



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reactividad Química Global y Local en el Estudio de  
Diterpenos del Romero para el Tratamiento de  
Alzheimer

Tesis que para obtener el título de:  
Licenciado en Biología

Presenta:  
Luis Fernando Acosta Brito

Directores de Tesis:  
Dra. María Eugenia Castro Sánchez  
Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante



Junio 2023

## ***Agradecimientos***

Quiero expresar mi profunda gratitud a la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP por brindarme el entorno académico para llevar a cabo este trabajo de investigación.

Quiero agradecer a los profesores y académicos de la facultad por su guía, conocimiento y dedicación en la formación de mi carrera académica. Sus enseñanzas y consejos han sido invaluable en mi crecimiento como científico y me han inspirado a buscar constantemente la excelencia en mis estudios.

Quiero dedicar un agradecimiento especial a mis estimados Directores de Tesis, la Dra. María Eugenia Castro Sánchez y el Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante. Su paciencia, guía y compromiso con mi desarrollo académico han sido fundamentales en el éxito de este proyecto de investigación. Gracias por creer en mí y por brindarme la oportunidad de explorar nuevas fronteras científicas bajo su tutela. Me siento afortunado de haber contado con su orientación y evaluación experta durante este proceso.

También quiero expresar mi profundo agradecimiento a los revisores de mi tesis, la Dra. Norma Angélica Caballero Concha y el Dr. Luis Ramiro Caso Vargas. Su dedicación y minuciosa revisión de este trabajo son invaluable para mi preparación y evaluación profesional. Gracias por su tiempo, esfuerzo y valioso apoyo que contribuyen a mejorar la calidad de este trabajo. Sus observaciones críticas y sugerencias constructivas sirven enormemente y me ayuda a crecer como científico.

También deseo agradecer al personal administrativo y de apoyo de la facultad por su amabilidad, disposición y paciencia en todas las etapas de la carrera.

A mis amigos y compañeros de la facultad, les agradezco por su apoyo, su motivación y por compartir conmigo tantas horas de estudio, discusiones y experiencias en el laboratorio. Su compañerismo ha sido un pilar fundamental durante este tiempo y ha hecho que el camino hacia la finalización de esta tesis sea más llevadero.

Además, quiero expresar mi agradecimiento a mi familia por su amor, aliento y comprensión a lo largo de mi carrera. Su apoyo inquebrantable ha sido fundamental para superar los desafíos y obstáculos que he encontrado en este camino.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en este proyecto de investigación, ya sea a través de su colaboración, sus consejos o su inspiración. Su contribución ha enriquecido significativamente este trabajo y ha contribuido a su calidad y relevancia.

Al Laboratorio de Química Teórica de la Facultad de Ciencias Químicas, al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP) por las facilidades otorgadas para realizar este trabajo.



También agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo brindado mediante los proyectos: Proyecto 100256733-VIEP 2022 con el título: “Estructura y Reactividad química de un grupo de xantonas y su interacción con enzimas involucradas en el desarrollo de cáncer de mama. Un estudio teórico” y Proyecto 100517029-VIEP 2023 con título: “Estudio computacional DFT y de acoplamiento molecular de fármacos anti-tuberculosis”.



Agradezco al Cuerpo Académico BUAP-CA-263 “Investigación experimental y computacional de nuevos materiales y sistemas biomoleculares” (PRODEP-SEP).



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioinorgánica Aplicada del Centro de Química del Instituto de Ciencias y el Laboratorio de Química Teórica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde se desarrollan las líneas de generación y aplicación de conocimiento (LGAC): Estudio computacional de nuevos materiales y sistemas moleculares; y Estudio experimental y computacional de mecanismos moleculares de sistemas biológicos.

## ***Dedicatoria***

A mis queridos amigos, estimados maestros y amada familia:

Esta tesis es un testimonio del apoyo, el aliento y la guía que me han brindado a lo largo de este viaje. Es con mi más sincero agradecimiento que dedico este trabajo a todos y cada uno de ustedes.

Para mis queridos amigos su fe en mí ha alimentado mi determinación y su amistad ha traído alegría y compañía a cada paso de este esfuerzo. Con ustedes hice gran equipo de estudio y trabajo sin el que no podría haberlo logrado.

Para mis estimados maestros, su dedicación a la educación me ha inspirado y su orientación ha dado forma a mi crecimiento intelectual, tanto dentro como fuera del aula.

Para mi querida familia, su amor y apoyo inquebrantables han sido mi roca a lo largo de este esfuerzo. Sus sacrificios, comprensión y confianza en mí han proporcionado la base sobre la cual he construido mis actividades académicas. Siempre estaré agradecido por su constante presencia, aliento y confianza en mis habilidades.

Gracias a todos ustedes por su impacto inconmensurable en mi vida y por compartir este triunfo. Este logro es tanto mío como suyo, y dedico este trabajo con profunda gratitud y aprecio.

## ÍNDICE

<b>Introducción</b>	1
<b>Capítulo 1</b>	
<b>1. Antecedentes</b>	4
1.1 Enfermedad de Alzheimer	4
1.2 Péptido $\beta$ -amiloide	8
1.3 Diterpenos del romero	11
<b>Capítulo 2</b>	
<b>2. Justificación, Hipótesis y Objetivos</b>	15
2.1 Justificación	15
2.2 Hipótesis	15
2.3 Objetivos	16
<b>Capítulo 3</b>	
<b>3. Marco teórico</b>	17
3.1 Teoría del funcional de la densidad (DFT)	17
3.2 Funciones de base	19
3.3 Índices de reactividad química global	23
3.4 Índices de reactividad química local	25
3.5 Interacciones intermoleculares	26
<b>Capítulo 4</b>	
<b>4. Metodología</b>	28
4.1. Cálculo de las estructuras moleculares de los diterpenos del romero	28
4.2 Cálculo de los índices de reactividad química global	29
4.3 Cálculo de los índices de reactividad química local	30
4.4 Cálculo de la interacción de los diterpenos del romero con el péptido $\beta$ -amiloide(25-35)	30
<b>Capítulo 5</b>	
<b>5. Resultados</b>	32
5.1 Estructura molecular de los diterpenos del romero	32
5.2 Índices de reactividad química global	34
5.3 Índices de reactividad química local	41
5.4 Interacción de los diterpenos del romero con el péptido $\beta$ -amiloide(25-35)	47
<b>Conclusiones</b>	59
<b>Bibliografía</b>	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Hipótesis de la cascada amiloide- $\beta$ [3]. A la expresión del gen de la proteína precursora de amiloide- $\beta$ (APP) le sigue el procesamiento consecutivo de la proteasa por la $\beta$ -secretasa 1 (BACE1) y el complejo $\gamma$ -secretasa PSEN1 (presenilina 1), PSEN2 (presenilina 2), nicastrina y APH1 (proteína de faringe anterior defectuosa 1) liberando el péptido amiloide- $\beta$ , incluidas las especies patógenas A $\beta$ 42. A $\beta$ 42 sufre cambios conformacionales, se ensambla en oligómeros (2 a 100 unidades) y protofibrillas (>100 kDa), que son neurotóxicos y finalmente se depositan como placas seniles.	5
<b>Figura 2.</b>	Estructura en solución del péptido $\beta$ -amiloide (1-42) involucrado en la enfermedad de Alzheimer, recuperado de <a href="https://www.rcsb.org/structure/1iyt">https://www.rcsb.org/structure/1iyt</a> . A $\beta$ <i>in vitro</i> puede sufrir una transición conformacional de una forma soluble a estructuras de láminas $\beta$ -fibrilares agregadas. En soluciones acuosas de alcoholes fluorados A $\beta$ (1-42) tiene una alta propensión a adoptar conformaciones helicoidales. La estructura de RMN 3D de A $\beta$ (1-42) muestra dos regiones helicoidales que abarcan los residuos 8-25 y 28-38, conectadas por un giro $\beta$ de tipo I regular.	9
<b>Figura 3.</b>	Estructuras de dos isoformas del dímero $\beta$ -amiloide [9]. Se muestran dos isoformas del dímero A $\beta$ , D40 y D42. Los monómeros están marcados como superior (rojo) e inferior (verde). Los residuos de proteínas se muestran en líneas y las estructuras secundarias de la columna vertebral en hojas. Se muestra en una escala de 10 Å.	10
<b>Figura 4.</b>	Ácido carnósico y diterpenos de romero de tipo abietano relacionados. Modificado de la referencia [11].	13
<b>Figura 5.</b>	Estructuras químicas de los diterpenos de romero en estudio.	29
<b>Figura 6.</b>	Estructuras moleculares optimizadas de los diterpenos de romero calculadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	33
<b>Figura 7.</b>	Orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO de los diterpenos de romero calculadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	39
<b>Figura 8.</b>	Gráficas de las funciones de Fukui para ataque nucleofílico $f_k^+$ para los principales átomos de los diterpenos de romero calculadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2 usando análisis de población NBO.	45
<b>Figura 9.</b>	Isosuperficies de las funciones de Fukui para ataque nucleofílico $f_k^+$ de los diterpenos de romero calculadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	46
<b>Figura 10.</b>	Estructura del $\beta$ -amiloide (25-35) calculado en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	48
<b>Figura 11.</b>	Estructuras de los complejos formados entre el A $\beta$ (25-35) y los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	49
<b>Figura 12.</b>	Mapas del potencial electrostático molecular (MEP) de los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	55
<b>Figura 13.</b>	Mapa del potencial electrostático molecular (MEP) del $\beta$ -amiloide (25-35) calculado en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	56
<b>Figura 14.</b>	Mapas del potencial electrostático molecular (MEP) de los complejos formados entre el A $\beta$ (25-35) y los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	57

