

Estudio teórico de la reparación de radicales libres de Triptófano y Tirosina
mediada por derivados de 2-piridona

Nicolás Espinosa Rincón

Trabajo de Grado para optar por el título de Químico

Director

Leonardo Muñoz Rugeles

Dr. en Ciencias – Química

Codirector

Anderson Arboleda

Químico – Ing. Petróleos

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

*A Dios,
Por sus infinitas bendiciones y su protección.*

*A mi abuelo,
Por sus grandes esfuerzos, su compañía y su fé.*

Agradecimientos

A la Escuela de Química, el Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular (LEAM) y a la Universidad Industrial de Santander por permitirme estudiar y formar mis conocimientos en tan hermosa disciplina.

Al Dr. Leonardo Muñoz Rugeles, por su valiosa guía, apoyo y motivación para el estudio de la química teórica.

A Anderson Arboleda por su tutoría a lo largo del proyecto y por demostrarme a través de su dedicación el amor a la ciencia.

Al Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy por su cordial colaboración y dedicación, y a la Universidad Autónoma de México por permitirme utilizar los recursos computacionales necesarios para el desarrollo del proyecto de investigación.

A todos mis amigos, en especial a Angie, Jeniffer, Bohórquez, Cadena, Cosgo, Laurita, Daniela y V, por su apoyo incondicional, su confianza, las experiencias y su querer, los cuales me han permitido sobrellevar y disfrutar esta existencia.

A mi familia, por acompañarme en este camino y por todo su amor, en especial a mis abuelos, mi abuela María, mis papás Jordan y Ludy, mis hermanos y Mía.

Tabla de contenido

Resumen	12
Abstract.....	13
Introducción.....	14
1. Marco Teórico.....	17
1.1. Antioxidantes	17
1.2. Mecanismos de reacción Radical-Antioxidante.....	20
1.2.1. Mecanismo HAT	20
1.2.2. Mecanismo PCET	21
1.2.3. Mecanismo PEST.....	23
1.2.4. Mecanismo EPST.....	24
1.2.5. Mecanismo SPLET	25
1.2.6. Mecanismo SPGET.....	26
1.3. Teoría del funcional de la densidad y funciones base	27
1.4. Teoría del estado de transición	33
1.5. Transferencias de Carga	37
1.6. Método de la coordenada intrínseca de reacción	41
1.7. Análisis de Poblaciones.....	43
1.8. Método del campo de reacción autoconsistente.....	45
2. Objetivos.....	49
2.1. Objetivo General	49
2.2. Objetivos Específicos	49

3.	Metodología	50
3.1.	Optimización de Reactivos	50
3.2.	Análisis termodinámico y cinético.....	52
3.3.	Estados de transición, IRC y análisis de población de Hirshfeld.	53
4.	Resultados y análisis	54
4.1.	Disociación a pH fisiológico.....	54
4.2.	Análisis Termodinámico	55
4.3.	Mecanismos de reacción de antioxidantes con el radical triptófano.....	57
4.3.1.	Mecanismos de reacción FHT	57
4.3.2.	Mecanismos de reacción SET.....	60
4.4.	Mecanismos de reacción de antioxidantes con el radical tirosina	61
4.4.1.	Mecanismos de reacción FHT	61
4.4.2.	Mecanismos de reacción SET.....	66
4.5.	Dependencia de la constante de velocidad con el pH	67
5.	Conclusiones	69
6.	Recomendaciones.....	71
	Referencias Bibliográficas	72
	Apéndices	80

Lista de Figuras

Figura 1. a) Análisis de carga atómica de la reacción entre el radical benzilo y el tolueno b) Densidad de espín del análisis a. c) Análisis de carga de la reacción de radical fenilo y el fenol. d) Densidad de espín del análisis c. Adaptado de: (Muñoz-Rugeles & Alvarez-Idaboy, 2015).....22

Figura 2. a) Análisis de carga atómica de la reacción entre el radical triptófano y el ácido úrico. b) Densidad de espín del análisis a. c) Análisis de carga de la reacción de radical triptófano y el ácido ascórbico. d) densidad de espín del análisis c. Adaptado de: (Muñoz-Rugeles & Alvarez-Idaboy, 2017).....24

Figura 3. Orbital de Slater STO (negro). Las curvas de color naranja y gris representan orbitales tipo Gaussianos (GTO) y la curva en color rojo representa la multiplicación de los GTO la cual da el orbital STO-2G que es más cercano al orbital tipo STO.33

Figura 4 Superficie de energía potencial para la reacción $A + B \rightarrow B + C$. Fuente: CC BY-NC; Ümit Kaya via LibreTexts34

Figura 5. Gráfico de energía a lo largo de la coordenada de reacción de una reacción. La parábola en color negro representa la curva de energía de reactivos y en color rojo la curva de energía de productos. La diferencia en los estados mínimos de energía de estas representa el valor de la energía libre de reacción ΔG . La energía de reorganización está dada por el punto de intersección de ambos mínimos de energías.40

Figura 6. Secuencia de figuras que demuestran que a medida que aumenta la energía libre de reacción, el punto de intersección que define el valor de la energía de activación se traslada hacia la izquierda pasando por el valor $E_A=0$ y luego a la llamada región invertida.41

Figura 7. Curva de Energía como función de la coordenada de reacción. Los puntos indican los cálculos realizados en el análisis IRC a partir del TS.43

Figura 8. Antioxidantes evaluados mediante la metodología QM-ORSA y optimizados por medio del software Gaussian 16. a) 3-hidroxi-2-piridona b) 4-hidroxi-2-piridona, c) 5-hidroxi-2-piridona, d) 6-hidroxi-2-piridona.....50

Figura 9. Resultados obtenidos sobre la reacción entre la 6-hidroxi-2-piridona y el radical Triptófano a) TS. b) IRC del estado de transición c) Cargas atómicas de Hirshfeld d) Densidad de espín de Hirshfeld.58

Figura 10. Estados de transición de la reacciones de antioxidantes con el radical Tirosina. (a) reacción con la 3-hidroxi-2-piridona (b) reacción con la 5-hidroxi-2-piridona (c) reacción con la 6-hidroxi-2-piridona.....61

Figura 12. Resultados obtenidos sobre la reacción entre la 5-hidroxi-2-piridona y el radical

tirosina. (a) Coordenada IRC (b) Carga atómicas de Hirshfeld. (c) Densidad de espín de Hirshfeld. Densidad de los orbitales HOMO (d) y SOMO (e) (valor de isodensidad de 0.02 au).....63

Figura 13. Resultados obtenidos sobre la reacción entre la 6-hidroxi-2-piridona y el radical tirosina. (a) Coordenada IRC (b) Carga atómicas de Hirshfeld. (c) Densidad de espín de Hirshfeld. Densidad de los orbitales HOMO (d) y SOMO (e) (valor de isodensidad de 0.02 au).....64

Figura 14. Cambios en la constantes de velocidad con respecto al pH de los antioxidantes. (a) Reacción de la 3-hidroxi-2-piridona con el radical tirosina, los mecanismos de reacción PCET (rojo), SET (azul) y constante global (verde). (b) Reacción de la 5-hidroxi-2-piridona con el radical tirosina, los mecanismos de reacción PCET (rojo), SET (azul) y constante global (verd). (c) Reacción de la 6-hidroxi-2-piridona con el radical tirosina, los mecanismos de reacción PCET (rojo), SET (azul) y constante global (verde).68

A.1 Archivo de comandos para optimización de la geometría de la 3-hidroxi-2-piridona.	66
A.2 Archivo para calcular el TS de la 3-hidroxi-2-piridona y el radical tirosina.	81
A.3 Comandos en texto plano para calcular el camino de reacción por el método IRC a partir de la geometría del TS de la 3-hidroxi-2-piridona y el radical tirosina.	85
A.4 Comandos en texto plano para calcular el análisis de población de Hirshfeld a partir de las coordenadas de los puntos del camino de reacción hallado con el método IRC de la 3-hidroxi-2-piridona con el radical tirosina.	74

Lista de Tablas

Tabla 1. Valores de m y C_0 según el protocolo de Galano et al., con respecto a las bases 6-31(p), 6-31+g(d,p), 6-311+g(d) y 6-311++g(d,p) y enlace OH tipo fenol.....52

Tabla 2 Valores de pK_a teóricos de los antioxidantes, según el procedimiento de Idaboy et al., con respecto a las bases 6-31(p), 6-31+g(d,p), 6-311+g(d) y 6-311++g(d,p) y enlace OH tipo fenol.....54

Tabla 3. Porcentajes de disociación de los antioxidantes de acuerdo con su pK_a en pH fisiológico.55

Tabla 4. Valores de ΔG para las transferencias FHT de los antioxidantes con el radical triptófano y tirosina (kcal/mol) a 298.15 K.55

Tabla 5. Valores de ΔG de reacciones SET de los antioxidantes desprotonados con el catión radical triptófano, radical triptófano y radical tirosina en kcal/mol a 298.15 K.....55

Tabla 6. Valores de ΔG para reacciones SET de los antioxidantes neutros con el radical tirosina, radical triptófano y catión radical triptófano en kcal/mol a 298.15 K.56

Tabla 7. Resumen de esquemas de mecanismos de reacción entre los antioxidantes y los radicales tirosina y triptófano.57

Tabla 8. Constantes de velocidad $k = 7.4 (M - 1s - 1)$ y energías libres de activación ΔG_0 (kcal/mol) para los mecanismos SET de la reparación de los antioxidantes aniónicos con el catión radical triptófano.60

Tabla 9. Constantes de velocidad $k_{pH} = 7.4 (M - 1s - 1)$ para los mecanismos PCET de la reparación de los antioxidantes neutros con el radical tirosina, su porcentaje de contribución respecto a la constante total $\% \Gamma$ y energías libres de activación ΔG_0 (kcal/mol).....66

Tabla 10. Constantes de velocidad $k_{pH} = 7.4 (M - 1s - 1)$ para los mecanismos SET de la reparación de los antioxidantes aniónicos con el radical tirosina, su porcentaje de contribución respecto a la constante total $\% \Gamma$ y energías libres de activación ΔG_0 (kcal/mol).....66

Glosario

DFT: teoría del funcional de la densidad.

EPST: mecanismo de transferencia secuencial electrón-protón

FHT: mecanismo de transferencia formal de hidrógeno.

FR: radicales libres.

HAT: mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno.

HOMO: orbital molecular ocupado de mayor energía.

IRC: coordenada intrínseca de reacción.

OS: estrés oxidativo.

PCET: mecanismo de transferencia acoplada protón-electrón.

PEST: mecanismo de transferencia secuencial protón-electrón.

QM-ORSA: prueba basada en mecánica cuántica para la actividad secuestradora de radicales libres.

RAF: mecanismo de formación de aducción de radicales.

RNS: especies reactivas de nitrógeno.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

RSS: especies reactivas de azufre.

SCRf: campo de reacción autoconsistente.

SET: transferencia de electrón simple.

SMD: modelo de solvatación de densidad de solvente.

SOMO: orbital molecular ocupado por un solo electrón.

SPGET: mecanismo de transferencia de ganancia de protón por solvente y transferencia de electrón.

Tryp: radical triptófano.

TrypNH: catión radical triptófano.

TS: estado de transición.

TST: teoría del estado de transición clásica.

Tyr: radical tirosina.

Resumen

Título: Estudio teórico de la reparación de radicales libres de Triptófano y Tirosina mediada por derivados de 2-piridona *

Autor: Nicolás Espinosa Rincón †.

Palabras claves: Antioxidantes, 2-Piridonas, Mecanismos FHT, Radical Triptófano, Radical Tirosina, Metodología QM-ORSA.

La presencia de radicales Triptófano y Tirosina han demostrado tener efectos negativos en la salud humana. Existen reportes que asocian el estrés oxidativo que causan en las células a patologías y enfermedades como Alzheimer, Parkinson, cáncer, desórdenes cardiovasculares, entre otros. En este trabajo, se evaluó la capacidad antioxidante de las moléculas 3-hidroxi-2-piridona, 4-hidroxi-2-piridona, 5-hidroxi-2-piridona y 6-hidroxi-2-piridona frente a los radicales Triptófano y Tirosina por medio de la metodología QM-ORSA, utilizando el software Gaussian 16. De los análisis termodinámicos, cinéticos y de mecanismos obtenidos, se identificó que todos las fracciones desprotonadas de los antioxidantes reaccionaron con el catión radical triptófano por medio de mecanismos de transferencia electrónica (SET), siendo la 3-hidroxi-2-piridona y 5-hidroxi-2-piridona las que reaccionaron con mayor constante de velocidad ($k \approx 10^7$). Con respecto al radical tirosina, todos los antioxidantes reaccionaron a excepción de la 4-hidroxi-2-piridona. Las fracciones neutras reaccionaron a través de transferencia formal de hidrógeno en forma concertada (PCET) y sus fracciones desprotonadas por transferencia electrónica, siendo la 3-hidroxi-2-piridona y 5-hidroxi-2-piridona las que mejor capacidad antioxidante presentaron, $k \approx 10^9$ para mecanismo SET y $k \approx 10^8$ para mecanismo PCET. Del análisis de la variación de la constante de velocidad con el pH se evidenció que los mecanismos SET se favorecen a valores de pH mayores al pK_a de la molécula, mientras que los mecanismos PCET a valores menores.

*Trabajo de grado

†Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Dr. Leonardo Muñoz Rugeles. Codirector: Anderson Arboleda

Abstract

Title: Theoretical study of free radical repair of Tryptophan and Tyrosine mediated by 2-pyridone derivatives. *

Author: Nicolás Espinosa Rincón †.

Keywords: Antioxidants, 2-Pyridones, FHT Mechanisms, Tryptophan Radical, Tyrosine Radical, QM-ORSA protocol.

The presence of Tryptophan and Tyrosine radicals have been shown to have negative effects on human health. There are reports that associate the oxidative stress they cause in cells to pathologies and diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, cancer, cardiovascular disorders, among others. In this work, the antioxidant capacity of 3-hydroxy-2-pyridone, 4-hydroxy-2-pyridone, 5-hydroxy-2-pyridone and 6-hydroxy-2-pyridone molecules was evaluated against Tryptophan and Tyrosine radicals by means of QM-ORSA methodology, using Gaussian 16 software. From the thermodynamic, kinetic and mechanism analyses obtained, it was identified that all the deprotonated fractions of the antioxidants reacted with the tryptophan radical cation by electron transfer mechanisms (SET), with 3-hydroxy-2-pyridone and 5-hydroxy-2-pyridone reacting with the highest rate constant ($k \approx 10^7$). With respect to the tyrosine radical, all antioxidants reacted except for 4-hydroxy-2-pyridone. The neutral fractions reacted through formal concerted hydrogen transfer (PCET) and their deprotonated fractions by electron transfer, with 3-hydroxy-2-pyridone and 5-hydroxy-2-pyridone showing the best antioxidant capacity $k \approx 10^9$ for SET mechanism and $k \approx 10^8$ for PCET mechanism. From the analysis of the variation of the rate constant with respect to pH, it was evident that SET mechanisms are favored at pH values higher than the pKa of the molecule, while PCET mechanisms are favored at lower values.

*Bachelor tesis

†Faculty of Science. School of Chemistry. Director: PhD. Leonardo Muñoz Rugeles. Codirector: Engineer Anderson Arboleda

Introducción

El estrés oxidativo OS (por sus siglas en inglés, *Oxidative Stress*) se define como el desbalanceo entre la producción de radicales libres y su consumo en los sistemas vivos. Este fenómeno está asociado al desarrollo de varios problemas de la salud como desórdenes cardiovasculares, cáncer, arterioesclerosis o enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson (Butterfield, 1996, 1997; Butterfield et al., 1999; Fay et al., 2002). Por esto, se han desarrollado extensas investigaciones en las últimas décadas al estudio de mecanismos que prevengan o reparen el daño causado por estos procesos químicos.

Los radicales libres FR (por sus siglas en inglés, *Free Radicals*) reaccionan con macromoléculas como el ADN, las proteínas y los lípidos; induciendo mutaciones, pérdidas en la funcionalidad de las proteínas o en la estructura celular (Cadet et al., 2008; Hands et al., 2011; Hawkins et al., 2002; Viedma-Poyatos et al., 2021). Debido a esto, se hace necesario desarrollar sustancias químicas que reaccionen con los radicales libres o que reparen el daño molecular causado por éstos. Estas sustancias son llamadas antioxidantes y su funcionalidad depende tanto de su estructura química, como de los radicales con los que reaccionan.

La capacidad antioxidante de una sustancia se puede estudiar tanto experimentalmente como computacionalmente. Los ensayos experimentales miden esta capacidad en dependencia del radical que se utiliza en la prueba, por lo que cierta sustancia puede exhibir una buena capacidad antioxidante frente a un radical, pero ser un antioxidante pobre frente a otros. Debido a costos de operación y manejo de sustancias, es útil realizar estudios computacionales para su desarrollo.

Los estudios computacionales clásicos se basan en propiedades intrínsecas de los antioxidantes, como las energías de disociación de enlace, afinidades protónicas, entalpías de transferencia de protón, entre otras. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la capacidad antioxidante también depende de los radicales involucrados, y así mismo, del solvente donde ocurra la reacción. Es por esto, que se han desarrollado nuevas estrategias que añadan estos efectos, incluyendo además estudios cinéticos y termodinámicos de las reacciones.

La metodología QM-ORSA (por sus siglas en inglés, *quantum-mechanics-based test for overall free radical scavenging activity*) ha demostrado ser un protocolo con alta precisión para estos estudios. En comparación con datos experimentales, sus resultados han dado incertidumbres no mayores a aquellas obtenidas en los experimentos (Galano & Alvarez-Idaboy, 2013). Su fiabilidad ha sido demostrada mediante el estudio de actividad antioxidante en una larga serie de compuestos, tanto en ambientes polares como lipídicos (Galano & Alvarez-Idaboy, 2014).

Dentro de los productos derivados por el OS a las proteínas, se encuentran los radicales de aminoácidos, los cuales debidos a su alta reactividad pueden generar otros daños dentro de las proteínas. Por ejemplo, los radicales de Triptófano han demostrado inducir la agregación de proteínas como amiloides o la formación de dímeros de di-Triptófano entre monómeros en la unidad hSOD1 (Ehrenshaft et al., 2015), efectos que están asociados a la enfermedad de Esclerosis lateral amiotrófica (Graslund et al., 1985).

Por otro lado, los radicales de Tirosina presentan alta reactividad con los iones nitro formando 3-nitrotirosina, la cual cambia las propiedades del aminoácido, induciendo cambios en las proteínas y afectando la homeostasis del tejido celular (Murata & Kawanishi, 2004). Este radical en la proteína M2 también está asociado a la inhibición de la enzima ribonucleótido

reductasa mediante la reacción con la tiosemicarbazona 1-formilisoquinolina, lo que afecta el mecanismo de síntesis de ADN (Liermann et al., 1990).

En este trabajo se estudiaron las moléculas 3-hidroxi-2-piridona, 4-hidroxi-2-piridona, 5-hidroxi-2-piridona y 6-hidroxi-2-piridona mediante la metodología QM-ORSA y utilizando el software Gaussian 16, para identificar los mecanismos de reacción frente a los radicales Triptófano y Tirosina, así como para estimar su capacidad antioxidante por medio de las constantes de velocidad de las reacciones de reparación.

