



BENÉMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICO-MATEMÁTICAS



TESIS

ESTUDIO TEÓRICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL PÉPTIDO AMILOIDE- β 25-35 Y CUATRO ANTIOXIDANTES

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

TRINIDAD CRUZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAMSÉS E. RAMÍREZ GUTIÉRREZ

Departamento de Fisicomatemáticas FCQ-BUAP

ASESOR DE TESIS

DRA. MA. LUISA ROXANA LICONA IBARRA

Departamento de Fisicomatemáticas FCQ-BUAP

FEBRERO 2015

Este trabajo de tesis tuvo participación en los siguientes congresos:

- Participación en la IX Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, con la presentación “Estudio teórico estructural del péptido $A\beta_{25-35}$ y su posible interacción con cuatro antioxidantes” que se llevo a cabo en Pachuca Hidalgo, Estado de México 11, 12 y 13 de Noviembre de 2010.
- Participación en la 7ma Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, con la presentación “La función de Fukui proyectada sobre el potencial electrostático como una herramienta para dilucidar sitios específicos de interacción entre el péptido $A\beta_{25-35}$ y cuatro antioxidantes” que se llevo a cabo en Cuernavaca Morelos, Estado de México del 4 al 8 de Abril de 2011.
- Participación en la X Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, con la presentación “Un posible mecanismo de reacción entre el péptido $A\beta_{25-35}$ y cuatro antioxidantes ” que se llevo a cabo en Pachuca Hidalgo, Estado de México 10, 11 y 12 de Noviembre de 2011.
- Participación en la XI Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, con la presentación “Formación del complejo toxina-flavonoide en disolución acuosa entre el péptido $A\beta_{25-35}$ y cuatro antioxidantes” que se llevo a cabo en Toluca de Lerdo, Estado de México 8 – 10 de Noviembre de 2012

ABREVIATURAS

UV	Ultra violeta
IR	Infra rojo
Aβ	Beta Amiloide
Aβ₂₅₋₃₅	Beta Amiloide 25-35
EA	Enfermedad de Alzheimer
PPA-β	Proteína precursora de A β
APOE	Apolipoproteina E
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropionato
MNDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Sintasas del óxido nítrico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
NO	Óxido nítrico
ATP	Adenintrifosfato
O²⁻	Ion superóxido
ONOO⁻	Peroxinítrito
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
OH⁻	Radical hidroxilo
EO	Estrés oxidativo
RL	Radicales libres
SEP	Superficies de Energía Potenciales
MM	Mecánico Moleculares
DFT	Teoría funcionales de la densidad
PDB	Protein Data Bank
SE	Semiempiricos
STO	Orbital tipo Slater
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

INDICE GENERAL

	Pagina
Capítulo I Introducción.....	7
Capítulo 2 Antecedentes.....	9
2.1 El péptido Amiloide β	10
2.2 El fragmento $A\beta_{25-35}$ y su toxicidad.....	12
2.3 Óxido Nítrico.....	13
2.4 Los radicales libres, estrés oxidativo y el $A\beta_{25-35}$	15
Justificación	17
Capítulo 3 Objetivos.....	18
Capítulo 4 Teoría.....	19
4.1 Métodos en química cuántica.....	19
4.1.1 Conceptos básicos de la química computacional.....	19
4.1.2 Métodos computacionales.....	19
4.1.3 Usos de los métodos computacionales.....	20
4.1.4 Elección del mejor método.....	21
4.1.5 Superficie de energía potencial.....	23
4.1.6 Consideraciones sobre la mecánica molecular.....	27
4.1.7 Consideraciones sobre la mecánica cuántica.....	31
4.1.8 Simplificaciones en el tratamiento de la teoría mecanocuántica.....	31
4.1.9 Dinámica molecular.....	33
4.2 Potencial electrostático.....	33
Capitulo 5 Metodología.....	34
Capitulo 6 Resultados y discusión.....	36
6.2 Análisis estructural de los antioxidantes.....	38
Catequina.....	38
Epicatequina.....	39
Quercetina.....	40
Hespertina.....	42
6.3 Calculo del potencial electrostático molecular.....	43
6.4 Calculo de los orbitales LUMO.....	44
6.5 Formación de complejos.....	45
6.6 tablas de energías de los antioxidantes.....	49

6.7 tablas de energía de cada complejo.....	49
Conclusión	50
Perspectivas	50
Bibliografía	51

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Esquema de la proteólisis de la PPA- β .	9
Figura 2 El péptido A β ₂₅₋₃₅ , fragmento de 11 aminoácidos con secuencia GSNKGAIIGLM	10
Figura 3 Esquema hipotético del mecanismo de toxicidad del A β ₂₅₋₃₅	14
Figura 4 Superficie de energía potencial donde se especifica cada punto.	23
Figura 5 Punto que puede alcanzar el mínimo global.	24
Figura 6 Interacciones que presentan la mayoría de las moléculas	27
Figura 7 Metodología	33
Figura 8 Estructura general de los flavonoides con numeración y especificación de cada heterociclo	35
Figura 9 (-)Catequina	36
Figura 10 (-) Epicatequina	37
Figura 11 (-) Quercetina	38
Figura 12 (-) Hespertina	40
Figura 13 Estructura del péptido A β ₂₅₋₃₅ calculado con B3LYP/6-31+g(d,p) a una isosuperficie de -0.03 (azul) y 0.09 (41
Figura 14 La (-) Catequina, (-) Epicatequina, (-) Quercetina, (-) Hespertina, calculado con B3LYP/6-31+g(d,p) a una isosuperficie de -0.03 (azul) y 0.09 (rojo).	42
Figura 15 Cálculo de LUMO para observar los orbitales de menor energía.	43
Figura 16 Formación de complejos entre el A β ₂₅₋₃₅ calculado con RHF/STO-3G	44

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 6.1 Antioxidantes utilizados y la familia a la que pertenece cada uno	35
Tabla 6.2 Distancias de enlace (Å) de los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Catequina	36
Tabla 6.3 Ángulos de enlace ($^{\circ}$) de los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Catequina	36
Tabla 6.4 Ángulos diedros ($^{\circ}$) de los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Catequina	37
Tabla 6.5 Distancias de enlace (Å) entre los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Epicatequina	37
Tabla 6.6 Ángulos de enlace ($^{\circ}$) entre los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Epicatequina	38
Tabla 6.7 ángulos diedros ($^{\circ}$) entre los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Epicatequina	38
Tabla 6.8 Distancias de enlace (Å) entre los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Quercetina	39
Tabla 6.9 Ángulos de enlace ($^{\circ}$) entre los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Quercetina	39
Tabla 6.10 ángulos diedros ($^{\circ}$) entre los diferentes métodos utilizados para para la estructura de la (-) Quercetina	39
Tabla 6.11 Distancias de enlace (Å) entre los diferentes métodos utilizados para para la estructura de la (-) Hespertina	40
Tabla 6.12 ángulos de enlace ($^{\circ}$) entre los diferentes métodos utilizados para para la estructura de la (-) Hespertina	40
Tabla 6.13 ángulos diedros ($^{\circ}$) entre los diferentes métodos utilizados para para la estructura de la (-) Hespertina	40
Tabla 14. Clasificación de las interacciones de puentes de hidrogeno según Jeffrey	46
Tabla 15. Energía (Kcal/mol) de los antioxidantes con diferentes métodos computacionales	47
	47

Capítulo 1

Introducción

La mecánica cuántica se aplica en diversas áreas de la ciencia como la química, biología y física. La aplicación de los postulados de la mecánica cuántica a los problemas de la química se conoce como Química Cuántica ésta nos permite calcular propiedades termodinámicas (por ejemplo, entropía, capacidades caloríficas, entalpías de formación, etc.), predecir propiedades moleculares (como longitudes y ángulos de enlace, momentos dipolares, barreras de rotación interna, diferencias de energía entre isómeros conformacionales, etc.), estimar estabilidades relativas de las moléculas, estudiar estados de transición e intermediarios de reacciones químicas y calcular espectros de RMN, UV e IR entre otros.[1]

La razón por la cual la química cuántica se ha constituido como un área de importancia para los químicos es porque ha logrado explicar y reproducir de manera precisa resultados experimentales ya conocidos, de tal forma que al predecir resultados aún no determinados experimentalmente también se hace de manera precisa. Así, la química cuántica permite estudiar sistemas moleculares que experimentalmente son difíciles de tratar o diseñar, como es el caso de los nuevos materiales.[1]

Dentro de los estudios teóricos, se aplican métodos basados en teorías que van desde las que tienen alta precisión numérica, hasta otras que son aproximadamente confiables. En el contexto de estos métodos teóricos en la comunidad se han

desarrollado a su vez varios métodos computacionales complementarios (llamados también métodos Químico-Teóricos) que permiten estudiar los modelos de las moléculas de interés, extrayendo así sus diversas propiedades físicas y químicas [Libros de QC]. Los métodos llamados *ab initio*, son empleados para pequeños sistemas. Mientras que los empíricos o semi-empíricos, se aplican a grandes sistemas moleculares. Los métodos semi-empíricos son más comunes usados para el estudio de moléculas biológicas, ya que en estos se toman algunos datos obtenidos experimentalmente.[2]

Actualmente existen programas computacionales para realizar cálculos fisicoquímicos moleculares, lo cual ha facilitado el uso de la química cuántica de forma práctica y aplicada a la solución de problemas químicos reales. En este sentido el presente trabajo se centra en realizar un estudio teórico estructural de la estructura Beta-Amiloide₂₅₋₃₅ (**A β ₂₅₋₃₅**) la cual participa en la enfermedad de Alzheimer que actualmente es un trastorno neurodegenerativo y la causa más común de demencia en las personas de edad. Se ha argumentado que la acumulación de la proteína A β ₂₅₋₃₅ es un paso clave en el mecanismo de esta enfermedad.

Además de realizar los cálculos para los flavonoides como catequina, epicatequina, hespertina y quercetina que son compuestos polifenólicos antioxidantes con un potencial significativo indican que previenen el daño causado por la proteína A β ₂₅₋₃₅, para evitar la formación de radicales libres al mismo tiempo de prevenir el estrés oxidativo que causan toxicidad del péptido y la muerte neuronal.

Capítulo 2

Antecedentes

Desde tiempos muy remotos la memoria es un tema de interés para la investigación, debido a la capacidad que presentan todos los seres vivos para adquirir conocimientos sobre su entorno. La memoria, el componente central de nuestra vida cognitiva, al permitirnos recordar detalles específicos de un acontecimiento o experiencia pasada, para proporcionarnos información pertinente y con ello tomar decisiones adecuadas en la actualidad. En donde el aprendizaje es el modo principal de adaptación de los seres vivos.[3]

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por un cuadro clínico de demencia entre 5 y 20 años, es incurable y su diagnóstico definitivo se confirma postmortem por la presencia de marañas y placas en el cerebro de los pacientes. México no tiene estadísticas precisas del número de pacientes con Alzheimer; sin embargo, se calcula que para el año 2050 tendremos 36 millones de personas por arriba de los 60 años. Una de las mayores preocupaciones se refiere al diagnóstico temprano y preciso de la enfermedad. Así, numerosos grupos de investigación en todo el mundo y en México, investigan desde muy diversos puntos de vista los mecanismos fundamentales que le dan origen a la EA.[4]

La EA es un trastorno neurodegenerativo crónico de curso insidioso que afecta principalmente a sujetos adultos mayores. Es el tipo de demencia más frecuente, el cual según estadísticas de U.S.A, puede afectar entre un 5 a 10% de las personas mayores de 65 años.[5] Esta enfermedad se caracteriza desde el punto de

vista clínico por una serie de alteraciones cognitivas, entre ellas trastornos del lenguaje, de la percepción, orientación y la memoria.[6]

El déficit de la memoria episódica se presenta de manera frecuente en los sujetos con EA, muchas veces sin presentarse deterioro en la memoria semántica. Esta dificultad para la adquisición de conocimientos episódicos se han atribuido a desconexión de hipocampo y los sistemas de procesamiento sensorial.[7] Dentro de los hallazgos patológicos descritos en estudios postmortem de pacientes diagnosticados con Alzheimer, se destacan: la acumulación del péptido $A\beta$ en forma de placas, ovillos neurofibrilares y pérdida neuronal selectiva en el cerebro.[8]

2.1 EL PEPTIDO AMILOIDE β

Un marcador importante en la enfermedad de Alzheimer (EA) son las placas neuríticas, las cuales están constituidas por depósitos extracelulares del péptido Beta-Amiloide ($A\beta$) de 40 a 42 aminoácidos. Estas placas se encuentran localizadas principalmente en áreas cognitivas como el hipocampo, la corteza temporal, la corteza parietal y la corteza frontal.[9] El péptido $A\beta$ es el resultado de la proteólisis de la proteína precursora de $A\beta$ (PPA- β) Figura 2.

La PPA- β es una proteína transmembranal que se expresa en numerosas células de forma natural y es codificada por el cromosoma 21, esta constituida de 695 a 770 aminoácidos. Es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso, posteriormente es transferida al aparato de Golgi donde se glicosila y atraviesa el citoplasma para insertarse en la membrana. La PPA- β es cortada por la acción de dos

enzimas, la β y γ -secretasas, dando como resultado la formación del péptido $A\beta_{1-40}$ o $A\beta_{1-42}$ (Figura 1) [10].

