



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química.

Análisis y Control de Calidad Químicos

**ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DEL TRANS-RESVERATROL FRENTE
A LOS RADICALES OH Y OOH**

Autor: Julio Pérez González

Tutoras: Pilar Redondo Cristóbal

Ana María Velasco Sanz

Año 2024-2025

Índice

1.	Resumen.....	4
2.	Introducción	5
3.	Objetivos	11
4.	Metodología	12
4.1.	Métodos de la mecánica cuántica	12
4.2.	Teoría del funcional de la densidad (DFT).....	12
4.3.	DFT Conceptual.....	15
4.4.	Funciones de base.....	17
4.5.	Superficie de energía potencial.....	19
4.6.	La influencia del disolvente: el modelo SMD	20
5.	Resultados y discusión	22
5.1.	Reactividad del trans-resveratrol en fase gas	23
5.1.1.	<i>Single Electron Transfer, SET:</i>	24
5.1.2.	<i>Hydrogen Atom Transfer, HAT:</i>	25
5.1.3.	<i>Radical Adduct Formation, RAF:</i>	28
5.2.	Reactividad del trans-resveratrol en disolución acuosa.....	32
5.2.1.	<i>Single Electron Transfer, SET:</i>	33
5.2.2.	<i>Hydrogen Atom Transfer, HAT:</i>	33
5.2.3.	<i>Radical Adduct Formation, RAF:</i>	34
5.3.	Reactividad del trans-resveratrol en CCl ₄	35
5.3.1.	<i>Single Electron Transfer, SET:</i>	36
5.3.2.	<i>Hydrogen Atom Transfer, HAT:</i>	36
5.3.3.	<i>Radical Adduct Formation, RAF:</i>	38
5.4.	Comparación de la reactividad de trans-resveratrol en fase gas, acuosa y en tetracloruro de carbono.....	39
5.5.	Análisis de la reactividad del trans-resveratrol	42
6.	Conclusiones	46
7.	Lista de figuras y tablas	47
8.	Bibliografía.....	49

1. Resumen

En el presente Trabajo Fin de Máster (TFM) se realiza un estudio computacional de la capacidad antioxidante del *trans*-resveratrol, un polifenol de origen natural presente en el vino, frente a los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OOH}$. Esta capacidad se evalúa considerando tres mecanismos de reacción: transferencia de un electrón (SET), transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) y formación de aducto radicalario (RAF). El estudio se lleva a cabo en fase gas, medio acuoso y en un disolvente apolar (CCl_4). Para identificar el mecanismo más favorable se utilizan parámetros termodinámicos. Para caracterizar los reactivos, productos y estados de transición implicados en los diferentes procesos se ha utilizado la Teoría del Funcional de la densidad (DFT) en particular el funcional M08HX en conjunción con el conjunto de funciones de base 6-31++G(d,p). Para el estudio en fases condensadas se ha empleado un modelo de disolvente continuo (SMD). Los resultados obtenidos se han explicado a partir de diferentes índices de reactividad haciendo uso de la teoría conceptual del DFT.

Abstract

In the present work, a computational study is conducted on the antioxidant capacity of trans-resveratrol, a naturally occurring polyphenol found in wine, against the $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{OOH}$ radicals. This capacity is evaluated by considering three reaction mechanisms: single electron transfer (SET), hydrogen atom transfer (HAT), and radical adduct formation (RAF). The study is performed in the gas phase, in an aqueous medium, and in a non-polar solvent (CCl_4). Thermodynamic parameters are employed to identify the most favorable reaction mechanism.

To characterize the reactants, products, and transition states involved in the various processes, Density Functional Theory (DFT) is used, specifically the M08HX functional in combination with the 6-31++G(d,p) basis set. For the study in condensed phases, a continuum solvation model (SMD) is applied. The results are interpreted using various reactivity indices within the framework of conceptual DFT.

2. Introducción

Los radicales libres son especies que contienen uno o más electrones desapareados. Se originan cuando una molécula capta o pierde un electrón o cuando un enlace covalente se rompe de forma homolítica (por calentamiento, por irradiación de luz UV o radiación ionizante, por ejemplo). Un grupo muy importante de radicales son aquellos derivados del oxígeno, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*). Este término incluye tanto a radicales de oxígeno como el radical-anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($\cdot OH$), peróxido ($RO_2^{\cdot}$), alcóxido ($RO^{\cdot}$) o hidroperoxilo ($HOO^{\cdot}$) y otros agentes oxidantes no radicalarios, como HOCl, H_2O_2 , O_3 , entre otros. En definitiva, especies derivadas de O_2 más reactivas que él. De entre todas ellas, en este trabajo dedicaremos especial atención a los radicales hidroxilo e hidroperoxilo.

Los radicales libres desempeñan un papel muy importante en la química atmosférica. La gran mayoría de las reacciones que tienen lugar en la atmósfera son de tipo radicalario, y en muchas de ellas participa el radical hidroxilo. En las capas altas de la atmósfera, el radical $\cdot OH$ existe en estado gaseoso y desempeña un papel importante en la oxidación de numerosos gases de efecto invernadero distintos al CO_2 , así como de otros contaminantes del aire, como el CH_4 .

En disolución, el radical $OH^{\cdot}$ reacciona muy rápidamente con las moléculas adyacentes, de hecho, es el radical de oxígeno más reactivo conocido, con un potencial de reducción $OH^{\cdot}$, H^+/H_2O de 2.31 V¹. Por otra parte, el radical hidroperoxilo, $\cdot OOH$, es menos reactivo, con un tiempo de vida media de varios segundos. Este radical es la forma protonada del radical anión superóxido, $O_2^{\cdot-}$, y su comportamiento en disolución es similar al de otros radicales peróxido de mayor tamaño, como $ROO^{\cdot}$, muy abundantes en los sistemas biológicos. Por tanto, el estudio de este radical puede aportar información relevante sobre la reactividad de otros radicales importantes.

En el organismo, las especies radicalarias son esenciales para el funcionamiento celular normal. Participan en diversas vías de señalización intracelular que regulan la respuesta inmunitaria y la apoptosis celular, las células del sistema inmunitario emplean ROS para la eliminación de algunos patógenos, etc. Sin embargo, un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del organismo para eliminarlos o reparar el daño que provocan conduce a lo que se conoce como estrés oxidativo. Los radicales libres reaccionan con componentes vitales de la célula, generando nuevos radicales que inician una reacción en cadena que puede dañar células y tejidos, lo que puede causar diversas enfermedades cardiovasculares² o neurodegenerativas³, entre otras, y, en general, contribuir al envejecimiento. Para contrarrestar los efectos nocivos de los radicales libres, los seres vivos

han desarrollado complejos mecanismos de defensa antioxidante. Se define como antioxidante a toda sustancia que, presente en bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato susceptible de oxidación, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato⁴. Los sustratos son muy variados e incluyen prácticamente cualquier componente de una célula viva: proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ADN, etc. Estos compuestos son capaces de frenar reacciones de oxidación en cadena mediante la neutralización directa de ROS, inhibiendo enzimas involucradas en procesos oxidativos o quelando iones metálicos como Fe^{3+} o Cu^+ . Gracias a estas características se les atribuye efectos beneficiosos en enfermedades como la aterosclerosis, las cardiopatías coronarias, ciertos tipos de cáncer y en el retraso del envejecimiento.

Los antioxidantes pueden ser enzimas, como la superóxido dismutasa o la catalasa, así como especies no enzimáticas como la vitamina C, la vitamina E y el glutatión. Además, los antioxidantes presentes en alimentos de origen vegetal, como frutas y hortalizas, desempeñan un papel esencial en la protección frente al estrés oxidativo. Entre estos compuestos de origen vegetal destacan los polifenoles. Su poder antioxidante depende en gran medida del número y posición relativa de los grupos hidroxilo. La dieta humana es rica en esta clase de compuestos: la soja contiene tocoferoles, isoflavonas (como genisteína y daidzeína) y ácido cafeico. Los cacahuetes contienen taxifolina y *trans*-resveratrol, que también se encuentra en las uvas y otras especies de plantas. El té verde es rico en catequinas, mientras que el té negro contiene además teaflavinas y tearubiginas.

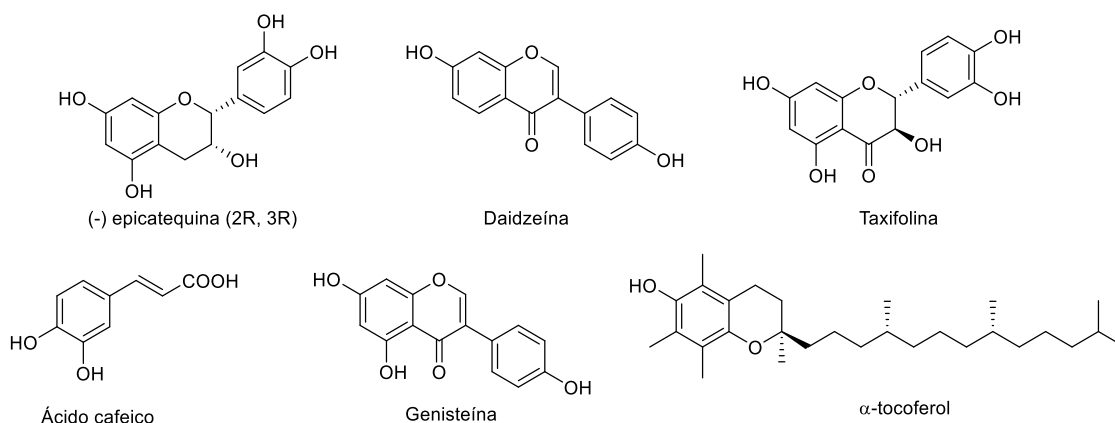
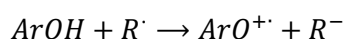


Figura 1. Algunos antioxidantes fenólicos presentes en la dieta humana.

Se han identificado tres mecanismos principales mediante los cuales los antioxidantes polifenólicos inactivan radicales libres⁵:

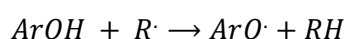
- **Transferencia de un electrón (SET, *single electron transfer*):**



El antioxidante, ArOH, cede un electrón al radical R[•], formándose el anión R⁻ y el catión-radical ArO^{•+}, que, debido a la propia naturaleza del antioxidante, será mucho menos reactivo que el radical inicial. El potencial de ionización del antioxidante (IP, *ionization potential*) juega un papel crucial a la hora de determinar la viabilidad de este mecanismo. La diferencia de entalpía entre productos y reactivos de la reacción corresponde a diferencia entre los IPs del antioxidante y el radical⁶:

$$IP = H([ArOH]^{+\bullet}) - H(ArOH) \quad [1]$$

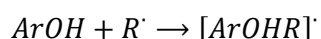
- **Transferencia de átomo de hidrógeno (HAT, *hydrogen atom transfer*):**



El antioxidante reacciona con el radical libre transfiriéndole un átomo de hidrógeno tras la ruptura homolítica del enlace O-H. Como productos de la reacción se obtienen la especie RH y el radical ArO[•], menos reactivo que la especie de partida. La entalpía de disociación del enlace O-H (BDE, *bond dissociation enthalpy*) se relaciona con la entalpía de reacción:

$$BDE = H(ArO^{\bullet}) + H(H^{\bullet}) - H(ArOH) \quad [2]$$

- **Formación de aducto radicalario (RAF, *radical adduct formation*):**



El antioxidante capta el radical mediante la formación de un aducto. La viabilidad de este proceso se evalúa mediante la entalpía de reacción asociada a la formación del aducto.

Los compuestos polifenólicos son componentes importantes de las uvas y determinan el color, el sabor y el cuerpo de los vinos. A diferencia de otras bebidas alcohólicas, el vino tinto contiene polifenoles en concentraciones de hasta 4 g·L⁻¹. Entre estos compuestos, los estilbenoides constituyen un grupo muy relevante, cuyos niveles totales pueden superar los 100 mg·L⁻¹ en el vino tinto.



Figura 2. *Vitis vinifera*⁷.

Los estilbenoides son un grupo de polifenoles no flavonoides cuya estructura está formada por dos anillos aromáticos unidos por un puente de etileno (esqueleto C6–C2–C6). En las vides (*Vitis vinífera*, **Figura 2**) existen alrededor de 60 estilbenoides, aunque solo algunos de ellos están presentes en el vino. Se sintetizan mayoritariamente en las zonas lignificadas de la planta (tallo y raíces) como mecanismo de defensa frente a ataques bióticos, como hongos o bacterias, o abióticos, como luz UV. En el fruto, su concentración es menor, acumulándose en la piel y en menor medida en las semillas⁸.

El **resveratrol** (3,4',5 trihidroxiestilbeno) es un polifenol de origen natural con estructura de tipo estilbeno. Posee dos estereoisómeros, las formas *trans* (E) y *cis* (Z); no obstante, el isómero *trans* es el más estable desde el punto de vista estérico y en un mayor rango de pH⁹.

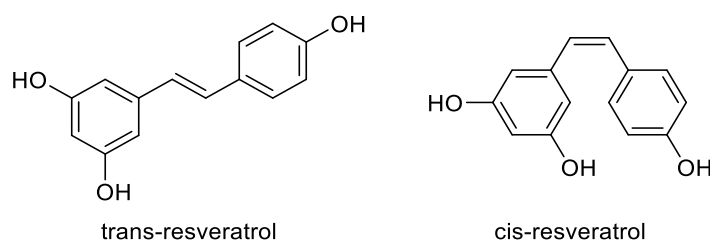


Figura 3. Estructura del trans- y cis-resveratrol (3,4',5 trihidroxiestilbeno).

Fue caracterizado químicamente por primera vez en 1940 por Takaoka, tras ser aislado de las raíces del *Veratrum grandiflorum*¹⁰. Sin embargo, ya estaba presente en preparados medicinales tradicionales de la medicina india, como el *Darakchasava*¹¹.

El *trans*-resveratrol se encuentra en una gran variedad de plantas y frutos, como vides, moras, arándanos, grosellas, cacahuetes y en las raíces del *Polygonum cuspidatum* (especie muy usada en la medicina tradicional china y japonesa). Además, es un componente natural presente en el vino. En la vid, fue detectado por primera vez en 1976 por Langcake y Pryce,

quienes demostraron que los tejidos foliares lo sintetizan en respuesta a infecciones provocadas por hongos (sobre todo *Botrytis cinerea*) o por la exposición a luz UV¹². En las uvas, el *trans*-resveratrol se encuentra mayoritariamente unido a glúcidos y en menor cantidad como monómero, al igual que ocurre con sus derivados E/Z-piceido y pteroesstilbeno.

El resveratrol y sus derivados se encuentran en concentraciones mucho más elevadas en los vinos tintos que en los blancos¹³. Esto se debe a que, durante la elaboración del vino tinto, la fermentación se realiza con la uva entera, incluyendo la piel, que es donde se concentra una mayor cantidad de resveratrol. Esto permite que los compuestos de tipo estilbeno, altamente hidrofóbicos, sean extraídos eficazmente de la piel de la uva hacia el etanol. En contraste, en la producción de vinos blancos, la piel, las semillas y parte de las flores (peciolos) se eliminan después de la extracción del jugo de las uvas. Aunque en el extracto de uva solo se ha identificado el isómero *trans*^{12,14}, en el vino están presentes ambos isómeros, siendo el *cis* mucho menos abundante¹⁵.

En plantas, la síntesis del *trans*-resveratrol discurre por vía enzimática (**Figura 4**). En primer lugar, la fenilalanina es desaminada por la enzima fenilalanina amonio liasa para formar ácido cinámico. La cinamato 4-hidroxilasa hidroxila el ácido cinámico para dar ácido para-cumárico, que se activa con CoA mediante la 4-cumarato CoA ligasa, generando cumaril-CoA. La condensación de este último con 3 moléculas de malonil CoA en presencia de la estilbeno sintetasa da lugar al *trans*-resveratrol.

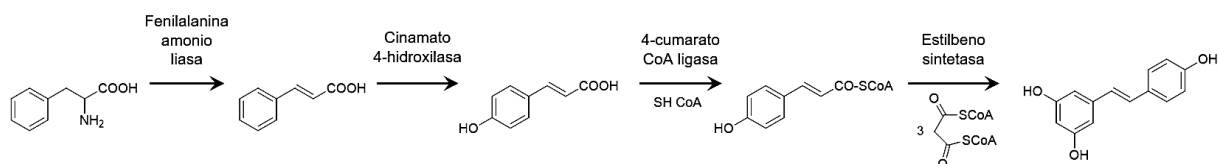


Figura 4. Biosíntesis por vía enzimática del *trans*-resveratrol.

