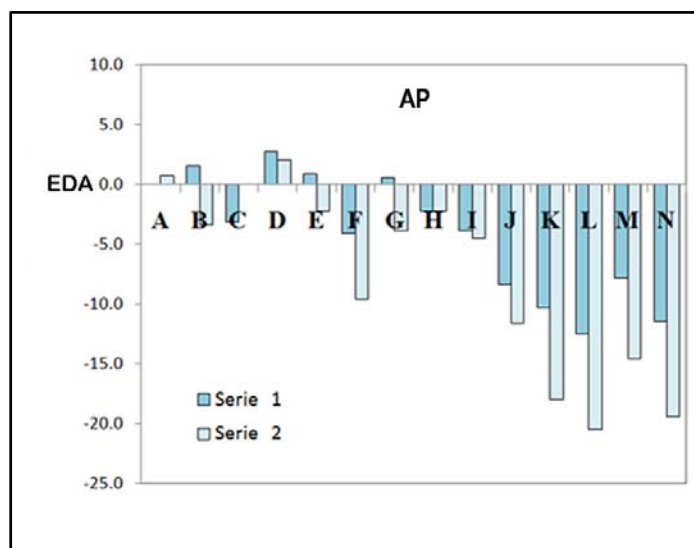


Figura 7. Diferencia de las AP (kcal/mol) de los derivados de EDA, respecto al de EDA.

4.3.4 *pKa*s y fracciones molares a pH fisiológico

Como se ha mencionado, a pesar de que las afinidades protónicas pueden dar información relevante sobre la tendencia intrínseca de las especies químicas a desprotonarse, no toma en cuenta los efectos del solvente. Para incluir tales efectos se estimaron los valores de *pKa*.

El valor estimado de *pKa* para las especies estudiadas en este trabajo están reportadas en la Tabla 13, junto con las fracciones molares de sus formas aniónicas (*fa*) a pH fisiológico.

Además del *pKa* de EDA, Chegaev y col.⁵¹ también reportaron valores de *pKa* de los derivados B1 (*pKa* = 7.06) y C1 (*pKa* = 7.11). Los valores estimados en el presente trabajo para estos derivados están en plena concordancia con los valores experimentales. Esto apoya la validez de los *pKa*s reportados por primera vez para el resto de los compuestos estudiados. Sin embargo, los valores de *pKa* obtenidos para las especies K2, L2, M2 y N2 son muy bajos, incluso negativos, por lo tanto se recomienda realizar otros estudios, de ser posible experimentales, de sus *pKa*. En cualquier caso el principal propósito de las estimaciones de *pKa* en el presente trabajo es compararlos con el de EDA. Tales valores relativos son dignos de confianza, independientemente de la exactitud de los valores individuales de *pKa* dada la cancelación de errores esperada con base a la similitud estructural.^{196,197}

Se encontró que la influencia de las modificaciones en el sitio R3 sobre los valores de *pKa* de las especies estudiadas, es mayor que la que causa modificaciones en R1. Se encontró que el rango de variación de *pKa* para especies de la serie 1 es ~2 unidades de *pKa*, mientras este rango es ~12 unidades de *pKa* para la serie 2. Este parece ser un comportamiento lógico ya que para la serie 2 el sitio de sustitución (R3) está muy cercano al sitio de desprotonación, mientras en la serie 1 (R1) las sustituciones modificarían principalmente las propiedades electrónicas de la parte fenólica y no del pirazol que es donde ocurre la desprotonación.

Tabla 13. Valores pK_a de EDA y sus derivados, y fracciones molares estimadas para la forma aniónica (fa), en solución acuosa a pH fisiológico.

Especies	pK_a	fa	Especies	pK_a	fa
A1	6.9 ⁵¹	0.76	A2	6.64	0.85
B1	7.54	0.42	B2	6.19	0.94
C1	7.18	0.63			
D1	7.32	0.54	D2	9.52	0.01
E1	7.31	0.55	E2	5.17	0.99
F1	6.57	0.87	F2	3.00	~1.00
G1	7.40	0.50	G2	5.82	0.97
H1	6.67	0.84	H2	6.26	0.93
I1	7.12	0.66	I2	4.80	~1.00
J1	6.14	0.95	J2	2.39	~1.00
K1	5.85	0.97	K2	0.27	~1.00
L1	5.48	0.99	L2	-2.60	~1.00
M1	5.88	0.97	M2	0.47	~1.00
N1	5.71	0.98	N2	-0.31	~1.00

Los valores de pK_a de los derivados estudiados, respecto a EDA, se grafican en la Figura 8. Comparando con la Figura 7 se puede observar que aun cuando las tendencias son las mismas que las encontradas para AP, la solvatación tiene una influencia sobre la facilidad relativa de desprotonación. Una de las principales diferencias es que mientras la AP de A2 es ligeramente mayor que la de EDA, su pK_a es ligeramente menor. Esto indica que A2 debería tener una mayor fracción de la forma aniónica que EDA (Tabla 13), lo cual soporta lo propuesto por Nakagawa y col.,⁴⁷ y puede justificar su alta actividad antioxidante. Otra diferencia concierne a los derivados C1 e I1. Sus AP son significativamente más bajos que el de EDA, pero sus pK_a son ligeramente más altos (0.28 y 0.22 unidades de pK_a , respectivamente). La Figura 8 también muestra que, en general, la presencia del solvente incrementa el efecto de los grupos sustituyentes en R1, con respecto a las sustituciones en R3, independientemente de la facilidad de desprotonación.

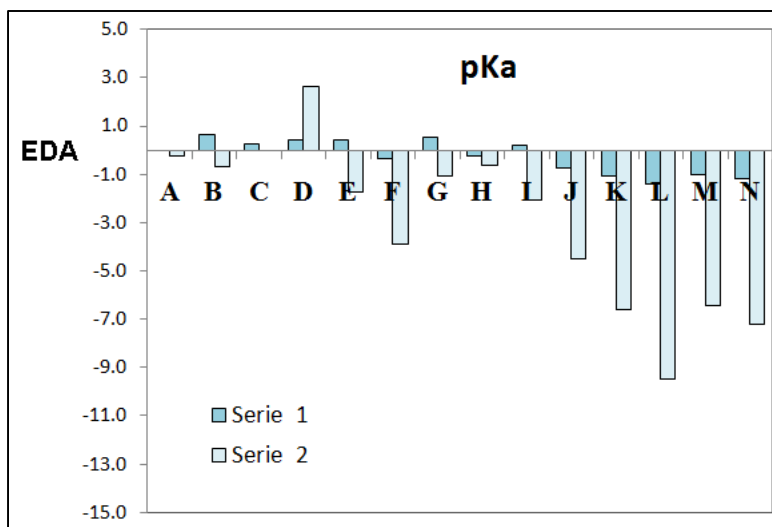


Figura 8. Diferencia del pK_a de los derivados de EDA, respecto al de EDA.

4.3.5 Propuesta de eficiencia antioxidante según descriptores químicos

Potenciales de ionización vs afinidades protónicas

De acuerdo a la discusión anterior, y en concordancia con la intuición química, las modificaciones de EDA con grupos electroattractores dan en general derivados con potenciales de ionización más altos que la de EDA, y entonces tales derivados se espera que sean menos eficientes que EDA mismo. Al mismo tiempo la presencia de grupos electroattractores reducen la afinidad protónica, y entonces incrementa la fracción de la forma aniónica. Lógicamente, modificando EDA con grupos electrodonadores se tiene el efecto opuesto para ambas propiedades: los derivados resultantes tienen los potenciales de ionización más bajos, y las afinidades protónicas más altas que EDA.

La eficiencia de estos compuestos como secuestradores de radicales libres se ha asociado con potenciales de ionización bajos y alta fracción de la forma aniónica (más activa que la forma neutra). Entonces diseñar derivados de EDA con mejor desempeño antioxidante basados en estas dos propiedades, es un desafío ya que los grupos sustituyentes aumentan una de las propiedades deseadas al mismo tiempo que disminuyen la otra (fracción aniónica vs. facilidad para donar electrones). De acuerdo con esto podemos realizar la hipótesis que sustituyentes con carácter ligero, o moderado, electrodonador y

electroceptor son los mejores candidatos para modificar a EDA y producir un antioxidante más eficiente vía TES.

La Figura 9 muestra una gráfica que permite comparar, simultáneamente, los PI y AP de los derivados estudiados con respecto a EDA (A1). Los derivados localizados en el cuadrante (1) tienen mayores PI y AP que EDA. Lo que permite esperar que sean peores antioxidantes que éste. Por otro lado el único compuesto localizado en este cuadrante es A2, reportado por Nakagawa y col.⁴⁷ como mejor antioxidante y por Hata y col.⁴⁸ como peor antioxidante que EDA. Como el análisis realizado hasta el momento se basa en el PI y la AP, o sea está enfocado solamente a TES, se necesita un análisis más extenso y detallado que incluya también otros mecanismos para tratar de definir la contradicción entre las propuestas experimentales. Además, esto sugiere que aunque la facilidad de donar electrones, y la fracción molar de la forma aniónica, son factores clave en la actividad antioxidante de EDA y sus derivados, no son necesariamente los únicos factores que influyen tal actividad. En nuestra opinión la importancia de otros factores aumenta así como disminuye la importancia de los procesos TES, comparados con otros posibles mecanismos de acción tales como la transferencia de hidrógeno y la formación de aducto radicalico.

Las especies en el cuadrante (2) (Figura 9) tienen PI superiores, pero AP inferiores, que EDA. Esto significa que pueden desprotonarse más fácilmente que EDA, y por tanto tienen mayores fracciones molares de la forma aniónica. Las especies en el cuadrante (4) tienen justo las características opuestas: tienen PI más bajas, pero AP más altas que EDA. Las especies en el cuadrante (3) tienen justo el comportamiento deseado: PI y AP más bajas que EDA, entonces se espera que sean los mejores secuestradores de radicales libres a través del mecanismo TES. Una de estas especies es C1, uno de los compuestos sintetizados por Chegaev y col.,⁵¹ y lo describen como mejor antioxidante que EDA. Entonces, en este caso el análisis de PI y AP parecen ser suficientes para explicar el comportamiento observado, y por tanto al parecer el mecanismo TES juega un papel dominante en la actividad antioxidante de este compuesto.

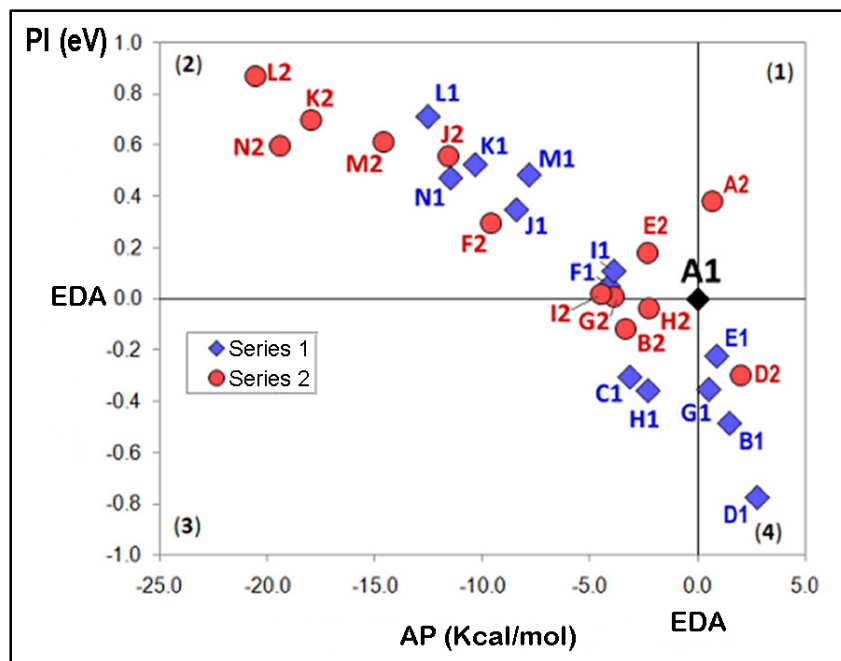


Figura 9. Potenciales de ionización (eV) vs afinidades protónicas (kcal/mol) de los derivados estudiados, respecto a EDA.

Las especies H1 y H2, ambas con el sustituyente $-\text{CH}=\text{CH}_2$ también se localizan en el cuadrante (3) (Figura 9). Basados sólo en PI y AP, ambos parecen ser mejores antioxidantes que EDA. El valor de σ para este grupo es casi cero (-0.04), lo cual soporta la hipótesis que los sustituyentes con efectos electrónicos débiles deberían producir buenos antioxidantes vía TES. Además, H1 se predice como mejor que H2, indicando un gran efecto de la modificación de las propiedades con este grupo cuando la sustitución ocurre en el sitio R1, comparado con R3. De hecho H1 tiene valores de PI y AP significativamente más bajos que los de EDA, mientras la AP de H2 es más baja que la de EDA pero su PI es casi el mismo.

Otra especie localizada en el cuadrante (3) es B2. El grupo sustituyente en este caso es $-\text{OCH}_3$ el cual tiene efectos electrónicos moderados ($\sigma = -0.25$), pero el sitio sustituido es R3 lo que parece desvanecer su influencia global sobre las propiedades analizadas, comparadas con R1. De hecho, cambiar el sitio sustituido a R1 (derivado B1) causa un incremento en AP, por lo que se mueve su localización al cuadrante (4). De acuerdo a este

análisis la actividad antioxidante de B2 se predice como más alta que la de EDA, siempre y cuando el mecanismo de reacción más importante sea TES.

Potenciales de ionización vs pKas.

Se construyó un nuevo esquema que muestra la facilidad de desprotonación y la capacidad electrodonadora de los compuestos estudiados (Figura 10). Los efectos del solvente se incluyeron mediante la sustitución de AP por $pKas$. Como los PI son usualmente estimados experimentalmente en fase gas, tenemos que mantenerlos así, pero al mismo tiempo no podemos ignorar los efectos del solvente. Lógicamente, las diferencias entre $pKas$ relativos y AP relativos se reflejan en el gráfico. En este gráfico incluimos un rectángulo “ideal” (coloreado en gris) que intenta destacar los derivados que nosotros predecimos como tan buenos, o incluso mejores que EDA para depurar radicales libres. Esta zona fue construida basada en los errores que pueden ocurrir en los cálculos, y de acuerdo al siguiente razonamiento. Se ha establecido que las predicciones teóricas de los valores exactos de pKa es una tarea difícil, y significa que desviaciones medias absolutas menores a 2 unidades de pKa son razonablemente exactas,¹⁴² entonces hemos usado este rango para limitar la zona ideal. Aun cuando los métodos TPE son capaces de predecir los PI con aproximadamente 0.25 eV de los experimentales,^{101,102} su exactitud cuando son usados en combinación con los modelos de solvente continuo no es clara todavía. Entonces se incrementó el límite de posibles errores a 0.4 eV para construir el rectángulo ideal mostrado en la Figura 10.

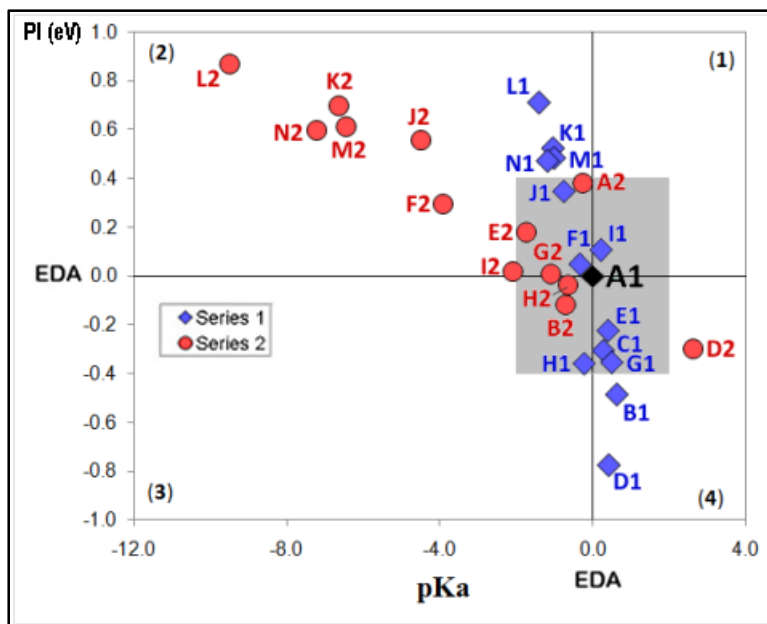


Figura 10. Potenciales de ionización (eV) vs pK_a s de los derivados estudiados, respecto a EDA.

De acuerdo a la Figura 10, se espera que los derivados H1, H2 y B2 tengan la mayor actividad antioxidante entre todos los compuestos estudiados, pues están localizados dentro del rectángulo ideal y también en el cuadrante (3). Los derivados C1, E1, F1, G1, I1, J1, A2, E2 y G2 también se espera que sean buenos candidatos para tal propósito, ya que incluso cuando no están en el cuadrante (3), están localizados dentro del rectángulo ideal. Todos ellos se recomiendan para secuestrar radicales libres tan eficientemente como, o incluso más eficientemente que EDA, al menos cuando el mecanismo TES juega un papel dominante en tal actividad. La Figura 10 también explica los resultados reportados por Chagaev y col.⁵¹ para C1, y por Nakagawa y col.⁴⁷ para A2, por lo que en este caso nuestros resultados soportan la propuesta de Nakagawa⁴⁷ en lugar de la de Hata⁴⁸ con respecto a la actividad antioxidante de A2, incluso considerando solamente TES. Sin embargo, este punto será considerado en más detalle incluyendo todos los mecanismos posibles y cálculos cinéticos en capítulos posteriores. La actividad antioxidante más alta del derivado C1, comparado con EDA, puede racionalizarse en términos de sus PI más bajos, mientras la actividad antioxidante más alta del derivado A2 puede justificarse por su más bajo pK_a , el cual da una fracción más alta de la forma aniónica (0.85 vs 0.76).

4.4 Mecanismo de transferencia electrónica

4.4.1 Termodinámica

El mecanismo de transferencia electrónica para las reacciones de EDA y sus 26 derivados propuestos, se estudió hacia 11 diferentes especies radicálicas (Tabla 14). Se modelaron únicamente en solución acuosa ya que los ambientes polares promueven la solvatación necesaria para las especies iónicas involucradas en el mecanismo TES:



donde HX representa la forma neutra de EDA y sus derivados, X^{-} representa sus monoaniones, y R^{\bullet} es el radical libre.

Tabla 14. Radicales libres estudiados.

Radical	Estructura	Radical	Estructura
•R1		•R7	
•R2		•R8	
•R3		•R9	
•R4		•R10	
•R5		•R11	
•R6			

En cuanto a la conversión de radicales libres a aniones, por el mecanismo TES, existe un desafío extra computacional, que es describir adecuadamente la solvatación de los aniones. Se ha reportado previamente que los mayores errores derivados del uso de modelos de solvatación continuos surgen cuando se estudian aniones que concentran la

carga sobre un heteroátomo expuesto. De las especies radicálicas libres estudiadas el anión OH es el único en esta situación. Entonces se analizó la descripción de solvatación de esta especie en detalle. La energía libre de Gibbs de solvatación para $\bar{\text{O}}\text{H}$ obtenida usando el modelo SMD, sin moléculas de agua explícitas, es -97.5 kcal/mol. Los valores experimentales recomendados por Pliego y Riveros es -105 ± 0.5 kcal/mol.¹⁹⁸ Por lo tanto, incluso cuando SMD da cuenta del 92.8% de la solvatación, hay 7.5 kcal/mol que no están incluidas en la descripción. Esta diferencia es atribuida a las fuertes interacciones de corto alcance del enlace de hidrógeno entre el anión y el solvente. Como resultado se recomienda una estrategia para mejorar el desempeño de modelos continuos que es combinarlos con moléculas de agua explícitas.

Se analizó esta última estrategia para el par $\cdot\text{OH}/\bar{\text{O}}\text{H}$, incluyendo cuatro moléculas de agua (Figura 11). Las constantes de velocidad para las reacciones TES con EDA fueron 1.09×10^7 , 6.02×10^9 , 6.15×10^9 , 6.75×10^9 y 6.48×10^9 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, para 0, 1, 2, 3 y 4 moléculas de agua explícitas, respectivamente. Estos valores muestran que incluir la primera molécula tiene un efecto importante sobre la constante de velocidad, la cual llega a ser 550 veces más grande. Sin embargo, el efecto de la inclusión de las subsecuentes moléculas de agua es casi despreciable. Estos resultados soportan la importancia de adicionar al menos una molécula de agua al continuo para describir apropiadamente la solvatación de $\bar{\text{O}}\text{H}$, de acuerdo con lo propuesto por Kelly, Cramer y Truhlar.¹⁹⁹ Sin embargo, como es generalmente aceptado que la primera capa de solvatación para $\bar{\text{O}}\text{H}$ contiene cuatro moléculas de agua, se usó este modelo particular para estimar todos los datos relacionados con el $\bar{\text{O}}\text{H}$ reportados en este trabajo. Un análisis similar fue desarrollado para las reacciones con $\cdot\text{OOH}$, usando hasta 3 moléculas de agua (Anexo IX). Sin embargo, en este caso la inclusión de moléculas de agua explícitas tiene sólo efectos menores sobre las constantes de velocidad calculadas. Por lo tanto, para todos los otros pares radical/anión estudiados en este trabajo la solvatación fue modelada usando sólo SMD sin aguas explícitas.

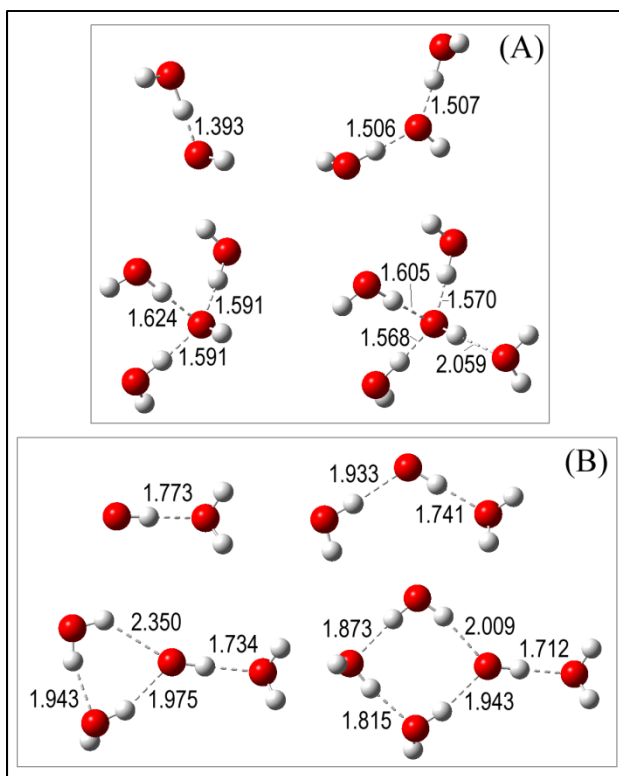


Figura 11. Geometrías optimizadas de (A) OH^- , y (B) OH^\cdot , con 1 a 4 moléculas de agua explícitas.

Las energías libres de Gibbs de reacción (ΔG) entre los radicales estudiados y los derivados de EDA, en sus formas neutras y mono-aniónicas, se muestran en el Anexo X y XI, respectivamente. También se graficaron en las Figuras 12 y 13 para facilitar las comparaciones directas. La capacidad electroaceptora de los radicales estudiados siguen la tendencia: $\text{R4} > \text{R5} > \text{R1} > \text{R9} > \text{R10} > \text{R3} > \text{R2} > \text{R11} > \text{R6} > \text{R8}$. La transferencia electrónica para las formas neutras de EDA y sus derivados, se encontró endergónica hacia los radicales R2 , R3 , R6 , R7 , R8 y R11 . Muchas de las reacciones con R9 y R10 también son endergónicas, excepto $\text{D1} + \text{R9}$ y $\text{D1} + \text{R10}$, mientras que cerca de la mitad de las reacciones con R1 son exergónicas. Por otro lado, el proceso TES con R4 y R5 es exergónico, excepto para $\text{L2} + \text{R5}$. En general, los derivados D1 y D2 producen sistemáticamente los valores más bajos de ΔG cuando transfieren un electrón de sus formas neutras (Figura 12). Sin embargo, la naturaleza de los radicales libres reaccionantes parece

ser mucho más importante para la facilidad termoquímica de las reacciones estudiadas que el derivado particular involucrado en el proceso.

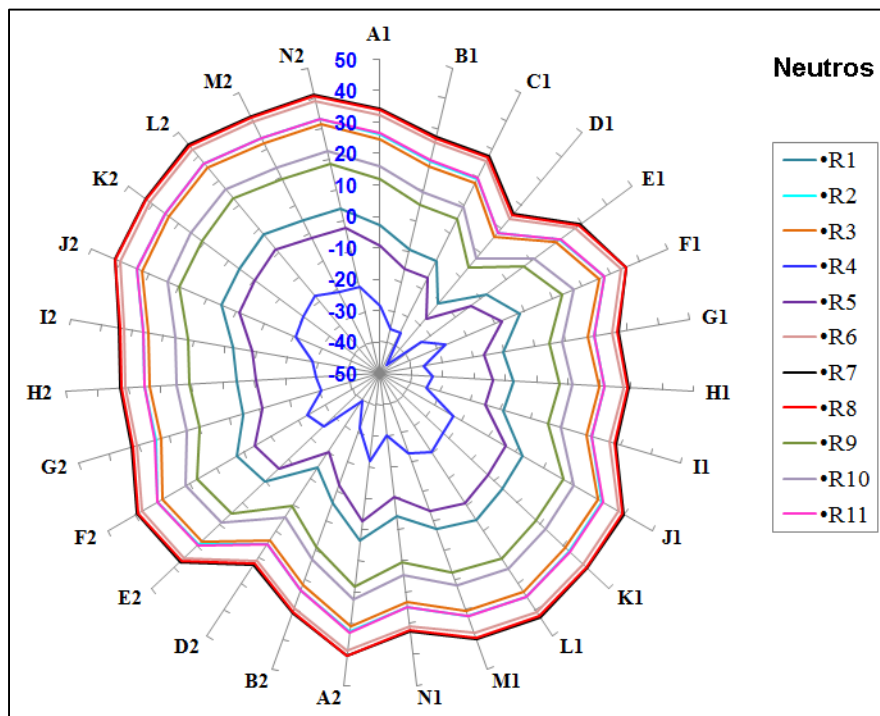


Figura 12. Energías libres de Gibbs de reacción (kcal/mol) del proceso TES para EDA y sus derivados, en sus formas neutras, y los radicales libres estudiados.

Mientras el mecanismo TES de los derivados neutros con $\cdot\text{OCCl}_3$ ($\cdot\text{R4}$) y $\text{CH}_3\text{COO}\cdot$ ($\cdot\text{R5}$) es termoquímicamente viable, muchos de los procesos que involucran los otros radicales libres son endergónicos. Cuando la transferencia electrónica tiene lugar desde los mono-aniones la facilidad termoquímica de los procesos, lógicamente, se incrementa. Las únicas reacciones TES que permanecen endergónicas en este caso son aquellas que involucran a los radicales $\cdot\text{R6}$ (excepto para sus reacciones con D2), $\cdot\text{R7}$ y $\cdot\text{R8}$. Sin embargo, para estos radicales se incrementa significativamente la facilidad termoquímica con respecto a las reacciones que involucran a los antioxidantes neutros. Muchas de las otras reacciones son exergónicas, o rara vez isoergónicas, y muchas de las excepciones corresponden a las transferencias electrónicas de los aniones N1 y N2, los

cuales resultan ser los derivados de EDA que producen los valores más altos de ΔG cuando se transfiere un electrón desde sus formas aniónicas (Figura 13). Esto es algo lógico, ya que $-\text{NO}$ es el grupo electroceptor más fuerte, entre los sustituyentes estudiados. Sin embargo, como fue descrito para las especies neutras, en el caso de los aniones la facilidad termoquímica de las reacciones TES también está fuertemente influenciada por la naturaleza del radical libre, mientras que sólo es moderadamente influenciada por los diferentes derivados.

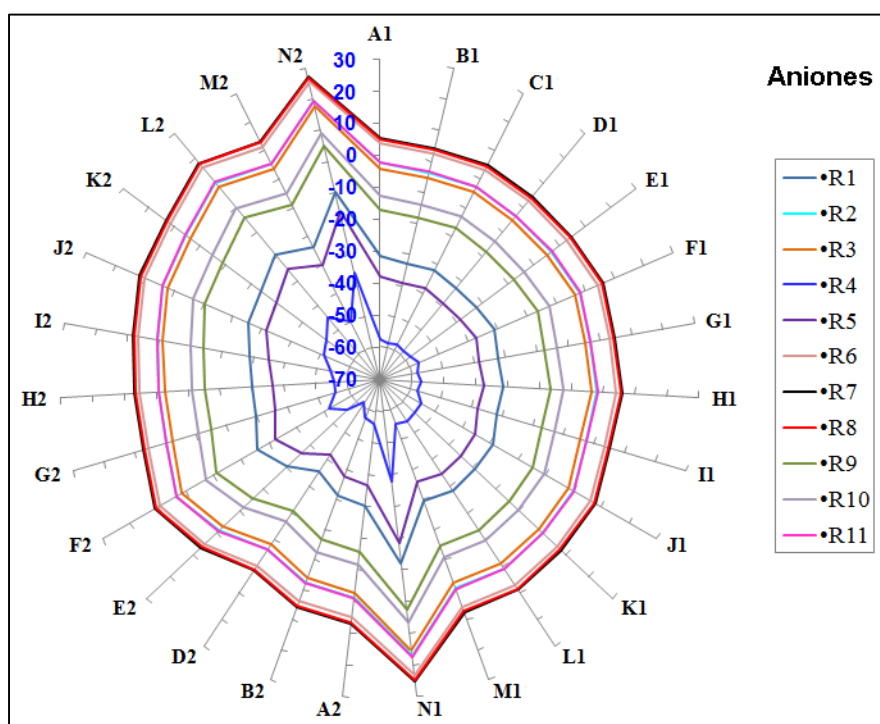


Figura 13. Energías libres de Gibbs de reacción (kcal/mol) del proceso TES para EDA y sus derivados, en sus formas mono-aniónicas, y los radicales libres estudiados.

Debe notarse que los valores positivos de ΔG no necesariamente significan que la reacción correspondiente no ocurra, especialmente si son valores pequeños. Tales procesos pueden darse a velocidades significativas, y si sus productos reaccionan rápidamente a través de reacciones que son suficientemente exergónicas para proporcionar una fuerza impulsora, entonces pueden representar canales importantes. Es decir, procesos

endergónicos pueden jugar un papel importante en sistemas biológicos cuando no hay reacciones paralelas que sean energéticamente más favorables.

4.4.2 Cinética

Las energías de activación de Gibbs (ΔG^\ddagger) se reportan en los Anexos XII y XIII para las reacciones de EDA y sus derivados en sus formas neutras y mono-aniones, respectivamente. Algunas reacciones de los derivados aniónicos de EDA tienen barreras altas, a pesar del hecho que son altamente exergónicas. Esto es particularmente evidente para las reacciones con los radicales $\cdot R4$ y $\cdot R5$, para los cuales sus valores ΔG^\ddagger de las reacciones con los derivados aniónicos son significativamente más altos que con los derivados neutros. El mismo comportamiento se encontró para las reacciones de $\cdot R1$ con los derivados B1, C1, G1, H1 e I1, ya que, considerando sus cargas, se espera que la capacidad electrodonadora de los aniones sea más alta que la de los compuestos neutros correspondientes; este comportamiento es contra intuitivo. Esto puede explicarse basándonos en el hecho de que estas reacciones corresponden a la región invertida de la parábola de Marcus ($\Delta G < \lambda$) y tienen la característica de que ΔG no es sólo más baja, sino mucho más baja que $-\lambda$ (zonas rojas, Figura 14). Los valores de λ para las especies neutras y aniónicas de los compuestos se reportan en los Anexos XIV y XV, respectivamente. Sin embargo, hay otras reacciones que aunque también corresponden a la región invertida, están muy cercanas al vértice de la parábola y entonces sus barreras permanecen bajas. Esto corresponde a los casos donde la diferencia $(-\lambda) - \Delta G$ es positiva pero relativamente pequeña (regiones rosas, Figura 14). Para los otros radicales ($\cdot R2$, $\cdot R3$ y $\cdot R6$ al $\cdot R11$), por otro lado, se encontró el comportamiento esperado y las barreras de sus reacciones con derivados aniónicos son más bajas que aquellos que reaccionan con especies neutras.

Lógicamente, los valores de ΔG^\ddagger se reflejan directamente sobre las constantes de velocidad (Anexos XVI y XVII). Entonces las constantes de velocidad de los radicales $\cdot R4$ y $\cdot R5$ son, en general, más altas para las reacciones con derivados neutros que para las reacciones con las especies aniónicas. Este es también el caso de las reacciones de $\cdot R1$ con los derivados B1, C1, G1, H1 e I1. Para el resto de los radicales la tendencia general es que

las constantes de velocidad de las reacciones con los mono-aniones son más altas que las correspondientes a las reacciones con las especies neutras.

Es muy interesante que, excepto en pocos casos, para cada par radical libre-derivado de EDA por lo menos una de las constantes de velocidad (con la forma neutra o aniónica) es significativamente alta ($> 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Esto tiene implicaciones importantes para la actividad depuradora de radicales libres de esta familia de compuestos. Como los valores de pK_a de muchos de los derivados de EDA son cercanos al pH fisiológico, se espera que cantidades importantes de sus formas neutras y aniónicas estén presentes. Esto significa que el más reactivo donará un electrón al radical libre, desactivándolo, y su población será restaurada a través del equilibrio ácido-base.

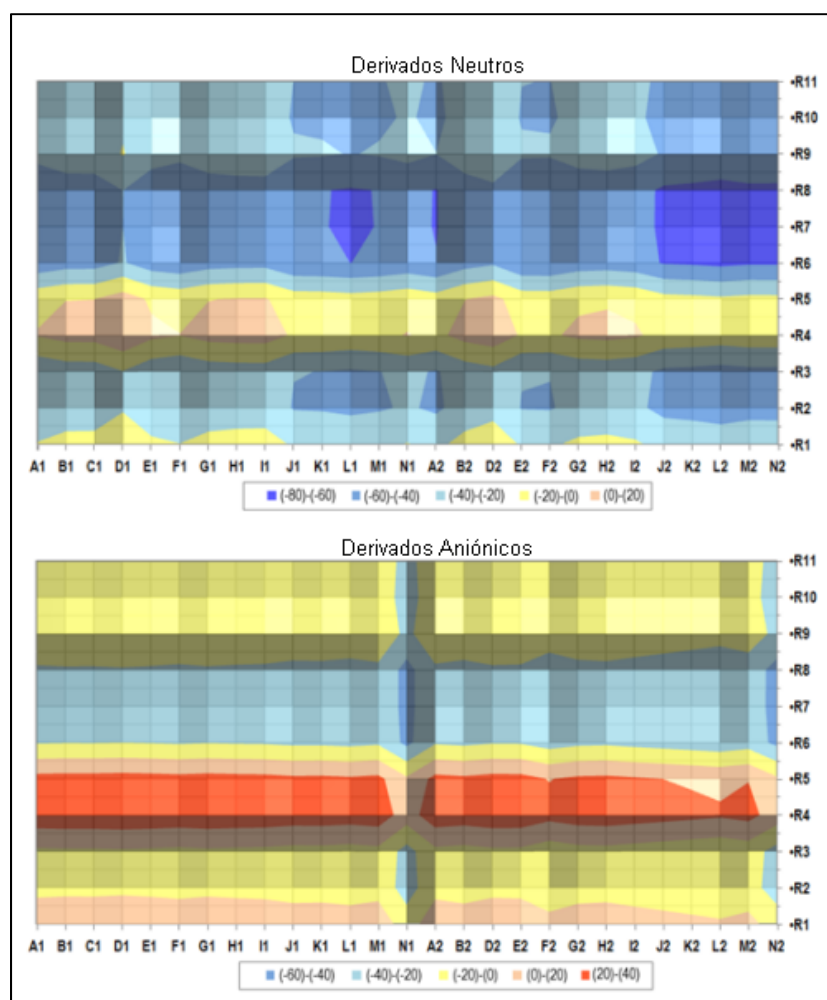


Figura 14. Diferencia entre $-\lambda$ y ΔG (kcal/mol).

Las constantes de velocidad (k_{app} , ecuación 37) de las reacciones TES entre los radicales libres estudiados y la forma neutra de los derivados de EDA se graficaron en la Figura 15 para facilitar comparaciones directas entre todos los datos reportados. Como esta figura muestra, todas las reacciones con los radicales $\cdot R4$ y $\cdot R5$ están dentro del régimen de limite por difusión, o muy cercanas a este ($k_{app} \geq 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Este es también el caso de las reacciones de $\cdot R1$ con muchos derivados y de las reacciones $\cdot R9 + D1$, $\cdot R9 + D2$ y $\cdot R10 + D1$. Para los procesos TES de los mono-aniones de los derivados de EDA (Anexo XVII y Figura 16), muchas de las reacciones con $\cdot R4$ y $\cdot R5$ tienen valores de k_{app} más bajos que $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Las excepciones son los procesos TES de N1, K2, L2 y N2 con $\cdot R4$, y de N1, L2, y N2 con $\cdot R5$. Por otro lado, muchas de las reacciones con $\cdot R1$, $\cdot R2$, $\cdot R3$, $\cdot R9$, $\cdot R10$ y $\cdot R11$ tienen valores de k_{app} que corresponden, o son muy cercanas a ser controladas por difusión. Ya que la eficiencia como depuradores de radicales libres de los compuestos estudiados podría ser importante bajo condiciones fisiológicas, también se calcularon las correspondientes constantes de velocidad totales de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$k_{app}^{Total} = p^N k_{app}^N + p^A k_{app}^A, \quad (50)$$

donde p^N y p^A corresponden a las fracciones molares de las formas neutras y aniónicas de los derivados de EDA, respectivamente; y k_{app}^N y k_{app}^A son sus constantes de velocidad TES.

Los valores de estas constantes de velocidad totales se reportan en el Anexo XVIII, y son graficadas en la Figura 17. En esta figura se muestra una línea a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para dividir la gráfica en dos regiones separadas: arriba de la línea roja están localizados los procesos que se consideran particularmente eficientes para depurar radicales libres, y debajo de la línea roja aquellos que se espera que sean menos eficientes.

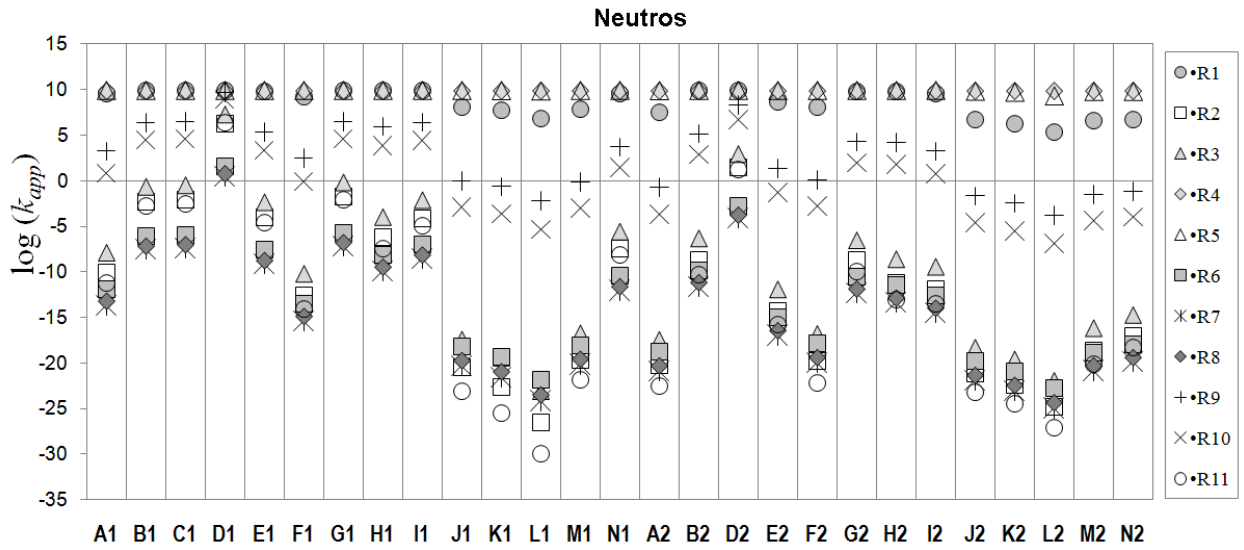


Figura 15. Constantes de velocidad de los derivados neutros de EDA vía TES.

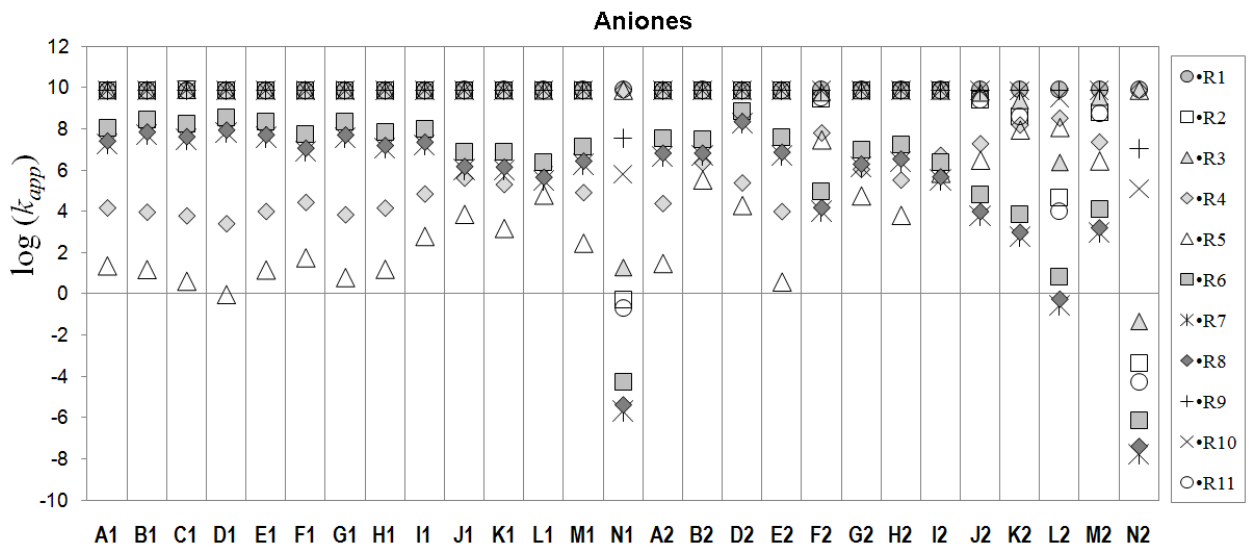


Figura 16. Constantes de velocidad de los derivados aniónicos de EDA vía TES.

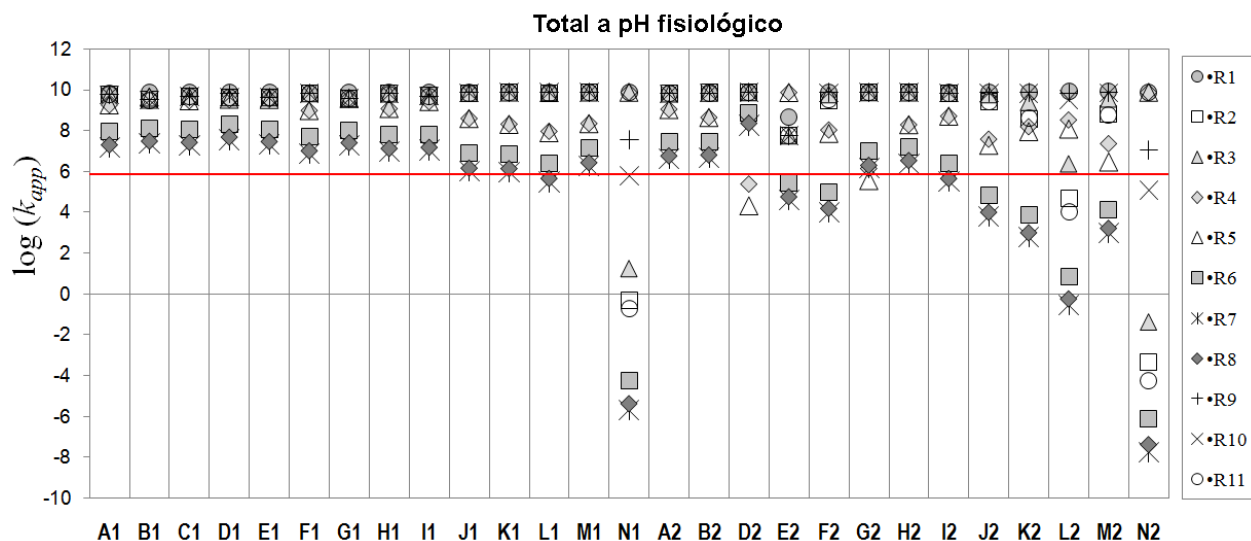


Figura 17. Constantes de velocidad totales, considerando las fracciones molares de derivados neutros y aniónicos, vía TES a pH fisiológico.

Como la Figura 17 muestra, muchos de los derivados de EDA estudiados son muy eficientes como atrapadores de una amplia variedad de radicales libres (todos los estudiados en este trabajo), a través del mecanismo TES. De hecho las reacciones TES que se encontraron con constantes de velocidad más bajas que $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, en condiciones fisiológicas, son las excepciones. EDA y los derivados B1 a J1, M1, A2, B2, y H2 son excelentes para atrapar todos los radicales libres estudiados por donación de un electrón. Estos resultados están de acuerdo con la alta eficiencia antioxidante previamente propuesta para los compuestos C1 y A2,^{51,47} que también están en acuerdo con las predicciones derivadas de los PI y pK_a s. Con base a esto, EDA y los derivados C1 a J1, A2, B2, E2, G2, H2, e I2 fueron identificados como los mejores candidatos para depurar radicales libres oxigenados a través del mecanismo TES. Debería notarse que un estudio mucho más detallado, incluyendo la cinética de otros posibles mecanismos, es necesario para realizar predicciones más exactas. Después de los estudios cinéticos, B1 y M1 son también incluidos en la lista de los ideales, mientras que E2, G2 e I2 no están entre los mejores candidatos para depurar radicales libres vía TES. Sin embargo, es interesante que la similitud entre las predicciones basadas en descriptores químicos y en consideraciones

cinéticas sea amplia. De hecho están de acuerdo para muchas de las especies estudiadas (más del 80%).

Los derivados J1, K1, L1 e I2 se consideraron también como excelentes depuradores de muchos radicales libres, las excepciones corresponden a las reacciones que involucran a los radicales $\cdot R7$ y $\cdot R8$, contra los cuales su actividad protectora es únicamente buena. La eficiencia de los otros derivados como depuradores de radicales libres, vía TES, está ampliamente influenciada por la naturaleza del radical libre involucrado. Los peores depuradores fueron N1 y N2, los que deberían ser incapaces de transferir un electrón a $\cdot R2$, $\cdot R3$, $\cdot R6$, $\cdot R7$, $\cdot R8$, $\cdot R9$ y $\cdot R10$ a velocidades significativas bajo condiciones fisiológicas. Entonces funcionalizando los sitios R1 y R3 de la estructura de EDA (Esquema II) con el grupo NO, no se recomienda para diseñar compuestos con el propósito de actuar como depuradores de radicales libres a través del mecanismo TES. Además, los derivados obtenidos por funcionalización en el sitio R3 generalmente producen derivados con menores capacidades electro-donadoras que aquellos con el mismo grupo funcional en el sitio R1. Para poner en perspectiva la eficiencia de los compuestos estudiados como depuradores de radicales libres se realizaron algunas comparaciones con otros antioxidantes. Por ejemplo, si usamos sus reacciones con $\cdot OH$, podemos concluir que todos ellos tienen reactividad similar, ya que las reacciones con este radical frecuentemente están controladas por difusión.^{49,50} Como tales comparaciones pueden ser engañosas, preferimos usar uno de los radicales menos reactivos; para tal propósito escogimos el radical $\cdot OOH$. Por otra parte, precisamente a causa de la reactividad relativamente baja de este radical, constantes de velocidad global en el orden de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ indica que un compuesto químico es un buen depurador de radicales libres, mientras los coeficientes de velocidad en el orden de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor implican una actividad antioxidante excepcional.²⁰⁰

Se encontró que, en solución acuosa, bajo condiciones fisiológicas, las reacciones de $\cdot OOH$ ($\cdot R6$) con los derivados B1, C1, D1, E1, G1, y D2 (a través de procesos TES) tienen constantes de velocidad en el orden de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Anexo XVIII). Esto significa que estas reacciones son más rápidas que aquellas que involucran muchos de los antioxidantes conocidos, y solamente comparables a la del sesamol ($\sim 2.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).¹⁴⁸ Los coeficientes de velocidad de las reacciones de los derivados A1, F1, H1, I1, M1, A2, B2 y H2 fueron encontrados ligeramente más bajos y similares a los del ácido 2-propensulfénico

($\sim 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$),¹⁴⁸ y glutatión ($\sim 2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$),¹⁴⁷ los cuales han sido reportados como excelentes atrapadores de $\cdot\text{OOH}$. En consecuencia, 14 de los derivados de EDA se encuentran entre los mejores atrapadores de $\cdot\text{OOH}$ conocidos. Además, se encontró que su eficiencia para desactivar este radical es mucho mayor que la de los carotenos ($\sim 10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$),²⁰¹ alicina ($\sim 8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$),²⁰² melatonina ($\sim 2 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$),¹⁵⁰ y cafeína ($3.3 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).¹⁴⁹ Los derivados J1, K1, L1, G2, e I2 también reaccionan con $\cdot\text{OOH}$ más rápido que la alicina, melatonina y cafeína, y a velocidades similares ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) a las de los carotenos más reactivos. Entonces también son muy buenos depuradores de $\cdot\text{OOH}$. Se encontró que la eficiencia de los derivados E2, F2, J2, K2 y M2 es moderada ($k_{\text{app}} \sim 10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), pero mejor que la de alicina, melatonina y cafeína, y similar a la de algunos carotenos. Solamente los derivados N1, L2 y N2 tienen actividad depuradora de $\cdot\text{OOH}$ insignificante.

Además, debe notarse que consideramos únicamente el mecanismo TES para las reacciones de EDA y sus derivados, mientras que se incluyeron otros mecanismos en las estimaciones de constantes de velocidad experimentales de los antioxidantes mencionados arriba. Entonces las constantes de velocidad, reportadas hasta el momento, para EDA y sus derivados, corresponden a límites inferiores, si se incluyeran otros mecanismos de reacción en el estudio de su actividad antioxidante podrían obtenerse coeficientes de velocidad globales más altos. Esto significa que son al menos tan buenos para depurar radicales libres como se predicen hasta este punto del trabajo.

4.5 Comparación de la actividad antioxidante total de Edaravone y sus derivados

4.5.1 Reacción de EDA + $\cdot\text{OH}$

Se realizó el estudio termodinámico y cinético de la reacción entre las formas neutra y aniónica de Edaravone con el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Se consideró el efecto que puede tener el medio circundante en la capacidad antioxidante de EDA teniendo en cuenta tanto el ambiente polar como el no polar y además el efecto del *pH* en solución acuosa. De acuerdo con los diferentes mecanismos de reacción comúnmente asociados a la actividad depuradora de este tipo de compuestos, se estudiaron las siguientes alternativas:

transferencia electrónica simple (TES), formación de aducto radicalico (FAR), transferencia de hidrógeno (TH) y transferencia secuencial protón-electrón (TSPE).

Las energías libres de Gibbs de reacción se reportan en la Tabla 15. Se encontró que el mecanismo de transferencia electrónica de la forma neutra de EDA es endergónico, independientemente de la polaridad del medio. Por lo tanto este mecanismo se descartó como viable para la actividad antioxidante de EDA hacia el radical $\cdot\text{OH}$ en ambos medios. Para la forma aniónica de EDA, por el contrario, el proceso de TES se encontró como exergónico y, por lo tanto, se espera que contribuya significativamente a la reactividad global de EDA hacia el radical $\cdot\text{OH}$ en medio acuoso. Este proceso se corresponde a un mecanismo de transferencia protónica seguida de transferencia de electrónica. Todos los caminos de reacción FAR y TH también se encontraron termodinámicamente viables para ambas formas de EDA independientemente de la polaridad del medio. Para la forma aniónica de EDA las reacciones termodinámicamente más favorables son la de TES y TH del sitio 3a. Para la forma neutra, la más favorable corresponde a la TH en el sitio 4, tanto en ambiente polar como no polar.

Un parámetro geométrico importante en los mecanismos FAR son las distancias C--O en los estados de transición (Tabla 16). Se encontró que todos los estados de transición (ET) FAR tienen una distancia C---O de aproximadamente 2Å. Para la forma neutra de EDA los ET más tempranos son los que corresponden a la adición del $\cdot\text{OH}$ al sitio 3, sugiriendo que este sitio es el más favorecido para el mecanismo FAR. El ET de FAR más temprano para la forma aniónica de EDA es el correspondiente a la adición de $\cdot\text{OH}$ en el sitio 9. Estas características geométricas son congruentes con los resultados termodinámicos mostrados en la Tabla 15. Se encontró que existe un complejo pre-reactivo para el mecanismo FAR en los sitios 4 y 5, de la forma aniónica de EDA (Figura 18). Esta estructura corresponde a ambos sitios de reacción, y es 8.05 kcal/mol inferior que los reactivos aislados, en términos de energía libre de Gibbs.

Tabla 15. Energías libres de Gibbs de reacción para EDA + $\cdot\text{OH}$, a 298.15 K, en kcal/mol.

	Neutro		Anión
	No polar	Polar	Polar
<i>TES</i>	78.65	9.42	-20.36
<i>TH</i>			
Sitio 3a	-29.69	-31.20	-30.06
Sitio 4	-37.91	-38.51	-
<i>FAR</i>			
Sitio 3	-29.81	-29.19	-14.42
Sitio 4			-5.11
Sitio 5	-27.98	-26.89	-15.92
Sitio 6	-8.46	-9.57	-7.70
Sitio 7	-11.90	-11.55	-13.97
Sitio 8	-7.30	-8.81	-8.28
Sitio 9	-9.93	-11.40	-12.18
Sitio 10	-6.92	-8.74	-8.45
Sitio 11	-12.21	-12.15	-11.11

Tabla 16. Distancia (\AA) del enlace C---O en los ET correspondientes al mecanismo FAR.

	d(C---O)	
	Neutro	Anión
Sitio 3	2.203	2.150
Sitio 4	-	1.807
Sitio 5	1.979	2.025
Sitio 6	1.993	2.049
Sitio 7	2.026	2.082
Sitio 8	1.996	2.032
Sitio 9	2.036	2.295
Sitio 10	1.995	2.022
Sitio 11	2.016	2.039

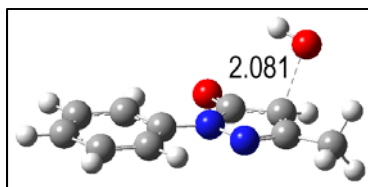


Figura 18. Geometría optimizada del complejo pre-reactivo encontrado para el mecanismo FAR, caminos 4 y 5 de la forma aniónica.

Las barreras de reacción, en términos de energías libres de Gibbs, se reportan en la Tabla 17 para todos los caminos estudiados TH y FAR. Entre todos los caminos TH el que tiene la menor barrera corresponde a la forma aniónica de EDA. Esto sugiere que este mecanismo es favorecido por el proceso de desprotonación. Para el mecanismo FAR, la menor barrera también corresponde a la forma aniónica, en particular, a la adición de $\cdot\text{OH}$ al sitio 3. En general, las barreras de activación de la forma aniónica de EDA son menores que las de los procesos equivalentes para la forma neutra, con excepción de los caminos correspondientes a las adiciones de $\cdot\text{OH}$ en los sitios 6 y 10. Estos resultados apoyan la hipótesis relacionada con la mayor reactividad de la forma desprotonada de EDA, en comparación con la neutra. Para el mecanismo FAR en EDA neutra, las energías de activación son sistemáticamente más bajas en ambientes polares que en no polares, con la excepción del sitio 9. La forma aniónica en medio no polar no se consideró porque no se espera que las especies cargadas existan en concentraciones significativas.

Las geometrías optimizadas de los estados de transición TH se muestran en la Figura 19. Se encontraron dos diferentes estados de transición para el camino correspondiente a TH del grupo metilo en EDA neutro. Uno de ellos presenta un puente de hidrógeno debido a la interacción entre el átomo de H del radical $\cdot\text{OH}$ y el átomo N2 en EDA, con $d(\text{H}\cdots\text{N}) = 2.21 \text{ \AA}$. Para la forma aniónica de EDA sólo se encontró un estado de transición y corresponde a una conformación sin interacción. El ET correspondiente al mecanismo TH en el sitio 4 de EDA neutro también presenta un puente de hidrógeno, esta vez entre el átomo de H del radical $\cdot\text{OH}$ y el átomo O en EDA. La distancia de interacción $d(\text{H}\cdots\text{O})$ resultó ser de 2.38 \AA .