Existen diversos factores que sobrepasan la producción de este péptido $A\beta$ como son mutaciones en la PPA- β [11] ó mutaciones en el alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (APOE). La función de la APOE es transportar el colesterol, debido a ello es considerada como un factor de riesgo para desarrollar la EA, ya que un incremento en las concentraciones de colesterol causa un aumento en la actividad de las β y γ -secretasas, en consecuencia se incrementa la producción del péptido $A\beta$ [12] El péptido $A\beta$ se autoagrega [13] para formar los depósitos de $A\beta$ y contribuye a la degeneración neuronal. Se han realizado diversos estudios a las secuencias funcionales del péptido $A\beta$, en donde se le atribuye al fragmento 25-35 ($A\beta_{25-35}$) la toxicidad de esta proteína. El $A\beta_{25-35}$ produce muerte neuronal al ser administrado en cultivos celulares de hipocampo de rata.[14]

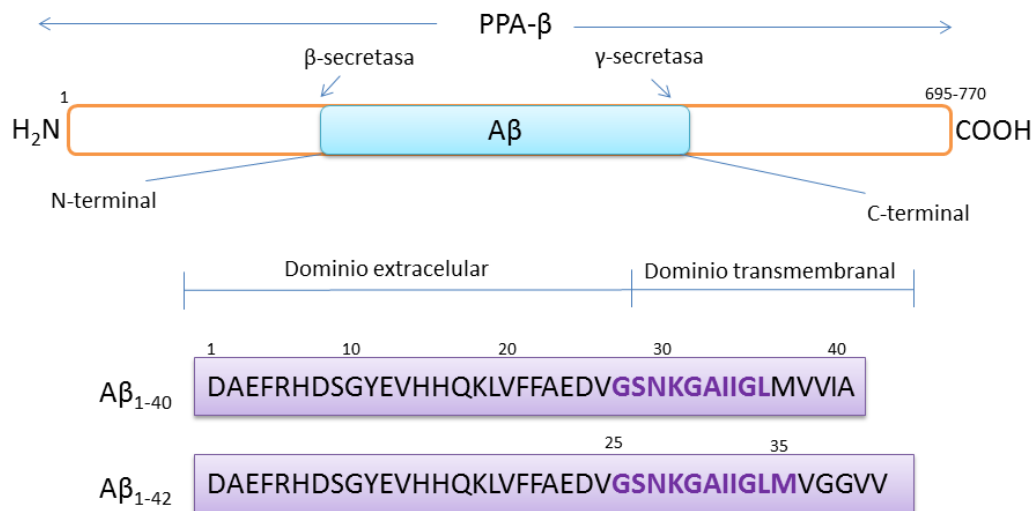


Figura 1. Esquema de la proteólisis de la PPA- β . En la parte superior se observa la segmentación de la PPA- β por medio de la β y γ -secretasa, dicha acción da como resultado la formación del péptido $A\beta_{1-40}$ o $A\beta_{1-42}$. Por otra parte en la parte inferior se muestra la ubicación del fragmento 25-35. [15](Tomado y modificado de Hashimoto y cols., 2009)

2.2 EL FRAGMENTO $A\beta_{25-35}$ Y SU TOXICIDAD

El $A\beta_{25-35}$ es un fragmento de 11 aminoácidos con secuencia **GSNKGAIIGLM** como se muestra en la figura 2 y con peso molecular de 160 Da. Estudios in vitro han demostrado que tiene efectos tóxicos similares al péptido completo, sin embargo el $A\beta_{25-35}$ genera efectos tóxicos mas rápidos en comparación con el péptido completo.[16] Existen diversos mecanismos por los cuales este fragmento produce toxicidad. A nivel bioquímico se ha demostrado la capacidad que tiene para insertarse en la membrana celular, formando poros que alteran las propiedades electrofisiológicas de la membrana.[17]

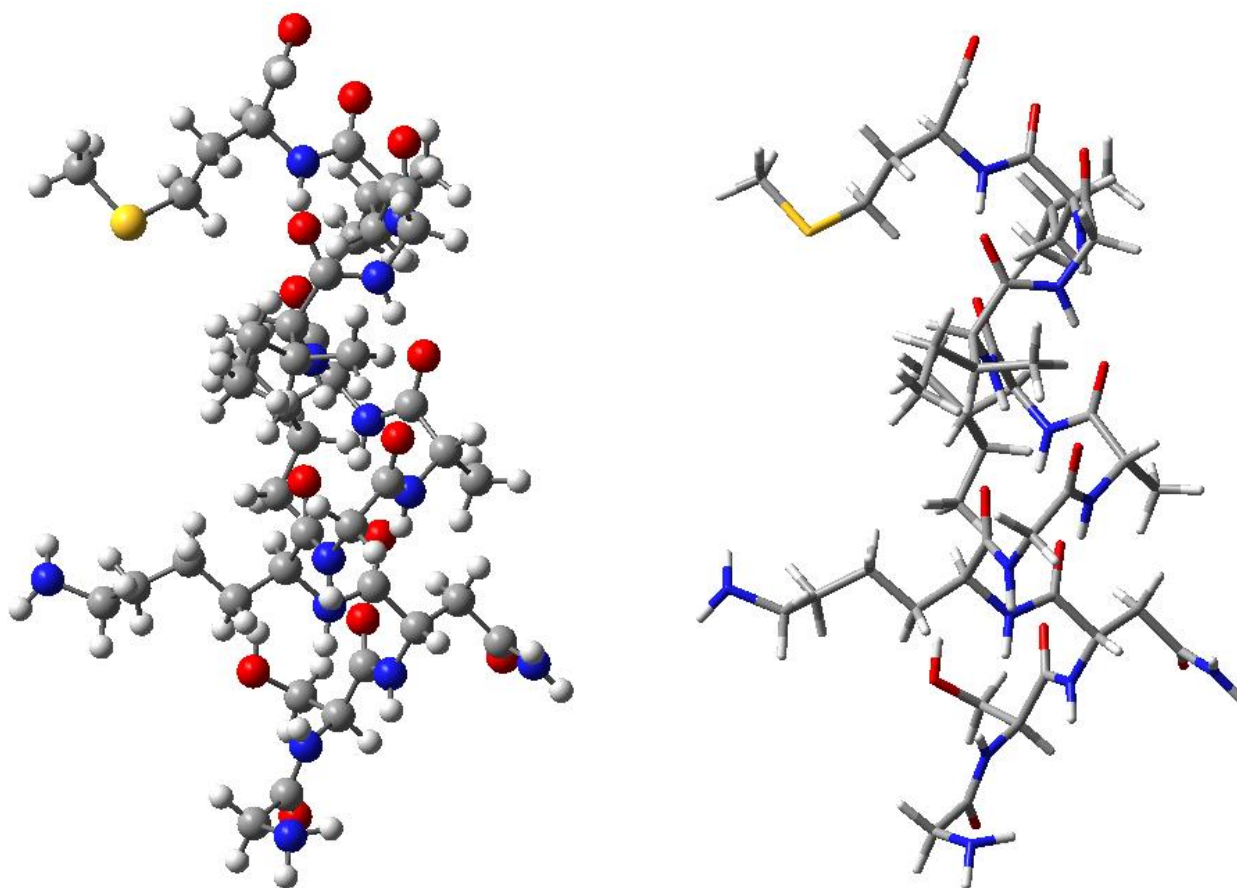


Figura 2 El péptido $A\beta_{25-35}$, fragmento de 11 aminoácidos con secuencia GSNKGAIIGLM. La imagen proviene de la base de datos RCBS Protein Datta Bank

También puede inhibir a los receptores de recaptura de glutamato, produciendo un incremento de dicho neurotransmisor en el espacio sináptico y ocasionando la sobre activación de los receptores alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropionato (AMPA) y N-metil-D-aspartato (MNDAs).[18] Cowburn demostró que el $A\beta_{25-35}$ tiene la afinidad de unión a los sitios de glutamato y glicina del receptor NMDA.[19] La sobre activación de este receptor da como resultado un proceso de excitotoxicidad, al alterar la homeostasis del calcio a nivel intracelular, lo que ocasiona la activación de diversas enzimas entre ellas las sintasas del óxido nítrico (NOs). Por otra parte, el $A\beta_{25-35}$ incrementa la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que genera peroxidación de lípidos, daño en la mitocondria, nitración de proteínas y finalmente la muerte neuronal.[20]

2.3 ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es una molécula diatómica, hidrofóbica, altamente reactiva, con un tiempo de vida corto, aproximadamente 5 segundos, se difunde libremente a través de las membranas celulares, de acuerdo a su gradiente de concentración. El NO se define como un radical libre que es rápidamente oxidado en el ambiente, por lo que no puede ser almacenado.[21] El NO es sintetizado por una familia de enzimas denominadas sintasas del óxido nítrico (NOs), las cuales requiere de los cofactores FMN, el FAD y el NADPH para catalizar la reacción de L-arginina a L-citrulina y una molécula de NO.

El NO tiene un papel muy importante a nivel periférico en la dilatación de los vasos sanguíneos, citotoxicidad contra patógenos y tumores, coordinación del ritmo cardiaco y regulación de la actividad respiratoria celular. En el sistema nervioso central se propone que el NO participa en diversos procesos como la neurotransmisión y directamente en procesos de proliferación, diferenciación y sinaptogénesis. También ha sido implicado en la memoria, al participar en la potenciación a largo plazo.[22] Sin embargo, existen sustancias como el $A\beta_{25-35}$ que incrementa las condiciones basales de NO.[23]

El NO tiene la capacidad de incrementar la formación de radicales libres, al inhibir la fosforilación oxidativa, ya que une al grupo hemo de la cadena transportadora de electrones (complejos I y V mitocondrial) y provoca la muerte neuronal por deficiencia de ATP.[24] Además el NO es capaz de interactuar con el ion superóxido (O_2^-) para formar al peroxinitrito ($ONOO^-$).[25]

El $ONOO^-$ es una molécula altamente inestable, al disociarse en más radicales libres como el radical hidroxilo y el dióxido de nitrógeno, estas moléculas son capaces de provocar la peroxidación lipídica, que da por resultado la activación de la glía, que a su vez incrementa la liberación de radicales libre.

En las neuronas, el $ONOO^-$ es capaz de dañar a los neurofilamentos, ya que nitrifica los residuos de tirosina de algunas proteínas, e inhibe irreversiblemente el transportador de glutamato en las células gliales, en consecuencia incrementa las concentraciones de glutamato en el espacio sináptico ocasionando excitotoxicidad y estrés oxidativo.

2.4 LOS RADICALES LIBRES, ESTRÉS OXIDATIVO Y EL $A\beta_{25-35}$

Los radicales libres se generan en la cadena respiratoria, el oxígeno molecular es reducido secuencialmente en la mitocondria mediante la adición de $4e^-$ para generar una molécula de agua. En este proceso se producen pequeñas cantidades de sustancias tóxicas intermedias que comprende los radicales libres peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ion superóxido (O_2^-) y radical hidroxilo (OH^-), sin embargo existen sustancias como el $A\beta_{25-35}$ que pueden alterar este proceso. Se ha demostrado que a las dos horas después de la administración intrahipocámpal del $A\beta_{25-35}$ en ratas incrementa la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) [26] (Figura 3). Esto se debe, al $A\beta_{25-35}$ ya que causa una alteración en la homeostasis del Ca^{2+} , lo que neuronas del hipocampo y de la corteza cerebral.

El EO se define como un desequilibrio en los radicales libres (RL) y las especies antioxidantes.[27] Debido a que los RL tienen un electrón desapareado en su orbital externo, son altamente reactivos e inestables, ya que pueden aceptar electrones y reaccionar con átomos de hidrógeno de otras moléculas de los diferentes componentes de la célula como pueden ser los lípidos de las membranas, proteínas ó ácidos nucleicos. Estas interacciones alteran su función y producen un daño drástico en las membranas y organelos de las células.

Recientes estudios demuestran que un incremento en las especies reactivas de oxígeno, incrementan la concentración de malonilaldehído a las dos y cuatro horas después de administración intrahipocámpal del $A\beta_{25-35}$ en rata.[27]

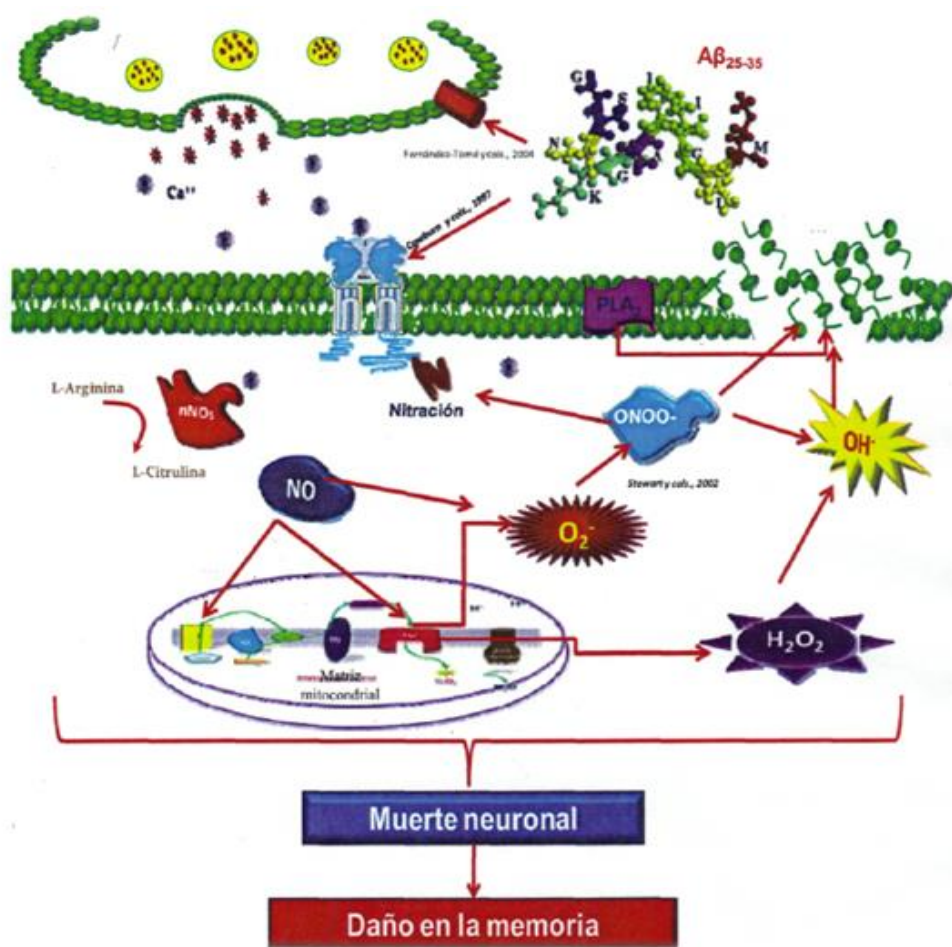


Figura 3 Esquema hipotético del mecanismo de toxicidad del $A\beta_{25-35}$ en la región AC1 del hipocampo de rata. El $A\beta_{25-35}$ incrementa los niveles de calcio (Ca^{2+}) intracelular al sobreactivar a los receptores NMDA y en consecuencia provocan excitotoxicidad, este efecto produce estrés oxidativo al incrementar los niveles de óxido nítrico (NO). El flujo de calcio activa a dos enzimas involucradas en el daño inducido por el $A\beta_{25-35}$, las sintasas de óxido nítrico y la enzima fosfolipasa A2 (PLA2). Las nNOs va a incrementar la síntesis de óxido nítrico, el cual va a inhibir el complejo I y V mitocondrial, lo que conlleva a un incremento en la síntesis de radicales libres, como el ion superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno H_2O_2 . El O_2^- interactúa con el NO para formar el peroxinitrito ($ONOO^-$). El $ONOO^-$ produce nitración de proteínas y peroxidación de lípidos, además se disocia para formar al ion hidroxilo ($OH\cdot$). El $OH\cdot$ captura un átomo de hidrógeno de los fosfolípidos de la membrana e inicia la peroxidación de lípidos, ocasionando estrés oxidativo. El estrés oxidativo va a provocar la muerte neuronal, la cual se refleja en un daño en los procesos cognitivos, como la memoria de trabajo y la memoria de referencia.