El *trans*-resveratrol actúa como molécula precursora de una gran variedad de compuestos, incluyendo el piceido, pteroesstilbeno y el grupo de las viniferinas, una familia de compuestos con múltiples beneficios para el organismo¹⁶.

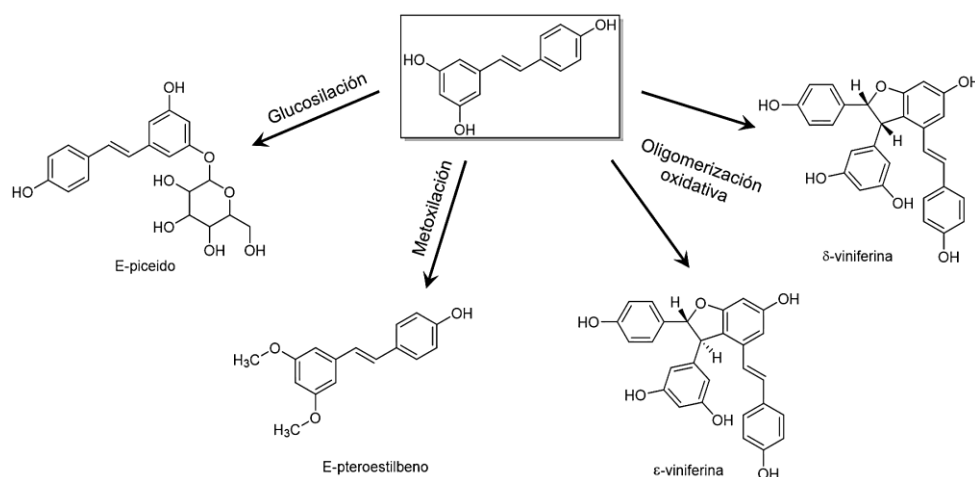


Figura 5. *Trans*-resveratrol como molécula precursora.

Diversos autores han realizado estudios acerca de la capacidad antioxidante del *trans*-resveratrol. La generación de estrés oxidante es uno de los mecanismos más importantes en la toxicidad y carcinogenicidad inducidas por metales pesados en las personas. Nicolás-Méndez y colaboradores¹⁷ estudian el papel del resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por metales pesados, los resultados que presentan muestran que el tratamiento previo con resveratrol es capaz reducir los efectos del estrés oxidante generado por los diferentes compuestos metálicos de As, Cd, Cu, Cr y Fe. Destaca especialmente el trabajo computacional de Nino Russo y sus colaboradores¹⁸, quienes llevaron a cabo un estudio sistemático de la reactividad del *trans*-resveratrol frente a los radicales hidroxilo e hidropéroxilo en fase acuosa, empleando la Teoría del Funcional de la Densidad con el funcional M05-2X y el conjunto de base 6-311++G(d,p). Por otro lado, las capacidades antioxidantes de los grupos hidroxilo (OH) y metilos aromáticos (CH) del *trans*-resveratrol han sido analizadas desde un punto de vista termodinámico¹⁹.

En este trabajo, se realizará un estudio teórico de la reactividad y la capacidad antioxidante del *trans*-resveratrol frente a los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OOH}$, dos de los más comunes en el organismo. El estudio se llevará a cabo tanto en fase gas como en fase condensada, empleando H_2O , un disolvente polar, en el que tienen lugar las reacciones biológicas, y tetracloruro de carbono, CCl_4 , un disolvente completamente apolar, con el fin de evaluar de forma comparativa el efecto de la solvatación y de la polaridad del medio sobre la capacidad antioxidante del *trans*-resveratrol. Además, para intentar explicar las tendencias de reactividad encontradas se hará uso de la Teoría Conceptual del Funcional de la Densidad.

3. Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster es estudiar la actividad antioxidante del *trans*-resveratrol. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la capacidad antioxidante del *trans*-resveratrol frente a los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OOH}$.
- Estudiar los diferentes mecanismos de oxidación del *trans*-resveratrol en fase gas, en disolución acuosa y en tetracloruro de carbono.
- Analizar las diferencias de la actividad antioxidante en función de la fase.
- Explicar los resultados obtenidos en base a diferentes índices de reactividad.

4. Metodología

4.1. Métodos de la mecánica cuántica

Se basan en la resolución de la ecuación de Schrödinger para el estudio de los sistemas. La función de onda de una molécula depende de la posición de los electrones y los núcleos. Para poder abordar la resolución de la ecuación de Schrödinger para especies moleculares, se introdujo la aproximación de Born-Oppenheimer, la cual se fundamenta en la diferencia de masa entre los núcleos y los electrones. En consecuencia, el movimiento de los electrones es mucho más rápido que el de los núcleos. Esta diferencia permite desacoplar ambos movimientos. En primer lugar, se considera que los núcleos se encuentran en una determinada posición, fijos, con los electrones moviéndose alrededor. A continuación, se estudia el movimiento nuclear en el potencial creado por los electrones. Esto supone considerar que los electrones se reajustan casi instantáneamente a cualquier cambio en la posición de los núcleos. De esta forma, a partir de la resolución de la ecuación de Schrödinger electrónica, es posible estudiar las propiedades electrónicas de los sistemas, así como los procesos químicos en los que se producen cambios electrónicos, lo que los hace a estos métodos más potentes que los de Mecánica Molecular. Sin embargo, demandan un mayor coste computacional y limitan el tamaño de los sistemas a estudiar. Se diferencian tres metodologías²⁰:

1. Métodos semiempíricos: son los más sencillos. Incluyen información experimental, despreciando términos del Hamiltoniano o simplificando integrales.
2. Métodos *ab initio*: resuelven la ecuación de Schrödinger sin emplear información experimental, haciendo uso únicamente de los valores de constantes universales. Se clasifican en métodos Hartree-Fock (HF, la repulsión interelectrónica se tiene en cuenta como un promedio) y métodos post-HF, que incluyen la correlación electrónica haciendo uso de procedimientos: variacionales (CI, MCSCF), perturbativos (MP) o de agregados acoplados (CC).
3. Teoría del Funcional de la Densidad (DFT): es una metodología alternativa, utilizando la densidad electrónica en vez de la función de onda. Se detalla en profundidad a continuación ya que es la que emplearemos en este estudio.

4.2. Teoría del funcional de la densidad (DFT)

La densidad electrónica, $\rho(r)$, se define como el número de electrones por unidad de volumen y es una función simple que depende de solo 3 variables: x , y , z . La Teoría del Funcional de la Densidad (*Density Functional Theory*, DFT) emplea la densidad electrónica

como variable principal en lugar de la función de onda, Ψ , la cual depende de $3N$ coordenadas, para el cálculo de la energía de un sistema polieletrónico. Esta metodología de cálculo se fundamenta en el teorema de Hohenberg-Kohn, que afirma que la energía del estado electrónico fundamental de un sistema puede determinarse si se conoce su densidad electrónica²⁰. Es decir, la energía del estado fundamental es un funcional de la densidad electrónica y se expresa de la siguiente forma:

$$E = E(\rho) = T(\rho) + E_{en}(\rho) + E_{ee}(\rho) \quad [3]$$

Donde $T(\rho)$ es el término de energía cinética, $E_{en}(\rho)$ es la energía de interacción electrón-núcleo y $E_{ee}(\rho)$ la energía de repulsión electrón-electrón. Kohn y Sham proponen un método que ha resultado clave para que la teoría DFT sea aplicable a sistemas químicos. Propusieron considerar un sistema sin interacciones de forma que la densidad electrónica de este sistema coincide con la del sistema real, en el que sí hay interacciones. Así, la ecuación [3] se reescribe de la siguiente forma:

$$E(\rho) = T_s(\rho) + E_{en}(\rho) + J(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad [4]$$

Donde $T_s(\rho)$ representa la energía cinética del sistema sin interacciones, que es una aproximación a la energía cinética real $T(\rho)$; $E_{en}(\rho)$ es la energía de interacción electrón-núcleo, $J(\rho)$ es la energía de Coulomb de interacción electrón-electrón clásica y $E_{xc}(\rho)$, término denominado de correlación e intercambio, incluye tanto la energía cinética que no tenía en cuenta $T_s(\rho)$, por asumir un sistema de partículas independientes, como la energía de interacción no clásica electrón-electrón (intercambio). La principal dificultad en la Teoría del Funcional de la Densidad reside en encontrar las expresiones adecuadas para $E_{xc}(\rho)$, ya que la expresión exacta se desconoce. Asumiendo que se conoce dicho funcional, el procedimiento es análogo al del método Hartree-Fock: se parte de un conjunto de orbitales ψ_i ortogonales que nos dan una densidad inicial y de forma iterativa se busca minimizar la energía del sistema. A diferencia del método Hartree-Fock, los métodos basados en el funcional de la densidad incluyen la correlación electrónica, aunque solo de forma aproximada, ya que el funcional no es exacto, con un coste computacional similar al del cálculo HF.

Los diferentes funcionales difieren en cómo se calcula el término de correlación e intercambio. Según las aproximaciones empleadas para determinar $E_{xc}(\rho)$, se distinguen varios tipos de funcionales:

1. Local Density Approximation, LDA: la aproximación local de la densidad asume que el término de correlación e intercambio solo depende de la densidad electrónica, tratándola como un gas uniforme de electrones.
2. Generalized Gradient Approximation, GGA: en la aproximación del gradiente generalizado, la energía de correlación e intercambio no solo depende de la densidad electrónica, también del módulo del gradiente de la densidad, $|\nabla\rho|$, para dar cuenta de la no homogeneidad de ρ . Proporcionan mejores resultados para las energías de enlace, geometrías moleculares y energías fundamentales que los funcionales LDA.
3. Meta-GGA: el término de correlación e intercambio depende de la densidad electrónica, del gradiente de la densidad y además incorporan información acerca de la densidad de energía cinética local (τ) y/o del Laplaciano²¹.
4. Funcionales híbridos: incorporan parte de la energía de intercambio calculada a nivel Hartree-Fock (E_x^{HF}) en el funcional de intercambio, ya que HF calcula las energías de intercambio de forma exacta. De entre todos los funcionales híbridos, el más popular es B3LYP²², donde la B es el funcional de intercambio de Becke, el 3 indica que el funcional tiene 3 parámetros y LYP hacer referencia al funcional de correlación Lee-Young-Park.

En muchos casos, con funcionales GGA e híbridos se han logrado resultados de precisión similar a la obtenida con métodos post Hartree-Fock, pero con un coste computacional menor, lo que les ha convertido en una gran alternativa para estudiar sistemas con un número elevado de electrones.

En este Trabajo Fin de Máster se ha empleado el funcional híbrido meta-GGA denominado M08-HX (**Minnesota 2008 High Hartree-Fock eXchange**)²³. Pertenece al grupo denominado “funcionales de Minnesota”, desarrollados entre 2005 y 2016 por Truhlar y sus colaboradores en la universidad de Minnesota. Este funcional se basa en la aproximación meta-GGA para la energía de intercambio-correlación, es decir, incluyen términos que dependen de la densidad de energía cinética, e incluyen una parte de energía de intercambio calculada a nivel HF. Se basa en formas funcionales complicadas parametrizadas en bases de datos de alta calidad. Se pueden utilizar para la química cuántica tradicional y los cálculos de física del estado sólido, pero las principales fortalezas son la descripción de interacciones no covalentes y proporcionar datos termodinámicos muy precisos.

4.3. DFT Conceptual

La Teoría Conceptual del Funcional de la Densidad o DFT Conceptual, desarrollada entre finales de los 70 y principios de los 80 por Parr y colaboradores²⁴, proporciona a los químicos una serie de conceptos químicos bien definidos que contribuyen a la comprensión cualitativa y a la predicción cuantitativa de la reactividad química. Cuando una molécula sufre una reacción, su número de electrones aumenta (ataque nucleofílico) o disminuye (ataque electrofílico). También cambia el potencial externo que sienten los electrones de la molécula, porque ahora los electrones no sólo son atraídos por los núcleos de la molécula, sino que también son atraídos por los núcleos y repelidos por los electrones del reactivo atacante. Por lo tanto, la susceptibilidad de una molécula a las reacciones químicas está determinada por su respuesta a los cambios en (a) el número de electrones y (b) potencial externo. Se establecen definiciones rigurosas para conceptos químicos ya existentes y de uso extendido (electronegatividad, dureza química, potencial de ionización, afinidad electrónica, etc.) proporcionándoles así una base cuantitativa²⁵.

El punto de unión entre la DFT computacional y la DFT conceptual se encuentra en el **potencial químico electrónico**, μ . Parr y Yang en 1989 lo definen como la derivada parcial de la energía del sistema, E , respecto al número de electrones, N , para un potencial fijo, $v(\mathbf{r})$, igualándolo a menos la electronegatividad, χ , de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(\mathbf{r})} = -\chi \quad [5]$$

El potencial químico cuantifica la tendencia de un electrón a “escapar” de un sistema en equilibrio.

Otra propiedad molecular que puede definirse en base a la DFT conceptual es la **dureza total o absoluta**, η , que se define como la resistencia de una especie química (átomo, molécula, ion) a cambiar su número de electrones, es decir, su resistencia a aceptar o donar electrones:

$$\eta = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_{v(\mathbf{r})} \quad [6]$$

El concepto opuesto al de dureza total es el de **blandura** (*softness*):

$$S = \frac{1}{\eta} = \frac{1}{2\eta} \left(\frac{\partial N}{\partial \mu} \right)_{v(\mathbf{r})} \quad [7]$$

Aunque existen definiciones de estos conceptos previas a la Teoría del Funcional de la Densidad, las formulaciones propuestas por la DFT conceptual no las contradicen; de hecho, las complementan y aportan una escala cuantitativa que se alinea con la interpretación clásica. De forma general, las especies duras/blandas se definen de la siguiente forma:

Base blanda: el átomo donador presenta alta polarizabilidad y baja electronegatividad, se oxida fácilmente y presenta orbitales vacíos (LUMO) de baja energía.

Base dura: el átomo donador presenta baja polarizabilidad y alta electronegatividad, es difícil de oxidar y contiene orbitales vacíos (LUMO) de alta energía.

Ácido blando: el átomo aceptor posee baja carga positiva, tiene un tamaño grande y sus electrones externos son fácilmente excitables (HOMO de alta energía).

Ácido duro: el átomo aceptor posee alta carga positiva y pequeño tamaño y no presenta electrones externos fácilmente excitables (HOMO de baja energía).

Aplicando el método de diferencias finitas, las ecuaciones anteriores se pueden expresar de forma más simplificada:

$$\mu = -\chi \approx -\frac{PI + AE}{2} = \frac{\varepsilon_{LUMO} + \varepsilon_{HOMO}}{2} \quad [8]$$

$$\eta \approx \frac{PI - AE}{2} = \frac{\varepsilon_{LUMO} - \varepsilon_{HOMO}}{2} \quad [9]$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \approx \frac{(I + A)^2}{2(I + A)} \approx \frac{(\varepsilon_{LUMO} + \varepsilon_{HOMO})^2}{2(\varepsilon_{LUMO} + \varepsilon_{HOMO})} \quad [10]$$

$$PI \approx -\varepsilon_{HOMO} \quad [11]$$

$$AE \approx -\varepsilon_{LUMO} \quad [12]$$

Donde PI es el potencial de ionización, AE la afinidad electrónica, ε_{HOMO} la energía del orbital molecular ocupado de mayor energía y ε_{LUMO} la energía del orbital molecular desocupado de menor energía. ω es el **índice de electrofilicidad**. Representa la energía de estabilización del sistema cuando éste acepta electrones del entorno.

Al igual que los anteriores, otro índice de reactividad química de gran importancia son las **funciones de Fukui**, $f(r)$:

$$f(r) = \left[\frac{\delta\mu}{\delta v(r)} \right]_N = \left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right]_v \quad [13]$$

Cuantifican como de sensible es el potencial químico de un sistema a las perturbaciones externas en un determinado punto. Se pueden definir tres funciones de Fukui $f^+(\mathbf{r})$, $f^-(\mathbf{r})$ y $f^0(\mathbf{r})$, que miden la reactividad frente a un reactivo nucleófilo, electrófilo o radicalario respectivamente en un átomo de la molécula:

$$f^+(\mathbf{r}) = \rho_{N+1}(\mathbf{r}) - \rho_N \approx \rho_{LUMO} \quad [14]$$

$$f^-(\mathbf{r}) = \rho_N - \rho_{N-1}(\mathbf{r}) \approx \rho_{HOMO} \quad [15]$$

$$f^0(\mathbf{r}) = \frac{1}{2}[\rho_{N+1}(\mathbf{r}) - \rho_{N-1}(\mathbf{r})] \approx \frac{1}{2}[\rho_{LUMO} + \rho_{HOMO}] \quad [16]$$

Donde ρ_{LUMO} y ρ_{HOMO} representan la densidad electrónica del LUMO y HOMO respectivamente. Un valor elevado de $f^+(\mathbf{r})$, $f^-(\mathbf{r})$ o $f^0(\mathbf{r})$ en una región de la molécula indica que esa zona es susceptible al ataque de reactivos nucleófilos, electrófilos o radicalarios respectivamente.