1. Marco Teórico

1.1. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias químicas que previenen el estrés oxidativo mediante la prevención, protección o reparación de los daños causados por los radicales libres. Estos pueden ser producidos por los mismos organismos vivos en forma de enzimas como la superóxido dismutasa o la Glutación peroxidasa, o en forma de compuestos no-enzimáticos, de carácter natural o sintético, como los polifenoles o flavonoides. Varios estudios confirman que la presencia de antioxidantes tiene efectos benéficos en patologías como artritis, cataratas y así mismo, que poseen propiedades como anticancerígenos, antivirales y antiinflamatorios (Rao & Agarwal, 1999).

Dependiendo de su modo de acción pueden clasificarse como tipo I o tipo II. Los antioxidantes tipo I reaccionan directamente con los radicales libres mediante diversos mecanismos de reacción, formando moléculas con baja reactividad que no puedan inducir daños celulares. Para lograr esto, estos antioxidantes deben reaccionar más rápido con los radicales libres que con las biomoléculas o estar presentes en altas concentraciones. Algunos de estos antioxidantes son de único uso, es decir, solo reaccionan con un radical y otros se pueden regenerar en el proceso, reaccionando múltiples veces.

Los antioxidantes tipo I también pueden reparar el daño causado por los radicales libres, normalmente a través de reacciones de transferencia electrónica o de hidrógeno. Esta acción es importante, puesto que, en algunos casos los mecanismos de reparación celular son más rápidos que la reacción con los radicales.

Los antioxidantes tipo II previenen los efectos del OS mediante absorción de luz UV (y, por ende, en la producción de radicales libres), secuestro de radicales oxigenados o descomposición de radicales en derivados no reactivos, reparación de antioxidantes primarios o desactivación de oxígeno en el estado singlete.

La capacidad de una molécula para ser antioxidante depende tanto de su estructura y propiedades electrónicas como de la naturaleza de los radicales libres con los que reacciona. Según esto, existen antioxidantes con múltiple funcionalidad por lo que pueden actuar simultáneamente como tipo I y tipo II.

Existen algunos factores que son importantes para tener en cuenta en el uso de estas moléculas. Uno de los más importantes es la toxicidad, la cual debe ser la menor posible o nula, tanto antes, durante y después de su acción. Para difundirse a través de las células, se prefieren antioxidantes de tamaños moderados y carácter anfipático, así como tener una estructura capaz de no interaccionar con sustancias no radicalarias, es decir, tener selectividad. La difusión debe dar lugar a que los antioxidantes se localicen en las áreas donde se producen los radicales libres para evitar sus reacciones con las biomoléculas del medio circundante. Otros de las propiedades importantes son reactividad rápida, pérdida mínima en desechos y versatilidad respecto a radicales libres (Rose & Bode, 1993).

La capacidad antioxidante se puede medir tanto experimentalmente como computacionalmente. Dentro de los protocolos experimentales se encuentran los ensayos DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazilo), FCR (reactivo Floin-Ciocalteu), FRAP (Poder antioxidante férrico reductor), TRAP (Parámetro antioxidante para trampas de radicales), ORAC (Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno), TEAC (Capacidad antioxidante equivalente de Trolox), entre otros (Antolovich et al., 2002; Frankel & Meyer, 2000; Prior et al., 2005). Estos métodos

experimentales dependen del radical utilizado en la medición y no existe aún un protocolo universal. Por otra parte, la capacidad antioxidante también se ve afectada por la polaridad de solvente, el pH y la concentración del antioxidante: por ejemplo, el ácido carnósico y carnosol son buenos antioxidantes a pH 4, mientras que su capacidad disminuye a pH 7 (Frankel et al., 1994).

Debido a que en las reacciones involucradas por antioxidantes ocurre normalmente una transferencia de electrones, protones o átomos de hidrógeno, en los estudios computacionales las propiedades más estudiadas son las entalpías de transferencia electrónica, afinidades protónicas, energías de disociación de enlace, potenciales de ionización, entalpía de transferencia electrónica, entre otras (Galano, 2017).

El enfoque clásico se basa en los cálculos de energías de ionización y de enlace de reactivos y productos. Esto es debido a que cada una de estas energías está asociadas directamente a un camino de reacción, por ejemplo, la energía de ionización se asocia con los mecanismos de transferencia electrónica, mientras que la entalpía de disociación de enlace está relacionada con transferencias de hidrógeno (Praveena et al., 2014; Wang et al., 2015; Xue et al., 2013).

Ya que un mecanismo puede darse de forma más rápida que otro, se hacen necesarios estudios de cinética de las reacciones y por esto, se han desarrollado nuevos protocolos, como el protocolo QM-ORSA, en el cual se realizan cálculos de constantes de velocidad y energías de reacción. A continuación, se describen los tipos de mecanismos de reacción y teorías utilizadas en la metodología QM-ORSA.

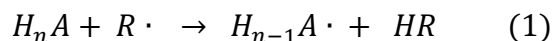
1.2. Mecanismos de reacción Radical-Antioxidante

Los mecanismos de reacción antioxidante-radical involucran la transferencia de un electrón SET (por sus siglas en inglés, *Single Electron Transfer*) o de un átomo de hidrógeno FHT (por sus siglas en inglés, *Formal Hydrogen Transfer*), el cual puede ser transferido como una entidad completa o por separado mediante la transferencia concertada o secuencial de un protón y un electrón.

Los mecanismos FHT pueden ocurrir de forma secuencial o concertada, los mecanismos concertados son los HAT (por sus siglas en inglés, *Hydrogen Atom Transfer*), el cual sucede cuando el átomo de hidrógeno se transfiere como una entidad y el PCET (por sus siglas en inglés, *Proton Coupled Electron Transfer*), cuando el electrón y protón se transfieren de forma desacoplada.

1.2.1. Mecanismo HAT

El mecanismo HAT corresponde a una transferencia de un átomo de hidrógeno desde el antioxidante hacia el radical como se expresa en la ecuación 1.



Este camino de reacción se ha descubierto como el principal para polifenoles como la capsaicina, fisetina, procyanidinas, orientina, ácido clorogénico, cynarina, así como para el triptófano, glutatión y ácidos dihidrolipóicos (Galano & Raúl Alvarez-Idaboy, 2019).

Debido a que el donador del átomo de hidrógeno es el antioxidante, este mecanismo se ve afectado cuando el pH del medio induce la desprotonación de éste. Por esto, es usual encontrar este mecanismo en medios no polares. En medios polares el pH del solvente debe ser menor que los valores de pK_a de los reactivos para favorecer este mecanismo.

1.2.2. Mecanismo PCET

El mecanismo PCET da lugar a la transferencia simultánea de un electrón y un protón, por lo que los productos son iguales a los del mecanismo HAT. Este se ha descubierto como principal mecanismo en antioxidantes como ácidos sulfénicos, diarilaminas, eupatilina, ubiquinol, flavonoides y alcoholes hidroxibenzílicos (Mendoza-Wilson et al., 2016; Ouyang et al., 2018; Wang et al., 2015) .

Para poder diferenciar los mecanismos HAT y PCET es necesario acudir a herramientas teóricas. Dentro de las más utilizadas está el análisis poblacional de carga y densidad de espín a lo largo de la coordenada IRC de la reacción.

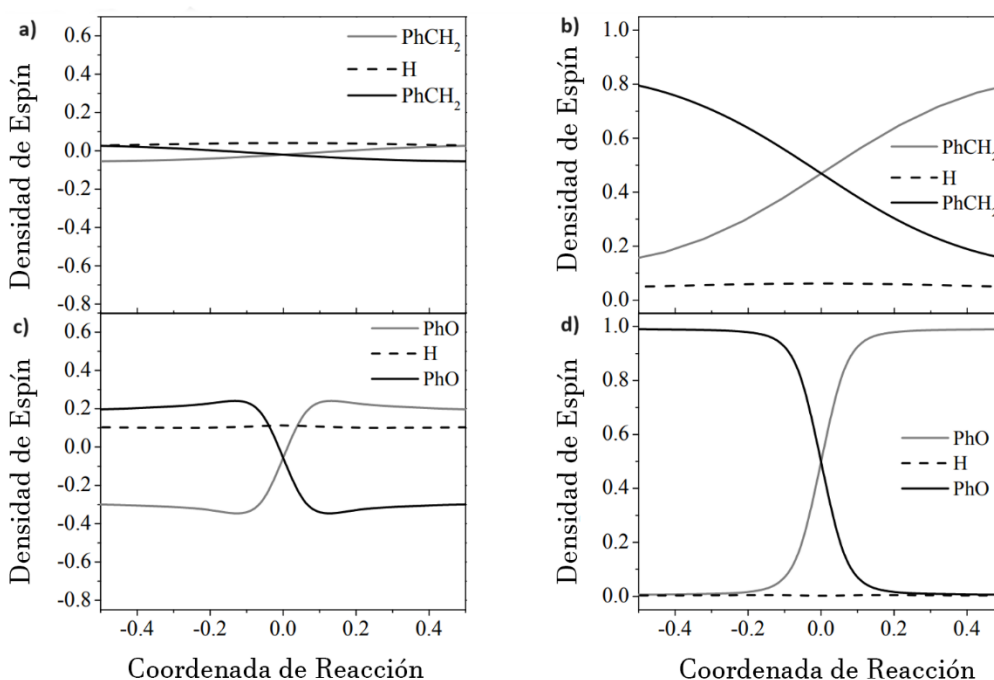
A modo de ejemplo, en la figura 1 se muestran los resultados de este análisis para la reacción entre el radical benzilo con el tolueno en las figuras 1a y 1b y el radical fenilo con el fenol en las figuras 1c y 1d (Muñoz-Rugeles & Alvarez-Idaboy, 2015). Como se observa, el valor de las cargas atómicas y las densidades de espín se intercambian para el donador y aceptor de hidrógeno en ambas reacciones. Sin embargo, en las figuras 1c y 1d esta inversión es más pronunciada, esto quiere decir que la transferencia del átomo de hidrógeno se dio en forma desacoplada, ya que la transferencia del electrón causó que la densidad de espín se situara completamente de donador a aceptor y no de forma parcial como la muestra las figuras 1a y 1b. Por otro lado, la transferencia independiente del protón y electrón induce los grandes cambios en los valores de las cargas de los reactivos. Por esto, estos perfiles de análisis de carga y densidad de espín indican que se trata de un mecanismo PCET. Las figuras 1a y 1b son representaciones de un mecanismo tipo HAT.

En el caso de la carga del átomo de hidrógeno, para el mecanismo HAT ésta es menor que en el mecanismo PCET. Esto sucede debido a que en el mecanismo PCET el protón se desacopla del electrón y se transfiere en forma H^+ , el cual posee un valor de carga positiva mayor que en el átomo de hidrógeno.

Si la transferencia del protón y electrón se realiza de manera independiente y además de forma secuencial, es decir, en dos o más etapas, se da lugar a los mecanismos PEST (por sus siglas en inglés, *Proton-Electron Sequential Transfer*), EPST (por sus siglas en inglés, *Electron-Proton Sequential Transfer*), SPLET (por sus siglas en inglés, *Sequential Proton loss Electron Transfer*) y SPGET (por sus siglas en inglés, *Sequential Proton Gain Electron Transfer*), descritos a continuación:

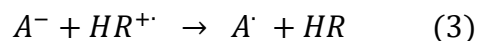
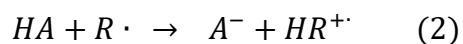
Figura 1.

a) Análisis de carga atómica de la reacción entre el radical benzilo y el tolueno b) Densidad de espín del análisis a. c) Análisis de carga de la reacción de radical fenilo y el fenol. d) Densidad de espín del análisis c. Adaptado de: (Muñoz-Rugeles & Alvarez-Idaboy, 2015)



1.2.3. Mecanismo PEST

En este mecanismo se presenta una transferencia de protón seguida de una transferencia SET, como se muestra en las ecuaciones 2 y 3.



De los productos de la primera reacción se observa la presencia de un catión radical, la cual puede existir únicamente en medios polares, lo que implica que este mecanismo no se puede dar en medios lipídicos o no polares. Debido a que el segundo paso implica una transferencia de electrón, la afinidad electrónica del catión radical debe ser alta.

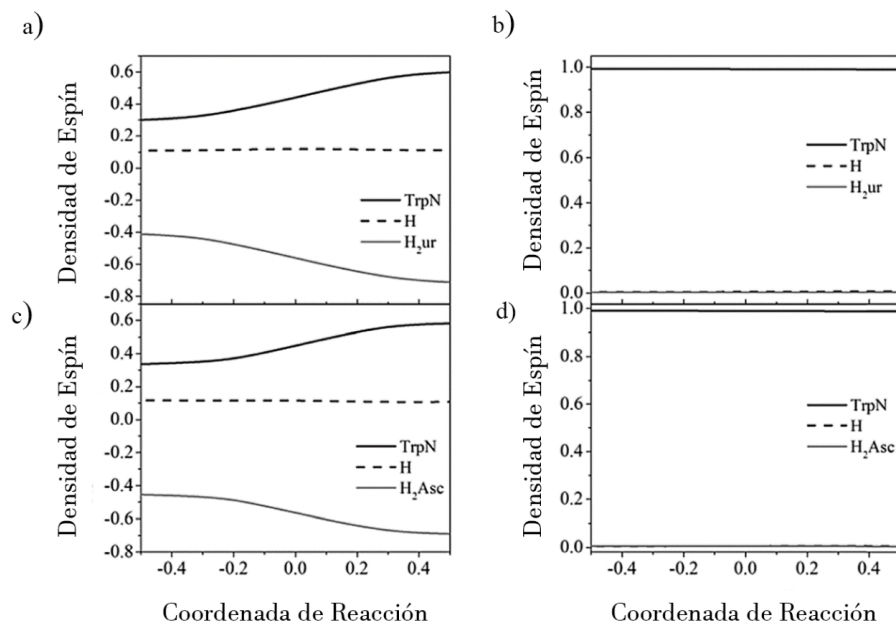
Este mecanismo ha sido encontrado como el principal camino de reacción de la reparación del radical triptófano por la fracción completamente protonada del ácido úrico, el ácido ascórbico y la fracción mono-aniónica del glutatión (Muñoz-Rugeles et al., 2017).

En la figura 2 se muestra el análisis de población de carga y densidad de espín para la reacción entre el radical triptófano y el ácido úrico en las figuras 2a y 2b y la reacción del radical triptófano con el ácido ascórbico en las figuras 2c y 2d (Muñoz-Rugeles & Alvarez-Idaboy, 2017).

En el análisis de carga de la figura 1, se comentó que las cargas en el aceptor de hidrógeno y en el donador se cruzan y cambian de signo durante los mecanismos concertados HAT/PCET. En el caso de la figura 2a y 2c, la carga del donador se vuelve más negativa mientras que la carga en el aceptor se vuelve más positiva, esto implica que hubo una transferencia de protón, sin la presencia de una transferencia SET. Por ende, estos perfiles de análisis de carga y densidad de espín corresponden a la primera etapa de una reacción tipo PEST.

Figura 2.

a) Análisis de carga atómica de la reacción entre el radical triptófano y el ácido úrico. b) Densidad de espín del análisis a. c) Análisis de carga de la reacción de radical triptófano y el ácido ascórbico. d) densidad de espín del análisis c. Adaptado de: (Muñoz-Rugeles & Alvarez-Idaboy, 2017)

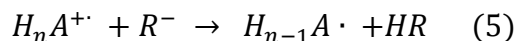
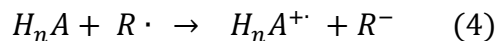


Para el análisis de la densidad de espín, mientras en los mecanismos HAT/PCET se presentaban cambios en la densidad de espín del donador y aceptor, en el mecanismo PEST las magnitudes de estas especies permanecen constantes como se muestra en la figura 2b y 2d, debido a que en la primera etapa no hay transferencia SET y por ende la densidad de espín se localiza sobre el radical a lo largo de la reacción.

1.2.4. Mecanismo EPST

El primer paso de este mecanismo consiste en una transferencia SET desde la molécula neutra del antioxidante hacia el radical, dando lugar al catión radical del antioxidante. El segundo paso consiste en una transferencia de protón hacia el radical libre, como establecen las

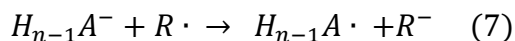
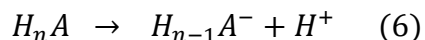
ecuaciones 4 y 5. Este último paso puede darse directamente desde el antioxidante o ser mediado por el solvente.



Dado que el primero paso implica una transferencia de electrón, este mecanismo se favorece en solventes polares, que estabilicen el catión radical del producto. Así mismo, la afinidad electrónica del antioxidante debe ser baja, mientras que la del radical debe ser alta.

1.2.5. Mecanismo SPLET

Este mecanismo fue propuesto en 2003 por Litwinienko e Ingold , y consta de dos pasos: el primero representa la deprotonación de la molécula de antioxidante, formando el correspondiente anión, y este, en un segundo paso realiza una transferencia SET (Litwinienko & Ingold, 2003), como se evidencia de las ecuaciones 6 y 7.

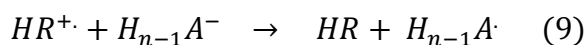
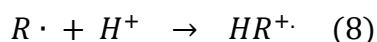


Evidentemente para ocurrir el primer paso de este mecanismo el pK_a del antioxidante debe ser menor a aquel del solvente, por lo que este camino de reacción se da en presencia de solventes polares.

Dentro de los antioxidantes que reaccionan por medio de este mecanismo se encuentran el Trolox, fraxetina, isoflavonoides, xantinas, ácido gálico, erodiales, quercetina, curcumina, ácidos dihidroxibenzoicos e hidroxibenzoicos, entre otros (Galano et al., 2014; Markovic et al., 2014).

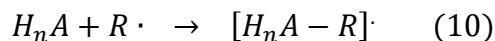
1.2.6. Mecanismo SPGET

Para este mecanismo, se parte de un proceso de protonación en el radical, el cual se da de forma asistida por medio del solvente. Luego de esto, el catión radical hace una transferencia SET al anión del antioxidante, como se muestra en las ecuaciones 8 y 9.



Este mecanismo ha sido descubierto recientemente y se ha encontrado en antioxidantes como el ácido úrico en la reparación al radical Triptófano (Muñoz-Rugeles et al., 2017).

Además de los mecanismos anteriores, las reacciones entre antioxidantes y radicales pueden dar lugar a un solo producto, en particular, un aducto o complejo formado entre ambas especies. Este mecanismo se conoce como RAF (por sus siglas en inglés, *Radical Adduction Formation*) y se puede describir como presenta la ecuación 10.



Para la formación de estos aductos se debe contar con sitios de reacción en los antioxidantes que no contengan gran cantidad de sustituyentes debido a impedimentos estéricos. Por otro lado, este mecanismo se favorece cuando los antioxidantes poseen gran cantidad de dobles enlaces para permitir la sustitución, así como también se favorece por radicales electrofílicos.

El mecanismo RAF se ha encontrado en carotenoides en reacción con radicales alcoxil, alcoxiperoxilol, benzoperoxilos, también en alcoholes hidroxibenzílicos, carnosina, ácido géntísico y rebamipidina en reacción con radicales hidroxilo (Galano, Mazzone, et al., 2016).

Cuando en la reacción global se encuentran varios mecanismos de reacción, se define un factor de fracción porcentual ($\% \Gamma$), el cual calcula el porcentaje de participación de cada mecanismo, este se define según la ecuación 11.

$$\% \Gamma = \frac{k_i}{k_{overall}} * 100 \quad (11)$$

Donde k_i es la constante de velocidad de cada mecanismo y $k_{overall}$ es la suma de las constantes de velocidad de todos los mecanismos involucrados.