Tabla 17. Energías libres de Gibbs de activación, a 298.15 K, en kcal/mol.

	Neutro		Anión
	No polar	Polar	Polar
<i>TH</i>			
Sitio 3a(H)	8.27	8.56	
Sitio 3a	8.00	8.20	3.85
Sitio 4	8.40	10.13	
<i>FAR</i>			
Sitio 3	4.00	6.07	0.59
Sitio 4			2.23
Sitio 5	11.31	8.99	3.38
Sitio 6	9.82	7.81	11.00
Sitio 7	7.92	5.44	2.77
Sitio 8	8.06	6.54	7.01
Sitio 9	6.57	9.33	3.65
Sitio 10	8.84	7.00	20.84
Sitio 11	7.75	5.00	1.22

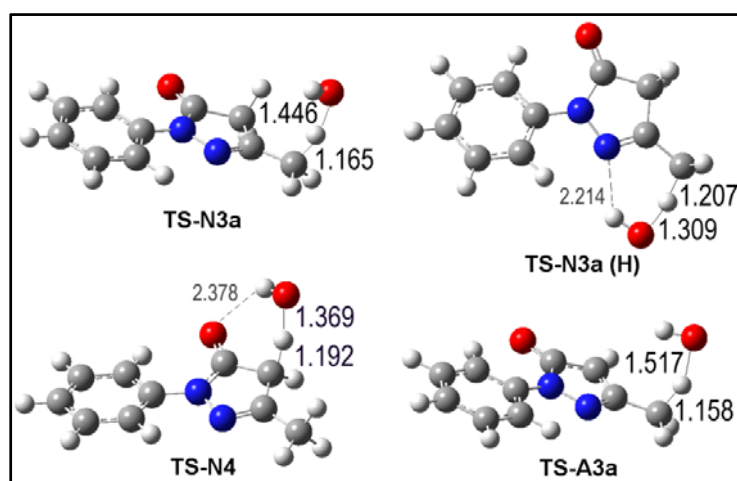


Figura 19. Geometrías optimizadas de ET del mecanismo TH para EDA + \cdot OH.

Las constantes de velocidad para los distintos caminos de reacción, así como sus contribuciones a la reacción total entre EDA y $\cdot\text{OH}$, se reportan en la Tabla 18, junto con el coeficiente de velocidad global. Se asumió que no existen mezclas ni cruces entre los diferentes caminos de reacción, y por tanto el coeficiente de velocidad global, mide la velocidad de desaparición de radicales $\cdot\text{OH}$, y se calculó como:

$$k_{global} = p^N k_{tot}^N + p^A k_{tot}^A, \quad (51)$$

donde p^N y p^A son las fracciones molares de las formas neutra y aniónica de EDA, respectivamente. El total de las contribuciones de cada forma (k_{tot}^N y k_{tot}^A) se calculó sumando las constantes de velocidad de los diferentes caminos de reacción:

$$k_{tot}^N = k_{app}^{N,TH} + k_{app}^{N,FAR}, \quad (52)$$

donde

$$k_{app}^{N,TH} = k_{app}^{N,C3a} + k_{app}^{N,C4}, \quad (53)$$

$$k_{app}^{N,FAR} = k_{app}^{N,C3} + k_{app}^{N,C5} + k_{app}^{N,C6} + k_{app}^{N,C7} + k_{app}^{N,C8} + k_{app}^{N,C9} + k_{app}^{N,C10} + k_{app}^{N,C11}, \quad (54)$$

y

$$k_{tot}^A = k_{app}^{A,TES} + k_{app}^{A,TH} + k_{app}^{A,FAR}, \quad (55)$$

donde:

$$k_{app}^{A,TH} = k_{app}^{A,C3a}, \quad (56)$$

$$k_{app}^{A,FAR} = k_{app}^{A,C3} + k_{app}^{A,C4} + k_{app}^{A,C5} + k_{app}^{A,C6} + k_{app}^{A,C7} + k_{app}^{A,C8} + k_{app}^{A,C9} + k_{app}^{A,C10} + k_{app}^{A,C11} \quad (57)$$

Las contribuciones de los diferentes caminos a la reacción total, presentadas en porcentaje, se calcularon como:

$$\Gamma_i = \frac{k_i}{k_{global}} \times 100, \quad (58)$$

donde i representa cada camino de reacción en particular.

La constante de velocidad total para la reacción entre el $\cdot\text{OH}$ y EDA aniónico en solución acuosa resultó ser 8.64 veces más rápida que la de la forma neutra en el mismo medio. Esto apoya la propuesta de Yamamoto y col.³⁵ y Ohara y col.,³⁶ es decir, que la forma aniónica de Edaravone es más reactiva que su forma no iónica cuando actúa como antioxidante. Se encontró que el mecanismo predominante varía dependiendo de la forma de EDA. Para la forma aniónica se encontró que TES es el mecanismo que más contribuye a la reactividad global de EDA hacia $\cdot\text{OH}$ (~ 44%). Para la forma neutra, por el contrario, el mecanismo principal es FAR, independientemente de la polaridad del medio, con una contribución de 98.20% y 99.16 % en soluciones de benceno y agua, respectivamente. Las contribuciones TH son de menor importancia para EDA neutro. En cambio, las contribuciones de este mecanismo a la reactividad total de EDA aniónica fueron pequeñas pero significativas (~ 16%). El mecanismo FAR para la forma aniónica de EDA representa alrededor del 40% de la constante de velocidad total.

La mayoría de los caminos FAR contribuyen de manera similar a la reactividad total de EDA aniónico, con aportaciones que van desde ~6.5 % a ~6.8 %. Las excepciones son los correspondientes a las adiciones en los sitios 6, 8, y 10, que contribuyen menos del 1% a la constante de velocidad total. Por lo tanto, de acuerdo con los datos reportados en la Tabla 18, se espera una amplia distribución de productos cuando el radical $\cdot\text{OH}$ reacciona con el anión de EDA. Para la forma neutra la abundancia de los diferentes productos de la reacción está influenciada por la polaridad del medio. En medio no-polar, hay dos productos principales: los correspondientes a adiciones de $\cdot\text{OH}$ a los sitios 3 y 9 (alrededor del 86% y 9%, respectivamente). En soluciones acuosas, por el contrario, se espera una distribución más amplia de productos, y se predicen cinco productos en proporciones significativas. Ellos son los correspondientes a las adiciones al sitio 11 (~40.2 %), al sitio 7 (~29.9 %), al sitio 3 (~15.5 %), al sitio 8 (~8.2 %), y al sitio 10 (~4.1 %).

Tabla 18. Constantes de velocidad aparentes (k_{app}) y contribuciones (Γ) de los diferentes caminos, y coeficiente de velocidad global ($M^{-1} s^{-1}$), a 298 K.

	Constantes de velocidad			Contribuciones		
	Neutro		Anión	Neutro		Anión
	No polar	Polar	Polar	No polar	Polar	Polar
<i>TES</i>			7.96E+09			43.93
<i>TH</i>						
Sitio 3a	2.53E+07	1.71E+07	2.83E+09	1.35	0.82	15.63
Sitio 4	8.57E+06	4.63E+05	-	0.46	0.02	
<i>FAR</i>						
Sitio 3	1.61E+09	3.25E+08	1.23E+09	85.60	15.49	6.77
Sitio 4			1.22E+09			6.71
Sitio 5	6.34E+04	3.16E+06	1.19E+09	~0	0.15	6.57
Sitio 6	7.87E+05	2.29E+07	1.08E+05	0.04	1.09	~0
Sitio 7	1.91E+07	6.27E+08	1.21E+09	1.02	29.90	6.70
Sitio 8	1.53E+07	1.71E+08	8.44E+07	0.81	8.17	0.47
Sitio 9	1.72E+08	1.78E+06	1.17E+09	9.15	0.08	6.46
Sitio 10	4.11E+06	8.51E+07	6.51E-03	0.22	4.06	~0
Sitio 11	2.54E+07	8.44E+08	1.22E+09	1.35	40.22	6.76
<i>Total</i>	1.88E+09	2.10E+09	1.81E+10			
<i>Global</i>		1.35E+10				
<i>Exp.</i>		8.5E+09 ^(a)				
		3.0E+10 ^(b)				

^(a) referencia 38

^(b) referencia 39

Como se mencionó, en solución acuosa a *pH* fisiológico (7.4), 28.5% de EDA se encontrará en su forma neutra y 71.5% en su forma aniónica. Considerando sus abundancias relativas, se estimó la contribución en porcentaje de cada camino de reacción a la reactividad global (Figura 20). Como esta figura muestra claramente el principal mecanismo de reacción, en condiciones fisiológicas en medio acuoso, es TES de la forma aniónica de EDA hacia el radical $\cdot OH$. Este proceso es equivalente al mecanismo TSPE, es

decir, a una transferencia de protón seguida de una transferencia electrónica y corresponde exactamente al mismo producto que se obtendría por una transferencia directa del H en el sitio 4 de EDA neutro. De acuerdo a esto se predice que este es el intermediario radicalico más abundante de la reacción de EDA con el radical $\cdot\text{OH}$ a $p\text{H}$ fisiológico. El segundo producto más abundante se forma por el mecanismo TH en el sitio 3a de EDA aniónico y por FAR en el sitio 11 de EDA neutro. De acuerdo con la Figura 20 también se espera una amplia variedad de aductos radicalicos.

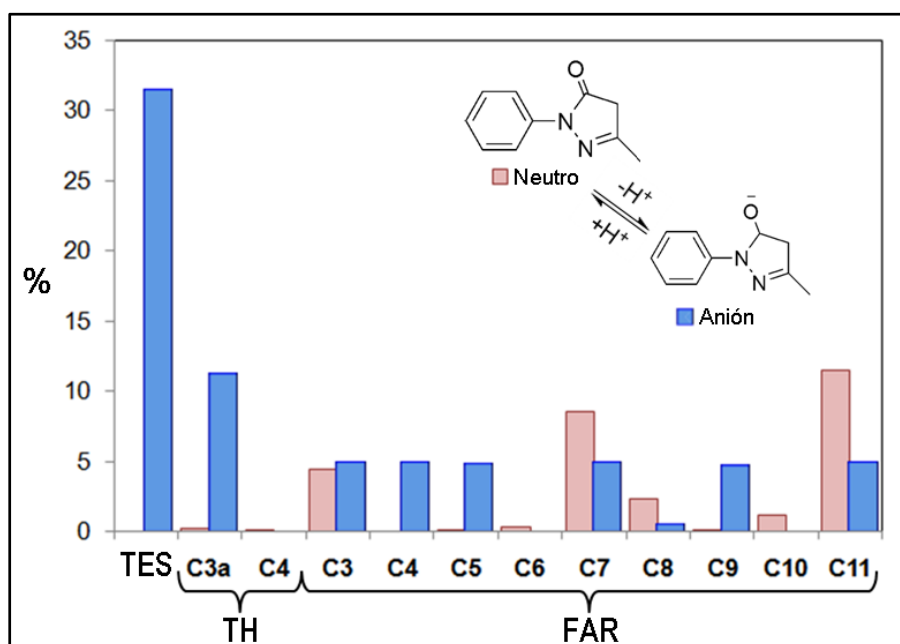


Figura 20. Contribuciones en porcentaje a la constante de velocidad global a $p\text{H}$ fisiológico.

Las constantes de velocidad totales se encontraron cerca del límite por difusión en todos los casos estudiados. Esto apoya que EDA es un excelente atrapador de $\cdot\text{OH}$, y está de acuerdo con los datos experimentales. La constante de velocidad global calculada, en solución acuosa, considerando las fracciones molares de las formas aniónica y neutra de EDA, a $p\text{H}$ fisiológico, está en excelente acuerdo con los datos experimentales reportados previamente. De hecho, el valor calculado ($1.35 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) está entre los estimados por Lin y col.³⁸ ($8.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y Abe y col.³⁹ ($3.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Nuestro valor es sólo 1.6

veces mayor que el primero y 2.2 veces inferior al segundo. Esto apoya la confiabilidad de los cálculos realizados, así como de los datos que se presentan por primera vez.

Lin y col.³⁸ también reportan el espectro de absorción UV-Vis de la reacción entre EDA y $\cdot\text{OH}$, en solución acuosa a $\text{pH}=7$. Ellos encontraron un pico principal a 320 nm, con un hombro a 350 nm. Una comparación entre el espectro UV-Vis experimental y el obtenido en el presente trabajo se muestra en la Figura 21, donde el espectro UV-Vis teórico se graficó a $\text{pH}=7$ y $\text{pH}=7.4$ para ser comparados con el experimental. A $\text{pH}=7$, el cual se asemeja más a las condiciones experimentales, se observa una banda con un hombro, justo como en el espectro experimental, mientras que a pH fisiológico (7.4) la separación de las bandas es más evidente. En la Figura 22 se muestra el espectro calculado a diferentes pH . Los cuales se obtuvieron usando la aditividad de la absorbancia, la abundancia relativa de los productos formados, y las fracciones molares de las formas neutra y aniónica de EDA de acuerdo con su $\text{pK}_a=7$. Las bandas de absorción descritas por Lin y col.³⁸ aparecen, en el espectro calculado, en los rangos 312-320 nm y 348-368 nm, respectivamente. A pesar de que la intensidad relativa de estas dos bandas se invierte con respecto al espectro experimental, su ubicación se encuentra en muy buen acuerdo con los datos experimentales. El espectro de la Figura 22 también muestra que a pH más ácidos los dos picos se sobrepone formando una sola banda. Cuando el pH se incrementa (así como la fracción molar de la forma aniónica de EDA) la banda se separa en dos picos. Además, una banda amplia también aparece en el espectro calculado, en el rango 468-506 nm (Figura 22). Y su intensidad se incrementa cuando el pH se hace más básico. Esta banda se debe a la formación del aducto radicalico del $\cdot\text{OH}$ en el sitio 5 de la forma aniónica de EDA, el cual es un intermediario lógico del producto de oxidación propuesto en las referencias 35 y 37.

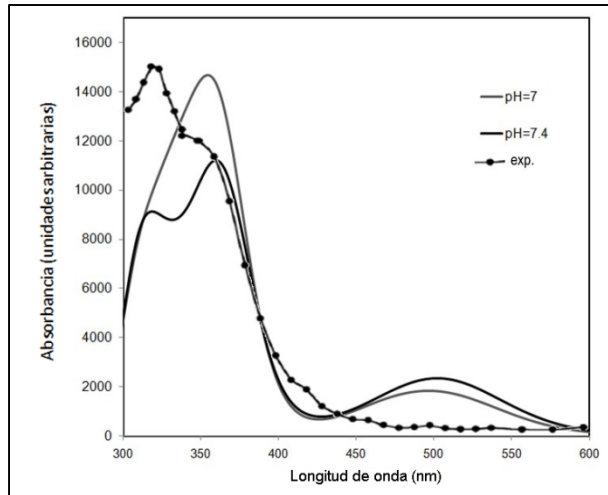


Figura 21. Espectro UV-Vis experimental ($pH=7$) y calculado ($pH=7$ y 7.4).

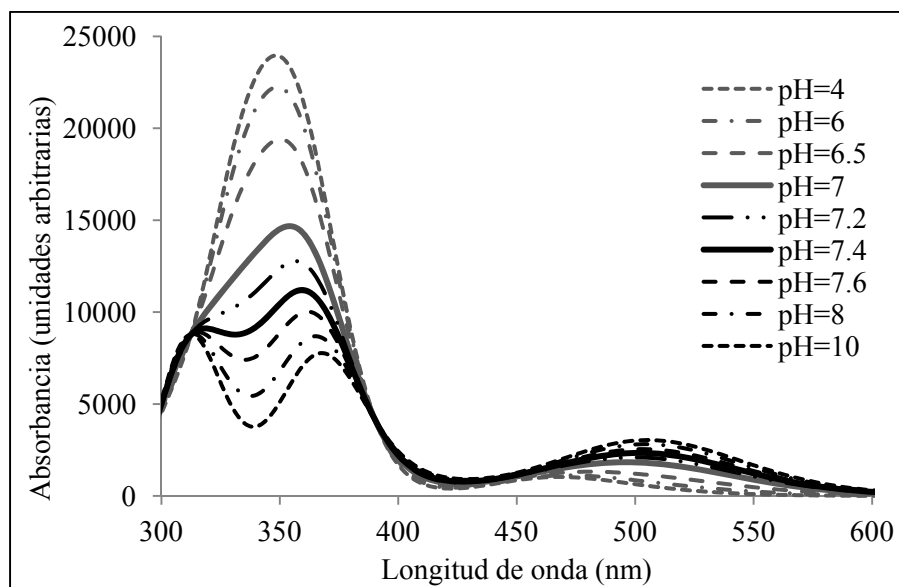


Figura 22. Espectro UV-Vis calculado a diferentes pH , tomando pK_a (EDA)=7.

Las contribuciones por separado de los productos de reacción más importantes al espectro UV-Vis, a pH fisiológico, se muestran en la Figura 23, junto con los espectro UV-Vis de las formas aniónica y neutra de Edaravone. Se incluyeron únicamente los productos con mayor población, y sus espectros se pesaron de acuerdo a su población relativa. Las contribuciones al espectro total, del exceso de EDA y de su anión, que podrían no haber

reaccionado, se han descartado. Estas dos especies tienen sus señales a longitudes de onda fuera de la región de interés. La forma no iónica tiene su máxima absorción a 223 nm, en solución acuosa. Este valor se encuentra en muy buen acuerdo con lo reportado por Chapkanov y col.²⁰³ en etanol (244 nm). La forma de la banda también es similar mostrando un ligero hombro a la derecha del máximo. El excelente acuerdo entre el espectro UV-Vis calculado y experimental de EDA,²⁰³ soporta la confiabilidad del otro espectro reportado en este trabajo. La λ máxima experimental del producto formado por transferencia electrónica del anión de EDA se encontró alrededor de 350 nm.³⁸ El valor obtenido de nuestros cálculos es 365 nm, también está en muy buen acuerdo con el experimento. No encontramos ningún otro dato experimental sobre espectros UV-Vis de alguna otra especie estudiada. La λ máxima calculada de EDA aniónica se encontró en 262 nm, es decir, desplazada por cerca de 40 nm con respecto a EDA neutro.

Se encontraron dos espectros con una mayor contribución a la banda en el rango de 312-320 nm, que fueron los correspondientes al mecanismo TH del grupo metilo en el anión de EDA ($\lambda_{\text{max}} = 312$ nm), y a la adición de $\cdot\text{OH}$ en el sitio 3 de EDA neutra ($\lambda_{\text{max}} = 306$ nm). Además, se encontró una mayor contribución del aducto radicalico formado en el sitio 7 de EDA neutra ($\lambda = 330$ nm), el cual también contribuye a la banda en la región 348-368 nm ($\lambda = 360$ nm). De igual manera existen varios productos de reacción que contribuyen a esta banda, los cuales son los formados por FAR en el sitio 11 de ambas formas de EDA ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm para EDA neutro y 369 nm para su anión), por FAR en el sitio 7 de EDA anión ($\lambda = 367$ nm), y por TES en la forma aniónica de EDA ($\lambda = 365$ nm).

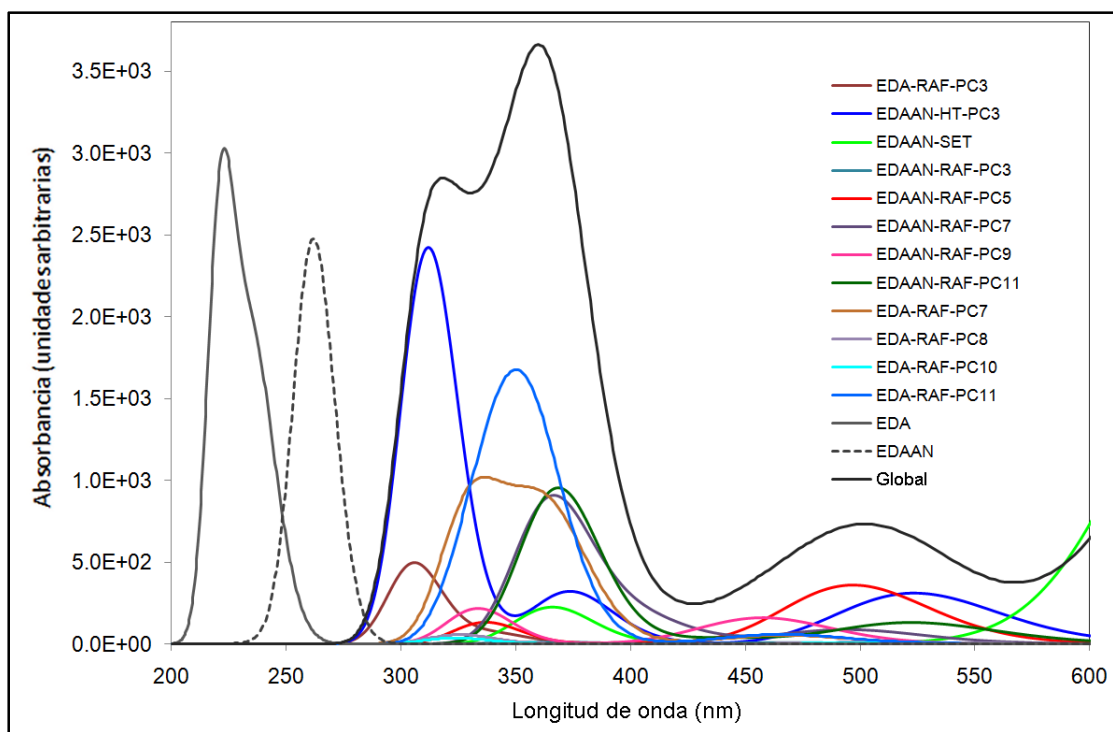


Figura 23. Espectro UV-Vis de EDA neutro (EDA) y anión (EDAAN), y de los productos más abundantes obtenidos por sus reacciones con $\cdot\text{OH}$, a $p\text{H}$ fisiológico.

Entonces, en condiciones fisiológicas en medio acuoso, el principal mecanismo de reacción en la actividad depuradora global de EDA hacia el radical $\cdot\text{OH}$ es TSPE. Para la reacción de EDA anión con el radical $\cdot\text{OH}$ se predice una amplia distribución de productos. Para la forma neutra, la población relativa de los diferentes productos de reacción es influenciada por la polaridad del medio circundante. El excelente acuerdo con datos experimentales soporta la confiabilidad de la metodología empleada así como de la nueva información que se presenta en este trabajo.

4.5.2 Reacción del derivado A2 (piridil) con $\cdot\text{OH}$

Piridil (3-metil-1-piridin-2-il-5-pirazolona, A2, Esquema III) es un derivado de Edaravone, sintetizado por Nakagawa y col.⁴⁷ y propuesto como mejor antioxidante que EDA cuando reacciona con $\cdot\text{OH}$ por TES, en solución acuosa. Por el contrario Hata y col.⁴⁸ lo proponen con actividad antioxidante ligeramente menor que la de EDA. Por esta

contradicción entre ambos autores sobre la actividad antioxidante de EDA y su derivado piridil, es importante analizar cuál de ellos tiene mayor actividad depuradora de radicales libres. En el presente trabajo trataremos de elucidar cuál de ellos es mejor antioxidante a partir de un estudio termodinámico y cinético considerando todos los mecanismos posibles de reacción.

En la Tabla 19 se reportan las energías libres de Gibbs (ΔG) de los diferentes mecanismos y caminos de la reacción entre piridil y $\cdot\text{OH}$, junto con sus correspondientes barreras de activación en términos de energías libres de Gibbs (ΔG^\ddagger).

Tabla 19. Energías libres de Gibbs de reacción (ΔG) para piridil + $\cdot\text{OH}$, y energías libres de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger), a 298.15 K, en kcal/mol.

	ΔG			ΔG^\ddagger		
	Neutro		Anión	Neutro		Anión
	No polar	Polar	Polar	No polar	Polar	Polar
<i>TES</i>	84.67	14.86	-16.13		17.61	10.28
<i>TH</i>						
Sitio 4	-37.71	-38.20		8.39	10.16	
Sitio 3a	-30.86	-32.96	-30.10	7.27	7.74	7.36
<i>FAR</i>						
Sitio 3	-29.58	-29.27	-14.57	3.24	5.80	2.16
Sitio 4			-4.52			8.29
Sitio 5	-25.92	-25.32	-30.38	13.24	11.24	7.47
Sitio 6	-10.95	-12.85	-14.25	13.25	9.81	5.75
Sitio 8	-12.32	-12.92	-13.24	10.19	7.43	6.35
Sitio 9	-9.20	-10.49	-11.37	6.86	5.26	4.00
Sitio 10	-4.17	-6.26	-5.25	11.14	10.43	11.15
Sitio 11	-13.66	-13.03	-12.10	7.37	5.41	1.77

Se encontró que TES de la forma neutra de piridil es endergónica, independientemente de la polaridad del medio. Además cuando el proceso tiene lugar en medio no polar el valor de ΔG aumenta significativamente, debido a la pobre solvatación que esta clase de solventes puede proporcionar a las especies iónicas formadas vía TES. Por otro lado se encontró como exergónico el mecanismo de transferencia electrónica de la forma aniónica en solución acuosa. También se encontró que los mecanismos TH y FAR son termodinámicamente favorables para todos los sitios de reacción, independientemente de la polaridad del medio y de la forma reaccionante, neutra o aniónica. Para la forma neutra de piridil, se encontraron como los canales más exergónicos los correspondientes al mecanismo TH en el sitio 4 y al mecanismo FAR en los sitios 3 y 5. Esta tendencia es la misma independientemente de la polaridad del medio. Con respecto a la forma aniónica los caminos más exergónicos fueron los de TH en el sitio 3a y FAR en el sitio 5.

Con respecto a las energías libres de activación (Tabla 19), el valor más pequeño para el mecanismo TH corresponde al sitio 3a, tanto para las formas neutras como para las aniónicas, en ambiente polar y no polar. Para el mecanismo FAR la barrera más baja corresponde a la adición de $\cdot\text{OH}$ al sitio 3, cuando la forma neutra de piridil reacciona en medio no polar. Cuando este mecanismo tiene lugar en solución acuosa, involucrando piridil neutro, hay tres sitios de reacción con barreras similares (3, 9 y 11) que son significativamente más bajas que las correspondientes a los otros sitios FAR. Para las reacciones con piridil aniónico las barreras más bajas son las correspondientes a la adición de $\cdot\text{OH}$ en los sitios 3 y 11. Comparando las formas neutra y aniónica de piridil en solución acuosa, los valores ΔG^\ddagger de las reacciones con el anión de piridil son sistemáticamente más bajas que con su especie neutra, la única excepción encontrada fue la adición de $\cdot\text{OH}$ al sitio 10. Estos resultados sugieren una reactividad más alta de la forma desprotonada de piridil, comparada con la forma neutra. Es interesante notar que a pesar de la alta exergonicidad de la transferencia electrónica del anión, su correspondiente valor de ΔG^\ddagger es alto. Este comportamiento contra-intuitivo puede ser explicado basándonos en que este punto corresponde a la región invertida de la parábola de Marcus ($\Delta G < -\lambda$). De hecho se encontró que el valor de ΔG es significativamente más bajo que el de $-\lambda$ en 12.4 kcal/mol.

En cuanto a las estructuras de los estados de transición (ET), un parámetro geométrico importante para los TSs de FAR es la distancia C---O. Para todos los sitios de

reacción posibles de este mecanismo se encontró una distancia de aproximadamente 2Å (Tabla 20). Para la forma neutra de piridil los TSs más tempranos son los que corresponden a la adición del $\cdot\text{OH}$ al sitio 3 seguido de los sitios 9 y 11. Lo que sugiere que estos sitios son los más favorecidos para el mecanismo FAR. El ET FAR más temprano para la forma aniónica de piridil es el correspondiente a la adición de $\cdot\text{OH}$ al sitio 9. Cabe destacar que estos resultados son muy similares a los encontrados en la reacción de EDA con el radical $\cdot\text{OH}$.

Tabla 20. Distancia (Å) del enlace C---O en los ET correspondientes al mecanismo FAR para piridil + $\cdot\text{OH}$.

	d(C---O)	
	Neutro	Anión
Sitio 3	2.140	2.096
Sitio 4	---	1.814
Sitio 5	1.946	2.058
Sitio 6	1.950	2.077
Sitio 8	1.987	2.045
Sitio 9	2.024	2.314
Sitio 10	1.946	1.922
Sitio 11	2.011	2.041

En la Figura 24 se muestran las geometrías optimizadas de los estados de transición correspondientes al mecanismo TH para la reacción entre piridil y $\cdot\text{OH}$. Se encontraron dos diferentes estados de transición para el camino correspondiente a TH del grupo metilo en piridil neutro. Uno de ellos presenta un puente de hidrógeno debido a la interacción entre el átomo de H del radical $\cdot\text{OH}$ y el átomo N2 en piridil, con $d(\text{H}---\text{N}) = 2.160$ Å. El ET correspondiente al sitio 4 de piridil neutro también presenta un puente de hidrógeno, esta vez entre el átomo de H del radical $\cdot\text{OH}$ y el átomo O en piridil. La distancia de interacción $d(\text{H}---\text{O})$ resultó ser de 2.389 Å. Para la forma aniónica de piridil sólo se encontró un estado de transición y corresponde a una conformación sin interacción de puente de H.

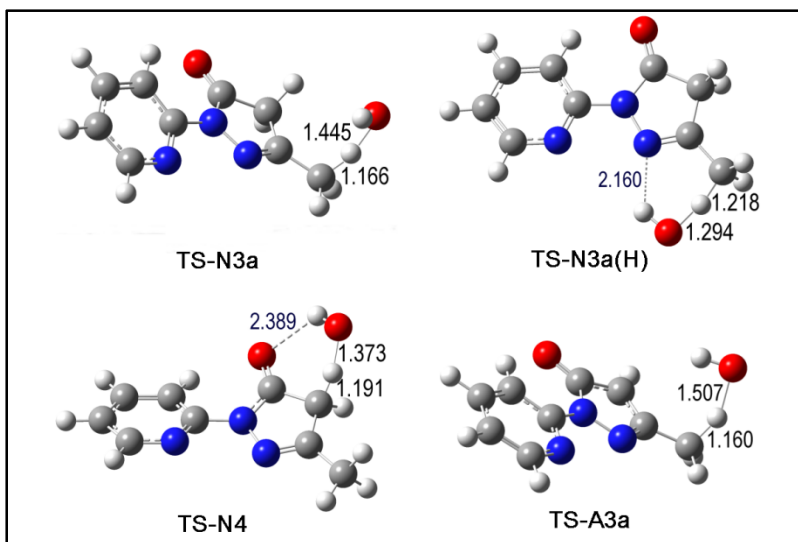


Figura 24. Geometrías optimizadas de ET del mecanismo TH para piridil + $\cdot\text{OH}$.

Las constantes de velocidad de los diferentes caminos de reacción entre piridil y $\cdot\text{OH}$, en solución acuosa y benceno, se reportan en la Tabla 21, junto con los coeficientes de velocidad total y global, así como sus contribuciones a la constante de velocidad total. Las constantes de velocidad totales de las reacciones que involucran a la forma neutra en medio no polar y polar, así como la de la forma aniónica en solución acuosa, se calcularon como la suma de las constantes de velocidad aparentes de los diferentes caminos (como en las ecuaciones 52-57). Para calcular el coeficiente de velocidad global en solución acuosa, se consideraron las fracciones molares de las formas neutra (p^N) y aniónica (p^A) a $p\text{H}$ fisiológico (ecuación 51). Las contribuciones de los diferentes canales de reacción en solución acuosa y benceno, las cuales representan su porcentaje de contribución a la reacción total, se calcularon según la ecuación 58.

Se encontró que el coeficiente de velocidad global calculado en solución acuosa (Tabla 21) es 1.96 veces más bajo que el valor experimental reportado por Hata y col.⁴⁸ Este excelente acuerdo confirma la confiabilidad de nuestros resultados, y nuevamente valida la metodología usada para los cálculos. Las constantes de velocidad totales todas tienen valores muy similares, que están en el rango de límite por difusión tanto en ambiente polar como no polar. Esto significa que piridil (derivado A2) es un excelente atrapador de $\cdot\text{OH}$ independientemente de la polaridad del medio. Entonces su efecto protector, contra esta especie tan dañina, se espera que tenga lugar tanto en la fase acuosa como en la lipídica

de los organismos vivos. Además, se encontró que en solución acuosa la forma aniónica de piridil reacciona 2.3 veces más rápido con $\cdot\text{OH}$ que la forma neutra. Esto está de acuerdo con reportes previos sobre la mayor actividad depuradora de las especies aniónicas^{35,36,38,39} de esta familia de compuestos. Esta diferencia es particularmente significativa para el mecanismo TES, lo cual es lógico basado en la carga del electrodonador.

Tabla 21. Constantes de velocidad aparentes (k_{app}), contribuciones (Γ) de los diferentes caminos, y coeficiente de velocidad global ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), para piridil + $\cdot\text{OH}$, a 298.15 K.

	Constantes de velocidad			Contribuciones		
	Neutro		Anión	Neutro		Anión
	No polar	Polar	Polar	No polar	Polar	Polar
<i>TES</i>		7.71E-01	1.80E+05		~0.00	~0.00
<i>TH</i>						
Sitio 3a	5.65E+07	2.57E+07	4.83E+07	2.86	1.37	1.12
Sitio 4	8.74E+06	4.42E+05		0.44	0.02	
<i>FAR</i>						
Sitio 3	1.75E+09	4.44E+08	1.22E+09	88.72	23.70	28.31
Sitio 4			7.03E+04			~0.00
Sitio 5	2.43E+03	7.18E+04	5.62E+05	~0.00	~0.00	0.01
Sitio 6	2.40E+03	8.02E+05	4.68E+08	~0.00	0.04	10.82
Sitio 8	4.19E+05	4.28E+07	2.23E+08	0.02	2.28	5.17
Sitio 9	1.09E+08	7.20E+08	1.13E+09	5.50	38.43	26.20
Sitio 10	8.48E+04	2.79E+05	8.38E+04	~0.00	~0.01	~0.00
Sitio 11	4.82E+07	6.40E+08	1.23E+09	2.44	34.13	28.36
<i>Total</i>	2.05E+09	1.88E+09	4.35E+09			
<i>Global</i>		3.98E+09				
<i>Exp.</i>		7.80E+09 ^(a)				

(a) referencia 48

En cuanto a la importancia relativa de los diferentes mecanismos de reacción, se encontró que cuando la reacción ocurre en ambientes no-polares el mecanismo principal es FAR, particularmente en el sitio 3. Este sitio se encontró que contribuye alrededor del 85% a la reactividad total de piridil hacia $\cdot\text{OH}$ en solución de benceno. Entonces el aducto correspondiente se espera sea el producto de reacción principal en tales condiciones. Por el contrario, cuando la reacción tiene lugar en solución acuosa se espera una amplia distribución de productos. Sin embargo, el mecanismo FAR sigue siendo el que más contribuye a la reactividad global de piridil hacia $\cdot\text{OH}$. En este caso se espera que se formen por lo menos tres productos mayoritarios. Estos son los aductos formados de las adiciones de $\cdot\text{OH}$ a los sitios 3, 9 y 11. Mientras que TES tiene una contribución insignificante a la constante de velocidad total en solución acuosa, tanto para la forma neutra como aniónica de piridil, en el caso de EDA el comportamiento es el contrario, o sea el mecanismo de reacción con mayor contribución a su reactividad global fue precisamente TES, para su forma aniónica.

De los resultados obtenidos sabemos que el coeficiente de velocidad global de EDA hacia el radical $\cdot\text{OH}$ es $1.35 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y que el de piridil (A2) hacia el mismo radical es de $3.98 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ambos en medio acuoso a *pH* fisiológico. Por tanto, se puede afirmar que en estas condiciones ambos tienen una excelente actividad depuradora del radical $\cdot\text{OH}$, que es únicamente limitada por difusión, es decir, la reacción ocurrirá tan rápido como puedan difundir los reactivos en el seno del líquido.

4.5.3 Actividad antioxidante relativa de Edaravone y sus derivados

Un aspecto muy importante para estudiar la actividad antioxidante de compuestos químicos es identificar aquellos que tengan una mayor actividad depuradora de radicales libres. Para tal propósito es recomendable comparar los diferentes depuradores cuando actúan sobre radicales libres de reactividad ligera. Esto es porque si estudiamos sus reacciones con el radical libre $\cdot\text{OH}$, por ejemplo, podemos llegar a la conclusión que los depuradores analizados tienen todos una actividad similar, ya que las reacciones con este radical frecuentemente están controladas por difusión, debido a su alta reactividad. Por ello para maximizar la diferencia en la actividad relativa depuradora de EDA y sus derivados se

estudiaron sus reacciones hacia un radical libre menos reactivo, este es el radical hidroperóxilo ($\cdot\text{OOH}$). Para ellos se realizó el estudio mediante dos enfoques: termodinámico y cinético, e incluyendo todos los mecanismos y sitios de reacción posibles. Se escogieron para este estudio detallado a EDA y tres de sus derivados (A2 o piridil, C1 y D1). Esta selección se realizó teniendo en cuenta el hecho de que A2 y C1 fueron ya sintetizados y D1 es el más prometedor (mediante TES) de los investigados en este trabajo que no ha sido sintetizado todavía. Del estudio de la reacción entre A2 y el radical $\cdot\text{OH}$, aun se tiene un resultado ambiguo acerca de su actividad depuradora respecto a la de EDA, ya que ambos reaccionan con este radical a velocidades limitadas por difusión. Este es uno de los casos donde se evidencia la necesidad de realizar el estudio comparativo con un radical menos reactivo que el $\cdot\text{OH}$. Por tanto estudiaremos las reacciones entre EDA y sus derivados A2, C1 y D1 hacia el radical $\cdot\text{OOH}$ lo que debe permitir una mejor comparación de su actividad depuradora relativa, considerando todos los mecanismos de reacción posibles y los equilibrios ácido-base en solución polar a pH fisiológico.

Reacciones con el radical $\cdot\text{OOH}$

En la Tabla 22 se reportan las energías libres de Gibbs (ΔG) obtenidas para las reacciones de EDA y sus derivados A2 (piridil), C1 y D1, con el radical $\cdot\text{OOH}$ en medio polar y no polar, para cada uno de los sitios de reacción considerando todos los posibles mecanismos. Para este radical se encontró que el proceso TES es endergónico en todos los casos, incluyendo la transferencia electrónica desde las especies aniónicas; sin embargo, en este último caso los valores de ΔG son relativamente pequeños por lo que este proceso no puede ser descartado. Las reacciones en todos los sitios TH y FAR, involucrando los aniones, también fueron endergónicas. Además algunos valores de ΔG son positivos y mucho más altos que los de TES. Se encontró que las reacciones TH de las especies neutras en el sitio 4 son exergónicas en todos los casos, tanto en medio polar como no polar. Por el contrario, las reacciones TH del sitio 3a de los derivados C1 y D1 en medio polar son exergónicas, mientras que las correspondientes a todos los otros sitios TH de las especies estudiadas se encontraron como no viables desde el punto de vista termodinámico, independientemente de la polaridad del medio circundante.

En cuanto a los procesos FAR, se encontró que únicamente el que involucra al sitio 3 de las especies neutras es exergónico, ó más bien isoergónico, para EDA y piridil solamente en medio polar, para C1 sólo en medio no polar y para D1 en ambos medios. Estos resultados son significativamente diferentes de los encontrados para las reacciones con el radical $\cdot\text{OH}$. Esto está de acuerdo con la baja reactividad de $\cdot\text{OOH}$, comparada con la de $\cdot\text{OH}$.

Para continuar con el estudio cinético los sitios de reacción que resultaron endergónicos (Tabla 22) fueron descartados, porque aunque ocurran a velocidades grandes serían reversibles y entonces los productos de reacción no se observarían. Además aun cuando los procesos endergónicos pueden jugar un papel importante en sistemas biológicos, este comportamiento particular aparece únicamente cuando no existen reacciones paralelas energéticamente más favorecidas. Este podría ser el caso del mecanismo de reacción TES para las formas aniónicas de EDA, A2, C1 y D1 en solución polar, por lo que éstos se incluyeron en el estudio cinético.

Las energías libres de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger) se reportan en Tabla 23. Para los procesos TES el valor de ΔG^\ddagger es más bajo para EDA y D1 (5.6-6.4 kcal/mol) que para piridil y C1 (7.1-7.6 kcal/mol). Por otro lado, para la reacción TH de C1 y D1, en el sitio 3a en solución acuosa, los valores son muy similares, alrededor de 22 y 23 kcal/mol. En el caso del mecanismo de reacción TH en el sitio 4, las barreras energéticas son muy similares para todos los compuestos estudiados y van desde 18 hasta 25 kcal/mol. Sin embargo, para los derivados C1 y D1 los valores de las barreras de activación son menores, entre 18 y 23 kcal/mol. Además, es muy notable que las barreras energéticas para A2 son mayores en solución acuosa que en medio no polar, y para EDA, C1 y D1 el comportamiento es contrario ya que los valores de las energías libres de activación disminuyen en solución acuosa con respecto a medio lipídico.

Tabla 22. Energías libres de Gibbs (ΔG) de las reacciones con $\cdot\text{OOH}$, a 298.15 K, en kcal/mol.

	EDA			A2			C1			D1		
	No polar		Polar	No polar		Polar	No polar		Polar	No polar		Polar
	Neutro	Neutro	Anión	Neutro	Neutro	Anión	Neutro	Neutro	Anión	Neutro	Neutro	Anión
<i>TES</i>	97.69	32.65	2.87	103.71	38.10	7.11	66.34	25.93	3.10	53.70	14.62	1.98
<i>TH</i>												
Sitio 3a	2.93	1.80	39.71	1.76	0.04	2.91	1.85	-0.78	2.12	0.93	-0.81	2.13
Sitio 4	-5.29	-5.50		-5.09	-5.20		-4.61	-5.83		-6.23	-6.50	
Sitio 12							10.49	9.57	9.19	5.03	3.21	0.45
Sitio 13							11.78	9.50	9.53			
Sitio 14							13.29	11.84	11.74			
<i>FAR</i>												
Sitio 3	0.08	-0.43	11.91	0.46	-0.84	10.62	-1.27	4.84	12.62	-0.01	-1.58	11.97
Sitio 4			17.92			18.31						
Sitio 5	3.45	6.31	9.01	5.45	7.87	8.62	7.28	10.20	10.52			9.58
Sitio 6	20.72	19.30	19.42	23.30	17.81	25.59	18.86	17.12	16.10	15.89	13.90	13.02
Sitio 7							16.74	15.58	12.53	16.44	16.85	13.99
Sitio 8	19.25	18.52	18.11	17.57	14.03	13.42	18.94	17.32	16.70	16.10	13.68	13.20
Sitio 9	16.62	15.83	14.45	17.23	16.96	15.16	13.80	13.44	12.04	15.68	15.58	12.94
Sitio 10	19.02	18.40	18.07	22.43	21.64	22.78	16.36	14.60	15.28	15.46	12.88	13.10
Sitio 11	16.00	14.76	15.40	15.34	14.17	14.21	16.55	16.40	12.28	16.44	16.85	11.70

Tabla 23. Energías libres de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger), para las reacciones con $\cdot\text{OOH}$, a 298.15K, en kcal/mol.

	EDA			A2			C1			D1				
	No polar	Polar		No polar	Polar		No polar	Polar		No polar	Polar			
	Neutro	Neutro	Anión	Neutro	Neutro	Anión	Neutro	Neutro	Anión	Neutro	Neutro	Anión		
TES			6.44			7.18			31.32	7.64			15.51	5.65
TH														
Sitio 3a									23.06				22.47	
Sitio 4	24.62	24.32		21.74	24.16		24.14	23.60					23.54	18.33
FAR														
Sitio 3	19.23	18.51		16.32	19.69		16.90						15.82	15.22

En cuanto al mecanismo de reacción FAR el único canal de reacción favorable termodinámicamente, y por tanto estudiado desde el punto de vista cinético, tiene valores ΔG^\ddagger de 19 kcal/mol para EDA y piridil, mientras que para los derivados C1 y D1 los valores de ΔG^\ddagger son menores con valores de ~ 17 kcal/mol para C1 en medio no polar y de $\sim 15-16$ kcal/mol para D1 en ambos medios. Es notable, por tanto, que las barreras más bajas correspondan a la transferencia electrónica del anión de cada compuesto depurador, es decir, a la transferencia secuencial protón-electrón (TSPE). Esto sugiere que TSPE podría ser el mecanismo dominante involucrado en la actividad depuradora de radicales $\cdot\text{OOH}$ de los compuestos estudiados.

En la Figura 25 se muestran las geometrías optimizadas de los estados de transición para la reacción de EDA con el radical $\cdot\text{OOH}$. Se encontraron interacciones tipo puente de H para el camino correspondiente a TH del sitio 4. Estas involucran al H del radical $\cdot\text{OOH}$ y al O de EDA, tanto en medio polar como no polar. En medio polar la interacción ocurre a una distancia de 2.792 Å y en medio no polar con una distancia de 2.081 Å. Por el contrario, para el mecanismo de reacción FAR no se encontró ninguna interacción en los estados de transición correspondientes al sitio 3, en ambos medios polar y no polar. Para la reacción entre EDA y el radical $\cdot\text{OOH}$ los estados de transición más tempranos son aquellos que ocurren en medio polar, tanto para mecanismos TH como FAR.

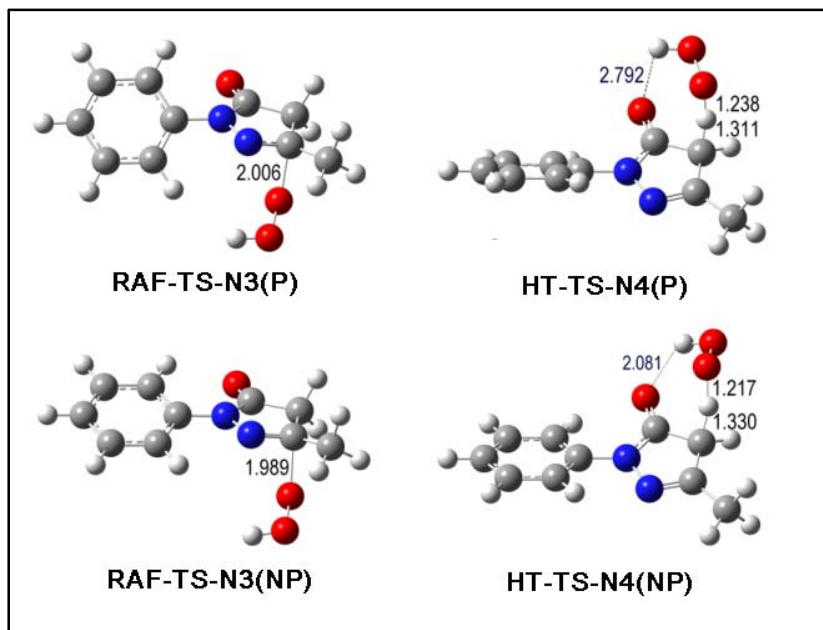


Figura 25. Geometrías optimizadas de estados de transición entre EDA y $\cdot\text{OOH}$.

En cuanto a las geometrías optimizadas de los estados de transición para la reacción entre A2 y el radical $\cdot\text{OOH}$ (Figura 26), también se encontraron interacciones tipo puente de hidrógeno en los caminos correspondientes a los mecanismos TH y FAR en los sitios 4 y 3, respectivamente. Para TH las interacciones ocurren entre el H del radical $\cdot\text{OOH}$ y el O de A2, tanto en medio polar como no polar, con $d(\text{H}\cdots\text{O}) = 2.937 \text{ \AA}$ y $d(\text{H}\text{---}\text{O}) = 2.104 \text{ \AA}$, respectivamente, aunque la primera (medio polar) no representa un puente de hidrógeno,²⁰⁴ se reporta para propósitos comparativos. En cuanto al mecanismo de reacción FAR, las interacciones en los estados de transición correspondientes al sitio 3 ocurren entre el H del radical $\cdot\text{OOH}$ y el N7 de A2 en ambos medios polar y no polar, con $d(\text{H}\cdots\text{N7}) = 1.977 \text{ \AA}$ y $d(\text{H}\text{---}\text{N7}) = 2.048 \text{ \AA}$, respectivamente. Para la reacción entre A2 y el radical $\cdot\text{OOH}$ los estados de transición más tempranos son aquellos que ocurren en medio polar, tanto para TH como para FAR, lo que sugiere un incremento en la reactividad con la polaridad del medio.

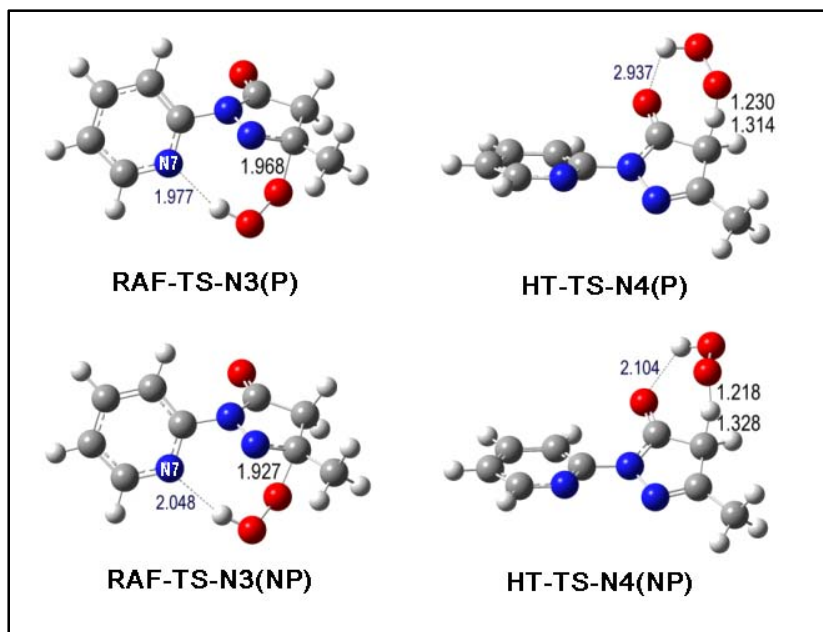


Figura 26. Geometrías optimizadas de estados de transición entre A2 y $\cdot\text{OOH}$.

En las Figuras 27 y 28 se muestran las geometrías optimizadas de los estados de transición correspondientes a las reacciones de los derivados C1 y D1 con el radical $\cdot\text{OOH}$. Se encontraron algunas interacciones por puentes de hidrógeno en sus estados de transición. Para el caso del derivado C1, el ET que corresponde a la TH del sitio 4 en medio no polar es el único que presenta esta clase de interacción. Está última ocurre entre el H del radical $\cdot\text{OOH}$ y el O del grupo pirazol con $d(\text{H}\cdots\text{O}) = 2.070 \text{ \AA}$. Para los estados de transición correspondientes a TH del sitio 3a, en medio polar, y a FAR en el sitio 3, en medio no polar, las distancias entre los N del anillo pirazol y el H del radical son grandes para considerarse puente de H,²⁰⁴ $d(\text{H}\cdots\text{N}2) = 2.931 \text{ \AA}$ y $d(\text{H}\cdots\text{N}1) = 2.907 \text{ \AA}$, respectivamente.

En cuanto al derivado D1 (Figura 28), presenta características similares a las antes mencionadas para los estados de transición de C1. La única interacción por puente de hidrógeno se presenta en el estado de transición del mecanismo TH en el sitio 4 en medio no polar. Esta ocurre entre el H del radical $\cdot\text{OOH}$ y el O del grupo pirazol del derivado D1, con $d(\text{H}\cdots\text{O}) = 2.057 \text{ \AA}$; es decir, a una distancia ligeramente menor a la equivalente del ET correspondiente de C1. En medio polar la distancia entre estos dos átomos se incrementa a $d(\text{H}\cdots\text{O}) = 2.934 \text{ \AA}$, así que no corresponde a una interacción por puente de hidrógeno. Para el caso de los estados de transición correspondientes a TH del sitio 3a, en

medio polar, y a FAR en el sitio 3, en medio polar y no polar, las estructuras presentan distancias relativamente grandes entre los N del grupo pirazol y el H del radical $\cdot\text{OOH}$, con $d(\text{H}---\text{N}2) = 2.980 \text{ \AA}$, $d(\text{H}---\text{N}1) = 2.934 \text{ \AA}$ y $d(\text{H}---\text{N}1) = 2.906 \text{ \AA}$, respectivamente. Estas tampoco corresponden a interacciones por puente de hidrógeno.

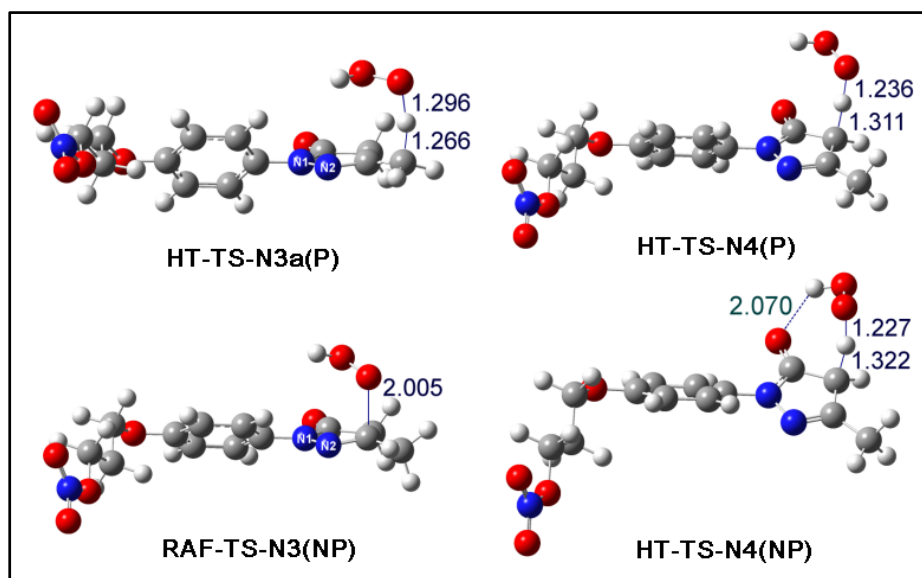


Figura 27. Geometrías optimizadas de estados de transición entre C1 y $\cdot\text{OOH}$.

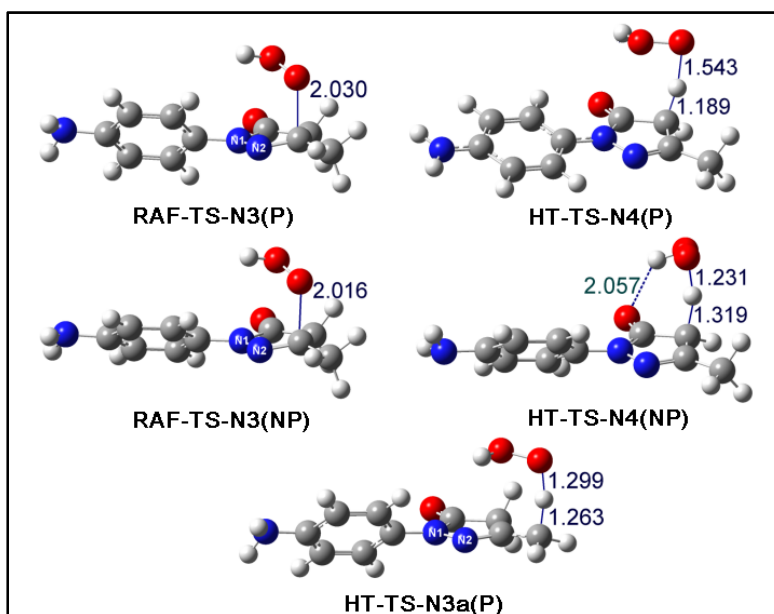


Figura 28. Geometrías optimizadas de estados de transición entre D1 y $\cdot\text{OOH}$.

Las constantes de velocidad para las reacciones de EDA y sus derivados con el radical $\cdot\text{OOH}$ se presentan en Tabla 24. En ambiente no polar A2 reacciona con $\cdot\text{OOH}$ alrededor de 2 y 132 veces más rápido que C1 y EDA, respectivamente, y prácticamente a la misma velocidad que D1. De acuerdo a estos resultados se puede plantear que funcionalizando la estructura de EDA con grupos moderadamente electrodonadores en el sitio R1 (NH_2 , $\sigma_{\text{Hammett}}=-0.66$) se puede incrementar la actividad depuradora de esta familia de compuestos en medio lipídico. Sin embargo, en tal medio todos los procesos de depuramiento de radicales hidropéroxilo son más bien lentos. Estos resultados son dramáticamente diferentes de los previamente descritos para las reacciones de EDA y A2 con $\cdot\text{OH}$. Para este último las reacciones equivalentes fueron limitadas por difusión, de acuerdo con la reactividad de este radical.

En solución acuosa, los procesos de depuramiento de $\cdot\text{OOH}$ son muy rápidos tanto para EDA como para sus derivados, con coeficientes de velocidad globales mayores que $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. En este caso D1 reacciona 3, 8 y 24 veces más rápido que EDA, A2 y C1, respectivamente. Esta inversión en la reactividad demuestra la fuerte influencia del solvente no únicamente sobre la eficiencia absoluta de los compuestos estudiados como depuradores de radicales libres, sino también sobre su reactividad relativa. La presencia de agua en este caso está directamente relacionada a la formación de las especies aniónicas de EDA y sus derivados, las cuales son significativamente más reactivas que las especies neutras debido al mecanismo TES.