Todos estos parámetros fisicoquímicos que define la DFT conceptual (potencial químico, electronegatividad, funciones de Fukui, etc.) y a los que dota de base cuantitativa, se les conoce como **índices de reactividad generales**, y pueden resultar de gran utilidad a la hora de evaluar la capacidad antioxidante de una molécula.

4.4. Funciones de base

Las metodologías computacionales basadas en la química cuántica; es decir, aquellas que se basan en la resolución de la ecuación de Schrödinger, requieren de un conjunto de funciones de base (χ) que definan los orbitales moleculares (ϕ) como combinación lineal de las mismas:

$$\phi = \sum c_i \chi_i \quad [17]$$

En el modelo CLOA (combinación lineal de orbitales atómicos), estas funciones de base son los orbitales atómicos, que se definen mediante la siguiente expresión:

$$\chi = NY(\theta, \gamma)R(r) \quad [18]$$

Donde N es la constante de normalización, $Y(\theta, \gamma)$ la parte angular (armónicos esféricos) y $R(r)$ la parte radial. En función de cómo sea la parte radial existen dos tipos de funciones de base.

- **Funciones de tipo Slater (STO, Slater-Type Orbitals):**

$$R(r) = Nr^{n-1}e^{-\zeta r} \quad [19]$$

describen mejor el comportamiento de los electrones en los átomos, tanto a cortas como a largas distancias. Sin embargo, el cálculo de las integrales es costoso y solo se emplean para moléculas pequeñas.

- **Funciones de tipo gaussiana (GTO, *Gaussian-Type Orbitals*):**

$$R(r) = N r^{n-1} e^{-\alpha r^2} \quad [20]$$

describen peor el comportamiento de los electrones en los átomos y requieren de un mayor número de funciones; sin embargo, al ser el cálculo de las integrales más sencillo, su uso está más extendido que el de las funciones STO.

Estas últimas son las que se emplean de manera generalizada. Para usar un menor número de funciones de base, en las funciones de tipo gaussiana, se recurre a la contracción de funciones. De esta manera, algunas de las funciones originales (primitivas) se combinan linealmente entre sí para dar unas nuevas funciones (contraídas) que son las que se utilizan en el cálculo:

$$R(r) = \sum_j c_j e^{-\zeta_j r^2} \quad [21]$$

Donde $R(r)$ representa la función contraída y $e^{-\zeta_j r^2}$ la función primitiva.

Las bases también se pueden clasificar en función de su tamaño. Se dice que una base es mínima cuando emplea una función para cada orbital atómico ocupado en el estado fundamental del átomo. Las bases doble zeta emplean dos funciones para describir cada orbital atómico ocupado, las bases triple zeta emplean 3 funciones, etc.

En este trabajo se ha utilizado el conjunto de base **6-31++G(d,p)**²⁶. Se trata de un conjunto de base de tipo *Split-valence* o de valencia desdoblada. Estas bases describen las capas de valencia con bases doble zeta, triple zeta..., mientras que emplean bases mínimas para los orbitales del *core*. En este caso, cada orbital interno viene descrito por una única función (base mínima) que es contracción de seis gaussianas primitivas. Por otro lado, cada orbital de valencia viene descrito por dos funciones (base doble zeta), una de ellas que es contracción de tres gaussianas y la otra formada por una única gaussiana primitiva.

El término (++) hace referencia a las **funciones difusas** que se le añaden a la base para describir mejor la densidad electrónica que se encuentra alejada del núcleo. En este caso, se han añadido funciones difusas para los átomos pesados y para los átomos de hidrógeno.

Además de las funciones difusas, se han añadido a la base **funciones de polarización**, representadas como (d,p). Estas añaden un conjunto de funciones *d* para los elementos más pesados que el H, como C y O, además de añadir un conjunto de funciones *p* para cada átomo de H. Las funciones de polarización ayudan a describir los cambios en la densidad electrónica de un átomo en el entorno molecular.

4.5. Superficie de energía potencial.

El término de superficie de energía potencial (SEP) deriva de la aproximación de Born-Oppenheimer. Al resolver la ecuación de Schrödinger electrónica se obtiene el valor de la energía para una determinada configuración nuclear $U_i(\vec{R})$. El valor de esta energía, que es la energía potencial, para todas las configuraciones nucleares posibles es lo que se llama superficie de energía potencial. El análisis de esta superficie es fundamental para la determinación de estructuras o el estudio de la reactividad.

La obtención de la superficie de energía potencial completa es imposible en la gran mayoría de sistemas, debido a su dimensión. Un sistema con *N* átomos tiene 3*N* coordenadas nucleares, y aún eliminando las coordenadas de rotación y traslación, quedaría un número de 3*N*-6 (o 3*N*-5 en moléculas lineales) coordenadas internas. La alternativa consiste en limitarse a analizar las zonas de la superficie que sean de interés químico. Estas coincidirán con los puntos críticos de la misma. Para ello analizamos el comportamiento del gradiente de energía potencial, que se define como:

$$g_i = \frac{\partial U}{\partial q_i} \quad [22]$$

Donde *U* es la energía potencial y *q_i* una coordenada nuclear genérica. Si la primera derivada de esta, gradiente, es nula (ecuación [23]) estamos ante un punto crítico o estacionario en la SEP.

$$\frac{\partial U}{\partial q_i} = 0 \quad [23]$$

Hay dos tipos de puntos críticos o estacionarios, dependiendo de los valores de la derivada segunda de la energía potencial:

- **Mínimos.** Cuando todas las derivadas segundas de la energía son positivas. Estos corresponden a reactivos productos e intermedios de reacción.

$$\frac{\partial^2 U}{\partial^2 q_i} > 0 \quad [24]$$

- **Puntos de silla de orden uno.** Cuando al hacer la segunda derivada se obtiene uno de los valores negativos y el resto positivos. Estos corresponden con los estados de transición, que son un mínimo en todas las direcciones excepto en una, la coordenada de reacción

$$\frac{\partial^2 U}{\partial^2 q_i} > 0 \text{ y } \frac{\partial^2 U}{\partial^2 q_1} < 0 \quad [25]$$

La localización de estos puntos críticos en la SEP se realiza mediante optimizaciones de la geometría. La mayoría de las técnicas empleadas actualmente en la localización de puntos estacionarios requieren el cálculo del gradiente (derivadas primeras de energía) y el Hessiano (derivadas segundas de la energía).

En los puntos estacionarios de la SEP podemos calcular las frecuencias armónicas de vibración. Para ello, se calculan las derivadas segundas de la energía con respecto de las coordenadas nucleares, y se hace una transformación de la matriz de derivadas segundas a coordenadas normales (asociadas a los modos normales de vibración de la molécula) obteniendo una matriz diagonal. Los elementos de la matriz diagonal (valores propios), corresponden a las constantes de fuerza, k_i . A partir de estas constantes de fuerza pueden calcularse las frecuencias armónicas de vibración.

$$\nu_i = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_i}{\mu_i}} \quad [26]$$

El cálculo de frecuencias nos permite caracterizar los puntos estacionarios localizados en la SEP. Un mínimo se caracteriza porque todas sus frecuencias son reales, es decir, positivas. Un estado de transición, al contrario, tendrá una frecuencia imaginaria y el resto reales. El modo normal asociado a la correspondiente frecuencia imaginaria estará asociado a la coordenada de reacción. También nos posibilita el cálculo de la energía de vibración en el punto cero (ZPVE).

4.6. La influencia del disolvente: el modelo SMD

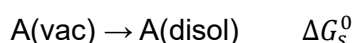
Tanto en el vino como en el organismo, el *trans*-resveratrol actúa sobre los radicales libres en disolución, en general medio acuoso. Por lo tanto, es importante tener en cuenta la influencia del disolvente en la reactividad de las moléculas y esta influencia puede también estudiarse mediante metodologías teóricas.

La forma más rigurosa para tratar los efectos del disolvente sobre los solutos sería considerar a la molécula de soluto rodeadas de moléculas de disolvente. Sin embargo, incluir

explícitamente todas las moléculas de disolvente incrementaría enormemente el coste computacional y hace a esta metodología impracticable.

Por este motivo, en este trabajo se ha escogido un método sencillo que se sitúa dentro de los conocidos como *modelos de disolvente continuos* o *modelos de solvatación implícita*. Estos métodos prescinden de la estructura molecular del disolvente, considerándolo como un dieléctrico continuo de extensión infinita, que forma una cavidad en la que se aloja la molécula de soluto. El dieléctrico está caracterizado por su permitividad relativa o constante dieléctrica (ϵ_r) y simula las propiedades del disolvente, proveyendo a los solutos estudiados de una energía de solvatación similar a la que tendrían en un disolvente real, pero sin representar explícitamente las moléculas del disolvente.

Para realizar un tratamiento específico de la interacción con el medio (la interacción soluto-disolvente) el concepto clave aquí es la energía de solvatación (ΔG_s^0) definida como el cambio en la energía libre de Gibbs asociada al proceso en el que una molécula pasa de estar en vacío a fase condensada:



De esta manera, el cálculo de energías libres de Gibbs en disolución se puede llevar a cabo añadiendo las energías libres de solvatación a las energías libres en vacío. En los *modelos de disolvente continuos* la energía de solvatación se calcula como la suma de tres términos:

$$\Delta G_s^0 = \Delta G_{cav} + \Delta G_{vdw} + \Delta G_{ele} \quad [27]$$

que representan la energía de formación de la cavidad las interacciones de dispersión y las interacciones electrostáticas.

En el presente estudio, se ha utilizado el modelo SMD²⁷ (*solvation model based on density*), en el que la cavidad que alberga al soluto se construye como una superposición de esferas de radio ρ_k (radio intrínseco de Coulomb) centradas en los núcleos atómicos. En definitiva, es un modelo robusto, con un buen equilibrio entre precisión y eficiencia computacional y aplicable a una gran variedad de disolventes de uso común.

5. Resultados y discusión

Como ya se ha mencionado en la introducción, en este trabajo se estudia la capacidad antioxidante del *trans*-resveratrol (t-RV) frente a los radicales hidroxilo, OH[•], e hidroperoxilo, OOH[•]. El estudio se llevó a cabo considerando tres posibles mecanismos de reacción: transferencia de hidrógeno (HAT, *hydrogen atom transfer*), transferencia de un electrón (SET, *single electron transfer*) y adición radicalaria (RAF, *radical adduct formation*). Estos mecanismos fueron evaluados en tres medios distintos: fase gas, medio acuoso (H₂O) y en un medio apolar (CCl₄), con el objetivo de explorar la influencia del entorno sobre cada una de las vías posibles.

Como paso previo al análisis de los mecanismos de reacción mencionados, es necesario establecer un sistema de numeración para la estructura molecular del *trans*-resveratrol. Esta numeración resulta fundamental tanto para la discusión de los mecanismos de reactividad como para la descripción detallada de los sitios reactivos, los estados de transición y los productos formados.

La **Figura 6** muestra la estructura del *trans*-resveratrol con la numeración asignada a cada uno de sus átomos. A cada anillo bencénico se le ha asignado una letra, A y B, y sus átomos se han numerado en sentido horario, comenzando por el carbono unido al doble enlace. Al carbono de la olefina contiguo al anillo A se le ha asignado la letra α y al contiguo al anillo B, la letra β .

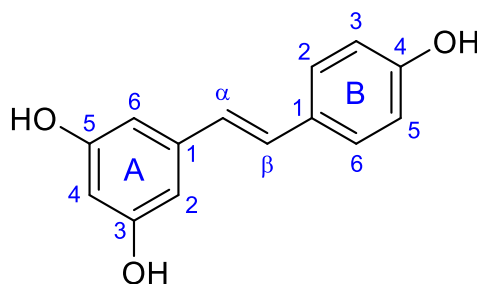


Figura 6. Estructura numerada del *trans*-resveratrol.

Aunque la totalidad de los cálculos teóricos que se presentan en este trabajo se han realizado empleando el conjunto de base 6-31++G(d,p), inicialmente se llevaron a cabo pruebas con la base 6-311++G(d,p). Este conjunto, de mayor calidad y coste computacional, describe cada orbital de valencia mediante tres funciones (base triple zeta), una de ellas constituida por la contracción de tres funciones gaussianas, y las otras dos formadas por una función gaussiana primitiva.

Para testar ambas bases se tomó como referencia el mecanismo SET en fase gas: t-RV + OH[•] → t-RV^{•+} + OH⁻. El procedimiento consistió, en primer lugar, en la optimización de la

geometría molecular y el cálculo de las frecuencias vibracionales utilizando la base 6-31++G(d,p) para las cuatro especies implicadas en el proceso. A continuación, se repitió el mismo proceso para la base triple-zeta 6-311++G(d,p). Posteriormente, sobre la geometría optimizada con la base 6-31G++G(d,p), se efectuó un cálculo de energía, *single point*, con el conjunto de funciones de base 6-311++G(d,p). Las funciones termodinámicas obtenidas en este estudio, entalpía (H) y Función de Gibbs (G), se han calculado a 298 K y 1 atm.

En la **Tabla 1** se muestran los resultados de la energía de reacción obtenidos con las tres aproximaciones.

Tabla 1. Variación de energía y energía libre de Gibbs, en *kcal/mol*, de reacción a los tres niveles de cálculo, en *kcal/mol*.

Nivel	t-RV + $\cdot\text{OH} \rightarrow \text{OH}^- + [\text{t-RV}]^{+*}$	
	ΔE	ΔG
M08HX/6-311++G(d,p)	132.2	132.0
M08HX/6-31++G(d,p)	131.7	132.6
M08HX/6-311++G(d,p)//M08HX/6-31++G(d,p)	131.9	132.6

En esta tabla se aprecia que las diferencias en las energías de reacción obtenidas a los tres niveles son menores de 0.5 kcal/mol. La máxima variación en la energía libre de Gibbs es de 0.6 kcal/mol. Esta pequeña variación (menor de 1 kcal/mol) confirma que el uso del conjunto de base más pequeño resulta suficiente para describir estos procesos, al mismo tiempo que permite una reducción significativa del tiempo de cálculo. Se concluyó que el uso del conjunto más extenso no aportaba mejoras sustanciales que justificasen el incremento en el tiempo y en el coste computacional. Por ello, se optó por realizar los cálculos del estudio con la base 6-31++G(d,p), ya que ofrecía un buen equilibrio entre precisión de los resultados y eficiencia computacional.

5.1. Reactividad del *trans*-resveratrol en fase gas

El estudio de la capacidad antioxidante del *trans*-resveratrol en fase gas supone un punto de partida fundamental, pues permite analizar el comportamiento del sistema sin la influencia de los efectos del disolvente. A continuación, vamos a analizar los tres mecanismos propuestos.

5.1.1. Single Electron Transfer, SET:

En este mecanismo, el *trans*-resveratrol transfiere un electrón al radical, dando lugar al catión radicalario del antioxidante, [t-RV]^{•+}, y al correspondiente anión derivado del radical, en este caso, OH⁻ u OOH⁻, como se muestra en la **Figura 7**.

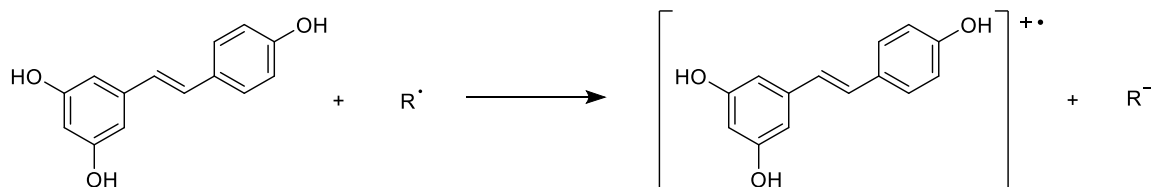


Figura 7. Reacción de transferencia de un electrón (SET) entre el *trans*-resveratrol y un radical.

En la **Figura 8** se recogen las geometrías optimizadas y las energías libres de Gibbs obtenidas para los reactivos y productos involucrados en el mecanismo SET.