1.3. Teoría del funcional de la densidad y funciones base

Dentro del marco de la teoría cuántica, las propiedades físicas de un sistema atómico o molecular se pueden derivar a través de la función de onda del sistema. Para moléculas poliatómicas esta función es resultado de la solución de la ecuación de Schrödinger no relativista dada por la ecuación 12.

$$H_{el} \psi_i = E \psi_i \quad (12)$$

Cuyo Hamiltoniano está definido por la ecuación 13 (Koch & Holthausen, 2001).

$$H_{el} = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_i \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{i\alpha}} + \sum_i \sum_{j>i} \frac{1}{r_{ij}} \quad (13)$$

Debido a que la función de onda $\psi(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n)$ depende de las $3N$ coordenadas de los átomos, la resolución para sistemas de gran tamaño de partículas de la ecuación de Schrödinger se hace laboriosa e impráctica. Una aproximación a este problema se resuelve mediante la teoría del funcional de la densidad DFT (por sus siglas en inglés, *Density Functional Theory*) que utiliza la densidad electrónica definida según la ecuación 14.

$$n(r) = 2 \sum_i \psi_i^*(\mathbf{r}) \psi_i(\mathbf{r}) \quad (14)$$

La ventaja de esta propiedad radica que sólo depende de tres coordenadas y no 3N coordenadas, como en el caso de la función de onda. A través de esta propiedad, Kohn y Hohenberg establecieron dos teoremas que son la base fundamental de la teoría DFT (Hohenberg & Kohn, 1964).

Primer Teorema: La energía basal del sistema (E) es un funcional único de la densidad electrónica.

Segundo Teorema: La densidad electrónica que minimiza la energía del funcional de energía es la densidad electrónica verdadera que es la solución de la ecuación de Schrödinger.

El primer teorema garantiza que existe una correlación única entre la función de onda del estado basal con la densidad electrónica y, por lo tanto, también con la energía, es decir, se deduce entonces que el uso de la densidad electrónica también permite conocer la energía del sistema y las propiedades relacionadas a ella.

La forma del funcional de energía se puede expresar como muestra la ecuación 15.

$$E(\psi_i) = E_{conocido}(\psi_i) + E_{XC}(\psi_i) \quad (15)$$

Donde el término $E_{conocido}(\psi_i)$ está definido según la ecuación 16.

$$E_{conocido}(\psi_i) = \frac{\hbar^2}{m} \sum_i \psi_i^* \nabla^2 \psi_i d^3r + \int V(r) n(r) d^3r + \frac{e^2}{2} \iint \frac{n(r)n(r')}{r-r'} d^3r d^3r' + E_v \quad (16)$$

El primer término de la derecha representa la energía cinética electrónica, el segundo representa la energía de interacción núcleo-electrón, el tercero la energía de interacción electrón-electrón y el último la energía de interacción entre núcleos.

La forma del funcional $E_{XC}(\psi_i)$ se aproxima teniendo en cuenta variables como el gradiente de la densidad electrónica, el intercambio Hartree-Fock y la inclusión de orbitales atómicos.

La aproximación de densidad local LDA (por sus siglas en inglés, *Local Density Aproximation*), aproxima el funcional $E_{XC}(\psi_i)$ mediante la relación de la ecuación 17 (Bagayoko, 2014).

$$E_{XC}(\psi_i) = \int p(r) \varepsilon_{XC}(p) dr \quad (17)$$

En la cual se supone que la densidad electrónica $p(r)$ solo cambia con la posición r y lo hace de forma continua. El término $\varepsilon_{XC}(p)$ es la energía de intercambio-correlación de cada electrón en un gas de electrones con densidad uniforme p y tiene la forma mostrada en la ecuación 18.

$$\varepsilon_{XC}(p) = -\frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{\frac{1}{3}} (p(r))^{\frac{1}{3}} + \varepsilon_X(p) \quad (18)$$

Donde $\varepsilon_X(p)$ es una función de forma compleja hallada por Vosko, Wilk y Nusair. Al reemplazar este término $\varepsilon_{XC}(p)$ en la definición del funcional se obtiene la ecuación 19 (Vosko et al., 1980).

$$E_{XC}(\psi_i) = -\frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{\frac{1}{3}} \int (p(r))^{\frac{4}{3}} dr \quad (19)$$

Para sistemas de capa abierta, es usual tratar los electrones de diferente espín en orbitales atómicos diferentes, incluso si se encuentran dentro del mismo nivel energético. Debido a esto, el funcional de correlación depende entonces de la densidad electrónica de espín α y de espín β $E_{XC}(p_\alpha, p_\beta)$. Esta técnica es llamada la aproximación de densidad local de espín LSDA (por sus siglas en inglés, *Local Spin Density Aproximation*).

La aproximación por gradiente generalizado de densidad GGA (por sus siglas en inglés, *Generalized-Gradient Aproximation*) presenta la misma forma del funcional $E_{XC}(\psi_i)$ dada por la

aproximación LSDA, pero teniendo en cuenta los gradientes de densidad de p_α y p_β , como muestra la ecuación 20 (Sun et al., 2015).

$$E_{XC}(p_\alpha, p_\beta) = \int f(p_\alpha(r), p_\beta(r), \nabla p_\alpha(r), \nabla p_\beta(r)) dr \quad (21)$$

Por esto, estos funcionales son llamados semi-locales, ya que incluyen no solo el valor de la densidad electrónica en cierta posición r , sino también en su vecindad, dada por el gradiente (derivadas espaciales).

Adicionalmente, se pueden incluir las segundas derivadas de la densidad electrónica y/o el término de densidad de energía cinética en los funcionales de intercambio-correlación, lo que da lugar a los funcionales meta-GGA, dados por la ecuación 22.

$$E_{XC}(p_\alpha, p_\beta) = \int f(p_\alpha(r), p_\beta(r), \nabla p_\alpha(r), \nabla p_\beta(r), \nabla^2 p_\alpha(r), \nabla^2 p_\beta(r)) dr \quad (22)$$

Si dentro de la definición de un funcional se incluyen tanto funcionales dados en la aproximación meta-GGA y el funcional de intercambio dado por la teoría de Hartree-Fock, se obtiene los llamados funcionales híbridos-metaGGA. En estos, se incluye un parámetro α que acompaña al funcional $E_{XC}(\psi_i)$, el cual define la cantidad de correlación que tiene, por ejemplo, un funcional con valor de $\alpha = 0.50$ se dice que contiene un 50% de correlación Hartree-Fock.

Dependiendo de las variables incluidas en los funcionales de correlación, estos se clasifican en la llamada escalera de Jacob. El funcional M05-2X desarrollado por Truhlar et al (Zhao & Truhlar, 2008) es el funcional más utilizado en la metodología QM-ORSA y es el utilizado en este trabajo. Está parametrizado para elementos no-metálicos y pertenece a los funcionales de cuarto nivel en la escalera de Jacob, es decir, funcionales de tipo meta-GGA o híbridos-metaGGA, que incorporan un alto intercambio Hartree-Fock, densidad de energía cinética, gradiente de densidad y densidad de espín electrónico.

Debido a que los sistemas químicos son en su mayoría moléculas, para describir el estado electrónico de éstas se construyen las funciones de onda moleculares a partir de orbitales atómicos.

Los orbitales atómicos más usados son los orbitales tipo Slater (STOs) y tipo Gaussiano (GTOs), que se describen mediante las ecuaciones 23 y 24.

$$\chi(r, \theta, \phi) = r^{n-1} e^{-\zeta r} Y(\theta, \phi) \quad \text{Orbitales tipo Slater (STOs)} \quad (23)$$

$$\chi(x, y, z) = x^i y^j z^k e^{-\alpha r^2} \quad \text{Orbitales tipo Gaussiano (GTOs)} \quad (24)$$

En los orbitales STOs el parámetro zeta (ζ) define el exponente del orbital, y puede ser hallado mediante el teorema variacional, minimizando la energía con respecto a ζ (Jensen, 2013).

En los orbitales GTOs, i, j y k son enteros positivos o cero, y definen el tipo de orbital, por ejemplo, con $i + j + k = 0$ se define un orbital tipo s o con $i = 1$ y $j = k = 0$ un orbital p_x .

La diferencia entre estos tipos de orbitales radica en que los STOs no son funciones suaves en el origen de coordenadas a diferencia de los GTOs (Magalhães, 2014).

La forma de los orbitales STOs es similar a aquellos del átomo de hidrógeno y por ende su uso es preferible para construir orbitales moleculares de átomos y moléculas lineales. Sin embargo, los orbitales GTOs presentan ventajas para construir orbitales de moléculas no lineales y en la evaluación de las integrales de dos electrones, lo que representa una mejor eficiencia en el uso de recursos computacionales y, por ende, para efectos de cómputo se prefieren los GTOs.

El conjunto de funciones utilizadas para construir los orbitales moleculares es llamada el set de funciones base. El número mínimo de funciones en el set base es aquel que contiene una función para cada orbital atómico de cada átomo, tanto en capas internas como externas. En el caso que se utilicen dos funciones para describir cada orbital atómico, el set base se conoce como

set de funciones base doble zeta, debido a que el orbital se describe mediante dos STOs con diferente exponente, como lo muestra la ecuación 25.

$$x(r, \theta, \phi) = r^{n-1} [c_1 e^{-\zeta_1 r} + c_2 e^{-\zeta_2 r}] Y(\theta, \phi) \quad (25)$$

Con este tipo de funciones base se logra describir con más precisión la distribución de carga en la molécula y, por ende, obtener mejores resultados (Ulusoy & Wilson, 2019). Del mismo modo, si se utilizan tres funciones para describir cada orbital atómico se obtiene un set de base triple zeta, y en general, dependiendo del número de funciones necesarias para describir cada orbital se pueden formar set de bases n zeta.

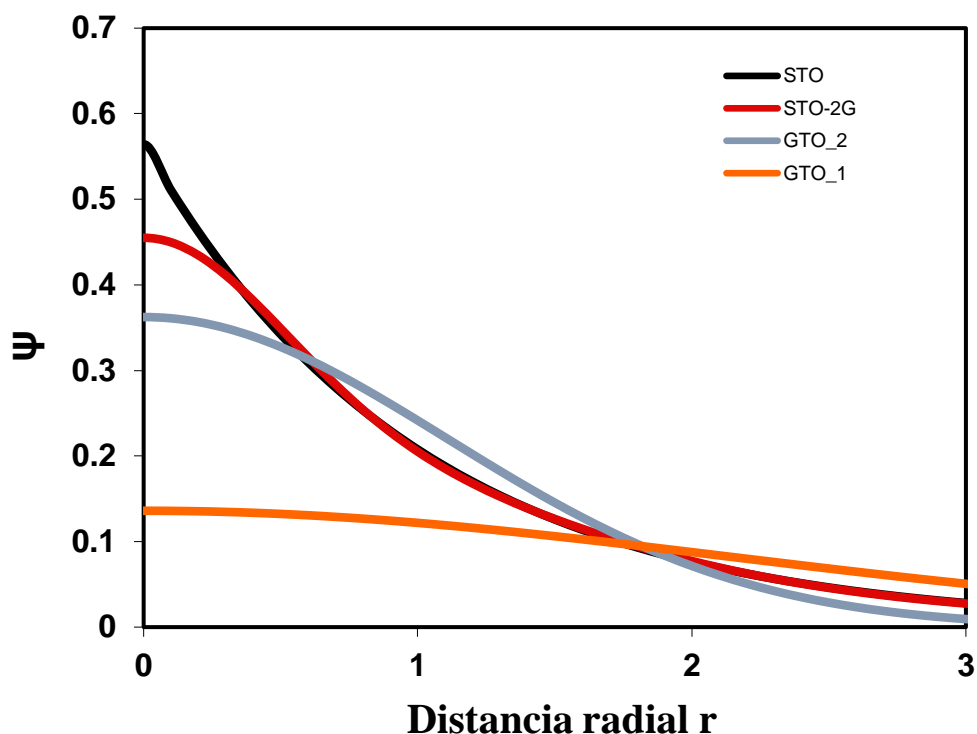
Dado que en las reacciones químicas los orbitales involucrados son aquellos en la capa externa, es útil describir cada orbital interno por una función STOs y aquellos de valencia por dos o más funciones. Este tipo de set se conocen como set de funciones base de valencia dividida (Davidson & Feller, 1986).

Adicionalmente a las funciones del set base, se utilizan otras funciones adicionales llamadas funciones de polarización, las cuales ayudan a describir las perturbaciones que sufren los orbitales en la formación de enlaces químicos. Estas funciones también son del tipo STOs, pero con un número cuántico l mayor que aquel de la capa de valencia de los átomos (Check et al., 2001).

En la práctica, para obtener mejores resultados, se utilizan orbitales STOs construidos mediante una combinación de orbitales GTOs, como se muestra en la figura 3. Dependiendo de cuantos GTOs se utilicen, el set de funciones base se describe mediante la terminología N-MPG. La letra N indica el número de funciones Gaussianas para los orbitales internos, M el número para la región interna de los orbitales de valencia y P el número de funciones para la región externa de valencia. G representa que el set de funciones base es de tipo Gaussiano.

Figura 3.

Orbital de Slater STO (negro). Las curvas de color naranja y gris representan orbitales tipo Gaussianos (GTO) y la curva en color rojo representa la multiplicación de los GTO la cual da el orbital STO-2G que es más cercano al orbital tipo STO.



El set de funciones base más empleado en la metodología QM-ORSA, el cual es utilizado en este trabajo, es el 6-31+G (d, p), es decir, una base conformada de una combinación lineal de 6 funciones gaussianas para los orbitales internos, con división de los orbitales de valencia, en donde la parte interna de estos está descrita por una combinación de 3 Gaussianas y la parte externa por 1 función Gaussiana. La terminología +(d,p) representa funciones de polarización d para átomos pesados, p para átomos de hidrógeno, y “+” una función difusa, la cual se incluye para describir mejor aniones e interacciones atómicas de alto rango.

1.4. Teoría del estado de transición

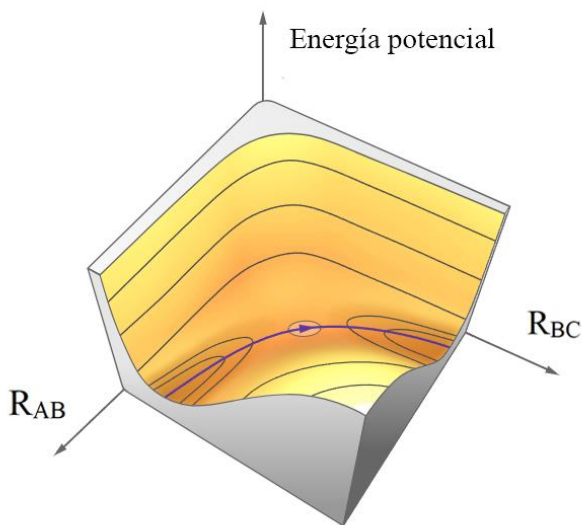
Una reacción química puede considerarse como una reorganización de átomos en las moléculas de reactivos hasta formar los productos, por esto, es posible calcular la energía de los

átomos en función de las coordenadas geométricas de cada de ellos al transcurrir la reacción. Debido a que para especificar la posición de cada átomo se necesitan 3 coordenadas, el sistema completo queda determinado con $3n$ coordenadas, siendo n el número de átomos. El cambio en energía respecto a las $3n$ coordenadas se representa usualmente a través de curvas de nivel, llamadas superficies de energía potencial (Truhlar, 2001), como se muestra en la figura 4.

Para pasar de una curva a otra, el sistema requiere de un aumento o disminución de energía, según sea el gradiente del cambio. Los mínimos de estas superficies representan configuraciones atómicas estables, en este caso, a los correspondientes reactivos o productos. Para que las moléculas pasen de la configuración de reactivos a productos es necesario un aumento de energía en el proceso, la energía mínima requerida se conoce como energía de activación ΔG^0 y corresponde a una configuración llamada Estado de Transición TS (por sus siglas en inglés, *Transition State*). Este estado se encuentra en equilibrio con los reactivos, por lo que su concentración depende de la concentración de los reactivos (Truhlar et al., 1996).

Figura 4

Superficie de energía potencial para la reacción $A + B \rightarrow B + C$. Fuente: CC BY-NC; Ümit Kaya via LibreTexts



Para reacciones en soluciones, se toma en cuenta el efecto de la teoría del volumen libre y las correcciones de Okuno, por lo que la energía de activación se corrige según la ecuación 26 (Okuno, 1997).

$$\Delta G_{sol}^{FV} \cong \Delta G^0 - RT\{\ln[n10^{(2n-2)}] - (n - 1)\} \quad (26)$$

Donde n es la molecularidad de la reacción. Este efecto del solvente muestra en este caso, que los efectos en la pérdida de entropía en solución decrecen 2.54 k mol^{-1} , comparado con reacciones en fase gaseosa.

La energía de activación está asociada a la constante de velocidad según la ecuación 27.

$$k = \sigma\tau \frac{k_b T}{h} e^{\frac{-(\Delta G^0)}{RT}} \quad (27)$$

En la metodología QM-ORSA se utilizan una serie de correcciones a la ecuación de velocidad, entre las que está la degeneración del camino de reacción o factor estadístico (σ). Este tiene en cuenta todos los posibles caminos de reacción equivalentes, considerando todas las configuraciones al reorganizar átomos iguales por rotación. Para incluir este factor es necesario tener en cuenta la simetría del sistema, ya que puede introducirse error en la medición por doble conteo de la misma configuración (Pollak & Pechukas, 1978).

Debido a que en las reacciones antioxidante-radical se incluye la transferencia de átomos ligeros como el átomo de hidrógeno, se debe introducir correcciones por tunelaje (τ), en este caso, esta corrección se realiza a través de la función de energía potencial unidimensional de Eckart, la cual está definida según la ecuación 28 (Brown, 1981).

$$\Gamma = e^{\frac{V_1}{kT}} \int_{E_0}^{\infty} \frac{K e^{\frac{-E}{kT}}}{kT} dE \quad (28)$$

Donde V_1 representa la barrera de la energía potencial y K el coeficiente de probabilidad de transmisión por tuneo.

Puesto que en estos mecanismos se manejan reacciones bimoleculares, las unidades de las constantes de velocidad son del orden de $M^{-1} s^{-1}$, de ahí que sea necesario incluir factores de corrección al estado estándar 1 M para evitar subestimaciones en los valores de k .

Para constantes de velocidad cercanas al límite de difusión se utiliza la teoría de Collins-Kimball para calcular la constante aparente de velocidad, definida por la ecuación 29 (Collins & Kimball, 1949).

$$k_{app} = \frac{k_d k}{k_d + k} \quad (29)$$

Donde k es la constante de la ecuación 14 y k_d la constante de Smoluchowski (Smoluchowski, 1918) dada por la ecuación 30.

$$k_d = 4\pi R D_{AB} N_a \quad (30)$$

Siendo R la distancia de reacción, N_a es el número de Avogrado y D_{AB} es el coeficiente de difusión mutua dado por la ecuación 31 (Einstein, 1905).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (31)$$

Donde η es la viscosidad del solvente, a el radio del soluto, k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura, que en este caso es 298.15K.