Justificación

Actualmente para comprender algunos procesos biológicos, es necesario apoyarse de las diferentes ciencias, las cuales nos ayudan a comprender mejor lo que está sucediendo en el proceso de nuestro interés. Al mismo tiempo también se disponen de diversas herramientas, y es importante saber utilizar tanto la información teórica como las herramientas con las que contamos.

Las ciencias interdisciplinarias son de gran ayuda, así contamos con la Química Cuántica Computacional, con la cual tenemos la oportunidad de conocer las características electrónicas de un sistema molecular y así comprender procesos bioquímicos. En este trabajo nos interesa estudiar las interacciones de los antioxidantes Catequina, Epicatequina, Hespertina y Quercetina con aminoácidos específicos del péptido $A\beta_{25-35}$, se aplicaron metodologías Químico Cuánticas, potenciales electrostáticos y función de Fukui para conocer algunas propiedades fisicoquímicas, electrónicas y moleculares de este sistema. Una vez obtenidas las características de dicho sistema, se realizó un análisis de resultados con la finalidad de relacionar los datos teóricos obtenidos con los datos experimentales y de esta manera tener una mejor comprensión de este proceso el cual es el primer paso para que se lleve a cabo una interacción y erradicar o prevenir el problema.

Capítulo 3

Objetivos

Objetivo general

Realizar un análisis Químico-Teórico de las moléculas antioxidantes formando complejos con el Beta Amiloide (β 25-35) y los antioxidantes Catequina, Epicatequina, Hespertina y Quercetina para poder visualizar su interacción, aplicando métodos semi-empíricos y posteriormente conocer cual complejo es más efectivo para la enfermedad de Alzheimer.

Objetivos Específicos

- 1) Hacer un estudio teórico estructural de los antioxidantes Catequina, Epicatequina, Hespertina y Quercetina.
- 2) Calcular el potencial electrostático de cada uno de los antioxidantes Catequina, Epicatequina, Hespertina y Quercetina y del $A\beta_{25-35}$ para conocer su sitio de interacción.
- 3) Proponer la formación del $A\beta_{25-35}$ con cada uno de los antioxidantes y optimizar los cálculos en fase gaseosa.

Capítulo 4

Teoría

164.1 METODOS EN QUIMICA CUANTICA

4.1.1 CONCEPTOS BÁSICOS DE LA QUÍMICA COMPUTACIONAL

La química computacional es una disciplina que se extiende más allá de los límites tradicionales que separan la química, la física, la biología y la ciencia de la computación, permitiendo la investigación de átomos, moléculas y macromoléculas mediante un sistema de ordenadores o actualmente incluso con ordenador, cuando la investigación de laboratorio sea inapropiada o imposible.

Aunque hay distintas definiciones de química computacional quizás la más apropiada sea la dada por Lipkowitz y Boyd: “Aquellos aspectos de la química que son explicados o realizados mediante ordenadores”. Mientras el modelado molecular nos da un modelo en 2D o 3D de la estructura de una molécula y sus propiedades, los métodos computacionales calculan la estructura y los datos apropiados necesarios para realizar el modelo. [28]

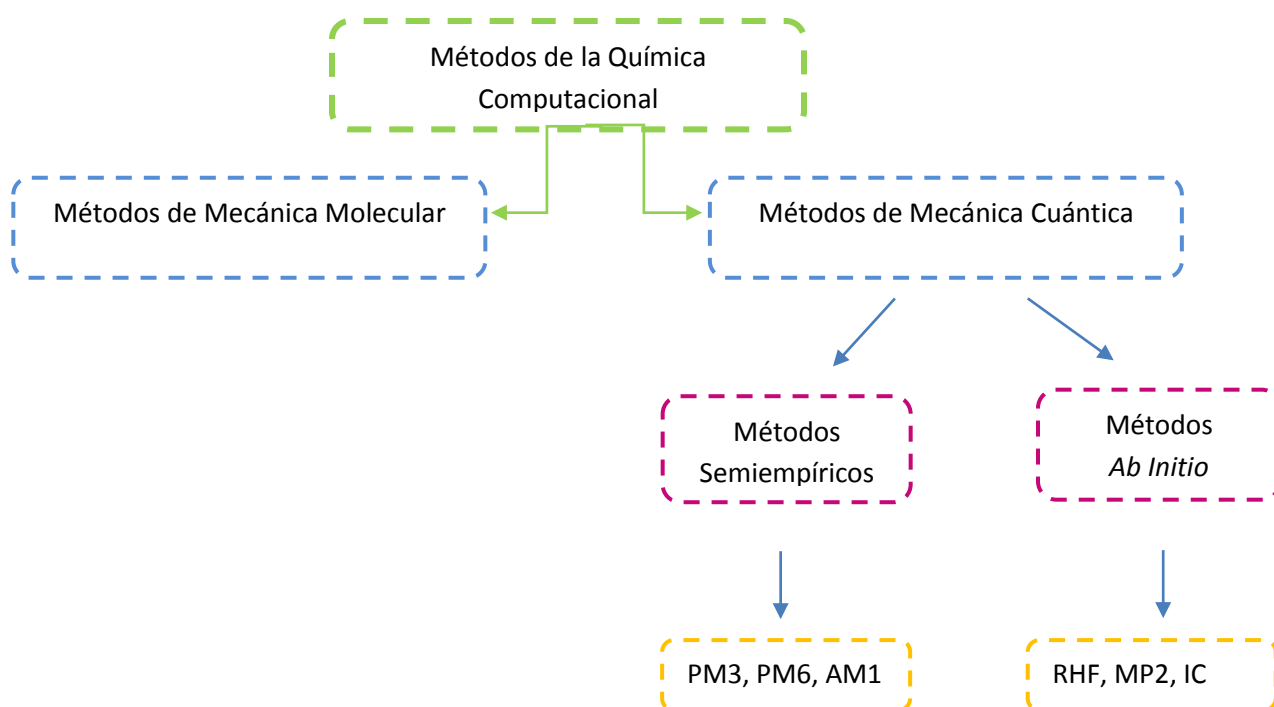
4.1.2 MÉTODOS COMPUTACIONALES

La química computacional abarca un amplio rango de métodos matemáticos que pueden dividirse en dos grandes categorías:

1. La mecánica molecular: que aplica las leyes de la física clásica al núcleo molecular sin considerar explícitamente a los electrones.

2. La mecánica cuántica: se basa en la ecuación de Schrödinger para describir una molécula con un tratamiento directo de la estructura electrónica y que se subdivide a su vez en dos clases, según el tratamiento realizado, métodos semiempíricos y métodos *ab initio* ("a primeros principios").[28]

Los métodos que se utilizan se dividen según la clasificación que se muestra a continuación:



4.1.3 USOS DE LOS MÉTODOS COMPUTACIONALES

Los métodos computacionales se basan en el cálculo de las Superficies de Energía Potenciales (SEP) de las moléculas. La superficie de energía potencial es la envoltura de las fuerzas de interacción entre átomos de una molécula. De la Superficie de Energía Potencial se puede derivar información estructural y química de la molécula. Los diferentes métodos computacionales difieren en el modo en el cual la superficie se calcula y como se derivan las propiedades moleculares de esta. [29]

Los tipos básicos de cálculos que se realizan con los diferentes métodos son:

- **Calculo de la Energía en un Punto:** La energía para una disposición dada de los átomos en un modelo o el valor de la SEP para un conjunto de coordenadas atómicas.
- **Optimización Geométrica:** Consiste en la modificación sistemática de las coordenadas atómicas de un modelo dando como resultado una geometría donde las fuerzas netas en la estructura son iguales a cero. En una disposición 3D de los átomos, representa un mínimo de energía local (se encontrará una geometría molecular estable sin necesidad de cruzar una barrera de energía conformacional).
- **Calculo de propiedades:** es la predicción de determinadas propiedades físicas y químicas, tales como la carga, momento dipolar o el calor de formación.

Los métodos computacionales pueden también realizar más funciones específicas tales como búsquedas conformacionales y simulaciones dinámicas moleculares. [30]

4.1.4 ELECCIÓN DEL MEJOR MÉTODO

Ni todos los tipos de cálculos son posibles en todos los métodos, ni hay un método que sea el mejor para todo. Así, para cada aplicación, cada método posee ventajas y desventajas que debemos conocer, dependiendo la elección del método de una serie de factores como son:

- ✓ La naturaleza de la molécula con la que vamos a trabajar.
- ✓ El tipo de información que necesitamos.

- ✓ La disponibilidad para poder aplicar parámetros experimentales determinados, ya que algunos de los métodos así lo requieren.
- ✓ Recursos de computación.

Los tres criterios más importantes son:

Tamaño del modelo: El tamaño de un modelo puede llegar a ser un factor limitante para un método en particular, de manera que el número límite de átomos en una molécula se incrementa aproximadamente en un orden de magnitud entre métodos distintos desde el ab initio a los de mecánica molecular. El método ab initio está limitado a decenas de átomos, los métodos semiempíricos a cientos y los métodos mecánico moleculares a miles. [30]

Disponibilidad de parámetros: Algunos de los métodos que se han indicado necesitan para sus cálculos de una serie de parámetros experimentales que se les deben de haber proporcionados previamente. Si la molécula contuviera átomos de los que no hubiera sido posible obtener los parámetros, el modelo obtendrá unas predicciones inválidas. Se ha de tener en cuenta que cualquier campo de fuerza particular es solo aplicable a la clase limitada de moléculas para las cuales esta parametrizada.

Recursos de ordenador: Las necesidades de computación aumentan con relación al tamaño de modelo según el método elegido.

- a. Ab initio: El tiempo requerido para realizar los cálculos se incrementa en el orden N^4 , donde N es el número de átomos del modelo.
- b. Semiempírico : En este caso el tiempo de computación se eleva según la relación N^3 o N^2 .
- c. Mecánico Moleculares (MM): Para este método el tiempo de cálculo aumenta del orden de N^2 .

En general, los métodos de mecánica molecular necesitan menos recursos de ordenador que los métodos de mecánica cuántica.

Una visión general de las características de cada método y sus aplicaciones podemos ver la en la tabla 1.

4.1.5 SUPERFICIE DE ENERGÍA POTENCIAL

Una Superficie de Energía Potencial (SEP) puede describir:

- Una molécula o conjunto de moléculas con una composición atómica constante o también un sistema donde tiene lugar una reacción química.
- Las energías relativas para distintos conformómeros (ejemplo: forma eclipsada y escalonada para el etano). [31]

Se puede generar una Superficie de Energía Potencial diferente en los siguientes casos:

- Moléculas que tienen diferente composición atómica (etano y cloroetano).
- Moléculas en estado excitado y en estado fundamental.

- Moléculas con idéntica composición atómica pero con enlaces de diferente orden (propileno y ciclopropano).

Una representación real de la Superficie de Energía Potencial necesitaría una superficie multidimensional cuya dimensión se incrementa con el número de variables independiente. Ya que cada átomo tiene tres variables independientes (coordenadas x, y, z) la visualización de una SEP para un modelo multiatómico es imposible. Este inconveniente se solventa al generalizar el problema y examinar para cada átomo solo dos variables independientes.

Los puntos críticos de una Superficie de Energía Potencial son:

- **Mínimo global:** Es la energía más baja y nos indica la conformación más estable. Solo existe un mínimo global para cada molécula.
- **Mínimo local:** Mínimo distintos del anterior, que constituyen regiones donde un cambio en la geometría en cualquier dirección nos da una geometría de mayor energía.
- **Punto de silla:** Es el punto entre dos energías extremas. El punto silla se define como un punto en la SEP en el cual hay un incremento de energía en todas las direcciones excepto una, y para el cual la pendiente (primera derivada) de la superficie es cero.
- Una representación gráfica de lo anterior podemos verlo en la figura 4. Todos los mínimos de una SEP de una molécula representan puntos estacionarios estables donde la suma de las fuerzas sobre los átomos es igual a cero. El mínimo global representa la conformación más estable, mientras que los mínimos locales son

conformaciones estables aunque menos que la global y los puntos silla representan conformaciones de transición entre mínimos.