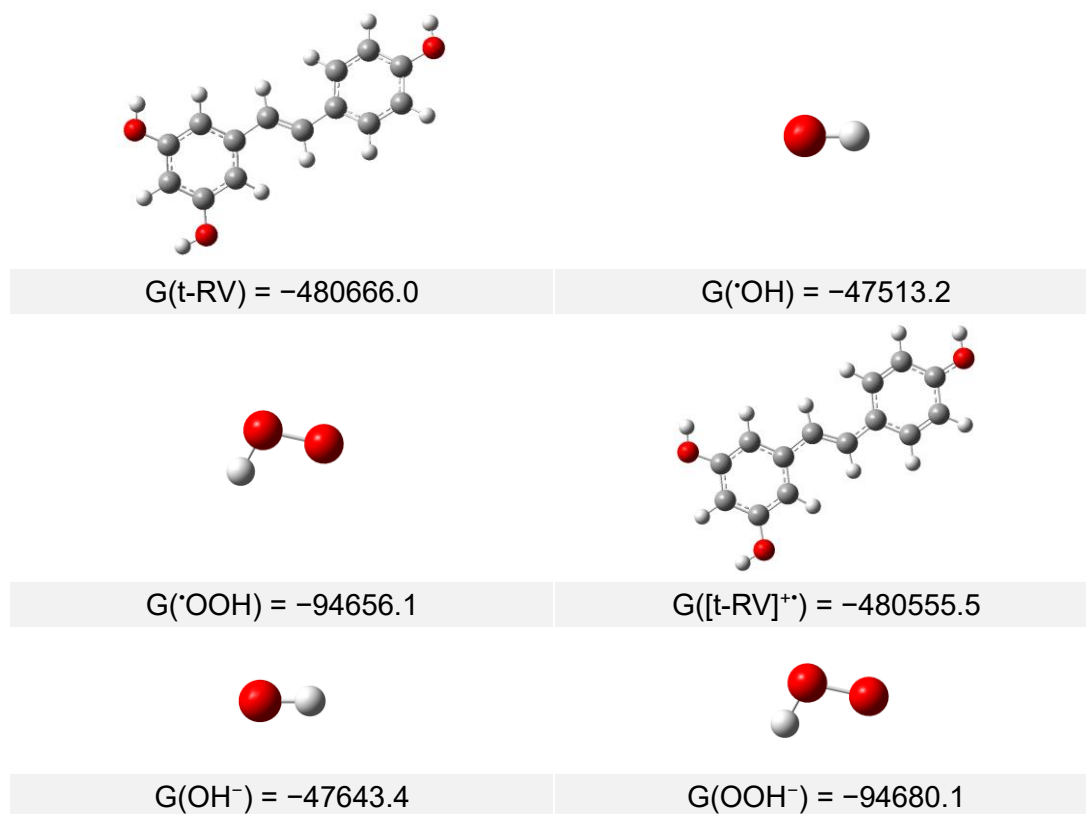


Figura 8. Estructura y energía libre de Gibbs, en *kcal/mol*, de reactivos y productos del mecanismo SET en fase gas.

Para evaluar cómo de viable es este mecanismo, se calcula la diferencia de energía entre reactivos y productos. En el caso de la energía libre de Gibbs ΔG , viene dado por:

$$\Delta G = [G(t-RV^{•+}) + G(R^{-})] - [G(t-RV) + G(R^{\bullet})] \quad [28]$$

Donde R puede ser OH o OOH. En la **Tabla 2** se muestran la variación de energía, ΔE , de entalpía, ΔH , y de energía libre de Gibbs, ΔG , para las reacciones entre el *trans*-resveratrol y los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OOH}$ en fase gas

Tabla 2. ΔE , ΔH y ΔG para las reacciones del t-RV con OH y OOH siguiendo un mecanismo SET en fase gas.

	$\Delta E(\text{kcal/mol})$	$\Delta H(\text{kcal/mol})$	$\Delta G(\text{kcal/mol})$
$\text{t-RV} + \cdot\text{OH} \rightarrow [\text{t-RV}]^{+\bullet} + \text{OH}^-$	131.7	131.6	132.0
$\text{t-RV} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{t-RV}]^{+\bullet} + \text{OOH}^-$	146.9	146.8	147.0

Para ambos procesos se observa que tanto la variación de la energía como la entalpía son positivas, por tanto, son claramente endotérmicos. De manera similar, la variación de la energía libre de Gibbs, ΔG , también es positiva, lo que indica que la energía de Gibbs de los reactivos es menor (más negativa) que la de los productos. Este resultado implica que las dos reacciones no son espontáneas en fase gas. Por lo tanto, el *trans*-resveratrol no reaccionará con los radicales OH y OOH de forma espontánea por este mecanismo. Para el resto de los mecanismos, discutiremos su viabilidad en términos de la energía libre de Gibbs ya que este parámetro determina si un proceso es espontáneo a una determinada temperatura y presión.

5.1.2. Hydrogen Atom Transfer, HAT:

Como se aprecia en la **Figura 9**, en este mecanismo se produce la transferencia de un átomo de hidrógeno del *trans*-resveratrol al radical, tras la ruptura homolítica de uno de sus enlaces O-H, dando lugar a la especie radicalaria de *trans*-resveratrol, t-RV $\cdot$, que debería ser más estable que el radical hidroxilo por estar su electrón desapareado estabilizado por deslocalización. R $\cdot$ en la figura representa al radical hidroxilo o hidroperoxilo.

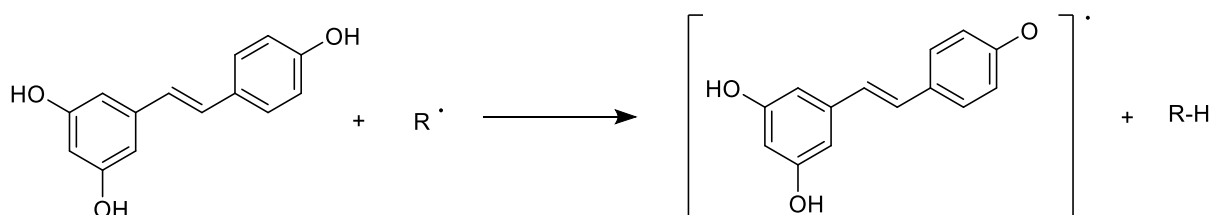


Figura 9. Reacción de transferencia de un hidrógeno (HAT) entre el *trans*-resveratrol y un radical R $\cdot$.

La sustracción del átomo de hidrógeno por parte del radical puede ocurrir en cualquiera de los tres grupos hidroxilo del *trans*-resveratrol, dando lugar a tres especies radicalarias, cuyas estructuras y energías libres de Gibbs, en kcal/mol, junto a los productos se representan en la **Figura 10**. En cada una de ellas, el electrón desapareado en el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, se puede deslocalizar por toda la estructura de la molécula. Junto con las especies radicalarias de *trans*-resveratrol, también se forman como productos de la reacción

una molécula de H₂O, en las reacciones con el radical hidroxilo, y una molécula de H₂O₂ en las que participa el radical hidroperoxilo.

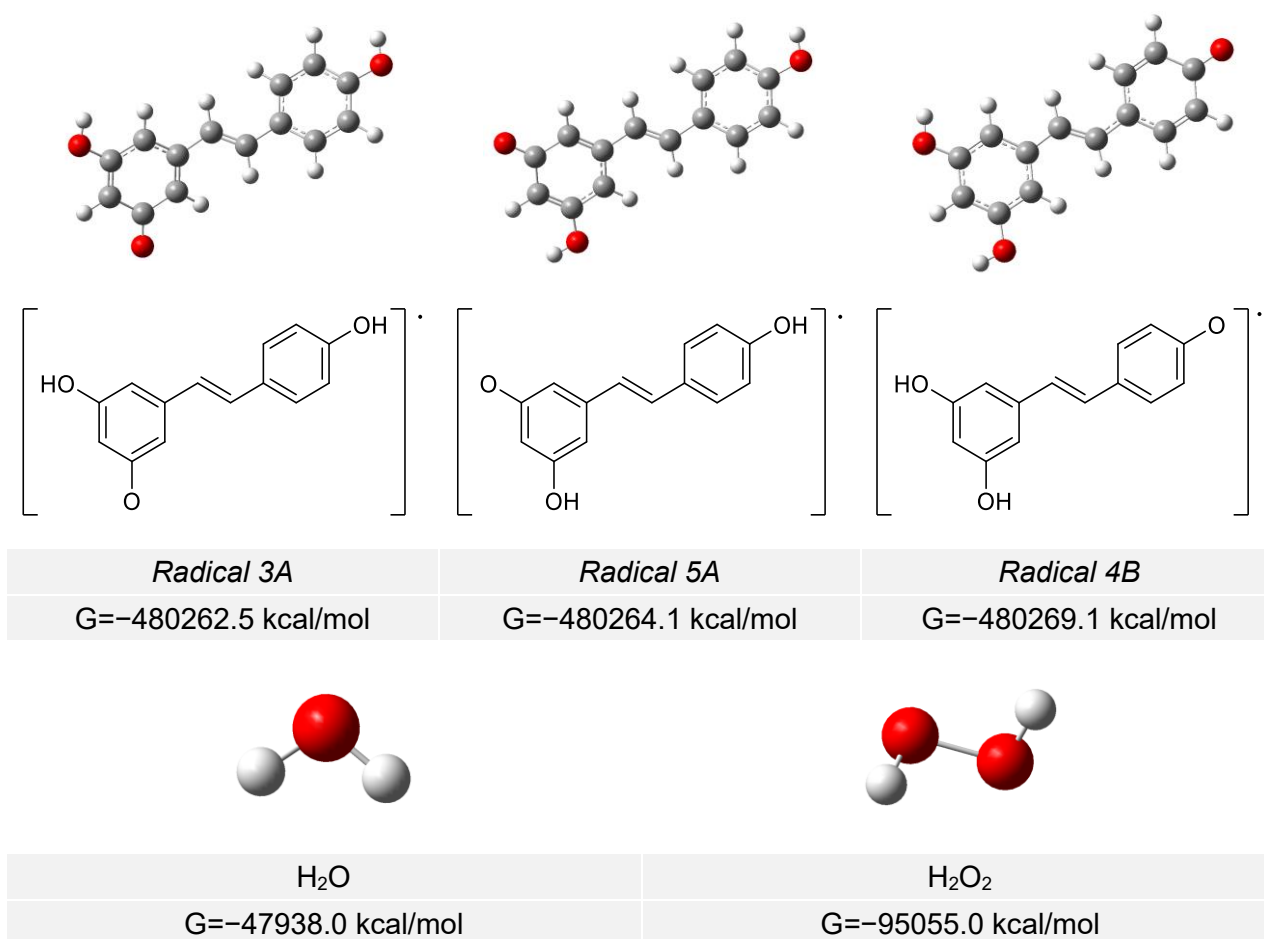


Figura 10. Productos formados en la reacción del *trans*-resveratrol con OH y OOH y su energía libre de Gibbs, en kcal/mol, siguiendo un mecanismo HAT.

La reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno desde el *trans*-resveratrol al radical OH y OOH transcurre a través de un estado de transición en el que el átomo de oxígeno terminal del radical se aproxima al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo que se va a transferir. En este estado de transición, la frecuencia de vibración imaginaria (de valor negativo) corresponde a la transferencia del átomo de H del oxígeno fenólico hacia el oxígeno del radical. En la **Figura 11** se muestra la estructura de estos estados de transición para las reacciones con ambos radicales. Las flechas en color azul indican el modo de vibración imaginario que presenta la molécula. Este modo de vibración, de frecuencia imaginaria, indica que la estructura no es un mínimo real en la superficie de energía potencial.

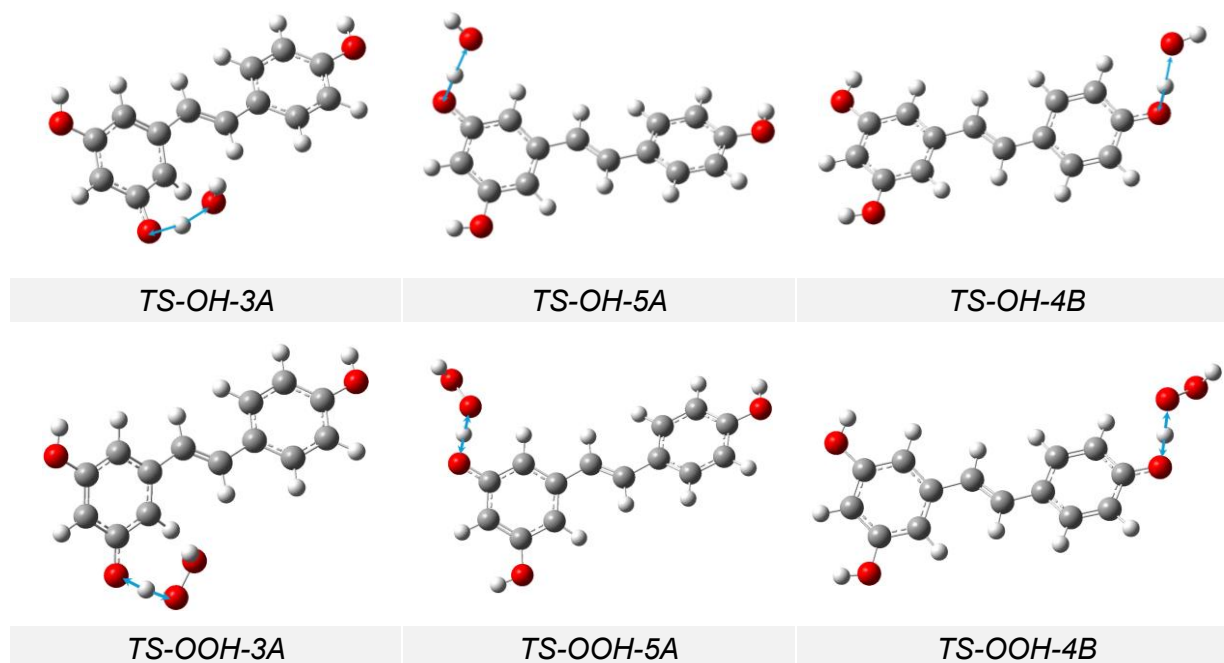


Figura 11. Estructura de los estados de transición para la reacción en fase gas entre el trans-resveratrol y el radical OOH mediante el mecanismo HAT.

Al igual que hicimos para el mecanismo SET, se evalúa la variación de la energía libre de Gibbs, ΔG , para determinar si el proceso es espontáneo para este mecanismo de reacción. Para el trans-resveratrol, existen tres posiciones reactivas, como hemos indicado, en función del átomo de H abstraído. La energía de cada proceso se obtiene de acuerdo con las ecuaciones:

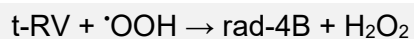
$$\Delta G = [G(rad) + G(H_2O)] - [G(t-RV) + G(OH^\cdot)] \quad [29]$$

$$\Delta G = [G(rad) + G(H_2O_2)] - [G(t-RV) + G(OOH^\cdot)] \quad [30]$$

En la **Tabla 3** se muestra la variación de la energía libre de Gibbs, ΔG , de las reacciones que siguen el mecanismo HAT en fase gas para ambos radicales y la variación de energía libre de Gibbs de activación, $\Delta G^\ddagger$. Esta se determina como la diferencia entre la energía libre de Gibbs del estado de transición menos la correspondiente a los reactivos.

Tabla 3. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para la reacción del t-RV con OH y OOH siguiendo un mecanismo HAT en fase gas.

	ΔG (kcal/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)
t-RV + $^\cdot OH \rightarrow$ rad-3A + H_2O	-27.4	4.5
t-RV + $^\cdot OH \rightarrow$ rad-5A + H_2O	-29.1	6.4
t-RV + $^\cdot OH \rightarrow$ rad-4B + H_2O	-34.0	5.0
t-RV + $^\cdot OOH \rightarrow$ rad-3A + H_2O_2	4.6	19.4
t-RV + $^\cdot OOH \rightarrow$ rad-5A + H_2O_2	2.9	21.6



-2.0

18.6

Para el radical hidroxilo, la variación de la energía libre de Gibbs es negativa, lo que indica que el proceso es favorable termodinámicamente en fase gas, especialmente cuando el hidrógeno eliminado es el del grupo hidroxilo en posición 4B, en disposición *para* respecto al resto estireno. Estos procesos llevan asociada una energía de activación entorno a las 5 kcal/mol. En cambio, en el caso del radical hidroperoxilo, las reacciones que dan lugar a las especies radicalarias 3A y 5A no son espontáneas, al ser ΔG positivo. Únicamente es favorable la formación de la especie radicalaria 4B, este proceso implica una barrera de activación de 18.6 kcal/mol. Las barreras de activación son más elevadas para el radical OOH que el OH. La posición más favorable en el *trans*-resveratrol para la transferencia de un hidrógeno es desde el OH unido al carbono 4B.