De acuerdo a sus pK_a s ($pK_a^{\text{EDA}}=6.9$, $pK_a^{\text{A2}}=6.64$, $pK_a^{\text{C1}}=7.18$, $pK_a^{\text{D1}}=7.32$)^{51,205} la fracción de la forma aniónica, a pH fisiológico, debería ser 0.76, 0.85, 0.62 y 0.55 para EDA, A2, C1 y D1, respectivamente. De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 24, en cuanto a la actividad antioxidante, los aniones son las formas más activas. Sin embargo, se predice que reaccionarán exclusivamente por transferencia electrónica. Entonces, en solución acuosa o polar el mecanismo de reacción responsable de la actividad depuradora de $\cdot\text{OOH}$ para EDA y sus derivados, es la transferencia secuencial protón-electrón (TSPE).

Tabla 24. Constantes de velocidad aparentes (k_{app} , $M^{-1}s^{-1}$), constantes de velocidad totales ($M^{-1}s^{-1}$), y coeficiente de velocidad global ($M^{-1}s^{-1}$), para $\cdot OOH$, a 298.15 K.

	EDA			A2			C1			D1		
	No polar	Polar		No polar	Polar		No polar	Polar		No polar	Polar	
	Neutro	Neutro	Anión	Neutro	Neutro	Anión	Neutro	Neutro	Anión	Neutro	Neutro	Anión
TES		1.16E+08			3.35E+07		6.79E-11 1.56E+07		2.67E+01 4.23E+08			
TH												
Sitio 3a							1.57E-01		3.95E-01			
Sitio 4	2.06E-02	3.42E-02		2.34E+00	3.93E-02		2.02E+00 7.86E+00		8.80E-01 5.39E-01			
FAR												
Sitio 3	9.95E-02	3.34E-01		1.34E+01	4.61E-02		7.30E+00		1.18E+01 1.30E+02			
Total	1.20E-01	3.68E-01	1.16E+08	1.58E+01	8.53E-02	3.35E+07	9.32E+00	8.01E+00	1.56E+07	1.27E+01	1.58E+02	4.23E+08
Global	8.79+07			2.85E+07			9.71E+06			2.31E+08		

Comparados con otros compuestos

Como se mencionó, en ambientes no polares EDA y sus derivados son débiles depuradores de $\cdot OOH$. En tales ambientes, el cual representa la fase lipídica en organismos vivos, la actividad de A2, C1 y D1 se encontró por debajo de la de los carotenos ($\sim 10^5$ - $10^6 M^{-1} s^{-1}$),²⁰¹ canolol ($6.8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$),²⁰⁶ ácido sinapínico ($1.7 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$),⁸⁴ y melatonina ($3.1 \times 10^2 M^{-1} s^{-1}$),¹⁵⁰ similar a la de la cafeína ($3.2 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$),¹⁴⁹ y más alta que la de Edaravone ($1.20 \times 10^{-1} M^{-1} s^{-1}$). Sin embargo, tomando en cuenta que las constantes de velocidad correspondientes al daño causado por $\cdot OOH$ a los ácidos grasos insaturados está en el rango de $1.18 - 3.05 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$, EDA, A2, C1 y D1, todos, se proponen como ineficientes en la protección contra la peroxidación de lípidos, lo que debería también ser el caso de la melatonina y cafeína, por ejemplo. Sin embargo, es interesante que la actividad depuradora en tal medio aumente al realizar modificaciones en la estructura de EDA, por lo que está parece ser una estrategia posible para incrementar la actividad depuradora de radicales libres de este tipo de compuestos en medio no polar.

Por el contrario, en solución acuosa las actividades depuradoras del radical hidroperóxido de EDA y sus derivados se proponen como excelentes. Esto porque se

encontró que las constantes de velocidad en este medio para EDA, A2 y C1 son más altas que la de los carotenos ($\sim 10^4$ - 10^6 $M^{-1} s^{-1}$),²⁰¹ ácido sinapínico (5.4×10^5 $M^{-1} s^{-1}$),⁸⁴ alicina (7.4×10^3 $M^{-1} s^{-1}$),²⁰² y tioacroleína (2.9×10^4 $M^{-1} s^{-1}$);²⁰² mucho más altas que las de la melatonina (2.0×10^1 $M^{-1} s^{-1}$),¹⁵⁰ y cafeína (3.3×10^{-1} $M^{-1} s^{-1}$);¹⁴⁹ y similar a las de ácido 2-propenosulfénico (2.6×10^7 $M^{-1} s^{-1}$)¹⁴⁸ y glutatión (2.7×10^7 $M^{-1} s^{-1}$),¹⁴⁷ los cuales son excepcionalmente buenos atrapadores de $\cdot OOH$. Además el derivado D1 se propone como mucho mejor depurador en solución acuosa a *pH* fisiológico, que EDA y que los derivados A2 y C1.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Se evaluaron las capacidades electrodonadoras y facilidades de desprotonación, propuestas como clave para la actividad depuradora de radicales libres de EDA y sus derivados. Para tal propósito se calcularon las energías de ionización (PI), afinidades protónicas (AP) y pK as, todos estos datos se proponen por primera vez.

Para los cálculos de potenciales de ionización (PI) primeramente se analizó la eficiencia de diferentes metodologías. Para ello se usó un conjunto de moléculas de referencia estructuralmente similares a EDA. Como se esperó las aproximaciones basadas en TPE fueron identificadas como las mejores. En particular la aproximación P3 produjo el error promedio absoluto más bajo. Por tanto ésta fue utilizada para estimar los PI de los compuestos estudiados.

Tener potenciales de ionización bajos y fracciones molares de la forma aniónica altas (más activa que la neutra), son factores clave para la eficiencia de EDA y sus derivados como depuradores de radicales libres. Según estas propiedades, algunos derivados se recomiendan como depuradores de radicales libres tan eficientes como, o incluso mejores que EDA, al menos cuando el mecanismo TES juega un papel importante en tal actividad.

Se estudiaron las reacciones TES de las formas neutras y aniónicas de EDA y sus 26 derivados hacia 11 radicales libres, en solución acuosa. Se propone, por primera vez, sus órdenes relativos de reactividad y sus constantes de velocidad. Se demostró que la forma más activa no siempre es la forma aniónica, sino que depende del derivado de EDA particular que está reaccionando y, en general, de la naturaleza del radical libre involucrado. Más de la mitad de los compuestos estudiados se proponen como excelentes depuradores de radicales libres, vía TES, en solución acuosa a pH fisiológico. No se recomienda funcionalizar los sitios R1 y R3 en la estructura de EDA (Esquema II) con el grupo NO, o similares, para diseñar derivados de EDA con el propósito de actuar como depuradores de radicales libres a través del mecanismo TES.

Las constantes de velocidad de las reacciones TES, para EDA y sus derivados hacia las diferentes especies radicálicas, están en el rango de $10^6 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por lo tanto, se proponen como depuradores versátiles, capaces de desactivar rápidamente radicales libres de diferente naturaleza en solución acuosa.

De acuerdo a sus valores de pK_a , ambas formas (aniónica o neutra) estarán presentes en cantidades significativas bajo condiciones fisiológicas ($pH = 7.4$). Así, esta distribución garantiza la presencia de por lo menos una especie activa bajo tales condiciones, por tanto, el equilibrio ácido-base juega un papel muy importante.

Se comparó la actividad depuradora de radicales $\cdot\text{OH}$ entre EDA y su derivado piridil (A2), en medio polar y no polar considerando todos los mecanismos de reacción posibles. Se encontró que sus constantes de velocidad están controladas por difusión y sus valores están en buen acuerdo con los datos experimentales disponibles.

Debido a la alta reactividad del radical $\cdot\text{OH}$, se escogió el radical $\cdot\text{OOH}$ para estimar la eficiencia relativa de EDA y sus derivados A2, C1 y D1 como depuradores de radicales libres. EDA, A2, C1 y D1 se predicen como excelente depuradores de radicales $\cdot\text{OOH}$ en solución acuosa a pH fisiológico. En este caso D1 resultó ser el mejor depurador, aproximadamente 3, 8, y 24 veces mejor que EDA, A2 y C1, respectivamente, aunque todos ellos se encuentran entre los mejores depuradores de $\cdot\text{OOH}$ en tal medio.

En medio no polar EDA, A2, C1 y D1 son débiles depuradores de radicales hidroperóxilo. Aunque la actividad depuradora de A2, C1 y D1 hacia $\cdot\text{OOH}$, es mayor que la de EDA, 132, 106 y 78 veces, respectivamente. Por lo cual consideramos que funcionalizando la estructura de EDA, la actividad de estos compuestos puede incrementarse en medio lipídico.

La sobresaliente actividad depuradora de radicales $\cdot\text{OOH}$ de estos compuestos se atribuye a la presencia de sus formas iónicas, las cuales son mucho más reactivas que las especies neutras. Además estas reacciones tienen lugar casi exclusivamente por el mecanismo de transferencia secuencial protón-electrón (TSPE).

La metodología usada en el presente trabajo demostró ser confiable y adecuada para estudiar la actividad depuradora de radicales libres, ya que las comparaciones con datos experimentales soportan su validez.

CAPITULO 6

PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos del estudio realizado sobre la actividad depuradora de radicales libres de EDA y sus derivados, es interesante considerar un estudio futuro sobre derivados de EDA, con nuevos sustituyentes en el anillo pirazol-5-ona, buscando potenciar la actividad depuradora de radicales peroxilo ($\cdot\text{OOR}$) en medio lipídico.

Así mismo, analizar la actividad depuradora de radicales libres de compuestos con estructuras similares a la de EDA, en particular con el grupo pirazol, puesto que para este se han reportado diversas actividades farmacológicas, como por ejemplo antiinflamatorias, antivirales, anti cancerígenas, antimicrobianas, analgésicas y antipiréticas.^{207,208,209}

También consideramos importante evaluar la capacidad de acomplejamiento de la familia de los compuestos de EDA con cationes metálicos y ver la posibilidad de inhibir la reacción de Fenton, que se produce al reaccionar el H_2O_2 con metales de transición, dando como resultado la generación de radicales altamente reactivos tales como el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).

También es importante considerar el estudio de la actividad reparadora de esta familia de compuestos hacia moléculas biológicas tales como el ADN, por reacciones de TES y TH, mecanismos relevantes en la actividad de EDA y sus derivados y por medio de los cuales es posible la reparación del ADN.^{154,210}

REFERENCIAS

- ¹ Veiga, E.; Aguilar, J. A.; Clavo, B.; Llanes, L. "Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres" *Análisis Clínicos*. **1997**, 22, 201.
- ² Ballester, M. "Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico" *Med Clin*. **1996**, 107, 509.
- ³ Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. "*Free radicals in biology and medicine*" (2ª ed). Oxford Clarendon Press, **1989**.
- ⁴ Slater, T. F. "Free radical mediated tissue damage" *Nutrition* **1987**, 87, 46.
- ⁵ Pryor, W. A. "Free radical and lipid peroxidation. Natural antioxidant in human health and disease" *Nueva York: Academic Press*, **1994**; 1.
- ⁶ Marcus, S. C.; Mark, D.E.; Miral, D.; Joseph, L. "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease" *FASEB J.*, **2003**, 17, 1195.
- ⁷ Mukul, D.; Kishore, B.; Naveen, P. R.; Lalit, M. S. "Oxidative damage of plasma proteins and lipids in epidemic dropsy patients: alterations in antioxidant status" *Biochim Biophys Acta*, **2005**, 1722, 209.
- ⁸ Boyd, N. F.; McGuire, V. "The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk" *Free Rad. Biol. Med.*, **1991**, 10, 185.
- ⁹ Nelson, R. L. "Dietary iron and colorectal cancer risk" *Free Rad. Biol. Med.*, **1992**, 12, 161.
- ¹⁰ Knekt, P.; Reunanen, A.; Takkunen, H.; Aromaa, A.; Heliövaara, M.; Hakuinen, T. "Body iron stores and risk of cancer" *Int. J. Cancer*, **1994**, 56, 379.
- ¹¹ Omenn, G. S.; Goodman, G. E.; Thornquist, M. D. "Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease" *N. Engl. J. Med.*, **1996**, 334, 1150.
- ¹² Riemmersma, R. A.; Wood, D. A.; Macityre, C. C. A.; Elton, R. A.; Gey, K. F.; Oliver, M. F. "Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene" *Lancet*, **1991**, 337, 1.
- ¹³ Salonen, J. T.; Nyyssonen, K.; Korpela, H.; Tuomilehto, J.; Seppanen, R.; Salonen, R. "High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men" *Circulation*, **1992**, 86, 803.
- ¹⁴ Street, D. A.; Comstock, G.; Salkeldy, R.; Klag, M. "Serum antioxidants and myocardial infarction" *Circulation*, **1994**, 90, 1154.
- ¹⁵ Kushi, L. H.; Folsom, A. R.; Prineas, R. J.; Mink, P. J.; Wu, Y.; Bostick, R. "Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women" *N. Engl. J. Med.*, **1996**, 334, 1156.
- ¹⁶ Stephens, N. G.; Parsons, A.; Schofield, P. M.; Kelly, F.; Cheesman, K.; Mitchinson, M. J.; Brown, M. J. "Randomized controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)" *Lancet*, **1996**, 347, 781.
- ¹⁷ Panasencko, O. M.; Vol'nova, T. V.; Azizova, O. A.; Vladimirov, Y. A.; "Free radical modification of lipoproteins and cholesterol accumulation in cells upon atherosclerosis" *Free Rad. Biol. Med.*, **1991**, 10, 137.
- ¹⁸ Steinberg, D. "Antioxidants and atherosclerosis. A current assessment." *Circulation*, **1991**, 84, 1421.

-
- ¹⁹ Janero, D. R. "Therapeutic potential of vitamin E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis" *Free Rad. Biol. Med.*, **1991**, *11*, 129.
- ²⁰ Hodis, H. N.; Mack, W. J.; LaBree, L.; Cashin-Hemphill, L.; Sevanian, A.; Johnson, R.; Azen, S. "Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis" *J. Am. Med. Assoc.*, **1995**, *273*, 1849.
- ²¹ Butterfield, D. A.; Hensley, K.; Harris, M.; Mattson, M.; Carney, "beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease" *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *200*, 710.
- ²² Hensley, K.; Carney, J. M.; Mattson, M. P.; Aksenova, M.; Harris, M.; Wu, J. F.; Floyd, R. A.; Butterfield, D. A. "A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 3270.
- ²³ Butterfield, D. A.; Martin, L.; Carney, J. M.; Hensley, K. "A beta (25-35) peptide displays H₂O₂-like reactivity towards aqueous Fe²⁺, nitroxide spin probes, and synaptosomal membrane proteins" *Life Sci.*, **1996**, *58*, 217.
- ²⁴ Butterfield, D. A. "β-Amyloid-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity: Implications for Alzheimer's Disease" *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**, *10*, 495.
- ²⁵ Fay, D. S.; Fluet, A.; Johnson, C. J.; Link, C. D. "In vivo aggregation of beta-amyloid peptide variants" *J. Neurochem.*, **1998**, *71*, 1616.
- ²⁶ Watanabe, T.; Tahara, M.; Todo, S. "The novel antioxidant edaravone: from bench to bedside." *Cardiovasc. Ther.*, **2008**, *26*, 101.
- ²⁷ Yamamoto, Y.; Yanagisawa, M.; Tak, N. W.; Watanabe, K.; Takahashi, C.; Fujisawa, A.; Kashiba, M.; Tanaka, M. "Repeated edaravone treatment reduces oxidative cell damage in rat brain induced by middle cerebral artery occlusion" *Redox Rep.*, **2009**, *14*, 251.
- ²⁸ Higashi, Y.; Jitsuikia, D.; Chayamab, K.; Yoshizumia, M. "Edaravone (3-Methyl-1-Phenyl-2-Pyrazolin-5-one), A Novel Free Radical Scavenger, for Treatment of Cardiovascular Disease" *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, **2006**, *1*, 85.
- ²⁹ Inokuchi, Y.; Imai, S.; Nakajima, Y.; Shimazawa, M.; Aihara, M.; Araie, M.; Hara, H. "Edaravone, a free radical scavenger, protects against retinal damage in vitro and in vivo" *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2009**, *329*, 687.
- ³⁰ Saini, A. K.; Patel, R. J.; Sharma, S. S.; Kumar, A. "Edaravone attenuates hydroxyl radical stress and augmented angiotensin II response in diabetic rats" *Pharmacol. Res.*, **2006**, *54*, 6.
- ³¹ Saini, A. K.; Kumar, A.; Sharma, S. S. "Preventive and curative effect of edaravone on nerve functions and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy" *Eur. J. Pharmacol.*, **2007**, *568*, 164.
- ³² Zhang, N.; Komine-Kobayashi, M.; Tanaka, R.; Liu, M.; Mizuno, Y.; Urabe, T. "Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain" *Stroke*, **2005**, *36*, 2220.
- ³³ Noor, J. I.; Uedab, Y.; Ikeda, T.; Ikenoue, T. "Edaravone inhibits lipid peroxidation in neonatal hypoxic-ischemic rats: an in vivo microdialysis study" *Neurosci. Lett.*, **2007**, *414*, 5.
- ³⁴ Kono, H.; Woods, C. G.; Maki, A.; Connor, H. D.; Mason, R. P.; Rusyn, I.; Fujii, H. "Electron spin resonance and spin trapping technique provide direct evidence that edaravone prevents acute

ischemia-reperfusion injury of the liver by limiting free radical-mediated tissue damage” *Free Radical Res.*, **2006**, *40*, 579.

³⁵ Yamamoto, Y., Kuwahara, T., Watanabe, K., Watanabe, K. “Antioxidant activity of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one” *Redox Rep.*, **1996**, *2*, 333.

³⁶ Ohara, K.; Fujii, A.; Ichimura, Y.; Sato, K.; Mukai, K. “Kinetic Study of Radical-Scavenging and Vitamin E-Regenerating Actions of Edaravone (3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)” *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2006**, *79*, 421.

³⁷ Ono S.; Okazaki K.; Sakurai M.; Inoue Y. “Density Functional Study of the Radical Reactions of 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186): Implication for the Biological Function of MCI-186 as a Highly Potent Antioxidative Radical Scavenger” *J. Phys. Chem. A*, **1997**, *101*, 3769.

³⁸ Lin, M.; Katsumura, Y.; Hata, K.; Muroya, Y.; Nakagawa, K. “Pulse radiolysis study on free radical scavenger edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)” *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **2007**, *89*, 36.

³⁹ Abe, S.; Kirima, K.; Tsuchiya, K.; Okamoto, M.; Hasegawa, T. Houchi, H.; Yoshizumi, M.; Tamaki, T. “The reaction rate of edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186)) with hydroxyl radical” *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, *52*, 186.

⁴⁰ Wang, L. F.; Zhang, H. Y. *Bioorg.* “A theoretical investigation on DPPH radical-scavenging mechanism of edaravone” *Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 3789.

⁴¹ Sujatha, K.; Shanthi, G.; Selvam, N. P.; Manoharan, S.; Perumal, P.T.; Rajendran, M. “Synthesis and antiviral activity of 4,4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ols) against peste des petits ruminant virus (PPRV)” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 4501.

⁴² Fan, X.; Zhang, X.; Zhou, L.; Keith, K. A.; Kern, E. R.; Torrence, P. F. “A pyrimidine-pyrazolone nucleoside chimera with potent in vitro anti-orthopoxvirus activity” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 3224.

⁴³ Castagnolo, D.; Manetti, F.; Radi, M.; Bechi, B.; Pagano, M.; De Logu, A.; Meleddu, R.; Saggi, M.; Botta, M. “Synthesis, biological evaluation, and SAR study of novel pyrazole analogues as inhibitors of Mycobacterium tuberculosis: part 2. Synthesis of rigid pyrazolones” *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 5716.

⁴⁴ Tripathy, R.; Ghose, A.; Singh, J.; Bacon, E. R.; Angeles, T. S.; Yang, S. X.; Albom, M. S.; Aimone, L. D.; Herman, J. L.; Mallamo, J. P. “1,2,3-Thiadiazole substituted pyrazolones as potent KDR/VEGFR-2 kinase inhibitors” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 1793.

⁴⁵ Markovic, V.; Eric, S.; Juranic, Z. D.; Stanojkovic, T.; Joksovic, L.; Rankovic, B.; Kosanic, M.; Joksovic, M. D. “Synthesis, antitumor activity and QSAR studies of some 4-aminomethylidene derivatives of edaravone” *Bioorg. Chem.*, **2011**, *39*, 18.

⁴⁶ Kakiuchi, Y.; Sasaki, N.; Satoh-Masuoka, M.; Murofushi, H.; Murakami-Murofushi, K. “A novel pyrazolone, 4,4-dichloro-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-methyl-5-pyrazolone, as a potent catalytic inhibitor of human telomerase” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, *320*, 1351.

⁴⁷ Nakagawa, H.; Ohyama, R.; Kimata, A.; Suzuki, T.; Miyata, N. “Hydroxyl radical scavenging by edaravone derivatives: Efficient scavenging by 3-methyl-1-(pyridin-2-yl)-5-pyrazolone with an intramolecular base” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 5939.

⁴⁸ Hata, K.; Lin, M.; Katsumura, Y.; Muroya, Y.; Fu, H.; Yamashita, S.; Nakagawa, H. “Pulse radiolysis study on free radical scavenger edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one). 2: A comparative study on edaravone derivatives” *J. Radiat. Res.*, **2011**, *52*, 15.

-
- ⁴⁹ Rose, R. C.; Bode, A. M. "Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate" *The FASEB J.*, **1993**, *7*, 1135.
- ⁵⁰ Galano, A.; Tan, D. X.; Reiter, R. J. "Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination" *J. Pineal Res.*, **2011**, *51*, 1.
- ⁵¹ Chegaev, K.; Cena, C.; Giorgis, M.; Rolando, B.; Tosco, P.; Bertinaria, M.; Fruttero, R.; Carrupt, P.-A.; Gasco, A. "Edaravone derivatives containing NO-donor functions" *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 574.
- ⁵² Hohenberg, P.; Kohn, W. "Inhomogeneous Electron Gas" *Phys. Rev.*, **1964**, *136*, B864.
- ⁵³ Handy, N. C. "The importance of Colle-Salvetti for computational density functional theory" *Theor. Chem. Acc.*, **2009**, *123*, 165.
- ⁵⁴ Kohn, W.; Sham, L. "Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects" *J. Phys. Rev.*, **1965**, *140*, A1133.
- ⁵⁵ Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. "Generalized Gradient Approximation Made Simple" *Phys. Rev. Lett.*, **1996**, *77*, 3865.
- ⁵⁶ Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. "Generalized Gradient Approximation Made Simple, Errata" *Phys. Rev. Lett.*, **1997**, *78*, 1396.
- ⁵⁷ Tao, J.; Perdew, J. P.; Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E. "Climbing the density functional ladder: nonempirical meta-generalized gradient approximation designed for molecules and solids" *Phys. Rev. Lett.*, **2003**, *91*, 146401.
- ⁵⁸ Kurth, S.; Perdew, J. P.; Blaha, P. "Molecular and solid-state tests of density functional approximations: LSD, GGAs, and meta-GGAs" *Int. J. Quant. Chem.*, **1999**, *75*, 889.
- ⁵⁹ Perdew, J. P.; Ruzsinszky, A.; Tao, J.; Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E.; Csonka, G. I. "Prescription for the design and selection of density functional approximations: More constraint satisfaction with fewer fits" *J. Chem. Phys.*, **2005**, *123*, 062201.
- ⁶⁰ Frank Jensen, "Introduction to Computational chemistry", Second Edition, p-254.
- ⁶¹ "The Nobel Prize in Chemistry **1998**". Nobelprize.org.
- ⁶² Editores: Juan Andrés, Juan Bertrán, "Química teórica y computacional", Primera Edición, **2001** p-140.
- ⁶³ Gázquez, J. L.; Cedillo, A.; Vela, A. "Electrodonating and Electroaccepting Powers" *J. Phys. Chem. A*, **2007**, *111*, 1966.
- ⁶⁴ Gázquez, J. L.; "Perspectives on the Density Functional Theory of Chemical Reactivity" *J. Mex. Chem. Soc.* **2008**, *52(1)*, 3.
- ⁶⁵ Burke, K.; Werschnik, J.; Gross, E. K. U. "Time-dependent density functional theory: past, present and future" *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 062206.
- ⁶⁶ Casida, M. E. "Time-dependent density-functional theory for molecules and molecular solids" *J. Molecular Structure: THEOCHEM*, **2009**, *914*, 3.
- ⁶⁷ Marques, M. A. L.; Rubio, A. "Time-Dependent Density-Functional Theory", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (22), 4421.
- ⁶⁸ Meijer, E. J.; Sprik, M. "A density-functional study of the intermolecular interactions of benzene" *J. Chem. Phys.*, **1996**, *105*, 8684.

-
- ⁶⁹ Cybulski, S. M.; Seversen, C. E. "Critical examination of the supermolecule density functional theory calculations of intermolecular interactions" *J. Chem. Phys.*, **2005**, *122*, 014117.
- ⁷⁰ Tao, J.; Perdew, J. P. "Test of a nonempirical density functional: Short-range part of the van der Waals interaction in rare-gas dimmers" *J. Chem. Phys.*, **2005**, *122*, 114102.
- ⁷¹ Johnson, E. R.; Becke, A. D. "A post-Hartree-Fock model of intermolecular interactions" *J. Chem. Phys.*, **2005**, *123*, 024101.
- ⁷² Wu, Q.; Yang, W. "Empirical correction to density functional theory for van der Waals interactions" *J. Chem. Phys.*, **2002**, *116*, 515.
- ⁷³ Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. "Design of Density Functionals by Combining the Method of Constraint Satisfaction with Parametrization for Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions" *J. Chem. Theory Comput.*, **2006**, *2*, 364.
- ⁷⁴ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. "Exploring the Limit of Accuracy of the Global Hybrid Meta Density Functional for Main-Group Thermochemistry, Kinetics, and Noncovalent Interactions" *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 1849.
- ⁷⁵ Peverati, R.; Truhlar, D. G. "Improving the Accuracy of Hybrid Meta-GGA Density Functionals by Range Separation" *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 2810.
- ⁷⁶ Zavala-Oseguera, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Merino, G.; Galano, A. "OH radical gas phase reactions with aliphatic ethers: a variational transition state theory study" *J. Phys. Chem. A*, **2009**, *113*, 13913.
- ⁷⁷ Velez, E.; Quijano, J.; Notario, R.; Pabón, E.; Murillo, J.; Leal, J.; Zapata, E.; Alarcón, G. "A computational study of stereospecificity in the thermal elimination reaction of menthyl benzoate in the gas phase" *J. Phys. Org. Chem.*, **2009**, *22*, 971.
- ⁷⁸ Vega-Rodriguez, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. "Quantum chemistry and TST study of the mechanisms and branching ratios for the reactions of OH with unsaturated aldehydes" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, *11*, 7649.
- ⁷⁹ Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. "Guanosine + OH radical reaction in aqueous solution: a reinterpretation of the UV-vis data based on thermodynamic and kinetic calculations." *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5114.
- ⁸⁰ Black, G.; Simmie, J. M. "Barrier heights for H-atom abstraction by HO₂ from n-butanol--a simple yet exacting test for model chemistries?" *J. Comput. Chem.*, **2010**, *31*, 1236.
- ⁸¹ Furuncuoglu, T.; Ugur, I.; Degirmenci, I.; Aviyente, V. "Role of Chain Transfer Agents in Free Radical Polymerization Kinetics" *Macromolecules*, **2010**, *43*, 1823.
- ⁸² Galano, A.; Macías-Ruvalcaba, N. A.; Campos, O. N. M.; Pedraza-Chaverri, J. "Mechanism of the OH Radical Scavenging Activity of Nordihydroguaiaretic Acid: A Combined Theoretical and Experimental Study" *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 6625.
- ⁸³ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. "How Well Can New-Generation Density Functionals Describe the Energetics of Bond Dissociation Reactions Producing Radicals?" *J. Phys. Chem. A*, **2008**, *112*, 1095.
- ⁸⁴ Galano, A.; Francisco-Marquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. "Mechanism and kinetics studies on the antioxidant activity of sinapinic acid" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 11199.

-
- ⁸⁵ Leopoldini, M.; Chiodo, S. G.; Russo, N.; Toscano, M. "Detailed Investigation of the OH Radical Quenching by Natural Antioxidant Caffeic Acid Studied by Quantum Mechanical Models" *J. Chem. Theory Comput.*, **2011**, *7*, 4218.
- ⁸⁶ Ohrn Y.; Born, G. "Molecular Electron Propagator Theory and Calculations" *Adv. Quantum Chem.*, **1981**, *13*, 1.
- ⁸⁷ Mishra, M. K.; Medikeri, M. N. "Characterization of Shape and Auger Resonances Using the Dilated One Electron Propagator Method" *Adv. Quantum Chem.*, **1996**, *27*, 223.
- ⁸⁸ Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V.; Ratovski, G. V. "Electron Propagator Theory of Conformational Effects on Anisole and Thioanisole Photoelectron Spectra" *Int. J. Quantum Chem.*, **1998**, *70*, 1037.
- ⁸⁹ Ortiz, J. V. "Quasiparticle Approximations and Electron Propagator Theory" *Int. J. Quantum Chem.*, **2003**, *95*, 593.
- ⁹⁰ Singh, R. K.; Ortiz, J. V.; Mishra, M. K. "Tautomeric Forms of Adenine: Vertical Ionization Energies and Dyson Orbitals" *Int. J. Quantum Chem.*, **2010**, *110*, 1901.
- ⁹¹ Flores-Moreno, R.; Ortiz, J. V. "Integral Approximations in Ab Initio, Electron Propagator Calculations" *J. Chem. Phys.*, **2009**, *131*, 124110.
- ⁹² Ortiz, J. V. "The Electron Propagator Picture of Molecular Electronic Structure, in Computational Chemistry: Reviews of Current Trends" *J. Leszczynski, ed., World Scientific, Singapore*, **1997**, *2*, 1.
- ⁹³ Ortiz, J. V.; Zakrzewski, V. G.; Dolgounitcheva, O. "One-Electron Pictures of Electronic Structure: Propagator Calculations on Photoelectron Spectra of Aromatic Molecules, in Conceptual Perspectives in Quantum Chemistry" *J.-L. Calais, E. S. Kryachko, eds., Kluwer, Dordrecht*, **1997**, *3*, 465.
- ⁹⁴ Ferreira, A. M.; Seabra, G.; Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. "Application and Testing of diagonal, Partial Third-Order Electron Propagator Approximations, in Quantum-Mechanical Prediction of Thermochemical Data" *J. Cioslowski, ed., Kluwer, Dordrecht*, **2001**, 131.
- ⁹⁵ Flores-Moreno, R.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. "Assessment of Transition Operator Reference States in Electron Propagator Calculations" *J. Chem. Phys.*, **2007**, *127*, 134106.
- ⁹⁶ Galano, A. "Mechanism and kinetics of the hydroxyl and hydroperoxyl radical scavenging activity of N-acetylcysteine amide" *Theor. Chem. Acc.*, **2011**, *130*, 51.
- ⁹⁷ Zakjevskii, V. V.; King, S. J.; Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. "Base and Phosphate Electron Detachment Energies of Deoxyribonucleotide Anions" *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13350.
- ⁹⁸ Zakjevskii, V. V.; Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. "Electron Propagator Studies of Vertical Electron Detachment Energies and Isomerism in Purinic Deoxyribonucleotides" *Int. J. Quantum Chem.*, **2007**, *107*, 2266.
- ⁹⁹ Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. "Electron Propagator Calculations Show that Alkyl Substituents Alter Porphyrin Ionization Energies" *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8240.
- ¹⁰⁰ Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. "Ab Initio Electron Propagator Calculations on the Ionization Energies of Free Base Porphine, Magnesium Porphyrin and Zinc Porphyrin" *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 11596.
- ¹⁰¹ Flores-Moreno, R.; Ortiz, J. V. "Quasi-particle Virtual Orbitals in Electron Propagator Calculations" *J. Chem. Phys.*, **2008**, *128*, 164105.

- ¹⁰² Flores-Moreno, R.; Melin, J.; Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. "Three Approximations to the Nonlocal and Energy-Dependent Correlation Potential in Electron Propagator Theory" *Int. J. Quantum Chem.*, **2010**, *110*, 706.
- ¹⁰³ Levine, I. N. "Química cuántica", 5ª Edición, p-512-530.
- ¹⁰⁴ Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. "Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions" *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 6378.
- ¹⁰⁵ Huron, M. J.; Claverie, P. "Calculation of the interaction energy of one molecule with its whole surrounding. I. Method and application to pure nonpolar compounds" *J. Phys. Chem.*, **1972**, *76*, 2123.
- ¹⁰⁶ Huron, M. J.; Claverie, P. "Calculation of the interaction energy of one molecule with its whole surrounding. II. Method of calculating electrostatic energy" *J. Phys. Chem.*, **1974**, *78*, 1853.
- ¹⁰⁷ Huron, M. J.; Claverie, P. "Calculation of the interaction energy of one molecule with its whole surrounding. III. Application to pure polar compounds" *J. Phys. Chem.*, **1974**, *78*, 1862.
- ¹⁰⁸ Orozco, M.; Luque, F. J. "Theoretical methods for the description of the solvent effect in biomolecular systems" *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 4187.
- ¹⁰⁹ Benson, S.W. "The foundations of chemical kinetics" Malabar, Florida: Krieger; **1982**.
- ¹¹⁰ *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.; Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
- ¹¹¹ *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., Fox, D. J., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- ¹¹² Okuno, Y. "Theoretical Investigation of the Mechanism of the Baeyer-Villiger Reaction in Nonpolar Solvents" *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 210.

-
- ¹¹³ Ardura, D.; Lopez, R.; Sordo, T. L. "Relative Gibbs Energies in Solution through Continuum Models: Effect of the Loss of Translational Degrees of Freedom in Bimolecular Reactions on Gibbs Energy Barriers" *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 23618.
- ¹¹⁴ Alvarez-Idaboy, J. R.; Reyes, L.; Cruz, J. "A new specific mechanism for the acid catalysis of the addition step in the Baeyer-Villiger rearrangement" *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 1763.
- ¹¹⁵ Alvarez-Idaboy, J. R.; Reyes, L.; Mora-Diez, N. "The mechanism of the Baeyer-Villiger rearrangement: quantum chemistry and TST study supported by experimental kinetic data" *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 3682.
- ¹¹⁶ Galano, A. "Influence of Silicon defects on the adsorption of thiophene on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A theoretical study using Coronene as the simplest model" *J. Phys. Chem. A*, **2007**, *111*, 1677.
- ¹¹⁷ Galano, A. "Carbon Nanotubes as Free Radical Scavengers" *J. Phys. Chem. C*, **2008**, *112*, 8922.
- ¹¹⁸ Galano, A.; Cruz-Torres, A. "OH Radical Reactions with Phenylalanine in Free and Peptide Forms" *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 732.
- ¹¹⁹ Galano, A.; Francisco-Márquez, M. "Reactivity of Silicon and Germanium doped CNTs toward aromatic sulfur compounds: A theoretical approach" *Chem. Phys.*, **2008**, *345*, 87.
- ¹²⁰ Mora-Diez, N.; Keller, S.; Alvarez-Idaboy, J. R. "The Baeyer-Villiger reaction: solvent effects on reaction mechanisms" *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3682.
- ¹²¹ Eyring, H. "The Activated Complex in Chemical Reactions" *J. Chem. Phys.*, **1935**, *3*, 107.
- ¹²² Evans, M. G.; Polanyi, M. "Some applications of the transition state method to the calculation of reaction velocities, especially in solution" *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 875.
- ¹²³ Truhlar, D. G.; Hase, W. L.; Hynes, J. T. "Current status of transition-state theory" *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664.
- ¹²⁴ Marcus, R. A. "Chemical and Electrochemical Electron-Transfer Theory" *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **1964**, *15*, 155.
- ¹²⁵ Marcus, R. A. "Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture)" *Rev. Mod. Phys.*, **1993**, *65*, 599.
- ¹²⁶ Marcus, R. A. "Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture)" *Pure & Appl. Chem.*, **1997**, *69*, 13.
- ¹²⁷ Truhlar, D. G.; Kuppermann, A. "Exact tunneling calculations" *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 1840.
- ¹²⁸ Collins, F. C.; Kimball, G. E. "Diffusion-controlled reaction rates" *J. Colloid Sci.*, **1949**, *4*, 425.
- ¹²⁹ Smoluchowski, M. "Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen" *Z. Phys. Chem.*, **1917**, *92*, 129.
- ¹³⁰ Truhlar, D. G. "Nearly Encounter-Controlled Reactions: The Equivalence of the Steady-State and Diffusional Viewpoints" *J. Chem. Educ.*, **1985**, *62*, 104.
- ¹³¹ Einstein, A. "On the movement of small particles suspended in stationary liquids required by the molecular-kinetic theory of heat" *Annalen der Physik. (Leipzig)*, **1905**, *17*, 549.
- ¹³² Stokes, G. G. "On the Effect of the Internal Friction of Fluids on the Motion of Pendulums: PART I - Analytical Investigation" *Mathematical and Physical Papers*, **1903**, *3*, 55.

-
- ¹³³ Koopmans, T. "Ordering of Wave Functions and Eigenvalues to the Individual Electrons of an Atom" *Physica*, **1933**, *1*, 104.
- ¹³⁴ Levy, M.; Perdew, J. P.; Sahni, V. "Exact differential equation for the density and ionization energy of a many-particle system" *Phys. Rev. A*, **1984**, *30*, 2745.
- ¹³⁵ Perdew, J. P.; Parr, R. G.; Levy, M.; Balduz Jr., J. L. "Density-Functional Theory for Fractional Particle Number: Derivative Discontinuities of the Energy" *Phys. Rev. Lett.*, **1982**, *49*, 1691.
- ¹³⁶ Perdew, J. P.; Levy, M. "Comment on Significance of the highest occupied Kohn-Sham eigenvalue" *Phys. Rev. B*, **1997**, *56*, 16021.
- ¹³⁷ von Niessen, W.; Schirmer, J.; Cederbaum, L. S. "Computational methods for the one-particle green's function" *Comput. Phys. Rep.*, **1984**, *1*, 57.
- ¹³⁸ Ortiz, J. V. "Partial Third Order Quasiparticle Theory: Comparisons for Closed-Shell Ionization Energies and An Application to the Borazine Photoelectron Spectrum" *J. Chem. Phys.*, **1996**, *104*, 7599.
- ¹³⁹ Herman, M. F.; Freed, K. F.; Yeager, D. L. "Analysis and Evaluation of Ionization Potentials, Electron Affinities, and Excitation Energies by the Equations of Motion-Green's Function Method" *Adv. Chem. Phys.*, **1981**, *48*, 1.
- ¹⁴⁰ Ortiz, J. V. "Toward an Exact One-Electron Picture of Chemical Bonding" *Adv. Quantum Chem.*, **1999**, *35*, 33.
- ¹⁴¹ Linderberg, J.; Öhrn, Y. *Propagators in Quantum Chemistry*, 2nd ed. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, **2004**.
- ¹⁴² Ho, J.; Coote, M. L. "A universal approach for continuum solvent *pKa* calculations: are we there yet?" *Theor. Chem. Acc.*, **2010**, *125*, 3.
- ¹⁴³ Scheiner, A. C.; Baker, J.; Andzelm, J. W.; "Molecular energies and properties from density functional theory: Exploring basis set dependence of Kohn-Sham equation using several density functional" *J. Comput. Chem.*, **1997**, *18*, 775.
- ¹⁴⁴ St-Amant, A.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A.; Halgren, T. A. "Calculation of molecular geometries, relative conformational energies, dipole moments, and molecular electrostatic potential fitted charges of small organic molecules of biochemical interest by density functional theory" *J. Comput. Chem.*, **1995**, *16*, 1483.
- ¹⁴⁵ Dabkowska, I.; Jurečka, P.; Hobza, P. "On geometries of stacked and H-bonded nucleic acid base pairs determined at various DFT, MP2, and CCSD(T) levels up to the CCSD(T)/complete basis set limit level" *J. Chem. Phys.*, **2005**, *122*, 204322.
- ¹⁴⁶ Pitoňák, M.; Riley, K. E.; Neogrady, P.; Hobza, P. "Highly accurate CCSD(T) and DFT-SAPT stabilization energies of H-bonded and stacked structures of the Uracil Dimer" *Chem. Phys. Chem.*, **2008**, *9*, 1636.
- ¹⁴⁷ Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. "Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals" *RSC Advances*, **2011**, *1*, 1763.
- ¹⁴⁸ Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Francisco-Márquez, M. "Physicochemical Insights on the Free Radical Scavenging Activity of Sesamol: Importance of the Acid/Base Equilibrium" *J. Phys. Chem. B.*, **2011**, *115*, 13101.
- ¹⁴⁹ Leon-Carmona, J. R.; Galano, A. "Is Caffeine a Good Scavenger of Oxygenated Free Radicals?" *J. Phys. Chem. B.*, **2011**, *115*, 4538.

-
- ¹⁵⁰ Galano A. "On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 7147.
- ¹⁵¹ Galano, A.; Martínez, A. "Capsaicin, a Tasty Free Radical Scavenger: Mechanism of Action and Kinetics" *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*, 1200.
- ¹⁵² Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Francisco-Márquez, M.; Medina, M. E. "A Quantum Chemical Study on the Free Radical Scavenging Activity of Tyrosol and Hydroxytyrosol" *Theor. Chem. Acc.*, **2012**, *131*, 1173.
- ¹⁵³ Alberto, M. E.; Russo, N.; Grand, A.; Galano, A. "A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of Trolox: mechanism, kinetics and influence of the environment" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, *15*, 4642.
- ¹⁵⁴ Alvarez-Idaboy, J. R.; Galano, A. "On the Chemical Repair of DNA Radicals by Glutathione: Hydrogen vs. Electron Transfer" *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*, 9316.
- ¹⁵⁵ Galano, A.; León-Carmona, J. R.; Alvarez-Idaboy J. R. "Influence of the environment on the protective effects of Guaiacol derivatives against oxidative stress: Mechanisms, Kinetics, and Relative Antioxidant Activity" *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*, 7129.
- ¹⁵⁶ Baker, M. Z.; Badzello, R.; Tamba, M.; Quintiliani, M.; Gorin, G. "Pulse radiolytic study of hydrogen transfer from Glutathione to organic radicals" *Int. J. Radiat. Biol.*, **1982**, *41*, 595.
- ¹⁵⁷ Joshi, R.; Kumar, M. S.; Satyamoorthy, K.; Unnikrisnan, M. K.; Mukherjee, T. "Free radical reactions and antioxidant activities of sesamol: pulse radiolytic and biochemical studies" *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2696.
- ¹⁵⁸ Okada, Y.; Tanaka, K.; Sato, E.; Okajima, H. "Kinetics and antioxidative sites of Capsaicin in Homogeneous solution" *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2010**, *87*, 1397.
- ¹⁵⁹ Storozhok, N. M.; Gureeva, N. V.; Krysin, A. P.; Borisenko, V. E.; Rusina, I. F.; Khrapova, N. G.; Burlakova, E. B. "Interrelation between the inhibiting properties and the activity of phenoxy radicals of antioxidants different in structure" *Kinet Catal.*, **2004**, *45*, 488.
- ¹⁶⁰ Mitarai, K.; Ouchi, A.; Mukai, K.; Tokunaga, A.; Mukai, K.; Abe, K. "Kinetic studies of the free radical-scavenging actions of Tocopherol metabolites (α -, γ -, and δ -Carboxyethyl-6-hydroxychroman) and Trolox in ethanol and micellar solutions" *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 84.
- ¹⁶¹ Aruoma, O. I.; Evans, P. J.; Kaur, H.; Sutcliffe, L.; Halliwell, B. "An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of trolox C, vitamin E and probucol" *Free Radical Res. Commun.*, **1990**, *10*, 143.
- ¹⁶² Mahal, H. S.; Badheka, L. P.; Mukherjee, T. "Radical scavenging properties of a flavouring agent-Vanillin" *Res. Chem. Intermed.*, **2001**, *27*, 595.
- ¹⁶³ Guha, S. N.; Priyadarsini, K. I. "Kinetic and redox characteristics of phenoxy radicals of eugenol and isoeugenol: A pulse radiolysis study" *Int. J. Chem. Kinet.* **2000**, *32*, 17.
- ¹⁶⁴ Quintiliani, M.; Badiello, R.; Tamba, M.; Esfandi, A.; Gorin, G. "Radiolysis of Glutathione in oxygen-containing solutions of pH 7" *Int. J. Radiat. Biol.*, **1977**, *32*, 195.
- ¹⁶⁵ Eriksen, T. E.; Fransson, G. "Formation of reducing radicals on radiolysis of glutathione and some related compounds in aqueous solution" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1988**, 1117.
- ¹⁶⁶ Hofstetter, D.; Nauser, T.; Koppenol, W. H. "Hydrogen exchange equilibria in Glutathione radicals: rate constants" *Chem. Res. Toxicol.*, **2010**, *23*, 1596.

-
- ¹⁶⁷ Kesavan, P. C.; Powers, E. L. "Differential modification of oxic and anoxic components of radiation damage in *Bacillus megaterium* spores by caffeine" *Int. J. Radiat. Biol.* **1985**, *48*, 223.
- ¹⁶⁸ Devasagayam, T. P. A.; Kamat, J. P.; Mohan, H.; Kesavan, P. C. "Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species" *Biochim. Biophys. Acta*, **1996**, *1282*, 63.
- ¹⁶⁹ Brezova, V.; Slebođova, A.; Stasko, A. "Coffee as a source of antioxidants: An EPR study" *Food Chem.*, **2009**, *114*, 859.
- ¹⁷⁰ Poeggeler, B.; Reiter, R. J.; Hardeland, R. et al. "Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro" *Redox Rep*, **1996**; *2*, 179.
- ¹⁷¹ Matuszak, Z. K.; Reszka, J.; Chignell, C. F. "Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations" *Free Radic Biol Med*, **1997**; *23*, 367.
- ¹⁷² Roberts, J. E.; Hu D. N.; Wishart, J. F. "Pulse radiolysis studies of melatonin and chloromelatonin" *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1998**; *42*, 125.
- ¹⁷³ Stasica, P.; Ukanski, J.; Rosiak, J. M. "Reactions of melatonin with radicals in deoxygenated aqueous solution" *J Radioanal Nucl Chem*, **1998**; *232*, 107.
- ¹⁷⁴ Chyan, Y. J.; Poeggeler, B.; Omar, R. A.; et al. "Potent neuroprotective properties against the Alzheimer b-amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid" *J Biol Chem*, **1999**; *274*, 21937.
- ¹⁷⁵ Marshall, K. A.; Reiter, R. J.; Poeggeler, B. et al. "Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro" *Free Radic Biol Med*, **1996**; *21*, 307.
- ¹⁷⁶ Mahal, H. S.; Sharma, H. S.; Mukherjee, T. "Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study" *Free Radic Biol Med* **1999**; *26*, 557.
- ¹⁷⁷ Emanuel, C. J.; Newcomb, M.; Ferreri, C.; Chatgililoglu, C. "Kinetics of 2'-Deoxyuridin-1'-yl radical reactions" *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 2927.
- ¹⁷⁸ Chatgililoglu, C.; Ferreri, C.; Bazzanini, R.; Guerra, M.; Choi, S.-Y.; Emanuel, C. J.; Horner, J. H.; Newcomb, M. "Models of DNA C1' Radicals. Structural, Spectral, and Chemical properties of the Thymineylmethyl radical and the 2'-Deoxyuridin-1'-yl radical" *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 9525.
- ¹⁷⁹ Masoud, M. S.; Abd El Zaher Mostafa, M.; Ahmed, R. H.; Abd. El Moneim, N. H. "Structures and Chemical Equilibria of Some N-Heterocycles Containing Amide Linkages" *Molecules*, **2003**, *8*, 430.
- ¹⁸⁰ Hammett, L. P. "The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds. Benzene Derivatives" *J. Am. Chem. Soc.*, **1937**, *59*, 96.
- ¹⁸¹ Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. "A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters" *Chem. Rev.*, **1991**, *91*, 165.
- ¹⁸² Vondrak, T.; Bastl, Z. J. Böhm, S. "Gas-phase tautomerism in 2,4-dihydropyrazol-3-ones: an ultraviolet photoelectron spectroscopic study and MNDO molecular orbital calculations" *Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1988**, 641.
- ¹⁸³ Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. "Electron Propagator Calculations on the Photoelectron Spectrum of Ethylene" *J. Chem.Phys.*, **2001**, *114*, 130.
- ¹⁸⁴ Howell, J. O.; Goncalves, J. M.; Amatore, C.; Klasinc, L.; Wightman, R. M.; Kochi, J. K. "Electron transfer from aromatic hydrocarbons and their .pi.-complexes with metals. Comparison of

the standard oxidation potentials and vertical ionization potentials" *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 3968.

¹⁸⁵ Kovac, B.; Mohraz, M.; Heilbronner, E.; Boekelheide, V.; Hopf, H. "Photoelectron spectra of the cyclophanes" *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 4314

¹⁸⁶ Daamen, H.; Oskam, A.; Stufkens, D. J.; Waaijers, H. W. "Bonding properties of group VIB metal pentacarbonyl azole complexes studied by electronic absorption, photoelectron, ¹³C NMR and vibrational spectroscopy" *Inorg. Chim. Acta*, **1979**, *34*, 253.

¹⁸⁷ Cradock, S.; Findlay, R. H.; Palmer, M. H. "The molecular energy levels of the azoles: A study by photoelectron spectroscopy and ab initio molecular orbital calculations" *Tetrahedron*, **1973**, *29*, 2173.

¹⁸⁸ Ramsey, B. G. "Substituent effects on imidazole basicity and photoelectron spectroscopy determined ionization energies" *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 2093.

¹⁸⁹ Streets, D. G.; Hall, W. E.; Ceasar, G. P. "Mesomeric mixing in the π energy levels of aminobenzenes studied by photoelectron spectroscopy" *Chem. Phys. Lett.*, **1972**, *17*, 90.

¹⁹⁰ Moser, A.; Range, K.; York, D. M. "Accurate Proton Affinity and Gas-Phase Basicity Values for Molecules Important in Biocatalysis" *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 13911.

¹⁹¹ Bera, N.C.; Maeda, S.; Morokuma, K.; Viggiano, A. A. "Theoretical Proton Affinity and Fluoride Affinity of Nerve Agent VX" *J. Phys. Chem. A*, **2010**, *114*, 13189.

¹⁹² Liu, M.; Yang, I.; Buckley, B.; Lee, J. K. "Proton Affinities of Phosphines versus N-Heterocyclic Carbenes" *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 4764.

¹⁹³ Mulder, R. J.; Guerra, C. F.; Bickelhaupt, F. M. "Methyl Cation Affinities of Neutral and Anionic Maingroup-Element Hydrides: Trends Across the Periodic Table and Correlation with Proton Affinities" *J. Phys. Chem. A*, **2010**, *114*, 7604.

¹⁹⁴ Rosenberg, M.; Ottosson, H.; Kilsa, K. "Proton and Hydride Affinities in Excited States: Magnitude Reversals in Proton and Hydride Affinities between the Lowest Singlet and Triplet States of Annulenyl and Benzannulenyl Anions and Cations" *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 2189.

¹⁹⁵ de Petris, G.; Cartoni, A.; Rosi, M.; Barone, V.; Puzzarini, C.; Troiani, A. "The proton affinity and gas-phase basicity of sulfur dioxide" *Chem. Phys. Chem.*, **2011**, *12*, 112.

¹⁹⁶ Rebollar-Zepeda, A. M.; Campos-Hernández, T.; Ramírez-Silva, M. T.; Rojas-Hernández, A.; Galano, A. "Searching for computational strategies to accurately predict pK_as of large phenolic derivatives" *J. Chem. Theory Comput.*, **2011**, *7*, 2528.

¹⁹⁷ Casanovas, R.; Fernández, D.; Ortega-Castro, J.; Frau, J.; Donoso, J.; Muñoz, F. "Avoiding gas phase calculations in theoretical pK_a predictions" *Theoretical Chemical Accounts*, **2011**, *130*, 1.

¹⁹⁸ Pliego, J. R.; Riveros, J. M. "New values for the absolute solvation free energy of univalent ions in aqueous solution" *Chem. Phys. Lett.*, **2000**, *332*, 597.

¹⁹⁹ Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. "Adding Explicit Solvent Molecules to Continuum Solvent Calculations for the Calculation of Aqueous Acid Dissociation Constants" *J. Phys. Chem. A*, **2006**, *110*, 2493.

²⁰⁰ Vaidya, V.; Ingold, K. U.; Pratt, D. A. "Garlic: Source of the ultimate antioxydants - Sulfenic acids" *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 157.

-
- ²⁰¹ Galano, A.; Francisco-Marquez, M. "Reactions of OOH Radical with β -Carotene, Lycopene and Torulene: Hydrogen Atom Transfer and Adduct Formation Mechanisms" *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 11338.
- ²⁰² Galano, A.; Francisco-Marquez, M. "Peroxyl-Radical-Scavenging Activity of Garlic: 2-propenesulfenic Acid vs. Allicin" *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 16077.
- ²⁰³ Chapkanov, A. G.; Koleva, B. B.; Arnaudov, M. G.; Petkov, I. K. "On the tautomerism of 1-phenyl-3-substituted-pyrazol-5-ones and their photoinduced products — experimental and theoretical UV spectral analysis" *Chem. Papers*, **2008**, *62*, 294.
- ²⁰⁴ Jeffrey, G. A. *An Introduction to Hydrogen Bonding (Topics in Physical Chemistry)*. Oxford University Press, USA, **1997**.
- ²⁰⁵ Pérez-González, A.; Galano, A. "Ionization energies, proton affinities, and *pK*as of a large series of Edaravone derivatives: implication for their free radical scavenging activity" *J. Phys. Chem. B*, **2011**, *115*, 10375.
- ²⁰⁶ Galano, A.; Francisco-Marquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. "Canolol: a promising chemical agent against oxidative stress" *J. Phys. Chem. B*, **2011**, *115*, 8590.
- ²⁰⁷ Chauhan, A.; Sharma, P. K.; Kaushik, N. "Pyrazole: A Versatile Moiety" *Int. J. ChemTech. Res.*, **2011**, *3*, 11.
- ²⁰⁸ Pasin, J. S. M.; Ferreira, A. P. O.; Saraiva, A. L. L.; Ratzlaff, V.; Andrighetto, R.; Machado, P.; Marchesan, S.; Zanette, R. A.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P.; Ferreira J.; Mello, C.F.; "Antipyretic and antioxidant activities of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in rats" *Braz. J. Med Biol Res*, **2010**, *43*, 1193.
- ²⁰⁹ Dewangan, D.; Kumar, T.; Alexander, A.; Nagori, K.; Tripathi, D. K. "Pyrazole: Their Chemistry and Pharmacological Potentials: A Review" *Current Pharma Research*, **2011**, *1*, 369.
- ²¹⁰ Galano, A.; Alvarez-Idaboy J. R. "On the evolution of one-electron-oxidized deoxyguanosine in damaged DNA under physiological conditions: a TFD and ONIOM study on proton transfer and equilibrium" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2012**, *14*, 12476.

Anexo I. Parámetros optimizados en M05-2X¹

Parámetros	a_i	$Cc_{\alpha\beta,i}$	$Cc_{\sigma\sigma,i}$
0	1.00000	1.00000	1.00000
1	-0.56833	1.09297	-3.05430
2	-1.30057	-3.79171	7.61854
3	5.50070	2.82810	1.47665
4	9.06402	-10.58909	-11.92365
5	-32.21075		
6	-23.73298		
7	70.22996		
8	29.88614		
9	-60.25778		
10	-13.22205		
11	15.23694		
X		56	

a_i = Coeficientes de intercambio meta-GGA

$Cc_{\alpha\beta,i}$ = Coeficientes de correlación de espín opuesto

$Cc_{\sigma\sigma,i}$ = Coeficientes de correlación de espín paralelo

X = % de intercambio exacto

¹ Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364.