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Energías electrónicas de las moléculas neutras, $E_N$ , catiónicas, $E_{N-1}$ , y aniónicas, $E_{N+1}$ (en Hartrees) y los momentos dipolares (en Debyes) de los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	34
<b>Tabla 2.</b>	Índices de reactividad global (en eV) de los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2. La energía gap, $E_g$ , está definida como $E_{\text{gap}} = I - A$ .	35
<b>Tabla 3.</b>	Energías de los orbitales frontera HOMO y LUMO (en eV) y energía gap, $E_g$ , de los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2. La energía gap, $E_g$ , está definida como $E_{\text{gap}} = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$ .	38
<b>Tabla 4.</b>	Funciones de Fukui para ataque electrofílico $f_k^-$ , para ataque nucleofílico $f_k^+$ y el descriptor dual $f_k^2$ para los principales átomos de los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2 usando análisis de población NBO. La numeración de los átomos corresponde a la de la Figura 9.	41
<b>Tabla 5.</b>	Energías electrónicas del péptido $\beta$ -amiloide (25-35), $E_{A\beta}$ , de los diterpenos, $E_{\text{diterpeno}}$ , y de los complejos formados entre el $A\beta(25-35)$ y los diterpenos del romero, $E_{A\beta\text{-diterp}}$ (en Hartrees (arriba) y las energías de interacción, $E_{\text{inter}}$ (en kcal/mol) calculadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	47
<b>Tabla 6.</b>	Parámetros de los puentes de hidrógeno de los complejos formados entre el $A\beta(25-35)$ y los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.	52

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia. En la búsqueda por comprender el mecanismo de la enfermedad y las claves para mejorar el tratamiento, la investigación avanza cada vez más en la búsqueda de nuevos fármacos. En los últimos años se han estudiado los diterpenos del romero por su potencial terapéutico contra la EA. En el presente trabajo de tesis se realizó un estudio computacional de diterpenos extraídos de esta planta: ácido carnósico (1), carnosol (2), 12-metoxil ácido carnósico (3), ácido rosmarínico (4), epirosmanol (5) y rosmadial (6). A partir de sus estructuras optimizadas mediante la teoría del funcional de la densidad en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2 se obtuvieron los descriptores de reactividad global como el potencial químico ( $\mu$ ), la electronegatividad ( $\chi$ ), la dureza ( $\eta$ ), la blandura ( $s$ ) y el índice de electrofilicidad ( $\omega$ ), así como descriptores locales como las funciones de Fukui  $f_k^-$  y  $f_k^+$ , para comprender su interacción con el péptido  $\beta$ -amiloide (25-35). Los resultados de los índices de reactividad global muestran en general que el ácido rosmarínico (4), el epirosmanol (5) y el rosmadial (6) tienen mayor capacidad de aceptar electrones, es decir, tienen un poder electrofílico mayor, mientras los sistemas con mejores propiedades como donadores son el ácido carnósico (1), el carnosol (2) y el 12-metoxil ácido carnósico (3). Los descriptores locales muestran que los valores más altos de  $f_k^+$  corresponden a los protones del grupo ácido del ácido carnósico (1), el 12-metoxil ácido carnósico (3) y el ácido rosmarínico (4), los cuales son los más propensos a sufrir un ataque nucleofílico por parte del átomo de azufre de la Met<sub>35</sub> del A $\beta$  (25-35), formando interacciones de puente de hidrógeno fuertes. Estas interacciones pueden ser clave en la interrupción de la cascada de agregación de las placas seniles (PS), la cual es una de las hipótesis más difundidas sobre la EA.

## INTRODUCCIÓN

El romero (*Salvia rosmarinus* L.) es una de las especies de mayor importancia económica de la familia Lamiaceae. Esta planta originaria de la región mediterránea es conocida ampliamente en todo el mundo por sus usos culinarios, medicinales y comerciales. Entre los compuestos más importantes aislados de la planta se encuentran los diterpenos fenólicos de tipo abietano, que son responsables de la mayor parte de las actividades antioxidantes y farmacológicas de la planta.

En los últimos años se han estudiado los diterpenos del romero para inhibir la muerte celular neuronal inducida por una variedad de agentes tanto *in vitro* como *in vivo*. El potencial terapéutico de estos compuestos en la enfermedad de Alzheimer (EA) se ha estudiado en relación a la química de los compuestos y los diversos objetivos farmacológicos de la enfermedad. Se ha analizado la actividad multifuncional de los compuestos, que van desde la protección general de las neuronas mediada por antioxidantes hasta otros mecanismos específicos, incluida la inflamación cerebral y la formación, polimerización y patología de la beta amiloide ( $A\beta$ ).

La química computacional es una disciplina muy importante ya que permite entender las propiedades químicas, físicas y estructurales de una molécula. Mediante ésta se pueden desarrollar modelos, calcular y predecir propiedades, y comparar con los resultados de laboratorio para comprobar si los cálculos coinciden con la realidad. Desde el punto de vista de la investigación, contar con un modelo predictivo es valioso puesto que se dispone de una comprensión fundamental del proceso y luego se puede utilizar para predecir otros procesos. Asimismo es menos costoso hacer química *in silico* que *in vitro* o *in vivo*.

Al aplicar métodos teóricos de la química, la química computacional se usa a menudo para predecir geometrías moleculares estables y propiedades relacionadas con la distribución de los electrones dentro de las moléculas. Mediante teorías y programas con algoritmos implementados en ellos, se pueden calcular las propiedades estructurales, electrónicas, espectroscópicas y de

reactividad de las moléculas. La teoría del funcional de la densidad (DFT, *Density Functional Theory*), por ejemplo, ha sido muy popular para realizar cálculos de sistemas moleculares desde la década de 1970, debido a que la DFT predice una variedad de propiedades moleculares: estructuras moleculares, frecuencias vibracionales, energías de ionización, propiedades electrónicas, etc., con bastante precisión y a costos computacionales razonables.