La viabilidad termodinámica de cada uno de los mecanismos de reacción se mide a partir de la energía libre de Gibbs de la reacción, definida en la ecuación 32.

$$\Delta G_{rxn} = \Delta G_{productos} - \Delta G_{reactivos} \quad (32)$$

Computacionalmente, existen varios métodos para hallar el TS de una reacción, dependiendo de la información inicial dada y el método para hallar mínimos locales. Entre estos está el método STQN (por sus siglas en inglés, *Synchronous Transit Quasi-Newton method*), desarrollado por H.B Schegel y colaboradores (Schlegel, 1982), en el cual se halla el TS siguiendo una parábola que conecta a reactivos y productos en el perfil de energía potencial según el método QST (por sus siglas en inglés, *Quadratic Synchronous transit model*), seguido de una optimización por métodos QN (por sus siglas en inglés, *Quasi-Newton*). Este último consiste en algoritmos para hallar mínimos o máximos locales de funciones, dado el conocimiento de la función, su gradiente y estimando el hessiano a través de estos dos. Sin embargo, si la estructura química planteada es lejana al TS, no es posible encontrar una convergencia, y el método no permite calcular con precisión el hessiano de la función.

El método de optimización utilizado en este trabajo en el software Gaussian 16 es el algoritmo de Berny. Fue desarrollado por Bernhard Schlegel y consiste en un algoritmo que utiliza la función de las fuerzas que actúan en los átomos y su hessiano para predecir la estructura más favorable energéticamente (Peng & Bernhard Schlegel, 1993). El algoritmo construye el hessiano de la función al comienzo de la optimización a través de un campo de fuerzas estándar y a partir de este punto, con los cálculos de energía y sus primeras derivadas en cada punto del camino de reacción va cambiando el hessiano hasta obtener autovalores positivos que indiquen una convergencia en la optimización y, por ende, a un mínimo de energía.

1.5. Transferencias de Carga

En las reacciones en las que solo ocurre transferencias de electrones no es posible identificar un TS y por esto, no es posible encontrar el valor de ΔG^0 a partir de la teoría clásica TST y, por ende, el valor de k .

A partir de 1956, Rudolph A. Marcus publicó una serie de artículos de investigación que dieron lugar a su teoría de transferencia electrónica, en donde logra obtener una relación que permite hallar ΔG^0 para estas reacciones.

La transferencia de carga a lo largo de la reacción se modela mediante un acercamiento de los reactivos, en el cual no se forman ni se destruyen enlaces químicos y solo se realiza la transferencia electrónica. Cuando ocurre esta transferencia, se produce la creación de las especies cargadas, causando un efecto de cambio en la orientación dipolar del solvente circundante.

La energía liberada cuando los dipolos del solvente se reorganizan en la dirección del campo eléctrico de las cargas se llama energía de reorganización de solvente λ_s . Internamente, en las moléculas de los reactivos también ocurren cambios en las distribuciones de carga debido a la transferencia electrónica, la cual se representa por λ_o , la energía de reorganización interna. La suma de estas dos energías da lugar a la energía de reorganización del proceso global λ , dada por la ecuación 33.

$$\lambda = \lambda_s + \lambda_o \quad (33)$$

Marcus encontró que, en el caso de un modelo de dos esferas, λ_s se puede calcular según la ecuación 34 (Marcus & Sutin, 1985).

$$\lambda_s = (\Delta e)^2 \left[\frac{1}{2a_1} + \frac{1}{2a_2} - \frac{1}{R} \right] \left[\frac{1}{D_{op}} - \frac{1}{D_s} \right] \quad (34)$$

Donde a_1 y a_2 son los radios atómicos de los reactivos, R la distancia de separación de reactivos, D_{op} y D_s la constante dieléctrica óptica y estática del solvente respectivamente y Δe la carga transferida. Para el caso de λ_o , su calculo se puede realizar mediante las constantes de fuerzas en las coordenadas normales de vibración, o mediante las energías de reacción según la ecuación 35 (Marcus, 1964).

$$\lambda_o = \Delta E - \Delta G \quad (35)$$

Siendo ΔE la energía de la transición vertical electrónica y ΔG la energía libre de Gibbs de la reacción. El perfil de energía potencial de la reacción se aproxima a través de parábolas para los reactivos y productos, como se indica en la figura 5, donde la coordenada de reacción en el eje x, representa todas las posiciones nucleares del sistema.

A partir de estas parábolas, y por argumentos geométricos, Marcus encontró la relación entre ΔG^0 y ΔG dada por la ecuación 36 (Marcus, 1993).

$$\Delta G^0 = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G}{\lambda} \right)^2 \quad (36)$$

De la ecuación de Arrhenius se conoce que la constante de velocidad se relaciona con la energía de activación según la ecuación 37.

$$k = A e^{\left(-\frac{\Delta G^0}{RT} \right)} \quad (37)$$

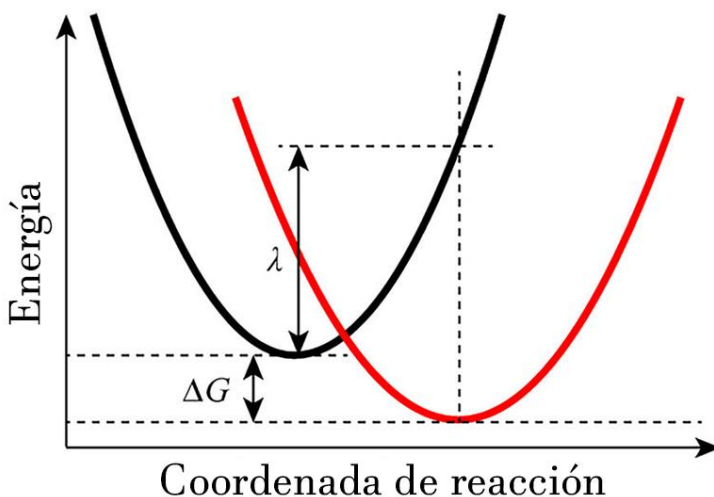
Donde A es la constante de frecuencia, R la constante de los gases y T la temperatura. Al reemplazar el valor de la energía de activación según la teoría de Marcus, se obtiene la ecuación 38.

$$k = A e^{\left[\frac{-(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda RT} \right]} \quad (38)$$

De la ecuación 25, se evidencia un fenómeno interesante. Dependiendo del valor de la energía de reorganización, se obtienen tres distintas relaciones con la energía de activación, como se ilustra en la figura 6.

Figura 5.

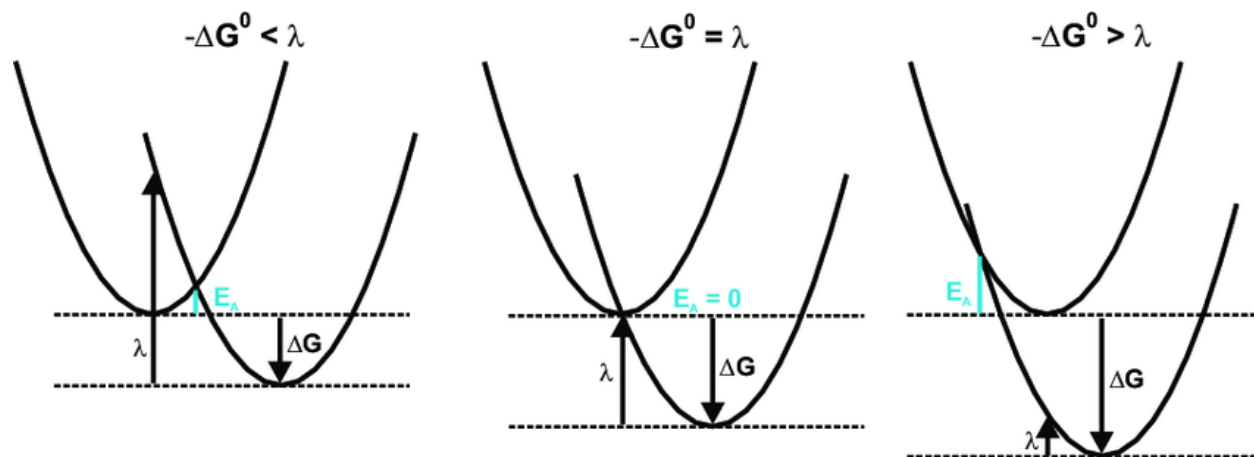
Gráfico de energía a lo largo de la coordenada de reacción de una reacción. La parábola en color negro representa la curva de energía de reactivos y en color rojo la curva de energía de productos. La diferencia en los estados mínimos de energía de estas representa el valor de la energía libre de reacción ΔG . La energía de reorganización está dada por el punto de intersección de ambos mínimos de energías.



En la primera secuencia, se observa las curvas con la relación $-\Delta G^0 < \lambda$. A medida que la reacción se hace más exergónica, la energía de activación disminuye y por ende aumenta la velocidad, hasta llegar a un punto de una reacción sin barrera de energía dada por $-\Delta G^0 = \lambda$ (Silverstein, 2012). Para reacciones altamente exergónicas, la intersección de las curvas se sitúa en el lado izquierdo de la parábola de reactivos $-\Delta G^0 > \lambda$, donde se observa que a medida que aumenta la energía libre de reacción, aumenta la energía de activación, lo que significa una disminución en la velocidad. Esta región es conocida como la región invertida y supone un cambio en la relación de la termodinámica con la cinética de reacciones.

Figura 6.

Secuencia de figuras que demuestran que a medida que aumenta la energía libre de reacción, el punto de intersección que define el valor de la energía de activación se traslada hacia la izquierda pasando por el valor $E_A=0$ y luego a la llamada región invertida.



1.6. Método de la coordenada intrínseca de reacción

Para estudiar la evolución de las cargas atómicas y densidades de espín durante la reacción, es necesario conocer el camino de reacción. Esto implica, que debe determinarse con exactitud el TS de la reacción y a su vez, encontrar el camino de mínima energía que conecte los puntos correspondientes a las configuraciones de reactivos y productos.

Existen diversos parámetros para encontrar el camino de reacción utilizando cualquier coordenada intrínseca del sistema, por ejemplo, el ángulo de enlace. Sin embargo, se ha encontrado que estos caminos de reacción pueden diferir dependiendo de la coordenada escogida.

Una aproximación más fiable se da por el método de la coordenada intrínseca de reacción IRC (por sus siglas en inglés, *Intrinsic Reaction Coordinate*). Como es sabido, el TS debe ser un punto en la superficie de energía potencial en el que, la energía con respecto a una frecuencia vibracional es máxima, y mínima para los demás modos de vibración. El método IRC parte de este punto y construye el camino de reacción de forma descendente por el gradiente de energía, utilizando las coordenadas cartesianas ponderadas en masa. De esta forma, se puede identificar que el método IRC se obtiene de la solución de la ecuación 39 (Maeda et al., 2015).

$$\frac{dq(s)}{ds} = v(s) \quad (39)$$

Donde $q(s)$ son las coordenadas cartesianas, s la coordenada a lo largo del camino de reacción, y $v(s)$ el vector de transición, el cual es un vector paralelo al gradiente de energía.

Esta aproximación del método IRC sigue de forma instantánea el vector de aceleración y por ello este método correlaciona de forma única el TS con las estructuras de reactivos y productos, donde el vector gradiente es igual a cero. Si la convergencia del perfil de energía llega en ambas direcciones desde el TS, se puede afirmar que la estructura del TS es correcta como muestra la figura 7. De lo contrario, si no hay convergencia, la estructura del TS propuesta es errónea y no conduce a una reacción química.

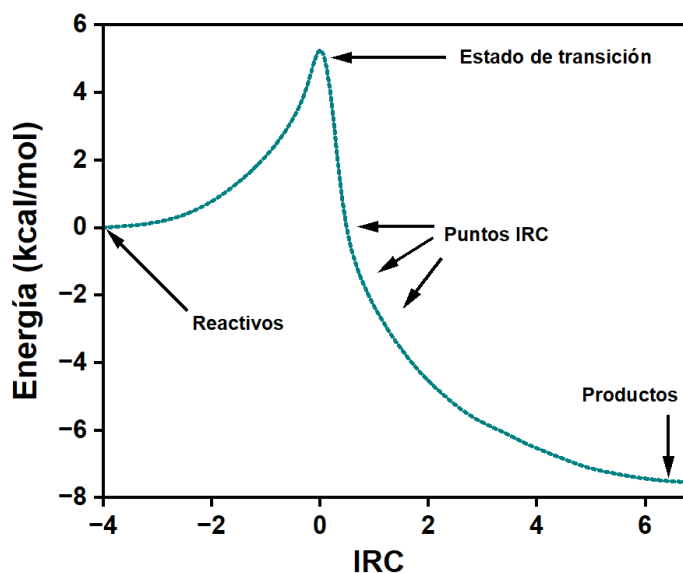
En Gaussian, el cálculo del método IRC posee varios parámetros que determinaran la precisión e información del perfil de reacción. En cualquier caso, las constantes de fuerza deben calcularse primero o ser proveídas por un análisis de frecuencia anterior, de manera que se pueda disminuir la energía de forma según la ecuación 40 (Deng & Ziegler, 1994).

$$dE = \frac{1}{2} k (dN)^2 \quad (40)$$

Donde dE es el cambio en la energía del sistema, k una constante de proporcionalidad y dN el tamaño de paso, que usualmente se da en unidades de 0.01 Bohr, o para casos más rigurosos en unidades de $0.01 \text{ amu}^{1/2} \text{ Bohr}$.

Figura 7.

Curva de Energía como función de la coordenada de reacción. Los puntos indican los cálculos realizados en el análisis IRC a partir del TS.



1.7. Análisis de Poblaciones

Para reacciones de transferencia de hidrógeno, es útil realizar un análisis de cargas de las moléculas a lo largo de la coordenada de reacción. Esto da información de si el hidrógeno se transfiere como átomo o en forma separada como un protón H^+ y un electrón e^- .

Existen diversos métodos de calcular la distribución electrónica en una molécula y derivar, por ende, la carga atómica, los momentos dipolares y las geometrías de los orbitales atómicos. El análisis de poblaciones de Mulliken, utiliza la función de onda molecular (Mulliken,

1955), mientras que el análisis de población de Hirshfeld utiliza la densidad electrónica (Hirshfeld, 1977).

El análisis de poblaciones de Mulliken implica utilizar un set de base particular para cada caso y esto implica una dependencia que afecta los resultados directamente, otros análisis basados en la teoría de orbitales naturales de Lowdin como el análisis natural de poblaciones, proveen una dependencia menor en el set de base escogido (Mayer, 2002), ya que se utiliza el set de base ortogonalizada simétrica de Lowdin y, por ende, produce resultados más fiables.

En la metodología QM-ORSA se utiliza el análisis de carga de Hirshfeld, el cual calcula la distribución de carga en cierto punto del espacio como la contribución de las densidades de carga de cada átomo a esa distancia. Integrando todas estas proporciones se obtiene el valor de la carga neta a lo largo del espacio. Esta densidad creada por la contribuciones de cada átomo se llama densidad electrónica promolecular.

El cálculo de la carga atómica según el análisis de Hirshfeld se da por medio de la ecuación 41.

$$q_a = Z_a - \int dr \frac{p_a^0(r)}{\sum_B p_B^0(r)} p(r) \quad (41)$$

Donde Z_a es la carga nuclear de cada átomo, $p_B^0(r)$ y $p_a^0(r)$ la densidad atómica basal del átomo B y A respectivamente y $p(r)$ es la densidad electrónica promolecular. Es decir, la densidad electrónica promolecular se particiona en cada región atómica y su valor depende de la contribución de la densidad de cada átomo a la densidad promolecular.

Debido a que las reacciones de antioxidantes involucran radicales, es decir, moléculas con uno o más electrones desapareados, el análisis de la densidad electrónica se facilita en

términos del espín electrónico (Reed et al., 1985). La densidad electrónica de espín se define como la ecuación 42.

$$\rho(r) = \rho_{\alpha}(r) + \rho_{\beta}(r) \quad (42)$$

Donde $\rho_{\alpha}(r)$ es la densidad de espín α y $\rho_{\beta}(r)$ la densidad de espín β . Las áreas positivas son aquellas en donde hay más probabilidad de encontrar al electrón en el estado α y las áreas negativas en el estado β . Por medio de esta función de densidad de espín es posible encontrar las regiones de alta probabilidad de deslocalización de los electrones desapareados, haciéndola útil para analizar procesos como transferencia de electrones y, por ende, para dilucidar mecanismos de reacción.

1.8. Método del campo de reacción autoconsistente

El efecto del solvente en la formulación del sistema depende del nivel de teoría utilizado para describir tanto el soluto como el solvente se obtienen distintos métodos.

Dentro de estos, están los métodos mixtos, en los cuales el soluto se modela mediante la teoría cuántica y el solvente mediante teorías clásicas. Una ventaja de éstos es que, se facilitan los cálculos computacionales al describir un sistema grande como el solvente en forma de un medio dieléctrico continuo y a su vez, se pueden conocer los cambios en las propiedades moleculares del soluto debido al solvente a través de su función de onda.

Inicialmente, Onsager et al, modelaron este sistema como una cavidad esférica alrededor del soluto y un medio dieléctrico continuo como el solvente (Onsager, 1936). La polarización inducida en el solvente por el soluto genera un campo de reacción al cual se acopla el momento dipolar del soluto. Más tarde, Tomasi et al, ampliarían el método para geometrías arbitrarias, donde la polarización inducida varía dependiendo de la superficie de contacto y el campo de reacción se modela mejor mediante densidades de carga (Tomasi et al., 1991).

Para introducir este efecto, en el hamiltoniano del soluto se introduce un operador de perturbación A no hermítico de origen electrostático. Al ser dependiente el hamiltoniano del operador A , la solución se obtiene de forma iterativa. Debido a esto, a este método se le conoce como el Campo de Reacción auto consistente SCRF (por sus siglas en inglés, *Self Consistent Reaction Field*).

Se han desarrollado varios modelos para su solución como el modelo PCM (por sus siglas en inglés, *Polarizable Continuum Model*), MST (por sus autores, Miertus, Scrocco y Tomasi), SMD (por sus siglas en inglés *Solvent Model Density*), COSMO (por sus siglas en inglés, *COnductor-like Screening MOdel*), entre otros.

La energía total del soluto, en términos de la aproximación de la teoría del funcional de densidad está dada por la ecuación 43.

$$E = \sum_i (\psi_i | h(1) | \psi_i) + \frac{1}{2} \int \rho_{total}(r) G(r, r') \rho_{total}(r') dr dr' + E_{xc}(\rho_{el}(r)) \quad (43)$$

Donde $G(r, r')$ es la interacción electrón-electrón efectiva u operador coulombiano de interacción, $h(1)$ el hamiltoniano mono electrónico, ψ_i los orbitales Kohn-Sham, $\rho_{total}(r)$ la densidad total de carga y E_{xc} un término de correlación que depende de la densidad electrónica.

En general, el campo de reacción se describe a través de las soluciones de una ecuación de diferencias finitas de Poisson-Boltzmann según la ecuación 44.

$$\nabla \epsilon(r) \nabla G(r, r') = -4\pi \delta(r, r') \quad (44)$$

Donde $\epsilon(r)$ es la constante dieléctrica y $\delta(r, r')$ es la función delta de Dirac. Para regiones interiores de la cavidad ϵ toma un valor de 1 y para regiones exteriores (solvente)

puede tomar valores superiores (por ejemplo, $\epsilon = 80$ para el agua). Debido a esto, la función de Green se puede separar como lo muestra la ecuación 45.

$$G(r, r') = \frac{1}{|r - r'|} + G^*(r, r') \quad (45)$$

Donde $G^*(r, r')$ representa el potencial del campo de reacción o efecto del solvente. El potencial de reacción per se, se obtiene operando este potencial a lo largo de la densidad de carga del soluto según muestra la ecuación 46 (Chen et al., 1994).

$$\psi_i^*(r) = \int G^*(r, r') \rho_{total}(r') dr' \quad (46)$$

Estas ecuaciones se solucionan a partir de métodos de diferencias finitas, las cuales modifican el término de energía total del soluto de forma dada por la ecuación 47.

$$E_{total} = E_o + \frac{1}{2} \int \rho_{total}(r) \psi_i^*(r) dr \quad (47)$$

Dentro de los métodos SCRF se encuentra el modelo universal de solvatación SMD, desarrollado por Truhlar et al. en donde el solvente se modela como un medio dieléctrico continuo, el cual presenta una tensión superficial en la superficie soluto-solvente (Marenich et al., 2009). Este método es universal, es decir, es aplicable a cualquier soluto y en cualquier medio en los que se conozcan algunos parámetros como la constante dieléctrica, índice de refracción y parámetros de acidez y basicidad. El solvente utilizado para medios polares es el agua y para medios lipídicos se utilizar el pentiletanolato.