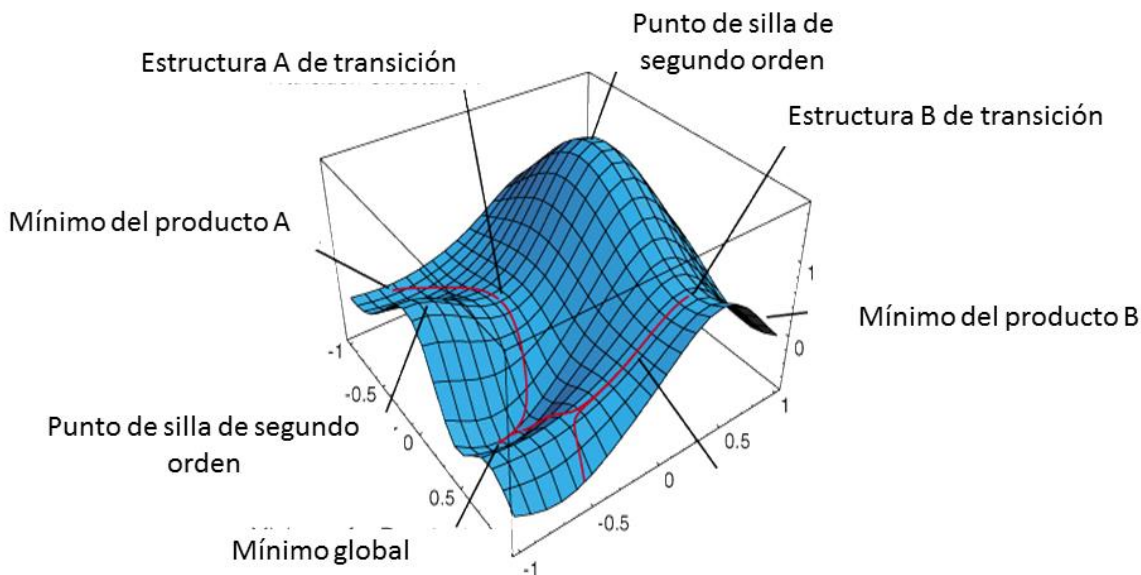


Figura 4. Superficie de energía potencial donde se especifica cada punto.

La optimización geométrica se utiliza para localizar la conformación más estable de un modelo. Esto se debería realizar antes de hacer cualquier análisis o cálculo adicional de la molécula. La determinación del mínimo de energía global y local se logra a través de la minimización de la energía. La determinación del punto silla nos lleva a un estado de transición.

La capacidad de una optimización geométrica para converger a un mínimo depende de la geometría de partida, de la función de energía de potencial usada, y de las condiciones impuestas para conseguir un gradiente mínimo aceptable entre pasos (es el criterio de convergencia). La optimización geométrica es un proceso iterativo y comienza con una geometría de partida que sigue el siguiente proceso:

1. El cálculo de la energía en un punto único se realiza sobre la geometría de partida.
2. Las coordenadas para un subconjunto de átomos se cambian y se recalcula un nuevo punto de energía aislado para determinar la energía de la nueva conformación.
3. La primera o segunda derivada de la energía (según el método) con respecto a las coordenadas atómicas determina cuanto y en qué dirección se debe cambiar el siguiente incremento de geometría.
4. Se realiza el cambio.
5. A continuación se determina de nuevo la energía y sus derivadas y el proceso continúa hasta que se alcanza la convergencia que se fijó, terminando en ese momento el proceso de minimización.

La siguiente ilustración muestra algunos conceptos del proceso de minimización. Para simplificar se muestra el proceso para una sola variable independiente y de esta manera poder representarlo en dos dimensiones.

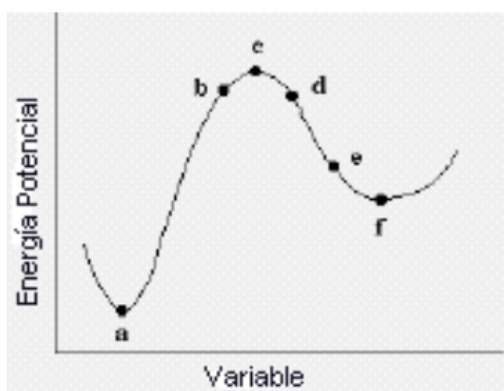


Figura 5. Punto que puede alcanzar el mínimo global.

Como podemos ver en la figura 5, la geometría del modelo de partida determinará que mínimo será el que finalmente se alcance. Así por ejemplo, si comenzamos en el punto (b), el mínimo que se alcanzará será el mínimo global. Sin embargo si partimos del

punto (d) lo que alcanzaremos será el mínimo local (f). Es posible que, si indicamos un valor del gradiente mínimo lo suficientemente grande, nos quedemos en el punto (e) y no en el (f). Esto se podrá controlar disminuyendo el valor del criterio de convergencia (gradiente de energía). Otro punto crítico lo tenemos en (c) ya que en un punto silla, también el valor de la derivada de la energía es igual a cero. Esto nos plantea el problema de que mediante el método de minimizar la primera derivada no podemos pasar de un mínimo a otro, saltándonos un punto de silla.

4.1.6 CONSIDERACIONES SOBRE LA MECÁNICA MOLECULAR

La mecánica molecular describe la energía de una molécula en términos de un conjunto de funciones de energía de potencial. Las funciones de energía potencial y los parámetros usados para su evaluación se conocen como "campo de fuerza".[33]

Los métodos de la mecánica molecular se basan en los siguientes principios:

- El núcleo y los electrones están juntos y se tratan como una única partícula.
- Estas partículas se tratan como si fueran esferas.
- Los enlaces entre partículas se comportan como osciladores armónicos.
- Las interacciones no enlazantes entre estas partículas se tratan utilizando funciones de potencial derivadas de la mecánica clásica.
- Se utilizan funciones de potencial individuales para describir las diferentes interacciones: tensión de enlaces, flexión de ángulos y energías torsionales, así como interacciones no enlazantes.

- Las funciones de energía potencial se relacionan con parámetros derivados empíricamente (constantes de fuerza y valores de equilibrio) que describen las interacciones entre los átomos.
- La suma de todas las interacciones determina la distribución espacial (conformación) de un conjunto de átomos.
- Las energías obtenidas en la mecánica molecular no son cantidades absolutas sino que solo se pueden utilizar para comparar energías estéricas relativas entre dos o más conformaciones de la misma molécula.

Resumiendo, la mecánica molecular trata a los átomos como esferas y a los enlaces como muelles, de manera, que utiliza la Ley de Hooke para el tratamiento matemático a la hora de describir la capacidad de los enlaces para alargarse, comprimirse, flexionarse y girarse. Los átomos no enlaces, los que hay una distancia mayor de dos enlaces entre ellos, interactúan a través de atracciones de van der Waals, repulsiones estéricas, y atracciones y repulsiones electrostáticas.

La energía total de una molécula E se puede describir por tanto, como suma de las diferentes interacciones:

$$\text{Energía} = \text{Energía de Tensión} + \text{Energía de Flexión} + \text{Energía de Torsión} + \text{Energía de Interacciones no Enlazantes}$$

En la figura 6 se pueden ver la mayoría de las interacciones.



Figura 6. Interacciones que presentan la mayoría de las moléculas

Se han desarrollado diferentes campos de fuerza para aplicar estas interacciones, de manera que alguno de ellos incluso añaden algunos términos de energía adicionales.

La fiabilidad de un campo de fuerza en la mecánica molecular depende de los parámetros y la función de energía potencial que se use para describir la energía total del modelo.

Dichos parámetros están optimizados para un conjunto particular de funciones de energía potencial, por lo que no es fácil transferirlos a otros campos de fuerza. [33]

Los campos de fuerza más utilizados son: MM2, MM3, AMBER, CHARMM, OPLS, etc.

4.1.7 CONSIDERACIONES SOBRE LA MECÁNICA CUÁNTICA

Los métodos de la mecánica cuántica describen las moléculas en términos de interacciones explícitas entre núcleos y electrones. Tanto los métodos *ab initio* como los semiempíricos se basan en los siguientes principios:

- Los núcleos y los electrones se distinguen unos de otros.

- Las interacciones electrón-electrón y electrón-núcleo son explícitas.
- Dichas interacciones están dirigidas por el movimiento y las cargas de los electrones.
- Estas interacciones determinan la distribución espacial del núcleo, los electrones y sus energías.
- Los métodos de la mecánica cuántica se resuelven mediante aproximaciones de soluciones aproximadas de la ecuación de onda de Schrödinger.

$$\mathbf{H}\Psi = \mathbf{E}\Psi$$

- El operador hamiltoniano H, contiene información que describe los electrones y el núcleo de un sistema.
- La función electrónica de onda Ψ describe el estado de los electrones en términos de su movimiento y su posición.
- La energía E es la energía asociada al estado particular del electrón.
- La ecuación exacta de la ecuación de Schrödinger solo es posible para un sistema de un núcleo y un solo electrón. Esta solución es, sin embargo, la base para toda la mecánica cuántica.
- Las distintas soluciones describen un conjunto de posibles estados para un electrón. La magnitud observable de estos estados se describe con una función de probabilidad, la cual es el cuadrado de la función de onda.
- La función de probabilidad normalizada indica la probabilidad de encontrar un electrón en ese estado.

- Existen muchas soluciones posibles para esta función de probabilidad, siendo estas soluciones los orbitales atómicos, y sus energías, las energías de los orbitales.
- En una molécula con muchos electrones y núcleos el propósito de la mecánica cuántica es describir sus orbitales y energías de manera análoga a la ecuación de Schrödinger.

4.1.8 SIMPLIFICACIONES EN EL TRATAMIENTO DE LA TEORÍA

MECANOCUÁNTICA

La primera aproximación que se utilizó fue la llamada aproximación de Born-Oppenheimer, la cual consistía en separar el tratamiento de las energías de los electrones de la de los núcleos. Esto era posible debido a la gran diferencia de masas entre el electrón y el núcleo, por lo que se podía considerar que el núcleo se movía tan lentamente con relación al electrón, que no presentaba movimiento. De esta manera se considera que los electrones son los que están en movimiento alrededor de un núcleo fijo con lo que es posible describir separadamente la energía del núcleo y del electrón en el Hamiltoniano, quedando la ecuación de Schrödinger de la siguiente manera:

$$\mathbf{H_{electrón} \Psi_{electrón} = E_{electrón} \Psi_{electrón}}$$

Otra aproximación que se hizo fue el suponer que los electrones eran independientes unos de otros, o más exactamente que era influenciado por un campo

promedio creado por los otros electrones y el núcleo. De esta manera, el Hamiltoniano electrónico se simplificaba quedando como la suma de Hamiltonianos de 1 electrón y la ecuación de onda podía ser resuelta para un electrón individual de una molécula así como derivar una función de onda.

$$\mathbf{H}_{\text{electrón}} = \sum \mathbf{H}_i$$

Sin embargo, en un sistema molecular, este Hamiltoniano no tiene en cuenta la interacción entre electrones con dos o más centros de interacción o la interacción entre dos electrones. Por este motivo se modificó el operador Hamiltoniano, pasando a llamarse operador de Fock:

$$\mathbf{F} \Psi = \mathbf{E} \Psi$$

El operador de Fock se compone de un conjunto de Hamiltonianos de un electrón que describen un único electrón, un centro de interacciones y términos adicionales que describe las interacciones entre dos electrones. Estos términos incluyen una matriz de densidad P , e integrales de intercambio y coulombianas.

El operador de Fock quedaría representado de la siguiente manera:

$$\mathbf{F}_{uv} = \mathbf{H}_{uv} + \sum \mathbf{P} \quad [\text{Integral de intercambio + coulombiana}]$$

A partir de aquí se han ido sucediendo distintas aproximaciones que han intentado superar los problemas que tenían las aproximaciones que les antecedían. Ejemplos de estas otras aproximaciones son:

- Aproximación de la Combinación Lineal de Orbitales Atómicos (CLOA).
- Aproximación de Roothaan-Hall.

4.1.9 DINÁMICA MOLECULAR

En sentido amplio, podríamos decir que la dinámica molecular es la simulación del movimiento de las moléculas, utiliza la mecánica Newtoniana para simular el movimiento de los átomos, añadiendo o quitando energía cinética mediante la elevación o disminución de la temperatura del modelo.

El proceso de dinámica molecular nos permite determinar las conformaciones espaciales permitidas en una molécula mediante el análisis posterior de las imágenes que se generan en la simulación. Otra aplicación importante es el estudio de las vibraciones locales. Esto es posible por que el proceso de simulación altera los valores de los grados de libertad internos en cada paso de la simulación de manera que cada uno de estos pasos representa el cambio de la posición de los átomos en el tiempo debido al cambio de la energía cinética. Se ha de tener en cuenta que antes de realizar la simulación se debe haber minimizado la energía del modelo.

4.2 POTENCIAL ELECTROSTÁTICO

El potencial electrostático creado por los núcleos y los electrones de un sistema en el espacio circundante está dada por la siguiente ecuación. [34]

$$V(r) = \sum_A \left(\frac{Z_A}{|R_A - r|} - \int \frac{\rho(r') dr'}{|r' - r|} \right)$$

Donde Z_A es la carga del núcleo A, localizado en R_A y $\rho(r)$ es la función de densidad electrónica.

El signo de $V(r)$ en cualquier punto depende de donde los efectos de los núcleos o de los electrones son dominantes.

Capítulo 5

Metodología

Hicimos en primer lugar la revisión bibliográfica del tema de interés en este caso de la enfermedad de Alzheimer que es producida por el péptido $A\beta$ que forma placas en los cerebros de los enfermos, sus mecanismos de acción del $A\beta_{25-35}$ aún no son esclarecidos, sin embargo se sabe que este péptido incrementa la concentración de radicales libres [26] y se ha propuesto a los antioxidantes como una alternativa que prevenga o revierta el daño generado por este péptido.