Los descriptores de reactividad química global y local definidos en el marco de la teoría del funcional de la densidad conceptual (cDFT, *conceptual-DFT*), el potencial químico, la electronegatividad, la dureza, la blandura, la electrofilicidad, la dureza y la blandura local, así como las funciones de Fukui o las funciones de Parr, han sido estudiados y reportados en la literatura por varios grupos de investigación y han demostrado ser muy útiles para describir el comportamiento reactivo de las moléculas. Los descriptores se clasifican en referencia a todo el sistema, lo que se denomina "descriptores de reactividad global", o en referencia a una parte local del sistema (un átomo o grupo), que se denomina "descriptores de reactividad local".

La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia. En la búsqueda por comprender el mecanismo de la enfermedad y las claves del tratamiento, la investigación avanza cada vez más con la esperanza de finalmente tener en un futuro una terapia específica contra el Alzheimer.

Teniendo en mente la importancia de la enfermedad del Alzheimer por su prevalencia, los estudios prometedores hasta la fecha sobre moléculas de diterpenos del romero como una posible terapia y la química computacional como una herramienta de gran utilidad, en el presente proyecto de tesis se realizó un estudio computacional de los principales diterpenos extraídos de esta planta, mediante la teoría del funcional de la densidad para obtener sus descriptores de reactividad global y local y comprender su interacción con el péptido  $\beta$ -amiloide (25-35) involucrado en la enfermedad de Alzheimer.

A continuación se describe brevemente la estructura de la tesis:

En el capítulo 1 se introducen los antecedentes del trabajo describiendo brevemente y de manera general la enfermedad del Alzheimer, mencionando

algunos datos relevantes como la prevalencia, su diagnóstico, el mecanismo de la enfermedad explicado desde la teoría amiloide. En este capítulo también se habla de la importancia del péptido amiloide en la progresión de la enfermedad por la oligomerización de éste y la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares. De este péptido se mencionan algunas características como el tamaño, la proteína precursora de éste, la vía amiloidogénica y las propiedades neurotóxicas. Asimismo se da una descripción general de los terpenos del romero; una descripción de la planta, la ruta metabólica de los terpenoides, su estructura química basada en un esqueleto de ácido carnósico y sus derivados, los mecanismos antioxidantes y las propiedades reportadas y descritas en la literatura hasta ahora.

En el capítulo 2 se detallan la justificación del trabajo, la hipótesis y los objetivos. En el capítulo 3 se establece el marco teórico comenzando por la teoría del funcional de la densidad (DFT) y la selección del nivel de teoría utilizado. Se menciona también la importancia de los descriptores de reactividad global y local, así como su interpretación. Adicionalmente, se describen el tipo de interacciones que se pueden llevar a cabo entre los diterpenos del romero y el péptido  $\beta$ -amiloide.

En el capítulo 4 se describe la metodología de trabajo, desde la obtención de las moléculas en las bases de datos, el proceso de optimización de las geometrías, el cálculo de los índices de reactividad química global y local, y la metodología para el análisis de la interacción de los diterpenos del romero con el péptido  $\beta$ -amiloide (25-35). También se mencionan los programas utilizados en cada paso de la metodología.

En el capítulo 5 se detallan, se analizan y se discuten los resultados de los cálculos mencionados. Se analizan los índices de reactividad química global y local que favorecen la interacción de los diterpenos del romero con el péptido  $\beta$ -amiloide (25-35). Se describe el tipo de interacciones involucradas entre ambas especies, para por último proporcionar las conclusiones del estudio.

Finalmente, se incluye la bibliografía consultada en el desarrollo del proyecto.

# CAPÍTULO 1

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Enfermedad de Alzheimer

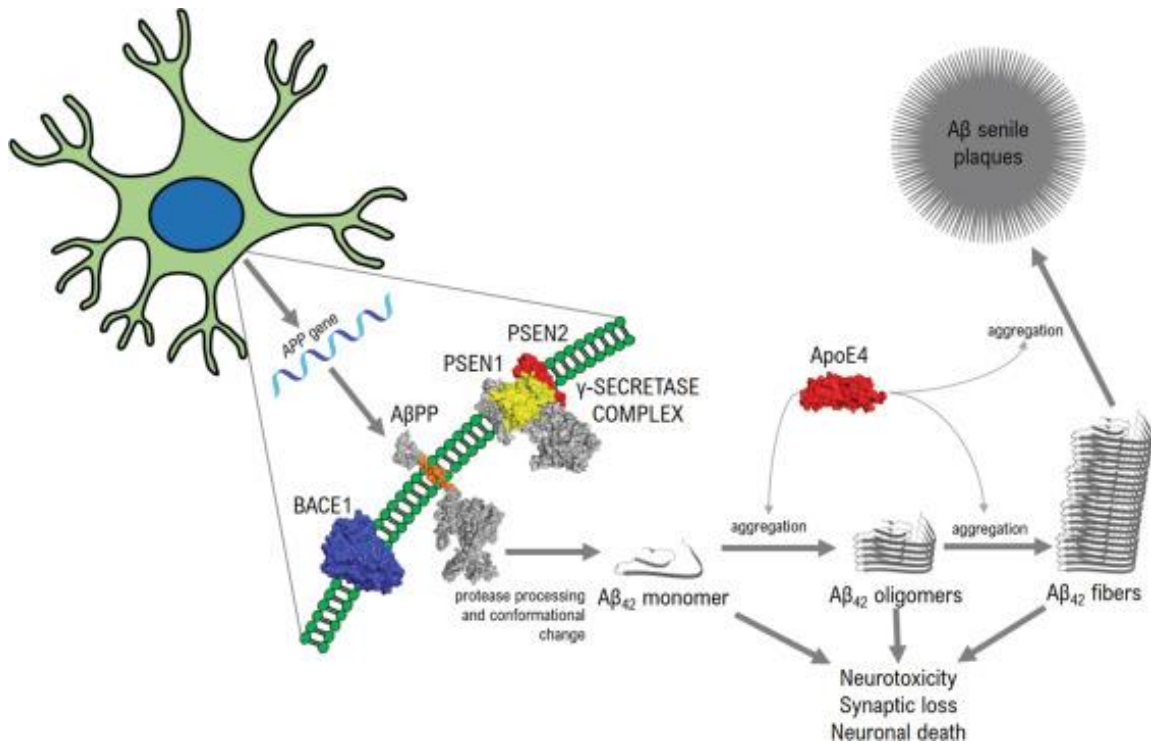
La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo complejo. La principal consecuencia del desarrollo de esta enfermedad es la demencia progresiva en los adultos mayores, siendo la mayor causa de demencia a nivel mundial, contribuyendo entre un 60 y 70% de los casos de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud.

El diagnóstico se hace comúnmente tras observar trastorno cognitivo y la sospecha de demencia, entonces se hace una evaluación neuropsicológica, en donde se considera posible o probable que se tenga la enfermedad. También se pueden utilizar pruebas de imagen cerebral como la Resonancia magnética nuclear (RMN), Tomografía axial computarizada (TAC) o Tomografía por emisión de positrones (TEP). Para la confirmación histológica, se tiene que hacer un examen del tejido cerebral *post mortem* [1].

El cerebro afectado exhibe astrogliosis, atrofia neuronal y pérdida neuronal y se caracteriza por la presencia generalizada de dos tipos de estructuras anormales: las denominadas placas seniles (PS) y ovillos neurofibrilares (NFT). En la década de 1980, se demostró que las placas seniles consisten en fibrillas amiloides compuestas por el péptido  $\beta$ -amiloide, mientras que los NFT contienen haces inmunoquímicos de filamentos helicoidales emparejados de la proteína asociada a los microtúbulos, la proteína  $\tau$  [2].