Anexo II. Propiedades para las cuales se parametrizó el funcional M05-2X¹

<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 ² y Database/4 ³
Potencial de ionización	IP13/3 ⁴	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	4 átomos y 1 molécula	C, O, OH, Cr, Cu
Afinidad electrónica	EA13/3 ⁴	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	2 átomos y 1 molécula	C, O, OH
Barreras energéticas	HTBH38/04 ⁵	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 ⁶	Energías de enlace de 6 dímeros con enlaces de H	(NH ₃) ₂ , (HF) ₂ , (H ₂ O) ₂ , H ₂ O--NH ₃ , (HCONH ₂) ₂ , (HCOOH) ₂
	CT7/04 ⁶	Energías de enlace de 7 complejos de transferencia	C ₂ H ₄ --F ₂ , NH ₃ --F ₂ , C ₂ H ₂ --ClF, HCN--ClF, NH ₃ --Cl ₂ , H ₂ O--ClF, NH ₃ --ClF
	DI6/04 ⁶	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 ⁷	Energías de enlace de 7 complejos con interacciones débiles	HeNe, HeAr, Ne ₂ , NeAr, CH ₄ --Ne, C ₆ H ₆ --Ne, (CH ₄) ₂
	PPS5/05 ⁷	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 , 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 ⁸	Energías de enlace de 4 metales	Cr ₂ , Cu ₂ , V ₂ , Zr ₂
	MLBE4/05 ⁹	Energías de enlace de 4 complejos organometálicos e inorganometálicos	Energías de enlace Cr-C, Ni-C, Fe-C, V-S de CrCH ₃ ⁺ , NiCH ₂ ⁺ , Fe(CO) ₅ y VS
Energías de disociación de enlaces alquíl	ABDE4/05 ¹⁰	Energías de disociación de enlace de 4 compuestos	R-X (donde R=Me y X=CH ₃ y OCH ₃)
Momento Dipolar	DM6/05 ¹¹	Momentos dipolares de 6 moléculas con geometría fija	H ₂ N(CH=CH) ₆ NO ₂ , H ₂ CO, CuH, BF, LiCl, H ₂ O
Energía totales	AAE5 ¹²	5 átomos	H, C, O, S, Si

² Lynch, B. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 3898.

³ Lynch, B. J.; Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 1643.

⁴ Lynch, B. J.; Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 1384.

⁵ Zhao, Y.; Lynch, B. J.; Truhlar, D. G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 43.

⁶ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 415.

⁷ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5656.

⁸ Schultz, N.; Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 4388.

⁹ Schultz, N.; Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 11127.

¹⁰ Izgorodina, E. I.; Coote, M. L.; Radom, L. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 7558.

¹¹ Bulat, F. A.; Toro-Labbe', A.; Champagne, B.; Kirtman, B.; Yang, W. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 14319.

¹² Chakravorty, S. J.; Gwaltney, S. R.; Davidson, E. R.; Parpia, F. A.; Fischer, C. F. *Phys. Rev. A: At., Mol., Opt. Phys.* **1993**, *47*, 3649.

Anexo III. Errores (kcal/mol) de diferentes funcionales¹³

Funcionales	Escalón	# Parámetros	TC-EAP	TK-EAP	NC-EAP	P-EAP
M08-HX	4 (HM)	47	0.86	1.00	0.28	0.71
M06-2X	4 (HM)	35	0.86	1.20	0.25	0.77
M08-SO	4 (HM)	44	1.09	1.21	0.28	0.86
M05-2X	4 (HM)	22	1.10	1.53	0.29	0.97
BMK	4 (HM)	20	1.25	1.29	1.12	1.22
MPWB1K	4 (HM)	7	1.74	1.37	0.65	1.25
M06	4 (HM)	38	1.28	2.13	0.41	1.28
M06-HF	4 (HM)	38	1.33	2.25	0.42	1.33
M05	4 (HM)	22	1.54	2.03	0.44	1.34
BB1K	4 (HM)	6	2.07	1.29	1.18	1.51
MPW1B95	4 (HM)	7	1.37	2.66	0.67	1.57
B97-3	4 (HG)	19	1.69	1.87	1.19	1.58
B1B95	4 (HM)	6	1.40	2.53	1.26	1.73
MPW1K	4 (HG)	5	3.07	1.55	0.87	1.83
B97-2	4 (HG)	16	1.77	2.74	1.22	1.91
B98	4 (HG)	16	1.61	3.78	0.73	2.04
PW1PW	4 (HG)	5	1.91	3.39	0.89	2.07
B97-1	4 (HG)	16	1.63	3.93	0.66	2.07
PBEh	4 (HG)	1	1.78	3.87	0.67	2.11
M06-L	3	39	1.92	4.02	0.58	2.17
B3LYP	4 (HG)	7	1.94	4.40	1.09	2.48
MPW3LYP	4 (HG)	8	1.83	5.02	0.80	2.55
τ -HCTHh	4 (HM)	20	1.78	4.92	1.47	2.73
TPSSh	4 (HM)	1	2.18	6.44	1.03	3.21
TPSS	3	0	2.17	8.33	1.19	3.90
BLYP	2	4	2.45	8.31	1.58	4.11
PBE	2	0	3.15	8.92	1.10	4.39
HFLYP	4 (HG)	3	7.84	7.08	0.76	5.22
SOGGA	2	0	6.31	11.45	2.12	6.63
LSDA	1	0	13.45	15.13	2.17	10.25
HF	NA	0	26.48	7.71	2.62	12.27

TC-EAP = Error absoluto promedio para Termoquímica

TK-EAP = Error absoluto promedio para Cinética Termoquímica

NC-EAP = Error absoluto promedio para interacciones no covalentes

P-EAP = Promedio de EAP's

¹³ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 1849.

Anexo IV. Errores absoluto promedio (EAP) (kcal/mol) para la base de datos BC332 de diferentes funcionales¹⁴

	PBE	SOGGA11	B3LYP	B97-3	ω -B97X	ω -B97X-D	M06-L	M05	M05-2X	M06	M06-2X	M06-HF	M08-HX	M08-SO	M11
# Parámetros	0	18	3	19	33	33	38	22	22	38	38	38	47	44	38
X	0	0	20	26.93	15.77-100	22.2-100	0	56	56	27	54	100	52.23	56.79	42.8-100
Sub-base	GGA		Hibrido-GGA		RSH-GGA		Meta-GGA			Hibrido-Meta-GGA				RSH-Meta-GGA	
de datos	PBE	SOGGA11	B3LYP	B97-3	ω -B97X	ω -B97X-D	M06-L	M05	M05-2X	M06	M06-2X	M06-HF	M08-HX	M08-SO	M11
π -TC13	6.01	7.61	6.06	7.10	3.94	5.82	6.52	5.18	3.05	4.08	1.51	1.92	1.98	1.87	2.12
HTBH38/08	9.31	6.57	4.23	2.28	2.01	2.36	4.15	1.94	1.26	1.98	1.14	2.07	0.72	1.07	1.30
NHTBH38/08	8.42	4.32	4.55	1.38	2.89	3.74	3.81	2.07	1.81	2.33	1.22	2.53	1.22	1.23	1.28
NCCE31/05	1.24	1.28	0.96	0.98	0.50	0.32	0.58	0.49	0.28	0.41	0.29	0.41	0.35	0.37	0.26

π -TC13 Termoquímica de sistemas- π
HTBH38/08 Barreras de transferencia de hidrógeno
NHTBH38/08 Barreras de transferencia de no hidrógeno
NCCE31/05 Interacciones no covalentes

¹⁴ Peverati, R.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 2810.

Anexo V. Funciones de partición y funciones de estado.

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), son:

$$q_t = \left(\frac{2\pi m k_B T}{h^2} \right)^{3/2} \frac{k_B T}{P}, \quad (1)$$

$$q_e = 2S + 1, \text{ multiplicidad del espín}, \quad (2)$$

$$q_r = \frac{8\pi^2 I k_B T}{\sigma h^2} \text{ (para especies lineales)}, \quad (3)$$

$$q_r = \frac{8\pi^2 (8\pi^3 I_A I_B I_C)^{1/2} (k_B T)^{3/2}}{\sigma h^3} \text{ (para especies no lineales)}, \quad (4)$$

$$q_v = \prod_i q_{vi} = \prod_i \left(\frac{1}{1 - e^{-h\nu_i/k_B T}} \right), \quad (5)$$

con
$$\nu_i = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{K_F}{m_R} \right)^{1/2}, \quad (6)$$

En cuanto a las componentes de la entropía (S) y de la energía (E), se obtienen según:

$$S_t = R \left(\ln q_t + \frac{5}{2} \right), \quad (7)$$

$$S_e = R (\ln q_e), \quad (8)$$

$$S_r = R (\ln q_r + 1) \text{ (para especies lineales)}, \quad (9)$$

$$S_r = R \left(\ln q_r + \frac{3}{2} \right) \text{ (para especies no lineales)}, \quad (10)$$

$$S_v = R \sum_i S_{vi} = R \sum_i \left(\left(\frac{h\nu_i}{k_B T} \right) \left(\frac{1}{e^{h\nu_i/k_B T} - 1} \right) - \ln(1 - e^{-h\nu_i/k_B T}) \right), \quad (11)$$

$$E_t = \frac{3}{2} RT, \quad (12)$$

$$E_e = 0, \text{ a temperatura ambiente (T=298.15°K)}, \quad (13)$$

$$E_r = RT \text{ (para especies lineales)}, \quad (14)$$

$$E_r = \frac{3}{2}RT \quad (\text{para especies no lineales}), \quad (15)$$

$$E_v = R \sum_i E_{vi} = R \sum_i \left(\left(\frac{h\nu_i}{k_B} \right) \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{e^{h\nu_i/k_B T} - 1} \right) \right) \quad (16)$$

Entonces la entalpía (H) y la energía libre de Gibbs (G) son:

$$H_{corr} = E_{tot} + k_B T, \quad (17)$$

$$G_{corr} = H_{corr} - TS_{tot} \quad (18)$$

con

$$E_{tot} = E_t + E_e + E_r + E_v, \quad (19)$$

$$S_{tot} = S_t + S_e + S_r + S_v \quad (20)$$

Anexo VI. Fuerzas polares (PS) para las PI de EDA y sus derivados.

	Neutro		Anión			Neutro		Anión	
	OVGf	P3	OVGf	P3		OVGf	P3	OVGf	P3
A1	0.892	0.882	0.889	0.878	A2	0.892	0.882	0.888	0.877
B1	0.892	0.881	0.889	0.877	B2	0.892	0.881	0.889	0.877
C1	0.890	0.879	0.888	0.877					
D1	0.893	0.882	0.889	0.878	D2	0.892	0.881	0.889	0.878
E1	0.892	0.881	0.889	0.877	E2	0.893	0.883	0.889	0.878
F1	0.892	0.881	0.888	0.877	F2	0.892	0.881	0.888	0.877
G1	0.893	0.882	0.890	0.878	G2	0.893	0.882	0.890	0.879
H1	0.889	0.879	0.885	0.874	H2	0.889	0.879	0.885	0.873
I1	0.889	0.878	0.887	0.876	I2	0.891	0.881	0.887	0.875
J1	0.889	0.878	0.885	0.874	J2	0.879	0.880	0.887	0.875
K1	0.889	0.878	0.886	0.874	K2	0.891	0.880	0.887	0.875
L1	0.889	0.877	0.885	0.873	L2	0.891	0.880	0.887	0.876
M1	0.891	0.880	0.888	0.876	M2	0.893	0.882	0.889	0.877
N1	0.888	0.877	0.884	0.872	N2	0.890	0.880	0.886	0.874

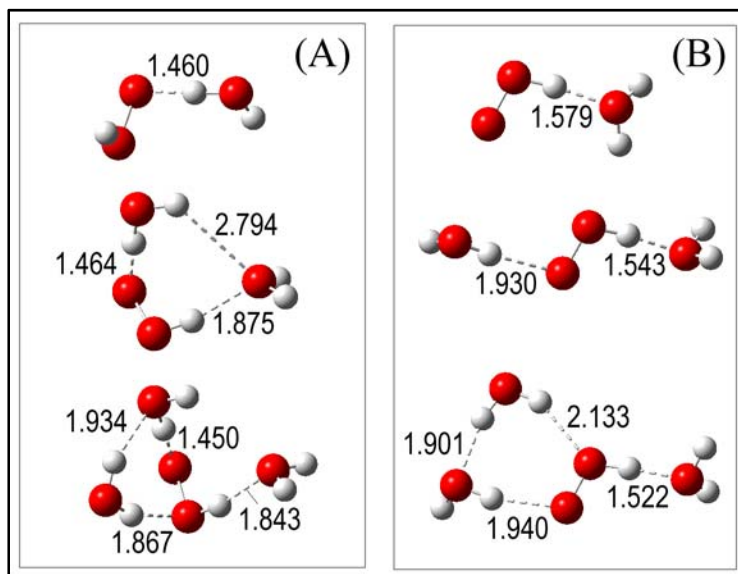
Anexo VII. PI (eV) de especies neutras de EDA y sus derivados.

Derivado	Δ SCF	Teorema PI^{PL}	OVGF	P3
A1	8.08	8.16	7.76	8.01
B1	7.61	7.72	7.27	7.53
C1	7.76	7.94	7.43	7.71
D1	7.32	7.37	6.99	7.24
E1	7.85	7.92	7.53	7.79
F1	8.14	8.28	7.75	8.06
G1	7.74	7.81	7.38	7.66
H1	7.70	7.68	7.39	7.65
I1	9.24	8.34	7.82	8.12
J1	8.43	8.56	8.00	8.36
K1	8.56	8.71	8.14	8.53
L1	8.76	9.02	8.27	8.72
M1	8.55	8.74	8.15	8.49
N1	8.21	8.66	8.12	8.48
A2	8.36	8.55	8.07	8.34
B2	7.95	8.09	7.64	7.90
D2	7.76	7.93	7.47	7.72
E2	8.28	8.30	7.93	8.19
F2	8.36	8.45	8.01	8.31
G2	8.09	8.18	7.75	8.02
H2	8.03	8.12	7.71	7.98
I2	8.07	8.23	7.75	8.03
J2	8.64	8.68	8.23	8.57
K2	8.75	8.82	8.37	8.71
L2	8.92	8.99	8.50	8.88
M2	8.69	8.73	8.31	8.62
N2	9.02	8.70	8.30	8.61

Anexo VIII. PI (eV) de especies aniónicas de EDA y sus derivados.

Derivado	Δ SCF	Perdew- Levy	OvGF	P3
A1	2.83	3.22	2.47	2.64
B1	2.85	3.25	2.50	2.67
C1	3.01	3.43	2.65	2.82
D1	2.69	3.08	2.37	2.55
E1	2.78	3.18	2.43	2.60
F1	3.03	3.45	2.66	2.85
G1	2.79	3.19	2.44	2.63
H1	2.93	3.35	2.61	2.79
I1	3.02	3.44	2.65	2.83
J1	3.26	3.69	2.88	3.08
K1	3.34	3.78	2.95	3.16
L1	3.47	3.92	3.07	3.29
M1	3.22	3.64	2.84	3.03
N1	3.42	3.82	3.02	3.21
A2	2.72	3.11	2.33	2.49
B2	2.93	3.39	2.57	2.75
D2	2.86	3.31	2.52	2.68
E2	2.85	3.20	2.48	2.68
F2	3.28	3.69	2.86	3.12
G2	3.04	3.47	2.67	2.87
H2	2.95	3.32	2.60	2.79
I2	3.13	3.54	2.74	2.97
J2	3.33	3.62	2.89	3.19
K2	3.53	3.88	3.09	3.42
L2	3.68	4.01	3.17	3.58
M2	3.43	3.77	2.98	3.29
N2	4.52	3.70	3.03	3.34

Anexo IX. Geometrías optimizadas de (A) OOH anión y (B) OOH radical con 1 a 3 moléculas de agua explícitas.



Anexo X. Energías libres Gibbs de reacción (ΔG) (kcal/mol) para los procesos TES de las especies neutras de los derivados de EDA.

	•R1	•R2	•R3	•R4	•R5	•R6	•R7	•R8	•R9	•R10	•R11
A1	9.19	26.23	24.49	-28.69	-9.21	32.30	34.10	33.72	11.76	15.84	26.36
B1	2.54	19.58	17.85	-35.34	-15.86	25.65	27.46	27.07	5.11	9.19	19.72
C1	2.34	19.38	17.64	-35.54	-16.07	25.44	27.25	26.86	4.91	8.98	19.51
D1	-8.79	8.25	6.51	-46.67	-27.19	14.32	16.12	15.74	-6.22	-2.14	8.38
E1	4.53	21.57	19.83	-33.35	-13.87	27.63	29.44	29.05	7.10	11.17	21.70
F1	10.70	27.74	26.00	-27.18	-7.71	33.80	35.61	35.22	13.26	17.34	27.87
G1	2.10	19.15	17.41	-35.77	-16.30	25.21	27.02	26.63	4.67	8.75	19.28
H1	4.60	21.64	19.91	-33.28	-13.80	27.71	29.52	29.13	7.17	11.25	21.78
I1	3.34	20.38	18.64	-34.54	-15.06	26.45	28.25	27.87	5.91	9.99	20.52
J1	14.76	31.80	30.06	-23.12	-3.65	37.86	39.67	39.28	17.33	21.40	31.93
K1	15.71	32.75	31.01	-22.17	-2.70	38.81	40.62	40.23	18.28	22.35	32.88
L1	17.85	34.89	33.15	-20.03	-0.56	40.95	42.76	42.37	20.42	24.49	35.02
M1	14.93	31.97	30.23	-22.95	-3.47	38.04	39.84	39.46	17.50	21.58	32.11
N1	7.87	24.92	23.18	-30.00	-10.53	30.98	32.79	32.40	10.44	14.52	25.05
A2	15.77	32.82	31.08	-22.10	-2.63	38.88	40.69	40.30	18.34	22.42	32.95
B2	6.30	23.34	21.60	-31.58	-12.11	29.40	31.21	30.82	8.86	12.94	23.47
D2	-1.89	15.15	13.42	-39.77	-20.29	21.22	23.03	22.64	0.68	4.76	15.29
E2	12.48	29.52	27.78	-25.40	-5.92	35.58	37.39	37.00	15.05	19.13	29.65
F2	14.56	31.61	29.87	-23.31	-3.84	37.67	39.48	39.09	17.13	21.21	31.74
G2	7.53	24.58	22.84	-30.35	-10.87	30.64	32.45	32.06	10.10	14.18	24.71
H2	8.01	25.06	23.32	-29.87	-10.39	31.12	32.93	32.54	10.58	14.66	25.19
I2	9.51	26.55	24.82	-28.37	-8.89	32.62	34.43	34.04	12.08	16.16	26.69
J2	17.09	34.13	32.39	-20.79	-1.32	40.19	42.00	41.61	19.66	23.73	34.26
K2	18.21	35.25	33.51	-19.67	-0.19	41.32	43.12	42.74	20.78	24.86	35.39
L2	20.02	37.06	35.33	-17.86	1.62	43.13	44.94	44.55	22.59	26.67	37.20
M2	16.76	33.81	32.07	-21.11	-1.64	39.87	41.68	41.29	19.33	23.41	33.94
N2	16.18	33.23	31.49	-21.69	-2.22	39.29	41.10	40.71	18.75	22.83	33.36

Anexo XI. Energías libres Gibbs de reacción (ΔG) (kcal/mol) para los procesos TES de las especies aniónicas de los derivados de EDA.

	•R1	•R2	•R3	•R4	•R5	•R6	•R7	•R8	•R9	•R10	•R11
A1	-19.48	-2.44	-4.18	-57.36	-37.88	3.63	5.43	5.05	-16.91	-12.83	-2.30
B1	-20.60	-3.56	-5.29	-58.48	-39.00	2.51	4.32	3.93	-18.03	-13.95	-3.42
C1	-19.85	-2.81	-4.54	-57.73	-38.25	3.26	5.07	4.68	-17.28	-13.20	-2.67
D1	-20.55	-3.51	-5.25	-58.43	-38.95	2.55	4.36	3.97	-17.98	-13.90	-3.38
E1	-20.21	-3.17	-4.91	-58.09	-38.62	2.89	4.70	4.31	-17.64	-13.57	-3.04
F1	-18.70	-1.65	-3.39	-56.58	-37.10	4.41	6.22	5.83	-16.13	-12.05	-1.52
G1	-20.10	-3.06	-4.80	-57.98	-38.51	3.00	4.81	4.42	-17.53	-13.46	-2.93
H1	-18.89	-1.85	-3.59	-56.77	-37.30	4.21	6.02	5.63	-16.32	-12.25	-1.72
I1	-19.69	-2.65	-4.39	-57.57	-38.10	3.41	5.22	4.83	-17.12	-13.05	-2.52
J1	-17.09	-0.05	-1.78	-54.97	-35.49	6.02	7.83	7.44	-14.52	-10.44	0.09
K1	-16.88	0.17	-1.57	-54.75	-35.28	6.23	8.04	7.65	-14.31	-10.23	0.30
L1	-16.14	0.90	-0.84	-54.02	-34.55	6.96	8.77	8.38	-13.57	-9.50	1.03
M1	-17.38	-0.34	-2.08	-55.26	-35.79	5.72	7.53	7.14	-14.81	-10.74	-0.21
N1	0.14	17.18	15.44	-37.74	-18.26	23.25	25.05	24.66	2.71	6.79	17.31
A2	-18.08	-1.03	-2.77	-55.95	-36.48	5.03	6.84	6.45	-15.51	-11.43	-0.90
B2	-19.20	-2.16	-3.90	-57.08	-37.61	3.90	5.71	5.32	-16.63	-12.56	-2.03
D2	-23.33	-6.29	-8.03	-61.21	-41.73	-0.22	1.59	1.20	-20.76	-16.68	-6.15
E2	-18.02	-0.98	-2.72	-55.90	-36.42	5.09	6.90	6.51	-15.45	-11.37	-0.84
F2	-13.74	3.31	1.57	-51.61	-32.14	9.37	11.18	10.79	-11.17	-7.09	3.44
G2	-17.58	-0.54	-2.28	-55.46	-35.99	5.52	7.33	6.94	-15.01	-10.94	-0.41
H2	-17.92	-0.87	-2.61	-55.79	-36.32	5.19	7.00	6.61	-15.35	-11.27	-0.74
I2	-16.46	0.58	-1.15	-54.34	-34.86	6.65	8.46	8.07	-13.89	-9.81	0.72
J2	-13.15	3.89	2.15	-51.03	-31.56	9.95	11.76	11.37	-10.58	-6.51	4.02
K2	-11.60	5.44	3.70	-49.48	-30.00	11.51	13.32	12.93	-9.03	-4.95	5.58
L2	-6.80	10.24	8.50	-44.68	-25.21	16.30	18.11	17.72	-4.23	-0.16	10.37
M2	-11.76	5.28	3.54	-49.64	-30.16	11.35	13.15	12.76	-9.19	-5.11	5.41
N2	2.28	19.32	17.58	-35.60	-16.12	25.39	27.19	26.81	4.85	8.93	19.46

Anexo XII. Energías libres Gibbs de activación (ΔG^\ddagger) (kcal/mol) para los procesos TES de las especies neutras de los derivados de EDA.

	•R1	•R2	•R3	•R4	•R5	•R6	•R7	•R8	•R9	•R10	•R11
A1	9.19	31.21	28.22	0.01	0.55	33.68	36.10	35.51	13.04	16.29	32.76
B1	4.13	20.58	18.36	0.38	0.00	25.74	27.74	27.29	8.77	11.36	21.20
C1	3.99	20.33	18.13	0.41	0.00	25.53	27.52	27.07	8.63	11.20	20.94
D1	0.25	8.84	7.55	2.25	1.28	15.31	16.75	16.46	3.57	5.20	8.78
E1	5.55	22.97	20.66	0.15	0.12	27.85	29.91	29.44	10.13	12.88	23.68
F1	10.78	34.66	31.37	0.00	0.76	35.85	38.41	37.78	14.10	17.54	36.66
G1	4.00	19.84	17.73	0.36	0.00	25.25	27.20	26.76	8.64	11.18	20.36
H1	4.87	25.91	22.91	0.62	0.02	28.63	30.97	30.40	9.31	12.22	27.56
I1	4.09	23.04	20.37	0.65	0.03	26.93	29.13	28.61	8.68	11.42	24.20
J1	16.43	45.39	41.22	0.06	1.68	42.22	45.15	44.39	17.45	21.42	48.92
K1	18.09	48.31	43.90	0.09	1.98	43.83	46.86	46.06	18.32	22.43	52.30
L1	21.70	53.66	48.93	0.26	2.89	47.20	50.37	49.52	20.42	24.76	58.29
M1	16.29	44.23	40.27	0.10	1.89	42.06	44.93	44.19	17.66	21.58	47.34
N1	8.14	27.63	25.07	0.01	0.57	31.64	33.86	33.34	12.41	15.45	28.63
A2	17.27	45.15	41.23	0.18	2.30	43.04	45.92	45.18	18.46	22.44	48.18
B2	6.32	29.40	26.08	0.44	0.00	30.86	33.33	32.73	10.41	13.52	31.53
D2	1.65	15.41	13.47	1.26	0.39	21.22	23.05	22.65	6.07	8.28	15.80
E2	12.71	37.03	33.71	0.04	1.35	37.96	40.56	39.92	15.65	19.23	39.05
F2	16.01	44.42	40.36	0.06	1.66	41.79	44.68	43.94	17.29	21.22	47.74
G2	7.57	29.38	26.37	0.13	0.19	31.87	34.27	33.69	11.64	14.78	30.99
H2	8.05	32.75	29.19	0.25	0.08	33.12	35.71	35.06	11.67	14.97	35.26
I2	9.57	33.71	30.32	0.05	0.39	34.63	37.19	36.56	13.03	16.41	35.88
J2	18.70	46.25	42.43	0.38	3.05	44.47	47.34	46.60	19.73	23.77	49.08
K2	20.16	48.02	44.16	0.55	3.64	45.94	48.85	48.10	20.81	24.94	50.90
L2	22.71	51.36	47.37	0.87	4.64	48.48	51.47	50.69	22.59	26.87	54.43
M2	17.59	42.89	39.48	0.50	3.27	43.15	45.85	45.17	19.54	23.41	45.00
N2	16.64	40.72	37.53	0.51	3.20	41.98	44.58	43.93	19.09	22.85	42.50

Anexo XIII. Energías libres Gibbs de activación (ΔG^\ddagger) (kcal/mol) para los procesos TES de las especies aniónicas de los derivados de EDA.

	•R1	•R2	•R3	•R4	•R5	•R6	•R7	•R8	•R9	•R10	•R11
A1	7.70	0.88	0.42	11.79	15.58	6.44	7.51	7.31	0.05	0.44	0.69
B1	7.96	0.63	0.26	12.08	15.82	5.89	6.90	6.71	0.02	0.33	0.46
C1	8.70	0.72	0.31	12.32	16.59	6.17	7.23	7.03	0.02	0.36	0.53
D1	9.61	0.51	0.18	12.84	17.47	5.76	6.78	6.59	0.01	0.27	0.35
E1	7.97	0.70	0.31	12.03	15.85	6.07	7.10	6.90	0.03	0.36	0.52
F1	7.18	1.13	0.59	11.43	15.05	6.89	8.00	7.79	0.09	0.55	0.94
G1	8.46	0.68	0.29	12.25	16.35	6.07	7.11	6.91	0.02	0.35	0.50
H1	7.91	1.01	0.50	11.81	15.80	6.72	7.83	7.61	0.06	0.49	0.82
I1	5.97	1.02	0.54	10.87	13.62	6.54	7.59	7.39	0.09	0.53	0.83
J1	4.65	1.97	1.24	9.81	12.18	8.04	9.23	9.00	0.28	0.94	1.77
K1	5.38	1.94	1.20	10.24	13.10	8.06	9.28	9.04	0.25	0.90	1.75
L1	3.64	2.51	1.68	9.05	10.91	8.72	9.96	9.71	0.43	1.20	2.33
M1	6.25	1.65	0.97	10.78	14.08	7.68	8.88	8.64	0.18	0.76	1.45
N1	2.55	17.85	15.72	0.88	0.14	23.27	25.20	24.77	7.14	9.54	18.39
A2	7.53	1.28	0.69	11.50	15.42	7.18	8.34	8.11	0.10	0.60	1.08
B2	3.22	1.62	1.04	8.79	9.91	7.26	8.31	8.11	0.28	0.89	1.42
D2	4.65	0.59	0.29	10.13	11.59	5.30	6.16	6.01	0.04	0.37	0.44
E2	8.80	1.19	0.61	12.04	16.64	7.11	8.28	8.05	0.08	0.54	0.99
F2	1.32	4.24	3.18	6.80	7.25	10.65	11.99	11.72	1.04	2.10	4.11
G2	3.79	1.95	1.26	9.23	10.96	7.91	9.06	8.84	0.32	0.99	1.75
H2	4.75	1.67	1.03	9.95	12.24	7.58	8.73	8.50	0.23	0.83	1.47
I2	2.72	2.59	1.79	8.30	9.46	8.72	9.92	9.69	0.51	1.31	2.40
J2	1.94	4.40	3.24	7.53	8.61	10.86	12.27	11.98	0.95	2.01	4.31
K2	0.88	5.71	4.40	6.27	6.60	12.18	13.65	13.35	1.43	2.68	5.69
L2	0.42	11.06	8.75	5.81	6.43	16.30	18.20	17.77	2.41	4.11	11.99
M2	1.83	5.40	4.03	7.42	8.65	11.85	13.37	13.05	1.14	2.32	5.43
N2	3.22	22.01	19.30	1.00	0.19	25.84	28.03	27.51	7.84	10.51	23.24

Anexo XIV. Energías de reorganización (λ) para los procesos TES de las especies neutras de los derivados de EDA.

	•R1	•R2	•R3	•R4	•R5	•R6	•R7	•R8	•R9	•R10	•R11
A1	9.57	11.26	11.44	27.46	14.95	21.41	21.13	21.34	22.48	22.18	10.21
B1	10.84	12.53	12.71	28.72	16.22	22.68	22.39	22.61	23.74	23.44	11.47
C1	10.78	12.47	12.65	28.67	16.16	22.62	22.34	22.55	23.69	23.39	11.42
D1	12.29	13.98	14.16	30.18	17.67	24.13	23.85	24.06	25.19	24.90	12.93
E1	11.34	13.03	13.21	29.23	16.72	23.18	22.90	23.11	24.25	23.95	11.98
F1	8.91	10.60	10.78	26.80	14.29	20.75	20.47	20.68	21.81	21.52	9.55
G1	11.41	13.10	13.28	29.30	16.79	23.25	22.97	23.18	24.31	24.02	12.05
H1	7.46	9.15	9.32	25.34	12.83	19.29	19.01	19.23	20.36	20.06	8.09
I1	8.36	10.05	10.23	26.25	13.74	20.20	19.92	20.13	21.27	20.97	9.00
J1	7.62	9.30	9.48	25.50	12.99	19.45	19.17	19.38	20.52	20.22	8.25
K1	7.35	9.04	9.21	25.23	12.72	19.18	18.90	19.12	20.25	19.95	7.98
L1	7.27	8.96	9.14	25.15	12.65	19.10	18.82	19.04	20.17	19.87	7.90
M1	8.23	9.92	10.10	26.12	13.61	20.07	19.79	20.00	21.13	20.84	8.87
N1	11.33	13.02	13.20	29.22	16.71	23.17	22.89	23.10	24.23	23.93	11.96
A2	8.60	10.29	10.47	26.48	13.98	20.44	20.15	20.37	21.50	21.20	9.23
B2	7.07	8.76	8.94	24.96	12.45	18.91	18.63	18.84	19.97	19.68	7.71
D2	10.00	11.69	11.87	27.89	15.38	21.84	21.56	21.77	22.90	22.61	10.64
E2	9.50	11.19	11.37	27.38	14.88	21.33	21.05	21.27	22.40	22.10	10.13
F2	7.83	9.52	9.70	25.72	13.21	19.67	19.39	19.60	20.73	20.44	8.47
G2	8.73	10.42	10.60	26.62	14.11	20.57	20.29	20.50	21.63	21.34	9.37
H2	7.01	8.69	8.87	24.89	12.38	18.84	18.56	18.77	19.91	19.61	7.64
I2	8.12	9.80	9.98	26.00	13.49	19.95	19.67	19.88	21.02	20.72	8.75
J2	9.33	11.01	11.19	27.21	14.70	21.16	20.88	21.09	22.23	21.93	9.96
K2	9.57	11.26	11.44	27.46	14.95	21.41	21.13	21.34	22.48	22.18	10.21
L2	9.78	11.46	11.64	27.66	15.15	21.61	21.33	21.54	22.68	22.38	10.41
M2	10.81	12.50	12.68	28.69	16.19	22.64	22.36	22.58	23.71	23.41	11.44
N2	11.58	13.27	13.45	29.47	16.96	23.42	23.14	23.35	24.49	24.19	12.22

Anexo XV. Energías de reorganización (λ) para los procesos TES de las especies aniónicas de los derivados de EDA.

	•R1	•R2	•R3	•R4	•R5	•R6	•R7	•R8	•R9	•R10	•R11
A1	5.95	7.63	7.81	23.83	11.32	17.78	17.50	17.71	18.85	18.55	6.58
B1	6.36	8.05	8.23	24.25	11.74	18.20	17.92	18.13	19.26	18.97	7.00
C1	5.73	7.42	7.59	23.61	11.10	17.56	17.28	17.50	18.63	18.33	6.36
D1	5.72	7.41	7.59	23.61	11.10	17.56	17.28	17.49	18.62	18.33	6.36
E1	6.18	7.87	8.05	24.06	11.55	18.01	17.73	17.95	19.08	18.78	6.81
F1	5.79	7.48	7.66	23.68	11.17	17.63	17.35	17.56	18.69	18.40	6.43
G1	5.93	7.62	7.80	23.82	11.31	17.77	17.49	17.70	18.84	18.54	6.57
H1	5.59	7.28	7.46	23.48	10.97	17.43	17.15	17.36	18.49	18.20	6.23
I1	6.88	8.57	8.74	24.76	12.25	18.71	18.43	18.65	19.78	19.48	7.51
J1	6.28	7.97	8.15	24.17	11.66	18.12	17.84	18.05	19.18	18.89	6.92
K1	5.75	7.44	7.62	23.64	11.13	17.59	17.31	17.52	18.65	18.36	6.39
L1	6.45	8.14	8.32	24.34	11.83	18.29	18.01	18.22	19.35	19.06	7.09
M1	5.58	7.26	7.44	23.46	10.95	17.41	17.13	17.34	18.48	18.18	6.21
N1	9.93	11.62	11.80	27.82	15.31	21.77	21.49	21.70	22.83	22.54	10.57
A2	5.36	7.05	7.23	23.25	10.74	17.20	16.92	17.13	18.27	17.97	6.00
B2	8.65	10.34	10.52	26.53	14.03	20.49	20.20	20.42	21.55	21.25	9.28
D2	9.82	11.51	11.68	27.70	15.19	21.65	21.37	21.59	22.72	22.42	10.45
E2	4.90	6.58	6.76	22.78	10.27	16.73	16.45	16.66	17.80	17.50	5.53
F2	7.46	9.15	9.33	25.35	12.84	19.30	19.02	19.23	20.36	20.07	8.10
G2	7.16	8.85	9.03	25.05	12.54	19.00	18.72	18.93	20.06	19.77	7.80
H2	6.66	8.35	8.53	24.55	12.04	18.50	18.22	18.43	19.56	19.27	7.30
I2	7.45	9.14	9.32	25.34	12.83	19.29	19.01	19.22	20.35	20.06	8.09
J2	6.21	7.90	8.08	24.09	11.59	18.05	17.76	17.98	19.11	18.81	6.84
K2	6.74	8.43	8.61	24.63	12.12	18.58	18.30	18.51	19.64	19.34	7.37
L2	4.17	5.86	6.03	22.05	9.54	16.00	15.72	15.94	17.07	16.77	4.80
M2	5.44	7.13	7.31	23.33	10.82	17.28	17.00	17.21	18.34	18.05	6.08
N2	7.63	9.32	9.50	25.52	13.01	19.47	19.19	19.40	20.53	20.24	8.27

Anexo XVI. Constantes de velocidad ($M^{-1}s^{-1}$) para los procesos TES de las especies neutras de los derivados de EDA.

	•R1	•R2	•R3	•R4	•R5	•R6	•R7	•R8	•R9	•R10	•R11
A1	1.13E+06	8.26E-11	1.28E-08	7.48E+09	7.54E+09	1.27E-12	2.15E-14	5.79E-14	1.72E+03	7.10E+00	6.03E-12
B1	3.39E+09	5.11E-03	2.14E-01	7.51E+09	7.61E+09	8.32E-07	2.86E-08	6.16E-08	2.33E+06	2.94E+04	1.80E-03
C1	3.91E+09	7.72E-03	3.18E-01	7.61E+09	7.73E+09	1.20E-06	4.16E-08	8.93E-08	2.94E+06	3.82E+04	2.75E-03
D1	8.00E+09	2.06E+06	1.82E+07	7.12E+09	7.50E+09	3.69E+01	3.27E+00	5.37E+00	4.99E+09	8.51E+08	2.26E+06
E1	4.96E+08	9.04E-05	4.44E-03	7.50E+09	7.58E+09	2.39E-08	7.37E-10	1.64E-09	2.33E+05	2.25E+03	2.73E-05
F1	7.71E+04	2.41E-13	6.24E-11	7.50E+09	7.55E+09	3.23E-14	4.32E-16	1.26E-15	2.85E+02	8.55E-01	8.24E-15
G1	3.80E+09	1.76E-02	6.26E-01	7.48E+09	7.57E+09	1.91E-06	7.17E-08	1.50E-07	2.88E+06	3.97E+04	7.32E-03
H1	1.38E+09	6.26E-07	1.00E-04	7.50E+09	7.60E+09	6.44E-09	1.24E-10	3.21E-10	9.35E+05	6.88E+03	3.87E-08
I1	3.50E+09	8.07E-05	7.22E-03	7.48E+09	7.58E+09	1.13E-07	2.76E-09	6.62E-09	2.68E+06	2.62E+04	1.13E-05
J1	5.61E+00	3.29E-21	3.76E-18	7.50E+09	7.44E+09	6.99E-19	4.96E-21	1.79E-20	1.00E+00	1.23E-03	8.51E-24
K1	3.43E-01	2.40E-23	4.09E-20	7.50E+09	7.34E+09	4.56E-20	2.76E-22	1.06E-21	2.29E-01	2.26E-04	2.83E-26
L1	7.72E-04	2.86E-27	8.35E-24	7.50E+09	6.55E+09	1.56E-22	7.36E-25	3.08E-24	6.69E-03	4.37E-06	1.16E-30
M1	7.05E+00	2.34E-20	1.86E-17	7.52E+09	7.40E+09	9.13E-19	7.20E-21	2.51E-20	7.08E-01	9.35E-04	1.24E-22
N1	6.72E+06	3.42E-08	2.62E-06	7.49E+09	7.56E+09	3.97E-11	9.36E-13	2.26E-12	5.00E+03	2.95E+01	6.42E-09
A2	1.35E+00	4.95E-21	3.73E-18	7.47E+09	7.13E+09	1.74E-19	1.35E-21	4.73E-21	1.82E-01	2.21E-04	2.99E-23
B2	1.43E+08	1.73E-09	4.71E-07	7.47E+09	7.56E+09	1.49E-10	2.27E-12	6.35E-12	1.45E+05	7.65E+02	4.75E-11
D2	7.79E+09	3.13E+01	8.33E+02	7.40E+09	7.53E+09	1.72E-03	7.84E-05	1.55E-04	2.13E+08	5.27E+06	1.63E+01
E2	2.98E+03	4.42E-15	1.20E-12	7.45E+09	7.44E+09	9.17E-16	1.14E-17	3.40E-17	2.09E+01	5.00E-02	1.46E-16
F2	1.13E+01	1.70E-20	1.62E-17	7.47E+09	7.40E+09	1.44E-18	1.09E-20	3.84E-20	1.31E+00	1.73E-03	6.28E-23
G2	1.74E+07	1.79E-09	2.90E-07	7.46E+09	7.53E+09	2.68E-11	4.69E-13	1.25E-12	1.82E+04	9.09E+01	1.19E-10
H2	7.80E+06	6.07E-12	2.46E-09	7.48E+09	7.56E+09	3.27E-12	4.14E-14	1.23E-13	1.72E+04	6.57E+01	8.75E-14
I2	5.97E+05	1.21E-12	3.66E-10	7.48E+09	7.54E+09	2.56E-13	3.38E-15	9.89E-15	1.74E+03	5.80E+00	3.11E-14
J2	1.21E-01	7.67E-22	4.92E-19	7.47E+09	6.26E+09	1.56E-20	1.23E-22	4.27E-22	2.13E-02	2.33E-05	6.48E-24
K2	1.04E-02	3.87E-23	2.65E-20	7.46E+09	4.82E+09	1.30E-21	9.64E-24	3.43E-23	3.44E-03	3.25E-06	3.00E-25
L2	1.40E-04	1.40E-25	1.17E-22	7.45E+09	1.86E+09	1.78E-23	1.16E-25	4.31E-25	1.70E-04	1.24E-07	7.80E-28
M2	7.98E-01	2.24E-19	7.04E-17	7.49E+09	5.82E+09	1.46E-19	1.52E-21	4.80E-21	2.96E-02	4.28E-05	6.42E-21
N2	3.93E+00	8.68E-18	1.90E-15	7.46E+09	5.94E+09	1.05E-18	1.29E-20	3.85E-20	6.30E-02	1.10E-04	4.32E-19

Anexo XVII. Constantes de velocidad ($M^{-1}s^{-1}$) para los procesos TES de las especies aniónicas de los derivados de EDA.

	•R1	•R2	•R3	•R4	•R5	•R6	•R7	•R8	•R9	•R10	•R11
A1	1.40E+07	7.63E+09	7.50E+09	1.41E+04	2.37E+01	1.16E+08	1.92E+07	2.71E+07	7.45E+09	7.50E+09	7.44E+09
B1	9.05E+06	7.71E+09	7.55E+09	8.69E+03	1.56E+01	2.88E+08	5.42E+07	7.42E+07	7.49E+09	7.54E+09	7.43E+09
C1	2.58E+06	7.87E+09	7.66E+09	5.76E+03	4.27E+00	1.82E+08	3.13E+07	4.37E+07	7.58E+09	7.66E+09	7.39E+09
D1	5.65E+05	7.68E+09	7.52E+09	2.40E+03	9.64E-01	3.55E+08	6.64E+07	9.12E+07	7.47E+09	7.52E+09	7.44E+09
E1	8.86E+06	7.69E+09	7.53E+09	9.41E+03	1.51E+01	2.16E+08	3.89E+07	5.38E+07	7.48E+09	7.53E+09	7.43E+09
F1	3.35E+07	7.64E+09	7.51E+09	2.62E+04	5.80E+01	5.50E+07	8.43E+06	1.21E+07	7.47E+09	7.51E+09	7.42E+09
G1	3.91E+06	7.66E+09	7.51E+09	6.51E+03	6.46E+00	2.14E+08	3.80E+07	5.28E+07	7.46E+09	7.51E+09	7.44E+09
H1	9.79E+06	7.68E+09	7.54E+09	1.38E+04	1.62E+01	7.32E+07	1.14E+07	1.63E+07	7.49E+09	7.54E+09	7.41E+09
I1	2.52E+08	7.66E+09	7.52E+09	6.70E+04	6.39E+02	9.84E+07	1.70E+07	2.36E+07	7.47E+09	7.52E+09	7.42E+09
J1	1.86E+09	7.45E+09	7.47E+09	3.97E+05	7.32E+03	7.94E+06	1.06E+06	1.57E+06	7.47E+09	7.50E+09	7.28E+09
K1	6.54E+08	7.47E+09	7.47E+09	1.94E+05	1.56E+03	7.60E+06	9.78E+05	1.46E+06	7.47E+09	7.50E+09	7.29E+09
L1	5.01E+09	7.10E+09	7.39E+09	1.44E+06	6.29E+04	2.53E+06	3.13E+05	4.72E+05	7.47E+09	7.47E+09	7.03E+09
M1	1.59E+08	7.59E+09	7.52E+09	7.81E+04	2.98E+02	1.44E+07	1.94E+06	2.87E+06	7.49E+09	7.53E+09	7.34E+09
N1	7.30E+09	5.14E-01	1.85E+01	7.46E+09	7.56E+09	5.42E-05	2.08E-06	4.34E-06	3.58E+07	6.32E+05	2.05E-01
A2	1.87E+07	7.58E+09	7.48E+09	2.30E+04	3.10E+01	3.35E+07	4.78E+06	6.98E+06	7.45E+09	7.48E+09	7.42E+09
B2	6.16E+09	7.54E+09	7.47E+09	2.23E+06	3.38E+05	2.95E+07	5.02E+06	7.00E+06	7.45E+09	7.48E+09	7.37E+09
D2	1.86E+09	7.63E+09	7.49E+09	2.32E+05	1.99E+04	7.30E+08	1.83E+08	2.36E+08	7.45E+09	7.49E+09	7.46E+09
E2	2.21E+06	7.55E+09	7.46E+09	9.33E+03	3.93E+00	3.77E+07	5.26E+06	7.73E+06	7.43E+09	7.46E+09	7.45E+09
F2	7.83E+09	2.97E+09	5.95E+09	6.32E+07	2.99E+07	9.72E+04	1.01E+04	1.60E+04	7.40E+09	7.20E+09	3.34E+09
G2	4.49E+09	7.40E+09	7.42E+09	1.06E+06	5.75E+04	9.82E+06	1.41E+06	2.05E+06	7.44E+09	7.45E+09	7.32E+09
H2	1.62E+09	7.54E+09	7.48E+09	3.18E+05	6.57E+03	1.71E+07	2.49E+06	3.62E+06	7.46E+09	7.49E+09	7.36E+09
I2	7.05E+09	6.98E+09	7.32E+09	5.14E+06	7.25E+05	2.52E+06	3.32E+05	4.93E+05	7.44E+09	7.43E+09	7.00E+09
J2	7.70E+09	2.50E+09	5.84E+09	1.87E+07	3.05E+06	6.78E+04	6.30E+03	1.03E+04	7.42E+09	7.25E+09	2.72E+09
K2	7.91E+09	3.86E+08	2.47E+09	1.54E+08	8.92E+07	7.32E+03	6.08E+02	1.02E+03	7.36E+09	6.76E+09	3.99E+08
L2	7.96E+09	4.86E+04	2.38E+06	3.30E+08	1.19E+08	6.94E+00	2.82E-01	5.82E-01	6.98E+09	3.33E+09	1.01E+04
M2	7.79E+09	6.27E+08	3.61E+09	2.25E+07	2.84E+06	1.27E+04	9.81E+02	1.68E+03	7.42E+09	7.11E+09	5.95E+08
N2	6.14E+09	4.58E-04	4.38E-02	7.43E+09	7.53E+09	7.13E-07	1.76E-08	4.21E-08	1.10E+07	1.23E+05	5.69E-05

Anexo XVIII. Constantes de velocidad totales ($M^{-1}s^{-1}$) para los procesos TES a pH fisiológico.¹⁵

	•R1	•R2	•R3	•R4	•R5	•R6	•R7	•R8	•R9	•R10	•R11
A1	1.09E+07	5.79E+09	5.69E+09	1.80E+09	1.81E+09	8.79E+07	1.46E+07	2.06E+07	5.66E+09	5.70E+09	5.66E+09
B1	1.96E+09	3.26E+09	3.19E+09	4.34E+09	4.39E+09	1.22E+08	2.29E+07	3.14E+07	3.17E+09	3.19E+09	3.14E+09
C1	1.47E+09	4.92E+09	4.79E+09	2.85E+09	2.90E+09	1.14E+08	1.95E+07	2.73E+07	4.74E+09	4.79E+09	4.62E+09
D1	3.64E+09	4.18E+09	4.11E+09	3.24E+09	3.42E+09	1.93E+08	3.61E+07	4.97E+07	6.34E+09	4.48E+09	4.05E+09
E1	2.26E+08	4.25E+09	4.17E+09	3.35E+09	3.39E+09	1.19E+08	2.15E+07	2.98E+07	4.14E+09	4.17E+09	4.11E+09
F1	2.92E+07	6.66E+09	6.55E+09	9.57E+08	9.64E+08	4.80E+07	7.36E+06	1.06E+07	6.52E+09	6.55E+09	6.47E+09
G1	1.91E+09	3.81E+09	3.74E+09	3.76E+09	3.80E+09	1.07E+08	1.89E+07	2.63E+07	3.71E+09	3.74E+09	3.70E+09
H1	2.25E+08	6.47E+09	6.35E+09	1.18E+09	1.20E+09	6.17E+07	9.59E+06	1.37E+07	6.31E+09	6.35E+09	6.24E+09
I1	1.37E+09	5.02E+09	4.93E+09	2.58E+09	2.61E+09	6.45E+07	1.11E+07	1.55E+07	4.90E+09	4.93E+09	4.87E+09
J1	1.77E+09	7.07E+09	7.08E+09	3.89E+08	3.85E+08	7.53E+06	1.01E+06	1.49E+06	7.08E+09	7.11E+09	6.90E+09
K1	6.36E+08	7.26E+09	7.27E+09	2.06E+08	2.02E+08	7.39E+06	9.51E+05	1.42E+06	7.26E+09	7.30E+09	7.09E+09
L1	4.95E+09	7.02E+09	7.30E+09	9.13E+07	7.85E+07	2.50E+06	3.09E+05	4.67E+05	7.38E+09	7.39E+09	6.94E+09
M1	1.54E+08	7.37E+09	7.30E+09	2.22E+08	2.19E+08	1.40E+07	1.88E+06	2.78E+06	7.27E+09	7.31E+09	7.12E+09
N1	7.15E+09	5.04E-01	1.81E+01	7.46E+09	7.56E+09	5.31E-05	2.04E-06	4.26E-06	3.51E+07	6.20E+05	2.01E-01
A2	1.59E+07	6.45E+09	6.37E+09	1.11E+09	1.06E+09	2.86E+07	4.07E+06	5.94E+06	6.34E+09	6.37E+09	6.32E+09
B2	5.81E+09	7.10E+09	7.03E+09	4.36E+08	4.39E+08	2.78E+07	4.73E+06	6.60E+06	7.02E+09	7.05E+09	6.94E+09
D2	1.86E+09	7.63E+09	7.49E+09	2.33E+05	2.02E+04	7.30E+08	1.83E+08	2.36E+08	7.45E+09	7.49E+09	7.46E+09
E2	1.97E+04	5.71E+07	5.64E+07	7.40E+09	7.38E+09	2.85E+05	3.98E+04	5.85E+04	5.62E+07	5.65E+07	5.64E+07
F2	7.78E+09	2.95E+09	5.92E+09	1.06E+08	7.27E+07	9.67E+04	1.01E+04	1.59E+04	7.36E+09	7.16E+09	3.32E+09
G2	4.49E+09	7.40E+09	7.42E+09	1.36E+06	3.55E+05	9.82E+06	1.41E+06	2.05E+06	7.44E+09	7.45E+09	7.32E+09
H2	1.58E+09	7.34E+09	7.29E+09	1.92E+08	1.94E+08	1.67E+07	2.43E+06	3.52E+06	7.27E+09	7.30E+09	7.17E+09
I2	6.58E+09	6.51E+09	6.83E+09	5.07E+08	5.07E+08	2.35E+06	3.10E+05	4.60E+05	6.94E+09	6.93E+09	6.53E+09
J2	7.68E+09	2.49E+09	5.83E+09	3.76E+07	1.89E+07	6.77E+04	6.29E+03	1.02E+04	7.40E+09	7.24E+09	2.71E+09
K2	7.91E+09	3.86E+08	2.47E+09	1.54E+08	8.92E+07	7.32E+03	6.08E+02	1.02E+03	7.36E+09	6.76E+09	3.99E+08
L2	7.96E+09	4.86E+04	2.38E+06	3.30E+08	1.19E+08	6.94E+00	2.82E-01	5.82E-01	6.98E+09	3.33E+09	1.01E+04
M2	7.79E+09	6.27E+08	3.61E+09	2.25E+07	2.84E+06	1.27E+04	9.81E+02	1.68E+03	7.42E+09	7.11E+09	5.95E+08
N2	6.14E+09	4.58E-04	4.38E-02	7.43E+09	7.53E+09	7.13E-07	1.76E-08	4.21E-08	1.10E+07	1.23E+05	5.69E-05

¹⁵ Teniendo en cuenta las fracciones molares de las especies neutra y aniónica.

ARTICULOS RELACIONADOS CON LA TESIS

1. Pérez-González, A.; Galano A. "OH Radical Scavenging Activity of Edaravone: Mechanism and Kinetics" *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (5), 1306–1314.
2. Pérez-González, A.; Galano A. "Ionization energies, proton affinities, and *pK*as of a large series of Edaravone derivatives: implication for their free radical scavenging activity" *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10375–10384.
3. Pérez-González, A.; Galano A. "On the Outstanding Antioxidant Capacity of Edaravone Derivatives through Single Electron Transfer Reactions" *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 1180–1188
4. Pérez-González, A.; Galano A. "On the $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{OOH}$ Scavenging Activity of 3-Methyl-1-pyridin-2-yl-5-pyrazolone: Comparisons with its Parent Compound, Edaravone" *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 3441-3448.
5. Pérez-González, A.; Galano, A. "On the Hydroperoxyl Radical Scavenging Activity of Two Edaravone Derivatives: Mechanism and Kinetics" *J. Phys. Org. Chem.* **2013**, *26*, 261-268

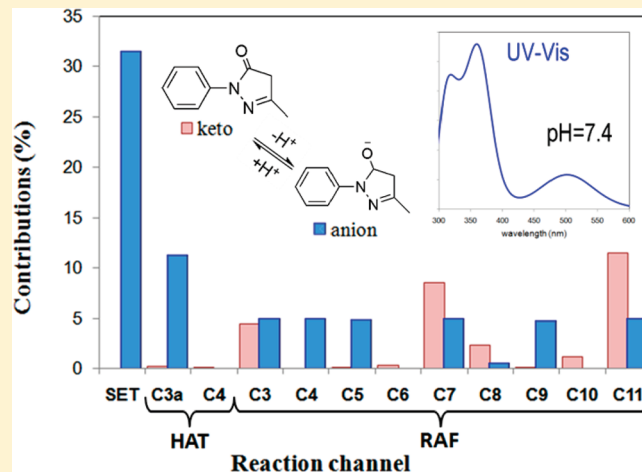
OH Radical Scavenging Activity of Edaravone: Mechanism and Kinetics

Adriana Pérez-González 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 D.F.

Supporting Information

ABSTRACT: The reactions of OH radicals with the neutral and anionic forms of Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, EDA) have been studied using Density Functional Theory. Different mechanisms and reaction sites have been considered. The overall rate constant was found to be diffusion-limited ($1.35 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, in aqueous solution), and in excellent agreement with the experimental results. Therefore, the present work supports previous evidence that EDA is an excellent $\cdot\text{OH}$ scavenger. The anionic form of EDA is predicted to react 8.6 times faster than its neutral form. The preponderant mechanism was found to be different depending on the form of EDA reacting with the radical. For the anionic form, the single electron transfer mechanism was found to be the one contributing the most to the overall reactivity toward $\cdot\text{OH}$ ($\sim 44\%$), closely followed by radical adduct formation ($\sim 40\%$). For the neutral form, the latter was found to be the main mechanism, with contributions larger than 98%, regardless of the polarity of the environment. For the global reactivity of EDA toward OH radicals, at physiological pH, the main mechanism of reaction is proposed to be the sequential electron proton transfer. A detailed analysis of the UV-vis spectra is also provided. The excellent agreement with the available experimental data supports the reliability of the new information provided in the present work.



INTRODUCTION

Oxidative stress (OS) can be defined as the imbalance between biochemical processes leading to the production of reactive oxygen species (ROS) and those responsible for their removal. It has attracted a great deal of attention in recent 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 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 oxidative stress and the consequent molecular damage.

Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, Scheme 1), also known as MCI-186, is a neuroprotective drug, recently developed in Japan, where it was the first free radical scavenger approved for treating acute stroke caused by cerebral thrombosis and embolism.⁵ Since its appearance, numerous studies have been devoted worldwide to investigate the protective effect of edaravone against OS-related diseases. For example, Yamamoto et al.⁶ have shown that repeated treatment with edaravone reduces oxidative cell damage in rat brains. Its beneficial effects

on the atherosclerotic process in patients with cardiovascular diseases have been recently reviewed by Higashi et al.⁷ Edaravone has been proven to protect against retinal damage, caused by OS, both in vitro and in vivo,⁸ and to attenuate OH radical stress in diabetic rats.⁹ It has been demonstrated that edaravone efficiently suppresses lipid peroxidation^{10,11} and oxidative DNA damage.¹⁰ It has also been proven to effectively block free radicals in the liver.¹²

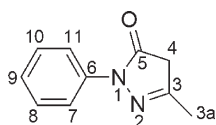
Regarding the antioxidant mechanism of edaravone, the available information is rather scarce. It has been suggested that the anionic form of edaravone is more reactive than its nonionic form.^{13,14} In the particular case of its OH radical scavenging activity, it has been reported that edaravone reacts yielding a stable oxidation product (2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid) through a radical intermediate.^{13,15} Lin et al.¹⁶ have proposed OH-adducts as the main intermediate products. They have also reported that the rate constant of the $\cdot\text{OH} + \text{edaravone}$ reaction is $8.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This value is close to the diffusion limit and 3.5 times lower than that previously

Received: October 31, 2010

Revised: December 6, 2010

Published: December 29, 2010

Scheme 1. Edaravone



reported by Abe et al.¹⁷ ($3.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). In addition, there are two theoretical studies addressing the free radical scavenging activity of EDA. Ono et al.¹⁵ studied the thermochemical feasibility of the reactions between different radicals and a model compound in which the phenyl ring of EDA was replaced by a methyl group. Wang and Zang¹⁸ studied the reaction between DPPH and the neutral form of edaravone, and concluded that the hydrogen atom transfer is preferred over the electron transfer. However, there are no previous kinetic studies that allow one to assess the contributions of different mechanisms to the overall reactivity of edaravone toward OH radicals neither on the proportion of the formed products.