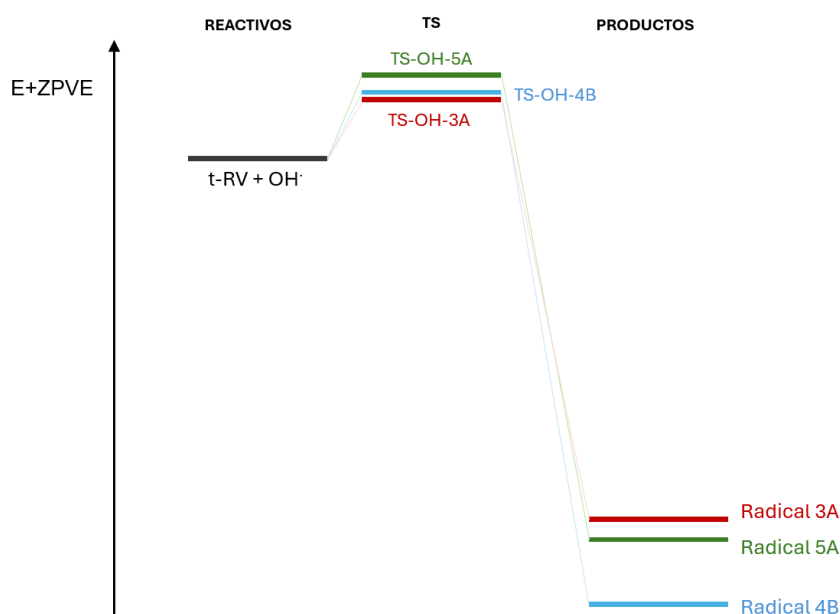


Figura 12. Diagrama energético de la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) entre el *trans*-resveratrol y el radical $\cdot\text{OH}$ en fase gas.

La **Figura 12** muestra el perfil energético de la reacción entre el *trans*-resveratrol y el radical hidroxilo en fase gas mediante el mecanismo HAT.

5.1.3. Radical Adduct Formation, RAF:

En este mecanismo de reacción, se produce la inserción del radical en uno de los dobles enlaces del *trans*-resveratrol, tanto del anillo (lo que rompe su aromaticidad) como del doble enlace, formándose un enlace con el radical y quedando un electrón desparado en producto de adición. Esto da lugar a la formación de catorce posibles aductos radicalarios (ver **Figura 13**).

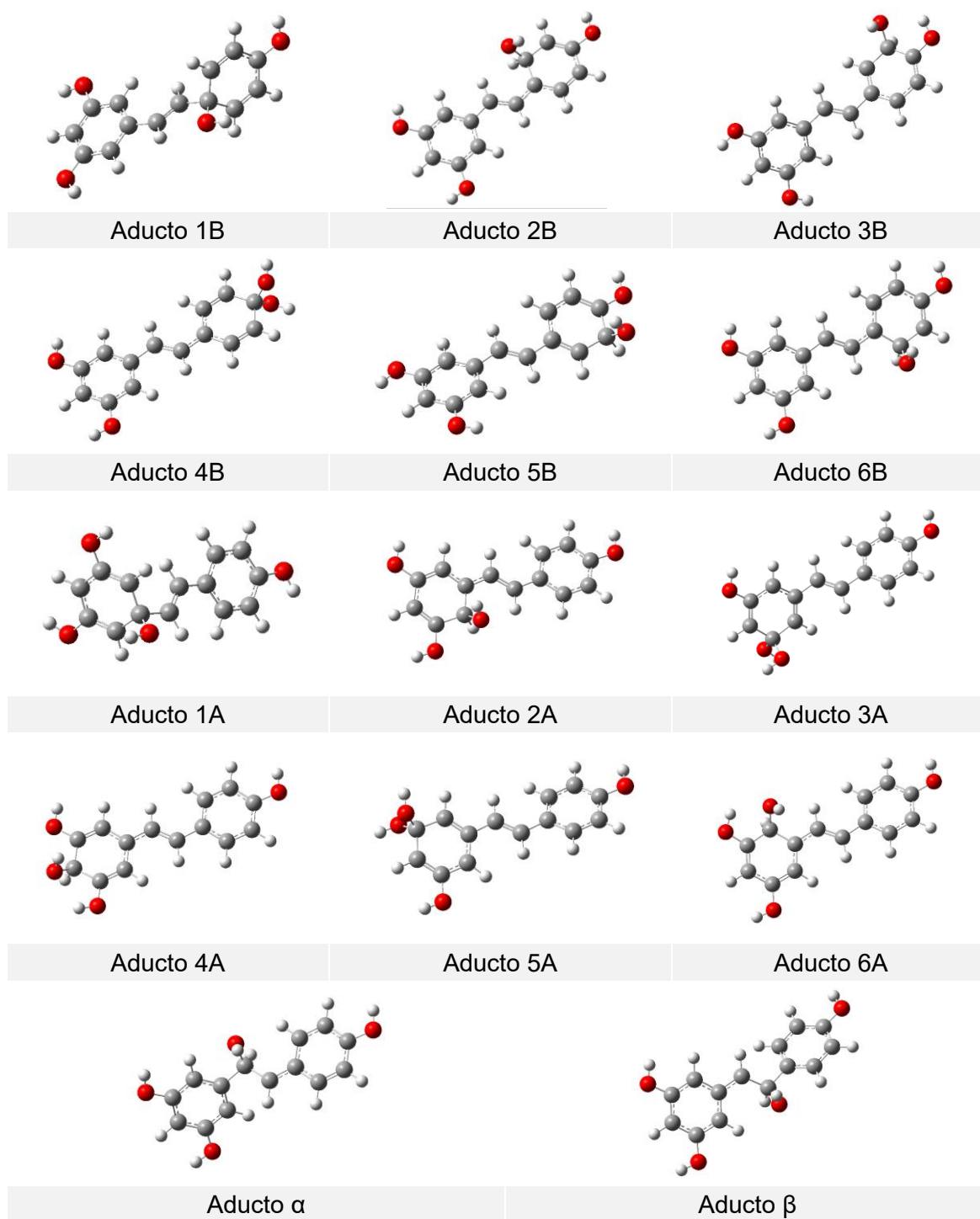
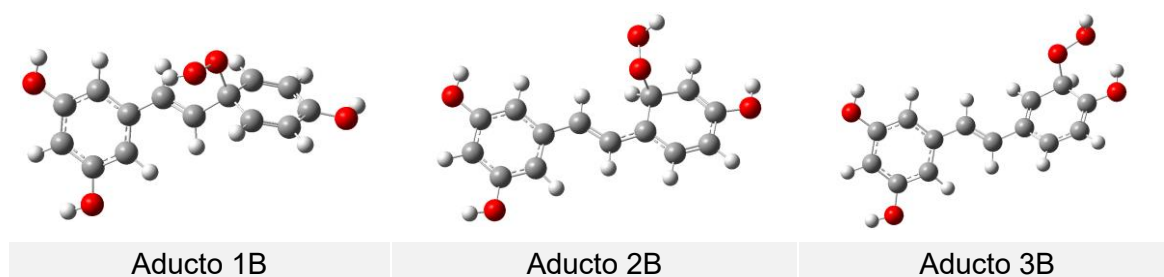


Figura 13 Estructuras de los aductos radicalarios obtenidos por adición del radical hidroxilo al *trans*-resveratrol en fase gas a través del mecanismo RAF.



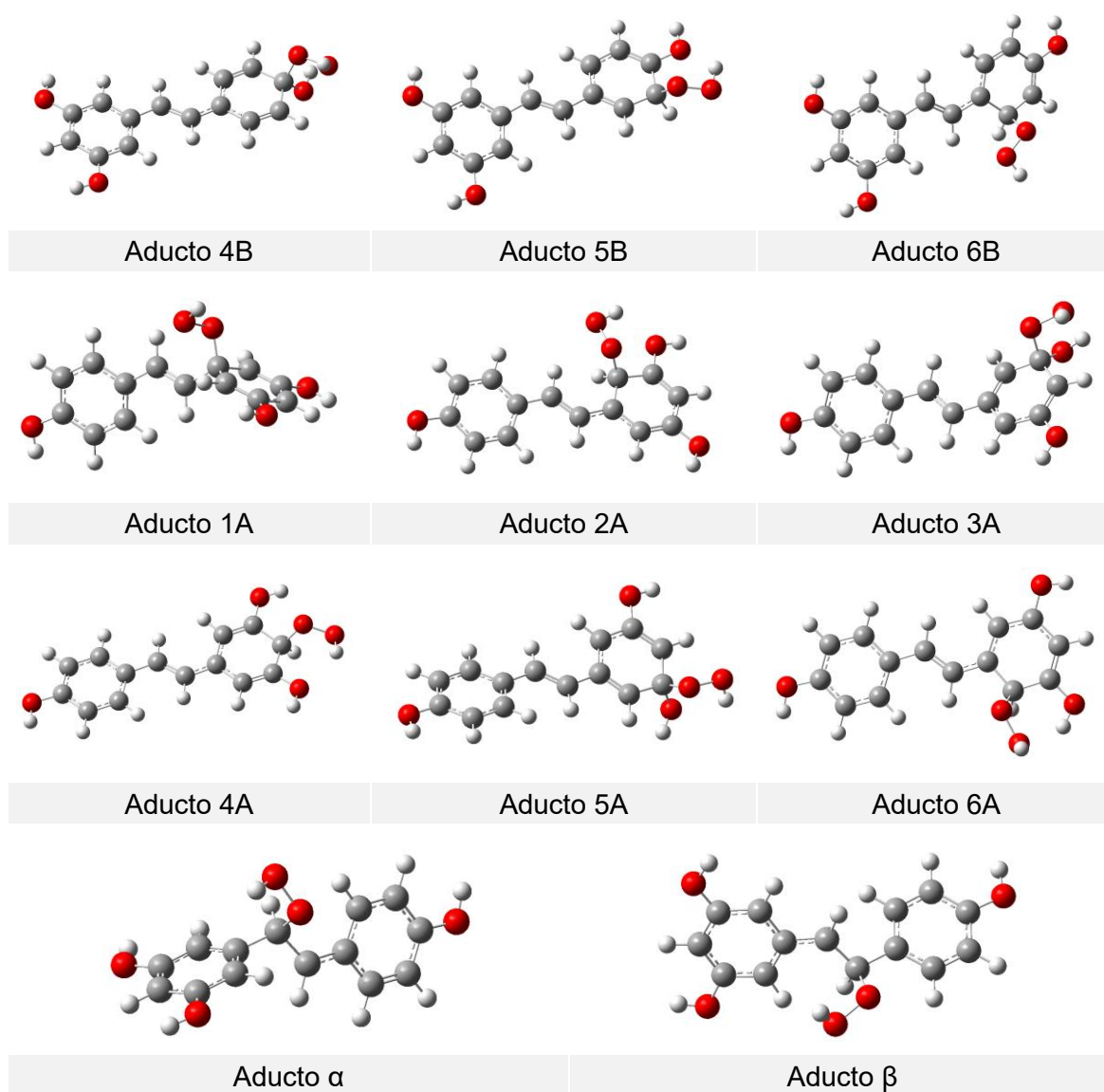
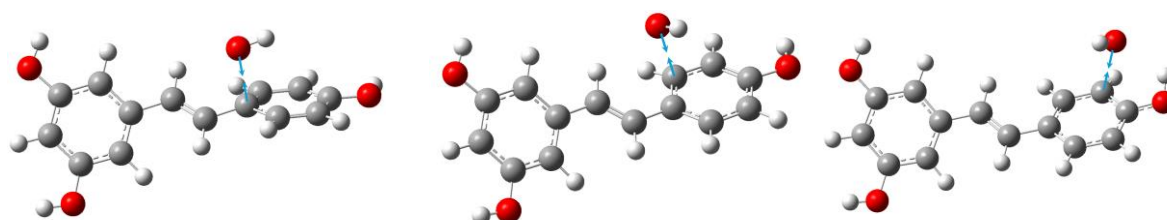


Figura 14. Estructuras de los aductos radicalarios obtenidos por adición del radical OOH al *trans*-resveratrol en fase gas a través del mecanismo RAF.

En la **Figura 13** se muestran las geometrías optimizadas de los catorce aductos que se forman por adición de OH. Las correspondientes geometrías formadas por adición del radical OOH se recogen en la **Figura 14**. Todas las adiciones radicalarias ocurren de forma similar. La inserción del radical tiene lugar a través de un estado de transición. Al formarse el aducto, el átomo de hidrógeno o los grupos -OH unidos al átomo de carbono sobre el que se produce la adición se orientan ligeramente hacia atrás para acomodar la unión del radical.



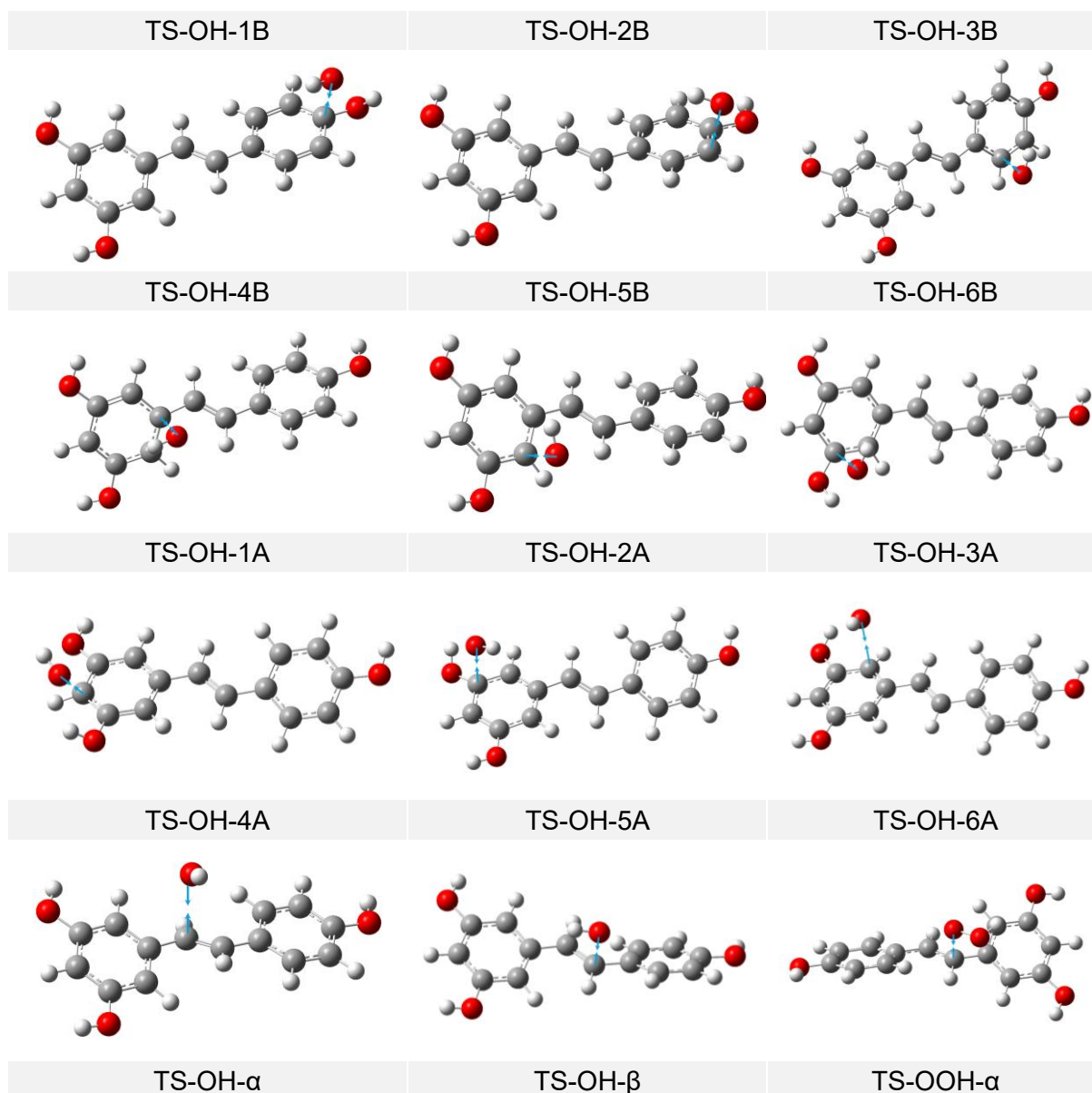


Figura 15. Estructura de los estados de transición para la reacción en fase gas entre el *t*-RV y los radicales OH y OOH mediante el mecanismo RAF

En la **Tabla 4** se pueden ver la variación de la función de Gibbs de reacción, ΔG , para el proceso de formación de los diferentes aductos entre el *trans*-resveratrol y los radicales OH y OOH. Como se aprecia, para el radical hidroxilo todas las posibles vías de reacción son exotérmicas o exergónicas, siendo las adiciones en los carbonos α y β las más favorecidas termodinámicamente: -27.4 kcal/mol y -25.5 kcal/mol, respectivamente. En cambio, ocurre lo opuesto en el caso del radical hidroperoxilo. Todos los procesos, salvo la adición en el carbono α son endergónicos, por tanto, no espontáneos.