El modelo SMD es el utilizado en la metodología QM-ORSA y en comparación a los demás, este incluye las interacciones de corto alcance que puedan ocurrir entre el soluto y las primeras capas de solvente, como interacciones $\pi - \pi$ stacking, puentes de hidrógeno, iones, efectos de dispersión, repulsión, entre otros. De esta forma, la energía de solvatación en este modelo se obtiene como establece la ecuación 48.

$$\Delta G_S^o = \Delta G_{ENP} + G_{CDS} + \Delta G_{conc}^o \quad (48)$$

Donde ΔG_{ENP} es el cambio en la energía debido a la polarización del soluto dada en la ecuación 40, G_{CDS} representa el cambio en la energía debido a las interacciones de corto alcance (efectos de cavidad, dispersión y estructura de solvente S.) y ΔG_{conc}^o es la energía de concentración de las moléculas en estado gaseoso estándar a estado líquido estándar a 298K.

El término G_{CDS} está dado por la ecuación 49.

$$G_{CDS} = \sum_k^N \delta_k A_k \left(R, (R_{Z_k} + r_s) \right) + \delta^M \sum_k^N A_k \left(R, (R_{Z_k} + r_s) \right) \quad (49)$$

Donde δ_k y δ^M son las tensiones superficiales del átomo k y la tensión superficial molecular respectivamente, R_{Z_k} el conjunto de radios atómicos, R las coordenadas del soluto, r_s el radio del solvente y A_k el área superficial accesible del solvente.

La eficiencia de este modelo ha sido comprobada con 274 energías libres de solvatación experimentales de solutos neutros en agua y 2072 energías libres de solvatación en 90 solventes no acuosos. En promedio los errores calculados fueron menos de 0.6-1.0 kcal/mol, lo que demuestra que es un modelo muy fiable para cálculos de efectos de solventes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar mediante la teoría del funcional de densidad los mecanismos de reparación antioxidante de moléculas derivadas de 2-piridona a los radicales Triptófano y Tirosina.

2.2. Objetivos Específicos

Establecer por medio de energías libres de Gibbs de reacción los mecanismos de reacción más probables.

Reconocer a partir de análisis de carga y de espín de los estados de transición la diferencia entre mecanismos de reacción concertados o secuenciales.

Calcular las constantes de velocidad de reacción total asociadas a la capacidad antioxidante para cada molécula de n-hidroxi-2-piridona.

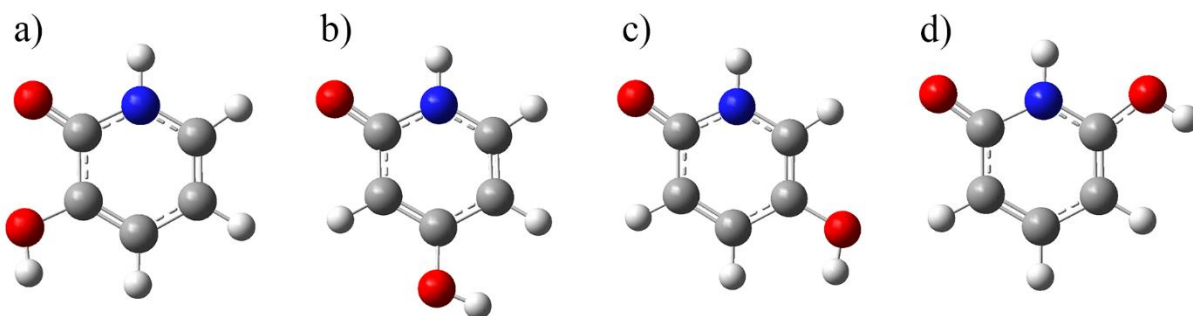
3. Metodología

3.1. Optimización de Reactivos.

Los antioxidantes evaluados en este trabajo fueron la 3-hidroxi-2-piridona, 4-hidroxi-2-piridona, 5-hidroxi-2-piridona y 6-hidroxi-2-piridona, cuya estructura química se muestra en la figura 8.

Figura 8.

Antioxidantes evaluados mediante la metodología QM-ORSA y optimizados por medio del software Gaussian 16. a) 3-hidroxi-2-piridona b) 4-hidroxi-2-piridona, c) 5-hidroxi-2-piridona, d) 6-hidroxi-2-piridona.



Los análisis de mecanismos de reacción y cinéticos se realizaron utilizando la metodología QM-ORSA, la cual utiliza a nivel de teoría el funcional M05-2X, el conjunto de funciones base 6-31+g(d,p) y el modelo SMD para incluir los efectos del solvente.

Para los cálculos de análisis IRC, optimizaciones, análisis de población y frecuencias se utilizó el software Gaussian 16. Las geometrías de las moléculas, los estados de transición y los orbitales HOMO y SOMO se obtuvieron mediante la interfaz gráfica de GaussView 6.

El comando `opt=calcfc` se usó para definir el método de optimización, `freq` para el análisis vibracional, `scf=qc` para definir la forma de convergencia cuadrática del campo de reacción autoconsistente y `int(grid=ultrafine)` para establecer el cálculo de las integrales de dos electrones y sus derivadas.

Primeramente, se realizó una optimización de la geometría de las moléculas ya que, es necesario encontrar la distancia de enlace efectivas y la geometría de los sistemas resonantes de los antioxidantes y radicales. En el apartado A-1 del apéndice se muestra el archivo de entrada de Gaussian utilizado para la optimización de la molécula 3-hidroxi-2-piridona.

Debido a que el equilibrio ácido-base afecta la disociación de las especies presentes en solución, y, por ende, los posibles mecanismos de reacción, es necesario conocer a pH fisiológico las fracciones molares tanto de los antioxidantes como de los aminoácidos Tyr y Tryp.

Los valores de pK_a de los antioxidantes se calcularon de forma teórica de acuerdo con un protocolo desarrollado por Galano et al. según la ecuación 50.

$$pK_a^{calc} = m\Delta G_{s(BA)} + C_o \quad (50)$$

Donde m y C_o son parámetros que dependen del grupo funcional que contenga el enlace de hidrógeno y la base de funciones de orbitales con la cual se calculan las energías libres. En este caso, el enlace O-H del anillo de los antioxidantes se consideró de tipo fenol.

Los valores de las constantes para los cuatro conjuntos de bases reportados en el protocolo se muestran en la tabla 1 (Galano, Pérez-González, et al., 2016).

Tabla 1.

Valores de m y C_o según el protocolo de Galano et al., con respecto a las bases 6-31(p), 6-31+g(d,p), 6-311+g(d) y 6-311++g(d,p) y enlace OH tipo fenol.

Base	m	C_o
6-31+g(d)	0.313	-80.02
6-311+g(d)	0.313	-79.435
6-311+g(d,p)	0.316	-81.497
6-311++g(d,p)	0.317	-81.693

3.2. Análisis termodinámico y cinético

Para el análisis termodinámico se utilizó la fórmula de ΔG dada en la ecuación 32 tanto para reacciones FHT como SET.

Con respecto al análisis cinético, se utilizó la ecuación 29 para el cálculo de constantes de velocidad de reacciones FHT mientras que en el caso de las reacciones SET, las constantes de velocidad se calcularon con la teoría de Marcus según la ecuación 38.

Dado que en el ambiente celular se encuentran varios valores de pH del solvente, es útil observar cómo se comporta la constante de velocidad en un rango amplio de acidez y basicidad, para determinar si bajo ciertos ambientes químicos, la reactividad de los antioxidantes sigue siendo efectiva y si se favorece un mecanismo sobre otro.

El cálculo de la constante de velocidad de acuerdo con el pH del medio se realizó mediante la ecuación 51.

$$k_{FHT/SET}^{pH} = k_{FHT/SET} * (xA) * (xR) \quad (51)$$

Donde (xA) y (xR) son las fracciones molares de los antioxidantes y radicales respectivamente al pH calculado.

3.3. Estados de transición, IRC y análisis de población de Hirshfeld.

Para obtener los estados de transición se modeló la geometría mediante el acercamiento de los reactivos por medio del hidrógeno del grupo hidroxilo de los antioxidantes y se utilizó este archivo como guess para la optimización mediante el algoritmo de Berny en Gaussian 16.

Adicionalmente a la entrada `calcfc` del comando de optimización anteriormente mencionado, se añadió el argumento `TS` para optimizar la geometría del TS y `Noeigen` para mejorar el tiempo de cómputo, ignorando la prueba de curvatura del método `STQN`. El fichero A-2 muestra el archivo usado para el cálculo del TS entre la 3-hidroxi-2-piridona y el radical triptófano.

Los caminos de reacción se obtuvieron mediante el análisis IRC de los estados de transición mediante el comando adicional `IRC=(calcfc,maxpoints=200,maxcyc=200,stepsize=5)` en Gaussian 16, el cual define las condiciones de tamaño de paso, número de puntos y ciclos para el cálculo de las coordenadas de reacción. El archivo A-3 muestra los comandos de entrada utilizado para el análisis IRC del TS entre la 3-hidroxi-2-piridona y el radical tirosina.

Para obtener los valores de carga atómica y densidad de espín a lo largo del camino de reacción se realizó el análisis de poblaciones de Hirshfeld a los puntos del IRC del paso anterior con el comando adicional `pop=(NPA,Hirshfeld)` en Gaussian 16, como lo muestra la sección A-4 del apéndice.

El factor de fracción porcentual ($\% \Gamma$) de cada mecanismo se calculó según la ecuación 11.

4. Resultados y análisis

4.1. Disociación a pH fisiológico

Los resultados para el cálculo de los pK_a teóricos de los antioxidantes realizados mediante los parámetros y la ecuación 53, son reportados en la tabla 2. Como se observa, los valores de pK_a de las moléculas evaluadas entre las distintas bases no cambian considerablemente, ya que, sus desviaciones estándares son bajas comparadas con sus valores promedios.

Tabla 2

Valores de pK_a teóricos de los antioxidantes, según el procedimiento de Idaboy et al., con respecto a las bases 6-31(p), 6-31+g(d,p), 6-311+g(d) y 6-311++g(d,p) y enlace OH tipo fenol.

	pK_a				Promedio y desviación estándar
	6-31+G(d)	6-311+G(d)	6-311+G(d,p)	6-311++G(d,p)	
3-hidroxi-2-piridona	8.51	8.67	8.57	8.67	8.60±0.08
4-hidroxi-2-piridona	7.27	7.38	7.29	7.39	7.33±0.06
5-hidroxi-2-piridona	9.12	9.31	9.25	9.35	9.26±0.10
6-hidroxi-2-piridona	5.31	4.94	5.33	5.42	5.25±0.20

Con base en los pK_a calculados para los antioxidantes y los pK_a de los radicales triptófano y tirosina (4.7 y -2, respectivamente), la tabla 3 muestra los resultados del cálculo del porcentaje de disociación de las fracciones protonadas y desprotonadas a pH fisiológico de 7.4.

Tabla 3.

Porcentajes de disociación de los antioxidantes de acuerdo con su pKa en pH fisiológico.

Antioxidante	Fracción neutra	Fracción desprotonada
3-hidroxi-2-piridona	95.23 %	4.7 %
4-hidroxi-2-piridona	54.02%	45.98%
5-hidroxi-2-piridona	98.64%	1.36%
6-hidroxi-2-piridona	0.7%	99.3%
Catión Radical Triptófano	0.2%	99.8%
Catión Radical Tirosina	0.0%	100%

4.2. Análisis Termodinámico

Los resultados del análisis termodinámico para las reacciones FHT se muestran en la tabla 4, para las reacciones SET de los antioxidantes desprotonados en la tablas 5 y para reacciones SET de antioxidantes neutros en la tabla 6.

Tabla 4.

Valores de ΔG para las transferencias FHT de los antioxidantes con el radical triptófano y tirosina (kcal/mol) a 298.15 K.

Antioxidante	Radical Triptófano	Radical Tirosina
3-hidroxi-2-piridona	-10.07	-6.62
4-hidroxi-2-piridona	4.44	7.89
5-hidroxi-2-piridona	-10.20	-6.75
6-hidroxi-2-piridona	-12.92	-9.47

Tabla 5.

Valores de ΔG de reacciones SET de los antioxidantes desprotonados con el catión radical triptófano, radical triptófano y radical tirosina en kcal/mol a 298.15 K.

Anión Antioxidante	Radical Triptófano	Catión Radical Triptófano	Radical Tirosina
3-hidroxi-2-piridona	1.94	-21.25	-2.41
4-hidroxi-2-piridona	20.37	-2.83	16.01
5-hidroxi-2-piridona	1.21	-23.41	-4.56
6-hidroxi-2-piridona	9.25	-13.94	-14.25

Tabla 6.

Valores de ΔG para reacciones SET de los antioxidantes neutros con el radical tirosina, radical triptófano y catión radical triptófano en kcal/mol a 298.15 K.

Antioxidante	Radical Triptófano	Catión Radical Triptófano	Radical Tirosina
3-hidroxi-2-piridona	28.68	5.48	24.33
4-hidroxi-2-piridona	38.25	15.06	33.90
5-hidroxi-2-piridona	27.28	4.08	22.93
6-hidroxi-2-piridona	30.53	7.34	26.18

De la tabla 4 se infiere entonces, que para las reacciones FHT de los antioxidantes con el triptófano y la tirosina, todas son favorables ($\Delta G < 0$) a excepción de aquellas con la 4-hidroxi-2-piridona ($\Delta G > 0$). Por otra parte, para las reacciones SET con el catión radical triptófano, todas las reacciones son favorables y para las reacciones SET con el radical tirosina todas son favorables a excepción de aquella con la 4-hidroxi-2-piridona. El total de reacciones favorables entre los antioxidantes evaluados y los radicales de aminoácidos, junto con sus esquemas de reacción se resumen en la tabla 7.

Como se observa en las tablas 5 y 6, todas las reacciones SET de los antioxidantes neutros con el radical triptófano son endergónicas, indicando que este radical no es un buen aceptor de electrones, contrario a los cationes de estos radicales, los cuales presentan una alta afinidad electrónica y promueven, por tanto, una mecanismo de transferencia electrónica.

Tabla 7.

Resumen de esquemas de mecanismos de reacción entre los antioxidantes y los radicales tirosina y triptófano.

Radical	Antioxidante	Esquema de reacción
Radical Triptófano	3-Hpy FHT	$3 - Hpy + Trp^{\cdot} \rightarrow 3 - Hpy^{\cdot} + Trp$
	5-Hpy FHT	$5 - Hpy + Trp^{\cdot} \rightarrow 5 - Hpy^{\cdot} + Trp$
	6-Hpy FHT	$6 - Hpy + Trp^{\cdot} \rightarrow 6 - Hpy^{\cdot} + Trp$
Cación Radical Triptófano	3-Hpy ⁻ SET	$3 - Hpy^{-} + Trp^{+\cdot} \rightarrow 3 - Hpy^{\cdot} + Trp$
	4-Hpy ⁻ SET	$4 - Hpy^{-} + Trp^{+\cdot} \rightarrow 4 - Hpy^{\cdot} + Trp$
	5-Hpy ⁻ SET	$5 - Hpy^{-} + Trp^{+\cdot} \rightarrow 5 - Hpy^{\cdot} + Trp$
	6-Hpy ⁻ SET	$6 - Hpy^{-} + Trp^{+\cdot} \rightarrow 6 - Hpy^{\cdot} + Trp$
Radical Tirosina	3-Hpy FHT	$3 - Hpy + Trp^{\cdot} \rightarrow 3 - Hpy^{\cdot} + Tyr$
	3-Hpy ⁻ SET	$3 - Hpy^{-} + Trp^{+\cdot} \rightarrow 3 - Hpy^{\cdot} + Tyr$
	5-Hpy FHT	$5 - Hpy + Trp^{\cdot} \rightarrow 5 - Hpy^{\cdot} + Tyr$
	5-Hpy ⁻ SET	$5 - Hpy^{-} + Trp^{+\cdot} \rightarrow 5 - Hpy^{\cdot} + Tyr$
	6-Hpy FHT	$6 - Hpy + Trp^{\cdot} \rightarrow 6 - Hpy^{\cdot} + Tyr$
	6-Hpy ⁻ SET	$6 - Hpy^{-} + Trp^{+\cdot} \rightarrow 6 - Hpy^{\cdot} + Tyr$

4.3. Mecanismos de reacción de antioxidantes con el radical triptófano

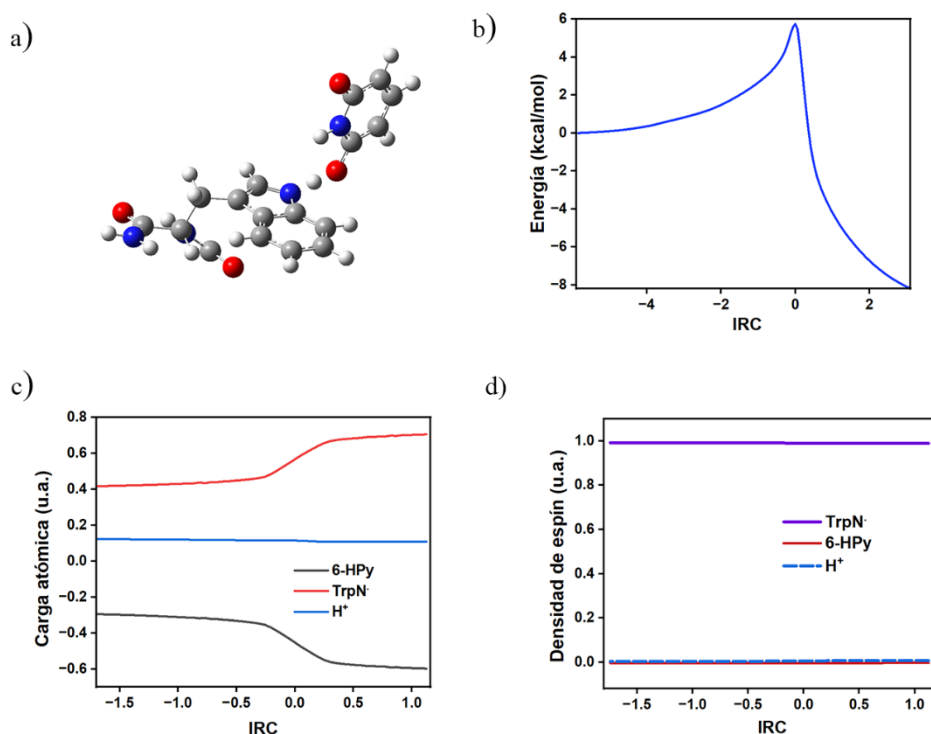
4.3.1. Mecanismos de reacción FHT

De las reacciones termodinámicamente favorables con el radical triptófano mediante el mecanismo FHT, la 3-hidroxi-2-piridona y 5-hidroxi-2-piridona no exhibieron un TS. Sin embargo, la reacción entre el radical triptófano con la 6-hidroxi-2-piridona, sí, como se muestra

en la figura 9 donde se expone la geometría del TS, el análisis IRC y las gráficas de carga atómica y densidad de espín del análisis de población de Hirshfeld. La energía libre de Gibbs de activación de este estado de transición fue de 12.32 kcal/mol.