Accordingly, it is the main aim of this work to systematically study different mechanisms of reactions for edaravone and its anion, and assess their contributions to the overall OH radical scavenging activity of this compound. The tested mechanisms are as follows: radical adduct formation (RAF), hydrogen atom transfer (HAT), single electron transfer (SET), sequential electron proton transfer (SEPT), and proton coupled electron transfer (PCET). Main products of reaction are also characterized and kinetic data are provided. In addition, the influence of the polarity of the environment on the edaravone's reactivity toward OH radicals has also been studied. The reliability of the results is supported by comparison with the available experimental data.

COMPUTATIONAL DETAILS

Geometry optimizations and frequency calculations have been carried out using the M05-2X functional and the 6-311++G(d,p) basis set. The M05-2X functional has been recommended for kinetic calculations by their developers,¹⁹ and it has been also successfully used by independent authors.^{20–26} Unrestricted calculations were used for open shell systems and spin contamination was checked. In all of the cases, the deviations from the expectation value ($\langle S^2 \rangle = 0.75$) were lower than 7.5% and 0.5% before and after annihilation of the first spin contaminant, respectively. 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 of the electronic calculations were performed with the Gaussian 09 package of programs.²⁷ 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 the SMD continuum model.²⁸ They have been performed using benzene and water as solvents, to mimic nonpolar and polar environments, respectively. The Gibbs free energy of reaction in solution have been obtained as the sum of the Gibbs free energy of reaction in vacuum and the solvation free energies.

The solvent cage effects have been included according to the corrections proposed by Okuno,²⁹ taking into account the free

volume theory.³⁰ These corrections are in good agreement with those independently obtained by Ardura et al.³¹ and have been successfully used by other authors.^{32–38}

The rate constants (k) were calculated using Conventional Transition State Theory (TST)^{39–41} and 1 M standard state as follows:

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

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.⁴²

Some of the calculated rate constants (k) values 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 for that purpose:⁴³

$$k_{\text{app}} = \frac{k_D k_{\text{act}}}{k_D + k_{\text{act}}} \quad (2)$$

where k_{act} is the thermal rate constant, obtained from TST calculations (eq 1), and k_D is the steady-state Smoluchowski⁴⁴ rate constant for an irreversible bimolecular diffusion-controlled reaction:

$$k_D = 4\pi R D_{AB} N_A \quad (3)$$

where R denotes the reaction distance, N_A is the Avogadro number, and D_{AB} is the mutual diffusion coefficient of the reactants A (OH radical) and B (EDA). D_{AB} has been calculated from D_A and D_B according to reference,⁴⁵ D_A and D_B have been estimated from the Stokes–Einstein approach:⁴⁶

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (4)$$

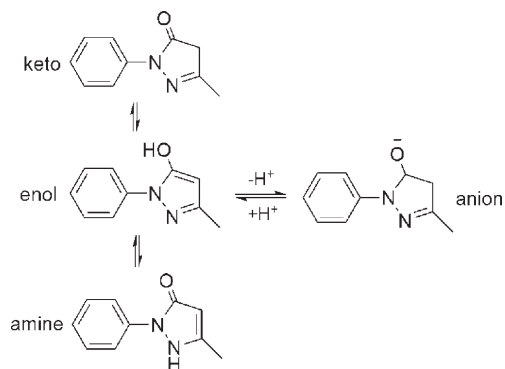
where k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, η denotes the viscosity of the solvent, in our case water ($\eta = 8.91 \times 10^{-4} \text{ Pa s}$) and benzene ($\eta = 6.04 \times 10^{-4} \text{ Pa s}$); and a is the radius of the solute ($a_{\text{OH}} = 4.79 \text{ \AA}$ and $a_{\text{EDA}} = 8.19 \text{ \AA}$).

The electronic spectra have been computed using the time dependent density functional theory (TD-DFT), based on vertical excitations involving the 3 lowest lying excited states.

RESULTS AND DISCUSSION

Three nonionic tautomeric forms of edaravone have been previously proposed.^{15,16} They are the keto, the enol, and the amino form (Scheme 2). All of them have been modeled to estimate their relative abundance. According to the calculated Gibbs free energy, in solution (Table 1) the keto form is the lowest in energy in both polar and nonpolar environments. It was found that both enol and amine forms are more than 3 and 4 kcal/mol higher in energy than the keto form, in water and benzene solutions, respectively. Their relative populations have been estimated using the Maxwell–Boltzmann distribution, and it was found that more than 97% of edaravone is in its keto form, regardless of the polarity of the environment. Therefore, this is the only nonionic form of edaravone that it is considered in the present work.

Scheme 2. Anionic and Tautomeric Forms of Edaravone

Table 1. Relative Gibbs Free Energies (ΔG_{rel} , kcal/mol) of the Tautomeric Forms of Edaravone, And Their Populations, In Percentage (P%)

form	benzene		water	
	ΔG_{rel}	P%	ΔG_{rel}	P%
keto	0.00	99.91	0.00	97.21
enol	4.93	0.02	3.67	0.20
amine	4.30	0.07	2.15	2.59

Table 2. Gibbs Free Energies of Reaction, at 298.15 K, in kcal/mol

	keto		anion
	benzene	water	water
	SET		
	78.65	9.42	-20.36
	HAT		
site 3a	-29.69	-31.20	-30.06
site 4	-37.91	-38.51	
	RAF		
site 3	-29.81	-29.19	-14.42
site 4			-5.11
site 5	-27.98	-26.89	-15.92
site 6	-8.46	-9.57	-7.70
site 7	-11.90	-11.55	-13.97
site 8	-7.30	-8.81	-8.28
site 9	-9.93	-11.40	-12.18
site 10	-6.92	-8.74	-8.45
site 11	-12.21	-12.15	-11.11

Since the anionic form of edaravone (Scheme 2) has been proposed to be more reactive than the neutral form, when acting as free radical scavenger, it has also been included in the present study. Two different values have been reported for the pK_a of edaravone: ~ 7.0 ^{7,13,14,16,47} and 8.1.⁴⁸ Any of them will lead to

Table 3. Distance (\AA) of the Forming C–O Bond in the Transition States Corresponding to the RAF Mechanism

	$d(\text{C}\cdots\text{O})$	
	keto	anion
site 3	2.203	2.150
site 4		1.807
site 5	1.979	2.025
site 6	1.993	2.049
site 7	2.026	2.082
site 8	1.996	2.032
site 9	2.036	2.295
site 10	1.995	2.022
site 11	2.016	2.039

significant population of the anionic form of EDA at physiological pH (7.4). Assuming $pK_a = 7.0$ as the correct value means that 28.5% of edaravone would be as the neutral form and 71.5% as the anionic form, while assuming $pK_a = 8.1$ would lead to 83.4% (neutral) and 16.6% (anionic). In any case, the ionic form must be considered to properly assess the antioxidant activity of edaravone. However, since most of the authors seem to agree with $pK_a = 7.0$, that will be the value used in this work. The molar fractions of EDA and its anion at different pHs, estimated using this value of pK_a , are provided as Supporting Information (Table 1S).

The mechanisms considered in this work for the OH radical scavenging activity of EDA are as follows:

radical adduct formation (RAF) : $\text{EDA} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{EDA} - \text{OH}^{\bullet}$

hydrogen atom transfer (HAT) : $\text{EDA} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{EDA}(-\text{H})^{\bullet} + \text{H}_2\text{O}$

single electron transfer (SET) : $\text{EDA} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{EDA}^{\bullet+} + \text{OH}^-$

Additionally, SET can occur rapidly followed by, or simultaneously with, proton transfer, which are known as Sequential Electron Proton Transfer (SEPT) and Proton Coupled Electron Transfer (PCET), 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 might also 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 electron transfer from the neutral form of EDA was found to be endergonic, regardless of the polarity of the environment (Table 2). Accordingly this mechanism, as well as SEPT, has been ruled out as a viable mechanism for the $\cdot\text{OH}$ scavenging activity of this species. For the anionic form of EDA, however, the SET process was found to be exergonic, and therefore it is expected to contribute to the overall reactivity of EDA toward OH radicals. All of the modeled RAF and HAT/PCET channels of reaction were also found to be thermochemically feasible for both the anionic and the neutral forms of EDA. The largest exergonicities were found for the SET reaction and for the H transfer from site 3a, for the anionic form of EDA. For the neutral

form, the largest exergonicity corresponds to H transfer from site 4, both in nonpolar and in polar environments.

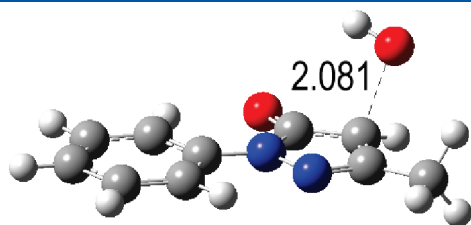


Figure 1. Optimized geometry of the reactant complex found for the RAF mechanism, channels C4 and C5 of the anion form.

Table 4. Atomic Spin Densities (ASD) and Charge (Q) Carried by the Migrating H atom, from Natural Orbital Population Analyses

	ASD (keto)		ASD (anion)		Q (keto)		Q (anion)
	benzene	water	water	benzene	water	water	
			TS-C3a				
C3	0.384	0.412	0.227				
H	-0.047	-0.040	-0.031	0.284	0.285	0.253	
O(OH)	0.685	0.647	0.757				
			TS-C3a(H)				
C3	0.249	0.257					
H	-0.042	-0.042		0.264	0.265		
O(OH)	0.773	0.765					
			TS-C4				
C4	0.269	0.281					
H	-0.050	-0.049		0.309	0.309		
O(OH)	0.751	0.733					

The C...O distance in the RAF transition states are reported in Table 3. This is the most relevant geometrical parameter in this case. All of the RAF transition states were found to be formed at a C...O distance of approximately 2 Å. For the keto form of EDA, the earliest TS is that corresponding to the $\cdot\text{OH}$ addition to site 3, suggesting this channel as the most favored one among those taking place through the RAF mechanism. For the anionic form or EDA the earliest RAF transition state is that corresponding to $\cdot\text{OH}$ addition to sites 9. These geometrical features are in line with the thermochemical results reported in Table 2. For RAF channels involving sites C4 and C5, of the anionic form of EDA, a reactant complex was found (Figure 1). This structure connects with both transition states, and is 8.05 kcal/mol lower than isolated reactants, in terms of Gibbs free energy.

Concerning H migrations, it is difficult to distinguish between PCET and HAT mechanisms, since they both lead to the same products of reaction. The PCET mechanism is commonly defined as a concerted electron proton transfer that is not HAT, and therefore HAT can be considered a particular case of PCET reactions.⁴⁹ In any case, it is important to identify if the corresponding transition state (TS) structures actually correspond to HAT or PCET mechanisms. With that purpose in mind, three different analyses have been performed. They are based on atomic spin densities (ASP) on the sites relevant to the H migration, 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 were obtained from natural population analysis (NPA) calculations and are reported in Table 4. For all of the TS structures, the spin populations were found to be 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.⁵⁰ 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.^{51,52}

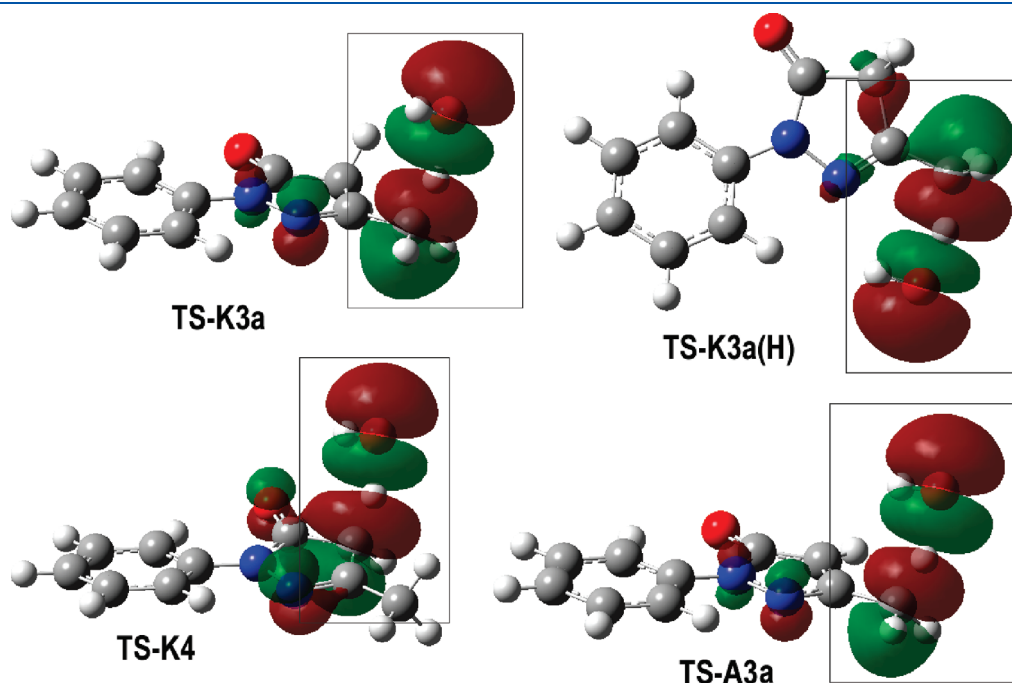


Figure 2. SOMO density surfaces of the HAT transition state structures.

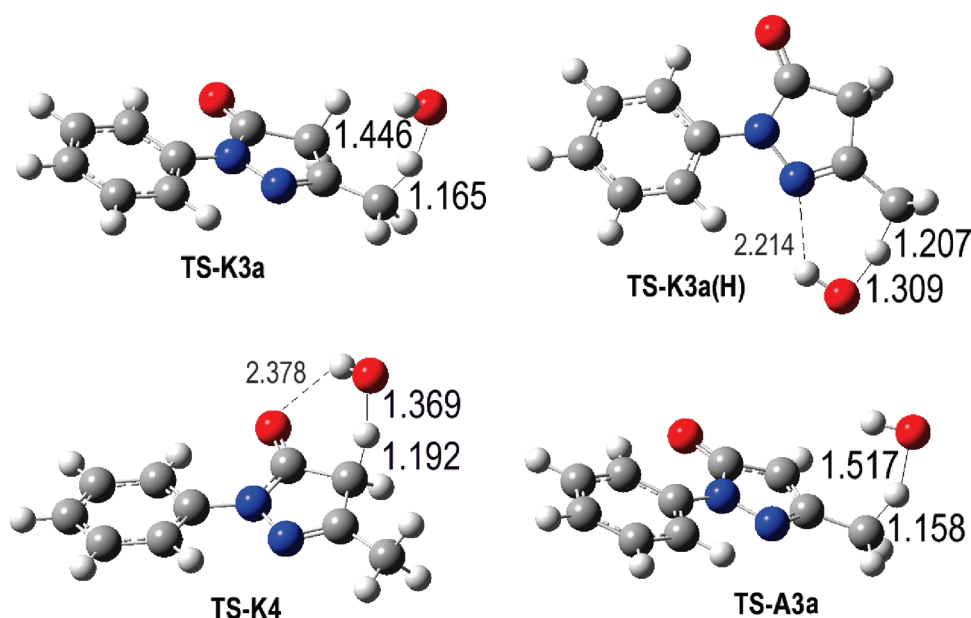


Figure 3. Optimized geometries of the transition states corresponding to HAT mechanism.

All of the Q values are about, or slightly lower than, 0.3; which is in the vicinity of those reported for other systems when reacting through the HAT mechanism.²⁶ Therefore the charge criterion also seems to support that these TSs correspond to HAT.

It is commonly accepted that when a reaction takes place through the PCET mechanism, the proton and the electron are transferred between different sets of orbitals.⁵¹ Therefore, the analysis of the singly occupied molecular orbital (SOMO) of the TS is very useful for differentiating 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). The SOMO of PCET TSs, however, involve p orbitals that are orthogonal to this vector.⁵¹ As the plots in Figure 2 show there is a node at the migrating H, in the SOMO of all the TSs associated with H transfers, and the SOMO is mostly localized on the transition vector. This is consistent with HAT transition states. Therefore, according to all analyzed criteria, the transition states involved in H migrations from EDA and its anion all correspond to the HAT mechanism, i.e., none of these channels of reaction correspond to PCET processes. Accordingly, the PCET mechanism has been ruled out.

The fully optimized geometries of the HAT transition states are shown in Figure 3. Two different TSs were located for the channel corresponding to HAT from the methyl group in neutral EDA. One of them presents an H bond like interaction between the H atom in the OH radical and N2 in EDA, with $d(\text{H}\cdots\text{N}) = 2.21$ Å. For the anionic form of EDA only one TS was located. All of the optimization attempts invariably lead to the TS conformation without H bond like interaction. The TS corresponding to HAT from C4 in neutral EDA also presents H bond like interaction, this time between the H atom in the OH radical and the O atom in EDA. The interaction distance $d(\text{H}\cdots\text{O})$ was found to be 2.38 Å.

The reaction barriers, in terms of Gibbs free energies, are reported in Table 5 for all of the studied HAT and RAF channels. Among all the HAT channels, the one with the lowest barrier corresponds to the anionic form of EDA. This suggests that this

mechanism is highly favored by the deprotonation process. For the RAF mechanism, the lowest barrier also corresponds to the anionic form, in particular to the $\cdot\text{OH}$ addition to site 3. In general, the barriers of the reactions involving the anionic form of EDA were found to be lower than those corresponding to the equivalent processes involving its neutral form, with exceptions of channels corresponding to $\cdot\text{OH}$ additions to sites 6 and 10. These results support a higher reactivity of the deprotonated form of EDA, compared to the neutral one. For the RAF mechanism of neutral EDA, the barriers are systematically lower in polar than in nonpolar environments, with the exception of the reaction on site 9. For the anionic form the nonpolar environment has not been considered since charged species are not expected to exist in a significant concentration in such media.

The rate constants for the different channels of reaction, as well as their branching ratios, are reported in Table 6, together with the overall rate coefficient. We have assumed that neither mixing nor crossover between different pathways occurs and therefore, the overall rate coefficient, measuring the rate of disappearance of OH radicals, has been calculated as follows:

$$k_{\text{overall}} = p^K k_{\text{tot}}^K + p^A k_{\text{tot}}^A \quad (5)$$

where p^K and p^A account for the fractions of the neutral and the anionic forms of EDA, respectively. The total contributions of each form (k_{tot}^K and k_{tot}^A) have been estimated by summing up the rate constants of the different reaction channels of the viable mechanisms:

$$k_{\text{tot}}^K = k_{\text{app}}^{K, \text{HAT}} + k_{\text{app}}^{K, \text{RAF}} \quad (6)$$

where

$$k_{\text{app}}^{K, \text{HAT}} = k_{\text{app}}^{K, \text{C3a}} + k_{\text{app}}^{K, \text{C4}} \quad (7)$$

$$k_{\text{app}}^{K, \text{RAF}} = k_{\text{app}}^{K, \text{C3}} + k_{\text{app}}^{K, \text{C5}} + k_{\text{app}}^{K, \text{C6}} + k_{\text{app}}^{K, \text{C7}} + k_{\text{app}}^{K, \text{C8}} + k_{\text{app}}^{K, \text{C9}} + k_{\text{app}}^{K, \text{C10}} + k_{\text{app}}^{K, \text{C11}} \quad (8)$$

Table 5. Gibbs Free Energies of Activation, at 298.15 K, in kcal/mol

	keto		anion
	benzene	water	water
	HAT		
site 3a(H)	8.27	8.56	
site 3a	8.00	8.20	3.85
site 4	8.40	10.13	
	RAF		
site 3	4.00	6.07	0.59
site 4			2.23
site 5	11.31	8.99	3.38
site 6	9.82	7.81	11.00
site 7	7.92	5.44	2.77
site 8	8.06	6.54	7.01
site 9	6.57	9.33	3.65
site 10	8.84	7.00	20.84
site 11	7.75	5.00	1.22

and

$$k_{\text{tot}}^A = k_{\text{app}}^{A, \text{SET}} + k_{\text{app}}^{A, \text{HAT}} + k_{\text{app}}^{A, \text{RAF}} \quad (9)$$

where:

$$k_{\text{app}}^{A, \text{HAT}} = k_{\text{app}}^{A, \text{C3a}} \quad (10)$$

$$k_{\text{app}}^{A, \text{RAF}} = k_{\text{app}}^{A, \text{C3}} + k_{\text{app}}^{A, \text{C4}} + k_{\text{app}}^{A, \text{C5}} + k_{\text{app}}^{A, \text{C6}} + k_{\text{app}}^{A, \text{C7}} + k_{\text{app}}^{A, \text{C8}} + k_{\text{app}}^{A, \text{C9}} + k_{\text{app}}^{A, \text{C10}} + k_{\text{app}}^{A, \text{C11}} \quad (11)$$

The branching ratios of the different reaction channels, which represent the percent of their contribution to the total reaction, have been calculated as follows:

$$\Gamma_i = \frac{k_i}{k_{\text{overall}}} \times 100 \quad (12)$$

where i represents each particular channel.

The total rate coefficient for the $\cdot\text{OH}$ reaction with anionic EDA in water solution was found to be 8.64 times faster than that of the neutral form in the same solvent. This supports what was previously proposed by Yamamoto et al.¹³ and Ohara et al.,¹⁴ i.e., that the anionic form of edaravone is more reactive than its nonionic form, when acting as antioxidant. The main mechanism was found to be different depending on the form of EDA. For the anionic form, the SET mechanism was found to be the one contributing the most to the overall reactivity toward $\cdot\text{OH}$ ($\sim 44\%$). For the neutral form, however, the main mechanism is RAF, regardless of the polarity of the environment, with contributions of 98.20% and 99.16% in benzene and water solutions, respectively. HAT contributions were then found to be only minor for neutral EDA. In contrast, the contribution of this mechanism to the total reactivity on anionic EDA is small but significant ($\sim 16\%$). The RAF mechanism represents about 40% of the total rate constant of anionic EDA.

Most of the RAF channels were found to similarly contribute to the total reactivity of anionic EDA, with contributions ranging

Table 6. Apparent Rate Constants (k) and Branching Ratios (Γ) of the Different Channels, And Overall Rate Coefficient ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), at 298 K

	rate constants			branching ratios		
	keto		anion	keto		anion
	benzene	water	water	benzene	water	water
SET			7.96×10^9			43.93
			HAT			
site 3a	2.53×10^7	1.71×10^7	2.83×10^9	1.35	0.82	15.63
site 4	8.57×10^6	4.63×10^5		0.46	0.02	
			RAF			
site 3	1.61×10^9	3.25×10^8	1.23×10^9	85.60	15.49	6.77
site 4			1.22×10^9			6.71
site 5	6.34×10^4	3.16×10^6	1.19×10^9	~ 0	0.15	6.57
site 6	7.87×10^5	2.29×10^7	1.08×10^5	0.04	1.09	~ 0
site 7	1.91×10^7	6.27×10^8	1.21×10^9	1.02	29.90	6.70
site 8	1.53×10^7	1.71×10^8	8.44×10^7	0.81	8.17	0.47
site 9	1.72×10^8	1.78×10^6	1.17×10^9	9.15	0.08	6.46
site 10	4.11×10^6	8.51×10^7	6.51×10^{-3}	0.22	4.06	~ 0
site 11	2.54×10^7	8.44×10^8	1.22×10^9	1.35	40.22	6.76
total	1.88×10^9	2.10×10^9	1.81×10^{10}			
overall		1.35×10^{10}				
exp.		8.5×10^{9b}				

^a Ref 16. ^b Ref 17.

from $\sim 6.5\%$ to $\sim 6.8\%$. The exceptions are those corresponding to additions to sites 6, 8, and 10; which were found to contribute less than 1% to the total rate coefficient. Therefore, according to the data reported in Table 6, a wide distribution of products is expected when the OH radical reacts with the EDA anion. For the neutral form, the abundance of the different products of reaction is influenced by the polarity of the environment. In nonpolar media, two main products are predicted: those corresponding to $\cdot\text{OH}$ additions to sites 3 and 9 (about 86% and 9%, respectively). In aqueous solutions, however, a wider product distribution is expected, and five products are predicted to be formed in significant proportions. They are those corresponding to additions to site 11 ($\sim 40.2\%$), site 7 ($\sim 29.9\%$), site 3 ($\sim 15.5\%$), site 8 ($\sim 8.2\%$), and site 10 ($\sim 4.1\%$).

As mentioned above, in aqueous solution at physiological pH (7.4), 28.5% of EDA would be in its neutral form and 71.5% in the anionic form. Taking this relative abundance into consideration, the weighted percent contribution of each channel of reaction has been estimated. The obtained results are plotted in Figure 4. As this figure clearly shows, the main channel of reaction, under physiological conditions, is expected to be the electron transfer from the anionic form of EDA to the OH radical. This process corresponds to the SEPT mechanism, i.e., a proton transfer followed by an electron transfer, and yields the exact same product as the H abstraction from site 4 of neutral EDA. Accordingly, this is predicted to be the most abundant radical intermediate arising from the reaction of EDA with $\cdot\text{OH}$ at physiological pH. The second most abundant products are predicted to be those arising from HAT at site 3a

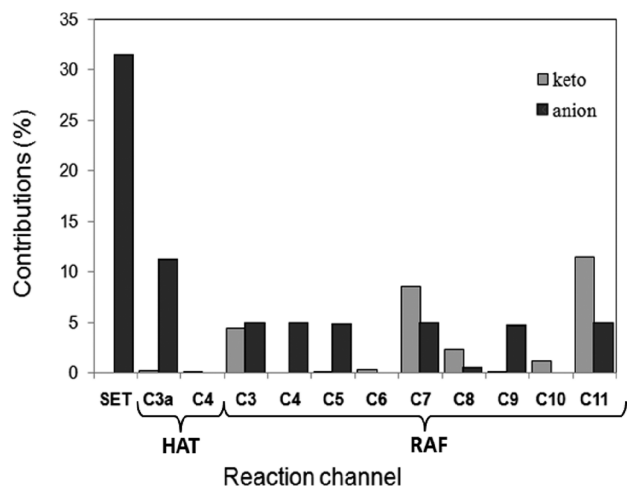


Figure 4. Percent contributions to the overall rate coefficient, at physiological pH.

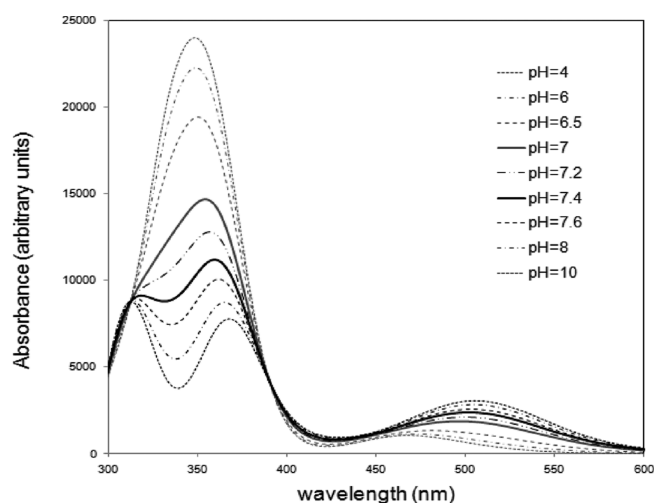


Figure 5. Calculated UV-vis spectra at different pH, taking $pK_a(\text{EDA}) = 7$.

of anionic EDA and from RAF on site 11 of neutral EDA. According to Figure 4, a wide variety of radical adducts is also expected to be formed.

The total rate constants were found to be close to the diffusion limit for all considered forms and solvents. This strongly supports that EDA is an excellent $\cdot\text{OH}$ scavenger, in agreement with the experimental evidence. The calculated overall rate constant in aqueous solution, taking into account the expected proportions of anionic and neutral EDA, according to the pK_a and the physiological pH, is in excellent agreement with experimental values previously reported. In fact, the calculated value ($1.35 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) is in between of those estimated by Lin et al.¹⁶ ($8.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and Abe et al.¹⁷ ($3.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Therefore, our value is only 1.6 times higher than that of the first one and 2.2 times lower than that of the latter one. This agreement strongly supports the reliability of the present calculations, as well as of the data reported here for the first time.

Lin et al.¹⁶ also reported the absorption spectrum of the $\text{EDA} + \cdot\text{OH}$ reaction, in aqueous solution at $\text{pH} = 7$, recorded at $1 \mu\text{s}$ after the electron pulse. They found a principal peak at

320 nm, with a shoulder at about 350 nm. The calculated spectra at different pH are shown in Figure 5. They were obtained using the additivity of absorbance, the relative abundance of the formed product, and the neutral-anionic proportion of EDA according to its pK_a (Table 1S of the Supporting Information). The absorption bands described by Lin et al.¹⁶ appear in the ranges 312–320 nm and 348–368 nm, respectively, in the calculated spectra. As the pH increases, the first one is slightly blue-shifted, while the second one is red-shifted. Even though the relative intensity of these two bands is inverted with respect to the experiment, their location is in very good agreement with the experimental results. The spectra in Figure 5 also show that while at acid pHs, the two peaks are overlapped forming a single band, as the pH increases (and therefore so does the proportion of the anionic form of EDA) the band split into two separated peaks. At $\text{pH} = 7$, which resembles the most the experimental conditions, the appearance corresponds to a band with a shoulder, just as in the experimental spectrum. At physiological pH (7.4), the separation becomes evident. An additional wide shallow band also appears in the calculated spectra, in the 468–506 nm range. It is red-shifted, and its intensity increases, as the pH becomes more basic. It arises from the formation of the $\cdot\text{OH}$ radical adduct at site 5 of the anionic form of EDA, which seems to be a logical radical intermediate to the oxidation product proposed in refs 13 and 15.

The separated contributions to the overall UV-vis spectra, at physiological pH, are shown in Figure 1S of the Supporting Information, together with those of the neutral and anionic forms of edaravone. Only the more abundant products have been included, and their spectra have been weighted according to their abundance. Contributions to the overall spectrum, arising from any excess of EDA and its anion, that might have not reacted, have been ruled out. These two species were found to absorb at wavelengths outside the region of interest. The nonionic form has its maximum absorption at 223 nm, in aqueous solution. This value is in good agreement with that reported by Chapkanov et al.⁵³ in ethanol (244 nm). The shape of the band is also similar, showing a subtle shoulder at the right of the maximum. The agreement between the experimental and calculated UV spectrum of EDA, supports the reliability of the other spectra reported in the present work. The λ_{max} of the product formed by single electron transfer from the EDA anion has been previously proposed to be around 350 nm.¹⁶ The value obtained from our calculations is 365 nm, also in good agreement with the experiment. We could not find any experimental data on the UV spectrum of the other studied species. The calculated λ_{max} of anionic EDA was found to be 262 nm, i.e., red-shifted by about 40 nm with respect to the neutral EDA.

Two spectra were found to be the major contributors to the band in the 312–320 nm range. They are those corresponding to H abstractions from the methyl group in the anionic EDA ($\lambda_{\text{max}} = 312 \text{ nm}$), and to $\cdot\text{OH}$ additions on site 3 of the nonionic EDA ($\lambda_{\text{max}} = 306 \text{ nm}$). A smaller contribution was also found from the radical adduct formed by RAF at site 7 of neutral EDA ($\lambda = 330 \text{ nm}$), which also contributes to the band in the 348–368 nm region ($\lambda = 360 \text{ nm}$). Several products of reaction seem to contribute to this band. They are those formed from RAF on site 11 of both forms of EDA ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ for neutral EDA and 369 nm for its anion), from RAF on site 7 of anionic EDA ($\lambda = 367 \text{ nm}$), and from SET involving the anionic form of EDA ($\lambda = 365 \text{ nm}$).

CONCLUSIONS

The reactions of OH radicals with the neutral and anionic forms of EDA have been studied considering different mechanisms and reaction sites. The SET mechanism was ruled out for neutral EDA, as well as the PCET for both the neutral and the anionic forms. The overall rate coefficient was found to be diffusion-limited and equal to $1.35 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, in aqueous solution. This value is in excellent agreement with, and in between, the two available experimental results. Therefore, the present work supports previous evidence that EDA is an excellent $\cdot\text{OH}$ scavenger. The anionic form of EDA is predicted to react 8.6 times faster than its neutral form. The preponderant mechanism was found to be different depending on the form of EDA reacting with $\cdot\text{OH}$. For the anionic form, the SET mechanism was found to be the one contributing the most to the overall reactivity toward $\cdot\text{OH}$ ($\sim 44\%$), closely followed by RAF ($\sim 40\%$). For the neutral form, the latter was found to be the main mechanism, with contributions larger than 98%, regardless of the polarity of the environment. Therefore, for the global reactivity of EDA toward OH radicals, at physiological pH, the main mechanism of reaction is SEPT, i.e., a proton transfer followed by an electron transfer. A wide distribution of products is predicted for the $\cdot\text{OH}$ reaction with the EDA anion. For the neutral form, the abundance of the different products of reaction is influenced by the polarity of the environment. The excellent agreement with the available experimental data supports the reliability of the new information provided in the present work.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Molar fractions of EDA and its anion at different pHs, estimated using $\text{p}K_{\text{a}}(\text{EDA}) = 7$. UV–vis spectra of the neutral (EDA) and anionic (EDAAN) forms of edaravone, and of the more abundant products yielded by their reactions with $\cdot\text{OH}$. This material is available free of charge via Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* E-mail: agalano@prodigy.net.mx.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo at UAM–Iztapalapa for the access to its computer facilities. A.P.-G. 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.; Takkinen, H.; Aromaa, A.; Heliövaara, 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) Riemersma, R. A.; Wood, D. A.; Macityre, C. C. A.; Elton, R. A.; Gey, K. F.; Oliver, M. F. *Lancet* **1991**, *337*, 1. (b) Salonen, J. T.; Nyssöner, K.; Korpela, H.; Tuomilehto, J.; Seppänen, 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.; Sevastian, 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) Watanabe, T.; Tahara, M.; Todo, S. *Cardiovasc. Ther.* **2008**, *26*, 101.
- (6) Yamamoto, Y.; Yanagisawa, M.; Tak, N. W.; Watanabe, K.; Takahashi, C.; Fujisawa, A.; Kashiba, M.; Tanaka, M. *Redox Rep.* **2009**, *14*, 251.
- (7) Higashi, Y.; Jitsuikida, D.; Chayamab, K.; Yoshizumia, M. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discovery* **2006**, *1*, 85.
- (8) Inokuchi, Y.; Imai, S.; Nakajima, Y.; Shimazawa, M.; Aihara, M.; Araie, M.; Hara, H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *329*, 687.
- (9) (a) Saini, A. K.; Patel, R. J.; Sharma, S. S.; Kumar, A. *Pharmacol. Res.* **2006**, *54*, 6. (b) Saini, A. K.; Kumar, A.; Sharma, S. S. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *568*, 164.
- (10) Zhang, N.; Komine-Kobayashi, M.; Tanaka, R.; Liu, M.; Mizuno, Y.; Urabe, T. *Stroke* **2005**, *36*, 2220.
- (11) Noora, J. I.; Uedab, Y.; Ikeda, T.; Ikenoue, T. *Neurosci. Lett.* **2007**, *414*, 5.
- (12) Kono, H.; Woods, C. G.; Maki, A.; Connor, H. D.; Mason, R. P.; Rusyn, I.; Fujii, H. *Free Radical Res.* **2006**, *40*, 579.
- (13) Yamamoto, Y.; Kuwahara, T.; Watanabe, K.; Watanabe, K. *Redox Rep.* **1996**, *2*, 333.
- (14) Ohara, K.; Fujii, A.; Ichimura, Y.; Sato, K.; Mukai, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*, 421.
- (15) Ono, S.; Okazaki, K.; Sakurai, M.; Inoue, Y. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3769.
- (16) Lin, M.; Katsumura, Y.; Hata, K.; Muroya, Y.; Nakagawa, K. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2007**, *89*, 36.
- (17) Abe, S.; Kirima, K.; Tsuchiya, K.; Okamoto, M.; Hasegawa, T.; Houchi, H.; Yoshizumi, M.; Tamaki, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 186.
- (18) Wang, L. F.; Zhang, H. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3789.
- (19) Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364.
- (20) Zavala-Oseguera, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Merino, G.; Galano, A. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13913.
- (21) Velez, E.; Quijano, J.; Notario, R.; Pabón, E.; Murillo, J.; Leal, J.; Zapata, E.; Alarcón, G. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 971.
- (22) Vega-Rodríguez, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7649.
- (23) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5114.
- (24) Black, G.; Simmie, J. M. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1236.
- (25) Furuncuoglu, T.; Ugur, I.; Degirmenci, I.; Aviyente, V. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1823.
- (26) Galano, A.; Macías-Ruvalcaba, N. A.; Campos, O. N. M.; Pedraza-Chaverri, J. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6625.
- (27) 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., Fox, D. J., *Gaussian 09, Revision A.08*; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2009.

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

(29) Okuno, Y. *Chem.—Eur. J.* **1997**, *3*, 210.

(30) Benson, S. W. *The Foundations of Chemical Kinetics*; Krieger: Malabar, FL, 1982.

(31) Ardura, D.; Lopez, R.; Sordo, T. L. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23618.

(32) Alvarez-Idaboy, J. R.; Reyes, L.; Cruz, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1763.

(33) Alvarez-Idaboy, J. R.; Reyes, L.; Mora-Diez, N. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3682.

(34) Galano, A. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1677.

(35) Galano, A. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 8922.

(36) Galano, A.; Cruz-Torres, A. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 732.

(37) Galano, A.; Francisco-Márquez, M. *Chem. Phys.* **2008**, *345*, 87.

(38) Mora-Diez, N.; Keller, S.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3682.

(39) Eyring, H. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107.

(40) Evans, M. G.; Polanyi, M. *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 875.

(41) Truhlar, D. G.; Hase, W. L.; Hynes, J. T. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664.

(42) Eckart, C. *Phys. Rev.* **1930**, *35*, 1303.

(43) Collins, F. C.; Kimball, G. E. *J. Colloid Sci.* **1949**, *4*, 425.

(44) Smoluchowski, M. *Z. Phys. Chem.* **1917**, *92*, 129.

(45) Truhlar, D. G. *J. Chem. Educ.* **1985**, *62*, 104.

(46) (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).

(47) Chegaev, K.; Cena, C.; Giorgis, M.; Rolando, B.; Tosco, P.; Bertinaria, M.; Fruttero, R.; Carrupt, P. A.; Gasco, A. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 574.

(48) Masoud, M. S.; Abd El Zaher, M.; Ahmed, R. H.; Abd El Moneim, N. H. *Molecules* **2003**, *8*, 430.

(49) Mayer, J. M. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2004**, *55*, 363.

(50) Olivella, S.; Anglada, J. M.; Solý, A.; Bofill, J. M. *Chem.—Eur. J.* **2004**, *10*, 3404.

(51) Mayer, J. M.; Hrovat, D. A.; Thomas, J. L.; Borden, W. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11142.

(52) Turecek, F.; Syrstad, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3353.

(53) Chapkanov, A. G.; Koleva, B. B.; Arnaudov, M. G.; Petkov, I. K. *Chem. Papers* **2008**, *62*, 294.

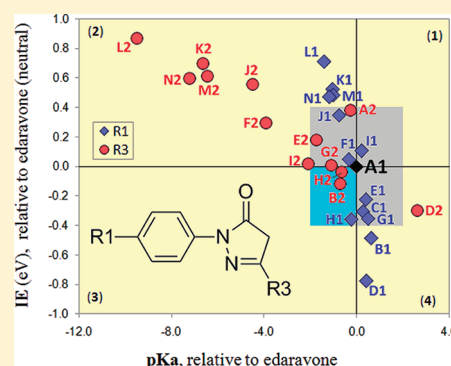
Ionization Energies, Proton Affinities, and pK_a Values of a Large Series of Edaravone Derivatives: Implication for Their Free Radical Scavenging Activity

Adriana Pérez-González 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 D. F.

Supporting Information

ABSTRACT: The electron-donating capability (EDC) and the ease of deprotonation (ED) of 26 edaravone derivatives have been evaluated. Their first ionization energies have been used to assess their EDC. Four different approaches to obtain vertical ionization energies were tested, using a set of structurally related compounds. Those based on the electron propagator theory (EPT) were identified as the best ones. In particular, the partial third order (P3) approximation led to the lowest mean unsigned error (MUE = 0.10 eV). Two descriptors were used to evaluate ED: the proton affinity (PA) and the pK_a . It was found that pK_a values are better descriptors than PA values. Ideal candidates to perform as efficiently as, or even better than, edaravone itself are proposed. The recommendations were based on the simultaneous analyses of EDC and ED, and they should be particularly valid when the electron transfer mechanism plays an important role in the antioxidant activity of the studied compounds.



INTRODUCTION

Edaravone (EDA, 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, Scheme 1), also known as MCI-186, is a neuroprotective drug developed in Japan, where it was approved for treating acute stroke caused by cerebral thrombosis and embolism.¹ Its beneficial effects have been attributed to its free radical scavenging ability^{2–6} because it has been reported to be very reactive toward reactive oxidative species (ROS) such as hydroxyl^{4,6} and peroxy radicals. This high reactivity toward ROS has drawn attention to the potential use of this compound as a radioprotector.^{7,8} It has been shown that repeated treatment with edaravone reduces oxidative cell damage in rat brains.⁹ Its beneficial effects on the atherosclerotic process in patients with cardiovascular diseases have been reviewed.¹⁰ Edaravone has been proven to protect against retinal damage caused by oxidative stress, both *in vitro* and *in vivo*,¹¹ and to attenuate OH radical stress in diabetic rats.^{12,13} It has been demonstrated that edaravone efficiently suppresses lipid peroxidation^{14,15} and oxidative DNA damage.¹⁴ It has also been proven to effectively block free radicals in the liver.¹⁶

Accordingly, the increasing interest in the synthesis of edaravone derivatives designed to potentiate the free radical scavenger activity of this compound is not surprising. Moreover, it has been reported that edaravone derivatives, obtained by the functionalization of the pyrazol-5-one ring (Scheme 1), offer a wide variety of synthetic and pharmacological possibilities. For example, some of them have been proven to have excellent antiviral activity,^{17,18} to inhibit the

agent of tuberculosis,¹⁹ to act as antitumor agents,^{20,21} and to be helpful for the medical treatment of cancer and related diseases.²²

Nakagawa et al.⁵ synthesized a large series of edaravone derivatives with substituents of different natures (electron-withdrawing groups, electron-donating groups, and π -conjugated groups) at sites 1, 3, and 4 of the pyrazolone ring (Scheme 1). They found one derivative (R1 = 2-pyridinyl, R3 = CH₃, R4 = H) with better antioxidant activity than that of edaravone when reacting with OH by the single electron transfer mechanism (SET) in aqueous solution. They also proposed that there are two factors influencing such activity: the oxidation potential and the amount of the anionic form. This is in line with other reports proposing that the anionic form has higher antioxidant activity than the neutral form of edaravone when reacting with free radicals through SET in polar media.^{2,4,23} Chegaev et al.²⁴ obtained a series of edaravone derivatives with NO-donor moieties and found them to have high antioxidant powers and NO-dependent vasodilator properties. They proposed that the antioxidant activity is mainly modulated by lipophilicity.

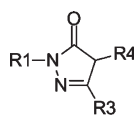
However, to our best knowledge, there are no previous reports on the ionization energies of the edaravone derivatives. For edaravone itself, there is one experimental value of ionization energy (IE) previously reported, 8.00 eV.²⁵ There is also a

Received: May 20, 2011

Revised: July 27, 2011

Published: July 28, 2011

Scheme 1. Pyrazol-5-one Ring, Edaravone: R1= Ph, R3 = CH₃, and R4 = H



theoretical estimation,²⁶ but it is 0.86 eV larger than the experimental value. Because the SET seems to play an important role in the antioxidant activity of this family of compounds, with the electron transfer taking place from the edaravone derivatives to the free radicals, the IE values become important magnitudes to characterize their reactivity. Therefore, it is one of the main goals of the present work to propose reliable IE values for the neutral and anionic forms of a large series of edaravone derivatives, functionalized with groups of various natures. To that purpose, the accuracy of four different approaches has been tested against the experimental values of vertical IE using a reference set of molecules that are structurally similar to edaravone derivatives and for which there is experimental data available.

There is also a lack of information on the proton affinities and pK_a values of edaravone derivatives. Because they are key descriptors to evaluate the ease of deprotonation and, therefore, the fraction of the anionic form (fa), it is another of the main goals of the present work to estimate their proton affinity (PA) and pK_a values, as well as the fa.

COMPUTATIONAL DETAILS

All the electronic calculations have been carried out with the Gaussian 09 package of programs,²⁷ using the M05-2X functional²⁸ and the 6-311++G(d,p) basis set. The reliability of this functional has been extensively proven.^{29–37} Full geometry optimizations, without any symmetry constraints, and frequency calculations were performed for all the species, and local minima were identified by the absence of imaginary frequencies. For ionization energies and proton affinities, all the calculations were performed in vacuum. For the estimations of pK_a values, all the calculations were carried out in solution, using the solvent model density (SMD) continuum model³⁸ and water as solvent. In this model, the full solute electron density is used without defining partial atomic charges, and the solvent is not represented explicitly but by a dielectric medium with surface tension at the solute–solvent boundary. SMD is considered a universal solvation model because of its applicability to any charged or uncharged solute in any solvent or liquid medium for which a few key descriptors are known. More details on this model can be found elsewhere.³⁸

Four different approaches have been used to estimate the electron detachment energies (vertical ionization energies) of the studied compounds. They are referred to as the following: electronic, Perdew–Levy, OVGf, and P3.

Electronic. The geometry relaxation of the (*N* – 1)-electron species after the electron transfer is ignored and the ionization energies are calculated as

$$IE^E = E_{N-1}(g_N) - E_N(g_N) \quad (1)$$

where $E_N(g_N)$ is the energy of the *N*-electron system calculated at the geometry g_N and $E_{N-1}(g_N)$ is the energy of the (*N* – 1) electron system calculated at the geometry g_N .

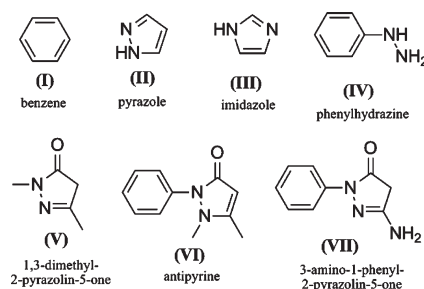


Figure 1. Set of reference molecules.

Perdew–Levy. This is the analogue to Koopman's theorem approximation³⁹ for the DFT framework and represents a particular case of vertical IE. Perdew et al.^{40,41} demonstrated that, in exact DFT, the ionization energy is

$$IE^{P-L} = -E_{\text{HOMO}}(g_N) \quad (2)$$

where $E_{\text{HOMO}}(g_N)$ represents the energy of the highest occupied molecular orbital (HOMO) of the *N*-electron system, from which an electron is removed.

OVGF and P3. The outer valence Green's function (OVGF)⁴² and the partial third order (P3)⁴³ approximations are electron propagator theory (EPT)^{42,44–46}-based methods. They are based on the Dyson equation,^{45,47} which can be written as one-electron equations, such as

$$[F + \sum(\epsilon_i)]\phi_i^{\text{Dyson}} = \epsilon_i\phi_i^{\text{Dyson}} \quad (3)$$

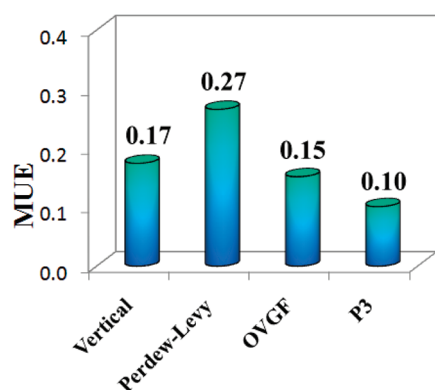
where F is the one-electron Hartree–Fock (HF) operator; ϕ_p^{Dyson} are the eigenfunctions of these equations, that is, the Dyson orbitals, which may be interpreted as an overlap function between the *N* and (*N* ± 1) states; and ϵ_i are the eigenvalues, which correspond to the electron binding energies of the molecular system. The $\sum(\epsilon_i)$ operator in eq 3 includes electron correlation and orbital relaxation effects that are neglected by the HF operator.

The pole strength (PS) is the norm of the Dyson orbital corresponding to a given electron binding energy, and its values range from 0 to 1. It is commonly used to diagnose the validity of the electron attachment and detachment energies obtained from OVGf and P3 calculations. These approximations remain valid only if the PS values are greater than 0.80–0.85.^{48–50} For all the results presented here, the PS values were found to be larger than 0.87, which validates the use of these methods (Tables 2S and 5S in the Supporting Information).

The EPT-based methods provide electron binding energies for ionizations from any orbital from a single calculation, and they permit systematic improvements in incorporation of correlation and relaxation effects.⁵⁰ For these reasons, they have emerged as an economic, efficient, and reliable tool for the direct computation of vertical ionization energies from a single calculation.⁴⁷ These methods provide a foundation for the efficient and accurate evaluation of ionization energies and electron affinities of large molecules⁵¹ and have been successfully used for predicting the electron binding energies of a large variety of chemical systems,^{52–56} ranging from diatomic molecules to nucleotides^{57,58} and substituted porphyrins.^{59,60} Moreover, EPT calculations have been proven to be capable of predicting ionization energies with average errors smaller than 0.25 eV with respect to the experiments.^{61,62}

Table 1. Signed Errors, from Calculations with Different Approaches, and Experimental Values of the First IE (eV) of the Reference Molecules

molecule	approach				exptl
	electronic	Perdew–Levy	OVGf	P3	
EDA	0.08	0.16	−0.24	0.01	8.00 ²⁵
I	0.16	−0.05	−0.08	0.04	9.24 ⁶⁴
II	0.50	0.34	0.20	0.32	9.15 ⁶⁵
III	0.21	−0.07	−0.01	0.08	8.87 ⁶⁶
IV	−0.01	0.06	−0.30	−0.09	7.86 ⁶⁷
V	0.16	0.68	−0.14	0.01	8.65 ²⁵
VI	0.19	0.55	0.01	0.24	7.86 ²⁵
VII	0.07	0.23	−0.23	0.02	7.70 ²⁵

**Figure 2.** Mean unsigned errors (MUE) obtained from different approaches for the first IE of the reference set of molecules.

RESULTS AND DISCUSSION

Choosing the Best Approach. Because one of the main goals of this work is to accurately predict the ionization energies of edaravone derivatives, the first part of this investigation was focused on testing the accuracy of different approaches. To that purpose, edaravone and a reference set of molecules, which are structurally similar to the edaravone derivatives, were used (Figure 1). The calculated vertical ionization energies obtained when using the electronic, Perdew–Levy, OVGf, and P3 approaches are provided in the Supporting Information (Table 1S). The pole strengths for the OVGf and P3 calculations are also provided in the Supporting Information (Table 2S). The experimental values available for the reference set of molecules and the signed errors, calculated with respect to them, for all the tested approaches are reported in Table 1.

The maximum absolute errors (MAE), within the Perdew–Levy and electronic approaches, were obtained for molecules V (0.68 eV) and II (0.50 eV). For the EPT-based methods, the maximum absolute errors were found to be significantly lower. For the P3 approach, MAE = 0.32 eV, which corresponds to the IE of molecule II; and for the OVGf approach, the MAE = 0.30 eV, which corresponds to molecule IV. For EDA, any of the used approaches led to errors that are significantly lower than the only previous theoretical estimation (7.14 eV).²⁶ In particular, the P3 value is in excellent agreement with the experimental value.

Table 2. Edaravone Derivatives Studied in This Work

species	R1	R3	species	R1	R3
A1	Ph–	–CH ₃	A2	2–pyridinyl–	–CH ₃
B1	<i>p</i> -OCH ₃ –Ph–	–CH ₃	B2	Ph–	–OCH ₃
C1	<i>p</i> -O(CH ₂) ₃ ONO ₂ –Ph–	–CH ₃			
D1	<i>p</i> -NH ₂ –Ph–	–CH ₃	D2	Ph–	–NH ₂
E1	<i>p</i> -CH ₃ –Ph–	–CH ₃	E2	Ph–	–H
F1	<i>p</i> -Cl–Ph–	–CH ₃	F2	Ph–	–Cl
G1	<i>p</i> -OH–Ph–	–CH ₃	G2	Ph–	–OH
H1	<i>p</i> -CH=CH ₂ –Ph–	–CH ₃	H2	Ph–	–CH=CH ₂
I1	<i>p</i> -SH–Ph–	–CH ₃	I2	Ph–	–SH
J1	<i>p</i> -CHO–Ph–	–CH ₃	J2	Ph–	–CHO
K1	<i>p</i> -CN–Ph–	–CH ₃	K2	Ph–	–CN
L1	<i>p</i> -NO ₂ –Ph–	–CH ₃	L2	Ph–	–NO ₂
M1	<i>p</i> -CF ₃ –Ph–	–CH ₃	M2	Ph–	–CF ₃
N1	<i>p</i> -NO–Ph–	–CH ₃	N2	Ph–	–NO

Table 3. Hammett Sigma Constants (σ) of the Groups Used To Construct the Edaravone Derivatives

group	σ^a	group	σ^a
H	0	SH	0.15
NH ₂	−0.66	Cl	0.23
O(CH ₂) ₃ ONO ₂	NA	CHO	0.42
OH	−0.37	CF ₃	0.54
OCH ₃	−0.27	CN	0.66
CH ₃	−0.17	NO ₂	0.78
CH=CH ₂	−0.04	NO	0.91

^a From ref 70.

The mean unsigned errors (MUE) arising from the calculations of the first vertical IE of the reference molecules with the tested approaches are plotted in Figure 2. All the obtained MUEs are lower than 0.3 eV. The Perdew–Levy approach yielded the largest average error (MUE = 0.27 eV), and the P3 approach yielded the smallest one (MUE = 0.10 eV), followed by the OVGf approach (MUE = 0.15 eV). This is in line with previous studies on the relative performance of these two EPT-based methods, which reported that the mean absolute errors of P3 calculations are to some extent lower than those arising from OVGf calculations, for small organic molecules.^{43,63}

On the basis of the better performance of the EPT-based methods, with respect to the other tested approaches, they have been selected for estimating the electron detachment energies of the edaravone derivatives.

First Ionization Energies of Edaravone Derivatives. Even though three nonionic tautomeric forms of edaravone, the keto, the enol, and the amino forms, have been previously proposed,^{6,68} it has been estimated that more than 97% of neutral edaravone is in the keto form, regardless of the polarity of the environment.²³ Therefore, this is the only nonionic form that is considered for EDA and its derivatives in the present work. However, because the anionic form has been proposed to have higher antioxidant activity than the neutral one and, on the basis of pK_a considerations,²³ it is expected to exist to a significant extent at a physiological pH, the electron detachment energies of the anions have also been estimated.

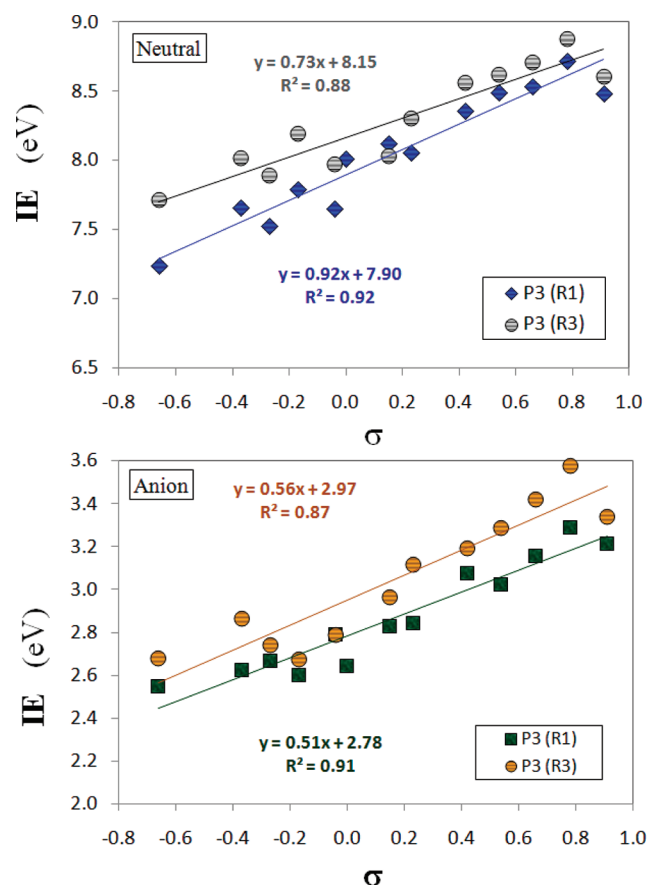


Figure 3. Relationship between the first ionization energies and the Hammett sigma constants (σ).