Tabla 4. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para la formación de los aductos entre el t-RV y los radicales OH u OOH en fase gas.

	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OOH}$
	ΔG (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 1B	-7.9	21.1	0.6	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 2B	-15.5	12.3	0.7	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 3B	-12.4	15.0	1.0	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 4B	-17.8	10.2	0.4	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 5B	-9.8	16.7	0.8	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 6B	-12.0	16.3	0.6	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 1A	-4.5	24.1	0.4	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 2A	-16.4	10.1	0.9	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 3A	-8.9	18.3	0.4	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 4A	-18.8	7.9	1.0	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 5A	-10.3	16.6	0.5	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 6A	-17.5	10.6	1.0	
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto- α	-27.4	-1.3	0.8	0.4
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto- β	-25.5	1.3	0.7	

En la **Figura 15** se muestran los estados de transición para los todos los procesos espontáneos. Las flechas en color azul indican el movimiento de los átomos correspondientes a la frecuencia imaginaria. La presencia de una frecuencia imaginaria indica que las estructuras corresponden a estados de transición en la superficie de energía potencial. Las barreras de activación son muy pequeñas, en torno a 1 kcal/mol, para todos los procesos. y las barreras de activación, $\Delta G^\ddagger$, se recogen en la **Tabla 4**. Para las reacciones de formación de aducto con el radical OOH, se logró localizar el estado de transición para la posición α , pero no para el resto de las posiciones de la molécula.

5.2. Reactividad del *trans*-resveratrol en disolución acuosa

Puesto que en los sistemas biológicos el agua es el disolvente principal, el estudio teórico de estas reacciones en fase acuosa permite aproximarse de manera más realista al entorno celular y a la capacidad antioxidante del *trans*-resveratrol en los seres vivos.

Dado que las reacciones globales estudiadas (formación de aducto radicalario, transferencia de un electrón y transferencia de un átomo de hidrógeno) son idénticas tanto en fase gas como en fase condensada, y ya han sido descritas de forma general en el apartado anterior, no se detallan de nuevo aquí. Los cálculos computacionales realizados para caracterizar reactivos, productos y estados de transición se realizan de forma similar a cómo se realizaban en fase gas.

5.2.1. Single Electron Transfer, SET:

Al igual que ocurría en fase gas, se evalúa cómo de favorable es este mecanismo calculando la diferencia de energía entre reactivos y productos, empleando la ecuación [28]. En la **Tabla 5** se reflejan los valores de ΔE , ΔH y ΔG para las reacciones de SET en fase acuosa entre el *trans*-resveratrol y los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OOH}$.

Tabla 5. ΔE , ΔH y ΔG de las reacciones entre *t*-RV y los radicales OH y OOH siguiendo un mecanismo SET en fase acuosa.

	ΔE (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
$t\text{-RV} + \cdot\text{OH} \rightarrow [t\text{-RV}]^{+\cdot} + \text{OH}^-$	0.5	0.3	1.6
$t\text{-RV} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [t\text{-RV}]^{+\cdot} + \text{OOH}^-$	23.8	23.6	24.7

De manera análoga a lo que ocurría en fase gas, para ambos radicales se obtiene que las variaciones de la energía son positivas, endotérmicas. En el caso de la reacción con OH, la variación de energía es muy próxima a cero, por ello reactivos y productos estarían en una situación de casi-equilibrio. El proceso con OOH no es favorable termodinámicamente en fase acuosa, lo que sugiere que el *trans*-resveratrol, al igual que ocurría en fase gas, no reaccionará con OOH de forma espontánea en disolución acuosa.

5.2.2. Hydrogen Atom Transfer, HAT:

En este caso, al igual que en fase gas, se produce la transferencia de un átomo de hidrógeno de cualquiera de los tres grupos hidroxilo de la molécula de *trans*-resveratrol hacia el radical, dando lugar a tres posibles especies radicalarias (radical 3A, radical 4A y radical 5B) junto con una molécula de H_2O o H_2O_2 dependiendo del radical que participe en la reacción. De nuevo, para ambos radicales, la reacción transcurre a través de un estado de transición en el que el átomo de oxígeno terminal del radical se aproxima al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo que se va a transferir,

Por tanto, para cada uno de los radicales existen tres posibles reacciones, en función del átomo de hidrógeno que sea transferido. Se determina cómo de favorable es este mecanismo calculando la diferencia de energía de Gibbs entre reactivos y productos en fase acuosa de acuerdo con las ecuaciones [29] y [30].

La **Tabla 6** muestra la variación de la energía libre de Gibbs, ΔG , de las reacciones que siguen el mecanismo HAT en fase acuosa para ambos radicales y la variación de energía libre de Gibbs de activación, $\Delta G^\ddagger$.

Tabla 6. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para la reacción del t-RV con OH y OOH siguiendo un mecanismo HAT en fase acuosa.

	ΔG (kcal/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)
t-RV + $\cdot\text{OH} \rightarrow \text{rad-3A} + \text{H}_2\text{O}$	-30.4	8.9
t-RV + $\cdot\text{OH} \rightarrow \text{rad-5A} + \text{H}_2\text{O}$	-30.7	
t-RV + $\cdot\text{OH} \rightarrow \text{rad-4B} + \text{H}_2\text{O}$	-36.2	
t-RV + $\cdot\text{OOH} \rightarrow \text{rad-3A} + \text{H}_2\text{O}_2$	2.7	25.0
t-RV + $\cdot\text{OOH} \rightarrow \text{rad-5A} + \text{H}_2\text{O}_2$	2.4	
t-RV + $\cdot\text{OOH} \rightarrow \text{rad-4B} + \text{H}_2\text{O}_2$	-3.1	

La situación en fase acuosa es similar a la observada en fase gas. Para el radical hidroxilo, la variación de la energía libre de Gibbs es negativa, lo que indica un proceso termodinámicamente favorable, especialmente cuando el hidrógeno eliminado corresponde al grupo hidroxilo en posición 4B, en disposición *para* respecto al resto estireno. Por otro lado, en el caso del radical hidroperoxilo, las reacciones que conducen a las especies radicalarias 3A y 5A no son espontáneas, ya que presentan valores positivos de ΔG , siendo únicamente favorable la formación de la especie radicalaria 4B. Para los dos radicales, no se han logrado obtener los estados de transición en las posiciones 5A y 4B, lo que indica que la transferencia de hidrógeno en esas posiciones ocurre de forma directa, sin barrera de activación.

Por lo tanto, la posición más favorable en el *trans*-resveratrol para la transferencia de un hidrógeno es desde el OH unido al carbono 4B.

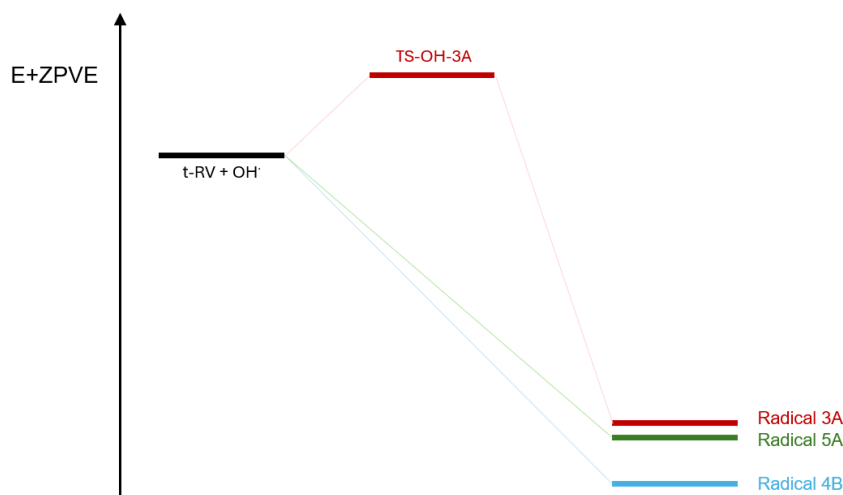


Figura 16. Diagrama energético de la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) entre el *trans*-resveratrol y el radical $\cdot\text{OH}$ en fase acuosa.

5.2.3. Radical Adduct Formation, RAF:

En el mecanismo de formación de aducto radicalario, de forma análoga a lo que se obtenía en este mecanismo en fase gas y en H_2O , para el radical hidroxilo todas las posibles

vías de reacción son exotérmicas, siendo la formación de los aductos en los carbonos α y β las vías más favorecidas termodinámicamente: -23.5 kcal/mol y -22.1 kcal/mol respectivamente. En cambio, ocurre lo opuesto en el caso del radical hidroperoxilo. Ninguno de los aductos radicalarios está favorecido termodinámicamente, todas las reacciones de formación de aductos son endotérmicas.

Tabla 7. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para las reacciones entre t-RV y los radicales OH y OOH según el mecanismo RAF en fase acuosa.

	$\cdot\text{OH}$ ΔG (kcal/mol)	$\cdot\text{OOH}$ ΔG (kcal/mol)	$\cdot\text{OH}$ $\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 1B	-3.8	24.3	9.6
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 2B	-11.0	15.5	8.2
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 3B	-7.0	21.6	8.3
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 4B	-15.4	12.9	7.3
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 5B	-17.6	20.0	8.2
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 6B	-9.5	18.5	8.7
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 1A	-0.8	25.5	13.7
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 2A	-14.2	13.3	12.9
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 3A	-7.3	20.6	11.3
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 4A	-14.8	13.2	8.1
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 5A	-8.0	20.3	10.9
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 6A	-11.7	15.5	13.0
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto- α	-23.5	3.3	4.9
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto- β	-22.1	4.2	5.1

Para los procesos espontáneos (reacción con OH) se han caracterizado los estados de transición y se han determinado las barreras de activación que se recogen en la **Tabla 7**. Las adiciones más favorables desde el punto de vista termodinámico, aducto α y β , son también las que presentan menores energías de activación, por tanto, también serán las más favorables desde el punto de vista cinético.

5.3. Reactividad del *trans*-resveratrol en CCl_4

Tras analizar la capacidad antioxidante del *trans*-resveratrol frente a radicales tanto en fase gas como en agua, resulta de especial interés estudiar su comportamiento en un entorno orgánico apolar, como el proporcionado por el tetracloruro de carbono, CCl_4 . El estudio en este tipo de disolventes puede ofrecer información valiosa sobre cómo influye la polaridad del medio en los mecanismos de reacción y en la eficiencia en la neutralización de radicales libres. El tetracloruro de carbono es un disolvente idóneo para este propósito, pues su elevada apolaridad permitiría obtener los parámetros termodinámicos de las reacciones de captación

de radicales en ausencia de interacciones intermoleculares fuertes como enlaces de hidrógeno.

Además, cabe destacar que el tetracloruro de carbono es un disolvente orgánico altamente tóxico y peligroso para la salud y el medio ambiente, por lo que la realización de este estudio de forma teórica y computacional permite obtener una primera aproximación al comportamiento del *trans*-resveratrol como antioxidante en medios apolares sin necesidad de trabajar directamente con él, eliminando los riesgos a los que se enfrentaría el experimentador.

5.3.1. Single Electron Transfer, SET:

Al igual que ocurría en fase gas, se evalúa cómo de favorable es este mecanismo calculando la diferencia de energía entre reactivos y productos, empleando la ecuación [28]. En la **Tabla 8** se reflejan los valores de ΔE , ΔH y ΔG para las reacciones del mecanismo SET en tetracloruro de carbono entre el *trans*-resveratrol y los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OOH}$.

Tabla 8. ΔE , ΔH y ΔG de las reacciones entre *t*-RV y los radicales OH y OOH siguiendo un mecanismo SET en CCl_4 .

	ΔE (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
$t\text{-RV} + \cdot\text{OH} \rightarrow [t\text{-RV}]^{+\cdot} + \text{OH}^-$	71.3	70.9	72.6
$t\text{-RV} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [t\text{-RV}]^{+\cdot} + \text{OOH}^-$	90.1	89.8	91.2

De manera similar a lo que ocurría en fase gas y en fase acuosa, para ambos radicales se obtiene que las variaciones de la energía son positivas, endotérmicas. Los valores obtenidos son intermedios entre los de fase gas y acuosa. Por tanto, el mecanismo SET no es un proceso espontáneo en CCl_4 .

5.3.2. Hydrogen Atom Transfer, HAT:

De forma análoga a lo que ocurría en fase gas y en fase acuosa, se puede producir la transferencia de un átomo de hidrógeno de cualquiera de los tres grupos hidroxilo de la molécula de *trans*-resveratrol hacia el radical, dando lugar a tres posibles especies radicalarias (radical 3A, radical 4A y radical 5B) junto con una molécula de H_2O o H_2O_2 dependiendo del radical que participe en la reacción. Para ambos radicales, la reacción podría implicar un estado de transición en el que el átomo de oxígeno terminal del radical se aproxima al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo que se va a transferir.

La **Tabla 9** muestra la variación de la energía libre de Gibbs, ΔG , de las tres posibles reacciones que siguen el mecanismo HAT en tetracloruro de carbono para ambos radicales y

la variación de energía libre de Gibbs de activación, $\Delta G^\ddagger$, obtenidas de acuerdo con las ecuaciones [29] y [30].

Tabla 9. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para la reacción del t-RV con OH y OOH siguiendo un mecanismo HAT en CCl₄.

	ΔG (kcal/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)
t-RV + $\cdot\text{OH} \rightarrow \text{rad-3A} + \text{H}_2\text{O}$	-28.7	8.8
t-RV + $\cdot\text{OH} \rightarrow \text{rad-5A} + \text{H}_2\text{O}$	-30.2	7.5
t-RV + $\cdot\text{OH} \rightarrow \text{rad-4B} + \text{H}_2\text{O}$	-34.5	
t-RV + $\cdot\text{OOH} \rightarrow \text{rad-3A} + \text{H}_2\text{O}_2$	4.0	21.1
t-RV + $\cdot\text{OOH} \rightarrow \text{rad-5A} + \text{H}_2\text{O}_2$	2.6	23.5
t-RV + $\cdot\text{OOH} \rightarrow \text{rad-4B} + \text{H}_2\text{O}_2$	-1.8	20.0

Para el radical hidroxilo, la situación en este disolvente es similar a la observada en fase gas y acuosa. La variación de la energía libre de Gibbs es negativa para las tres reacciones, lo que indica un proceso termodinámicamente favorable, especialmente cuando el hidrógeno eliminado corresponde al grupo hidroxilo en posición 4B, en disposición *para* respecto al resto estireno. No se ha localizado estado de transición para el proceso de transferencia de un hidrógeno desde la posición 4B, lo que indica que transcurre sin barrera de activación, de forma directa.

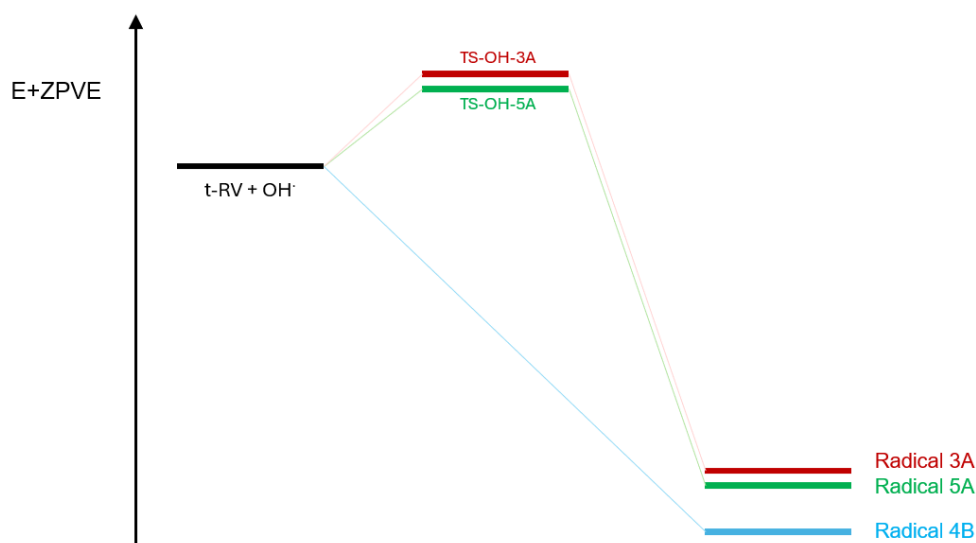


Figura 17. Diagrama energético de la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) entre el *trans*-resveratrol y el radical $\cdot\text{OH}$ en tetracloruro de carbono.