Figura 9.

Resultados obtenidos sobre la reacción entre la 6-hidroxi-2-piridona y el radical Triptófano
 a) TS. b) IRC del estado de transición c) Cargas atómicas de Hirshfeld d) Densidad de espín de Hirshfeld.



Como se observa en el gráfico de carga a lo largo de la coordenada de reacción, la carga en el núcleo transferido tuvo un valor entre $0.01-0.02e^-$, esto representa una carga diferente de cero y positiva, lo cual indica que la especie en transferencia se presenta como un protón. Al mismo tiempo, las cargas del donador y aceptor no presentan un cambio de signo o inversión, lo cual es concordante con una transferencia de H^+ , ya que la especie donadora se vuelve más

negativa a medida que se pierde el núcleo, y la especie aceptora se vuelve más positiva la recibirlo.

Con respecto a las gráficas de densidad de espín, tanto para el núcleo transferido como para el donador y aceptor, no hubo cambios en sus valores, es decir, permanecieron constantes. Esto indica que no hubo una transferencia de electrón, ya que la máxima densidad de espín se localiza únicamente en el radical a lo largo de la reacción, lo que confirma que hubo una transferencia de protón H^+ .

Como productos de este mecanismo, el radical triptófano se convirtió en un catión radical y la 6-hidroxi-2-piridona en un anión. Esto sugiere que esta reacción implica como segundo paso una transferencia de electrón según un mecanismo tipo PEST para lograr la reparación del aminoácido.

Con el fin de confirmarlo, se intentó calcular la diferencia en energía de la transición vertical según la teoría de Marcus. Sin embargo, al realizar los cálculos, esta transición no ocurrió y, por ende, no se evidenció la transferencia del electrón. Una posible explicación a esto es que los perfiles de energía de la reacción se intersecaran en la región invertida de Marcus, de manera que energéticamente la transferencia no fuera favorable. Esta explicación se puede fundamentar observando el alto valor de la magnitud de ΔG de esta reacción como se observa en la tabla 3, ya que de la teoría se conoce que altos valores de ΔG se dan en intersecciones de la región invertida de Marcus.

De este resultado se evidencia que, aunque la reacción sea favorable termodinámicamente, la cinética de la reacción no permite su ocurrencia.

4.3.2. Mecanismos de reacción SET

Para el caso de las reacciones de transferencia SET entre las fracciones desprotonadas de antioxidantes y el catión radical triptófano, la tabla 5 indica que termodinámicamente, todos los antioxidantes reaccionan de forma favorable.

Debido a que estas reacciones son de transferencia electrónica, no es posible ubicar un TS y su análisis cinético se realizó a través de la teoría de Marcus. Los valores de las constantes de velocidad y energías de activación calculadas se reportan en la tabla 8.

Tabla 8.

Constantes de velocidad $k^{pH=7.4}$ ($M^{-1}s^{-1}$) y energías libres de activación ΔG^0 (kcal/mol) para los mecanismos SET de la reparación de los antioxidantes aniónicos con el catión radical triptófano.

Antioxidante	ΔG^0	$k(M^{-1}s^{-1})$
3-hidroxi-2-piridona	0.42	1.45×10^7
4-hidroxi-2-piridona	2.79	6.20×10^6
5-hidroxi-2-piridona	0.87	1.51×10^7
6-hidroxi-2-piridona	8.65	3.96×10^1

Como se observa, la gran barrera de activación de la reacción con la 6-hidroxi-2-piridona da como resultado un valor de constante de velocidad bajo, lo que concuerda con el hecho de no haber obtenido una transferencia SET hacia el catión radical triptófano en la sección anterior con el mecanismo PEST. La relación de constantes de velocidad y barreras de activación son inversamente proporcionales para los demás antioxidantes, lo que indica que estas transferencias no se encuentran en la región invertida. La 3-hidroxi-2-piridona y 5-hidroxi-2-piridona fueron las moléculas que reaccionaron más rápido con el catión radical Triptófano $k \sim 10^7$. Por esto, es posible establecer que estas dos moléculas tienen una capacidad antioxidante relativamente cercana a otros antioxidantes como el ácido úrico ($k \sim 10^5 - 10^7$). Sin embargo, sus constantes

de velocidad son bajas frente a otras moléculas como el radical superóxido ($k \sim 10^8$) o el ácido ascórbico ($k \sim 10^9$).

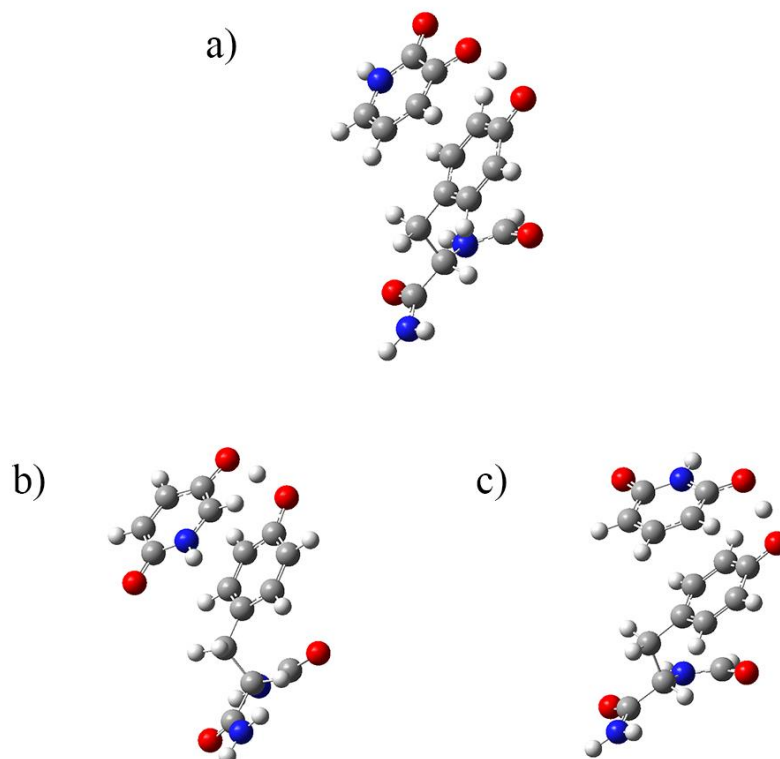
4.4. Mecanismos de reacción de antioxidantes con el radical tirosina

4.4.1. Mecanismos de reacción FHT

En el caso de las reacciones termodinámicamente favorables de transferencia de hidrógeno con el radical tirosina, se pudieron obtener los tres estados de transición correspondiente a las reacciones de los antioxidantes 3-hidroxi-2-piridona, 5-hidroxi-2-piridona y 6-hidroxi-2-piridona, los cuales se muestran en la figura 10.

Figura 10.

Estados de transición de la reacciones de antioxidantes con el radical Tirosina. (a) reacción con la 3-hidroxi-2-piridona (b) reacción con la 5-hidroxi-2-piridona (c) reacción con la 6-hidroxi-2-piridona.



Como se evidencia en estos TS con el radical tirosina, sus geometrías difieren de aquellos con el triptófano, es decir, los TS de las reacciones con la tirosina presentan interacciones tipo $\pi - \pi$ stacking, las cuales han demostrado promover mecanismos tipo PCET según Muñoz-Rugeles y Jidaboy, R. (Muñoz-Rugeles, 2017).

El análisis poblacional de Hirshfeld de carga y densidad de espín y los orbitales HOMO y SOMO de las reacciones entre la 3-hidroxi-2-piridona, 5-hidroxi-2-piridona y 6-hidroxi-2-piridona y el radical tirosina se muestran en las figuras 11, 12 y 13 respectivamente.

Figura 11.

Resultados obtenidos sobre la reacción entre la 3-hidroxi-2-piridona y el radical tirosina. (a) Coordenada IRC (b) Carga atómicas de Hirshfeld. (c) Densidad de espín de Hirshfeld. Densidad de los orbitales HOMO (d) y SOMO (e) (valor de isodensidad de 0.02 au).

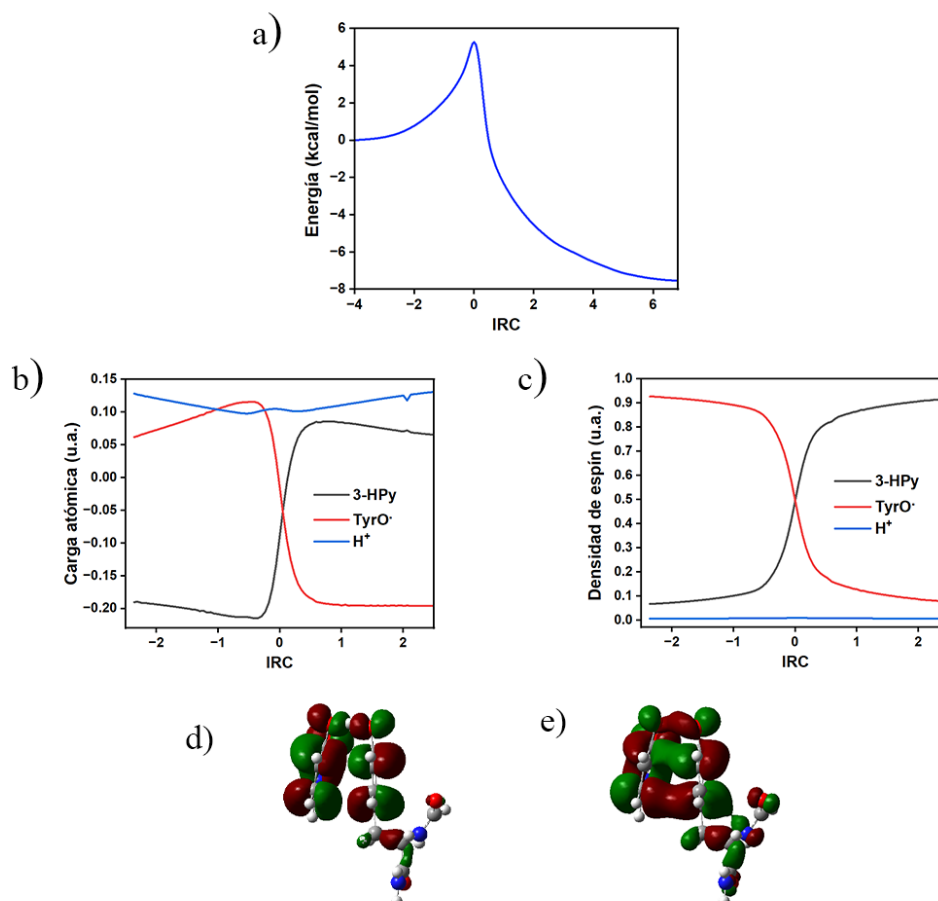
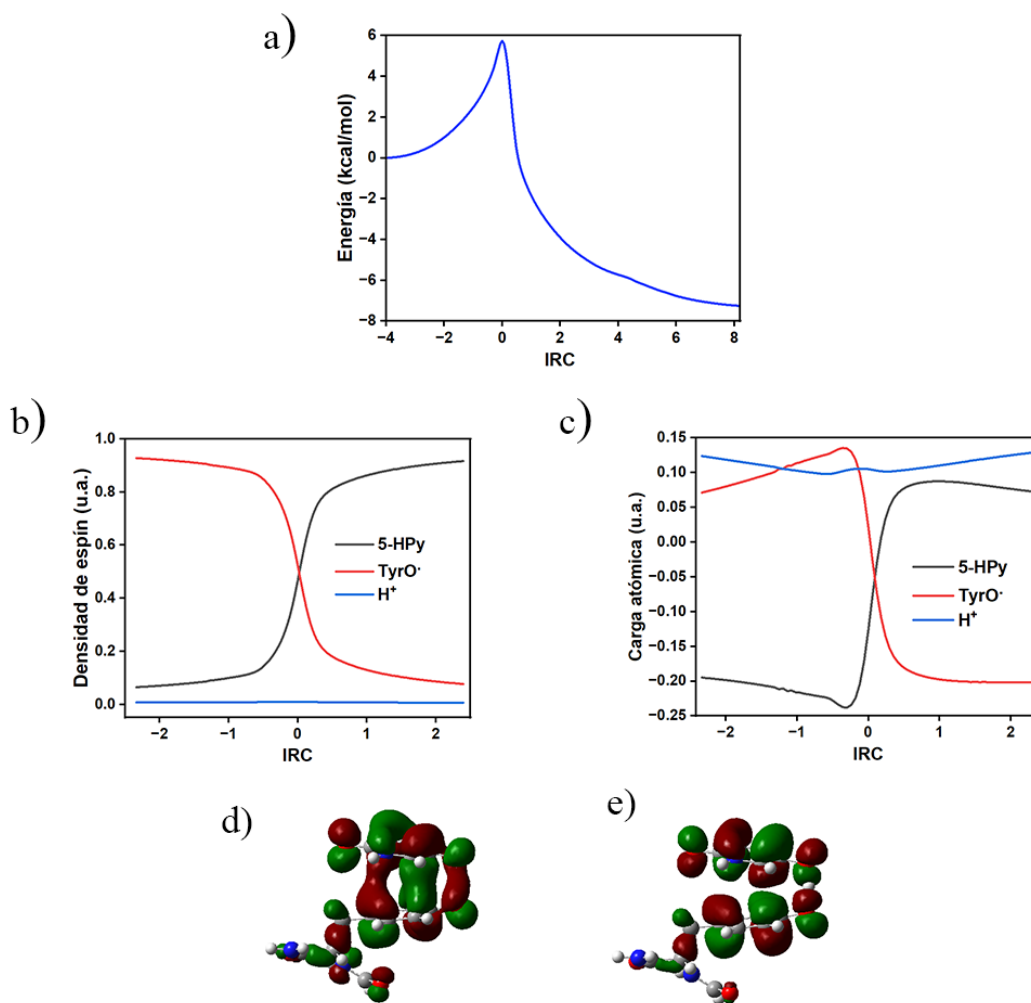


Figura 12.

Resultados obtenidos sobre la reacción entre la 5-hidroxi-2-piridona y el radical tirosina. (a) Coordenada IRC (b) Carga atómicas de Hirshfeld. (c) Densidad de espín de Hirshfeld. Densidad de los orbitales HOMO (d) y SOMO (e) (valor de isodensidad de 0.02 au).

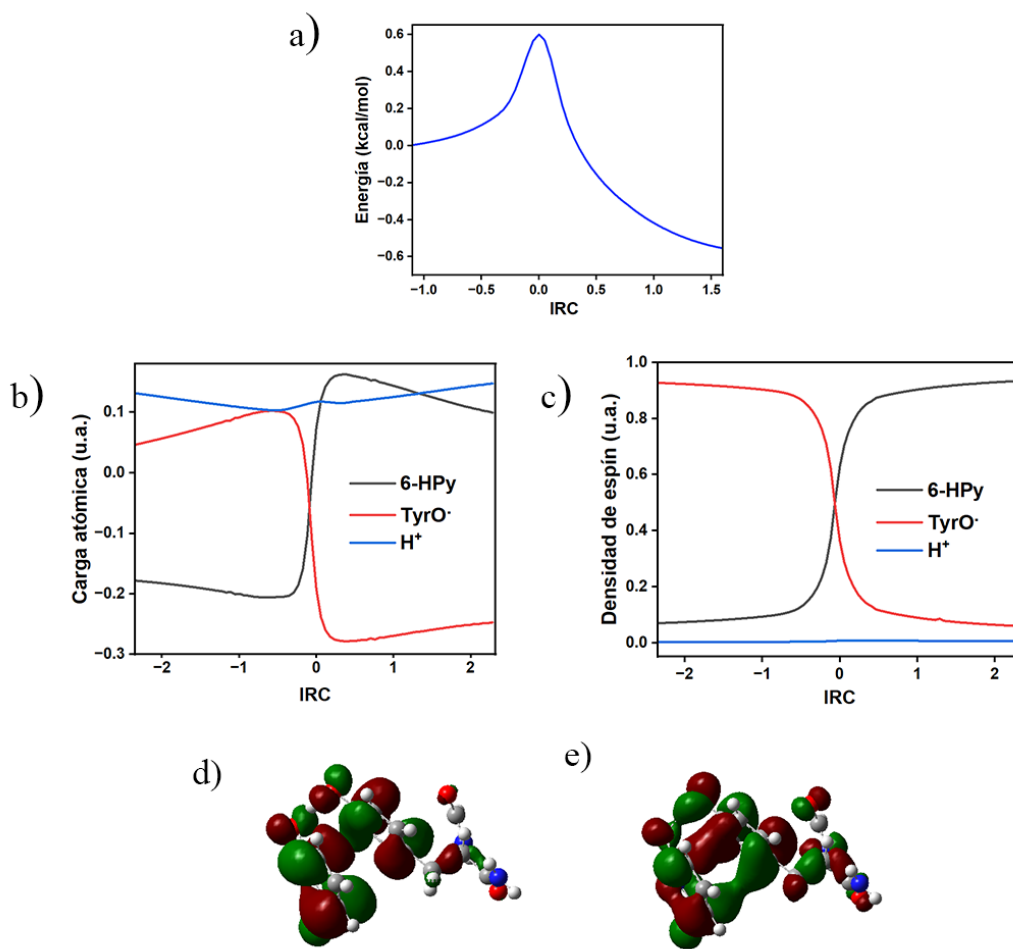


Como se evidencia en las figuras del análisis de carga 11b, 12b y 13b, a lo largo de la coordenada de reacción las cargas del donador y aceptor se cruzan y cambian de signo, es decir, la carga del radical tirosina se hace más negativa y la carga del antioxidante más positiva; esto indica que hubo una transferencia de electrón y de protón simultánea. Así mismo, el núcleo

transferido a lo largo de la reacción tuvo una carga positiva, lo que indica que se transfirió en forma de protón H^+ desacoplado del electrón y no como un átomo de hidrógeno. De la inversión simultánea de carga y la fluctuación en la carga del protón transferido se evidencia que la carga total del sistema se conserva.

Figura 13.

Resultados obtenidos sobre la reacción entre la 6-hidroxi-2-piridona y el radical tirosina. (a) Coordenada IRC (b) Carga atómicas de Hirshfeld. (c) Densidad de espín de Hirshfeld. Densidad de los orbitales HOMO (d) y SOMO (e) (valor de isodensidad de 0.02 au)



Así mismo, en las gráficas de densidades de espín 11c, 12c y 13c se observa una inversión nuevamente entre el radical y los antioxidantes. Esto sugiere que hubo una transferencia de electrón desde el antioxidante hacia el radical, ya que la densidad de espín del radical tirosina disminuye debido a que acepta un electrón y la densidad del espín de los antioxidantes aumenta al donar el electrón y convertirse en radicales. En el caso del protón transferido, no hubo densidad de espín sobre él, por lo que se confirma que su transferencia fue en forma de H^+ , en concordancia con el análisis de carga anteriormente expuesto. Además, se observa que los orbitales HOMO y SOMO se encuentran deslocalizados entre el aceptor y donador en la geometría del TS, como se evidencia en las figuras 11 d-e, 12 d-e y 13 d-e. lo que indica que la interacción $\pi - \pi$ stacking abre un canal de transferencia para el electrón, que permite el desacoplamiento con el protón.