Table 4. First Ionization Energies (eV) of Edaravone Derivatives

species	neutral		anion		species	neutral		anion	
	OVGF	P3	OVGF	P3		OVGF	P3	OVGF	P3
A1	7.76	8.01	2.47	2.64	A2	8.07	8.34	2.33	2.49
B1	7.27	7.53	2.50	2.67	B2	7.64	7.90	2.57	2.75
C1	7.43	7.71	2.65	2.82					
D1	6.99	7.24	2.37	2.55	D2	7.47	7.72	2.52	2.68
E1	7.53	7.79	2.43	2.60	E2	7.93	8.19	2.48	2.68
F1	7.75	8.06	2.66	2.85	F2	8.01	8.31	2.86	3.12
G1	7.38	7.66	2.44	2.63	G2	7.75	8.02	2.67	2.87
H1	7.39	7.65	2.61	2.79	H2	7.71	7.98	2.60	2.79
I1	7.82	8.12	2.65	2.83	I2	7.75	8.03	2.74	2.97
J1	8.00	8.36	2.88	3.08	J2	8.23	8.57	2.89	3.19
K1	8.14	8.53	2.95	3.16	K2	8.37	8.71	3.09	3.42
L1	8.27	8.72	3.07	3.29	L2	8.50	8.88	3.17	3.58
M1	8.15	8.49	2.84	3.03	M2	8.31	8.62	2.98	3.29
N1	8.12	8.48	3.02	3.21	N2	8.30	8.61	3.03	3.34

The edaravone derivatives studied in this work are presented in Table 2. They have been constructed by replacement of the R1 (series 1) and R3 (series 2) moieties of edaravone (A1) with several groups. The substitute groups have different chemical natures, as is reflected by their Hammett sigma constants

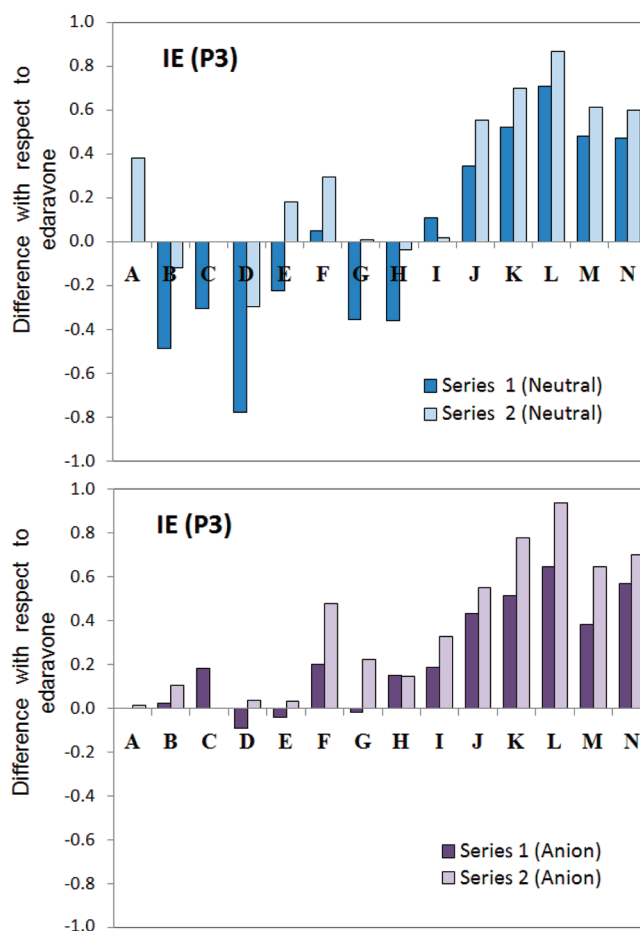


Figure 4. Difference in the first ionization energies (eV) of edaravone derivatives relative to that of edaravone.

(σ)⁶⁹(Table 3). Their σ values range from -0.66 for the $-\text{NH}_2$ group to 0.91 for $-\text{NO}$. In addition, the A2 and C1 derivatives have been included because they have been already synthesized.^{5,24} Both of them are proposed to have higher antioxidant activity than edaravone.^{5,24}

The ionization energies of the studied compounds are expected to be influenced by the presence of the substituents, in accordance with their electronic effect. As the electron withdrawing power of the group increases, the ionization energies are expected to decrease, while, as the electron-donor power increases, the ionization energies are expected to increase. The studied compounds follow this trend for substitutions at both the R1 and the R3 sites. This is shown in Figure 3, where the relationship between the first IE and the Hammett sigma constant is presented. Another regularity that arises from the analysis of the results presented in Table 4 is that the first ionization energies of the edaravone derivatives modified in site R1 are systematically lower than those of the derivatives modified with the same substituent in site R3. This trend appears for both the neutral and the ionic forms of the studied compounds and occurs regardless of the electronic nature of the substituent group. The only exceptions to this trend are as follows: structures I in the neutral form ($\text{IE}(\text{I1}) > \text{IE}(\text{I2})$) and structures H in the anionic form ($\text{IE}(\text{H1}) \approx \text{IE}(\text{H2})$). The IE values obtained within the EPT approaches are presented in Table 4, and the corresponding PS values are reported in Table S5 in the Supporting

Table 5. Proton Affinities (in kcal/mol) of the Edaravone Derivative Anions

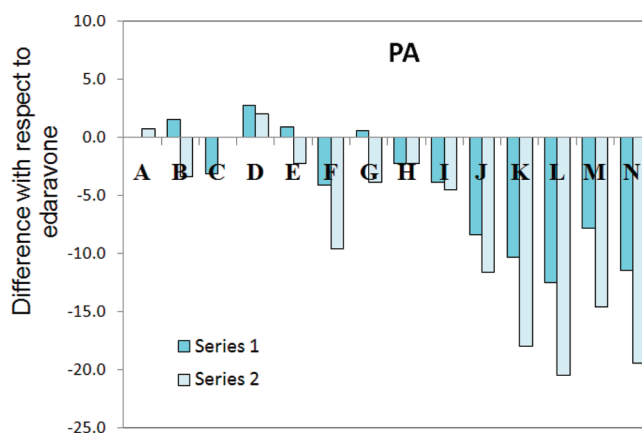
species	PA	species	PA
A1	332.03	A2	332.73
B1	333.52	B2	328.66
C1	328.90		
D1	334.80	D2	334.02
E1	332.93	E2	329.73
F1	327.91	F2	322.43
G1	332.55	G2	328.15
H1	329.74	H2	329.77
I1	328.15	I2	327.53
J1	323.63	J2	320.44
K1	321.72	K2	314.06
L1	319.53	L2	311.51
M1	324.22	M2	317.46
N1	320.58	N2	312.60

Information. The values obtained with the other approaches are also reported in the Supporting Information (Tables 3S and 4S).

To analyze in more detail the electron donating capability of the edaravone derivative, with respect to the parent molecule, the differences in the first ionization energies relative to that of edaravone have been plotted in Figure 4. In general, the effect of the substituent is in the same direction, regardless of the substitution site (R1 or R3). The only exceptions for the neutral forms of the derivatives are structures E and G. The first ionization energy of G1 is significantly lower than that of edaravone (0.36 eV), while the first ionization of G2 is practically the same as that of edaravone (higher by 0.01 eV). Therefore, when the substituent is the $-OH$ moiety, its influence on the IE values is substantial when the substitution takes place in the phenyl ring, but its influence is negligible when the substitution takes place in the pyrazolin ring. For structures E1 and E2, the analysis is different. Because E1 has a methyl group in the phenyl ring and another one in the pyrazolin ring, it has an extra methyl group as compared to edaravone (R1). On the other hand, E2 has one fewer methyl group than edaravone. Because this group has an electron-donating character, the IE value of E1 is lower than that of edaravone, while the IE value of E2 is higher than that of edaravone. The exceptions for the anionic forms are structures D, E, and G. The IE of D1 is moderately lower than that of EDA (~ 0.1 eV), while the IE of D2 is very similar to that of edaravone, though slightly higher (0.04 eV). The effect of the substituent on the IE values of E1 and E2 is almost negligible, but the values are of opposite signs. For the G structures, the substitution in R1 leaves the IE almost unchanged, while the IE of R2 is higher than that of EDA by 0.22 eV.

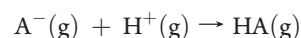
The effects of the substituents on the IE values of the neutral species are in line with the Hammett sigma constants; that is, those substituents with negative values of σ lower the IE of the derivative with respect to that of edaravone, while those groups with positive values of σ increase the IE with respect to that of edaravone. However, for the anions, this trend is not as apparent. All the anionic derivatives, except D1, E1, and G1, have higher IE values than that of EDA's anion.

In the particular case of derivatives A2 and C1, which cannot be characterized by the Hammett sigma constants, in their neutral forms, the IE of A2 is 0.38 eV higher than that of EDA, while the

**Figure 5.** Difference in the proton affinities (kcal/mol) of edaravone derivatives relative to that of edaravone.

IE of C1 is 0.31 eV lower than that of EDA. Regarding their anionic forms, the IE of A2 is very similar to that of EDA, while the IE of C1 is higher than that of EDA by 0.18 eV. Therefore, the facility for electron-donation is not responsible for the higher antioxidant activity of A2 reported by Nakagawa et al.⁵ This suggestion is supported by the oxidation potentials estimated by these authors,⁵ as they found them to be identical for A2 and EDA. Moreover, these authors found that the relationship between the antioxidant activity and the oxidation potential was not simply proportional, but V-shaped, and they proposed that the efficiency of A2 for radical scavenging is due to the increase of its anion form.⁵ On the other hand, the higher antioxidant activity of C1 reported by Chegaev et al.²⁴ can be rationalized in terms of IE.

Proton Affinities. A key quantity that allows the estimation of the relative ease of deprotonation of a series of compounds is the proton affinity of the base involved in the protonation–deprotonation equilibrium. The PA of the species A^- is defined as the negative of the molar enthalpy change (ΔH), at 298.15 K, of the hypothetical gas-phase reaction:



In this work, A^- and HA represent the anionic and neutral forms of the studied species, and the PA has been used to evaluate the proclivity of the edaravone derivatives to form the corresponding anions. Even though PA is by definition in the gas phase, the solvents effects are not taken into account; PA values are very helpful and have been widely used for describing large varieties of chemical systems.⁷¹ Moreover the experimental data concerning PA has increased dramatically in the last decades.

The calculated values of PA are reported in Table 5. They have not been compared with other results because this is the first report on the PA of these compounds. In general, for every pair of derivatives with an identical substituent, the PA is higher for that with the substituent in R1. The only exception to this trend was found for structures H (substituent, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), with PA values for H1 and H2 that are practically the same (Table 5).

The relative values of PA, compared to that of edaravone, are plotted in Figure 5. As this figure shows, most of the studied derivatives have lower proton affinities than edaravone, which indicates that they should be more prompt to deprotonate than the parent compound. The exceptions are B1, D1, E1, G1, A2,

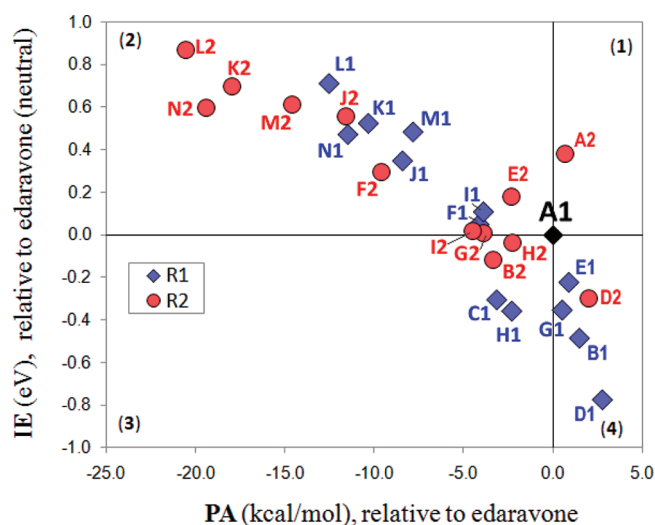


Figure 6. Ionization energies vs proton affinities of the studied derivatives relative to edaravone.

and D2. However, the PA values of A2, E1, and G1 are very similar to that of edaravone. Analyzing the effect of the substitution on the PA for each pair of derivatives, with identical substituent groups, it can be noticed that it is the same (increase or decrease) in most of the studied cases. The exceptions are structures B, E, and G. In these three cases, the substitution in R1 increases the PA value, while the substitution in R3 decreases the PA value, with respect to that of edaravone. As expected, the PA values of all the edaravone derivatives with electron-withdrawing substituents, that is, groups with positive σ values, are lower than that of EDA, and this effect is stronger for substitutions in R3 than it is for substitutions in R1. For electron-donating substituents, the only one that has the same effect on the PA value (increase with respect to edaravone) regardless of the substitution site is $-\text{NH}_2$, that is, the group with the most negative value of σ . For the other groups with negative σ , the substitution in R1 increases the PA, while the substitution in R3 decreases the PA.

First Ionization Energies vs Proton Affinities. According to the above discussions and in line with chemical intuition, modifications of edaravone with electron-withdrawing groups lead, in general, to derivatives with ionization energies higher than that of EDA, and therefore, such derivatives are expected to be less efficient as electron donors, that is, less efficient as antioxidants through the SET mechanism, than edaravone. At the same time, the presence of electron-withdrawing groups decreases the proton affinity and therefore increases the fraction of the anionic form. Logically, modifying EDA with electron-donating groups has the opposite effects: the resulting derivatives have lower ionization energies and higher proton affinities than those of edaravone.

The efficiency of these compounds as free radical scavengers has been associated with both low ionization energies and large fraction of the anionic form (more active than the neutral one). Therefore, designing edaravone derivatives with better performance as antioxidants than edaravone itself, on the basis of these two properties, is a challenge because groups with a strong electron-donating or electron-withdrawing character have the opposite effect. Accordingly, it may be hypothesized that substituents with weak or moderate electron-donating or

electron-withdrawing characters are the best candidates for modifying edaravone to produce better antioxidants.

Figure 6 shows a plot that allows comparing, simultaneously, both the IE and PA values of the studied derivatives with respect to edaravone (A1). The structures located in quadrant 1 have higher IE values and higher PA values than those of edaravone. Accordingly, it might be expected that they behave as poorer antioxidants than edaravone. However, the only compound located in this quadrant is A2, which has been previously reported to be a better free radical scavenger than edaravone.⁵ Accordingly, it seems that, at least for this compound, IE and PA are not enough to explain the observed behavior, and more extensive and detailed analyses of the involved chemical processes are needed. Moreover, this suggests that even though the ease of donating electrons and the fraction of the anionic form are key factors to the antioxidant activity of edaravone and its derivatives, they are not necessarily the only ones ruling such activity. In our opinion, the importance of other factors would increase as the importance of the SET process decreases, compared to other possible mechanisms of action such as hydrogen transfers or radical adduct formation.

The species in quadrant 2 (Figure 6) have higher IE values but lower PA values than those of edaravone. This means that they are expected to deprotonate more easily than EDA and, therefore, to have larger fractions of the anionic form, but as neutral species, they are less able to donate electrons. Species in quadrant 4 have just the opposite characteristics: they have lower IE values but higher PA values than those of EDA.

Species in quadrant 3 have just the desired behavior: lower IE values and lower PA values than those of edaravone. Therefore, they are expected to be better free radical scavengers than their parent molecule is through the SET mechanism. One of these species is C1, which is one of the compounds synthesized by Chegaev et al.²⁴ and described as having better antioxidant activity than edaravone. Therefore, in this case, the analysis of IE and PA seems to be enough to explain the observed behavior, and therefore, it seems that the SET mechanisms play a key role in the free radical scavenging activity of this compound.

Species H1 and H2, both with the $-\text{CH}=\text{CH}_2$ group as substituent, are also located in quadrant 3 (Figure 6). On the basis of IE and PA values alone, they are both predicted to be better antioxidants than EDA. The σ value of this group is almost zero (-0.04), which supports the hypothesis that substituents with weak electronic effects would produce better SET antioxidants. In addition, H1 is predicted to be better than H2, indicating a larger effect of the structure modification with this group when it takes place at site R1, compared to R3. In fact, H1 has values of both IE and PA that are significantly lower than those of edaravone, while the PA of H2 is lower than that of EDA but its IE is almost the same as that of EDA.

The other species located in quadrant 3 is B2. The substituent group in this case is $-\text{OCH}_3$, which has moderate electronic effects ($\sigma = -0.25$), but the substitution site is R3, which seems to fade its overall influence on the analyzed properties, compared to R1. In fact, changing the substitution site to R1 (derivative B1) causes an increase in PA that moves the location of the species to quadrant 4. According to this analysis, the antioxidant activity of B2 is predicted to be higher than that of EDA, provided that the major mechanism of reaction is SET.

pK_a Values. As mentioned above, even though proton affinities provide relevant information on the intrinsic propensity of a chemical species to deprotonate, this property does not take

Table 6. pK_a Values of Edaravone Derivatives and Estimated Fractions of the Anionic Form (fa) in Aqueous Solution at Physiological pH

species	pK_a	fa	species	pK_a	fa
A1	6.9 ^a	0.76	A2	6.64	0.85
B1	7.54	0.42	B2	6.19	0.94
C1	7.18	0.63			
D1	7.32	0.54	D2	9.52	0.01
E1	7.31	0.55	E2	5.17	0.99
F1	6.57	0.87	F2	3.00	~1.00
G1	7.40	0.50	G2	5.82	0.97
H1	6.67	0.84	H2	6.26	0.93
I1	7.12	0.66	I2	4.80	~1.00
J1	6.14	0.95	J2	2.39	~1.00
K1	5.85	0.97	K2	0.27	~1.00
L1	5.48	0.99	L2	-2.60	~1.00
M1	5.88	0.97	M2	0.47	~1.00
N1	5.71	0.98	N2	-0.31	~1.00

^a From ref 24.

into account the effects of the solvent. To include such effects, we have estimated the pK_a values. For this purpose, we have used the proton exchange method, also known as the isodesmic method or the relative method.⁷² It involves the reaction scheme



where HRef/Ref⁻ is the acid/base pair of a reference compound, which should be structurally similar to the system of interest. Within this approach, the pK_a is calculated as

$$pK_a(\text{HA}) = \frac{\Delta G_s}{RT \ln 10} + pK_a(\text{HRef}) \quad (4)$$

where the experimental value of the reference acid, HRef, is used. In our case, we have chosen HRef = edaravone, which has been reported to have $pK_a = 6.9$.²⁴

The pK_a values estimated for the species studied in this work are reported in Table 6, together with the fraction of their anion form (fa) at physiological pH. To calculate fa, we have obtained the acid constants (K_a) from the pK_a values:

$$K_a = 10^{-pK_a} \quad (5)$$

Then, using the definition of the equilibrium constant, for the deprotonation equilibrium ($HA \leftrightarrow A^- + H^+$)

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad (6)$$

The fraction of the anion can be easily obtained as

$$f_a = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \quad (7)$$

where $[H^+]$ is calculated from the pH. At physiological pH (7.4), $[H^+] = 3.98 \times 10^{-8}$ M.

In addition to the pK_a of edaravone, Chegaev et al.²⁴ also reported the pK_a values of structures B1 ($pK_a = 7.06$) and C1 ($pK_a = 7.11$). The values estimated in the present work for these derivatives agree well with the experimental values. This agreement supports the reliability of the pK_a values reported here for the first time for the other compounds. However, the pK_a values

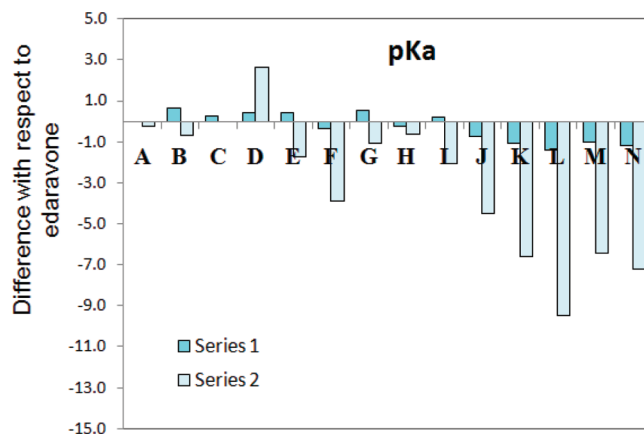


Figure 7. Difference in the pK_a of edaravone derivatives relative to that of edaravone.

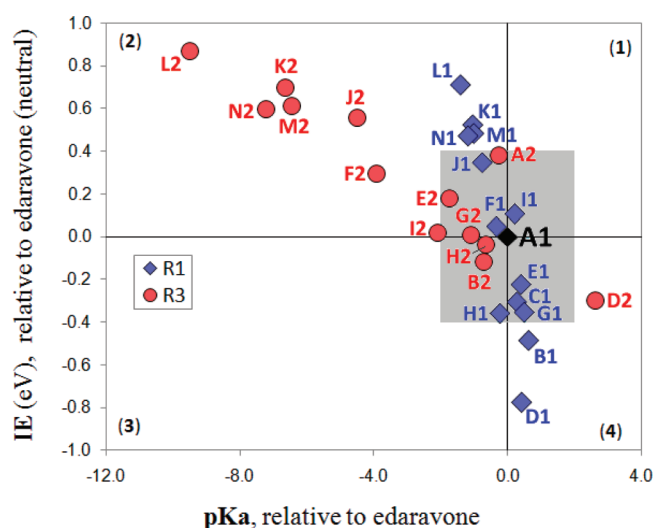


Figure 8. Ionization energies vs pK_a values of the studied derivatives relative to edaravone.

obtained for species K2, L2, M2, and N2 are very low, even negative. Therefore, further estimations of their pK_a values are highly recommended. In any case, the main purpose of the pK_a estimations in the present work is to use them for comparison with that of edaravone. Such relative values are trustworthy, regardless of the accuracy of the individual pK_a values, since a cancellation of errors is expected because of the structure similarities.^{73–75}

It was found that the influence of the modifications in site R3 on the pK_a values of the studied species is stronger than that of modifications in R1. It was found that the range of pK_a value variation for species of series 1 is ~2 units of pK_a , while this range is ~12 units of pK_a for series 2. This seems to be a logical finding because in series 2 the substitution site (R3) is very close to the deprotonated site, while in series 1 (R1) the substitutions would mainly modify the electronic properties of the phenyl moiety.

The values of pK_a for the studied derivatives, relative to that of edaravone itself, are plotted in Figure 7. Comparing this figure with Figure 5, it can be seen that, even when the trends are the same as those found for PA, the solvation has an influence on the relative ease of deprotonation. One of the main differences is

that, while the PA of A2 is slightly higher than that of EDA, its pK_a is slightly lower. This indicates that A2 would have a larger fraction of the anionic form than EDA (Table 6), which supports the proposal of Nakagawa et al.⁵ and might justify its higher antioxidant activity. Another difference concerns derivatives C1 and I1. Their PA values are significantly lower than that of EDA, but their pK_a values are slightly higher (0.28 and 0.22 units of pK_a , respectively) than that of EDA. Figure 7 also shows that, in general, the presence of the solvent increases the effect of the substituent groups in R1, with respect to substitutions in R3, regarding the ease of deprotonation.

First Ionization Energies vs pK_a Values. A new map, simultaneously showing the ease of deprotonation and the electron-donating ability of the studied compounds, has been constructed (Figure 8). The solvent effects have been included by replacing PA values with pK_a values. Because IE values are usually estimated from experiments in gas phase, we have kept them that way. Logically, the differences between the relative pK_a values and the relative PA values are reflected in this graphic. In this plot, we have included an “ideal” rectangle (colored in gray) that intends to highlight those derivatives that we predict to be as good as, or even better than, edaravone itself for scavenging free radicals. This zone was constructed on the basis of the errors that might arise from calculations, according to the following reasoning. It has been established that theoretical prediction of accurate pK_a values is a challenging task and that mean absolute deviations smaller than 2 units of pK_a are reasonably accurate.⁷² Therefore, we have used this threshold to limit the ideal zone. Even though EPT methods are capable of predicting IE values within approximately 0.25 eV of the experimental values,⁷⁶ their accuracy within the continuum solvent models is not clear yet. That is another reason why we have used gas phase IE values in this section. Therefore, we have increased the limit of possible errors to 0.4 eV to construct the ideal rectangle shown in Figure 8.

According to the map shown in this figure, derivatives H1, H2, and B2 are expected to have the best antioxidant activity among all the studied compounds. This statement is based on their location in the IE vs pK_a map. They are all located inside the ideal rectangle and also in quadrant 3. Derivatives C1, E1, F1, G1, H, I1, J1, A2, E2, and G2 are also expected to be good candidates for that purpose, because, even though they are not in quadrant 3, they are all located inside the ideal rectangle. All of them are recommended for scavenging free radicals as efficiently as, or even more efficiently than, edaravone itself, at least when the SET mechanism plays an important role in such activity.

This map (Figure 8) also explains the results reported by Chegaev et al.²⁴ and by Nakagawa et al.⁵ for derivatives C1 and A2, respectively. The higher antioxidant activity of the C1 derivative, compared to that of EDA, can be rationalized in terms of its lower IE, while the higher antioxidant activity of the A2 derivative, compared to that of EDA, can be justified by its lower pK_a , which led to a higher fraction of the anionic form (0.85 vs 0.76).

CONCLUSIONS

The electron-donating capability and the ease of deprotonation of 26 edaravone derivatives have been evaluated in this work. They had been previously proposed as key factors in the antioxidant activity of this kind of compounds. The first ionization energies have been used to assess the electron-donating capability, and the proton affinity (PA) and the pK_a have been used to evaluate the ease of deprotonation.

A reference set of molecules, which are structurally similar to edaravone derivatives, was used to test the suitability of different approaches to accurately reproduce experimental IE. EPT-based methods were identified as the ones with best performance, and they were selected for estimating the ionization energies of the edaravone derivatives. In particular, the P3 approximation led to the lowest mean unsigned error (MUE = 0.10 eV).

Low ionization energies and a large fraction of the anionic form (more active than the neutral one) are both desirable for edaravone derivatives intended to act as efficient free radical scavengers. Even though this means that designing edaravone derivatives with better performance as antioxidants than edaravone itself is a challenge (groups with strong electron-donating or electron-withdrawing characters have the opposite effect on producing edaravone derivatives with low ionization energies and higher proton affinities), we have identified a set of derivatives that are recommended for this purpose. They are derivatives H1, H2, and B2, which are proposed to be the best candidates, and also C1, E1, F1, G1, H, I1, J1, A2, E2, and G2. All of them are recommended for scavenging free radicals as efficiently as, or even more efficiently than, edaravone itself, at least when the SET mechanism plays an important role in such activity.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Calculated IE values obtained by electronic, Perdew–Levy, OVGf, and P3 approaches, pole strengths for the OVGf and P3 calculations, and Cartesian coordinates of the optimized structures. 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

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo at UAM-Iztapalapa for the access to its computer facilities. A.P.-G. acknowledges CONACyT for the doctoral fellowship.

REFERENCES

- (1) Watanabe, T.; Tahara, M.; Todo, S. *Cardiovasc. Ther.* **2008**, *26*, 101.
- (2) Yamamoto, Y.; Kuwahara, T.; Watanabe, K.; Watanabe, K. *Redox Rep.* **1996**, *2*, 333.
- (3) Wang, L.-F.; Zhang, H. -Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3789.
- (4) Abe, S.; Kirima, K.; Tsuchiya, K.; Okamoto, M.; Hasegawa, T.; Houchi, H.; Yoshizumi, M.; Tamaki, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 186.
- (5) Nakagawa, H.; Ohyama, R.; Kimata, A.; Suzuki, T.; Miyata, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5939.
- (6) Lin, M.; Katsumura, Y.; Hata, K.; Muroya, Y.; Nakagawa, K. *J. Photochem. Photobiol., B* **2007**, *89*, 36.
- (7) Anzai, K.; Furuse, M.; Yoshida, A.; Matsuyama, A.; Moritake, T.; Tsuboi, K.; Ikota, N. *J. Radiat. Res.* **2004**, *45*, 319.
- (8) Sasano, N.; Enomoto, A.; Hosoi, Y.; Katsumura, Y.; Matsumoto, Y.; Shiraiishi, K.; Miyagawa, K.; Igaki, H.; Nakagawa, K. *J. Radiat. Res.* **2007**, *48*, 495.

- (9) Yamamoto, Y.; Yanagisawa, M.; Tak, N. W.; Watanabe, K.; Takahashi, C.; Fujisawa, A.; Kashiba, M.; Tanaka, M. *Redox Rep.* **2009**, *14*, 251.
- (10) Higashi, Y.; Jitsuikia, D.; Chayamab, K.; Yoshizumia, M. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discovery* **2006**, *1*, 85.
- (11) Inokuchi, Y.; Imai, S.; Nakajima, Y.; Shimazawa, M.; Aihara, M.; Araie, M.; Hara, H. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *329*, 687.
- (12) Saini, A. K.; Patel, R. J.; Sharma, S. S.; Kumar, A. *Pharmacol. Res.* **2006**, *54*, 6.
- (13) Saini, A. K.; Kumar, A.; Sharma, S. S. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *568*, 164.
- (14) Zhang, N.; Komine-Kobayashi, M.; Tanaka, R.; Liu, M.; Mizuno, Y.; Urabe, T. *Stroke* **2005**, *36*, 2220.
- (15) Noora, J. I.; Uedab, Y.; Ikeda, T.; Ikenoue, T. *Neurosci. Lett.* **2007**, *414*, 5.
- (16) Kono, H.; Woods, C. G.; Maki, A.; Connor, H. D.; Mason, R. P.; Rusyn, I.; Fujii, H. *Free Radical Res.* **2006**, *40*, 579.
- (17) Sujatha, K.; Shanthi, G.; Selvam, N. P.; Manoharan, S.; Perumal, P. T.; Rajendran, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4501.
- (18) Fan, X.; Zhang, X.; Zhou, L.; Keith, K. A.; Kern, E. R.; Torrence, P. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3224.
- (19) Castagnolo, D.; Manetti, F.; Radi, M.; Bechi, B.; Pagano, M.; De Logu, A.; Meleddu, R.; Saggi, M.; Botta, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5716.
- (20) Tripathy, R.; Ghose, A.; Singh, J.; Bacon, E. R.; Angeles, T. S.; Yang, S. X.; Albom, M. S.; Aimone, L. D.; Herman, J. L.; Mallamo, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1793.
- (21) Markovic, V.; Eric, S.; Juranic, Z. D.; Stanojkovic, T.; Joksovic, L.; Rankovic, B.; Kosanic, M.; Joksovic, M. D. *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 18.
- (22) Kakiuchi, Y.; Sasaki, N.; Satoh-Masuoka, M.; Murofushi, H.; Murakami-Murofushi, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 1351.
- (23) Pérez-González, A.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1306.
- (24) Chegaev, K.; Cena, C.; Giorgis, M.; Rolando, B.; Tosco, P.; Bertinaria, M.; Fruttero, R.; Carrupt, P.-A.; Gasco, A. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 574.
- (25) Vondrak, T.; Bastl, Z. J.; Böhm, S. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1988**, 641.
- (26) (a) Wang, L. F.; Zhang, H. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3789. (b) Tiwari, A. K. *Curr. Sci.* **2004**, *86*, 1092.
- (27) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, 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.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, Revision A.08; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2009.
- (28) Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364.
- (29) Zavala-Oseguera, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Merino, G.; Galano, A. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13913.
- (30) Velez, E.; Quijano, J.; Notario, R.; Pabón, E.; Murillo, J.; Leal, J.; Zapata, E.; Alarcón, G. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 971.
- (31) Vega-Rodríguez, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7649.
- (32) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5114.
- (33) Black, G.; Simmie, J. M. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1236.
- (34) Furuncuoglu, T.; Ugur, I.; Degirmenci, I.; Aviyente, V. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1823.
- (35) Galano, A.; Macías-Ruvalcaba, N. A.; Campos, O. N. M.; Pedraza-Chaverri, J. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6625.
- (36) Galano, A.; Francisco-Marquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 11199–11205.
- (37) Galano, A. *Theor. Chem. Acc.* DOI: 10.1007/s00214-011-0958-0. Published Online First: May 22, 2011.
- (38) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378.
- (39) Koopmans, T. *Physica* **1933**, *1*, 104.
- (40) Perdew, J. P.; Parr, R. G.; Levy, M.; Balduz, J. L., Jr. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *49*, 1691.
- (41) Perdew, J. P.; Levy, M. *Phys. Rev. B* **1997**, *56*, 16021.
- (42) von Niessen, W.; Schirmer, J.; Cederbaum, L. S. *Comput. Phys. Rep.* **1984**, *1*, 57.
- (43) Ortiz, J. V. *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 7599.
- (44) Herman, M. F.; Freed, K. F.; Yeager, D. L. *Adv. Chem. Phys.* **1981**, *48*, 1.
- (45) Ortiz, J. V. *Adv. Quantum Chem.* **1999**, *35*, 33.
- (46) Linderberg, J.; Öhrn, Y. *Propagators in Quantum Chemistry*, 2nd ed.; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, 2004.
- (47) Mishra, M. K.; Medikeri, M. N. *Adv. Quantum Chem.* **1996**, *27*, 225.
- (48) Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V.; Ratovski, G. V. *Int. J. Quantum Chem.* **1998**, *70*, 1037.
- (49) Ortiz, J. V. *Int. J. Quantum Chem.* **2003**, *95*, 593.
- (50) Singh, R. K.; Ortiz, J. V.; Mishra, M. K. *Int. J. Quantum Chem.* **2010**, *110*, 1901.
- (51) Flores-Moreno, R.; Ortiz, J. V. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 124110.
- (52) Ortiz, J. V. *Computational Chemistry: Reviews of Current Trends*; Leszczynski, J., Ed.; World Scientific: Singapore, 1997.
- (53) Ortiz, J. V.; Zakrzewski, V. G.; Dolgounitcheva, O. *Conceptual Perspectives in Quantum Chemistry*; Kluwer: Dordrecht, 1997.
- (54) Ferreira, A. M.; Seabra, G.; Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. *Quantum—Mechanical Prediction of Thermochemical Data*; Kluwer: Dordrecht, 2001.
- (55) Flores-Moreno, R.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 134106.
- (56) Galano, A. *Theor. Chem. Acc.* DOI: 10.1007/s00214-011-0958-0. Published Online First: May 22, 2011.
- (57) Zakjevskii, V. V.; King, S. J.; Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13350.
- (58) Zakjevskii, V. V.; Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. *Int. J. Quantum Chem.* **2007**, *107*, 2266.
- (59) Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8240.
- (60) Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 11596.
- (61) Flores-Moreno, R.; Ortiz, J. V. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 164105.
- (62) Flores-Moreno, R.; Melin, J.; Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. *Int. J. Quantum Chem.* **2010**, *110*, 706.
- (63) Dolgounitcheva, O.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 130.
- (64) Average from all the vertical ionization energies reported by NIST: (a) Howell, J. O.; Goncalves, J. M.; Amatore, C.; Klasinc, L.; Wightman, R. M.; Kochi, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3968. (b) Kovac, B.; Mohraz, M.; Heilbronner, E.; Boekelheide, V.; Hopf, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4314. (c) Kaim, W.; Tesmann, H.; Bock, H. *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 3221. (d) Sell, J. A.; Kupperman, A. *Chem. Phys.* **1978**, *33*, 367. (e) Kobayashi, T. *Phys. Lett.* **1978**, *69*, 105. (f) Klasinc, L.; Novak, I.; Scholz, M.; Kluge, G. *Croat. Chem. Acta* **1978**, *51*, 43. (g) Schmidt, W. *J. Chem. Phys.* **1977**, *66*, 828. (h) Gower, M.; Kane-Maguire, L. A. P.; Maier, J. P.; Sweigart, D. A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1977**, 316. (i) Bock, H.; Kaim, W.; Rohwer, H. E. *J. Organomet. Chem.* **1977**, *135*, 14. (j) Clar, E.; Schmidt, W. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2563. (k) Kobayashi, T.; Nagakura, S. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1975**, *7*, 187. (l) Bischof, P. K.; Dewar, M. J. S.; Goodman, D. W.; Jones, T. B.

- J. Organomet. Chem.* **1974**, *82*, 89. (l) Schafer, W.; Schweig, A. *Angew. Chem.* **1972**, *84*, 898. (m) Klessinger, M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1972**, *11*, 525. (n) Bock, H.; Wagner, G.; Kroner, J. *Chem. Ber.* **1972**, *105*, 3850. (o) Carlson, T. A.; Anderson, C. P. *Chem. Phys. Lett.* **1971**, *10*, 561. (p) Bock, H.; Fuss, W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1971**, *10*, 182. (q) Gleiter, R.; Heilbronner, E.; Hornung, V. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 901.
- (65) (a) Daamen, H.; Oskam, A.; Stufkens, D. J.; Waaijers, H. W. *Inorg. Chim. Acta* **1979**, *34*, 253. (b) Cradock, S.; Findlay, R. H.; Palmer, M. H. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 2173.
- (66) Average from the two vertical ionization energies reported by NIST: (a) Ramsey, B. G. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2093. (b) Cradock, S.; Findlay, R. H.; Palmer, M. H. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 2173.
- (67) Streets, D. G.; Hall, W. E.; Ceasar, G. P. *Chem. Phys. Lett.* **1972**, *17*, 90.
- (68) Ono, S.; Okazaki, K.; Sakurai, M.; Inoue, Y. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3769.
- (69) Hammett, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 96.
- (70) Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165.
- (71) See, for example: (a) Moser, A.; Range, K.; York, D. M. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 13911. (b) Bera, N. C.; Maeda, S.; Morokuma, K.; Viggiano, A. A. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 13189. (c) Liu, M.; Yang, I.; Buckley, B.; Lee, J. K. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4764. (d) Mulder, R. J.; Guerra, C. F.; Bickelhaupt, F. M. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 7604. (e) Rosenberg, M.; Ottosson, H.; Kilsa, K. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2189. (f) de Petris, G.; Cartoni, A.; Rosi, M.; Barone, V.; Puzzarini, C.; Troiani, A. *Chem. Phys. Chem.* **2011**, *12*, 112.
- (72) Ho, J.; Coote, M. L. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, *125*, 3.
- (73) Ho, J.; Coote, M. L. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, *125*, 3.
- (74) Rebollar-Zepeda, A. M.; Campos-Hernández, T.; Ramírez-Silva, M. T.; Rojas-Hernández, A.; Galano, A. *J. Chem. Theory Comput.* DOI: 10.1021/ct2001864. Published ASAP: July 28, 2011.
- (75) Casanovas, R.; Fernandez, D.; Ortega-Castro, J.; Frau, J.; Donoso, J.; Muñoz, F. *Theor. Chem. Acc.* DOI 10.1007/s00214-011-0945-5. Published Online First: May 6, 2011.
- (76) Flores-Moreno, R.; Ortiz, J. V. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 124110.

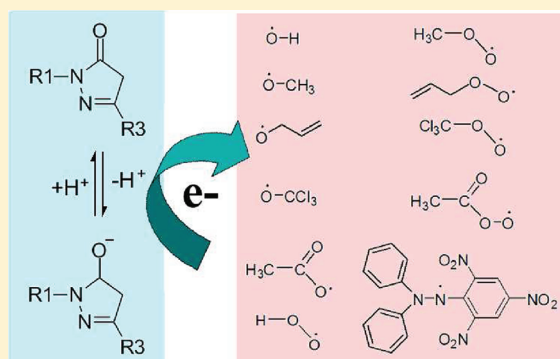
On the Outstanding Antioxidant Capacity of Edaravone Derivatives through Single Electron Transfer Reactions

Adriana Pérez-González 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 D.F.

S Supporting Information

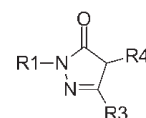
ABSTRACT: The single electron transfer (SET) reactions from the neutral and anionic forms of 27 edaravone derivatives to 11 free radicals have been studied using density functional theory and the Marcus theory. All of the studied compounds were found to be able to efficiently scavenge at least some of the studied radicals. More than half of them were found to be excellent free radical scavengers, via SET, under physiological conditions. Their SET reactions with all the studied radicals were found to have rate constants ranging from 10^6 to 10^9 $M^{-1} s^{-1}$ (diffusion limited). Therefore, they are predicted to be versatile scavengers, able to deactivate free radicals of different nature. Functionalizing the R1 and R3 sites of the pyrazol-5-one ring with the NO group is not recommended for edaravone derivatives designed as free radical scavengers through the SET mechanism. In general, this family of compounds was found to be exceptionally good for scavenging free radicals by transferring one electron. Moreover they are predicted to be outstanding scavengers, even if they would only react by SET. In addition, the acid–base equilibrium was found to play an important role in their activity.

**INTRODUCTION**

In healthy organisms, there is a delicate balance between the production and the removal of free radicals, which warrants that they remain in low/moderate concentrations. Under such conditions, free radicals have beneficial effects. However, at high concentrations free radicals can be very harmful to living organisms. Such high concentrations are caused by an imbalance between the production and the consumption of free radicals, which is commonly referred to as oxidative stress (OS). This chemical stress is a major health problem currently associated to the development of several diseases such as cancer,¹ cardiovascular disorders,² atherosclerosis,³ and Alzheimer's disease.⁴ Therefore, the study of compounds that can efficiently act as free radical scavengers is an important and active area of research.

Edaravone (EDA, 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, Scheme 1), also known as MCI-186, is a recently developed neuroprotective drug that has been successfully used for treating acute stroke caused by cerebral thrombosis and embolism.⁵ Its beneficial effects have been associated with its ability to scavenge free radicals.^{6–10} Moreover, there is an increasing interest in the synthesis of edaravone derivatives designed to potentiate the free radical scavenging activity of this compound. Some of these derivatives also have been reported to present other beneficial properties, such as antitumor activity,^{11,12} antiviral activity,^{13,14} inhibition of the agent of tuberculosis,¹⁵ and helpful effects for medical treatment of cancer and related diseases.¹⁶

It has been proposed that single electron transfer (SET) is one of the main antioxidant mechanisms of edaravone and its

Scheme 1. Pyrazol-5-one Ring^a

^a Edaravone: R1 = Ph, R3 = CH₃, and R4 = H.

derivatives in aqueous solution and that their anionic forms have higher activity than the neutral ones.^{6,8,9,17} On the basis of this evidence, a study on the electron-donating capability and the ease of deprotonation of a large series of edaravone derivatives has been recently reported.¹⁸ In that work, the ionization energies, the pK_a 's, and the anionic fractions at physiological pH were estimated, and some derivatives were proposed as ideal candidates for scavenging free radicals via SET. However, there are no previous reports on the relative antioxidant activity of different edaravone derivatives. There is also a lack of information on the relative antioxidant activity of the neutral and anionic forms of these compounds. Accordingly, it is the main goal of the present work to address these points. To that purpose, we have studied the kinetics of the SET reactions between 27 edaravone derivatives and their monoanions, with 11 free radicals of different

Received: October 15, 2011

Revised: December 17, 2011

Published: December 21, 2011

Table 1. Edaravone Derivatives Studied in This Work

	R1	R3	R1	R3
A1	Ph-	-CH ₃	A2	2-pyridinyl- -CH ₃
B1	<i>p</i> -OCH ₃ -Ph-	-CH ₃	B2	Ph- -OCH ₃
C1	<i>p</i> -O(CH ₂) ₃ ONO ₂ -Ph-	-CH ₃		
D1	<i>p</i> -NH ₂ -Ph-	-CH ₃	D2	Ph- -NH ₂
E1	<i>p</i> -CH ₃ -Ph-	-CH ₃	E2	Ph- -H
F1	<i>p</i> -Cl-Ph-	-CH ₃	F2	Ph- -Cl
G1	<i>p</i> -OH-Ph-	-CH ₃	G2	Ph- -OH
H1	<i>p</i> -CH=CH ₂ -Ph-	-CH ₃	H2	Ph- -CH=CH ₂
I1	<i>p</i> -SH-Ph-	-CH ₃	I2	Ph- -SH
J1	<i>p</i> -CHO-Ph-	-CH ₃	J2	Ph- -CHO
K1	<i>p</i> -CN-Ph-	-CH ₃	K2	Ph- -CN
L1	<i>p</i> -NO ₂ -Ph-	-CH ₃	L2	Ph- -NO ₂
M1	<i>p</i> -CF ₃ -Ph-	-CH ₃	M2	Ph- -CF ₃
N1	<i>p</i> -NO-Ph-	-CH ₃	N2	Ph- -NO

Table 2. Free Radicals Studied in This Work

Acronym	Structure	Acronym	Structure
•R1		•R7	
•R2		•R8	
•R3		•R9	
•R4		•R10	
•R5		•R11	
•R6			

nature. This study has been performed in aqueous solution considering the acid–base equilibria.

COMPUTATIONAL DETAILS

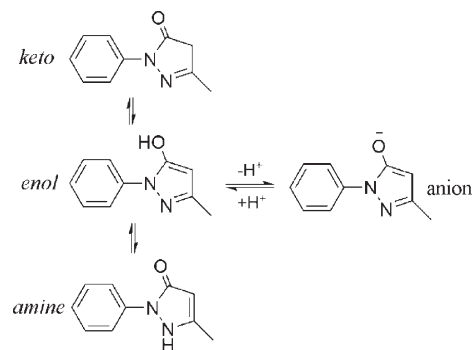
All the electronic calculations have been carried out with the Gaussian 09 package of programs,¹⁹ using the M05-2X functional²⁰ and the 6-311++G(d,p) basis set, in conjunction with the SMD continuum model.²¹ The reliability of this functional has been extensively proven.^{22–30} Full geometry optimizations, without any symmetry constraints, and frequency calculations were performed for all the species, in aqueous solution, and local minima were identified by the absence of imaginary frequencies.

The rate constants (k) were calculated using Conventional Transition State Theory (TST)³¹ and the 1 M standard state as

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

where k_B and h are the Boltzmann and Planck constants and ΔG^\ddagger is the Gibbs free energy of activation, which was calculated using

Scheme 2. Anionic and Tautomeric Forms of Edaravone



the Marcus theory³² as

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

where ΔG is the free energy of reaction and λ is a reorganization term.

Most 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 that purpose³³

$$k_{app} = \frac{k_D k_{act}}{k_D + k_{act}} \quad (3)$$

where k_{act} is the thermal rate constant, obtained from TST calculations (eq 1), and k_D is the steady-state Smoluchowski³⁴ rate constant for an irreversible bimolecular diffusion-controlled reaction

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

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 (antioxidant). D_{AB} has been calculated from D_A and D_B according to ref 35, and D_A and D_B have been estimated from the Stokes–Einstein approach³⁶

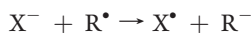
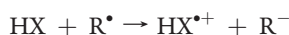
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (5)$$

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 a is the radius of the solute.

RESULTS AND DISCUSSION

The edaravone derivatives studied in this work are presented in Table 1. They have been constructed by replacement of the R1 (series 1) and R3 (series 2) moieties of edaravone (A1) with several groups. The substitute groups have different chemical nature, with their Hammett sigma constants ranging from -0.66 for the $-\text{NH}_2$ group to 0.91 for $-\text{NO}$. In addition, the A2 and C1 derivatives have been included since they have been already synthesized^{9,37} and proposed as better antioxidants than edaravone itself.^{9,37} The single electron transfer reaction from these compounds, and from their monoanions, to different free radicals (Table 2) has been studied. They have been modeled only in aqueous solution since nonpolar environments do not promote the necessary solvation of the ionic species involved in the SET

mechanism



where HX represents the neutral form of the edaravone derivatives; X^- represents their monoanions; and R^\bullet is the free radical.

Three nonionic tautomeric forms of edaravone have been previously proposed.^{38,39} They are the *keto*, the *enol*, and the *amino* forms (Scheme 2). Their relative abundance has been estimated,¹⁷ and it was found that more than 97% of edaravone is in its keto form, regardless of the polarity of the environment. Therefore, this is the only nonionic form considered in the

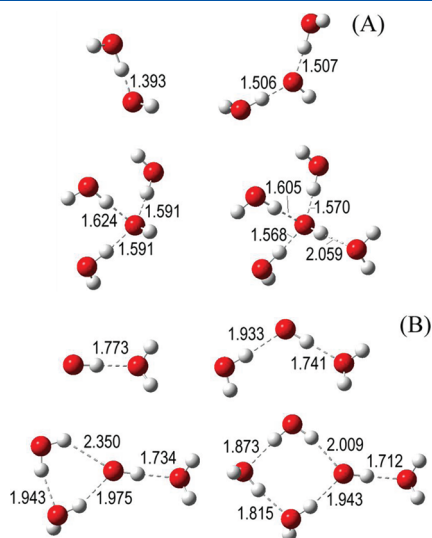


Figure 1. Optimized geometries of the (A) OH anion and (B) OH radical, with 1 to 4 explicit water molecules.

present work. Regarding the monoanion we have used the structure previously reported,^{38–43} which is shown in Scheme 2. The equivalent structures were also used for the studied derivatives.

Regarding the conversion of free radicals into anions, via SET, there is an extra computational challenge, the proper description of the solvation of the anions. It has been previously reported that the largest errors derived from using solvent continuum models to that purpose arise when studying anions which concentrate charge on a single exposed heteroatom.⁴⁴ From the studied species, the OH anion is the only one in this situation. Therefore, we have analyzed the description of the solvation of this species in detail. The OH[−] Gibbs free energy of solvation obtained from using the SMD model, without any explicit water molecules, is -97.5 kcal/mol. The experimental value recommended by Pliego and Riveros is -105 ± 0.5 kcal/mol.⁴⁵ Therefore, even when SMD accounts for 92.8% of the solvation, there are 7.5 kcal/mol that are not included in the description. This difference is attributed to strong short-range hydrogen bonding interactions between the anion and the solvent. As a result, a recommended strategy to improve the performance of continuum models is to combine them with explicit water molecules.^{44,46}

We have tested this strategy for the $\bullet\text{OH}/\text{OH}^-$ pair, including up to four water molecules (Figure 1). The rate constants (calculated using eq 6), for the reactions with edaravone, were found to be 1.09×10^7 , 6.02×10^9 , 6.15×10^9 , 6.75×10^9 , and $6.48 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for 0, 1, 2, 3, and 4 explicit water molecules, respectively. These values show that including the first water molecule has a huge effect on the rate constant, which becomes more than 550 times larger. However, the effect of the inclusion of the subsequent water molecules is almost negligible. These results support the importance of adding at least one water molecule to the continuum for properly describing the solvation of OH[−], in agreement with the proposal of Kelly, Cramer, and Truhlar.⁴⁴ Nevertheless, since it is generally accepted that the first solvation shell of OH[−] contains four water molecules, we have used this particular cluster for estimating all the related data

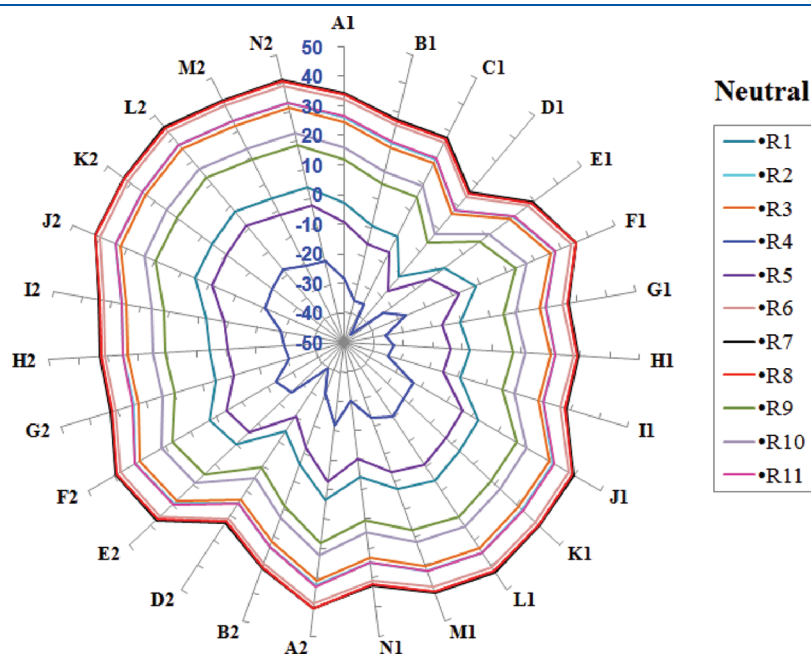


Figure 2. Gibbs free energies of reaction (kcal/mol) for the SET processes involving edaravone derivatives, in their neutral form, and the studied free radicals.

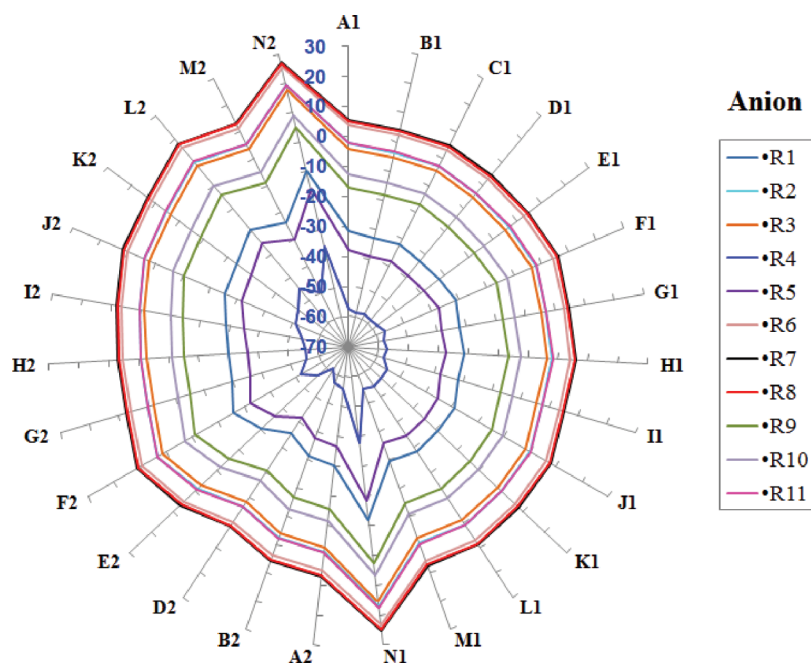


Figure 3. Gibbs free energies of reaction (kcal/mol) for the SET processes involving edaravone derivatives, in their monoanionic form, and the studied free radicals.

reported in this work. A similar analysis was performed for the reactions with $\cdot\text{OOH}$, using up to three water molecules (Figure 1S, Supporting Information). However, in this case the inclusion of explicit water molecules has only minor effects on the calculated rate constants. Accordingly, for all the other radical/anion pairs studied in this work, the solvation has been modeled using only SMD.

The Gibbs free energies of the reactions (ΔG) between the studied radicals and the edaravone derivatives, in their neutral and monoanionic forms, are provided in Tables 1S and 2S (Supporting Information). Since the calculated data are numerous, they have also been plotted in Figures 2 and 3 to facilitate direct comparisons. The electron acceptor capability of the studied radicals was found to follow the trend: $\cdot\text{R4} > \cdot\text{R5} > \cdot\text{R1} > \cdot\text{R9} > \cdot\text{R10} > \cdot\text{R3} > \cdot\text{R2} > \cdot\text{R11} > \cdot\text{R6} > \cdot\text{R8} > \cdot\text{R7}$. For the electron transfer from the neutral form of edaravone derivatives, those involving radicals $\cdot\text{R2}$, $\cdot\text{R3}$, $\cdot\text{R6}$, $\cdot\text{R7}$, $\cdot\text{R8}$, and $\cdot\text{R11}$ were all found to be endergonic. Most of the reactions involving $\cdot\text{R9}$ and $\cdot\text{R10}$ were also found to be endergonic, except $\text{D1} + \cdot\text{R9}$, and $\text{D1} + \cdot\text{R10}$, while about half of the reactions with $\cdot\text{R1}$ are exergonic. On the other hand, the SET processes involving $\cdot\text{R4}$ and $\cdot\text{R5}$ are all exergonic, except $\text{L2} + \cdot\text{R5}$. In general, edaravone derivatives D1 and D2 are those with the lowest values of ΔG when transferring an electron from their neutral forms (Figure 2). However, the nature of the reacting free radical seems to be more important to the thermochemical feasibility of the studied processes than the specific derivative involved in the reaction. While electron transfers from neutral derivatives to $\cdot\text{OCCl}_3$ (R4) and $\text{CH}_3\text{COO}\cdot$ (R5) are thermodynamically viable, most of the processes involving the other radicals are endergonic.

When the electron transfer takes place from the monoanions, the thermochemical feasibility of the processes logically increases. The only SET reactions that remain endergonic in this case are those involving radicals $\cdot\text{R6}$ (except for its reaction with D2), $\cdot\text{R7}$, and $\cdot\text{R8}$. However, even for these radicals, the thermochemical

feasibility is significantly increased with respect to the reactions involving the neutral antioxidants. Most of the other reactions are exergonic, or rather isoergonic, and most of the exceptions correspond to the electron transfers from N1 and N2 anions, which were found to be the edaravone derivatives that systematically produce higher values of ΔG when transferring an electron from their anionic forms (Figure 3). This is a logical finding since $-\text{NO}$ is the strongest electro-acceptor group, among the studied substituents. However, as was described for the neutral species, in the case of the anions the thermochemical feasibility of the SET reactions is largely influenced by the nature of the reacting free radical and only moderately influenced by the different derivatives.

It should be noticed that positive values of ΔG do not necessarily mean that the corresponding SET reaction would not occur, especially if they are small values. Such processes can still take place at significant rates, and if their products rapidly react further, through reactions that are sufficiently exergonic to provide a driving force, they might still represent significant channels. Moreover, endergonic processes might play important roles in biological systems when there are not parallel reactions that are more energetically favored.