La enfermedad de Alzheimer, la causa más común de demencia, se define principalmente por la presencia combinada de péptido amiloide y proteína  $\tau$ , sin embargo los investigadores más recientemente están planteando otras hipótesis diferentes a la propuesta de la hipótesis amiloide original. Es probable que los factores relacionados con la edad y que promueven la enfermedad interactúen con los mecanismos centrales de la EA [2].

En esta enfermedad, aunque se ha estado tratando de establecer los determinantes moleculares, el mecanismo todavía no se conoce bien, ni se puede señalar una causa específica. La hipótesis de la cascada amiloide es el modelo más influyente en la investigación de la EA, que en los últimos 30 años aproximadamente ha jugado un papel destacado en la explicación de la aparición y desarrollo de este tipo de demencia. Se basa en la idea de que una "cascada química" hace que se acumulen depósitos extracelulares anormales de material proteico de  $\beta$ -amiloide, que acaban destruyendo las neuronas (ver Figura 1). Esta hipótesis afirma que estos depósitos marcan el inicio patológico de la EA [2].



**Figura 1.** Hipótesis de la cascada amiloide- $\beta$  [3]. A la expresión del gen de la proteína precursora de amiloide- $\beta$  (APP) le sigue el procesamiento consecutivo de la proteasa por la  $\beta$ -secretasa 1 (BACE1) y el complejo  $\gamma$ -secretasa PSEN1 (presenilina 1), PSEN2 (presenilina 2), nicastrina y AβPP (proteína de faringe anterior defectuosa 1) liberando el péptido amiloide- $\beta$ , incluidas las especies patógenas Aβ42. Aβ42 sufre cambios conformacionales, se ensambla en oligómeros (2 a 100 unidades) y protofibrillas (>100 kDa), que son neurotóxicos y finalmente se depositan como placas seniles.

Gracias a varios años de investigación se ha asociado a la EA con la presencia del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en grandes oligómeros y fibrillas que dañan las células cerebrales sanas. Desde principios de 1900, con la investigación de Alois Alzheimer (y Oskar Fischer, de forma independiente) se planteó una conexión entre la EA y la proteína amiloide en el cerebro. Los investigadores reconocieron depósitos oscuros de algún tipo de proteína amiloide en los cerebros de personas fallecidas que presentaron pérdida de memoria y demencia. La asociación de estas placas con neuronas moribundas sugería que estaban implicadas en la enfermedad. Asimismo reconocieron que los "ovillos neurofibrilares" también estaban presentes como signo de la patología [4].

Las placas seniles (PS) son la lesión más temprana en la EA, son depósitos extracelulares densos e insolubles de fibrillas amiloides, que se agregan de forma anormal. Están constituidas por un núcleo de  $\beta$ -amiloide (BA). Este núcleo se encuentra rodeado por neuritas degeneradas (prolongación del soma), microglías activadas y astrocitos que le dan un aspecto de nido. Otras sustancias que conforman las PS son la  $\alpha$ -sinucleína (principal componente no amiloide),  $\alpha$ 1-antiquimotripsina,  $\alpha$ 2-macroglobulina, la apolipoproteína E, ubiquitina y las presenilinas [5].

La EA se caracteriza por la formación de estructuras enredadas como ovillos neurofibrilares (ONF). Las neuronas presentan acumulación de inclusiones en forma de llama alargada y a veces forman una cesta alrededor del núcleo. Sucesivamente las inclusiones llenan el citoplasma, particularmente en el soma y la dendrita apical facilitando la neurodegeneración y muerte neuronal principalmente por mecanismos apoptóticos, quedando luego sólo el citoesqueleto (nódulos sepulcrales) [1].

Una placa de EA clásica tiene un núcleo denso de proteínas fallidas rodeado por un halo menos denso de proteínas anormales, y también está rodeado por muchas proyecciones de neuronas cercanas. También están presentes astrocitos activados y microglía, lo que sugiere que ha estado ocurriendo un proceso degenerativo durante algún tiempo y que los mecanismos de reparación habituales no estaban funcionando de forma normal [5].

La AE preclínica se define como biomarcadores que indican cambios patológicos en individuos cognitivamente sanos. El amiloide  $\beta$ 42 y las proteínas  $\tau$  son biomarcadores cerebrospinales centrales establecidos. Los nuevos biomarcadores candidatos incluyen  $\beta$ -oligómeros de amiloide y marcadores sinápticos. La resonancia magnética y la PET con fluorodesoxiglucosa son modalidades de imagen establecidas para el diagnóstico de la EA [6].

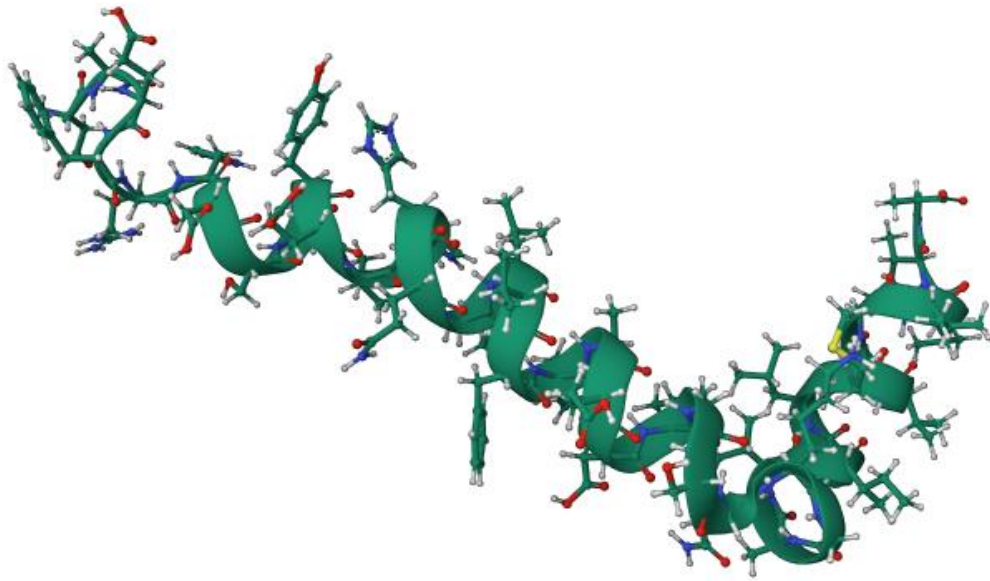
A la largo de todos estos años de estudio se continuó dando gran cantidad de apoyo a la hipótesis de la cascada amiloide, sin embargo los ensayos clínicos dirigidos a  $A\beta$  no han sido satisfactorios, con resultados negativos atribuidos a insuficiencias en la selección de pacientes, desafíos en farmacología y conocimiento incompleto del objetivo más apropiado. Existe evidencia de que se ha logrado una prueba de concepto, es decir, la eliminación de  $A\beta$  durante la vida, pero no es claro que haya cambios significativos en la trayectoria cognitiva en la enfermedad. Recientemente se ha publicado en la revista Science un informe sobre imágenes manipuladas en una serie de artículos muy influyentes sobre el amiloide y la EA. Ha habido mucho trabajo (y mucha especulación) sobre la posibilidad de que haya formas de péptido  $\beta$  amiloide difíciles de detectar que sean las verdaderas culpables del Alzheimer. Entre la década de 1990 y principios de la de 2000, hubo diversas publicaciones sobre oligómeros patógenos de amiloide solubles y el estado de oligomerización asociado con la enfermedad. En 2006, se publicó un artículo del laboratorio de Karen Ashe en Minnesota sobre el trabajo de Sylvain Lesné sobre una forma de amiloide llamada  $AB^{*56}$ . Al aislar esta especie de un modelo de ratón transgénico e inyectarla en ratas jóvenes les llevó a mostrar defectos de memoria a su vez, llamando mucha la atención sobre una posible evidencia inequívoca de la causa de la enfermedad. Desde entonces, este trabajo ha sido citado más de 2000 veces, pero en trabajos posteriores de revisión se informó en el sitio web de PubPeer una posible manipulación de imágenes [4]. Con el tiempo se determinará si los esfuerzos y el gasto de la terapia dirigida a  $A\beta$  resultarán valiosos, ya que los ensayos clínicos centrados en  $A\beta$  continúan dominando las estrategias terapéuticas. A pesar de esto se mantiene

razonable plantear la hipótesis de que la cascada amiloide está íntimamente involucrada en la EA.