En la **Figura 17** se aprecia el perfil energético para la reacción de transferencia de hidrógeno entre el *trans*-resveratrol y el radical hidroxilo. El orden de estabilidad de los productos es idéntico al que se obtiene en fase gas y en agua. En este caso, la obtención del radical 4B ocurre sin barrera de activación, de forma directa.

Por otro lado, para el radical hidroperoxilo sólo la eliminación del hidrógeno del OH unido al carbono en la posición 4B es un proceso espontáneo. Se han localizado los correspondientes estados de transición, que nos han permitido determinar las barreras de activación. Como puede verse, la eliminación del hidrógeno en posición 4B es la que presenta menor barrera de activación en la reacción con OOH, esta posición no presenta barrera de activación cuando el radical es el OH. Esta posición es la más favorable para ambos radicales en disolución de CCl₄.

5.3.3. Radical Adduct Formation, RAF:

En el mecanismo de formación de aducto radicalario, de forma análoga a lo que se obtenía en este mecanismo en fase gas y en medio acuoso, para el radical hidroxilo todas las posibles vías de reacción son exotérmicas, siendo la formación de los aductos en los carbonos α y β las vías más favorecidas termodinámicamente: -24.9 kcal/mol y -23.5 kcal/mol respectivamente. En cambio, para el radical hidroperoxilo todos los procesos son no espontáneos ($\Delta G > 0$), ninguno de los aductos radicalarios está favorecido termodinámicamente.

Tabla 10. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para las reacciones entre t-RV y los radicales OH y OOH según el mecanismo RAF en CCl₄.

	$\cdot\text{OH}$ ΔG (kcal/mol)	$\cdot\text{OOH}$ ΔG (kcal/mol)	$\cdot\text{OH}$ $\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 1B	-6.0	23.7	12.4
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 2B	-12.7	14.5	8.5
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 3B	-10.0	17.9	7.7
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 4B	-15.6	12.6	8.4
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 5B	-8.0	18.5	9.9
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 6B	-9.8	18.2	10.2
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 1A	-1.9	25.0	15.8
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 2A	-14.9	12.1	6.4
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 3A	-7.2	20.0	11.6
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 4A	-16.5	10.9	5.9
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 5A	-8.8	18.5	10.9
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto 6A	-15.0	12.6	4.3
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto α	-24.9	1.0	5.1
t-RV + $\cdot\text{R} \rightarrow$ aducto β	-23.5	3.1	6.7

Para los procesos espontáneos (reacción con OH) se han caracterizado los estados de transición y se han determinado las barreras de activación, que se recogen en la **Tabla 10**. Las adiciones más favorables desde el punto de vista termodinámico, aducto α y β , son

también las que presentan menores energías de activación (1 kcal/mol y 3.1 kcal/mol), por tanto, también serán las más favorables desde el punto de vista cinético.

5.4. Comparación de la reactividad de *trans*-resveratrol en fase gas, acuosa y en tetracloruro de carbono.

Hemos visto que el mecanismo de transferencia de un electrón, **SET**, desde el *trans*-resveratrol a los radicales OH y OOH en todas las fases es un proceso endotérmico. Puede observarse que los valores más positivos de energías de reacción se obtienen para la fase gas, debido a la inestabilidad de los iones en dicha fase. Los valores más bajos se obtienen para el disolvente más polar, H₂O, que es capaz de estabilizar los iones formados por solvatación. El tetracloruro de carbono es una situación intermedia. En conclusión, nuestros resultados muestran que el *trans*-resveratrol no reacciona con los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OOH}$ mediante el mecanismo SET en ninguna de las fases estudiadas.

Para el mecanismo de transferencia de un hidrógeno, **HAT**, donde el hidrógeno que se transfiere es el correspondiente a los grupos hidroxilos, las reacciones son claramente espontáneas cuando el radical es hidroxilo, independientemente del medio. En cambio, para el radical OOH, la reacción de transferencia de hidrógeno sólo es un proceso espontáneo cuando se produce desde el OH unido al carbono en posición 4B. Este mismo grupo OH es el que corresponde a la vía más exotérmica con el radical OH.

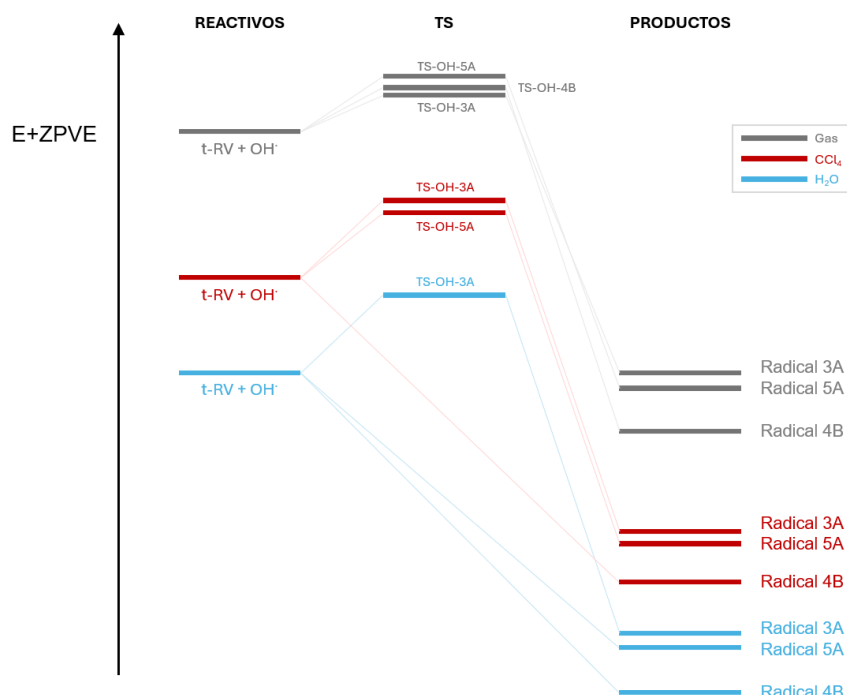


Figura 18. Diagrama energético para las reacciones de transferencia de un hidrógeno (HAT) entre el *trans*-resveratrol y $\cdot\text{OH}$ en fase gas, en H₂O y CCl₄.

La **Figura 18** muestra el diagrama energético que resume las reacciones de transferencia de hidrógeno, HAT, entre el radical hidroxilo y el *trans*-resveratrol en las 3 fases estudiadas (en todas las fases las energías son relativas t-RV + $\cdot$ OH). Se aprecia como la energía de reactivos, estados de transición y productos depende fuertemente del medio de reacción. La mayor estabilización se logra en agua, mientras que en fase gas las especies presentan mayor energía y están menos estabilizadas. El agua, al ser un disolvente polar, solvata y estabiliza fuertemente a las especies polares y radicalarias implicadas. Estas variaciones se deben a ΔG_s^0 en las fases condensadas.

El orden de estabilidad de los radicales que se obtienen como productos es el mismo en todas las fases: la posición más favorable en el *trans*-resveratrol para la transferencia de un hidrógeno es desde el OH unido al carbono 4B, seguido de las posiciones 5A y 3A. La reacción en esta posición transcurre sin barrera de activación en las fases condensadas, agua y tetracloruro de carbono).

Por tanto, podemos concluir que la reacción de transferencia de hidrógeno desde el *trans*-resveratrol es más eficiente cuando tiene lugar desde el OH unido al carbono 4B, para ambos radicales y en las tres fases consideradas.

Para el mecanismo de formación de un aducto radicalario, **RAF**, en el que se produce la inserción del radical en cualquiera de los átomos de carbono del *trans*-resveratrol, las reacciones son espontáneas cuando el radical es hidroxilo, independientemente de la fase y la posición de inserción. Los procesos más favorecidos termodinámicamente son aquellos que dan lugar a los aductos en posiciones α y β , que además presentan las menores barreras de activación, por lo que también serán los procesos más favorables desde el punto de vista cinético. Por el contrario, para el radical OOH la formación de aductos radicalarios es desfavorable en todas las fases estudiadas, a excepción de la reacción que da lugar al aducto en posición α en fase gas, cuya energía de reacción es -1.3 kcal/mol, próxima a cero, lo que sugiere que se alcanzará una situación cercana al equilibrio.

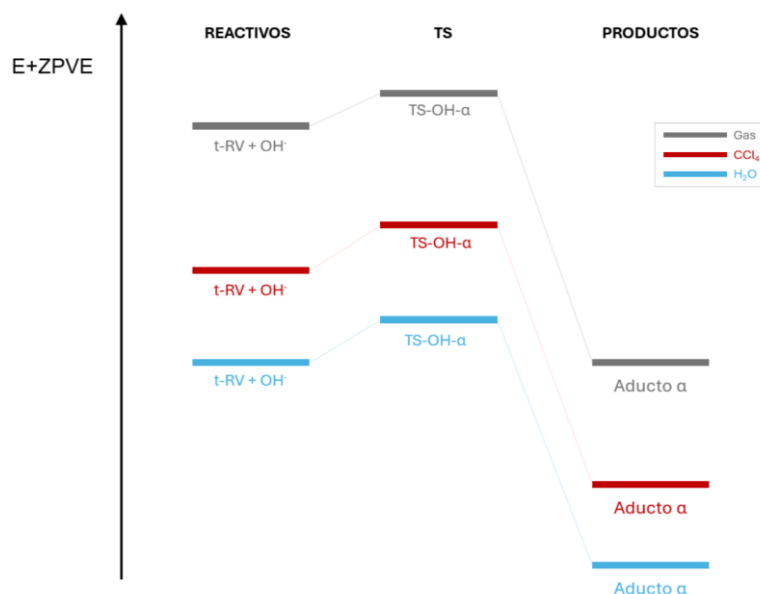


Figura 19. Diagrama energético para la reacción de formación del aducto en posición α según el mecanismo RAF por reacción entre *trans*-resveratrol y $\cdot\text{OH}$ en fase gas, en H_2O y en CCl_4 .

La **Figura 19** muestra el diagrama energético que resume las reacciones de formación de aducto radicalario, RAF, entre el radical hidroxilo y el *trans*-resveratrol en las 3 fases estudiadas. Se ha optado por representar la reacción de inserción más favorable, aquella en la que el radical hidroxilo se une al carbono α de la estructura. Se observa como la mayor estabilización de reactivos, productos y estados de transición se logra en agua, mientras que en fase gas las especies presentan mayor energía y están menos estabilizadas. Al igual que ocurría en el mecanismo HAT, el H_2O estabiliza las especies implicadas por efecto de los enlaces de hidrógeno y la solvatación. El tetracloruro de carbono es una situación intermedia entre la fase gas y la acuosa, pues estabiliza las especies por interacciones intermoleculares más débiles que las del agua, como interacciones dipolo instantáneo-dipolo inducido. La barrera energética es prácticamente idéntica en los tres medios. Tampoco se producen variaciones significativas en la energía libre de reacción al cambiar de fase.

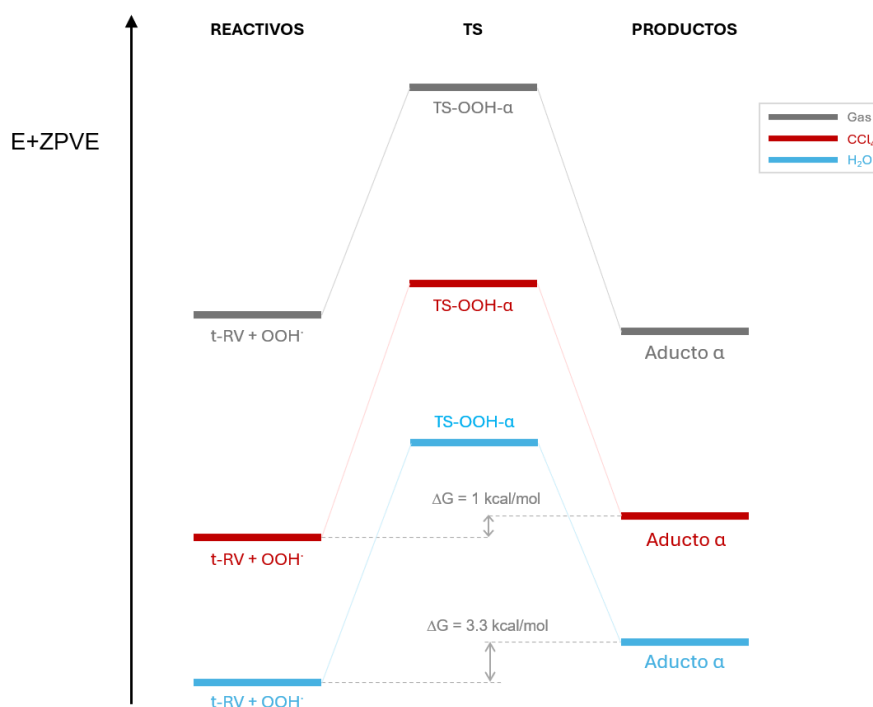


Figura 20. Diagrama energético para la reacción de formación del aducto en posición α según el mecanismo RAF por reacción entre *trans*-resveratrol y $\cdot\text{OOH}$ en fase gas, en H_2O y en CCl_4 .

La **Figura 20** muestra el diagrama energético de las reacciones de formación de aducto radicalario en posición α entre el radical OOH y el *trans*-resveratrol en las 3 fases estudiadas. Aunque las especies involucradas están más estabilizadas en fase acuosa y en CCl_4 que en fase gas, por los motivos expuestos antes, solamente la inserción en fase gas es ligeramente exotérmica.

Podemos resumir que el mecanismo SET es el más afectado por el tipo de fase, para los mecanismos HAT y RAF los resultados son bastante similares en las tres fases.

5.5. Análisis de la reactividad del *trans*-resveratrol

En este apartado vamos a analizar la reactividad del *trans*-resveratrol a partir de diferentes índices de reactividad, para intentar explicar los resultados obtenidos en los apartados anteriores.

Tabla 11. Índices de reactividad químicos para el *trans*-resveratrol usando las ecuaciones de la DFT Conceptual en fase gas, acuosa y en CCl_4 .

	η (eV)	χ (eV)	μ (eV)	ω (eV)	PI (eV)	AE (eV)	ϵ_{HOMO} (eV)	ϵ_{LUMO} (eV)
Gas	0.10974	0.14748	-0.14748	0.0991	0.25722	0.03774	-0.25722	-0.03774
H_2O	0.10816	0.14751	-0.14751	0.10059	0.25567	0.03935	-0.25567	-0.03935
CCl_4	0.10901	0.14728	-0.14728	0.09949	0.25629	0.03827	-0.25629	-0.03827

Como se mencionó en el apartado 4.3, la dureza total, η , se define como la resistencia de una especie química a cambiar su número de electrones; es decir, su resistencia a aceptar o donar electrones, los valores obtenidos para el *trans*-resveratrol se muestran en la **Tabla 11** y se han calculado para las tres fases empleando la ecuación [9]. La dureza es mayor en fase gas (0.10974 eV) y ligeramente menor en CCl₄ y H₂O, donde alcanza su menor valor, 0.10816. Una menor η implica menor resistencia a ganar o perder electrones, luego el mecanismo SET del *trans*-resveratrol es más favorable en disolución, especialmente en agua, que en fase gas. Estos resultados están en concordancia con los del potencial de ionización y afinidad electrónica. El PI más elevado es el de fase gas, mientras que en fase acuosa se obtiene el menor valor, lo que indica que, en agua, el *trans*-resveratrol requiere menor energía para ceder electrones. La situación en CCl₄ es intermedia entre la fase gas y la acuosa. Análogamente, el valor más elevado de AE se obtiene en fase acuosa. Relacionado con la AE, el índice de electrofilicidad, ω , es ligeramente mayor en agua (0.10059 eV), lo que indica que el *trans*-resveratrol es más proclive a aceptar electrones en este medio, seguido del CCl₄ y la fase gas.

Los valores de ϵ_{HOMO} y ϵ_{LUMO} son opuestos a los de PI y AE. El mayor valor de ϵ_{HOMO} se obtiene en medio acuoso, lo que sugiere que la capacidad donadora de electrones es mejor en este medio. El valor más bajo de ϵ_{LUMO} también se obtiene en agua, por lo que la captación de electrones también es más favorable en agua. Además, el gap HOMO-LUMO es menor en agua, lo que se traduce en una mayor reactividad química del *trans*-resveratrol en este medio. Esto queda reflejado en los resultados obtenidos en el mecanismo SET.