De estos resultados se identifica que los mecanismos de reacción de antioxidantes con el radical tirosina fueron de tipo PCET.

Es interesante notar que, en las reacciones con la 3-hidroxi-2-piridona y 5-hidroxi-2-piridona, las curvas de carga atómica y densidad de espín presentan una asincronía posterior a la coordenada del TS, lo que indica una ligera tendencia en dirección de un mecanismo tipo PEST, es decir, la transferencia del protón tiene tendencia a suceder de forma anticipada al electrón. De forma contraria, la reacción con la 6-hidroxi-2-piridona presenta una ligera asincronía en dirección anterior al TS, lo que apunta en una dirección de mecanismo tipo EPST, esto es, la transferencia del protón se hace en cierta magnitud tardía con respecto al electrón.

En la tabla 9 se muestran los valores de las constantes de velocidad de las reacciones de transferencia formal de hidrógeno de la 3-hidroxi-2-piridona, 5-hidroxi-2-piridona y 6-hidroxi-2-piridona con el radical tirosina, así como los valores de ΔG^0 y porcentaje de contribución $\% \Gamma$.

Tabla 9.

Constantes de velocidad $k^{pH=7.4}$ ($M^{-1}s^{-1}$) para los mecanismos PCET de la reparación de los antioxidantes neutros con el radical tirosina, su porcentaje de contribución respecto a la constante total $\% \Gamma$ y energías libres de activación ΔG^0 (kcal/mol).

Antioxidante	ΔG^0	$k(M^{-1}s^{-1})$	$\% \Gamma$
3-hidroxi-2-piridona	6.06	3.13×10^8	47.74
5-hidroxi-2-piridona	6.11	3.02×10^8	74.61
6-hidroxi-2-piridona	6.46	1.21×10^6	98.93

De la tabla se observa que la 3-hidroxi-2-piridona y 5-hidroxi-2-piridona presentan una buena capacidad antioxidante ante el radical tirosina ($k \sim 10^8$), siendo valores son ligeramente mayores que otros antioxidantes como el ácido úrico y el glutatión ($k \sim 10^7$).

4.4.2. Mecanismos de reacción SET

En el caso de las reacciones tipo SET de las fracciones desprotonadas de los antioxidantes con el radical tirosina, la cinética de estas reacciones se calculó nuevamente con la teoría de Marcus al ser transferencias de electrones. Sus valores se encuentran en la tabla 10.

Tabla 10.

Constantes de velocidad $k^{pH=7.4}$ ($M^{-1}s^{-1}$) para los mecanismos SET de la reparación de los antioxidantes aniónicos con el radical tirosina, su porcentaje de contribución respecto a la constante total $\% \Gamma$ y energías libres de activación ΔG^0 (kcal/mol).

Antioxidante	ΔG^0	$k(M^{-1}s^{-1})$	$\% \Gamma$
3-hidroxi-2-piridona	0.09	3.43×10^8	52.26
5-hidroxi-2-piridona	0.09	1.03×10^8	25.39
6-hidroxi-2-piridona	9.39	1.32×10^4	1.07

De esta tabla se evidencia que los aniones de la 3-hidroxi-2-piridona y 5-hidroxi-2-piridona presentan las mayores constantes de velocidad ($k \sim 10^8$), y, por ende, la mejor capacidad antioxidante frente a la tirosina con este mecanismo. El alto valor de la barrera de activación de la 6-hidroxi-2-piridona no permite una alta velocidad de reacción, esto se puede deber a que el anión hidroxilo en la estructura química de esta molécula está adyacente al grupo NH del anillo a diferencia de los demás antioxidantes, lo que presenta una atracción hacia el electrón de transferencia.

De la tablas 3 y 10 se observa que, aunque a pH fisiológico, la fracciones aniónicas de los antioxidantes 3-hidroxi-2-piridona y 5-hidroxi-2-piridona no son muy altas, la constante de velocidad de estos aniones representa un valor importante en la constante de reacción global. Para el caso de la 3-hidroxi-2-piridona el valor de k_{SET} es más de la mitad (52.26%) de la constante total, y para la 5-hidroxi-2-piridona, es de aproximadamente una cuarta parte (25.39%).

4.5. Dependencia de la constante de velocidad con el pH

En las figura 14 se muestra el comportamiento de la constante de velocidad tanto de los mecanismos PCET y SET de los antioxidantes 3-hidroxi-2-piridona, 5-hidroxi-2-piridona y 6-hidroxi-2-piridona con el radical tirosina a lo largo del rango 0-14 de pH.

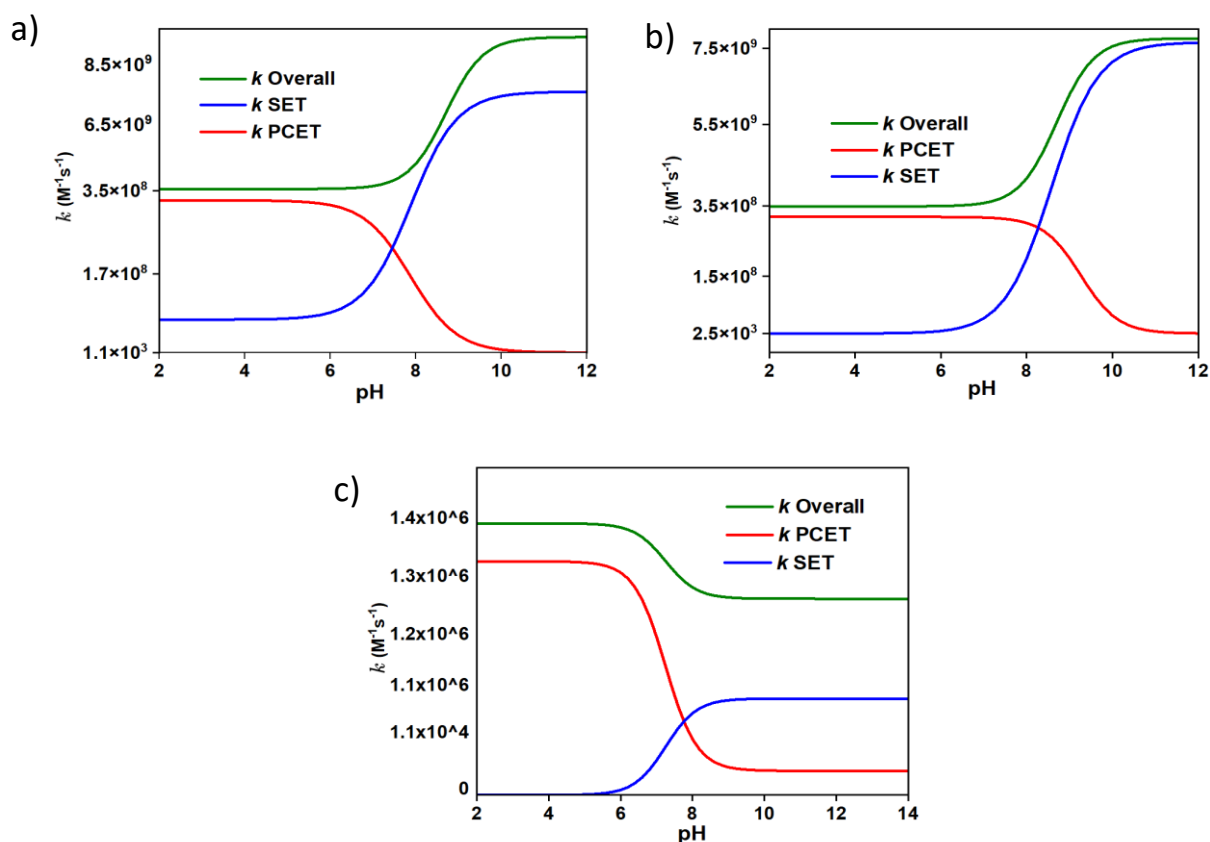
Como se observa para las tres gráficas, existe una inversión en la constante de los mecanismos de reacción a valores de pH cercanos al pK_a de cada antioxidante en particular. Esto tiene sentido, ya que, en estos valores la disociación de los antioxidantes en sus fracciones desprotonadas es mayor y, por ende, se promueve en mayor medida el mecanismo SET. A su vez, antes de valores cercanos a los pK_a , las fracciones neutras predominan en solución, lo que hace que el mecanismo PCET sea más relevante.

En la figura 14a y 14b se observa que después del cruce de ambas gráficas el valor de k_{SET} aumenta a valores mayores que los máximos de la constante k_{PCET} , esto es concordante con los valores de ΔG^0 mostrados en las tablas 9 y 10, ya que, su valor es mucho menor para el mecanismo SET que para el mecanismo PCET.

En el caso de la figura 14c, el mecanismo SET cobra importancia a pH mayores que el pK_a de la 6-hidroxi-2-piridona con respecto al mecanismo PCET. Sin embargo, sus valores máximos no llegan a ordenes de magnitud mayores que los máximos del mecanismo PCET. Esto se puede explicar debido a que los valores de ΔG^0 del mecanismo SET es mayor que aquella del mecanismo PCET.

Figura 14.

Cambios en la constantes de velocidad con respecto al pH de los antioxidantes. (a) Reacción de la 3-hidroxi-2-piridona con el radical tirosina, los mecanismos de reacción PCET (rojo), SET (azul) y constante global (verde). (b) Reacción de la 5-hidroxi-2-piridona con el radical tirosina, los mecanismos de reacción PCET (rojo), SET (azul) y constante global (verd). (c) Reacción de la 6-hidroxi-2-piridona con el radical tirosina, los mecanismos de reacción PCET (rojo), SET (azul) y constante global (verde).



5. Conclusiones

Del análisis termodinámico se evidenció que todos los antioxidantes a excepción de la 4-hidroxi-2-piridona reaccionaron con el radical triptófano, mientras que todas las fracciones desprotonadas de los 4 antioxidantes reaccionaron con el catión radical triptófano.

Respecto al radical tirosina, a excepción de la 4-hidroxi-2-piridona, todas las reacciones con los antioxidantes y sus fracciones protonadas fueron termodinámicamente favorables.

De los análisis de mecanismos de reacción se identificó que la 3-hidroxi-2-piridona, 5-hidroxi-2-piridona y 6-hidroxi-2-piridona reaccionaron con el radical tirosina a través de mecanismos PCET, por otro lado, sus fracciones desprotonadas reaccionaron a través de mecanismos SET.

Las reacciones de los antioxidantes aniónicos con el catión radical triptófano se dieron a través de mecanismos SET.

Se evidenció que las interacciones $\pi - \pi$ stacking favorecen el mecanismo de reacción PCET, al permitir un canal de transferencia de electrón desacoplado del protón.

De los antioxidantes evaluados, la 3-hidroxi-2-piridona y la 5-hidroxi-2-piridona presentaron la mejor capacidad antioxidante para la reparación del radical triptófano según los valores de las constantes de velocidad obtenidos.

Para la reparación del radical tirosina, la 3-hidroxi-2-piridona y la 5-hidroxi-2-piridona exhibieron la mejor capacidad antioxidante, tanto en sus fracciones neutras como en sus fracciones desprotonadas.

De los resultados de las constantes de velocidad para las reparaciones del radical tirosina por la 3-hidroxi-2-piridona y 5-hidroxi-2-piridona y de su dependencia con el pH se evidenció que estos antioxidantes tienen una capacidad de reparación alta a cualquier valor de pH.

La mayor reparación del radical tirosina por la 6-hidroxi-2-piridona se da a pH menores de 5.25 ya que la constante de velocidad del mecanismo PCET es considerablemente mayor que la constante del mecanismo SET que se da a valores de pH mayores a este por la fracción desprotonada del antioxidante.

Se concluye que es importante tener en cuenta las diversas fracciones molares de los antioxidantes, ya que estas pueden reaccionar a través de diferentes mecanismos e incluso tener importancia en la reparación de radicales a distintos valores de pH.

6. Recomendaciones

De los gráficos del análisis poblacional de carga se observa que existe una variación de carga en el núcleo transferido de hidrógeno en los mecanismos PCET, se recomienda hacer un estudio detallado sobre este cambio.

Debido a la alta favorabilidad teórica en las constantes de velocidad de la 3-hidroxi-2-piridona y la 5-hidroxi-2-piridona con los radicales tirosina y triptófano se recomienda un estudio experimental de estas reacciones.

Se recomienda hacer un estudio de propiedades químicas de estos antioxidantes para concluir el efecto de la posición del sustituyente en el anillo de 2-piridona.

Referencias Bibliográficas

- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, *127*(1), 183–198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>
- Bagayoko, D. (2014). Understanding density functional theory (DFT) and completing it in practice. *AIP Advances*, *4*(12), 127104. <https://doi.org/10.1063/1.4903408>
- Brown, R. L. (1981). A Method of Calculating Tunneling Corrections for Eckart Potential Barriers. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, *86*(4), 357. <https://doi.org/10.6028/jres.086.014>
- Butterfield, D. A. (1996). A (25-35) peptide displays HO[•]-like reactivity towards aqueous Fe⁸⁺, nitroxide spin probes, and synaptic membrane proteins. *58*(3).
- Butterfield, D. A. (1997). β -Amyloid-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity: Implications for Alzheimer's Disease. *Chemical Research in Toxicology*, *10*(5), 495–506. <https://doi.org/10.1021/tx960130e>
- Butterfield, D. A., Howard, B., Yatin, S., Koppal, T., Drake, J., Hensley, K., Aksenov, M., Aksenova, M., Subramaniam, R., Varadarajan, S., Harris-White, M. E., Pedigo, N. W., & Carney, J. M. (1999). Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. *Life Sciences*, *65*(18–19), 1883–1892. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00442-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00442-7)
- Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J.-L. (2008). Oxidatively Generated Damage to the Guanine Moiety of DNA: Mechanistic Aspects and Formation in Cells. *Accounts of Chemical Research*, *41*(8), 1075–1083. <https://doi.org/10.1021/ar700245e>

- Check, C. E., Faust, T. O., Bailey, J. M., Wright, B. J., Gilbert, T. M., & Sunderlin, L. S. (2001). Addition of Polarization and Diffuse Functions to the LANL2DZ Basis Set for P-Block Elements. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(34), 8111–8116. <https://doi.org/10.1021/jp0119451>
- Chen, J. L., Noodleman, L., Case, D. A., & Bashford, D. (1994). Incorporating Solvation Effects into Density Functional Electronic Structure Calculations. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(43), 11059–11068. <https://doi.org/10.1021/j100094a013>
- Collins, F. C., & Kimball, G. E. (1949). Diffusion-controlled reaction rates. *Journal of Colloid Science*, 4(4), 425–437. [https://doi.org/10.1016/0095-8522\(49\)90023-9](https://doi.org/10.1016/0095-8522(49)90023-9)
- Davidson, E. R., & Feller, D. (1986). Basis set selection for molecular calculations. *Chemical Reviews*, 86(4), 681–696. <https://doi.org/10.1021/cr00074a002>
- Deng, L., & Ziegler, T. (1994). The determination of intrinsic reaction coordinates by density functional theory. *International Journal of Quantum Chemistry*, 52(4), 731–765. <https://doi.org/10.1002/qua.560520406>
- Einstein, A. (1905). Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 322(8), 549–560. <https://doi.org/10.1002/andp.19053220806>
- Fay, D. S., Fluet, A., Johnson, C. J., & Link, C. D. (2002). In Vivo Aggregation of β -Amyloid Peptide Variants. *Journal of Neurochemistry*, 71(4), 1616–1625. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71041616.x>
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food*

- and Agriculture*, 80(13), 1925–1941. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200010\)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4)
- Galano, A. (2017). Free Radicals Induced Oxidative Stress at a Molecular Level: The Current Status, Challenges and Perspectives of Computational Chemistry Based Protocols. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 59(4). <https://doi.org/10.29356/jmcs.v59i4.81>
- Galano, A., & Alvarez-Idaboy, J. R. (2013). A computational methodology for accurate predictions of rate constants in solution: Application to the assessment of primary antioxidant activity. *Journal of Computational Chemistry*, 34(28), 2430–2445. <https://doi.org/10.1002/jcc.23409>
- Galano, A., & Alvarez-Idaboy, J. R. (2014). Kinetics of radical-molecule reactions in aqueous solution: A benchmark study of the performance of density functional methods. *Journal of Computational Chemistry*, 35(28), 2019–2026. <https://doi.org/10.1002/jcc.23715>
- Galano, A., Mazzone, G., Alvarez-Diduk, R., Marino, T., Alvarez-Idaboy, J. R., & Russo, N. (2016). Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 335–352. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033206>
- Galano, A., Pérez-González, A., Castañeda-Arriaga, R., Muñoz-Rugeles, L., Mendoza-Sarmiento, G., Romero-Silva, A., Ibarra-Escutia, A., Rebollar-Zepeda, A. M., León-Carmona, J. R., Hernández-Olivares, M. A., & Alvarez-Idaboy, J. R. (2016). Empirically Fitted Parameters for Calculating pK_a Values with Small Deviations from Experiments Using a Simple Computational Strategy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(9), 1714–1724. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00310>

- Galano, A., & Raúl Alvarez-Idaboy, J. (2019). Computational strategies for predicting free radical scavengers' protection against oxidative stress: Where are we and what might follow? *International Journal of Quantum Chemistry*, 119(2), e25665. <https://doi.org/10.1002/qua.25665>
- Graslund, A., Sahlin, M., & Sjoberg, B.-M. (1985). *The tyrosyl free radical in ribonucleotide reductase*.
- Hands, S., Sajjad, M. U., Newton, M. J., & Wytttenbach, A. (2011). In Vitro and in Vivo Aggregation of a Fragment of Huntingtin Protein Directly Causes Free Radical Production. *Journal of Biological Chemistry*, 286(52), 44512–44520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.307587>
- Hawkins, C. L., Pattison, D. I., & Davies, M. J. (2002). Reaction of protein chloramines with DNA and nucleosides: Evidence for the formation of radicals, protein–DNA cross-links and DNA fragmentation. *Biochemical Journal*, 365(3), 605–615. <https://doi.org/10.1042/bj20020363>
- Hirshfeld, F. L. (1977). Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. *Theoretica Chimica Acta*, 44(2), 129–138. <https://doi.org/10.1007/BF00549096>
- Hohenberg, P., & Kohn, W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review*, 136(3B), B864–B871. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.B864>
- Jensen, F. (2013). Atomic orbital basis sets. *WIREs Computational Molecular Science*, 3(3), 273–295. <https://doi.org/10.1002/wcms.1123>
- Koch, W., & Holthausen, M. C. (2001). *A Chemist's Guide to Density Functional Theory* (1a ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/3527600043>

- Liermann, B., Lassmann, G., & Langen, P. (1990). Quenching of tyrosine radicals of M2 subunit from ribonucleotide reductase in tumor cells by different antitumor agents: An EPR study. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90042-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90042-H)
- Litwinienko, G., & Ingold, K. U. (2003). Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstractions. 1. The Reactions of Phenols with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph[•]) in Alcohols. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(9), 3433–3438. <https://doi.org/10.1021/jo026917t>
- Maeda, S., Harabuchi, Y., Ono, Y., Taketsugu, T., & Morokuma, K. (2015). Intrinsic reaction coordinate: Calculation, bifurcation, and automated search. *International Journal of Quantum Chemistry*, 115(5), 258–269. <https://doi.org/10.1002/qua.24757>
- Magalhães, A. L. (2014). Gaussian-Type Orbitals versus Slater-Type Orbitals: A Comparison. *Journal of Chemical Education*, 91(12), 2124–2127. <https://doi.org/10.1021/ed500437a>
- Marcus, R. A. (1964). Chemical and Electrochemical Electron-Transfer Theory. *Annual Review of Physical Chemistry*, 15(1), 155–196. <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.15.100164.001103>
- Marcus, R. A., & Sutin, N. (1985). Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 811(3), 265–322. [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(85\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0304-4173(85)90014-X)
- Marenich, A. V., Cramer, C. J., & Truhlar, D. G. (2009). 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. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(18), 6378–6396. <https://doi.org/10.1021/jp810292n>