Con estos datos buscamos la secuencia de los aminoácidos de la estructura del $A\beta_{25-35}$ que está en rayos-X en la base de datos de la página RCSB Protein Data Bank la cual no fue optimizada.

Posteriormente buscamos los antioxidantes de interés los cuales son Catequina, Epicatequina, Quercetina y Hesperina, de cada una se construyó la matriz Z en el programa Gauss View 5.0, se realizó la optimización de las mismas con los métodos AM1, RHF con la base 3-21g** y el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr B3LYP en conjunción con las bases 3-21g y 6-31+g**, estas últimas funciones base son una combinación de expresiones matemáticas que dan mayor exactitud a los resultados, en el caso del $A\beta_{25-35}$ se optimizó con B3LYP/6-31+g**.

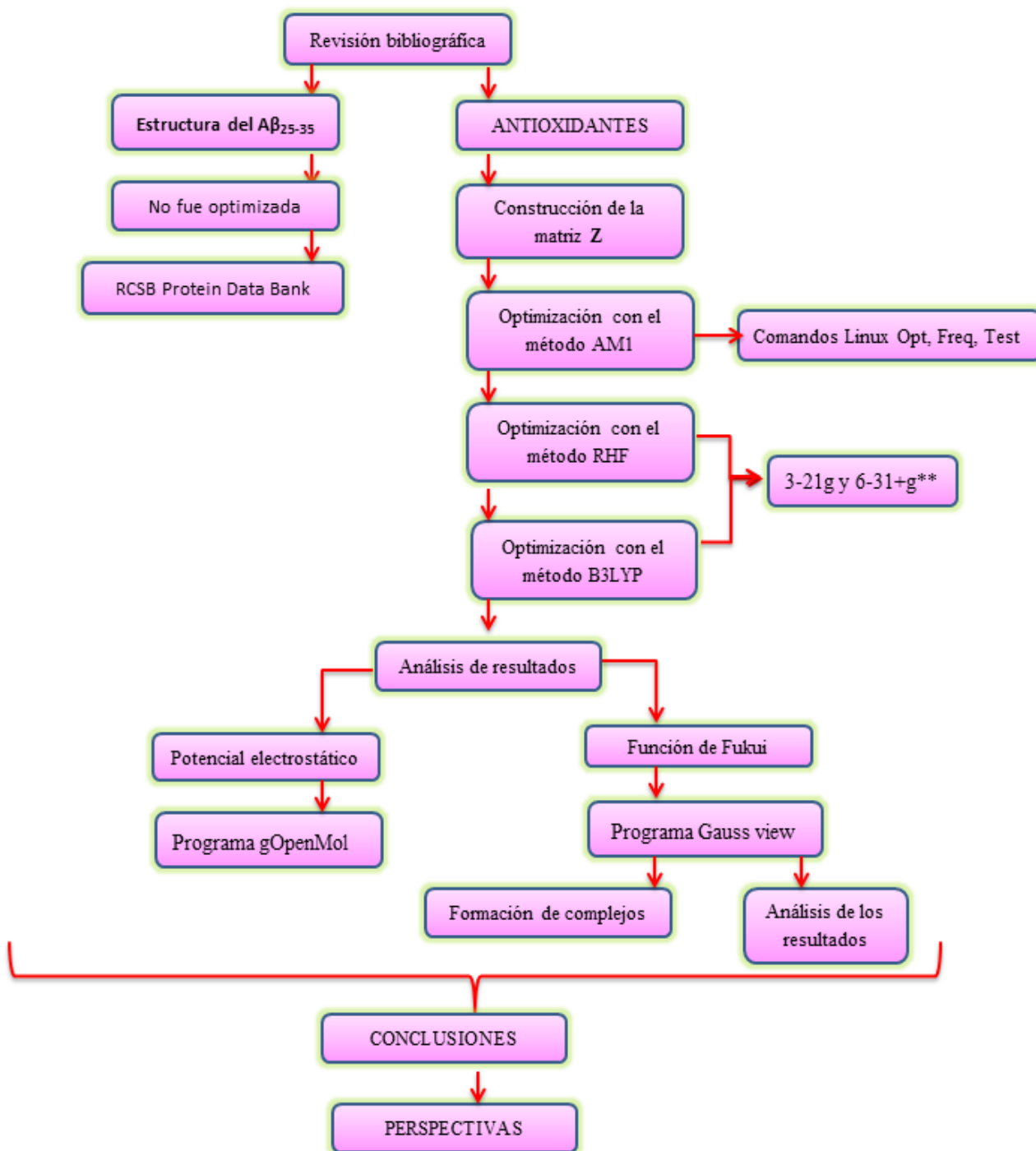
Para el cálculo del potencial electrostático molecular (MEP) utilizamos el programa gOpenMol que se encuentra disponible en la red de forma gratuita, nos sirvió para visualizar la densidad electrónica de las moléculas involucradas.

Para hacer un estudio más detallado se calculó la función de Fukui (f^+) para las moléculas involucradas, en particular para los flavonoides.

Por último se realizaron los complejos entre el $A\beta_{25-35}$ y cada antioxidante con los métodos en el programa Gauss view 5.0, posteriormente se optimizaron los cálculos con el nivel de teoría AM1 Y GTO/STO3G en centro de supercomputo de la UAM-Izt

con el cluster Aitzaloo con dominio Aitzaloo.supercomputo.itz.uam.mx. La anterior metodología que se encuentra sintetizada en la figura 7.

Figura 7 Metodología



Capítulo 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias capaces de inhibir, revertir o retardar el proceso oxidativo, interfiriendo con la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de la auto-oxidación. El estudio de las sustancias antioxidantes constituye un tema, de interés debido a que actualmente se utilizan como alternativa terapéutica en diversas enfermedades neurodegenerativas y con el fin de disminuir o retardar los efectos de deterioro de los radicales libres. [36]

Dependiendo de su mecanismo de acción los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios o terciarios. Los antioxidantes primarios impiden la formación de radicales libres al interactuar con ellos, los antioxidantes secundarios interrumpen la reacción de propagación por inactivación o desplazan a las especies reactivas de oxígeno y finalmente los antioxidantes terciarios son capaces de reparar el daño causado a las moléculas. [36]

Muchos compuestos antioxidantes actúan por un único mecanismo, pero otros como por ejemplo los compuestos fenólicos (CF) pueden tener acciones combinadas.[37] Los CF estabilizan los radicales libres (RL) al ceder un hidrógeno de sus grupos hidroxilos, formando un puente de hidrógeno entre los dos compuestos. El grado de actividad de los CF y de otros muchos antioxidantes, está relacionado con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula.

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo. Pueden encontrarse desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos altamente polimerizados con pesos moleculares mayores de 30000 Da [7,8]. Se dividen en 13 subclases con un total de más de 5000 compuestos, pero todos presentan en común un esqueleto hidrocarbonado del tipo C6-C3-C6 (difencilpropano) que se deriva del ácido shiquímico y de tres restos de acetato. Cada porción de seis carbonos comprende un anillo aromático y la de tres carbonos un heterociclo (Figura 7).[40].

De acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en varias familias: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc,[37] en la tabla 6.1 se encuentran los antioxidantes utilizados. Para poder explicar de manera acertada las propiedades estructurales de los antioxidantes es necesario establecer la numeración de sus átomos tanto de carbono como del oxígeno como se observa en la figura 8.

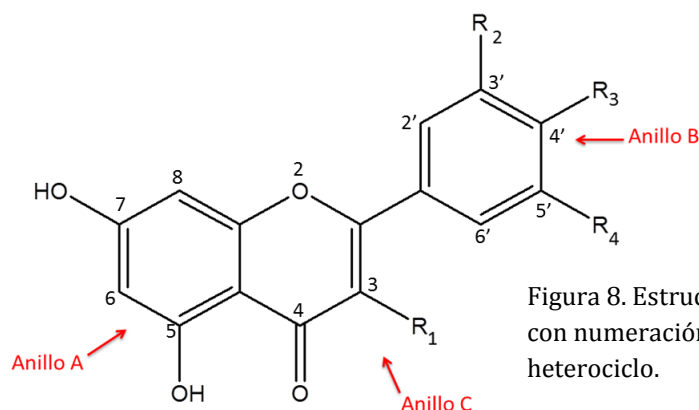


Figura 8. Estructura general de los flavonoides con numeración y especificación de cada heterociclo.

Tabla 6.1 Antioxidantes utilizados y la familia a la que pertenece cada uno.

Familia	Flavonoide
Flavonoles	Quercetina
Flavanoles	Catequina
Flavanoles	Epicatequina
Flavanonas	Hesperina

6.2 Análisis estructural de los antioxidantes

La optimización de las estructuras de la Catequina, Epicatequina, Quercetina y Hesperetina se llevó a cabo con el método semiempírico AM1 con lo que se obtuvo la estructura del flavonoide más estable, posteriormente se llevó a un nivel de optimización más alto de teoría: la combinación de los métodos *ab initio* y funcionales de la densidad (B3LYP con las bases 3-21g(d,p) y 6-31g(d,p)) para obtener valores más confiables de energía y geometría.

Calculo de la (-) Catequina con los diferentes métodos computacionales:

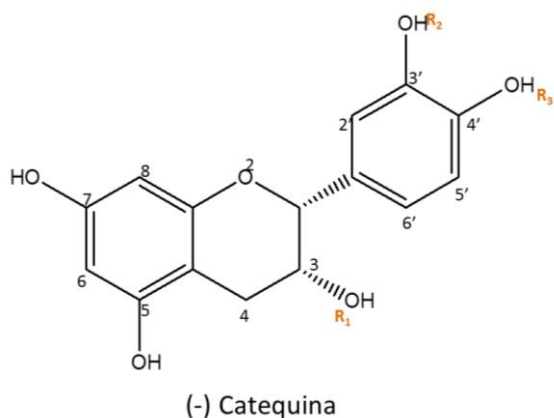


Figura 9. (-) Catequina. Presenta una mayor actividad antioxidante, debido a sus propiedades estructurales. Dicha estructura hace que ejerzan una acción inhibitoria contra los radicales hidroxilo y superóxido, que son los principales inductores de la peroxidación de lípidos [43]. La Catequina es el compuesto fenólico monomérico más abundante en vinos tintos (120-390 mg/L), y también se encuentra en el té negro y verde.

Tabla 6.2 Distancias de enlace (Å) con los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Catequina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R ₁	1.44	1.43	1.43	1.42	1.42
R ₂	1.38	1.37	1.37	1.37	1.36
R ₃	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39

Tabla 6.3 Ángulos de valencia (°) con los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Catequina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R ₁ (H-O-C3)	109.9	109.9	109.8	109.5	108.9
R ₂ (H-O-C3')	110.1	110.2	110.2	110.1	108.7
R ₃ (H-O-C4')	112.9	113.7	113.7	113.5	110.7

Tabla 6.4 Ángulos diedros ($^{\circ}$) con los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Catequina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R ₁ (H-O-C3)	80.7	80.7	80.7	80.5	73.4
R ₂ (H-O-C3')	180.7	179.8	179.8	179.4	179.8
R ₃ (H-O-C4')	177.8	177.2	177.5	177.4	179.7

Se optimizó la (-) Catequina con los métodos AM1, RHF/STO-3G, RHF/3-21+g**, B3LYP/3-21+g**, B3LYP/6-31+g**, y en las tablas 6.2, 6.3 y 6.4 se puede observar que los valores para los enlaces, los ángulos de valencia y los ángulos diedros en los grupos funcionales de interés, prácticamente permanecen invariantes en la medida en que los métodos son cada vez más precisos.

Calculo de la (-) Epicatequina con los diferentes métodos computacionales:

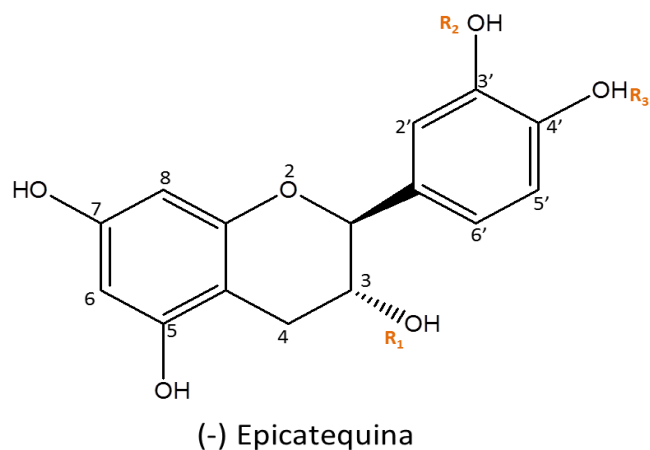


Figura 10. (-) Epicatequina. Es un tipo de flavonoide presente en diversos productos comestibles, principalmente en vegetales y/o frutos, como son las moras, damascos, cerezas, el vino tinto, te y el chocolate sobre todo el negro [42]. Se cree que uno de sus efectos sobresalientes está relacionado con la elevación de los niveles de óxido nítrico en la sangre, lo cual ayuda a relajar los vasos sanguíneos y mejorar su flujo.