The Gibbs free energies of activation (ΔG^\ddagger) are reported in Tables 3S and 4S (Supporting Information) for the reactions involving neutral and anionic derivatives, respectively. Some of the reactions involving the anionic derivatives of edaravone have high barriers, despite the fact that they are highly exergonic. This is particularly evident for the reactions of radicals $\cdot\text{R4}$ and $\cdot\text{R5}$, for which the ΔG^\ddagger values of the reactions with the derivative anions are significantly higher than those of the reactions with the neutral derivatives. Since it would be expected that the electrodonor capability of the anions would be higher than that of the corresponding neutral compound, this behavior is contra-intuitive. However, it can be explained based on the fact that these reactions correspond to the inverted region of the Marcus theory ($\Delta G < -\lambda$)^{32a,47} and have the characteristic that ΔG is not only

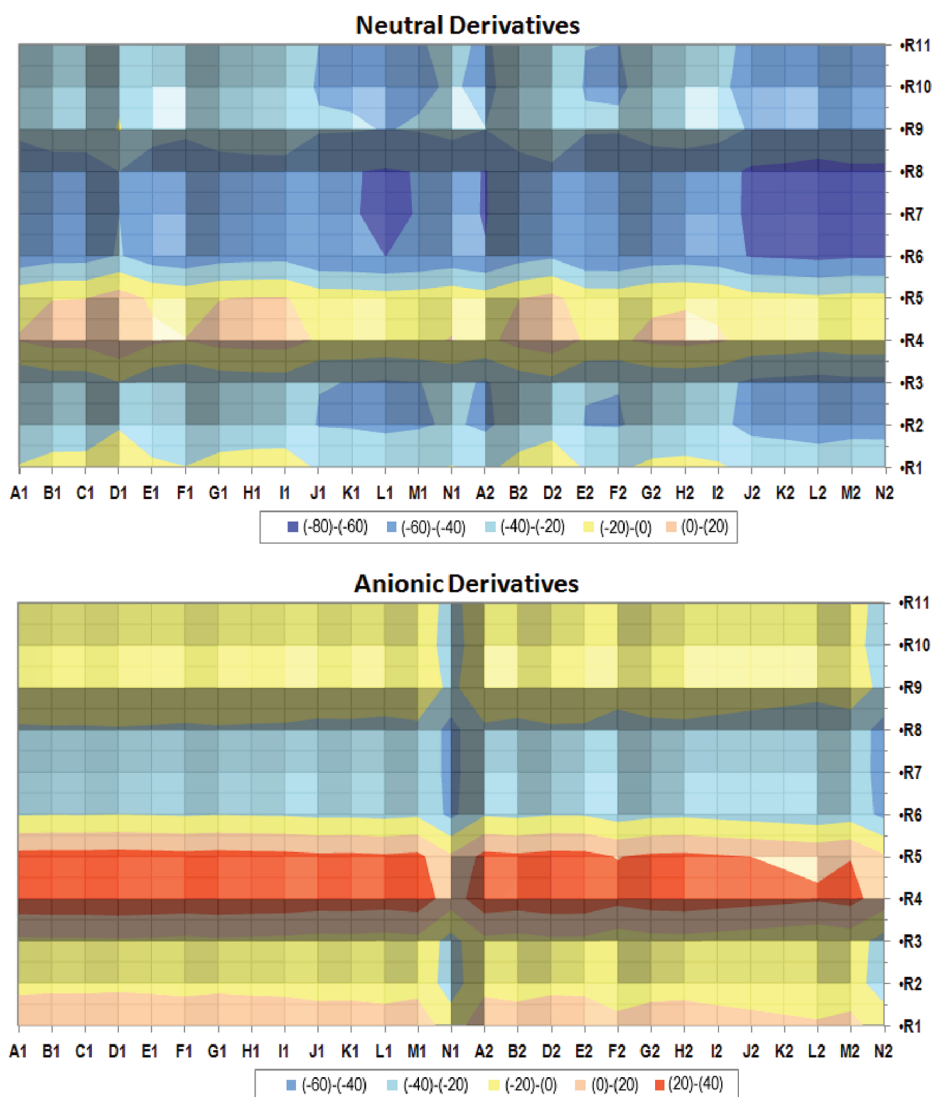


Figure 4. Difference between $-\lambda$ and ΔG (kcal/mol).

lower, but much lower, than $-\lambda$ (red zones, Figure 4). The λ values are provided in Tables 5S and 6S (Supporting Information). There are other reactions that, while located in the inverted region, are very close to the vertex of the parabola, and therefore their barrier remains low. This corresponds to the cases where the difference $(-\lambda) - \Delta G$ is positive but relatively small (pink regions, Figure 4). For the other radicals ($\bullet R2$, $\bullet R3$, and $\bullet R6$ to $\bullet R11$), on the other hand, the expected behavior was found, and the barriers of their reactions with the anionic derivatives are lower than those of the reactions with the neutral species.

Logically, the ΔG^\ddagger values are directly reflected on the rate constants (Tables 7S and 8S, Supporting Information). Therefore, the rate constants of radicals $\bullet R4$ and $\bullet R5$ are, in general, higher for the reactions with the neutral derivatives, compared to those involving the anionic species. For the rest of the radicals the general trend is that the rate constants of the reactions with the monoanions are higher.

It is very interesting that, except in a few cases, for every pair free radical–edaravone derivative at least one of the rate constants (with the anionic or with the neutral forms) is significantly high ($>10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). This has important implications for the

free radical scavenging activity of this family of compounds. Since the pK_a values of most of the studied derivatives have been estimated to be near the physiological pH ,¹⁸ under such conditions significant amounts of both their anionic and neutral forms are expected to be present. This means that the most reactive one would donate one electron to the free radical, deactivating it, and its population would be restored through the acid–base equilibrium.

The rate constants (k_{app}) of the SET reactions between the studied free radicals and the neutral form of the edaravone derivatives have been plotted in Figure 5 to facilitate direct comparisons among all the reported data. As this figure shows, the reactions involving $\bullet R4$ and $\bullet R5$ are all within the diffusion-limit regime, or close to it ($k_{\text{app}} \geq 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). This is also the case of the $\bullet R1$ reactions with most derivatives and of the $\bullet R9 + D1$, $\bullet R9 + D2$, and $\bullet R10 + D1$ reactions. For the SET processes involving the monoanions of edaravone derivatives (Table 8S (Supporting Information) and Figure 6), most of the reactions with $\bullet R4$ and $\bullet R5$ have k_{app} values lower than $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The exceptions are the SET processes from N1, K2, L2, and N2 to $\bullet R4$ and from N1, L2, and N2 to $\bullet R5$. On the other hand, most of the reactions

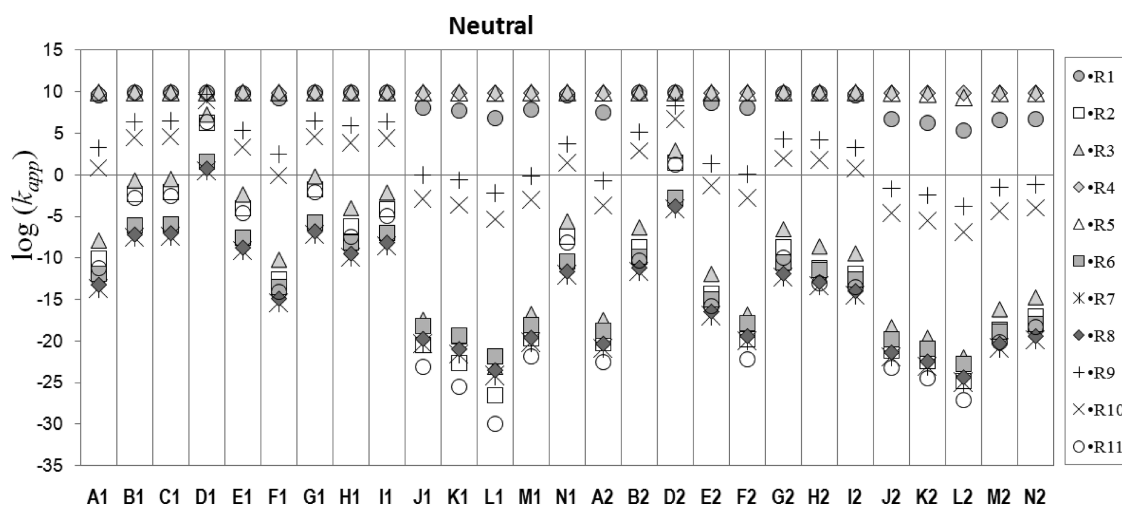


Figure 5. Rate constants of the SET reactions involving the neutral form of the edaravone derivatives.

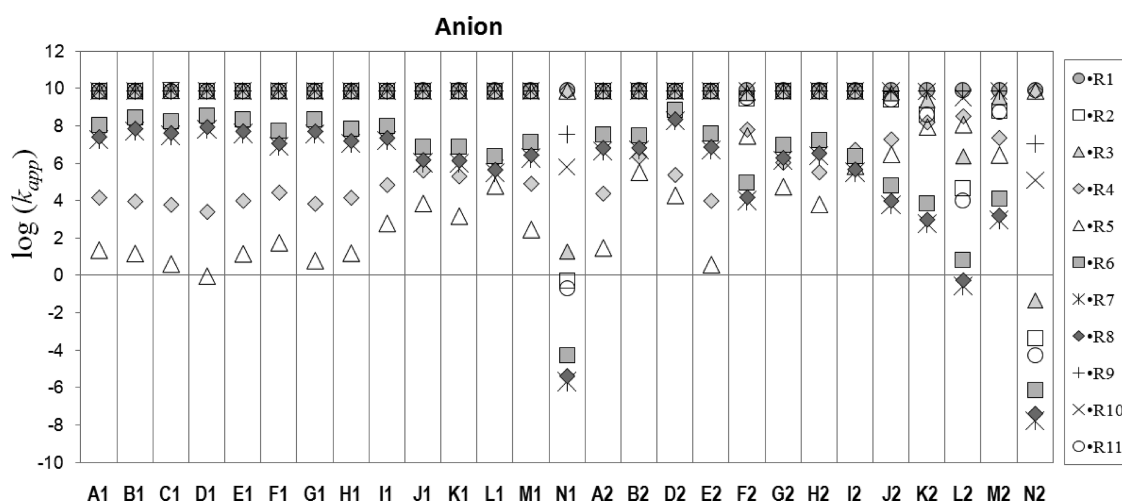


Figure 6. Rate constants of the SET reactions involving the anionic form of the edaravone derivatives.

involving \bullet R1, \bullet R2, \bullet R3, \bullet R9, \bullet R10, and \bullet R11 have values of k_{app} that are within, or close to, the diffusion-limited control.

Since the efficiency as a free radical scavenger of the studied compounds would be particularly important under physiological conditions, we have also calculated the corresponding total rate constant according to

$$k_{\text{app}}^{\text{total}} = p^{\text{N}}k_{\text{app}}^{\text{N}} + p^{\text{A}}k_{\text{app}}^{\text{A}} \quad (6)$$

where p^{N} and p^{A} account for the fractions of the neutral and the anionic forms of the edaravone derivatives, respectively, and $k_{\text{app}}^{\text{N}}$ and $k_{\text{app}}^{\text{A}}$ are their SET rate constants. The values of these total rate constants are reported in Table 9S (Supporting Information) and plotted in Figure 7. In this figure, a red line has been drawn at $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ to divide the plot into two separated regions: above the red line are located the free radical scavenging processes that are considered particularly efficient, and below the red line are those that are not expected to be very effective.

As Figure 7 shows, most of the studied edaravone derivatives are very efficient for scavenging a wide variety of free radicals (all those studied in this work), through the SET mechanism.

In fact, the SET reactions that were found to have rate constants lower than $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, under physiological conditions, are the exceptions. Edaravone derivatives A1 to J1, M1, A2, B2, and H2 are excellent for scavenging all the studied free radicals by donating one electron. These results are in agreement with the high efficiency as antioxidants previously proposed for compounds C1 and A2.^{9,37} They are also in general agreement with the predictions derived from ionization energies and $\text{p}K_{\text{a}}$'s.¹⁸ According to them, derivatives A1, C1 to J1, A2, B2, E2, G2, H2, and I2 were identified as the best candidates for scavenging oxygenated free radicals through the SET mechanism. It should be noticed that a more detailed study, including kinetics, is needed to make more accurate predictions. After such study, B1 and M1 are also included in the ideal list, while E2, G2, and I2 are no longer among the best candidates for scavenging free radicals via SET. However, it is interesting that the overlap between the predictions made based only on chemical descriptors and those made based on kinetic consideration is wide. In fact, they agree for most of the studied species (more than 80%).

Derivatives J1, K1, L1, and I2 were found to be also excellent for scavenging most free radicals, and the exceptions correspond

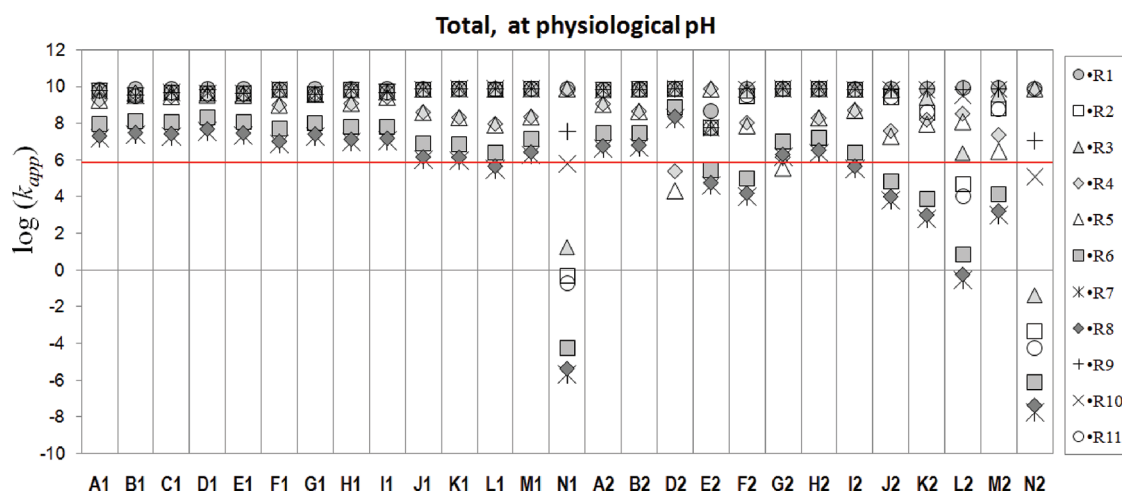


Figure 7. Total rate constants of the SET reactions, considering the molar fractions of neutral and anionic derivatives, at physiological pH.

to the reactions involving radicals $\cdot\text{R7}$ and $\cdot\text{R8}$, against which their protective activity is only good. The efficiency of the other derivatives as free radical scavengers, via SET, is largely influenced by the nature of the reacting radical. The worst scavengers were found to be N1 and N2. They would be unable to transfer an electron to $\cdot\text{R2}$, $\cdot\text{R3}$, $\cdot\text{R6}$, $\cdot\text{R7}$, $\cdot\text{R8}$, $\cdot\text{R9}$, and $\cdot\text{R10}$ at significant rates under physiological conditions. Therefore, functionalizing the R1 and R3 sites of the pyrazol-5-one ring is not recommended for designing compounds intended to act as free radical scavengers through the SET mechanism. In addition, derivatives obtained by functionalizing site R3 in the pyrazol-5-one ring generally produce derivatives with poorer electron-donor capabilities than those with the same functional group at site R1.

To put in perspective the efficiency of the studied compounds as free radical scavengers, some comparisons with other antioxidants have been performed. To that purpose it is recommended to compare different scavengers using their reactions with free radicals that are not particularly reactive. For example, if we use their reactions with $\cdot\text{OH}$, we might conclude that they all have similar reactivity since the reactions with this radical often are diffusion-controlled.^{48,49} Since such comparison might be misleading, we prefer to use one of the less reactive radicals; therefore, we have chosen $\cdot\text{OOH}$. Moreover, precisely because of the relatively low reactivity of this radical, overall rate coefficients in the order of $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ indicate that a chemical compound is a good radical scavenger, while rate coefficients in the order of $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ or higher imply an outstanding antioxidant activity.⁵⁰

It was found that, in aqueous solution, under physiological conditions, the reactions of $\cdot\text{OOH}$ with derivatives B1, C1, D1, E1, G1, and D2 (through SET processes) have rate constants in the order of $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table 9S, Supporting Information). This means that these reactions are faster than those involving most of the known antioxidants and only comparable to that of sesamol ($\sim 2.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁵¹ The rate coefficients for the reactions of derivatives A1, F1, H1, I1, M1, A2, B2, and H2 were found to be slightly lower and similar to those of 2-propenesulfenic acid ($\sim 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁵¹ and glutathione ($\sim 2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁵² which have been reported to be excellent for scavenging $\cdot\text{OOH}$. Accordingly, 14 of the studied edaravone derivatives are among the best of the known $\cdot\text{OOH}$ scavengers. In addition, their efficiency for deactivating this radical was found to be much higher than that of carotenes ($\sim 10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁵³

allicin ($\sim 8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁵⁴ melatonin ($\sim 2 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁵⁵ and caffeine ($3.3 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Derivatives J1, K1, L1, G2, and I2 also react with $\cdot\text{OOH}$ faster than allicin, melatonin, and caffeine and at rates ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) similar to the most reactive carotenes. Therefore, they also are very good $\cdot\text{OOH}$ scavengers. The efficiency of derivatives E2, F2, J2, K2, and M2 was found to be moderate ($k_{\text{app}} \sim 10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) but still better than that of allicin, melatonin, and caffeine and similar to those of some carotenes. Only derivatives N1, L2, and N2 were found to have negligible $\cdot\text{OOH}$ scavenging activity.

In addition, it should be noted that we are considering only the SET mechanism for the reactions of the edaravone derivatives, while other mechanisms were included in the estimations of the rate constants of the other antioxidants mentioned above. Therefore, the rate constants of the studied derivatives are only lower limits, and including other reaction mechanisms in the study of their antioxidant activity would lead to higher overall rate coefficients. This means that they are at least as good as predicted in this work for scavenging free radicals.

CONCLUSIONS

The SET reactions from the neutral and anionic forms of 27 edaravone derivatives to 11 free radicals, in aqueous solution, have been studied using density functional theory and the Marcus theory. Their relative order of reactivity is proposed for the first time. It is demonstrated that the most active form is not always the anion but depends on the particular derivative that is reacting and also on the nature of the involved free radical.

In general, the nature of the reacting free radical was found to be more important, to the thermochemical feasibility of the studied reactions, than the particular derivative that is involved in the process. This does not mean that the nature of the derivatives is unimportant. In fact, two derivatives (N1 and N2) were found to be significantly less efficient than the rest as free radical scavengers, based on their versatility. Therefore, functionalizing the R1 and R3 sites of the pyrazol-5-one ring with the NO group is not recommended for designing edaravone derivatives intended to act as free radical scavengers through the SET mechanism.

For every pair free radical–edaravone derivative, at least one of the rate constants (with the anionic or with the neutral forms) was found to be larger than $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This has important implications for the free radical scavenging activity of this family

of compounds since according to their pK_a values both forms should be present in significant amounts under physiological conditions for most of the studied compounds. Thus, this distribution warrants the presence of at least one active species under such conditions.

All of the studied compounds were found to be able to efficiently scavenge at least some of the studied radicals. More than half of them (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1, I1, J1, K1, L1, M1, A2, B2, D2, G2, H2, and I2) were found to be excellent free radical scavengers, via SET, in aqueous solution under physiological conditions. Their SET reactions with all the studied radicals were found to have rate constants ranging from 10^6 to $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Therefore, they are predicted to be versatile scavengers, able to rapidly deactivate free radicals of different nature in aqueous solution.

In general, this family of compounds was found to be exceptionally good for scavenging free radicals, even if they would only react by SET, and the acid–base equilibrium was found to play an important role in their activity.

■ ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Gibbs free energies of reaction, Gibbs free energies of activation, reorganization energies, and rate constant values. 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.

■ ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo at UAM - Iztapalapa for the access to its computer facilities. A.P.-G. acknowledges CONACyT for a Doctoral fellowship.

■ REFERENCES

- (1) (a) Boyd, N. F.; McGuire, V. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 185–190. (b) Nelson, R. L. *Free Radical Biol. Med.* **1992**, *12*, 161–168. (c) Knekt, P.; Reunanen, A.; Takkunen, H.; Aromaa, A.; Heliövaara, M.; Hakuinen, T. *Int. J. Cancer* **1994**, *56*, 379–382. (d) Omenn, G. S.; Goodman, G. E.; Thornquist, M. D. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1150–1155.
- (2) (a) Riemersma, R. A.; Wood, D. A.; Macintyre, C. C. A.; Elton, R. A.; Gey, K. F.; Oliver, M. F. *Lancet* **1991**, *337*, 1–5. (b) Salonen, J. T.; Nyssoner, K.; Korpela, H.; Tuomilehto, J.; Seppanen, R.; Salonen, R. *Circulation* **1992**, *86*, 803–811. (c) Street, D. A.; Comstock, G.; Salkeld, R.; Klag, M. *Circulation* **1994**, *90*, 1154–1161. (d) Kushi, L. H.; Folsom, A. R.; Prineas, R. J.; Mink, P. J.; Wu, Y.; Bostick, R. N. *Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1156–1162. (e) Stephens, N. G.; Parsons, A.; Schofield, P. M.; Kelly, F.; Cheesman, K.; Mitchinson, M. J.; Brown, M. J. *Lancet* **1996**, *347*, 781–786.
- (3) (a) Panasenkov, O. M.; Nova, T. V.; Azizova, O. A.; Vladimirov, Y. A. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 137–148. (b) Steinberg, D. *Circulation* **1991**, *84*, 1421–1425. (c) Janero, D. R. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *11*, 129–144. (d) Hodis, H. N.; Mack, W. J.; LaBree, L.; Cashin-Hemphill, L.; Sevanian, A.; Johnson, R.; Azen, S. *J. Am. Med. Assoc.* **1995**, *273*, 1849–1854.
- (4) (a) Butterfield, D. A.; Hensley, K.; Harris, M.; Mattson, M.; Carney, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 710–715. (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*, 3270–3274. (c) Butterfield, D. A.; Martin, L.; Carney, J. M.; Hensley, K. *Life Sci.* **1996**, *58*, 217–228. (d) Butterfield, D. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 495–506. (e) Fay, D. S.; Fluet, A.; Johnson, C. J.; Link, C. D. *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 1616–1625.
- (5) Watanabe, T.; Tahara, M.; Todo, S. *Cardiovasc. Ther.* **2008**, *26*, 101–114.
- (6) Yamamoto, Y.; Kuwahara, T.; Watanabe, K.; Watanabe, K. *Redox Rep.* **1996**, *2*, 333–338.
- (7) Wang, L. F.; Zhang, H. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3789–3792.
- (8) Abe, S.; Kirima, K.; Tsuchiya, K.; Okamoto, M.; Hasegawa, T.; Houchi, H.; Yoshizumi, M.; Tamaki, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 186–191.
- (9) Nakagawa, H.; Ohyama, R.; Kimata, A.; Suzuki, T.; Miyata, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5939–5942.
- (10) Lin, M.; Katsumura, Y.; Hata, K.; Muroya, Y.; Nakagawa, K. *J. Photochem. Photobiol. B* **2007**, *89*, 36–43.
- (11) Tripathy, R.; Ghose, A.; Singh, J.; Bacon, E. R.; Angeles, T. S.; Yang, S. X.; Albom, M. S.; Aimone, L. D.; Herman, J. L.; Mallamo, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1793–1798.
- (12) Markovic, V.; Eric, S.; Juranic, Z. D.; Stanojkovic, T.; Joksovic, L.; Rankovic, B.; Kosanic, M.; Joksovic, M. D. *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 18–27.
- (13) Sujatha, K.; Shanthi, G.; Selvam, N. P.; Manoharan, S.; Perumal, P. T.; Rajendran, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4501–4503.
- (14) Fan, X.; Zhang, X.; Zhou, L.; Keith, K. A.; Kern, E. R.; Torrence, P. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3224–3228.
- (15) Castagnolo, D.; Manetti, F.; Radi, M.; Bechi, B.; Pagano, M.; De Logu, A.; Meleddu, R.; Saggi, M.; Botta, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5716–5721.
- (16) Kakiuchi, Y.; Sasaki, N.; Satoh-Masuoka, M.; Murofushi, H.; Murakami-Murofushi, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 1351–1358.
- (17) Pérez-González, A.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1306–1314.
- (18) Pérez-González, A.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10375–10384.
- (19) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A., et al. *Gaussian 09*, Revision A.08; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- (20) Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364–382.
- (21) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396.
- (22) Zavala-Oseguera, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Merino, G.; Galano, A. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13913–13920.
- (23) Velez, E.; Quijano, J.; Notario, R.; Pabón, E.; Murillo, J.; Leal, J.; Zapata, E.; Alarcón, G. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 971–977.
- (24) Vega-Rodríguez, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7649–7658.
- (25) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5114–5117.
- (26) Black, G.; Simmie, J. M. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1236–1248.
- (27) Furuncuoglu, T.; Ugur, I.; Degirmenci, I.; Aviyente, V. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1823–1835.
- (28) Galano, A.; Macías-Ruvalcaba, N. A.; Campos, O. N. M.; Pedraza-Chaverri, J. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6625–6635.
- (29) Galano, A.; Francisco-Marquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 11199–11205.
- (30) Galano, A. *Theor. Chem. Acc.* **2011**, *130*, 51–60.
- (31) (a) Eyring, H. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107–115. (b) Evans, M. G.; Polanyi, M. *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 875–894. (c) Truhlar, D. G.; Hase, W. L.; Hynes, J. T. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664–2682.
- (32) (a) Marcus, R. A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1965**, *16*, 155–196. (b) Marcus, R. A. *Rev. Mod. Phys.* **1993**, *65*, 599–610. (c) Marcus, R. A. *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 13–30.
- (33) Collins, F. C.; Kimball, G. E. *J. Colloid Sci.* **1949**, *4*, 425–437.

- (34) Smoluchowski, M. Z. *Phys. Chem.* **1917**, *92*, 129–168.
- (35) Truhlar, D. G. *J. Chem. Educ.* **1985**, *62*, 104–106.
- (36) (a) Einstein, A. *Ann. Phys. (Leipzig)* **1905**, *17*, 549–560.
(b) Stokes, G. G. *Mathematical and Physical Papers*; Cambridge University Press: Cambridge, 1903; Vol. 3, p 55.
- (37) Chegaev, K.; Cena, C.; Giorgis, M.; Rolando, B.; Tosco, P.; Bertinaria, M.; Fruttero, R.; Carrupt, P. A.; Gasco, A. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 574–578.
- (38) Ono, S.; Okazaki, K.; Sakurai, M.; Inoue, Y. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3769–3775.
- (39) Lin, M.; Katsumura, Y.; Hata, K.; Muroya, Y.; Nakagawa, K. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2007**, *89*, 36–43.
- (40) Abe, S.; Kirima, K.; Tsuchiya, K.; Okamoto, M.; Hasegawa, T.; Houchi, H.; Yoshizumi, M.; Tamaki, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 186–191.
- (41) Higashi, Y.; Jitsuikia, D.; Chayamab, K.; Yoshizumia, M. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discovery* **2006**, *1*, 85–93.
- (42) Ohara, K.; Fujii, A.; Ichimura, Y.; Sato, K.; Mukai, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*, 421–426.
- (43) Watanabe, T.; Tahara, M.; Todo, S. *Cardiovasc. Ther.* **2008**, *26*, 101–114.
- (44) Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 2493–2499.
- (45) Pliego, J. R.; Riveros, J. M. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *332*, 597–602.
- (46) Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 760–768.
- (47) See for example: (a) Ulstrup, J.; Jortner, J. *J. Chem. Phys.* **1975**, *63*, 4358–4368. (b) Marcus, R. A.; Sutin, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265–322. (c) Marcus, R. A. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1111–1121.
- (48) Rose, R. C.; Bode, A. M. *FASEB J.* **1993**, *7*, 1135–1142.
- (49) Galano, A.; Tan, D. X.; Reiter, R. J. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 1–16.
- (50) Vaidya, V.; Ingold, K. U.; Pratt, D. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 157–160.
- (51) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Francisco-Márquez, M. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 13101–13109.
- (52) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *RSC Adv.* **2011**, *1*, 1763–1771.
- (53) Galano, A.; Francisco-Márquez, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 11338–11345.
- (54) Galano, A.; Francisco-Márquez, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16077–16081.
- (55) Galano, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 7147–7157.

On the $\bullet\text{OH}$ and $\bullet\text{OOH}$ Scavenging Activity of 3-Methyl-1-pyridin-2-yl-5-pyrazolone: Comparisons with Its Parent Compound, Edaravone

Adriana Pérez-González and Annia Galano*

The free radical scavenging activity of 3-methyl-1-pyridin-2-yl-5-pyrazolone (pyridyl) has been studied in aqueous and lipid solutions, using the density functional theory. Four mechanisms of reaction have been considered: single electron transfer, sequential proton electron transfer (SPET), hydrogen transfer, and radical adduct formation. It was found that the reaction with $\bullet\text{OH}$ occur at diffusion-limited rate, which is very similar to that of edaravone, regardless of the polarity of the environment. This indicates that they are both excellent $\bullet\text{OH}$ scavengers. Regarding the $\bullet\text{OOH}$ scavenging activity of pyridyl, in lipid media it was predicted to be about 15 times higher than that of edaravone. However, in this case they were found to be rather poor $\bullet\text{OOH}$ scavengers in lipid

media. On the contrary, they are predicted to be excellent $\bullet\text{OOH}$ scavengers in aqueous solution. In fact, they were found to be among the best peroxy radical scavengers in such medium. The rates constants of the $\bullet\text{OOH}$ reactions with pyridyl and edaravone, in aqueous solution, were estimated to be 1.1×10^7 and $4.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. The outstanding scavenging activity of these compounds was attributed to the presence of their anionic forms, which are much more reactive than the neutral species. The reactions with $\bullet\text{OOH}$ were found to take place almost exclusively by the SPET mechanism. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

DOI: 10.1002/qua.24046

Introduction

Living organisms are in a delicate chemical balance that is required for maintaining a healthy state and involves a huge variety of chemical compounds including reactive oxygen species (ROS). The imbalance between the ROS generation and the antioxidant defense system leads to unhealthy high concentrations of these species and to chemical modifications of important biological molecules, such as DNA, proteins, lipids, and carbohydrates.^[1,2] This imbalance is known as oxidative stress (OS) and has been associated to the initiation and development of several diseases with significant morbidity and mortality. Some of them are cancer,^[3] cardiovascular disorders,^[4] atherosclerosis,^[5] and several neurological disorders including Parkinson's and Alzheimer's diseases.^[6] Therefore, it is not surprising that searching for efficient ways of preventing, or reducing, OS and the consequent molecular damage^[7] is a very active area of research.

In particular new protectors against ROS, frequently referred to as antioxidants, with low toxicity are of great interest. Edaravone, also known as MCI-186, (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, EDA, Scheme 1) is among them. It is a synthetic neuroprotective drug developed in Japan, where it has been clinically used since 2001. It was the first free radical scavenger approved for treating acute stroke caused by cerebral thrombosis and embolism.^[8] Since edaravone's appearance, numerous studies have been devoted to investigate its protective effects against OS-related diseases.^[9–14] Other derivatives have also been reported to present free radical scavenging activity and other beneficial properties including antiviral activity, inhibition of the agent of tuberculosis, antitumor effects, and benefits for medical treatment of cancer and related

diseases.^[15–20] Some of them have also been proposed to be even better scavengers than the parent molecule.

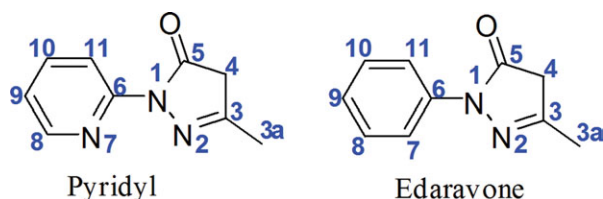
A variety of edaravone derivatives have been synthesized for Nakagawa et al.^[21] with substituents of different nature (electron-withdrawing groups, electron-donating groups, and π -conjugated groups) at sites 1, 3, and 4 of the pyrazolone ring (Scheme 1). They found one derivative, 3-methyl-1-pyridin-2-yl-5-pyrazolone (pyridyl), with better antioxidant activity than edaravone when reacting with $\bullet\text{OH}$ by single electron transfer (SET) in aqueous solution. Hata et al.^[22] determined the rate constants of the reactions of pyridyl and edaravone with oxidative radicals such as $\bullet\text{OH}$ and $\bullet\text{N}_3$. The reported values for the reaction of pyridyl with $\bullet\text{OH}$ and $\bullet\text{N}_3$ were $7.8 \pm 0.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $4.1 \pm 0.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. For the reaction of edaravone with $\bullet\text{OH}$ and $\bullet\text{N}_3$ the reported rate constants are $8.5 \pm 0.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $5.8 \pm 0.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. Thus, they suggested that the antioxidant activity of edaravone is slightly higher than that of pyridyl, contrary to what was proposed by Nakagawa et al.^[21] However, it should be noted that all the aforementioned rate constants correspond to diffusion-controlled reactions. This means that both compounds are excellent for scavenging $\bullet\text{OH}$ but it also means that, because of its very high reactivity, this radical is not the best for comparing the antioxidant activity of different species. In fact, it has been proposed that it

A. Pérez-González, 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 or agal@xanum.uam.mx

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.



Scheme 1. Structures and site numbers of edaravone and pyridyl. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

frequently react within the diffusion-limit regime with a wide variety of chemical compounds, which might lead to misleading conclusions regarding relative antioxidant capacities.^[23,24]

A very important aspect of studying the antioxidant activity of chemical compounds is to identify those with higher activity. Therefore it is the main goal of the present work to perform a systematic study on the relative efficiency of edaravone, and its derivative pyridyl, as free radical scavengers. To that purpose, we have chosen the hydroperoxyl radical ($\cdot\text{OOH}$), which is significantly less reactive than $\cdot\text{OH}$, and therefore, is expected to lead to larger differences between the relative reactivity of the studied compounds. In addition, we have also investigated the reactions of pyridyl with $\cdot\text{OH}$, and use the obtained kinetic data to validate our results. We have considered acid–base equilibria and different mechanisms of reaction. They are: radical adduct formation (RAF), hydrogen transfer (HT), SET, and sequential proton electron transfer (SPET). The main products of reaction have been identified and kinetic data, including branching ratio, are provided.

Computational Details

Geometry optimizations and frequency calculations have been performed using the M05-2X functional and the 6-311++G(d,p) basis set. The M05-2X functional has been recommended for kinetic calculations by their developers,^[25] and it has been also successfully used by independent authors.^[26–32] 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 calculations have been performed to confirm that the transition states properly connect reactants and products. All the electronic calculations were performed with Gaussian 09 package of programs.^[33] 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 the SMD continuum model.^[34] However, for the reactions involving $\cdot\text{OOH}$ geometry optimizations and frequency calculations were also performed in solution, and a comparison between both strategies is provided. To mimic non polar and polar environments, we have used benzene and water as solvents, respectively.

The solvent cage effects have been included according to the corrections proposed by Okuno,^[35] taking into account the free volume theory.^[36] These corrections are in good agreement

with those independently obtained by Ardura et al.^[37] and have been successfully used by other authors.^[38–44]

The rate constants (k) were calculated using conventional transition state theory (TST)^[45–47] and 1 M standard state as:

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

where k_B and h are the Boltzman 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 corrections.^[48]

For the mechanisms involving electron transfers (ETs), the Marcus theory^[49] was used. It relies on the transition state formalism and defines the ET activation barrier ($\Delta G_{\text{ET}}^\ddagger$) as:

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

where ΔG_{ET}^0 is the free energy of reaction and λ is a reorganization term.

Some of the calculated rate constants (k) were found to be close to, or within, the diffusion-limit regime. Accordingly, the apparent rate constant (k_{app}) cannot be directly obtained from TST calculations. In this work, we have used the Collins–Kimball theory for that purpose^[50]:

$$k_{\text{app}} = \frac{k_D k_{\text{act}}}{k_D + k_{\text{act}}} \quad (3)$$

where k_{act} is the thermal rate constant, obtained from TST calculations [Eq. (1)], and k_D is the steady-state Smoluchowski^[51] rate constant for an irreversible bimolecular diffusion-controlled reaction:

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

where R denotes the reaction distance, N_A is the Avogadro number, and D_{AB} is the mutual diffusion coefficient of the reactants A ($\cdot\text{OH}$ or $\cdot\text{OOH}$) and B (EDA or pyridyl). D_{AB} has been calculated from D_A and D_B according to reference,^[52] D_A and D_B have been estimated from the Stokes–Einstein approach^[53]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (5)$$

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

Even though edaravone and its derivatives have three tautomeric neutral forms: *keto*, *enol*, and *amine*; it has been reported that the *keto* form is the prevailing one, with populations higher

than 97%.^[54] Accordingly, it is the only nonionic form considered in this work. In addition, depending on their pKa, their anionic form can also be present to significant extent under physiological conditions. Moreover, this form has been reported to have higher reactivity than the nonionic forms toward free radicals.^[54–56] Therefore, the monoanions must be taken into account to properly assess the free radical scavenging activity of these compounds. According to its pKa value, 6.64,^[57] the populations of the neutral and monoanionic forms of pyridyl at physiological pH (7.4) are 15 and 85%, respectively. Therefore, both have been included in this work for the reactions in aqueous solution, while the neutral (*keto*) form has been used for the study in nonpolar environment. In addition, the free radical scavenging activity of the studied compounds can take place through different mechanisms, as it is the case for many other compounds.^[54,58–62] Those considered in this work are:

-For the reaction involving the neutral species, in lipid medium (**Ik**):

- RAF: $HX + \cdot R \rightarrow [HX - R]^\bullet$
- HT: $HX + \cdot R \rightarrow X^\bullet + HR$
- SET: $HX + \cdot R \rightarrow HX^{\bullet+} + R^-$

-For the reaction involving neutral species, in aqueous solution (**Iik**):

- RAF: $HX + \cdot R \rightarrow [HX - R]^\bullet$
- HT: $HX + \cdot R \rightarrow X^\bullet + HR$
- SET: $HX + \cdot R \rightarrow HX^{\bullet+} + R^-$

-For the reaction involving the monoanions, in aqueous solution (**Ila**):

- RAF: $X^- + \cdot R \rightarrow [X - R]^{\bullet-}$
- HT: $X^- + \cdot R \rightarrow X^\bullet + HR$
- SET: $X^- + \cdot R \rightarrow X^\bullet + R^-$

where X represents the antioxidant and R is the free radical. It should be noted that reaction **Ila**-SET, yield the same edaravone product than reaction **Iik**-HT. Accordingly, reaction **Ila**-SET actually represents a SPET from the neutral species. In addition, the radical cation formed in **Iik**-SET can spontaneously deprotonate yielding the same edaravone product than reactions **Iik**-HT and **Ila**-SET, which would correspond to a sequential electron proton transfer (SEPT). However, even though they yield the same product the influence of the solvent on their feasibility is expected to be different. Although SET, SPET, and SEPT are likely to be favored by polar environments that promote solvation of the intermediate ionic species, in nonpolar media only the HT mechanism would be viable since no charged intermediaries are formed.

Reaction of pyridyl with $\cdot OH$

The Gibbs free energies (ΔG) of the different mechanisms and channels of the pyridyl + $\cdot OH$ reaction are presented in Table 1, together with the corresponding reaction barriers (ΔG^\ddagger). It was found that the SET process from the neutral form of pyridyl is endergonic, regardless of the polarity of the environment. In addition, when the process takes place in nonpolar solution the value of ΔG significantly increases. This is in line with the poor solvation that this kind of solvents can provide to the ionic species formed via SET, as mentioned

Table 1. Gibbs free energies (ΔG) of the pyridyl + $\cdot OH$ reaction, and Gibbs free energies of activation (ΔG^\ddagger), at 298.15 K, in kcal/mol.

	ΔG			ΔG^\ddagger		
	Benzene neutral	Water neutral	Water anion	Benzene neutral	Water neutral	Water anion
SET	84.67	14.86	-16.13		17.61	10.28
HT						
Site 4	-37.71	-38.20		8.39	10.16	
Site 3a	-30.86	-32.96	-30.10	7.27	7.74	7.36
RAF						
Site 3	-29.58	-29.27	-14.57	3.24	5.80	2.16
Site 4			-4.52			8.29
Site 5	-25.92	-25.32	-30.38	13.24	11.24	7.47
Site 6	-10.95	-12.85	-14.25	13.25	9.81	5.75
Site 8	-12.32	-12.92	-13.24	10.19	7.43	6.35
Site 9	-9.20	-10.49	-11.37	6.86	5.26	4.00
Site 10	-4.17	-6.26	-5.25	11.14	10.43	11.15
Site 11	-13.66	-13.03	-12.10	7.37	5.41	1.77

earlier. Conversely, the ET from the anionic form, in aqueous solution was found to be exergonic. The HT and RAF mechanisms were found to be thermodynamically feasible for all the reaction sites in pyridyl, regardless of the polarity of the environment and of the reacting form, neutral or anionic. For the neutral form of pyridyl, HT from site 4 was found to be the most exergonic, and for the RAF mechanism sites 3 and 5 are the most favorable. This trend is the same regardless of the polarity of the environment. Regarding the anionic form the most exergonic channels of reaction were found to be HT from site 3a and RAF on site 5.

Regarding the Gibbs free energies of activation (Table 1), the lowest value for the HT mechanism was found to be that involving site 3a, for both the anionic and the neutral form and in polar as well as in nonpolar environments. For the RAF mechanism the lowest barrier corresponds to the $\cdot OH$ addition to site 3 when the neutral form of pyridyl reacts in nonpolar solutions. When this mechanism takes place in aqueous solution, involving neutral pyridyl, there are three reactions sites (3, 9, and 11) with similar barriers that are significantly lower than those corresponding to the other RAF sites. For the reactions with the anionic pyridyl the lowest barriers are those corresponding to $\cdot OH$ additions on sites 3 and 11. Comparing both forms of pyridyl in aqueous solution, the ΔG^\ddagger values of the reactions involving the anion are systematically lower than those involving the neutral species. The only exception was the $\cdot OH$ addition to site 10. These results suggest a higher reactivity of the deprotonated form of pyridyl, compared to the neutral form. It is interesting to notice that despite of the significant exergonicity of the ET from the anion, the corresponding ΔG^\ddagger value is rather high. This contra-intuitive behavior can be rationalized based on the fact that this point corresponds to the inverted region of the Marcus theory ($\Delta G < -\lambda$).^[63] In fact, the ΔG was found to be significantly lower than $-\lambda$ (19.4 kcal/mol).

The rate constants for the different channels of the pyridyl + $\cdot OH$ reaction, in aqueous and benzene solutions, are reported in Table 2, together with the total and overall rate coefficients, and branching ratios. The total rate coefficients for the reactions

Table 2. Total and overall rate coefficients ($M^{-1} s^{-1}$); and apparent rate constants ($M^{-1} s^{-1}$) and branching ratios (Γ) for the different channels of the pyridyl + $\cdot OH$ reaction, at 298.15 K.

	Rate constants			Branching ratios		
	Benzene neutral	Water neutral	Water anion	Benzene neutral	Water neutral	Water anion
SET		7.71E-01	1.80E+05		~0.00	~0.00
HT						
Site 3a	5.65E+07	2.57E+07	4.83E+07	2.86	1.37	1.12
Site 4	8.74E+06	4.42E+05		0.44	0.02	
RAF						
Site 3	1.75E+09	4.44E+08	1.22E+09	88.72	23.70	28.31
Site 4			7.03E+04			~0.00
Site 5	2.43E+03	7.18E+04	5.62E+05	~0.00	~0.00	0.01
Site 6	2.40E+03	8.02E+05	4.68E+08	~0.00	0.04	10.82
Site 8	4.19E+05	4.28E+07	2.23E+08	0.02	2.28	5.17
Site 9	1.09E+08	7.20E+08	1.13E+09	5.50	38.43	26.20
Site 10	8.48E+04	2.79E+05	8.38E+04	~0.00	~0.01	~0.00
Site 11	4.82E+07	6.40E+08	1.23E+09	2.44	34.13	28.36
Total	2.05E+09	1.88E+09	4.35E+09			
Overall		3.98E+09				
Exp. ^[a]		7.80E+09				

[a] From Ref. [22].

involving the neutral form in nonpolar environment (k_{tot}^{lk}), the neutral form in aqueous solution (k_{tot}^{llk}), and the anionic form in aqueous solution (k_{tot}^{lla}), have been calculated as the sum of the apparent rate constants of the different mechanisms:

$$k_{tot}^{lk} = k_{app}^{lk,HT} + k_{app}^{lk,RAF} \quad (6)$$

$$k_{tot}^{llk} = k_{app}^{lk,SET} + k_{app}^{lk,HT} + k_{app}^{lk,RAF} \quad (7)$$

$$k_{tot}^{lla} = k_{app}^{lla,SET} + k_{app}^{lla,HT} + k_{app}^{lla,RAF} \quad (8)$$

where the apparent rate constants for the different mechanisms have been obtained as the sum of the different channels of reaction. They are those involving sites 3a and 4 for HT, and those involving sites 3-11 for RAF, and have been calculated as detailed in the Computational Details section. It should be noted that the term corresponding to the SET process does not appear in Eq. (6) since this process has been ruled out for non polar media.

To calculate the overall rate coefficient in aqueous solution ($k_{overall}^{ll}$), which would correspond to the rate of disappearance of the reacting radical, both the anionic and the neutral forms of the scavenger must be taken into account. Therefore it has been calculated as:

$$k_{overall}^{ll} = p^k k_{tot}^{llk} + p^a k_{tot}^{lla} \quad (9)$$

where p^k and p^a account for the fractions of the neutral and the anionic forms, at physiological pH.

The branching ratios of the different channels of reaction in aqueous and benzene solutions, which represent the percent contributions of the different channels (i) to the overall reaction, have been calculated as:

$$\Gamma_i = \frac{k_i}{k_{tot}} \times 100 \quad (10)$$

The calculated overall rate coefficient in aqueous solution (Table 2) was found to be only 1.96 times lower than the reported experimental value. This excellent agreement supports the reliability of our results, and validates the methodology used for the calculations. According to our results, the total rate coefficients are very similar, and within the diffusion-limit regime, in solutions of dramatically different polarities. This means that pyridyl is an excellent $\cdot OH$ scavenger regardless of the polarity of the environment. Then, its protective effect, against this very damaging species, is expected to take place both in lipid and aqueous phases of living organisms. In addition it was found that in aqueous solution the anionic form of pyridyl reacts 2.3 times faster with $\cdot OH$ than the neutral form. This is in line with previous reports on the higher free radical scavenging activity of the anionic species.^[54-56] This difference is particularly significant for the SET mechanism, which is a logical finding based on the charge of the electron donor.

Regarding the relative importance of the different mechanisms of reaction, it is predicted that when the reaction takes place in nonpolar environments the main mechanism is RAF, particularly at site 3. This channel was found to account for about 85% of the total reactivity of pyridyl toward $\cdot OH$ in benzene solution. Therefore, the corresponding adduct is expected to be the major product under such conditions. On the contrary, when the reaction takes place in aqueous solution a wider distribution of products is expected. However, the RAF mechanism remains the one contributing the most to the overall reactivity of pyridyl towards $\cdot OH$. In this case, at least three major products are expected to be formed. They are the adducts arising from $\cdot OH$ additions to sites 3, 9 and 11.

Relative free radical scavenging activity of pyridyl. A very important aspect of studying the antioxidant activity of chemical compounds is to identify those with higher activity. To that purpose, it is recommended to compare different scavengers using their reactions with free radicals that are not particularly reactive.^[23,24] For example, if we use their reactions with $\cdot OH$, we might conclude that they have similar reactivity, since the reactions with this radical often are diffusion-controlled. Accordingly, we have used the least reactive of the studied radicals ($\cdot OOH$) to assess the relative activity of the studied compounds.

Compared to edaravone

The Gibbs free energies obtained for the reactions of edaravone and pyridyl with the $\cdot OOH$ radical are reported in the Table 3. For this radical, the SET processes were found to be endergonic in all the cases, including the ET from the anionic

Table 3. Gibbs free energies of the $\bullet\text{OOH}$ reactions with pyridyl and edaravone, at 298.15 K, in kcal/mol.

	Pyridyl			Edaravone		
	Benzene neutral	Water neutral	Water anion	Benzene neutral	Water neutral	Water anion
SET	103.71	38.10	7.11	97.69	32.65	2.87
HT						
Site 4	-5.09	-5.20		-5.29	-5.50	
Site 3a	1.76	0.04	2.91	2.93	1.80	39.71
RAF						
Site 3	0.46	-0.84	10.62	0.08	-0.43	11.91
Site 4			18.31			17.92
Site 5	5.45	7.87	8.62	3.45	6.31	9.01
Site 6	23.30	17.81	25.59	20.72	19.30	19.42
Site 8	17.57	14.03	13.42	19.25	18.52	18.11
Site 9	17.23	16.96	15.16	16.62	15.83	14.45
Site 10	22.43	21.64	22.78	19.02	18.40	18.07
Site 11	15.34	14.17	14.21	16.00	14.76	15.40

species. All the HT and RAF reactions channels, involving the anions were also found to be endergonic, most of them with higher positive values of ΔG than SET. For the reactions of the neutral species, the HT from site 4 was found to be exergonic, while all the other HT channels were found to be non-viable from a thermochemical point of view. This behavior is the same regardless of the polarity of the environment. Regarding the RAF processes only that involving site 3 in the neutral species was found to be exergonic, or rather isoergonic. These results are significantly different than those for the reactions with $\bullet\text{OH}$, for which all the HT and RAF channels of reaction were found to be exergonic. This is in line with the lower reactivity of $\bullet\text{OOH}$, compared to that of $\bullet\text{OH}$.

The channels of reaction described above as endergonic will no longer be considered in this work, 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. In addition, even when endergonic processes might play important roles in biological systems, this particular behavior appears only when there are not parallel reactions more energetically favored. That would be the case for the SET mechanism involving the anionic forms of pyridyl and edaravone in aqueous solution. Therefore, they have been included in the kinetic calculations.

The Gibbs free energies of activation are reported in Table 4. For the SET process, the ΔG^\ddagger value is lower for edaravone than for pyridyl. Conversely, for the HT reaction the values are very similar for both compounds, and lower in benzene than in aqueous solution. This dependence with the polarity of the environments is the same found for the RAF channel. However, in this case while the barriers in aqueous solution are very

Table 4. Gibbs free energies of activation, for the $\bullet\text{OOH}$ reactions with pyridyl and edaravone, at 298.15 K, in kcal/mol.

	Pyridyl			Edaravone		
	Benzene neutral	Water neutral	Water anion	Benzene neutral	Water neutral	Water anion
SET			7.74			5.47
HT						
Site 4	23.34	26.20		23.53	26.31	
RAF						
Site 3	16.41	19.67		18.04	19.50	

similar, in benzene solution that of pyridyl is lower than that of edaravone. In addition for both compounds, the mechanism of reaction leading to the lowest barrier is the ET from the anion, that is, the SPET. This suggests that SPET should be the dominant mechanism involved in the $\bullet\text{OOH}$ scavenging activity of the studied compounds.

The rate constants are presented in Table 5. In non polar environments, pyridyl is predicted to react with $\bullet\text{OOH}$ about

Table 5. Apparent rate constants, total and overall rate coefficients ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) for the $\bullet\text{OOH}$ reactions with pyridyl and edaravone, at 298.15 K.

	Pyridyl			Edaravone		
	Benzene neutral	Water neutral	Water anion	Benzene neutral	Water neutral	Water anion
SET			1.31E+07			5.65E+08
HT						
Site 4	4.68E-02	3.76E-04		3.55E-02	3.26E-04	
RAF						
Site 3	1.16E+01	4.74E-02		7.46E-01	6.29E-02	
Total	1.17E+01	4.77E-02	1.31E+07	7.81E-01	6.32E-02	5.65E+08
Overall		1.11E+07			4.30+08	

15 times faster than edaravone. However, in such media both scavenging processes are predicted to be rather slow. These results are dramatically different from those previously described for the reactions with $\bullet\text{OH}$. For the latter, the equivalent reactions were found to be diffusion-controlled. This is in line with the relative reactivity of these radicals. In aqueous solution, both $\bullet\text{OOH}$ scavenging processes are very fast, with overall rate coefficients larger than $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In this case, edaravone was found to react about 39 times faster than pyridyl. This inversion on reactivity demonstrates the strong influence of the solvent not only on the absolute efficiency of the studied compounds as free radical scavengers, but also on their relative reactivity. The presence of water in this case is directly related to the formation of the anionic forms of pyridyl and edaravone, which are significantly more reactive than the neutral species due to the SET mechanism. According to their pKas the fraction of the anionic form would be 0.85 and 0.76 for pyridyl and edaravone, respectively, at physiological pH. According to the results in Table 6, regarding the antioxidant activity, the anions are the active forms. Moreover, they are predicted to react exclusively via ET. Therefore, in aqueous solution the mechanism of reaction responsible for the

Table 6. Gibbs free energies of activation, for the $\cdot\text{OOH}$ reactions with pyridyl and edaravone, at 298.15 K, in kcal/mol, using geometry optimizations and frequency calculations in solution.

	Pyridyl			Edaravone		
	Benzene neutral	Water neutral	Water anion	Benzene neutral	Water neutral	Water anion
SET			7.18			6.44
HT						
Site 4	21.74	24.16		24.62	24.32	
RAF						
Site 3	16.32	19.69		19.23	18.51	

$\cdot\text{OOH}$ scavenging activity of pyridyl, and also of edaravone, is the SPET.

Compared to other compounds

As mentioned earlier, in nonpolar environments pyridyl is a poor $\cdot\text{OOH}$ scavenger. In such environments, which represents the lipidic phase in living organism, its activity was found to be lower than that of carotenes ($\sim 10^5\text{--}10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[64] canolol ($6.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[65] sinapinic acid ($1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[66]; and melatonin ($3.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[67]; similar to that of caffeine ($3.2 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[62] and higher than that of its parent compound, edaravone ($7.46 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 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 $1.18\text{--}3.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,^[68] pyridyl, is predicted to be rather inefficient for protection against peroxy oxidation of lipids. This would also be the case of edaravone, melatonin and caffeine.

On the contrary, in aqueous solution the peroxy radical scavenging activity of pyridyl is predicted to be excellent. It was found to be higher than that of carotenes ($\sim 10^4\text{--}10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[64] sinapinic acid ($5.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[66] allicin ($7.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), and thioacrolein ($2.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[69]; much higher than that of melatonin ($2.0 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[67] and caffeine ($3.3 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[62]; and similar to that of 2-propenesulfenic acid ($2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[69] and glutathione ($2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[70] which are exceptionally good for scavenging $\cdot\text{OOH}$. However, edaravone is predicted to be even better, supporting the proposal of Hata et al.^[22] According to these comparisons, both edaravone and pyridyl are among the best peroxy radical scavengers in aqueous solution.

Testing the influence of performing all calculations in solution. We have tested how different our main results could be if geometry optimizations, and frequency calculations, were performed in solution. For that test, we have chosen the reactions with $\cdot\text{OOH}$ because of the lower rate constants, which make the calculated values more sensitive to the used approach. These calculation have been performed at the same level of theory, M05-2X/6-311++G(d,p). The geometries of the reactant and transition states obtained from both approaches are shown in Supporting Information

Figures S5–S8. It was found that the mean unsigned differences for the main distances involved in the TSs are 0.017 (0.210) Å for benzene (and water) solution, with the largest deviations arising from the H-bond-like interactions, 0.035 (0.573) Å. A similar analysis was performed for the isolated reactants. It was found that the mean unsigned differences for the distances and angles are 0.001 (0.004) Å, and 0.117 (0.488)°. This agreement supports the implicit assumption made within Approach 1 that gas phase geometries are close enough to solution geometries for the studied species.

The Gibbs free energies of activation (ΔG^\ddagger), obtained when all calculations were performed in solution, are shown in Table 6 (Approach 2). Comparing these values with those reported in Table 4 (Approach 1), it can be observed that not only the general trends remain but also the individual values are in good agreement. The correlation between the values calculated using these approaches is actually very good (Fig. 1),

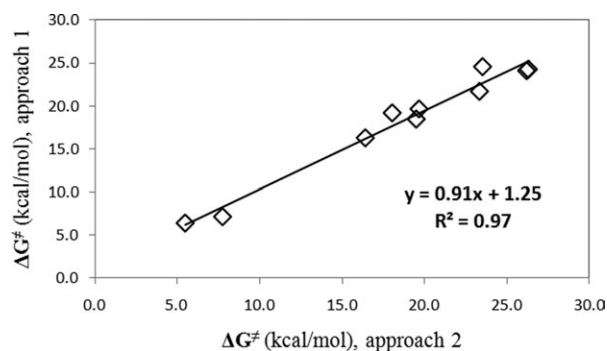


Figure 1. Correlation between the ΔG^\ddagger values calculated using approaches 1 and 2.

with $R^2 = 0.97$. The value of the average unsigned deviation was found to be 1.05 kcal/mol, which is within the currently accepted chemical accuracy. The largest unsigned deviation (~ 2 kcal/mol) corresponds to HT from site 4, in aqueous solution. For the SET processes from the anionic forms, which are the most important channels in the present case, the differences are 0.56 and 0.97 kcal/mol for pyridyl and edaravone, respectively. These deviations are within the average mean unsigned errors reported for M05-2X (0.99 kcal/mol, in gas phase).^[25]

Table 7. Apparent rate constants, total and overall rate coefficients ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) for the $\cdot\text{OOH}$ reactions with pyridyl and edaravone, at 298.15 K, using geometry optimizations and frequency calculations in solution.