La electronegatividad, χ , es prácticamente idéntica en los tres medios, aunque es ligeramente más elevada en agua. Es probable que el agua permita una distribución de cargas más asimétrica en la molécula, aunque la influencia del medio es mínima. Esto se puede apreciar también en la **Figura 21**, que representa la superficie de potencial electrostático en las tres fases. Se observa como la ESP es prácticamente idéntica en los tres medios. Las zonas en color azul (signo positivo del potencial electrostático) representan las regiones con menor densidad electrónica en la molécula (los H de los grupos hidroxilo) e indican las regiones donde es más favorable la reacción de un nucleófilo. Las regiones rojizas corresponden a las zonas con mayor densidad electrónica (potencial electrostático negativo), en este caso los anillos aromáticos y la región de los oxígenos. Corresponden a las regiones donde es más favorable el ataque de un electrófilo. También nos da información sobre la polaridad de los enlaces, un cambio de color entre los átomos que forman el enlace indica polaridad de este. En este caso se observa en los enlaces O-H, donde el oxígeno tiene color rojo y el hidrógeno azul.

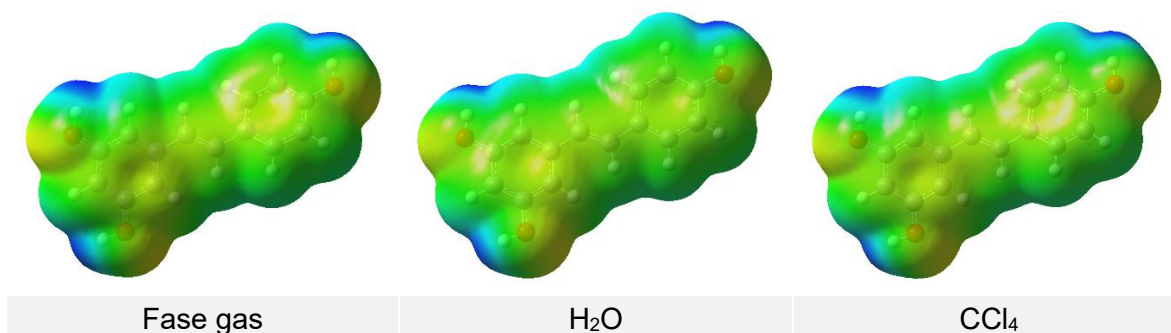


Figura 21. Superficie de potencial electrostático (ESP) para el *trans*-resveratrol en fase gas, H₂O y CCl₄.

El potencial químico, μ , se relaciona con la electronegatividad de acuerdo con la ecuación [8], y cuantifica la tendencia de un electrón a “escapar” de un sistema en equilibrio. Los valores negativos de μ que obtenemos en las tres fases, indican que el sistema tiende a ceder electrones más que aceptarlos, especialmente en medio acuoso. En el mecanismo HAT, se produce la transferencia de un átomo de hidrógeno, por ello la viabilidad de este mecanismo está directamente relacionada con la energía del enlace que se rompe en el *trans*-resveratrol. Las energías de los enlaces O-H son del orden de 70-80 kcal/mol y las de los enlaces C-H varían entre 100-110 kcal/mol¹⁹. Por ello, la transferencia de hidrógeno se produce desde el hidrógeno de los grupos OH. La posición más favorable es la del OH unido al carbono 4B que el que menor energía de enlace tiene. Las energías de enlace no cambian significativamente con la fase y por tanto este mecanismo es similar en las tres fases.

Se muestran a continuación las funciones de Fukui f^0 obtenidas para el *trans*-resveratrol en fase gas, fase acuosa y en tetracloruro de carbono. Estas funciones permiten determinar las zonas en las que atacan preferentemente los reactivos radicalarios (f^0) en las diferentes regiones de la molécula.

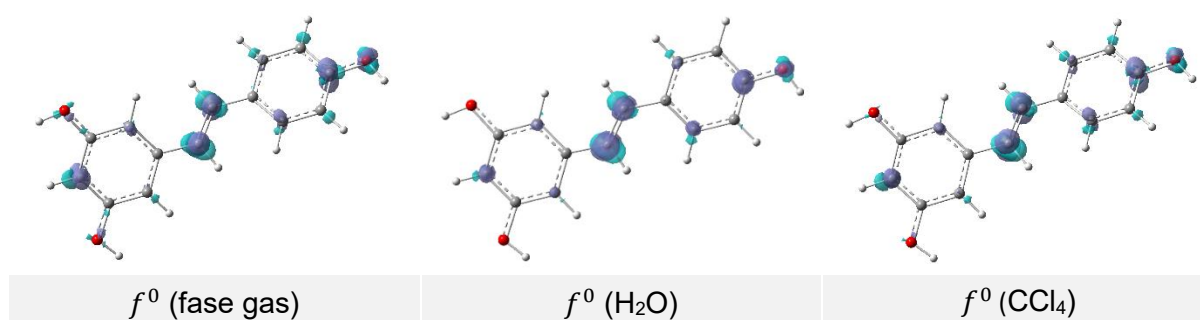


Figura 22. Funciones de Fukui f^0 para el *trans*-resveratrol en fase gas, fase acuosa y en CCl₄.

En las funciones f^0 se aprecia claramente como la zona de ataque preferente de los reactivos radicalarios son los carbonos α y β , los carbonos del doble enlace y, en menor medida, el carbono 4B. Este resultado está en concordancia con los valores obtenidos para las tres fases en el mecanismo RAF, ya que las reacciones más favorecidas eran aquellas en las que

la inserción del radical se producía en las posiciones α y β , seguida de la posición 4B. Como puede observarse, estas funciones no varían significativamente de una fase a otra, de acuerdo con los resultados obtenidos para el mecanismo RAF.

6. Conclusiones

En este TFM hemos realizado un estudio computacional a nivel M08HX/6-31++G(d,p) de la reactividad del *trans*-resveratrol con los radicales OH y OOH. El estudio se ha llevado a cabo en fase gas y en disoluciones acuosa y de tetracloruro de carbono. Los resultados obtenidos se han discutido en base a diferentes índices de reactividad basados en la teoría conceptual del DFT. De acuerdo con lo expuesto en esta memoria, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El *trans*-resveratrol no reacciona con los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OOH}$ mediante el mecanismo SET en ninguna de las fases estudiadas.
- Para el mecanismo de transferencia de un hidrógeno, HAT, las reacciones son claramente espontáneas cuando el radical es hidroxilo, siendo la posición más favorable la del OH unido al carbono 4B, seguido de los unidos en posiciones 5A y 3A. En cambio, para el radical OOH, la reacción HAT solo es espontánea cuando se produce desde el OH unido al carbono en posición 4B.
- En el mecanismo de formación de un aducto radicalario, RAF, las reacciones son espontáneas cuando el radical es hidroxilo, independientemente de la fase y la posición de inserción, siendo las posiciones α y β las más favorecidas termodinámicamente y cinéticamente. En el caso del radical OOH la formación de aductos radicalarios es desfavorable en todas las fases, a excepción de la reacción que da lugar al aducto α en fase gas. Los índices de reactividad química que proporciona la teoría conceptual DFT han servido para explicar el comportamiento reactivo del *trans*-resveratrol. La dureza total y los valores de los potenciales de ionización indican que el mecanismo SET es más favorable en fase gas. Las energías de enlace explican que la transferencia de hidrógeno desde los grupos OH es más favorable que desde los C-H. Las funciones de Fukui nos indican las posiciones donde el ataque de los radicales en el mecanismo RAF es más factible.
- El mecanismo que más que más variaciones experimenta al cambiar fase es el SET.

7. Lista de figuras y tablas

Figura 1. Algunos antioxidantes fenólicos presentes en la dieta humana.	6
Figura 2. Vitis vinifera.	8
Figura 3. Estructura del trans- y cis-resveratrol (3,4',5 trihidroxiestilbeno).	8
Figura 4. Biosíntesis por vía enzimática del trans-resveratrol.	9
Figura 5. Trans-resveratrol como molécula precursora.	10
Figura 6. Estructura numerada del trans-resveratrol.	22
Figura 7. Reacción de transferencia de un electrón (SET) entre el trans-resveratrol y un radical.	24
Figura 8. Estructura y energía libre de Gibbs, en kcal/mol , de reactivos y productos del mecanismo SET en fase gas.	24
Figura 9. Reacción de transferencia de un hidrógeno (HAT) entre el trans-resveratrol y un radical R [•]	25
Figura 10. Productos formados en la reacción del trans-resveratrol con OH y OOH y su energía libre de Gibbs, en kcal/mol, siguiendo un mecanismo HAT.	26
Figura 11. Estructura de los estados de transición para la reacción en fase gas entre el trans-resveratrol y el radical OOH mediante el mecanismo HAT.	27
Figura 12. Diagrama energético de la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) entre el trans-resveratrol y el radical [•] OH en fase gas.	28
Figura 13 Estructuras de los aductos radicalarios obtenidos por adición del radical hidroxilo al trans-resveratrol en fase gas a través del mecanismo RAF.	29
Figura 14. Estructuras de los aductos radicalarios obtenidos por adición del radical OOH al trans-resveratrol en fase gas a través del mecanismo RAF.	30
Figura 15. Estructura de los estados de transición para la reacción en fase gas entre el t-RV y los radicales OH y OOH mediante el mecanismo RAF.	31
Figura 16. Diagrama energético de la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) entre el trans-resveratrol y el radical [•] OH en fase acuosa.	34
Figura 17. Diagrama energético de la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) entre el trans-resveratrol y el radical [•] OH en tetracloruro de carbono.	37
Figura 18. Diagrama energético para las reacciones de transferencia de un hidrógeno (HAT) entre el trans-resveratrol y [•] OH en fase gas, en H ₂ O y CCl ₄	39
Figura 19. Diagrama energético para la reacción de formación del aducto en posición α según el mecanismo RAF por reacción entre trans-resveratrol y [•] OH en fase gas, en H ₂ O y en CCl ₄	41
Figura 20. Diagrama energético para la reacción de formación del aducto en posición α según el mecanismo RAF por reacción entre trans-resveratrol y [•] OOH en fase gas, en H ₂ O y en CCl ₄	42
Figura 21. Superficie de potencial electrostático (ESP) para el trans-resveratrol en fase gas, H ₂ O y CCl ₄	44
Figura 22. Funciones de Fukui <i>f</i> ₀ para el trans-resveratrol en fase gas, fase acuosa y en CCl ₄	44
Tabla 1. Variación de energía y energía libre de Gibbs, en kcal/mol , de reacción a los tres niveles de cálculo, en kcal/mol.	23

Tabla 2. ΔE , ΔH y ΔG para las reacciones del t-RV con OH y OOH siguiendo un mecanismo SET en fase gas.	25
Tabla 3. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para la reacción del t-RV con OH y OOH siguiendo un mecanismo HAT en fase gas.	27
Tabla 4. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para la formación de los aductos entre el t-RV y los radicales OH u OOH en fase gas.	32
Tabla 5. ΔE , ΔH y ΔG de las reacciones entre t-RV y los radicales OH y OOH siguiendo un mecanismo SET en fase acuosa.	33
Tabla 6. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para la reacción del t-RV con OH y OOH siguiendo un mecanismo HAT en fase acuosa.	34
Tabla 7. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para las reacciones entre t-RV y los radicales OH y OOH según el mecanismo RAF en fase acuosa.	35
Tabla 8. ΔE , ΔH y ΔG de las reacciones entre t-RV y los radicales OH y OOH siguiendo un mecanismo SET en CCl_4	36
Tabla 9. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para la reacción del t-RV con OH y OOH siguiendo un mecanismo HAT en CCl_4	37
Tabla 10. ΔG y $\Delta G^\ddagger$ para las reacciones entre t-RV y los radicales OH y OOH según el mecanismo RAF en CCl_4	38
Tabla 11. Índices de reactividad químicos para el trans-resveratrol usando las ecuaciones de la DFT Conceptual en fase gas, acuosa y en CCl_4	42

8. Bibliografía

1. Buettner, G. R. (1993). The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(2), 535–543. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>
2. Higashi, Y. (2022). Roles of Oxidative Stress and Inflammation in Vascular Endothelial Dysfunction-Related Disease. *Antioxidants*, 11(10), 1958. <https://doi.org/10.3390/antiox11101958>
3. Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24(8), 1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>
4. Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601–617. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00024-V](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00024-V)
5. Mendes, R. A., da Mata, V. A. S., Brown, A., & de Souza, G. L. C. (2024). A density functional theory benchmark on antioxidant-related properties of polyphenols. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 26(11), 8613–8622. <https://doi.org/10.1039/D3CP04412B>
6. Senthil kumar, K., & Kumaresan, R. (2012). A DFT study on the structural, electronic properties and radical scavenging mechanisms of calycosin, glycitein, pratensein and prunetin. *Computational and Theoretical Chemistry*, 985, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2012.01.028>
7. Brandt, W., Gürke, M., Köhler, F. E., Pabst, G., Schellenberg, G., & Vogtherr, M. (1883). Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America. Fr. Eugen Köhler. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.623>
8. Waffo-Tégou Pierre and Krisa, S. and P. A. D. and R. T. and M. J.-P. and M. J.-M. (2013). Grapevine Stilbenoids: Bioavailability and Neuroprotection. En J.-M. Ramawat Kishan Gopal and Mérillon (Ed.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 2275–2309). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_74
9. Trela, B. C., & Waterhouse, A. L. (1996). Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1253–1257. <https://doi.org/10.1021/jf9504576>
10. Takaoka, M. J. (1940). Of the phenolic substances of white hellebore. *J Faculty Sci Hokkaido Imperial University*, 3, 1–16.
11. Paul, B., Masih, I., Deopujari, J., & Charpentier, C. (1999). Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *Journal of ethnopharmacology*, 68(1-3), 71–76. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(99\)00044-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(99)00044-6)
12. Langcake, P., & Pryce, R. J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9(1), 77–86. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(76\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0048-4059(76)90077-1)

13. Stuart Jeffrey A. and Robb, E. L. (2013). Resveratrol and Its Derivatives as Phytoalexins. En *Bioactive Polyphenols from Wine Grapes* (pp. 1–8). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6968-1_1
14. Jeandet, P., Bessis, R., & Gautheron, B. (1991). The Production of Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(1), 41–46. <https://doi.org/10.5344/ajev.1991.42.1.41>
15. Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2002). Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3337–3340. <https://doi.org/10.1021/jf0112973>
16. Fuloria, S., Sekar, M., Khattulanuar, F. S., Gan, S. H., Rani, N. N. I. M., Ravi, S., Subramaniyan, V., Jeyabalan, S., Begum, M. Y., Chidambaram, K., Sathasivam, K. v., Safi, S. Z., Wu, Y. S., Nordin, R., Maziz, M. N. H., Kumarasamy, V., Lum, P. T., & Fuloria, N. K. (2022). Chemistry, Biosynthesis and Pharmacology of Viniferin: Potential Resveratrol-Derived Molecules for New Drug Discovery, Development and Therapy. *Molecules*, 27(16), 5072. <https://doi.org/10.3390/molecules27165072>
17. Nicolás-Méndez, T., Ortiz-Muñiz, A. R., Mendoza-Núñez, V. M., & García-Rodríguez, M. del C. (2020). The role of resveratrol on heavy metal-induced oxidative stress. *Nutrición Hospitalaria*. <https://doi.org/10.20960/nh.02846>
18. Iuga, C., Alvarez-Idaboy, J. R., & Russo, N. (2012). Antioxidant activity of trans -resveratrol toward hydroxyl and hydroperoxyl radicals: A quantum chemical and computational kinetics study. *Journal of Organic Chemistry*, 77(8), 3868–3877. <https://doi.org/10.1021/jo3002134>
19. Phan Thi, T., & Ninh The, S. (2020). Antioxidant of Trans-Resveratrol: A Comparison between OH and CH Groups Based on Thermodynamic Views. *Journal of Chemistry*, 2020, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2020/8869023>
20. Bertrán Rusca, J., Branchadell Gallo, V., Moreno Ferrer, M., & Sodupe Roure, M. (2000). *Química cuántica : fundamentos y aplicaciones computacionales*. Síntesis.
21. Perdew, J. P., Kurth, S., Zupan, A., & Blaha, P. (1999). Accurate Density Functional with Correct Formal Properties: A Step Beyond the Generalized Gradient Approximation. *Physical Review Letters*, 82(12), 2544–2547. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.82.2544>
22. Becke, A. D. (1993). A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. *The Journal of Chemical Physics*, 98(2), 1372–1377. <https://doi.org/10.1063/1.464304>
23. Zhao, Y., & Truhlar, D. G. 2006. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110(49), 13126–13130. <https://doi.org/10.1021/jp066479k>
24. Robert G. Parr, Y. W. (1989). *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press, Nueva York.
25. Geerlings, P., de Proft, F., & Langenaeker, W. (2003). Conceptual Density Functional Theory. *Chemical Reviews*, 103(5), 1793–1874. <https://doi.org/10.1021/cr990029p>
26. W. J. Hehre, R. Ditchfield, and J. A. Pople, “Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 12. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular-orbital studies of organic-molecules,” *J. Chem. Phys.*, 56 (1972) 2257. DOI: 10.1063/1.1677527
27. 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>