Tabla 6.5 Distancias de enlace (Å) con los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Epicatequina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R ₁	1.41	1.43	1.43	1.42	1.42
R ₂	1.38	1.37	1.38	1.37	1.37
R ₃	1.38	1.37	1.39	1.39	1.38

Tabla 6.6 Ángulos de valencia ($^{\circ}$) con los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Epicatequina

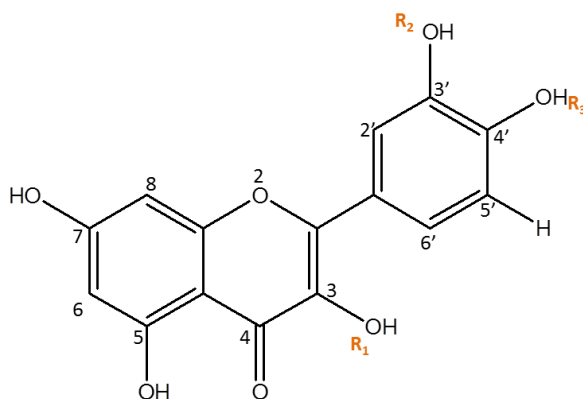
Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R ₁ (H-O-C3)	107.1	109.9	110.2	110.0	109.0
R ₂ (H-O-C3')	108.0	110.2	110.2	109.4	108.7
R ₃ (H-O-C4')	107.8	113.5	113.8	112.7	110.7

Tabla 6.7 ángulos diedros ($^{\circ}$) con los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Epicatequina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R ₁ (H-O-C3-C4)	79.8	80.7	79.1	79.1	68.4
R ₂ (H-O-C4'-C3')	179.2	179.7	179.1	179.1	179.1
R ₃ (H-O-C5-C6)	179.6	177.2	177.0	177.0	178.2

Se optimizó la (-) Epicatequina con los métodos AM1, RHF/STO-3G, RHF/3-21+g**, B3LYP/3-21+g**, B3LYP/6-31+g**, aquí se puede observar que tanto las distancias de enlace como los ángulos de valencia y diedros no sufren cambios drásticos en la medida que el cálculo de minimización de las estructuras se vuelve más exacto.

Calculo de la (-) Quercetina con los diferentes métodos computacionales:



(-) Quercetina

Figura 11. (-) Quercetina. Es un flavonoide ampliamente distribuido en el reino vegetal. Se trata de un compuesto polifenólico presente naturalmente en vegetales, frutas, bebidas no alcohólicas y plantas medicinales. Por ejemplo abunda en manzanas, cebollas, té verde y vino tinto, en donde aparece como glucósido. Entre las principales virtudes de la quercetina destaca su poder removedor sobre los radicales libres, ejerciendo un papel citoprotector en situaciones de peligro de daño celular.[41]

Tabla 6.8 Distancias de enlace (Å) con los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Quercetina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R ₁	1.38	1.38	1.38	1.37	1.36
R ₂	1.38	1.38	1.38	1.37	1.36
R ₃	1.39	1.39	1.39	1.38	1.38

Tabla 6.9 Ángulos de valencia (°) con los diferentes métodos utilizados para la estructura de la (-) Quercetina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R _{1(H-O-C3)}	107	107.5	107.8	107.7	107.6
R _{2(H-O-C3')}	107.1	107.1	110.2	110.0	109.0
R _{3(H-O-C4')}	107.9	107.9	113.8	112.5	111.0

Tabla 6.10 Ángulos diedros (°) con los diferentes métodos utilizados para para la estructura de la (-) Quercetina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R _{1(H-O-C3-C4)}	173.1	173.5	180.0	170.5	168.2
R _{2(H-O-C3'-C2')}	179.5	179.6	180.0	170.9	180.0
R _{3(H-O-C4'-C3')}	179.1	179.1	180.0	179.6	178.8

Se optimizó la (-) Quercetina con los métodos AM1, RHF/STO-3G, RHF/3-21+g**, B3LYP/3-21+g**, B3LYP/6-31+g**, los resultados muestran que la distancia de enlace disminuye ligeramente en la medida que el método se hace más exacto para los grupos funcionales de interés, mientras que los ángulos de valencia aumentan un poco al aumentar el nivel de cálculo. Finalmente los ángulos diedros no muestran una tendencia entre métodos de cálculo.

Calculo de la (-) Hespertina con los diferentes métodos computacionales:

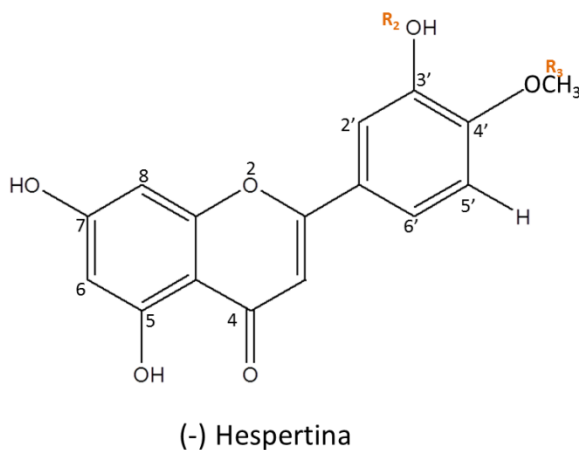


Figura 12. (-) Hespertina. Constituye el principal flavonoide de los cítricos. Aparece principalmente en la piel de la membrana blanca que hay antes de la pulpa de estas frutas. Protege a los capilares, por lo que resulta adecuada para el tratamiento de las varices, protege al estómago de úlceras y es un antialérgico. Previene el desarrollo de tumores cancerosos en el pecho, piel, ovarios, pulmones y vesícula.

Tabla 6.11 Distancias de enlace (Å) con los diferentes métodos utilizados para para la estructura de la (-) Hespertina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R ₂	1.42	1.43	1.43	1.42	1.42
R ₃	1.38	1.37	1.37	1.37	1.37

Tabla 6.12 Ángulos de valencia (°) con los diferentes métodos utilizados para para la estructura de la (-) Hespertina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R ₂ (H-O-C3')	110.7	111.0	111.0	111.0	111.0
R ₃ (C-O-C4')	108.1	109.7	109.7	108.7	108.0

Tabla 6.13 Ángulos diedros (°) con los diferentes métodos utilizados para para la estructura de la (-) Hespertina

Radical	AM1	RHF/STO-3G	RHF/3-21+g**	B3LYP/3-21+g**	B3LYP/6-31+g**
R ₂ (H-O-C3'-C2')	59.1	60.9	60.9	60.8	60.8
R ₃ (C-O-C4'-C3')	178.7	179.7	179.7	179.5	179.3

Se optimizó la (-) Hespertina con los métodos AM1, RHF/STO-3G, RHF/3-21+g**, B3LYP/3-21+g**, B3LYP/6-31+g**. Los resultados muestran que las distancias de enlace y los ángulos de valencia y diedros permanecen prácticamente sin cambios en la medida que el nivel de cálculo aumenta.

6.3 Calculo del potencial electrostático molecular

Primero se calculó el MEP para los antioxidantes en donde observamos que existe un patrón de sitios positivos (baja densidad electrónica) en los extremos de las estructuras como se muestra en la figura 14. Esto que sugiere que los extremos de los antioxidantes aquí señalados pueden interactuar con sitios nucleofílicos.

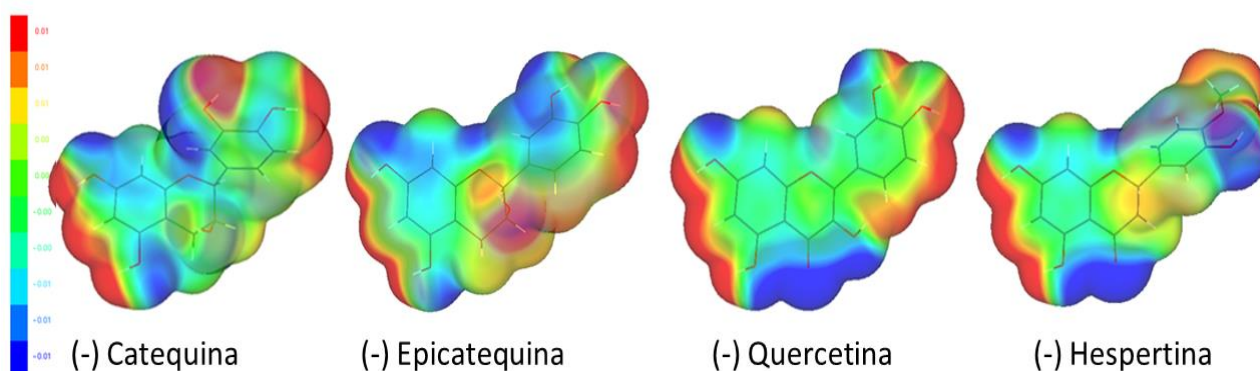


Figura 14. La (-) Catequina, (-) Epicatequina, (-) Quercetina, (-) Hespertina, calculado con B3LYP/6-31+g(d,p) a una isosuperficie de -0.03 (azul) y 0.09 (rojo).

En cada caso se puede observar que los Hidrógenos de los grupos Hidroxilo podrían interactuar fácilmente con las regiones electronegativas de otras moléculas, en nuestro caso con el péptido $A\beta_{25-35}$, formando enlaces por puentes de Hidrógeno.

Al igual que los antioxidantes, también calculamos el MEP para el $A\beta_{25-35}$ con el programa Gaussian09 y posterior mente se visualizaron los resultados con el programa gOpenMol como se muestra en la Figura 13. Aquí, observamos que lo que corresponde a valores muy negativos nos proporciona sitios nucleofílicos o regiones de alta densidad electrónica se encuentran en la parte que corresponde al aminoácido de la metionina y en el aminoácido de la lisina, lo cual sugiere que estos aminoácidos puedan interactuar con electrófilos.

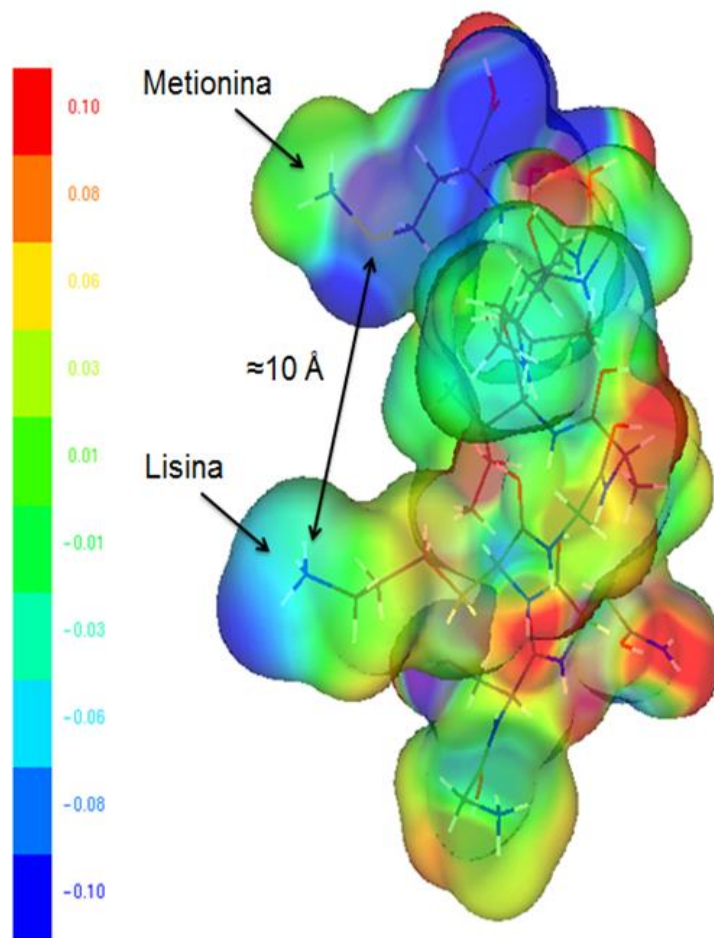


Figura 13 Estructura del péptido $A\beta_{25-35}$ calculado con B3LYP/6-31+g(d,p) y graficado a una isosuperficie de -0.10 y 0.10 u. a.

Además de los resultados anteriores calculamos las distancias que existen entre los aminoácidos Metionina y Lisina del $A\beta_{25-35}$ y las distancias para los extremos de los antioxidantes están alrededor de $\approx 10 \text{ \AA}$ entonces esto nos lleva a la realización de un complejo toxina-flavonoide.

La energía total del sistema $A\beta_{25-35}$ es de -2454049.028 kcal/mol.

6.4 Cálculo de orbitales LUMO

Para detallar el estudio anterior se calculó el LUMO de cada antioxidante (Fig. 15) donde LUMO significa (Lowest Unoccupied Molecular Orbital u Orbital Molecular vacante más bajo), es el orbital de menos energía que se encuentra vacío. Indica el lugar donde más fácilmente la molécula aceptaría un par de electrones cuando lo hace como ácido de Lewis. En el caso particular de radicales, donde tenemos un electrón desapareado.