## 1.2 Péptido $\beta$ -amiloide

El péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) es un péptido que consta de aproximadamente 40 aminoácidos formados por la escisión secuencial de la proteína precursora de amiloide- $\beta$  (PPA) por acción de la  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa. La proteína precursora de este péptido es mucho más grande, de ~100-130 kDa. Los fragmentos de péptidos predominantes en las placas, provenientes de la escisión proteolítica de PPA, están formados principalmente por  $A\beta$  1-40 y  $A\beta$  1-42 [2].

El péptido  $\beta$ -amiloide tiene las características estructurales de las proteínas de membrana (ver Figura 2). Los estudios conformacionales de estos péptidos en solución acuosa se complican por su tendencia a agregarse. Todos estos estudios apuntan a la presencia de dos regiones helicoidales, conectadas a través de un pliegue flexible. Se encuentra en las membranas citoplasmáticas, endosomal y del sistema de Golgi tanto del sistema nervioso como de las células sanguíneas. Es el principal componente proteico que se encuentra en los depósitos de placas seniles. La secuenciación completa del péptido  $A\beta$  ha demostrado que consta de 39-43 residuos de aminoácidos. Antes de la escisión de la molécula de PPA, los 28 residuos *N*-terminales de  $A\beta$  son extracelulares y los residuos restantes están dentro del dominio transmembranal. Los 12 residuos de aminoácidos C-terminales del péptido  $A\beta$  son hidrofóbicos, lo que confiere al péptido la capacidad de autoagregarse y polimerizarse en fibrillas de amiloide [6].

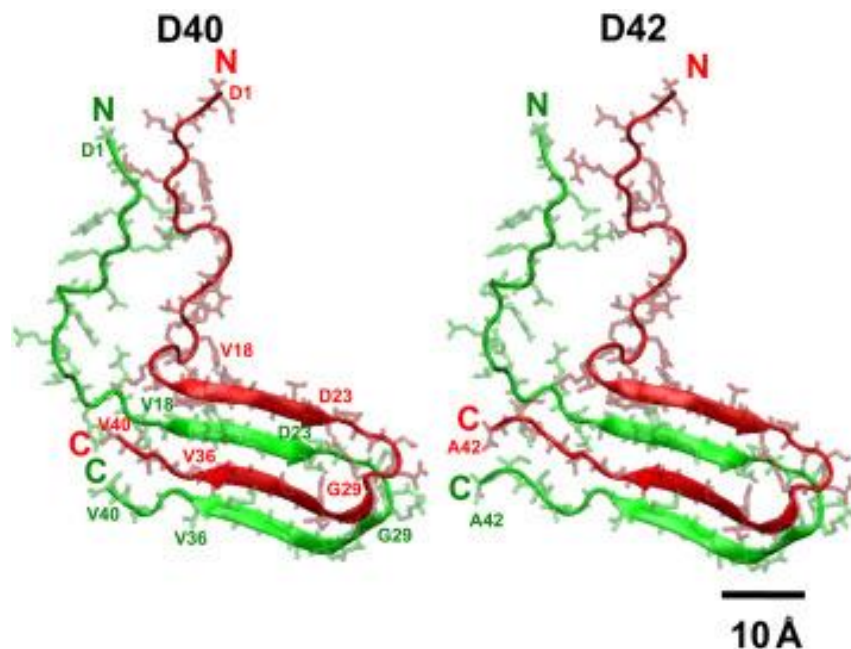


**Figura 2.** Estructura en solución del péptido  $\beta$ -amiloide (1-42) involucrado en la enfermedad de Alzheimer, recuperado de <https://www.rcsb.org/structure/1iyt>.  $A\beta$  *in vitro* puede sufrir una transición conformacional de una forma soluble a estructuras de láminas  $\beta$ -fibrilares agregadas. En soluciones acuosas de alcoholes fluorados  $A\beta$  (1-42) tiene una alta propensión a adoptar conformaciones helicoidales. La estructura de RMN 3D de  $A\beta$  (1-42) muestra dos regiones helicoidales que abarcan los residuos 8-25 y 28-38, conectadas por un giro  $\beta$  de tipo I regular.

Las isoformas que se expresan en las neuronas (isoforma de PPA con 695, 714, 751 y 770 a.a) que contienen el exón 15 son más amiloidogénicas y liberan mucho más péptido  $A\beta$  42 que las isoformas no neuronales. Se expresa en numerosas células: las neuronas, las células musculares lisas de la pared vascular y las plaquetas. A pesar del tiempo que se lleva estudiando, aún se desconoce la función de la PPA en la célula [7].

Conocer la estructura del péptido  $A\beta$  y sus agregados es muy importante para comprender su química. Ni  $A\beta$  (1–40) ni  $A\beta$  (1–42) cristalizan, por lo que no hay una estructura de rayos X de su monómero en ninguna de sus formas. Sin embargo, en condiciones controladas, ambas forman fibrillas cuyas estructuras son adecuadas para el análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de estado sólido. A partir de esto se pueden describir

características importantes de la estructura del monómero "sólido". Un estudio clave de fibrillas de A $\beta$  (1-40) mostró que están compuestas de unidades A $\beta$  diméricas apiladas como hojas B cruzadas (ver Figura 3). Las fibrillas de A $\beta$  (1–42) tienen una estructura idéntica, excepto que los dos monómeros que forman la unidad dimérica repetitiva de la fibrilla están desplazados entre sí por dos residuos. La estructura del monómero A $\beta$  en la unidad de propagación dimérica de las fibrillas consta de dos cadenas  $\beta$  plegadas espalda con espalda a través de una curva de horquilla (motivo de estructura secundaria horquilla  $\beta$ ). Las hebras  $\beta$  se retuercen para formar enlaces de hidrógeno amida-amida a lo largo del eje de la fibrilla, por lo que las cadenas laterales apuntan hacia adentro y hacia afuera en la horquilla. La curva cerrada está estabilizada por un puente salino entre D23 (aspartato) y K28 (lisina). De forma aislada, cada una de sus dos hebras  $\beta$  del monómero gira 90 grados para formar una hoja  $\beta$  interna antiparalela. La formación de estructuras de bucles en horquilla estabilizadas por puentes salinos es un precursor de la formación de fibrillas, como lo demuestra el forzamiento explícito de un puente lactámico entre D23 y K28 [8].



**Figura 3.** Estructuras de dos isoformas del dímero  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) [9]. Se muestran dos isoformas del dímero A $\beta$ , D40 y D42. Los monómeros están marcados como superior (rojo) e inferior (verde). Los residuos de proteínas se muestran en líneas y las estructuras secundarias de la columna vertebral en hojas. Se muestra en una escala de 10 Å.

### 1.3 Diterpenos del romero

El romero (*Salvia rosmarinus* L., sinónimo: *Rosmarinus officinalis* L.) es una de las hierbas culinarias más populares cultivadas en todo el mundo. Sus hojas se utilizan para obtener los extractos que se utilizan habitualmente como antioxidante natural para mejorar la vida útil de los alimentos perecederos. La Unión Europea ha aprobado el extracto de romero (E392) como antioxidante natural seguro y eficaz para la conservación de alimentos [10].