- Mayer, I. (2002). On Löwdin's method of symmetric orthogonalization*. *International Journal of Quantum Chemistry*, 90(1), 63–65. <https://doi.org/10.1002/qua.981>
- Mendoza-Wilson, A. M., Carmelo-Luna, F. J., Astiazarán-García, H., Pacheco-Moreno, B. I., Anduro-Corona, I., & Rascón-Durán, M. L. (2016). DFT study of the physicochemical properties of A- and B-type procyanidin oligomers. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*, 15(08), 1650069. <https://doi.org/10.1142/S0219633616500693>
- Mulliken, R. S. (1955). Electronic Population Analysis on LCAO–MO Molecular Wave Functions. I. *The Journal of Chemical Physics*, 23(10), 1833–1840. <https://doi.org/10.1063/1.1740588>
- Muñoz-Rugeles, L., & Alvarez-Idaboy, J. R. (2015). *Proton-Electron Sequential Transfers Mechanism: A Theoretical Evidence about Its Biological Relevance*. 6.
- Muñoz-Rugeles, L., Galano, A., & Alvarez-Idaboy, J. R. (2017). The role of acid–base equilibria in formal hydrogen transfer reactions: Tryptophan radical repair by uric acid as a paradigmatic case. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(23), 15296–15309. <https://doi.org/10.1039/C7CP01557G>
- Murata, M., & Kawanishi, S. (2004). Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(1), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.022>
- Okuno, Y. (1997). Theoretical Investigation of the Mechanism of the Baeyer-Villiger Reaction in Nonpolar Solvents. *Chemistry – A European Journal*, 3(2), 212–218. <https://doi.org/10.1002/chem.19970030208>

- Ouyang, X., Li, X., Lu, W., Zhao, X., & Chen, D. (2018). A Null B-Ring Improves the Antioxidant Levels of Flavonol: A Comparative Study between Galangin and 3,5,7-Trihydroxychromone. *Molecules*, 23(12), 3083. <https://doi.org/10.3390/molecules23123083>
- Peng, C., & Bernhard Schlegel, H. (1993). Combining Synchronous Transit and Quasi-Newton Methods to Find Transition States. *Israel Journal of Chemistry*, 33(4), 449–454. <https://doi.org/10.1002/ijch.199300051>
- Pollak, E., & Pechukas, P. (1978). *Symmetry Numbers, Not Statistical Factors, Should Be Used in Absolute Rate Theory and in Brønsted Relations.*
- Praveena, R., Sadasivam, K., Deepha, V., & Sivakumar, R. (2014). Antioxidant potential of orientin: A combined experimental and DFT approach. *Journal of Molecular Structure*, 1061, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.01.002>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Rao, A. V., & Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutrition Research*, 19(2), 305–323. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(98\)00193-6](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(98)00193-6)
- Reed, A. E., Weinstock, R. B., & Weinhold, F. (1985). Natural population analysis. *The Journal of Chemical Physics*, 83(2), 735–746. <https://doi.org/10.1063/1.449486>
- Rose, R. C., & Bode, A. M. (1993). Biology of free radical scavengers: An evaluation of ascorbate. *The FASEB Journal*, 7(12), 1135–1142. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.12.8375611>

- Schlegel, H. B. (1982). Optimization of equilibrium geometries and transition structures. *Journal of Computational Chemistry*, 3(2), 214–218. <https://doi.org/10.1002/jcc.540030212>
- Silverstein, T. P. (2012). Marcus Theory: Thermodynamics CAN Control the Kinetics of Electron Transfer Reactions. *Journal of Chemical Education*, 89(9), 1159–1167. <https://doi.org/10.1021/ed1007712>
- Sun, J., Perdew, J. P., & Ruzsinszky, A. (2015). Semilocal density functional obeying a strongly tightened bound for exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), 685–689. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423145112>
- Tomasi, J., Bonaccorsi, R., Cammi, R., & Del Valle, F. J. O. (1991). Theoretical chemistry in solution. Some results and perspectives of the continuum methods and in particular of the polarizable continuum model. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 234, 401–424. [https://doi.org/10.1016/0166-1280\(91\)89026-W](https://doi.org/10.1016/0166-1280(91)89026-W)
- Truhlar, D. G. (2001). Potential Energy Surfaces. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 9.
- Truhlar, D. G., Garrett, B. C., & Klippenstein, S. J. (1996). *Current Status of Transition-State Theory*. 30.
- Ulusoy, I. S., & Wilson, A. K. (2019). Slater and Gaussian basis functions and computation of molecular integrals. En *Mathematical Physics in Theoretical Chemistry* (pp. 31–61). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813651-5.00002-4>
- Viedma-Poyatos, Á., González-Jiménez, P., Langlois, O., Company-Marín, I., Spickett, C. M., & Pérez-Sala, D. (2021). Protein Lipoxidation: Basic Concepts and Emerging Roles. *Antioxidants*, 10(2), 295. <https://doi.org/10.3390/antiox10020295>

- Vosko, S. H., Wilk, L., & Nusair, M. (1980). Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: A critical analysis. *Canadian Journal of Physics*, 58(8), 1200–1211. <https://doi.org/10.1139/p80-159>
- Wang, G., Xue, Y., An, L., Zheng, Y., Dou, Y., Zhang, L., & Liu, Y. (2015). Theoretical study on the structural and antioxidant properties of some recently synthesised 2,4,5-trimethoxy chalcones. *Food Chemistry*, 171, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.106>
- Xue, Y., Zheng, Y., Zhang, L., Wu, W., Yu, D., & Liu, Y. (2013). Theoretical study on the antioxidant properties of 2'-hydroxychalcones: H-atom vs. electron transfer mechanism. *Journal of Molecular Modeling*, 19(9), 3851–3862. <https://doi.org/10.1007/s00894-013-1921-x>
- Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2008). Density Functionals with Broad Applicability in Chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 41(2), 157–167. <https://doi.org/10.1021/ar700111a>

Apéndices

A. Comandos en texto plano complementarios a la sección de metodología

A.1- Archivo de comandos para optimización de la geometría de la 3-hidroxi-2-piridona.

```
3 - hidoxi - 2 -piridona
# m052x 6-31+G(d,p) scrf=smd int(grid=ultrafine) opt=calcfc freq scf=q
c NoSymm
-----
Symbolic Z-matrix:
Charge = 0 Multiplicity = 1
C
C          1   1.40156
```

C	2	1.3949	1	119.40091			
C	3	1.3949	2	118.78629	1	0.	0
C	4	1.40156	3	119.40091	2	0.	0
H	5	2.03156	4	146.00553	3	0.	0
H	3	1.07	2	120.60685	1	-180.	0
H	4	1.07	3	120.29955	2	-180.	0
H	5	1.07	4	119.69322	3	-180.	0
N	5	1.34428	4	120.61355	3	0.	0
O	1	1.2584	10	119.69322	5	180.	0
O	2	1.43	1	120.29955	11	0.	0
H	12	0.96	2	109.47122	1	150.	0

A.2 Archivo para calcular el TS de la 3-hidroxi-2-piridona y el radical tirosina.

TyrO + 3py

opt=(calcfc,ts,noeigen) guess=mix freq 6-31+g(d,p) scrf=smd scf=qc i

nt=grid=ultrafine iop(1/8=3) m052x

Symbolic Z-matrix:

Charge = 0 Multiplicity = 2

N

C	1	B1					
C	2	B2	1	A1			
N	3	B3	2	A2	1	D1	0
O	3	B4	2	A3	1	D2	0
C	1	B5	2	A4	3	D3	0
O	6	B6	1	A5	2	D4	0
H	1	B7	6	A6	7	D5	0
H	2	B8	1	A7	6	D6	0
H	4	B9	3	A8	2	D7	0

H	4	B10	3	A9	2	D8	0
H	6	B11	1	A10	2	D9	0
C	2	B12	1	A11	6	D10	0
H	13	B13	2	A12	1	D11	0
H	13	B14	2	A13	1	D12	0
C	13	B15	2	A14	1	D13	0
C	16	B16	13	A15	2	D14	0
C	16	B17	13	A16	2	D15	0
H	17	B18	16	A17	13	D16	0
C	17	B19	16	A18	13	D17	0
C	18	B20	16	A19	13	D18	0
H	18	B21	16	A20	13	D19	0
H	20	B22	17	A21	16	D20	0
C	20	B23	17	A22	16	D21	0
H	21	B24	18	A23	16	D22	0
O	24	B25	20	A24	17	D23	0
H	26	B26	24	A25	20	D24	0
O	26	B27	24	A26	20	D25	0
C	28	B28	26	A27	24	D26	0
C	29	B29	28	A28	26	D27	0
C	30	B30	29	A29	28	D28	0
H	30	B31	29	A30	28	D29	0
C	31	B32	30	A31	29	D30	0
H	31	B33	30	A32	29	D31	0
H	33	B34	31	A33	30	D32	0
C	29	B35	28	A34	26	D33	0
H	36	B36	29	A35	28	D34	0
N	36	B37	29	A36	28	D35	0
O	36	B38	29	A37	28	D36	0

Variables:

B1	1.44696
B2	1.52318
B3	1.33264
B4	1.23972
B5	1.33652
B6	1.23918
B7	1.01159
B8	1.08966
B9	1.00872
B10	1.0097
B11	1.09417
B12	1.55053
B13	1.09175
B14	1.09192
B15	1.50005
B16	1.41391
B17	1.4022
B18	1.08427
B19	1.37529
B20	1.38405
B21	1.08351
B22	1.08278
B23	1.42261
B24	1.08354
B25	1.31898
B26	1.25
B27	2.5
B28	1.34351
B29	1.3702
B30	1.4107
B31	1.07997
B32	1.37295
B33	1.08327
B34	1.08058
B35	1.35476
B36	2.15829
B37	1.38588
B38	1.34
A1	108.36968
A2	115.95675
A3	120.51539

A4	123.72872
A5	124.8529
A6	118.57306
A7	108.54625
A8	121.06322
A9	119.50871
A10	113.43941
A11	111.92997
A12	108.36803
A13	108.04165
A14	110.92392
A15	119.74492
A16	120.87053
A17	118.9496
A18	121.0671
A19	120.53116
A20	119.60032
A21	121.711
A22	119.80504
A23	121.46809
A24	120.31537
A25	98.5075
A26	98.5075
A27	86.8657
A28	126.28689
A29	116.95797
A30	120.36917
A31	122.37144
A32	118.45004
A33	122.0952
A34	112.98754
A35	149.47156
A36	124.75012
A37	117.62494
D1	150.3452
D2	-32.07544
D3	-145.32683
D4	2.66601
D5	179.16541
D6	-25.43121
D7	-2.78818

D8	174.39574
D9	-178.12488
D10	95.76739
D11	60.04776
D12	178.04587
D13	-61.35539
D14	-81.51732
D15	95.8831
D16	-2.57354
D17	177.70688
D18	-176.78233
D19	3.19961
D20	179.05488
D21	-0.7362
D22	179.00255
D23	-179.19969
D24	-112.6567
D25	-112.6567
D26	12.3158
D27	74.8421
D28	-179.74728
D29	0.11904
D30	-0.02
D31	179.92045
D32	179.82908
D33	-105.05981
D34	179.35143
D35	179.60086
D36	-0.39914

Add virtual bond connecting atoms H27 and O26 Dist= 2.36D+00.

Add virtual bond connecting atoms O28 and H27 Dist= 2.36D+00.

A.3 Comandos en texto plano para calcular el camino de reacción por el método IRC a partir de la geometría del TS de la 3-hidroxi-2-piridona y el radical tirosina.

%chk=3py-TyrTS.chk

%nprocshared=16

Will use up to 16 processors via shared memory.

%mem=15GB

IRC=(calcfc,maxpoints=200,maxcyc=200,stepsize=5) 6-31+g(d,p) scrf=sm
d m052x scf=(qc,maxcyc=200) iop(1/7=300) guess=read geom=check

Structure from the checkpoint file: "3py-TyrTS.chk"

Charge = 0 Multiplicity = 2

N,0,0.07027224,-0.0102844214,0.0431431794
C,0,0.0004884629,0.0866580196,1.4861574838
C,0,1.4190307249,0.0717820682,2.0385156953
N,0,1.6283042043,0.7977377246,3.1361912007
O,0,2.2936221632,-0.6242281071,1.501324511
C,0,-0.7728371375,0.6171035331,-0.782570015
O,0,-1.6591901031,1.4059364064,-0.4250919247
H,0,0.7367286716,-0.6607790702,-0.3518552332
H,0,-0.4998958612,1.019393569,1.7436930539
H,0,0.8937729123,1.3612398815,3.5360669619
H,0,2.5306828085,0.7666154835,3.5882443819
H,0,-0.603123831,0.3830269422,-1.8378213492
C,0,-0.7694398003,-1.1068402664,2.1042210387
H,0,-0.2538248554,-2.0293544234,1.8287466889
H,0,-0.7437059157,-0.9985168315,3.1907365758
C,0,-2.1903237855,-1.138886831,1.6216033088
C,0,-3.1606045684,-0.3114130638,2.2274365508
C,0,-2.5582608166,-1.9333006388,0.5261519634
H,0,-2.8681851092,0.3166089655,3.06201762
C,0,-4.4655812768,-0.31046604,1.7904000764
C,0,-3.861950676,-1.9359652569,0.0602686581
H,0,-1.8141348673,-2.5622283425,0.0510453221

H,0,-5.2230915773,0.2974712374,2.269579885
C,0,-4.854005059,-1.1450419815,0.7043036072
H,0,-4.1572044505,-2.5425462591,-0.7880745639
O,0,-6.1137905918,-1.2195785601,0.3326086645
H,0,-6.5132087699,-2.3572745776,0.7065628396
O,0,-6.6377262703,-3.4120562878,1.1414787572
C,0,-5.4709120385,-3.7834693562,1.6372441292
C,0,-4.9597855325,-3.2870211555,2.8350410382
C,0,-3.6780470684,-3.6412696844,3.2678857747
H,0,-5.5680511066,-2.5932185998,3.4022553418
C,0,-2.9419012229,-4.5301277259,2.5143650268
H,0,-3.2553738796,-3.2322927795,4.1738939617
H,0,-1.944114094,-4.8498120722,2.7778709441
C,0,-4.7000161201,-4.7719460382,0.8726444451
H,0,-2.9086337605,-5.742599952,0.8653224297
N,0,-3.465263782,-5.0813072259,1.3971755002
O,0,-5.100781814,-5.3090203671,-0.1702501932

A.4 Comandos en texto plano para calcular el análisis de población de Hirshfeld a partir de las coordenadas de los puntos del camino de reacción hallado con el método IRC de la 3-hidroxi-2-piridona con el radical tirosina.

```
%chk=3py-TyrTS.chk
%nprocshared=16
Will use up to 16 processors via shared memory.
%mem=15GB
-----
# Int(Grid=Ultrafine) scrf=smd 6-31+g(d,p) rom052x iop(1/8=3) pop=(NPA
,Hirshfeld) guess=read
-----
3py-TyrTS
```

Symbolic Z-matrix:

Charge = 0 Multiplicity = 2

N							
C	1	B1					
C	2	B2	1	A1			
N	3	B3	2	A2	1	D1	0
O	3	B4	2	A3	1	D2	0
C	1	B5	2	A4	3	D3	0
O	6	B6	1	A5	2	D4	0
H	1	B7	6	A6	7	D5	0
H	2	B8	1	A7	6	D6	0
H	4	B9	3	A8	2	D7	0
H	4	B10	3	A9	2	D8	0
H	6	B11	1	A10	2	D9	0
C	2	B12	1	A11	6	D10	0
H	13	B13	2	A12	1	D11	0
H	13	B14	2	A13	1	D12	0
C	13	B15	2	A14	1	D13	0
C	16	B16	13	A15	2	D14	0
C	16	B17	13	A16	2	D15	0
H	17	B18	16	A17	13	D16	0
C	17	B19	16	A18	13	D17	0
C	18	B20	16	A19	13	D18	0
H	18	B21	16	A20	13	D19	0
H	20	B22	17	A21	16	D20	0
C	21	B23	18	A22	16	D21	0
H	21	B24	18	A23	16	D22	0
O	24	B25	21	A24	18	D23	0
H	26	B26	24	A25	21	D24	0
O	26	B27	24	A26	21	D25	0

C	28	B28	26	A27	24	D26	0
C	29	B29	28	A28	26	D27	0
C	30	B30	29	A29	28	D28	0
H	30	B31	29	A30	28	D29	0
C	31	B32	30	A31	29	D30	0
H	31	B33	30	A32	29	D31	0
H	33	B34	31	A33	30	D32	0
C	29	B35	28	A34	26	D33	0
H	36	B36	29	A35	28	D34	0
N	33	B37	31	A36	30	D35	0
O	36	B38	29	A37	28	D36	0

Variables:

B1	1.44795
B2	1.52236
B3	1.33255
B4	1.24013
B5	1.33651
B6	1.23922
B7	1.0116
B8	1.08936
B9	1.00845
B10	1.00976
B11	1.09414
B12	1.54894
B13	1.09214
B14	1.09221
B15	1.50095
B16	1.4118
B17	1.40231
B18	1.08464
B19	1.37621
B20	1.38444
B21	1.08397
B22	1.08306
B23	1.42285

B24	1.08388
B25	1.31559
B26	1.26243
B27	2.39494
B28	1.32105
B29	1.39371
B30	1.39846
B31	1.08309
B32	1.37832
B33	1.08017
B34	1.08038
B35	1.46833
B36	2.03747
B37	1.35123
B38	1.23963
A1	108.42307
A2	116.09689
A3	120.36217
A4	123.63341
A5	124.87547
A6	118.43882
A7	108.3649
A8	121.10846
A9	119.49385
A10	113.42688
A11	111.71754
A12	108.39278
A13	107.98773
A14	111.02034
A15	120.00706
A16	120.77426
A17	118.9645
A18	121.05211
A19	120.73328
A20	119.40366
A21	121.54025
A22	120.21029
A23	121.39794
A24	120.54912
A25	105.68428
A26	99.55143

A27	101.00552
A28	123.11347
A29	120.7906
A30	118.18378
A31	118.92454
A32	121.48946
A33	123.41792
A34	117.23033
A35	141.64591
A36	120.54355
A37	124.05692
D1	146.53962
D2	-35.91379
D3	-144.30374
D4	4.13807
D5	177.84169
D6	-24.30672
D7	-3.3793
D8	175.15574
D9	-176.77538
D10	96.65993
D11	59.49936
D12	177.30497
D13	-61.86097
D14	-81.59484
D15	95.12806
D16	-2.02071
D17	179.12917
D18	-178.33197
D19	2.59739
D20	178.0253
D21	-1.02431
D22	179.73793
D23	-174.79914
D24	69.99251
D25	70.19003
D26	-1.73596
D27	74.4545
D28	-175.43524
D29	2.44092
D30	-2.313

D31	177.50914
D32	179.69424
D33	-105.83804
D34	175.89736
D35	-1.97226
D36	-2.92457