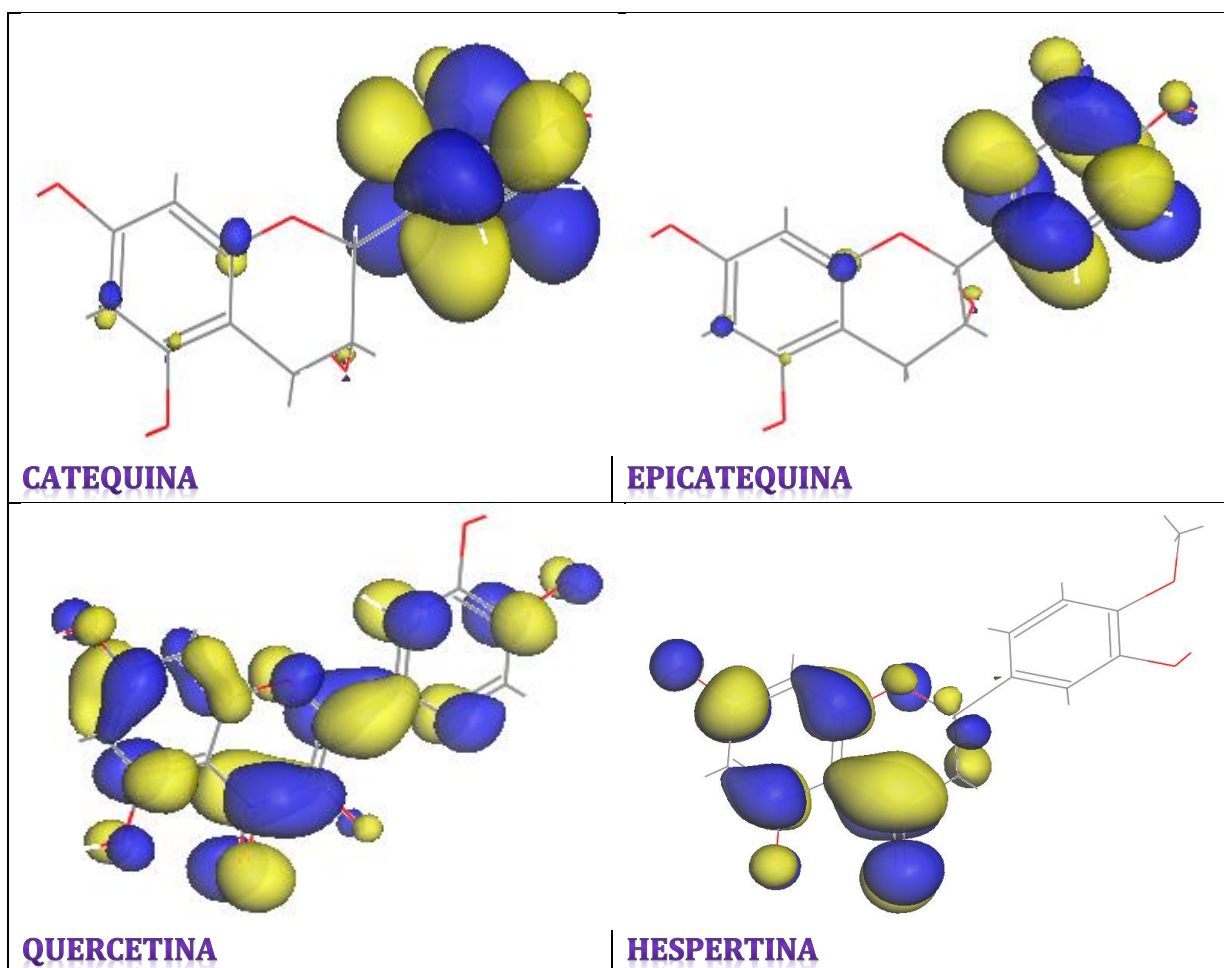


Figura 15. Cálculo de LUMO para observar los orbitales de menor energía.

Como vimos en la introducción, el orbital LUMO, al ser el primer orbital vacante, representa la región de la molécula en la que más fácilmente se aceptaría un electrón adicional. Es decir, la región donde ocurriría preferentemente el ataque

nucleófilo. Aunque, en general, la identificación de las zonas propicias para un ataque nucleófilo se observan más claramente mediante los análisis de población o las regiones positivas de potencial electrostático, la forma del orbital LUMO puede aportar información adicional. La visualización del orbital LUMO es especialmente interesante en el caso de carbocationes, ya que en estos casos el potencial electrostático no resulta ilustrativo (en moléculas cargadas, el potencial electrostático proporciona siempre valores positivos y muy altos).

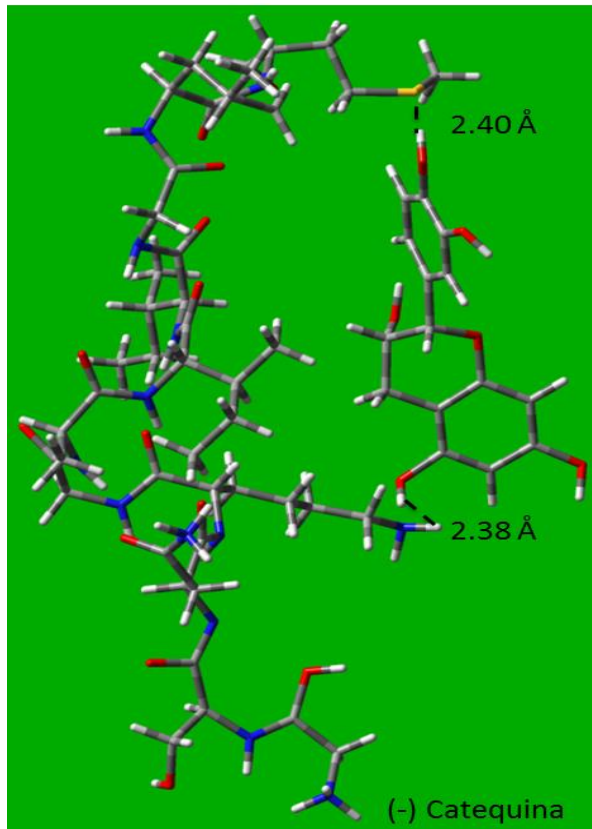
6.5 Formación de complejos

De acuerdo con los tres resultados:

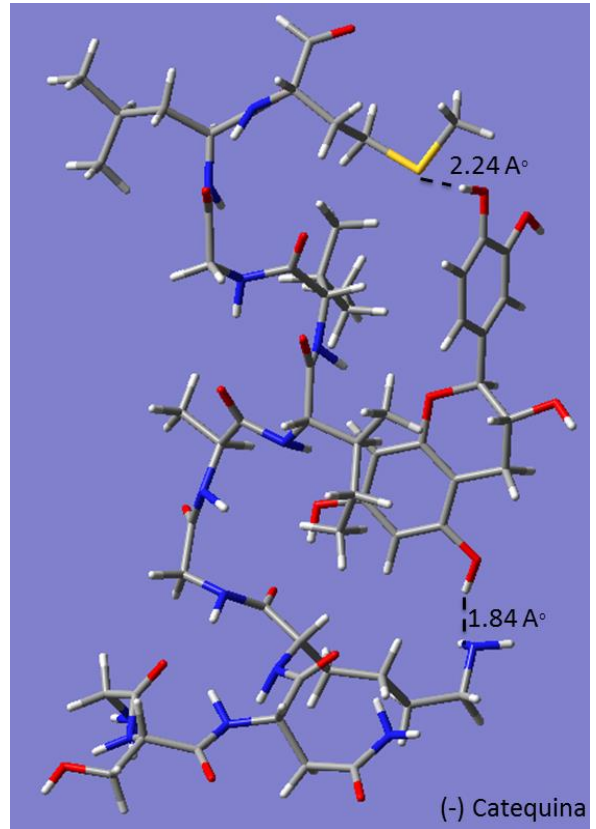
- 1) El cálculo de cada antioxidante
- 2) El potencial electrostático molecular y
- 3) El cálculo de LUMO

Sabemos que es posible formar un complejo entre el péptido tóxico y los antioxidantes para revertir el daño celular. En la figura 16 podemos observar cómo se formaron y fueron optimizados con los métodos AM y RHF/STO-3G

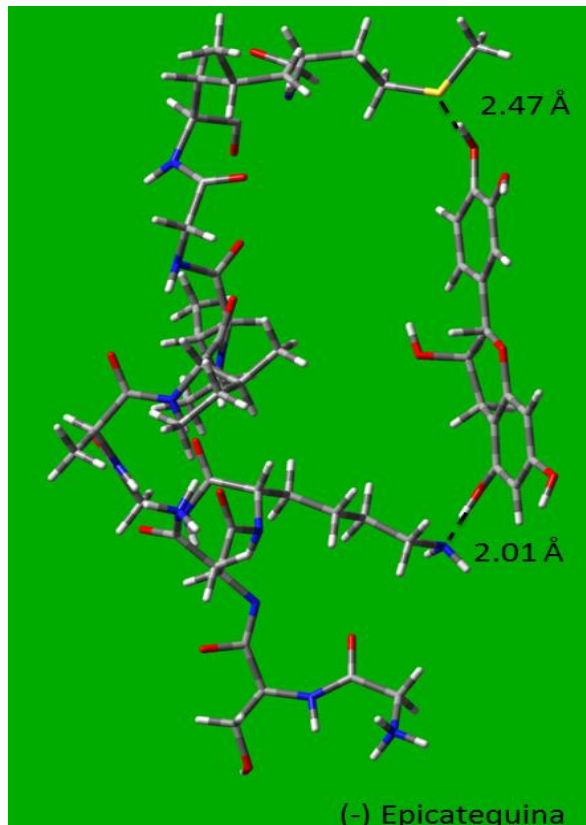
Figura 16. Formación de complejos entre el $A\beta_{25-35}$ calculado con AM1 y RHF/STO-3G