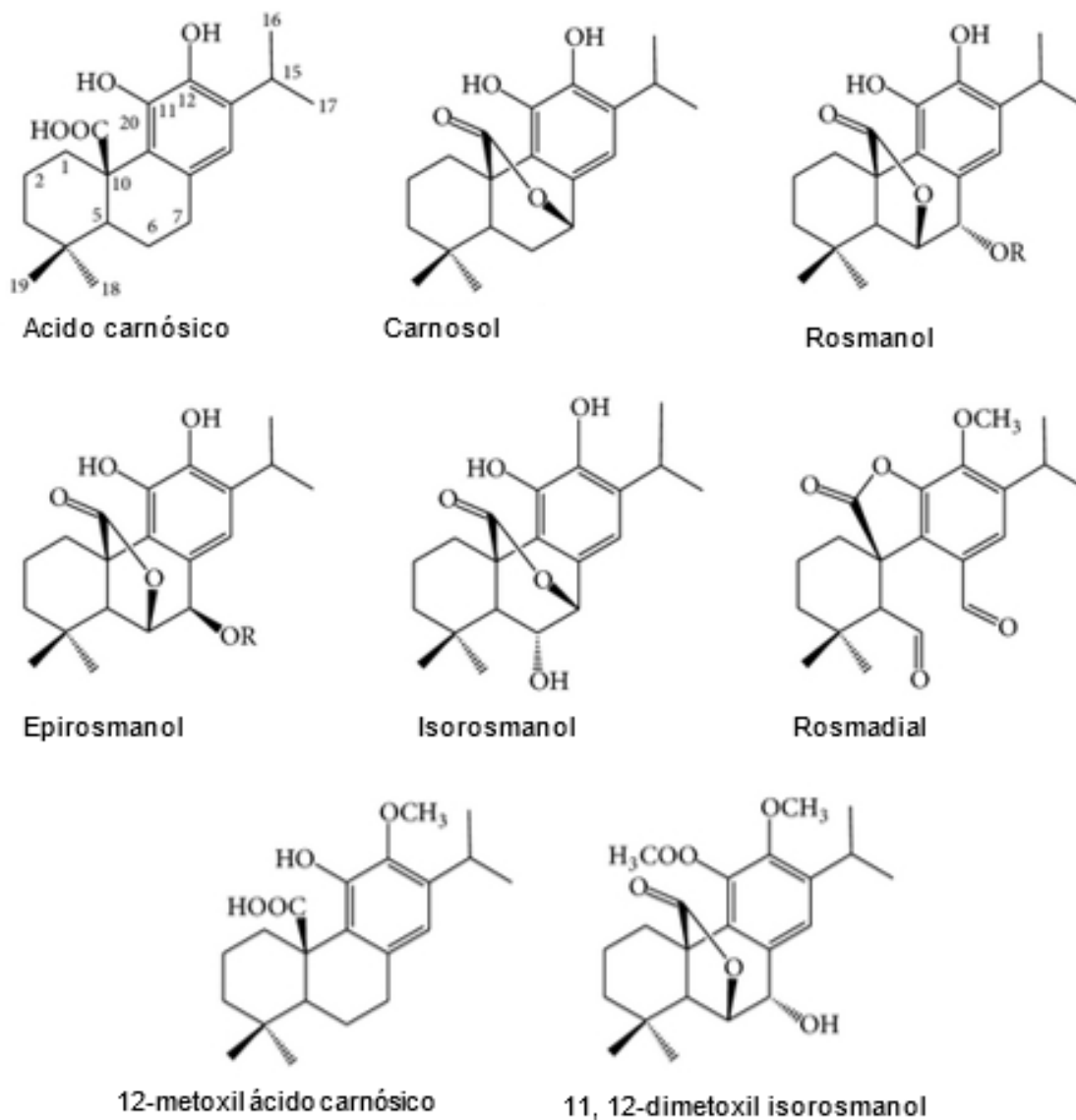
El grupo más importante de compuestos aislados del romero son los diterpenos polifenólicos [11]. La biosíntesis de los diterpenos se deriva de los terpenoides o de la ruta del mevalonato, consistiendo en estructuras repetidas de 5 carbonos, con isopreno como unidad. Los dos bloques de construcción de isopreno conocidos son el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), que en una polimerización de cabeza a cola forman el precursor de diterpeno de 20 carbonos (4 unidades de isopreno), llamado pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP, 3). El procesamiento del GGPP a través de reacciones como ciclación, aromatización, reordenamientos y una serie de pasos de reacción que comienzan con la pérdida del grupo fosfato, incluida la eliminación del ion carbonio, conduce a la formación de los subgrupos diterpenos. La clase de diterpenos identificados hasta ahora en el romero es del tipo abietano, que consta de sistemas de anillos tricíclicos de seis miembros, uno de los cuales es aromático [12].

El ácido carnósico y el carnosol (ver Figura 4) son los principales diterpenos fenólicos extraídos del romero con mayor actividad antioxidante. Otros compuestos fenólicos, como el ácido rosmarínico, el rosmanol y el epirosmanol (ver Figura 4), también contribuyen a las propiedades antioxidantes del extracto de romero, aunque en menor medida y en menor concentración que los dos primeros [12]. Estos componentes que se encuentran en menor cantidad, son en cierta medida debido a la degradación del ácido carnósico. El ácido carnósico se considera bastante inestable y se convierte en carnosol por oxidación del aire. A su vez, se ha asumido que el carnosol es el precursor de los diterpenos fenólicos

$\gamma$ - y  $\delta$ -lactonas, habiéndose demostrado que estas últimas se forman en un proceso oxidativo a través del carnosol [13].

Si bien el ácido carnósico es el componente principal de los extractos de romero, no es un compuesto muy estable y puede oxidarse para formar carnosol. Además del carnosol, la oxidación del ácido carnósico produce rosmanol, que se diferencia del carnosol por poseer un grupo hidroxilo libre en la posición C-7 y la  $\gamma$ -lactona formada a través de la ruta C-20-C-6. Se puede dar también una forma epimérica de rosmanol con diferencia estereoquímica en la posición C-7, siendo este el epirosmanol. Se ha sugerido una conversión catalizada por enzimas de ácido carnósico en derivados de lactona a través de reacciones mediadas por oxígeno como un posible mecanismo de formación de estas lactonas diterpénicas. La deshidrogenación enzimática y el ataque de radicales libres ahora también se consideran generalmente como una ruta común para la formación de varios productos de oxidación del ácido carnósico. También se ha identificado en el extracto de romero una estructura alternativa, el isorosmanol, donde el anillo de lactona se forma a través de la posición hidroxilo C-6 en lugar de C-7. Se ha identificado también una ruta adicional de diversificación estructural en los diterpenos de romero por la metoxilación, habiéndose identificado por ejemplo el derivado 12-metoxilo del ácido carnósico y el 11,12-dimetoxiisorosmanol [11], ver Figura 4.

La multifuncionalidad de los diterpenos de romero a través de distintos mecanismos puede servir como vías de estudio para terapias para la EA. Una serie de experimentos *in vitro* demuestran que la actividad antioxidante de los diterpenos de romero provee de protección a las células frente a la peroxidación lipídica y la muerte celular por estrés oxidativo [11]. El estrés oxidativo se define como un desequilibrio en la liberación de radicales libres, átomos o moléculas con uno o más electrones desapareados que no se regulan de manera eficiente. Los más importantes de este tipo de moléculas son los radicales  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{OOH}$ , llamados especies reactivas de oxígeno (ROS). Los radicales libres se han implicado en enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas como la EA [14].



**Figura 4.** Ácido carnósico y diterpenos de romero de tipo abietano relacionados. Modificado de la referencia [11].

Hay dos mecanismos ampliamente aceptados de actividad antioxidante. La primera es la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, *Hydrogen Atom Transfer*) en la que una molécula antioxidante dona su átomo de H a un radical libre para neutralizar su alta reactividad. El segundo mecanismo es la transferencia de un solo electrón (SET, *Single Electron Transfer*), en el que se dona un electrón completo al radical libre. Este mecanismo se mide por la energía de ionización (IE, *Ionization Energy*). Un buen antioxidante tiene un valor bajo de IE. Las moléculas antioxidantes tienen dos características importantes: viabilidad

de la donación de electrones a los radicales libres y estabilidad o baja reactividad de los radicales recién formados [14], de ahí entonces la importancia de estudios computacionales de su reactividad.