	Pyridyl			Edaravone		
	Benzene neutral	Water neutral	Water anion	Benzene neutral	Water neutral	Water anion
SET			3.35E+07			1.16E+08
HT						
Site 4	2.34E-00	3.93E-02		2.06E-02	3.42E-02	
RAF						
Site 3	1.34E+01	4.61E-02		9.95E-02	3.34E-01	
Total	1.58E+01	8.53E-02	3.35E+07	1.20E-01	3.68E-01	1.16E+08
Overall		2.85E+07		8.79+07		

The rate constants obtained from using the Approach 2 are reported in Table 7. As expected based on the above discussion on ΔG^\ddagger , the general trends are the same than those arising from using the Approach 1 (Table 5). A good correlation between the compared values was obtained for the rate constants (Fig. 2). The R^2 value is 0.96, the slope is close to 1 and

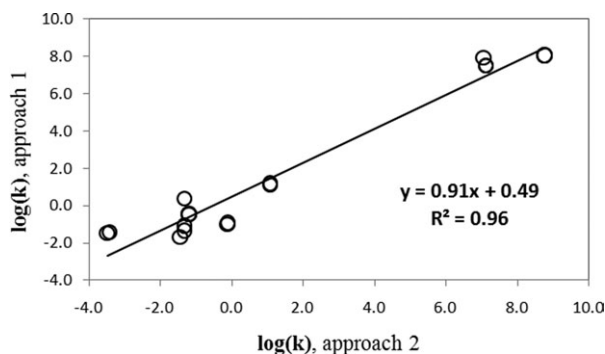


Figure 2. Correlation between the values of the rate constants calculated using approaches 1 and 2.

the intercept is close to zero. The differences in the individual values corresponding to the different channels, and in particular to HT from site 4, are larger in this case, compared to ΔG^\ddagger , because of the exponential dependence of k with ΔG^\ddagger . However, since the largest differences involve the least important channels, the values of the overall rate coefficients are in good agreement. In nonpolar environments, both compounds are rather poor $\bullet\text{OOH}$ scavengers, with pyridyl reacting faster than edaravone. In aqueous solution, both are excellent $\bullet\text{OOH}$ scavengers ($k > 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), with edaravone reacting faster than pyridyl. Accordingly, the conclusions of this work remain the same regardless of the used approach.

Conclusions

We have studied the reactions of pyridyl with $\bullet\text{OH}$ and $\bullet\text{OOH}$ in benzene and aqueous solutions. For the polar environment, the acid–base equilibria have been taken into account. Different mechanisms of reaction have been considered. They are: RAF, HT, SET, and SPET.

It was found that the reaction of pyridyl with $\bullet\text{OH}$ is diffusion-controlled, with rates coefficients equal to 2.05×10^9 and $3.98 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, for benzene and aqueous solutions, respectively. These values are in very good agreement with the available experimental data, and are very similar to those of edaravone. Accordingly they are both predicted to be excellent $\bullet\text{OH}$ scavengers, regardless of the polarity of the environment.

Because of the high reactivity of the $\bullet\text{OH}$ radical, we have chosen $\bullet\text{OOH}$ for estimating the relative efficiency of these compounds as free radical scavengers. In this case, the polarity of the environment has a major influence on the activity of the studied compounds. Even though the $\bullet\text{OOH}$ scavenging activity of pyridyl was found to be about 15 times higher than that of edaravone, in non-polar environments, they are both predicted to be rather poor $\bullet\text{OOH}$ scavengers in such media.

On the contrary, they are predicted to be excellent $\bullet\text{OOH}$ scavengers in aqueous solution, with rates constants higher than $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In this case, edaravone was found to react 39 times faster than pyridyl. However, they were both found to be among the best peroxy radical scavengers in such medium.

The outstanding $\bullet\text{OOH}$ scavenging activity of these compounds was attributed to the presence of their anionic forms, which are much more reactive than the neutral species. In addition these reactions were found to take place almost exclusively by the SPET mechanism.

The results from the present work indicate the importance of considering the acid–base equilibria of the reacting compounds to properly investigate their antioxidant activity in aqueous solution with computational techniques. If such equilibria were ignored for the reactions of pyridyl and edaravone, their free radical scavenging activity would be seriously underestimated. This is especially important when the studied reactions involve free radicals that are not particularly reactive.

Acknowledgments

The authors thank Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo at UAM - Iztapalapa for the access to its computer facilities and project SEP-CONACyT 167491. A. P.-G. acknowledges CONACyT for Doctoral fellowship.

Keywords: pyridyl · edaravone · free radicals · scavenging activity · antioxidant

How to cite this article: A. Pérez-González, A. Galano, *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 3441–3448. DOI: 10.1002/qua.24046

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

- [1] S. C. Marcus, D. E. Mark, D. Miral, L. Joseph, *FASEB J.* **2003**, *17*, 1195.
- [2] D. Mukul, B. Kishore, P. R. Naveen, M. S. Lalit, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1722*, 209.
- [3] (a) N. F. Boyd, V. McGuire, *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 185; (b) R. L. Nelson, *Free Radical Biol. Med.* **1992**, *12*, 161; (c) P. Knekt, A. Reunanen, H. Takkinen, A. Aromaa, M. Heliövaara, T. Hakuunen, *Int. J. Cancer* **1994**, *56*, 379; (d) G. S. Omenn, G. E. Goodman, M. D. Thornquist, *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1150; (e) M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telsler, *Mol. Cell Biochem.* **2004**, *266*, 37; (f) M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, J. Telsler, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, *39*, 44; (g) B. Halliwell, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1147.
- [4] (a) R. A. Riemersma, D. A. Wood, C. C. A. Macintyre, R. A. Elton, K. F. Gey, M. F. Oliver, *Lancet* **1991**, *337*, 1; (b) J. T. Salonen, K. Nyyssoner, H. Korpela, J. Tuomilehto, R. Seppanen, R. Salonen, *Circulation* **1992**, *86*, 803; (c) D. A. Street, G. Comstock, R. Salkeldy, M. Klag, *Circulation* **1994**, *90*, 1154; (d) L. H. Kushi, A. R. Folsom, R. J. Prineas, P. J. Mink, Y. Wu, R. Bostick, *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1156; (e) N. G. Stephens, A. Parsons, P. M. Schofield, F. Kelly, K. Cheesman, M. J. Mitchinson, M. J. Brown, *Lancet* **1996**, *347*, 781.
- [5] (a) O. M. Panasenka, T. V. Nova, O. A. Azizova, Y. A. Vladimirov, *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *10*, 137; (b) D. Steinberg, *Circulation* **1991**, *84*, 1421; (c) D. R. Janero, *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *11*, 129; (d) H. N. Hodis, W. J. Mack, L. LaBree, L. Cashin-Hemphill, A. Sevanian, R. Johnson, S. Azen, *J. Am. Med. Assoc.* **1995**, *273*, 1849.
- [6] (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. A. Butterfield, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 495; (c) D. S. Fay, A. Fluet, C. J. Johnson, C. D. Link, *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 1616; (d) B. Halliwell, *Drugs Aging* **2001**, *8*, 685; (e) D. A. Butterfield, *Free Radical Res.* **2002**, *36*, 1307.
- [7] B. S. Astley, G. David, *Mol. Aspec Med.* **2002**, *23(Suppl)*, 1.
- [8] T. Watanabe, M. Tahara, S. Todo, *Cardiovasc. Ther.* **2008**, *26*, 101.
- [9] Y. Higashi, D. Jitsuikia, K. Chayamab, M. Yoshizumia, *Recent Patents Cardiovas. Drug Discov.* **2006**, *1*, 85.
- [10] (a) A. K. Saini, R. J. Patel, S. S. Sharma, A. Kumar, *Pharmacol. Res.* **2006**, *54*, 6; (b) A. K. Saini, A. Kumar, S. S. Sharma, *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *568*, 164.
- [11] M. K. Sinha, H. K. Anuradha, R. Juyal, R. Shukla, R. K. Garg, A. M. Kar, *Neurol. Asia* **2009**, *14*, 7.
- [12] N. Zhang, M. Komine-Kobayashi, R. Tanaka, M. Liu, Y. Mizuno, T. Urabe, *Stroke* **2005**, *36*, 2220.
- [13] J. I. Noora, Y. Ueda, T. Ikeda, T. Ikenoue, *Neurosci. Lett.* **2007**, *414*, 5.
- [14] H. Kono, C. G. Woods, A. Maki, H. D. Connor, R. P. Mason, I. Rusyn, H. Fujii, *Free Radical Res.* **2006**, *40*, 579.
- [15] K. Sujatha, G. Shanthi, N. P. Selvam, S. Manoharan, P. T. Perumal, M. Rajendran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4501.
- [16] X. Fan, X. Zhang, L. Zhou, K. A. Keith, E. R. Kern, P. F. Torrence, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3224.
- [17] D. Castagnolo, F. Manetti, M. Radi, B. Bechi, M. Pagano, De A. Logu, R. Meleddu, M. Saggi, M. Botta, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5716.
- [18] R. Tripathy, A. Ghose, J. Singh, E. R. Bacon, T. S. Angeles, S. X. Yang, M. S. Albom, L. D. Aimone, J. L. Herman, J. P. Mallamo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1793.
- [19] V. Markovic, S. Eric, Z. D. Juranic, T. Stanojkovic, L. Joksovic, B. Rankovic, M. Kosanic, M. D. Joksovic, *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 18.
- [20] Y. Kakiuchi, N. Sasaki, M. Satoh-Masuoka, H. Murofushi, K. Murakami-Murofushi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 1351.
- [21] H. Nakagawa, R. Ohyama, A. Kimata, T. Suzuki, N. Miyata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5939.
- [22] K. Hata, M. Lin, Y. Katsumura, Y. Muroya, H. Fu, S. Yamashita, H. Nakagawa, *J. Radiat. Res.* **2011**, *52*, 15.
- [23] R. C. Rose, A. M. Bode, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1135.
- [24] A. Galano, D. X. Tan, R. J. Reiter, *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 1.
- [25] Y. Zhao, N. E. Schultz, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364.
- [26] C. Zavala-Oseguera, J. R. Alvarez-Idaboy, G. Merino, A. Galano, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13913.
- [27] E. Velez, J. Quijano, R. Notario, E. Pabón, J. Murillo, J. Leal, E. Zapata, G. Alarcón, *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 971.
- [28] A. Vega-Rodríguez, J. R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7649.
- [29] A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5114.
- [30] G. Black, J. M. Simmie, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1236.
- [31] T. Furuncuoglu, I. Ugur, I. Degirmenci, V. Aviyente, *Macromolecules* **2010**, *43*, 1823.
- [32] A. Galano, N. A. Macías-Ruvalcaba, O. N. M. Campos, J. Pedraza-Chaverri, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6625.
- [33] 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, Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. 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, D. J. Fox, Gaussian 09, Revision A.08; Gaussian: Wallingford CT, **2009**.
- [34] A. V. Marenich, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378.
- [35] Y. Okuno, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 210.
- [36] S. W. Benson, In *The Foundations of Chemical Kinetics*; McGraw-Hill: New York, **1960**; Chapter XV, pp 504.
- [37] D. Ardura, R. Lopez, T. L. Sordo, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23618.
- [38] J. R. Alvarez-Idaboy, L. Reyes, J. Cruz, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1763.
- [39] J. R. Alvarez-Idaboy, L. Reyes, N. Mora-Diez, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3682.
- [40] A. Galano, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1677.
- [41] A. Galano, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 8922.
- [42] A. Galano, A. Cruz-Torres, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 732.
- [43] A. Galano, M. Francisco-Márquez, *Chem. Phys.* **2008**, *345*, 87.
- [44] N. Mora-Diez, S. Keller, J. R. Alvarez-Idaboy, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3682.
- [45] H. Eyring, *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107.
- [46] M. G. Evans, M. Polanyi, *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 875.
- [47] D. G. Truhlar, W. L. Hase, J. T. Hynes, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664.
- [48] D. G. Truhlar, A. Kuppermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1840.
- [49] (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.
- [50] F. C. Collins, G. E. Kimball, *J. Colloid Sci.* **1949**, *4*, 425.
- [51] M. Smoluchowski, *Z. Phys. Chem.* **1917**, *92*, 129.
- [52] D. G. Truhlar, *J. Chem. Educ.* **1985**, *62*, 104.
- [53] (a) A. Einstein, *Ann. Phys (Leipzig)* **1905**, *17*, 549; (b) G. G. Stokes, In *Mathematical and Physical Papers, Vol.3*; Cambridge University Press: Cambridge, **1903**; pp. 55.
- [54] A. Pérez-González, A. Galano, *J. Phys. Chem.* **2011**, *115*, 1306.
- [55] Y. Yamamoto, T. Kuwahara, K. Watanabe, *Redox Rep.* **1996**, *2*, 333.
- [56] S. Abe, K. Kirima, K. Tsuchiya, M. Okamoto, Hasegawa, T. H. Houchi, M. Yoshizumi, T. Tamaki, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 186.
- [57] A. Pérez-González, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10375.
- [58] M. Belcastro, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, *Theor. Chem. Acc.* **2006**, *115*, 361.
- [59] M. Leopoldini, N. Russo, S. Chiodo, M. Toscano, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6343.
- [60] M. Leopoldini, F. Rondinelli, N. Russo, M. Toscano, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8862.
- [61] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, *Food Chem.* **2011**, *125*, 288.
- [62] J. R. León-Carmona, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4538.
- [63] (a) R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265; (b) R. A. Marcus, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1111; (c) J. Ulstrup, J. Jortner, *J. Chem. Phys.* **1975**, *63*, 4358.
- [64] A. Galano, M. Francisco-Márquez, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 11338.
- [65] A. Galano, M. Francisco-Márquez, J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8590.
- [66] A. Galano, M. Francisco-Márquez, J. R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 11199.
- [67] A. Galano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 7147.
- [68] A. D. N. de Grey, *J. DNA Cell Biol.* **2002**, *21*, 251.
- [69] A. Galano, M. Francisco-Márquez, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16077.
- [70] A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, *RSC Adv.* **2011**, *1*, 1763.

Received: 18 December 2011

Revised: 11 January 2012

Accepted: 23 January 2012

Published online on 6 March 2012

On the hydroperoxyl radical scavenging activity of two Edaravone derivatives: mechanism and kinetics

Adriana Pérez-González^a and Annia Galano^{a*}

The free radical scavenging activity of two Edaravone (EDA) derivatives (C1 and D1) has been studied in aqueous and lipid solutions using the Density Functional Theory. Different mechanisms of reaction have been considered, as well as the acid/base equilibrium in aqueous solution. The studied compounds were found to be rather poor ·OOH scavengers in non-polar environments, but better than the parent molecule, EDA, which suggests that the peroxy scavenging activity of this kind of compounds in lipid media could be increased via structural modifications. In aqueous solution, at physiological pH, D1 is predicted to be a better peroxy scavenger than C1, and slightly better than its parent molecule, EDA. Their excellent activity, under such conditions, is attributed to the electron transfer from their anionic forms. D1 was found to be among the best peroxy scavengers known so far, with a rate constant for its reaction with ·OOH near the diffusion limit regime ($2.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: antioxidant; edaravone derivatives; oxidative stress; peroxy radicals; rate constants

INTRODUCTION

Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, EDA) is an effective neuroprotective drug recently developed in Japan^[1] that has been proven to present beneficial effects against several diseases related to oxidative stress (OS).^[2–8] This dangerous chemical stress can be defined as the imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and their removal.^[9] Numerous investigations have been devoted in the last decades to the study of OS because of the increasing amount of evidences supporting its role in the onset and development of a large variety of health disorders, including cancer,^[10–13] cardiovascular disorders,^[14–17] atherosclerosis,^[18–21] fetal growth restriction and pre-eclampsia,^[22–24] and several degenerative neurological disorders including Parkinson's and Alzheimer's diseases.^[25–27] Because OS often involves reactions between free radicals and molecules of high biological importance such as DNA, proteins, and lipids, the study of compounds with free radical scavenging activity becomes an important area of research aiming to prevent OS and the consequent molecular damage.

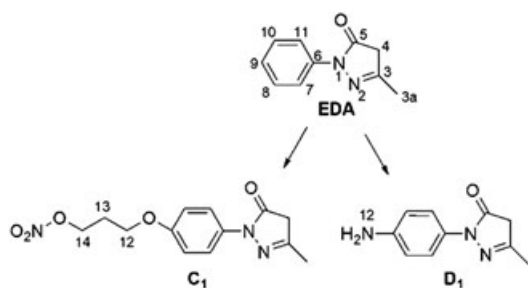
EDA has been proven to protect against the retinal damage caused by OS, both *in vitro* and *in vivo*,^[28] and to attenuate OH radical stress in diabetic rats.^[3,4] It has been demonstrated that EDA efficiently suppresses lipid peroxidation^[6,7] and oxidative DNA damage.^[6] It has also been proven to effectively block free radicals in the liver,^[8] and it has been shown that repeated treatment with EDA reduces oxidative cell damage in rat brain.^[29] Its beneficial effects on the atherosclerotic process in patients with cardiovascular diseases have been recently reviewed.^[2] The beneficial effects of EDA have been attributed to its free radical scavenging ability^[30–34] because it has been reported to be very reactive towards reactive oxidative species (ROS) such as hydroxyl and peroxy radicals. This high reactivity towards ROS has also drawn attention to the potential use of this compound as radioprotector.^[35,36]

Because EDA seems to be a very promising chemical agent to fight OS, the interest on the antioxidant capacity of its derivatives has also been increased. Some EDA derivatives have been reported to present free radical scavenging activity and other beneficial properties including antiviral activity, inhibition of the agent of tuberculosis, antitumor effects, and benefits for treating cancer and related diseases.^[37–42] In particular, Chegaev *et al.*^[43] synthesized a series of EDA derivatives with NO-donor moieties and found them to have high antioxidant capabilities and NO-dependent vasodilator properties. They even proposed that the antioxidant activity of some of these derivatives is better than that of their parent molecule. The derivative referred to as C1 in this work (3-(4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1-pyrazol-1-yl)phenoxy) propyl nitrate; Scheme 1) was found to be among the best ones. This is in agreement with previous results from our group based on the electron-donating capability and ease of deprotonation for a large set of EDA derivatives,^[44] as well as on the kinetic of their single electron transfer (SET) reactions with free radicals of different nature in aqueous solution.^[45] In both works, C1 was found to be one of the best possible free radical scavengers among the studied EDA derivatives.

According to the results from those previous works,^[44,45] there is another EDA derivative, here referred to as D1 (1-(4-aminophenyl)-3-methyl-1-pyrazol-5-one, Scheme 1), that is also among those with highest free radical scavenging activity via SET. However, in

* Correspondence to: Annia Galano, Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina, CP 09340, Mexico D.F., Mexico. E-mail: agal@xanum.uam.mx

^a A. Pérez-González, A. Galano
Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina, CP 09340, Mexico, D.F., Mexico



Scheme 1. EDA derivatives, C1 and D1

those works, the free radical scavenging activity of these compounds through hydrogen transfer (HT) or radical adduct formation (RAF) mechanisms were not investigated; and to our best knowledge, there is no information available on the possible role of such mechanisms on the free radical scavenging activity of EDA derivatives.

Therefore, in the present work different mechanisms of reaction have been studied, including HT, RAF, SET, and sequential proton electron transfer (SPET). In addition, the acid–base equilibria of EDA derivatives have been taken into account to investigate the importance of the pH of the environment on their activity, as well as to identify the relative activity of the acid–base forms of the studied compounds. This seems to be another important aspect of the reactivity of these compounds, because it has been suggested that the anionic form of the parent molecule, EDA, is more reactive than its non-ionic form.^[30,46] The main products of reaction have been identified; and kinetic data, including branching ratios, are provided. The main goal of this investigation is to assess the relative efficiency of EDA and its derivatives C1 and D1, as free radical scavengers, because the identification of chemical compounds with the highest activity is a very important aspect of studying their protective effects against OS, and thus for designing efficient strategies to ameliorate its deleterious effects.

To that purpose, we have chosen the hydroperoxyl radical (HOO·) because it is the simplest of the peroxy radicals (ROO·), which are among the free radicals of biological relevance that can be effectively scavenged to retard OS.^[47] This is because they have not too short half-lives, which is required for an efficient interception by chemical scavengers.^[48] ROO· are formed within living organisms, where they are involved in DNA cleavage and protein backbone modification.^[49] They are also involved in the oxidation of lipoproteins and biological membranes and had been held responsible for microvascular damage.^[50] In the particular case of HOO·, it has been suggested that they are central to the toxic side effects of aerobic respiration.^[51] It has also been pointed out that more information on the reactivity of this species is needed.^[51] In addition, radicals of intermediate to low reactivity have been recommended for studying the relative scavenging activity of different compounds.^[52,53] This is because when reacting with highly reactive radicals, such as ·OH, there is a large variety of compounds that would react at similar rates (close to the diffusion-limit). Thus, comparisons based on such reactions might lead to misconclude that all the analyzed compounds are equally efficient as antioxidants even when that might not be the case for a wider variety of free radicals. Moreover, it has been proposed that such highly reactive radicals cannot be intercepted in biological systems with reasonable efficiency.^[51]

COMPUTATIONAL DETAILS

Geometry optimizations and frequency calculations have been carried out using the M05-2X functional. The M05-2X functional has been recommended for kinetic calculations by their developers^[54] and it has been also successfully used by independent authors.^[55–61] It is also among the best performing functionals for calculating reaction energies involving free radicals.^[62] 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 calculations have been performed to confirm that the transition states properly connect reactants and products. All the electronic calculations were performed with the Gaussian 09 package of programs.^[63]

Thermodynamic corrections at 298 K were included in the calculation of relative energies. First, the stationary points were optimized in solution using the 6–31+G(d,p) basis set; next, we have performed single point (SP) calculations in solution using 6–311++G(d,p) basis set, and solvent effects were included using the continuum solvation model density (SMD).^[64] They have been performed by using pentyl ethanoate and water as solvents to mimic lipid and polar environments, respectively. SMD is considered a universal solvation model because of its applicability to any charged or uncharged solute in any solvent or liquid medium for which a few key descriptors are known.^[64] The solvent cage effects have been included according to the corrections proposed by Okuno,^[65] taking into account the free volume theory.^[66] These corrections are in good agreement with those independently obtained by Arduro *et al.*^[67] and have been successfully used by other authors.^[68–74]

The rate constants (k) were calculated using the conventional Transition State Theory (TST)^[75–77] and 1 M standard state. Reaction path degeneracies, accounting for the number of equivalent reaction paths, and tunneling corrections have been included in the calculations. 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.^[78]

Some of the calculated rate constants (k) values were found to be close to the diffusion-limited rate constant. 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 for that purpose^[79]

$$k_{app} = \frac{k_D k_{act}}{k_D + k_{act}} \quad (1)$$

where k_{act} is the thermal rate constant obtained from TST calculations, and k_D is the steady-state Smoluchowski^[80] rate constant for an irreversible bimolecular diffusion-controlled reaction:

$$k_D = 4\pi R D_{AB} N_A \quad (2)$$

where R denotes the reaction distance, N_A is the Avogadro number, and D_{AB} is the mutual diffusion coefficient of the reactants A (·OOH radical) and B (radical scavenger). D_{AB} has been calculated from D_A and D_B according to reference,^[81] D_A and D_B have been estimated from the Stokes–Einstein approach^[82,83]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (3)$$

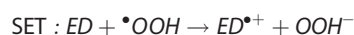
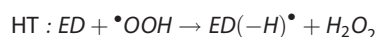
where k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, η denotes the viscosity of the solvent, in our case water ($\eta = 8.91 \times 10^{-4}$ Pa s) and pentyl ethanoate ($\eta = 8.62 \times 10^{-4}$ Pa s), and a the radius of the solute.

RESULTS AND DISCUSSION

Edaravone and its derivatives have three tautomeric neutral forms: amine, keto, and enol.^[34,84] The prevailing one among them is the keto form, with a population ~97%.^[85] Therefore, it

is the only non-ionic form considered in this work. In addition, depending on their pKa, their anionic form can also be present to significant extent under physiological conditions. Moreover, this form has been reported to have higher reactivity than the non-ionic forms towards free radicals.^[30,32,85] Therefore, the mono-anions must be taken into account to properly assess the free radical scavenging activity of these compounds, and the influence of pH on such activity.

According to their pKa values (pKa-C1 = 7.18 and pKa-D1 = 7.32),^[44] the populations of the neutral (and mono-anionic forms) of C1 and D1 at physiological pH (7.4) are 38% (62%) and 45% (55%), respectively. Therefore, both forms have been included in this work for the reactions in aqueous solution, whereas the neutral (*keto*) form have been used for the study in non-polar environment. In addition, as mentioned in the Introduction section, the free radical scavenging activity of the studied compounds can take place through different mechanisms, as it is the case for many other compounds.^[86–90] Those considered in this work are



where ED represents the EDA derivatives C1 and D1. The SPET mechanism corresponds to SET from the anionic forms of the ED.

The Gibbs energies of reaction for the different mechanisms and reaction sites are shown in Table 1. In non-polar media, the HT reaction from site 4 and the RAF reaction at site 3 were found to be exergonic for C1, with the largest exergonicity corresponding to HT from site 4. For D1, this is also the most thermochemically favored reaction path, whereas RAF at site 3 is almost isoergonic. In this media, the SET mechanism is not expected to be a likely process because such environments do

not promote the necessary solvation of the intermediate ionic species yielded by this mechanism. However, just to prove this point, the Gibbs energy of reaction (ΔG) for the SET process was calculated and found to be larger than 50 kcal mol^{-1} for both C1 and D1. These values definitively rule out the SET mechanism as viable for the scavenging activity of C1 and D1 in lipid media.

In aqueous solution, when the neutral form of C1 and D1 are the reacting ones, ΔG values are considerably lower than those in lipid media albeit the SET mechanism remains significantly endergonic. For the anionic species, on the other hand, even though the ΔG values remain positive, they are small ($<4 \text{ kcal mol}^{-1}$), which suggests that the SET process might be relevant in this case. For the neutral species in the aqueous solution, the HT from site 4 is the most exergonic process for both C1 and D1. In addition, the HT from their 3a site was found to be almost isoergonic, as well as RAF at site 3 for D1 in pentyl ethanoate solution. For the anionic species, all the RAF and HT channels were found to be endergonic, which indicates that when deprotonated, these mechanisms are not expected to contribute to the overall $\cdot\text{OOH}$ scavenging activity of C1 and D1.

For the kinetic study, we have not included the reaction paths described earlier as endergonic because, even if they take place at significant rates, 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 further stages are sufficiently exergonic to provide a driving force, and if their barriers of reactions are low. This could be the case for the SET reactions in aqueous solution because they yield reactive species and take place at relative large reaction distances. In addition, slightly endergonic processes can be important when there are no exergonic competing paths. This is the case of the SET reactions for the anionic species. Therefore, such processes have also been included in the kinetic calculations.

Table 1. Gibbs free energies of reaction (ΔG , kcal mol^{-1}), at 298.15 K

	C1			D1		
	PE neutral	Water neutral	Water anion	PE neutral	Water neutral	Water anion
SET	66.34	25.93	3.10	53.70	14.62	1.98
HT						
Site 3a	1.85	-0.78	2.12	0.93	-0.81	2.13
Site 4	-4.61	-5.83		-6.23	-6.50	
Site 12	10.49	9.57	9.19	5.03	3.21	0.45
Site 13	11.78	9.50	9.53			
Site 14	13.29	11.84	11.74			
RAF						
Site 3	-1.27	4.84	12.62	-0.01	-1.58	11.97
Site 5	7.28	10.20	10.52			9.58
Site 6	18.86	17.12	16.10	15.89	13.90	13.02
Site 7	16.74	15.58	12.53	16.44	16.85	13.99
Site 8	18.94	17.32	16.70	16.10	13.68	13.20
Site 9	13.80	13.44	12.04	15.68	15.58	12.94
Site 10	16.36	14.60	15.28	15.46	12.88	13.10
Site 11	16.55	16.40	12.28	16.44	16.85	11.70

PE, pentyl ethanoate; SET, single electron transfer; HT, hydrogen transfer; RAF, radical adduct formation.

The optimized geometries of the transition states (TS) corresponding to the reactions of C1 and D1 are provided in Figures 1 and 2, respectively. Some of the located transition states present hydrogen bonding (HB) like interactions. For the C1 reactions (Figure 1), the TS corresponding to HT from site C4 in pentyl ethanoate is the only one with this kind of interaction, which involves the H atom in the $\cdot\text{OOH}$ radical and the O atom in the pyrazol group ($d_{\text{O}\cdots\text{H}}=2.070\text{ \AA}$). For the equivalent TS in aqueous

solution, the distance between these two atoms becomes too long ($d_{\text{O}\cdots\text{H}}=3.040\text{ \AA}$), and the interaction vanishes. For the transition states corresponding to HT from site 3a, in aqueous solution, and to RAF at site 3, in lipid solution, the shortest distance involves the N atoms in the pyrazol group ($d_{\text{H}\cdots\text{N}_2}=2.931$ and $d_{\text{H}\cdots\text{N}_1}=2.907\text{ \AA}$, respectively). These distances are also too long for a proper HB.^[91]

For the D1 reactions (Figure 2), the characteristics of the transition states are very similar to what was described for C1. The TS

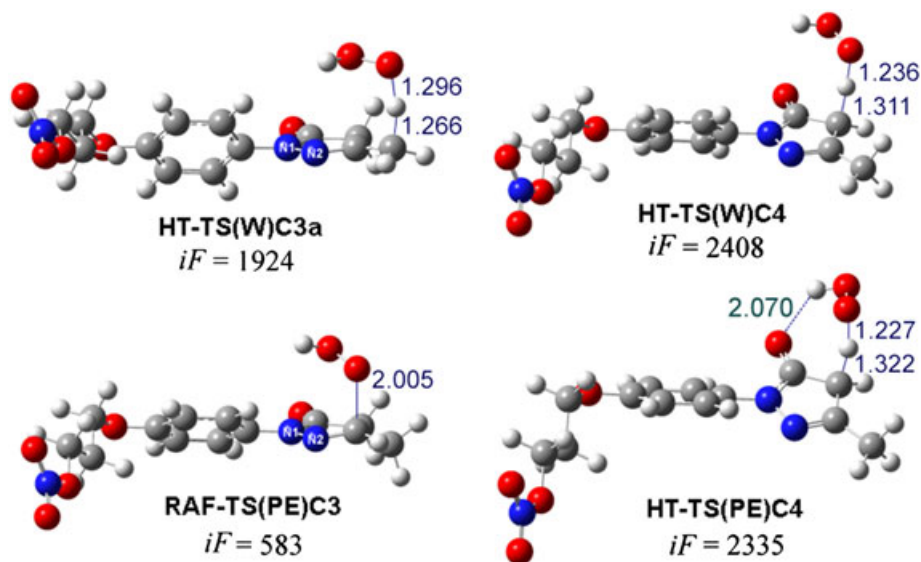


Figure 1. Optimized geometries of the transition states corresponding to C1 derivative in water (W) and pentyl ethanoate (PE) solution. Imaginary frequencies (*iF*) in cm^{-1}

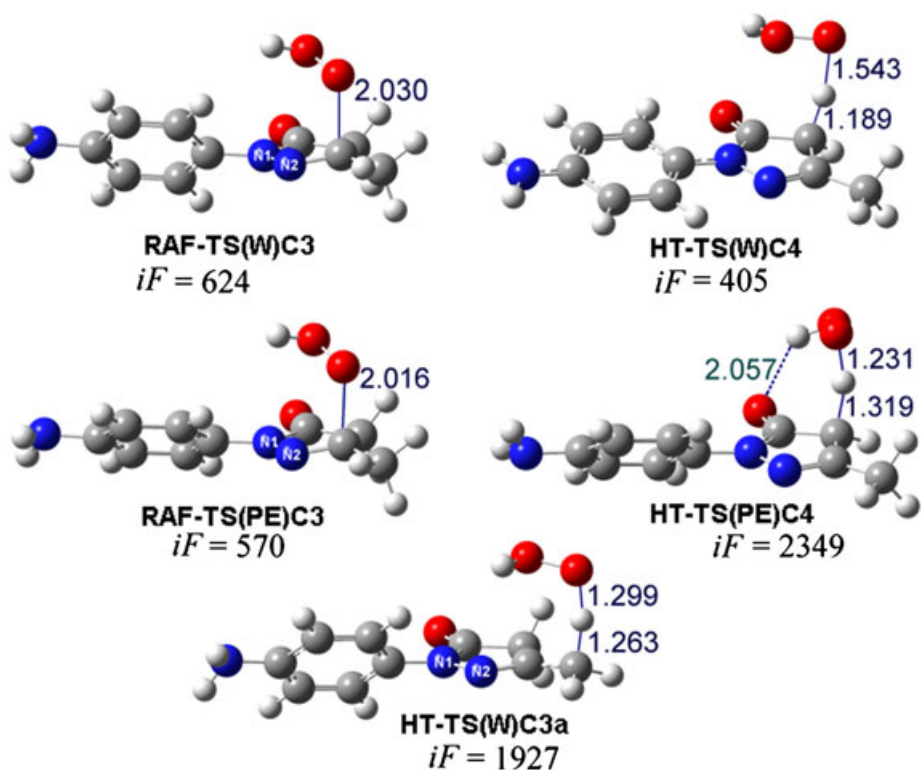


Figure 2. Optimized geometries of the transition states corresponding to D1 derivative in water (W) and pentyl ethanoate (PE) solution. Imaginary frequencies (*iF*) in cm^{-1}

corresponding to HT from site C4 in pentyl ethanoate is the only one with HB interaction, involving the H atom in the ·OOH radical and the O atom in the pyrazol group, with $d_{O-H} = 2.057 \text{ \AA}$, that is, slightly shorter than in the equivalent TS for C1. In aqueous solution, the distance between these two atoms increases to $d_{O-H} = 2.934 \text{ \AA}$, so there is no proper HB interaction. This is also the case for the transition states corresponding to HT from site 3a, in aqueous solution, and to RAF at site 3, in lipid solution and in polar solution. In these structures, the shortest distance, related to a possible HB interaction, involves the N atoms in the pirazol group and was found to be $d_{H-N2} = 2.980$, $d_{H-N1} = 2.898$, and $d_{H-N1} = 2.906 \text{ \AA}$, respectively. Therefore, no significant HB is expected for these transition states either.

The Gibbs free energies of activation (ΔG^\ddagger) are reported in Table 2. In aqueous solution, it was found that the lowest values of ΔG^\ddagger correspond to the SPET mechanism for both C1 and D1, that is, to the SET from their anionic forms. This is also the only thermochemically viable process for the anions. Analyzing the neutral forms alone, the lowest ΔG^\ddagger values for D1 are those corresponding to RAF at site 3 and SET. On the other hand, HT from site 3a has the lowest barrier for D1. In addition, the barriers of the reactions of ·OOH with D1 were found to be systematically lower than those involving C1. In non-polar media the same trend was found, the ΔG^\ddagger values of D1 are lower than those of C1. In this kind of environment, the lowest ΔG^\ddagger values for both C1 and D1 correspond to the RAF path.

The rate constants for the different paths involved in the ·OOH reactions with C1 and D1 are reported in Tables 3 and 4, respectively, together with the total and overall rate coefficients

and branching ratios. The overall rate coefficients (k_{overall}) have been calculated as

$$k_{\text{overall}} = p^N k_{\text{tot}}^N + p^A k_{\text{tot}}^A \quad (4)$$

where p^N and p^A account for the fractions of the neutral and anionic forms, respectively, at physiological pH, and the total rate coefficients were calculated as the sum of the rate constants for the different reaction paths:

$$k_{\text{tot}}^N = k_{\text{app}}^{N,SET} + k_{\text{app}}^{N,HT} + k_{\text{app}}^{N,RAF} \quad (5)$$

$$k_{\text{app}}^{N,HT} = k_{\text{app}}^{N,C3a} + k_{\text{app}}^{N,C4} \quad (6)$$

$$k_{\text{app}}^{N,RAF} = k_{\text{app}}^{N,C3} \quad (7)$$

$$k_{\text{tot}}^A = k_{\text{app}}^{A,SET} \quad (8)$$

The branching ratios of the different reaction channels, which represent the percent of their contribution to the total reaction of each species (neutral or anionic) in a given environment, have been calculated as

$$\Gamma_i = \frac{k_i}{k_{\text{total}}} \times 100 \quad (9)$$

where i represents each particular channel.

Both derivatives, C1 and D1, were found to be much more reactive in aqueous solution than in lipid solution (Tables 3 and 4),

Table 2. Gibbs free energies of activation (ΔG^\ddagger , kcal mol⁻¹), at 298.15 K

	C1			D1		
	PE neutral	Water neutral	Water anion	PE neutral	Water neutral	Water anion
SET		31.32	7.64		15.51	5.65
HT						
Site 3a		23.06			22.47	
Site 4	24.14	23.60		23.54	18.33	
RAF						
Site 3	16.90			15.82	15.22	

PE, pentyl ethanoate; SET, single electron transfer; HT, hydrogen transfer; RAF, radical adduct formation.

Table 3. Apparent rate constants, total and overall rate coefficients (M⁻¹ s⁻¹), and branching ratios (Γ) of the different channels of reaction between C1 + ·OOH, at 298.15 K

	Rate constants			Branching ratios		
	PE neutral	Water neutral	Water anion	PE neutral	Water neutral	Water anion
SET		6.79E - 11	1.56E + 07		~0.00	100.00
HT						
Site 3a		1.57E - 01			1.96	
Site 4	2.02E + 00	7.86E + 00		21.66	98.04	
RAF						
Site 3	7.30E + 00			78.34		
Total	9.32E + 00	8.01E + 00	1.56E + 07			
Overall		9.71E + 06				

PE, pentyl ethanoate; SET, single electron transfer; HT, hydrogen transfer; RAF, radical adduct formation.

Table 4. Apparent rate constants, total and overall rate coefficients ($M^{-1} s^{-1}$), and branching ratios (Γ) of the different channels of reaction between D1 + ·OOH, at 298.15 K

	Rate constants			Branching ratios		
	PE neutral	Water neutral	Water anion	PE neutral	Water neutral	Water anion
SET		2.67E + 01	4.23E + 08		16.89	100.00
HT						
Site 3a		3.95E – 01			0.25	
Site 4	8.80E – 01	5.39E – 01		6.95	0.34	
RAF						
Site 3	1.18E + 01	1.30E + 02		93.05	82.52	
Total	1.27E + 01	1.58E + 02	4.23E + 08			
Overall		2.31E + 08				

PE, pentyl ethanoate; SET, single electron transfer; HT, hydrogen transfer; RAF, radical adduct formation.

and in both kind of environments D1 was found to react faster with ·OOH than C1, ~1.4 times faster in pentyl ethanoate and ~24 times in aqueous solution. These findings suggest that D1 is a better peroxy radical scavenger than C1, regardless of the polarity of the environment. In addition, the anionic forms of both EDA derivatives react much faster than the neutral forms. This is in line with previous reports on the higher free radical scavenging activity of the anionic species of this type of compounds.^[30,32,85] Moreover, the rate constants for the SET reactions of the anionic species were found to be near the diffusion limited regime, which indicates that derivatives C1 and D1 are excellent for scavenging peroxy radicals in aqueous solution at physiological pH. It should be noted though that, according to the values in Tables 3 and 4, as the pH decreases so does the population of the anionic species and consequently the peroxy radical activity of the studied compounds decline. However, with the exception of some parts of the digestive system, the pH within the human body is about 7 or higher. Therefore, the efficiency of the C1 and D1 for scavenging peroxy radicals is expected to be outstanding; because of the relative low reactivity of peroxy radicals, they rarely react at rates as fast as those estimated in this work. Accordingly, these compounds are predicted to be excellent protectors against the deleterious effects of OS in the aqueous phase under physiological conditions.

On the contrary, they are predicted to be very poor peroxy radical scavengers in lipid solution. Taking into account that the rate constants corresponding to the ·OOH damage to unsaturated fatty acids are in the range $1.18 - 3.05 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$,^[51] whereas the rate constants estimated in this work are 9.3 and $12.7 M^{-1} s^{-1}$ under such conditions for C1 and D1, respectively; they are predicted to be inefficient for protection against peroxy oxidation of lipids. Accordingly, it seems that their protective effects against this kind of radicals are only because of their scavenging ability in the aqueous phase. However, compared with the parent molecule, EDA, the efficiency of both C1 and D1 for scavenging ·OOH in lipid media is increased. Under such conditions, they were found to react about 78 and 106 times faster than EDA ($0.12 M^{-1} s^{-1}$),^[92] which suggests that further investigations aiming to increase the peroxy scavenging activity of this kind of compounds in lipid media, via structural modifications, are worthwhile. On the other hand, in aqueous solution at physiological pH, EDA reacts with ·OOH ($8.79 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$)^[92] 9.1 times faster than C1, but 2.6 times slower than D1. However, they all react very fast with peroxy radicals under such conditions.

Regarding the relative importance of the different reaction mechanisms, for the neutral species in non-polar media RAF is predicted to be the main process for both C1 and D1, with contributions to the overall reactivity about 78 and 93%, respectively. Under such conditions, the HT mechanism was found to be minor, but not negligible (~22 and ~7% for C1 and D1, respectively). In aqueous solution, the anionic forms are predicted to react exclusively by SET, whereas for the neutral forms the main mechanism of reaction is predicted to be HT from site 4 for C1 (~98%) and RAF at site 3 for D1 (~82%). This suggests that the inclusion of different groups in the structure of EDA may lead to a change on their site selectivity when reacting with free radicals. It is interesting to notice that the relative importance of the SET mechanism for the neutral forms in aqueous solution is different for the studied EDA derivatives. While for C1 it is negligible, for D1 it is small but significant (~17%).

The high values of the overall rate constants for the reaction of C1 and D1 with ·OOH, in aqueous solution at physiological pH, were found to be primarily because of the SET process from the anion. Therefore, the main responsible for the outstanding peroxy scavenging activity of the studied compounds under such conditions is the SPET mechanism.

To rationalize the differences in reactivity among EDA and its derivatives C1 and D1, we have analyzed the gathered data together with the structures of the studied compounds (Scheme 1). The structural differences among these compounds are in the substituent at N1 site (R1). R1 is $-C_6H_5$, $-C_6H_4NH_2$, and $-C_6H_4O(CH_2)_3ONO_2$ for EDA, D1, and C1, respectively. Thus, the electro-donating character of R1 increases in the order $D1 > C1 > EDA$. According to our results, the nature of this substituent is particularly important for the reactivity of the studied compounds in non-polar media. In aqueous solution, they are all excellent peroxy scavengers, thus what seems to be crucial is to understand the role of R1 to increase their activity under conditions that made them poor scavengers, that is, in lipid solution. Therefore, under such conditions, R1 groups with increased electro-donating character are recommended to augment the reactivity towards peroxy radicals. In addition, in non-polar media RAF has been identified as the main mechanism of reaction. Therefore, the reactivity is expected to be increased as the size of the conjugated moiety increases. For example, using R1 moieties such as $-C_{10}H_7$ (naphthyl group), $-C_{10}H_6NH_2$, $-C_{14}H_9$ (anthryl or phenanthryl groups), and $-C_{14}H_8NH_2$ is expected to lead to EDA derivatives with improved reactivity towards peroxy radicals in lipid solution. However, this hypothesis remains to be demonstrated.

Compared with other antioxidants, the protective effects of C1 and D1 against OS, in aqueous solution at physiological pH, are predicted to be higher than that of melatonin ($2.0 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[93] caffeine ($3.3 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[90] allicin ($7.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[94] vainillin ($1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[95] dopamine ($2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[96] and α -mangostin ($1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[97] Compared with 2-propenesulfenic acid ($2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[94] and glutathione ($2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[98] C1's activity is predicted to be similar or slightly lower, whereas that of D1 is expected to be higher to some extent. This particular derivative (D1) was found to be among the best peroxy scavengers known so far, with an efficiency similar to that its parent molecule, EDA ($8.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[92] sesamol ($2.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[99] and caffeic acid ($2.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[100]

CONCLUSIONS

The peroxy radical scavenging activity of EDA derivatives, C1 and D1, has been investigated in aqueous and lipid solutions. To that purpose, different mechanisms have been taken into account, as well as the acid/base equilibrium in aqueous solution. The relative efficiency of the studied compounds has been assessed, on the basis of kinetic data, as well as the relative importance of the different reaction mechanisms on their scavenging activity.

It was found that in non-polar environments (lipid), their protective effects are rather poor, whereas in aqueous solution, they are very efficient for scavenging peroxy radicals. In addition, D1 is predicted to be a better peroxy scavenger than C1, and slightly better to its parent molecule, EDA, in aqueous solution at physiological pH. Their excellent scavenging activity, under such conditions, is attributed to the SPET mechanism, that is, to the electron transfer from their anionic forms. D1 was found to be among the best peroxy scavengers known so far, with a rate constant for its reaction with $\cdot\text{OOH}$ near to the diffusion limited regime.

It was also found that, compared with the parent molecule, EDA, the efficiency of both C1 and D1 for scavenging $\cdot\text{OOH}$ in lipid media is increased about 78 and 106 times, respectively. This finding suggests that further investigations aiming to increase the peroxy scavenging activity of this kind of compound in lipid media, via structural modifications, are worthwhile. Some possible derivatives are suggested.

The new data reported in this work are expected to contribute to a better understanding on the protective effects of EDA derivatives against OS. Because EDA is a recently developed neuroprotective drug, a detailed knowledge on the effects of structural modifications on its properties is vital for further designs of related compounds.

Acknowledgements

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. A.P.-G. acknowledges CONACyT for Doctoral fellowship.

REFERENCES

- [1] T. Watanabe, M. Tahara, S. Todo, *Cardiovasc. Ther.* **2008**, *26*, 101.
- [2] Y. Higashi, D. Jitsuikui, K. Chayamab, M. Yoshizumia, *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* **2006**, *1*, 85.
- [3] A. K. Saini, R. J. Patel, S. S. Sharma, A. Kumar, *Pharmacol. Res.* **2006**, *54*, 6.
- [4] A. K. Saini, A. Kumar, S. S. Sharma, *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *568*, 164.
- [5] M. K. Sinha, H. K. Anuradha, R. Juyal, R. Shukla, R. K. Garg, A.M. Kar, *Neurology Asia.* **2009**, *14*, 7.
- [6] N. Zhang, M. Komine-Kobayashi, R. Tanaka, M. Liu, Y. Mizuno, T. Urabe, *Stroke* **2005**, *36*, 2220.
- [7] J. I. Noora, Y. Ueda, T. Ikeda, T. Ikenoue, *Neurosci. Lett.* **2007**, *414*, 5.
- [8] H. Kono, C. G. Woods, A. Maki, H. D. Connor, R. P. Mason, I. Rusyn, H. Fujii, *Free Radical Res.* **2006**, *40*, 579.
- [9] L. M. Sayre, G. Perry, M. A. Smith, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 172.
- [10] N. F. Boyd, V. McGuire, *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *10*, 185.
- [11] R. L. Nelson, *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *12*, 161.
- [12] P. Knekt, A. Reunanen, H. Takkunen, A. Aromaa, M. Heliövaara, T. Hakuunen, *Int. J. Cancer* **1994**, *56*, 379.
- [13] J. K. Willcox, S. L. Ash, G.L. Catignani, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 275.
- [14] R. A. Riemersma, D. A. Wood, C. C. A. Macintyre, R. A. Elton, K. F. Gey, M. F. Oliver, *Lancet* **1991**, *337*, 1.
- [15] J. T. Salonen, K. Nyyssoner, H. Korpela, J. Tuomilehto, R. Seppanen, R. Salonen, *Circulation* **1992**, *86*, 803.
- [16] D. A. Street, G. Comstock, R. Salkeld, M. Klag, *Circulation* **1994**, *90*, 1154.
- [17] N. G. Stephens, A. Parsons, P. M. Schofield, F. Kelly, K. Cheesman, M. J. Mitchinson, M. J. Brown, *Lancet* **1996**, *347*, 781.
- [18] O. M. Panasenka, T. V. Nova, O. A. Azizova, Y. A. Vladimirov, *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *10*, 137.
- [19] D. Steinberg, *Circulation* **1991**, *84*, 1421.
- [20] D. R. Janero, *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *11*, 129.
- [21] H. N. Hodis, W. J. Mack, L. LaBree, L. Cashin-Hemphill, A. Sevanian, R. Johnson, S. Azen *J. Am. Med. Assoc.* **1995**, *273*, 1849.
- [22] K. Braekke, N. K. Harsem, A. C. Staff, *Pediatr. Res.* **2006**, *60*, 560.
- [23] A. Biri, N. Bozkurt, A. Turp, M. Kavutcu, O. Himmetoglu, I. Durak, *Gynecol. Obstet. Invest.* **2007**, *64*, 187.
- [24] Z. Hracsko, H. Orvos, Z. Novak, A. Pal, I. S. Varga, *Redox Rep.* **2008**, *13*, 11.
- [25] Y. Christen, *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 621.
- [26] B. Halliwell, *Drugs Aging* **2001**, *8*, 685.
- [27] D. A. Butterfield, *Free Radic. Res.* **2002**, *36*, 1307.
- [28] Y. Inokuchi, S. Imai, Y. Nakajima, M. Shimazawa, M. Aihara, M. Araie, H. Hara, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *329*, 687.
- [29] Y. Yamamoto, M. Yanagisawa, N. W. Tak, K. Watanabe, C. Takahashi, A. Fujisawa, M. Kashiba, M. Tanaka, *Redox Rep.* **2009**, *14*, 251.
- [30] Y. Yamamoto, T. Kuwahara, K. Watanabe, K. Watanabe, *Redox Rep.* **1996**, *2*, 333.
- [31] L. F. Wang, H. Y. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3789.
- [32] S. Abe, K. Kirima, K. Tsuchiya, M. Okamoto, T. Hasegawa, H. Houchi, M. Yoshizumi, T. Tamaki, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 186.
- [33] H. Nakagawa, R. Ohyama, A. Kimata, T. Suzuki, N. Miyata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5939.
- [34] M. Lin, Y. Katsumura, K. Hata, Y. Muroya, K. Nakagawa, *J. Photochem. Photobiol. B.* **2007**, *89*, 36.
- [35] K. Anzai, M. Furuse, A. Yoshida, A. Matsuyama, T. Moritake, K. Tsuboi, N. Ikota, *J. Radiat. Res.* **2004**, *45*, 319.
- [36] N. Sasano, A. Enomoto, Y. Hosoi, Y. Katsumura, Y. Matsumoto, K. Shiraishi, K. Miyagawa, H. Igaki, K. Nakagawa, *J. Radiat. Res.* **2007**, *48*, 495.
- [37] K. Sujatha, G. Shanthi, N. P. Selvam, S. Manoharan, P. T. Perumal, M. Rajendran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4501.
- [38] X. Fan, X. Zhang, L. Zhou, K. A. Keith, E. R. Kern, P. F. Torrence, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3224.
- [39] D. Castagnolo, F. Manetti, M. Radi, B. Bechi, M. Pagano, A. De Logu, R. Meleddu, M. Saggi, M. Botta, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5716.
- [40] R. Tripathy, A. Ghose, J. Singh, E. R. Bacon, T. S. Angeles, S. X. Yang, M. S. Alborn, L. D. Aimone, J. L. Herman, J. P. Mallamo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1793.
- [41] V. Markovic, S. Eric, Z. D. Juranic, T. Stanojkovic, L. Joksovic, B. Rankovic, M. Kosanic, M. D. Joksovic, *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 18.
- [42] Y. Kakiuchi, N. Sasaki, M. Satoh-Masuoka, H. Murofushi, K. Murakami-Murofushi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 1351.
- [43] K. Chegaev, C. Cena, M. Giorgis, B. Rolando, P. Tosco, M. Bertinaria, R. Fruttero, P.A. Carrupt, A. Gasco, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 574.
- [44] A. Pérez-González, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10375.
- [45] A. Pérez-González, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 1180.
- [46] K. Ohara, A. Fujii, Y. Ichimura, K. Sato, K. Mukai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*, 421.
- [47] P. Terpinic, H. Abramovic, *Food Chem.* **2010**, *121*, 366.

- [48] H. Sies, *Exp. Physiol.* **1997**, *82*, 291.
- [49] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncola, M. Izakovic, M. Mazur, *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1.
- [50] S. Itagaki, T. Kurokawa, C. Nakata, Y. Saito, S. Oikawa, M. Kobayashi, T. Hirano, K. Iseki, *Food Chem.* **2009**, *114*, 466.
- [51] De Grey A. D. N. J., *DNA Cell Biol.* **2002**, *21*, 251.
- [52] R. C. Rose, A. M. Bode, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1135.
- [53] A. Galano, D. X. Tan, R. J. Reiter, *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 1.
- [54] Y. Zhao, N. E. Schultz, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364.
- [55] C. Zavala-Oseguera, J. R. Alvarez-Idaboy, G. Merino, A. Galano, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13913.
- [56] E. Velez, J. Quijano, R. Notario, E. Pabón, J. Murillo, J. Leal, E. Zapata, G. Alarcón, *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 971.
- [57] A. Vega-Rodriguez, J. R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7649.
- [58] A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5114.
- [59] G. Black, J. M. Simmie, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1236.
- [60] T. Furuncuoğlu, I. Ugur, I. Degirmenci, V. Aviyyente, *Macromolecules* **2010**, *43*, 1823.
- [61] A. Galano, N. A. Macías-Ruvalcaba, O. N. M. Campos, J. Pedraza-Chaverri, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6625.
- [62] Y. Zhao, D.G. Truhlar, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1095.
- [63] Gaussian 09, Revision A.08, 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. J. Rega Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. E. Gomperts, O. Stratmann, A. J. Yazyev, R. Austin, C. Cammi, J. W. Pomelli, R. 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, y D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- [64] A. V. Marenich, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **2009**; *113*, 6378.
- [65] Y. Okuno, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 210.
- [66] S.W. Benson, *The foundations of chemical kinetics*. Krieger, Malabar, Florida, **1982**.
- [67] D. Ardura, R. Lopez, T. L. Sordo, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23618.
- [68] J. R. Alvarez-Idaboy, L. Reyes, J. Cruz, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1763.
- [69] J. R. Alvarez-Idaboy, L. Reyes, N. Mora-Diez, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3682.
- [70] A. Galano, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1677.
- [71] A. Galano, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 8922.
- [72] A. Galano, A. Cruz-Torres, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 732.
- [73] A. Galano, M. Francisco-Márquez, *Chem. Phys.* **2008**, *345*, 87.
- [74] N. Mora-Diez, S. Keller, J. R. Alvarez-Idaboy, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3682.
- [75] H. Eyring, *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107.
- [76] M. G. Evans, M. Polanyi, *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 875.
- [77] D. G. Truhlar, W. L. Hase, J. T. Hynes, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664.
- [78] D. G. Truhlar, A. Kuppermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1840.
- [79] F. C. Collins, G. E. Kimball, *J. Colloid Sci.* **1949**, *4*, 425.
- [80] M. Z. Smoluchowski, *Phys. Chem.* **1917**, *92*, 129.
- [81] D. G. Truhlar, *J. Chem. Ed.* **1985**, *62*, 104.
- [82] A. Einstein, *Ann. Phys. (Leipzig)*. **1905**, *17*, 549.
- [83] G. G. Stokes, *Mathematical and Physical Papers*, Cambridge University Press, Cambridge, **1903**, *3*, 55.
- [84] S. Ono, K. Okazaki, M. Sakurai, Y. Inoue, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3769.
- [85] A. Pérez-González, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1306.
- [86] M. Belcastro, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, *Theor. Chem. Acc.*, **2006**, *115*, 361.
- [87] M. Leopoldini, N. Russo, S. Chiodo, M. Toscano, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 6343.
- [88] M. Leopoldini, F. Rondinelli, N. Russo, M. Toscano, *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*, 8862.
- [89] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, *Food Chem.* **2011**, *125*, 288.
- [90] J. R. León-Carmona, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4538.
- [91] G. A. Jeffrey. *An Introduction to Hydrogen Bonding (Topics in Physical Chemistry)*. Oxford University Press, USA, **1997**.
- [92] A. Pérez-González, A. Galano, *Int. J. Quantum Chem.*, **2012**, *112*, 3441.
- [93] A. Galano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 7147.
- [94] A. Galano, M. Francisco-Márquez, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16077.
- [95] A. Galano, J. R. León-Carmona, J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 7129.
- [96] C. Iuga, J. R. Alvarez-Idaboy, A. Vivier-Bunge, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12234.
- [97] A. Martínez, A. Galano, R. Vargas, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12591.
- [98] A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, *RSC Advances*. **2011**, *1*, 1763.
- [99] A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, M. Francisco-Márquez, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 13101.
- [100] J. R. León-Carmona, J. R. Alvarez-Idaboy, A. Galano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 12534.