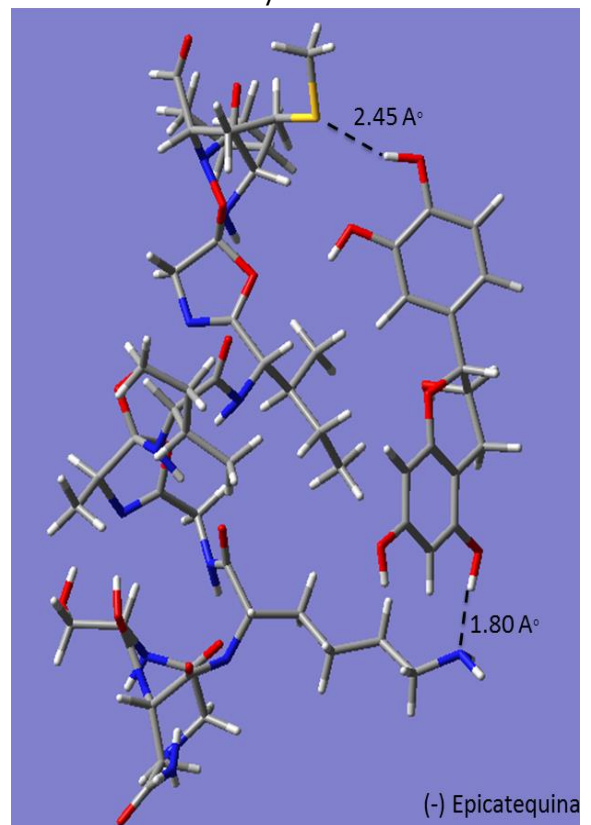
AM1



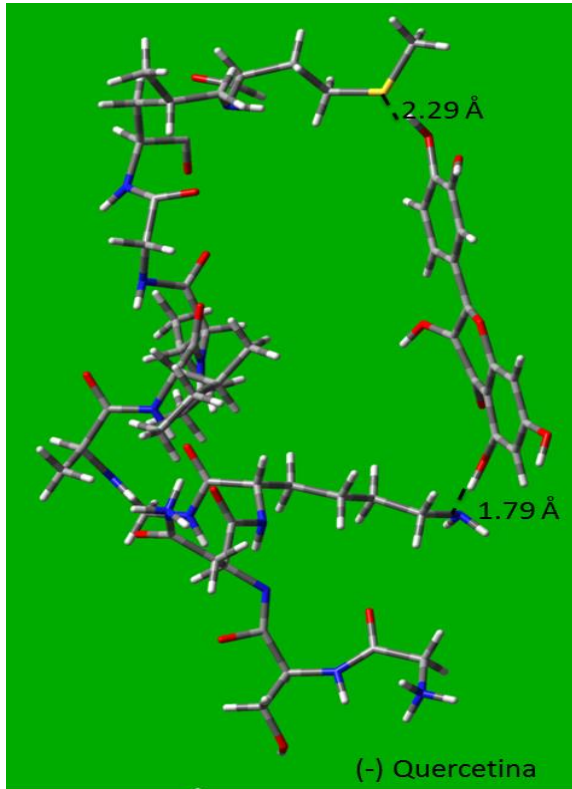
RHF/STO-3G



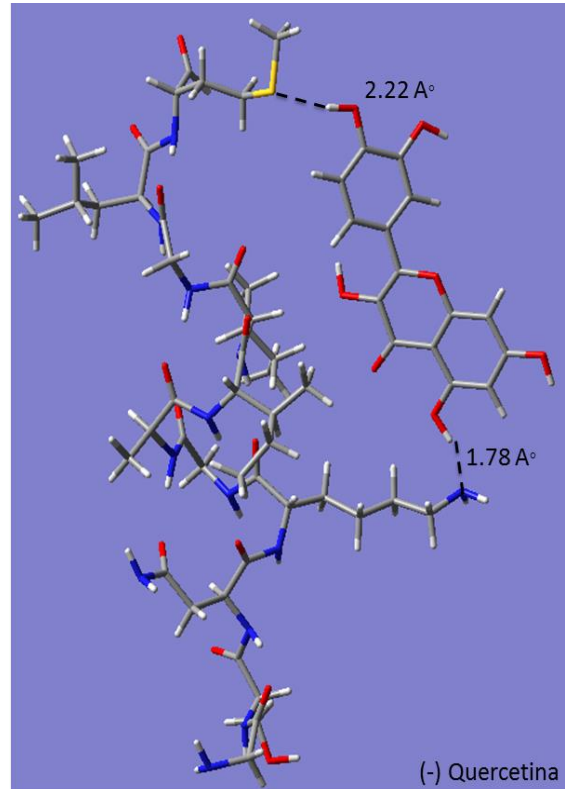
AM1



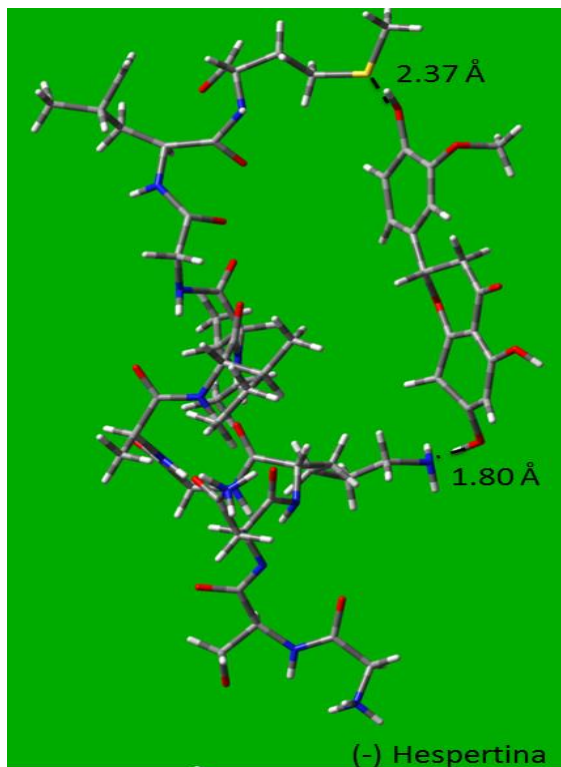
RHF/STO-3G



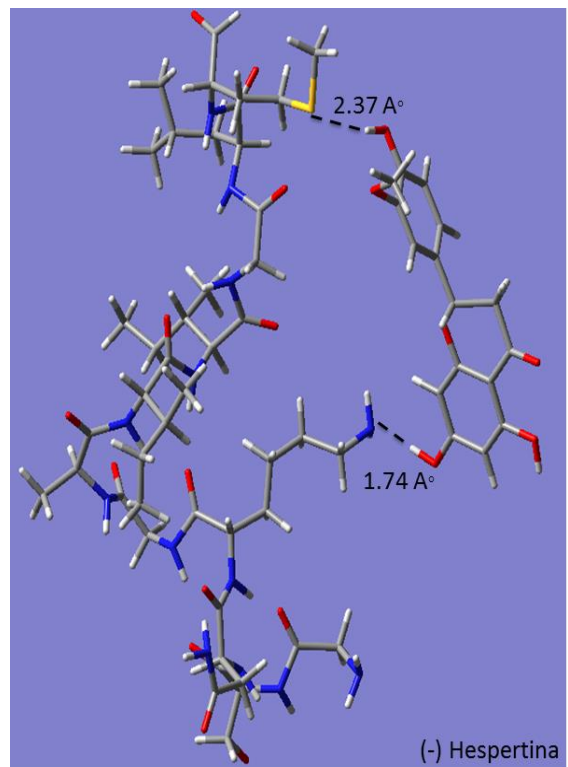
AM1



RHF/STO-3G



AM1



RHF/STO-3G

Los complejos TF formados como se muestra en la Figura 16, señalan que todos los enlaces son por puente de hidrógeno en cuyo rango para esta interacción va desde 2.01 a 2.59 Å.

Para poder evaluar si una interacción es posible por puentes de hidrogeno se toma en cuenta la modificación estructural del complejo A-H---B, es decir el enlace que existe entre A-H en donde a se caracteriza por ser más electronegativo que H (hidrógeno) y la interacción H-B en la que B deberá de contener un par de electrones libres. Con base a esto se pueden clasificar los puentes de hidrógeno en tres categorías: fuertes moderados y débiles, Tabla 14:

Clasificación de las interacciones de puentes de hidrogeno

	Fuerte	Moderado	Leve
Longitud del enlace B---H (Å)	~1.2-1.5	~1.5-2.2	2.2-3.2
Longitud del enlace A---B (Å)	2.2-2.5	2.5-3.2	3.2-4.0
Angulo (A-H---B) (°)	175-180	130-180	90-150

Tabla 14. Clasificación de las interacciones de puentes de hidrogeno según Jeffrey

Esta clasificación y tomando en cuenta la distancia de enlace B---H y la distancia del ángulo O-H---B en los complejos se observa que todos los antioxidantes pueden formar complejos por enlace de puentes de hidrogeno con el péptido A β ₂₅₋₃₅, siendo este enlace de naturaleza moderada.

6.6 Tablas de energías de los antioxidantes

Para poder realizar una reacción química debe consistir en un nuevo agrupamiento de los átomos de los reactivos para formar los productos. Esto supone la ruptura de ciertos enlaces y la formación de otros nuevos. Si se conocen las energías necesarias para romper dichos enlaces, se podría calcular la entalpia de la reacción. Cuanto más alta sea la energía de enlace, mas costara romperlo, por lo que el enlace será más fuerte y más estable.[44]

Tomando en cuenta este concepto, tomamos las energías de cada antioxidante optimizado con diferente metodología (tabla 15) para posterior mente tomar las energías de todo el sistema y saber cuál será más estable.

Tabla 15. Energía (Kcal/mol) de los antioxidantes con diferentes métodos computacionales.

Método	Catequina	Epicatequina	Quercetina	Hespertina
AM1	-211.9712989	-212.015662	-208.7832256	-185.1801839
RHF/STO-3G	-635204.5276	-635204.5726	-680051.2002	-658676.4607
RHF/3-21+g**	-639832.2118	-639799.4897	-685089.9216	-663461.4811
B3LYP/3-21+g**	-639832.2118	-639799.4897	-685089.9216	-663461.4811
B3LYP/6-31+g**	-639832.2118	-639832.2118	-685089.9216	-663461.4811

6.7 Tablas de energías de cada complejo

Tabla 16. Energías (kcal/mol) de cada complejo con los métodos AM1 y RHF/STO-3G

Antioxidante	AM1	RHF/STO3-G
Catequina	-791.220927	-3008620.88
Epicatequina	-549.9048531	-3007944.373
Hespertina	-856.1201008	-3032097.508
Quercetina	-666.1094892	-3053469.231

Tabla 17. Energías de optimización, utilizando la ecuación 6.7.1

$$\text{Ec. 6.7.1} \quad \Delta E_{\text{interacción}} = [E_{\text{productos}}] - [E_{\text{reactivos}}]$$

Antioxidante	AM1	RHF/STO3-G
Catequina	-1537619059	-1938347536
Epicatequina	-1537619086	-1966701943
Hespertina	-1537602274	-1953151509
Quercetina	-1537617061	-1537486257

Podemos hacer la comparación de las energías de la tabla 15 y 16 y observamos que los valores calculados solo con la optimización nos dan resultados de menor energía lo que señala que nuestra forma de calcular es bastante buena y saber que el complejo más estable es la Quercetina.

Conclusión

Los resultados obtenidos con el Potencial electrostático y la función de Fukui, establecieron una interacción entre los antioxidantes y el $A\beta_{25-35}$, debido a estos resultados se pudo formar el complejo. Posteriormente lo enviamos en disolución acuosa para demostrar lo que sucede en el trabajo experimental. Cabe mencionar que esta metodología tiene aplicaciones en química orgánica, farmacología, biología, etc.

La formación del complejo TF, evitaría la formación y polimerización de las fibrillas amiloides y con ello se tendría evidencia molecular de que existe una interacción entre los flavonoides y la toxina que fue sugerida experimentalmente por Ono *et al* [4].

Perspectivas

- ✓ Optimizar los complejos en disolución acuosa para saber su estabilidad de cada uno y compararlos con resultados experimentales ya existentes.
- ✓ Se pretende describir las reacciones entre los radicales libres y los antioxidantes en solución acuosa utilizando una función de base más grande, ya que hasta la fecha es ambigua la reacción que existe entre ellos.
- ✓ Realizar un docking para observar el comportamiento de los antioxidantes con el péptido $A\beta_{25-35}$.

Bibliografía

- [1] Lucia Pancoatl Moyotl. Tesis “Estudio teórico conformacional de la trans-4-(m-CIANOESTERIL)-PIRIMIDINA”. Noviembre 2012
- [3] Elizabeth Montserrat Hernandez Hernandez. Tesis “Efecto del prolame sobre la toxicidad del Amiloide- β 25-35, en un modelo in vivo
- [4] Limón I, El Toxiquito. Vol. 20 No.1. Benemerita Universidad Autonoma de Puepla. Departamento de farmacia. Laboratorio de Neurofarmacologia
- [5] Pruves D; Agustine GJ.; Fitzpatrick D; Katz LC.; La Mantia AS; McNamara JO.; Williams SM. Neuroscience 2th Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; c2001 Aviable in:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fegi?rid=neurosci.TOC&depth=2>
- [6] McHann et al., 1984
- [7] Aguado-Aguilar, 2001
- [8] Selkoe DJ. Alzheimer’s disease is a synaptic failure. Science. 2002; 298(5594):789-791
- [9] Selkoe D, Shenck D (2003). Alzheimer’s disease: Molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. Annu Rev Pharmacol Toxicol.
- [10] Walsh D, Selkoe D (2007) AB Oligomers a decade of discovery. J Neurochem.
- [11] Hass R, Glese G, Meyer G, Hartmann A, Dörk T, Köhler L, Resch K, Traub P, Goppeit-Strüebe M (1990). Differentiation and retrodifferentiation of U937 CELLS: reversible induction and suppression of intermediate filament protein synthesis. Eur J Cell Biol.
- [12] Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, Ninistö L, Halonen P, Kontula K (1995). Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. N Engl J Med.
- [13] Pike C, Overman M, Cotman C (1995). Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptide in vitro. J Biol Chem.

- [14] Yankner B, Duffy L, Kirschner D (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachkinin neuropeptides.
- [15] Hashimoto M, Shahdat H, Katakura M, Tanabe Y, Gamoh S, Miwa K, Shimada T, Shido O (2009). Effects of docosahexaenoic acid in vitro amyloid beta peptide 25-35 fibrillation. *Biochim Biophys Acta*. 1791: 289-296.
- [16] Varadarajan S, Kansaki J, Akesonova M, Lauderback C, Butterfield D (2001). Different mechanism of oxidative stress and neurotoxicity of Alzheimer's A beta (1-42) and A beta(25-35). *J Am Chem Soc*. 123:5625-5631.
- [17] Lin M, Kagan B (2002). Electrophysiologic properties of channels induced by A beta(25-35) in planar lipid bilayers. *Peptide*. 23: 1215-1228.
- [18] Fernandez - Tomé P, Brera B, Árebalo M, Ceballos M (2004). beta-Amyloid 25-35 inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: modulation of uptake as a survival mechanism. *Neurobiol Dis*. 15:580-589.
- [19] Cowburn R, Wehager B, Trief , Li-Li M, Sundström E (1997). Effects of beta-amyloid-(25-35) peptides on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: evidence for a selective affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor. *Neurochem Res*. 22: 1437-1442.
- [20] Torreilles F, Tabcheh S, Guérin M, Torreilles J (1999). Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res Brain Res Rev*. 30: 153-163.
- [21] Edelman G, Gally J (1992). Nitric oxide: linking space and time in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 11651-11652.
- [22] Alderton W, Cooper C, Knowles R (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 357:593-615.
- [23] Limón I, Diaz A, Mendieta L, Chamorro G, Espinoza , Zenteno E, Guevara J (2009^a). Amyloid-beta (25-35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. *Neurosci Res*. 63: 129-137.

- [24] Moncada S, Bolaños J (2006). Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem.* 97: 1676-1689.
- [25] Stewart V, Heslegrave A, Brown G, Clark J, Heales S (2002). Nitric oxide-dependent damage to neuronal mitochondria involves the NMDA receptor. *Eur J Neurosci.* 15:458-464
- [26] Cuevas E, Limón D, Pérez-Severiano F, Díaz A, Ortega L, Zenteno E, Guevara J. 2009. Antioxidantes effects of epicatechin on the hippocampal toxicity caused by Amiloide-beta 25-35 in rats. *Eur J Pharmacol* 616: 122-127
- [27] Andersen J (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause on consequence. *Nat Med.* 10: 18-25.
- [28] "Química teórica y computacional", Juan Andrés, Juan Beltrán y otros, Universidad Jaime I, Castellón de la Plana (2000).
- [29] Manual del programa CS Chem3D Pro 4.0, CambridgeSoft Corporation (1997).
- [30] "Reviews in Computational Chemistry", K. B. Lipkowitz y D. B. Boyd, VCH Publishers Inc. Nueva York (1990).
- [31] "A Computational Approach to Chemistry", D. M. Hirst, Blackwell Scientific Publications, Londres (1990).
- [32] "Molecular Modelling. Principles and Applications", A. Leach, Longmans, Londres (1996)
- [33] "Molecular Mechanics", U. Burkert y N. L. Allinger, American Chemical Society Monograph 177, Washington DC (1982).
- [34] Z. P. Inga.; J. S. Murray.; M. E. Grice.; S. Boyd.; C. J. O'Connor.; P. Politzer. *J. Mol. Struc. (Theoquem)* **2001**, 549, 147-158.
- [35] P. López, F. Méndez, *Org. Lett.* 6 (2004) 1781.
- [36] Gutteidge J (1998). Iron free radical reactions and antioxidant protection, En: free radicals oxidative stress, and antioxidants: pathological and phisicological significance. Springer. 4-11.

- [37] Rice-Evans C, Miller N, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. Free Radical Erratum. Biol Med. 20:933-956.
- [38] Ono, K., Hamaguchi, T., Naiki, H., Yamada, M. (2006) Biochim. Biophys. Acta. 1762, 575-586.
- [39] Christopher Isaac Escamilla Jiménez,¹ Elvis Yane Cuevas Martínez,² Jorge Guevara Fonseca³. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM Vol. 52 No. 2 Marzo-Abril, 2009.
- [40] Gilberto PÉREZ TRUEBA I* & Gregorio MARTÍNEZ SÁNCHEZ. 2001. Los Flavonoides como Antioxidantes Naturales. Centro de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas Preclínicas "Victoria de Girón. Acta Farm. Bonaerense **20** (4): 297-306.
- [41] Gentileza: Lab. Merck S. A. (Brasil). La Quercetina, página web:
- [42] Paolo Valverde Garcia. La Epicaterquina, un flavonoide para recordar página web:
- [43] Daniel Limón¹, Alfonso Díaz¹, Liliana Mendieta¹, Félix Luna¹, Edgar Zenteno² y Jorge Guevara². LOS FLAVONOIDES: MECANISMO DE ACCIÓN, NEUROPROTECCIÓN Y EFECTOS FARMACOLÓGICOS. Lab. de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas BUAP. Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
- [44] <http://www.ieslaaldea.com/documentos/fisicayquimica/bloquev.pdf>