Respecto a la importancia de los diterpenos del romero en enfermedades neurodegenerativas se ha demostrado que el ácido carnósico protege a las neuronas del daño isquémico al eliminar sus especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*).

Otro de los mecanismos por los que pueden resultar útiles los compuestos del romero es por su interacción con el péptido A $\beta$ . Encontrar compuestos naturales y/o sintéticos que inhiban la polimerización y la estabilidad de los agregados de A $\beta$  pueden usarse como agentes terapéuticos útiles para la EA para evitar la formación de oligómeros neurotóxicos. Se ha estudiado el efecto del ácido carnósico en la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y cultivadas con A $\beta$ 42 o A $\beta$ 43. Se reportó que la pérdida celular en estos cultivos se revirtió parcialmente mediante el tratamiento con ácido carnósico. Los efectos observados también se combinan con niveles reducidos de oligómeros celulares de A $\beta$ 42 y A $\beta$ 43, lo que sugiere la inhibición de la oligomerización como un posible mecanismo de acción. El efecto mostró expresiones mejoradas de ARNm de  $\alpha$ -secretasa pero no de  $\beta$ -secretasa, sugiriendo una promoción de la vía dependiente no amiloidogénica normal [15].

Los mecanismos en que pueden ayudar los diterpenos no están limitados a nivel de actividad antioxidante y de agregación a A $\beta$ . No obstante, otros como las propiedades quelantes del ácido carnósico y carnosol podrían actuar mediando las propiedades neurotóxicas de iones metálicos presentes en las placas amiloides [11], o incluso de señalización activando Nrf2, genes de enzimas desintoxicantes de fase II y enzimas antioxidantes, así como protegiendo las neuronas por mecanismos anti-inflamatorios activando la vía Keap1/Nrf2 [11].

## CAPITULO 2

### 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 2.1 Justificación

La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes para la que no existe una cura ni terapia preventiva específica. De acuerdo a múltiples estudios hechos con base en la teoría amiloidea se cree que el plegamiento incorrecto y la agregación extracelular de los péptidos  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) son una de las principales causas de la progresión de la EA, lo que conduce a la formación de oligómeros  $A\beta$  tóxicos y placas de  $\beta$ -amiloide en el cerebro que son características de la EA. Dada la necesidad de terapias novedosas, los productos naturales sirven como un recurso importante para el diseño de nuevos medicamentos. No obstante, la evidencia experimental de su mecanismo de acción se proporciona solo para un pequeño subconjunto de ellos. Se ha demostrado que los diterpenos del romero pueden interferir con la agregación de  $A\beta$  a través de interacciones directas con péptidos  $A\beta$  y cuyos mecanismos inhibidores se han estudiado mediante enfoques experimentales, más algunos otros derivados para los que no hay estudios aún. Los cálculos teóricos pueden proporcionar información valiosa para estudios sobre el diseño de fármacos y sobre terapias contra la EA.

En el presente trabajo se calcularon los índices de reactividad química global y local basados en la teoría del funcional de densidad conceptual para proporcionar herramientas para el análisis de la interacción entre los principales compuestos antioxidantes de *Salvia rosmarinus* y el péptido  $\beta$ -amiloide (25-35). Hasta el conocimiento del autor, no hay suficientes estudios acerca de los demás derivados del ácido cárnosico y su interacción con el péptido  $\beta$ -amiloide.

## **2.2 Hipótesis**

Es posible modelar la interacción de los diterpenos del romero con el  $\beta$ -amiloide mediante métodos computacionales, basados en el estudio de sus parámetros de reactividad global y local. La mayoría de los estudios reportados convergen en que las regiones A $\beta$  implicadas en la interrupción de la cascada de agregación y la regulación de la toxicidad de los oligómeros estabilizados son las regiones *N*-terminal y  $\beta$ 1.

## **2.3 Objetivos**

### **Objetivo general**

Calcular los índices de reactividad global y local de diterpenos del romero, así como su interacción con el  $\beta$ -amiloide (25-35) mediante métodos computacionales.

### **Objetivos particulares**

1. Calcular las estructuras optimizadas del ácido carnósico y sus derivados usando métodos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT).
2. Calcular los índices de reactividad global y local del ácido carnósico y sus derivados basados en la teoría del funcional de la densidad conceptual (c-DFT).
3. Modelar la interacción de los diterpenos del romero con el  $\beta$ -amiloide (25-35) usando cálculos basados en mecánica cuántica.

## CAPÍTULO 3

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Teoría del funcional de la densidad (DFT)

En el campo de la química computacional para el tratamiento de la estructura de las moléculas y su reactividad se utilizan métodos de estructura electrónica. Al utilizar la mecánica cuántica se parte de la resolución de la ecuación de Schrödinger para predecir las propiedades de una molécula:

$$H\Psi = E\Psi \quad (1)$$

La ecuación (1) es una ecuación de onda que predice analíticamente la probabilidad de eventos o resultados en un sistema dinámico, la ecuación fundamental de la mecánica cuántica que describe cualquier sistema químico. Sin embargo, obtener soluciones exactas para la ecuación en sistemas de varios electrones no es práctico por la demanda computacional, por lo que se utilizan diversas aproximaciones matemáticas a la solución [16]. Dentro de estas aproximaciones existen métodos basados en la resolución de la ecuación de Schrödinger (1) usando una función de onda y otros usando un funcional de la densidad.

Dentro de los métodos basados en funciones de onda, el más básico es el método de Hartree y Fock (método HF) desarrollado en la década de 1920. El método HF supone que la función de onda exacta de  $N$  cuerpos (multicuerpos) del sistema puede aproximarse mediante un determinante único de Slater de  $N$  *spin* orbitales (una técnica matemática de la mecánica cuántica que se usa para generar funciones de onda) que permite derivar un conjunto de ecuaciones. La solución de estas ecuaciones provee la función de onda de Hartree-Fock y la energía del sistema, que son valores aproximados al límite superior de las aproximaciones exactas. El principal defecto del método HF es que trata a los electrones como si se estuvieran moviendo independientemente unos de otros; en otras palabras, ignora la correlación electrónica. Por esta razón, la eficiencia y la simplicidad del método HF se ven contrarrestados por el bajo rendimiento de los

sistemas que involucran correlación electrónica. Por lo tanto, HF ahora se usa principalmente simplemente como un punto de partida para enfoques de química cuántica "post HF" más complejos que proporcionan diferentes formas de introducir la correlación faltante del HF y de aproximar la función de onda exacta. Aun así, los métodos post HF a menudo dificultan su aplicación a sistemas biológicos e inorgánicos, y su costo computacional actualmente sigue siendo alto para moléculas grandes [17].

Por otro lado, los métodos basados en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) tratan de resolver tanto la imprecisión de HF, así como las altas demandas computacionales de los métodos post-HF al reemplazar la función de onda electrónica con la densidad electrónica como la cantidad básica. La teoría DFT es en la actualidad una herramienta importante en la gama de métodos de la química cuántica computacional para examinar una variedad de sistemas químicos con docenas de átomos o más. La teoría DFT de Kohn-Sham se ha convertido en uno de los métodos más importantes para resolver aproximadamente las ecuaciones de Schrödinger y Dirac, donde se expresa la densidad electrónica exacta como un único determinante de Slater. El método de DFT incluye los efectos de la correlación electrónica (el que los electrones de un sistema molecular reaccionan al movimiento de los demás e intentan mantenerse fuera de su camino) lo que toma en cuenta las interacciones instantáneas de pares de electrones con *spin* opuesto [18]. Se basa en un funcional de intercambio-correlación universal desconocido, que solo se puede aproximar, por lo que encontrar las mejores aproximaciones ha sido una tarea importante [19].

En la teoría DFT todas las propiedades electrónicas están determinadas por la densidad electrónica del estado fundamental  $\rho_0$  [19]. La energía total que depende de  $\rho_0$  se expresa como:

$$E_0[\rho_0] = E_{en}[\rho_0] + V_{nn} + J[\rho_0] + T[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0] \quad (2)$$

Los términos de la energía cinética y de intercambio-correlación ( $T[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0]$ ) no tienen forma conocida. El término de intercambio-correlación se considera como suma de un término de intercambio y otro de correlación:

$$E_{xc}[\rho_0] = E_x[\rho_0] + E_c[\rho_0] \quad (3)$$

Los métodos DFT se clasifican según el método utilizado para calcular este término de intercambio-correlación. Por ejemplo, los métodos híbridos son ampliamente utilizados, en ellos se considera que se obtiene un valor exacto del término de intercambio mediante el método HF y se aproxima el valor de la correlación con una expresión adecuada [20].

Los funcionales de la densidad se clasifican en funcionales locales y no locales. Los tres tipos de funcionales locales son la aproximación de densidad de *spin* local (LSDA), la aproximación de gradiente generalizado (GGA) y los meta-GGA [21]. Los funcionales no locales incluyen GGA híbridos y metafuncionales híbridos. Los GGA híbridos y los metafuncionales híbridos (ambos incluyen el intercambio Hartree-Fock no local) tienen un mejor rendimiento para aplicaciones de uso general en química que los funcionales locales [22]. En general, los cálculos GGA y meta-GGA proporcionan una mayor precisión con una sobrecarga computacional adicional insignificante. El desarrollo de funcionales híbridos ha hecho que los cálculos DFT sean cada vez más precisos. Sin embargo, los funcionales híbridos también aumentaron en gran medida la complejidad computacional, incluso algunos agregaron términos de correlación basados en métodos de funciones de onda (como MP2 ó CC) al funcional de correlación original [23].

El Grupo de Química Teórica de Minnesota ha realizado un extenso trabajo en el diseño y optimización de funcionales de densidad más precisos. Ocho de estos, desarrollados entre 2005 y 2008, se denominan funcionales de la densidad de Minnesota (siglas que comienzan con M05, M06 o M08) [22]. En este proyecto de tesis se utilizó el funcional híbrido M06-2X [19], el cual es un funcional de Truhlar que es parte de un grupo de los funcionales de intercambio-correlación empíricos altamente parametrizados, desarrollados por Zhao y Truhlar [20].

### **3.2 Funciones de base**

Las funciones de base o conjuntos de base se utilizan para representar funciones de onda electrónicas. Un conjunto de base es una representación matemática de los orbitales moleculares en una molécula. Las funciones de base se pueden interpretar como el confinamiento de cada electrón a una región específica del

espacio. Las funciones de base más grandes imponen menos restricciones a los electrones, lo que permite aproximaciones más precisas de los orbitales moleculares. En consecuencia, se requieren más recursos computacionales [16].

Cuando se realizan cálculos moleculares, es común utilizar una base que consta de orbitales atómicos centrados en cada núcleo de la molécula (el enfoque de combinación lineal de orbitales atómicos). En la química computacional moderna, los cálculos químico-cuánticos generalmente se realizan utilizando un conjunto finito de funciones base. La función de onda del sistema bajo consideración se representa como un vector. Los elementos del vector corresponden a los coeficientes de la combinación lineal de funciones base del conjunto de funciones base utilizadas [23].

Intuitivamente, se pensó que se podría seleccionar orbitales atómicos hidrogenados como la base establecida para los orbitales moleculares, siendo esto el conjunto de base de los orbitales de tipo Slater (STO), que son soluciones a la ecuación de Schrödinger de átomos similares al hidrógeno y se desintegran exponencialmente lejos del núcleo. Sin embargo, los átomos similares al hidrógeno carecen de interacciones de muchos electrones, por lo que los orbitales no describen con precisión las correlaciones del estado de los electrones.

Los *spin* orbitales moleculares utilizados en el determinante de Slater generalmente se representan como una combinación lineal de algunas funciones seleccionadas. Desafortunadamente, calcular integrales usando STO es computacionalmente difícil. Más tarde se vio que los conjuntos de base STO podían aproximarse como una combinación lineal de orbitales gaussianos (GTO).

En la mayoría de los enlaces moleculares, son los electrones de valencia los que participan principalmente en el enlace. Por lo que es común representar a los orbitales de valencia con más de una función base (cada una de las cuales puede estar compuesta a su vez por una combinación lineal fija de funciones gaussianas primitivas). Los conjuntos de base en los que hay múltiples funciones correspondientes a cada orbital atómico de valencia se denominan conjuntos de base de valencia doble, triple, cuádruple, etc. (zeta,  $\zeta$ , se usa comúnmente para representar el exponente de una función de base STO). Dado que los diferentes

orbitales tienen diferentes extensiones espaciales, la combinación de bases permite que la densidad de los electrones ajuste su extensión espacial apropiada para el entorno molecular particular. Por el contrario, los conjuntos de base mínimos carecen de la flexibilidad para adaptarse a diferentes entornos moleculares [21].

A menudo para realizar cálculos moleculares, se necesitan agregar funciones de polarización y funciones difusas a estos cálculos para describir los orbitales atómicos que están desocupados en el estado fundamental del átomo pero que son importantes para la descripción molecular. Por ejemplo, es posible agregar funciones que describen la polarización de las densidades electrónicas de los átomos en la molécula, las cuales se llaman funciones de polarización. Por ejemplo, el conjunto de base mínimo para el hidrógeno es la función que se aproxima al orbital atómico  $1s$ , mientras que el conjunto de base polarizado simple normalmente tiene dos funciones, una función  $s$  y una función  $p$  (compuesta por tres funciones base  $p_x$ ,  $p_y$  y  $p_z$ ). Esto aumenta la flexibilidad de los conjuntos de base, lo que permite que los orbitales moleculares que contienen átomos de hidrógeno sean más asimétricos con respecto al núcleo de hidrógeno. Esto es muy importante para el modelado de enlaces químicos, ya que los enlaces químicos suelen estar polarizados. De manera similar, las funciones  $d$  se pueden agregar a conjuntos de base con orbitales de valencia  $p$ , y las funciones  $f$  se pueden agregar a conjuntos de base con orbitales  $d$  [21].

Las funciones difusas tienen los mismos números cuánticos angulares que las funciones de capa de valencia, pero son espacialmente más extensas, es decir, son funciones gaussianas con un exponente pequeño. Estas características son especialmente importantes en sistemas con una distribución de electrones extendida, como en los aniones [24]. Estas funciones permiten que los electrones se alejen del núcleo, lo cual es especialmente importante en el cálculo de sistemas en los que es necesario describir bien los orbitales débilmente enlazados o los electrones en la parte externa de los orbitales, como en aniones, estados de transición y sistemas no-covalentes.

Existen dos enfoques sistemáticos para agregar funciones difusas. El primero es agregar las funciones difusas estándar  $s$  y  $p$  (cuatro funciones en total) a los átomos que no son de hidrógeno ( $Z > 2$ ). Esto se llama el conjunto base "más" o "+". O también agregar funciones difusas de base  $s$  y  $p$  a los átomos de hidrógeno. Este se denomina conjunto base "doble +" o "++". El segundo enfoque es agregar una función difusa a cada átomo para cada simetría ya presente en la base original, esto se llama el enfoque aumentado ("aug") [24].

La notación de las funciones de base *Split-Valence* (de valencia desdoblada) de John Pople suele ser X-YZg, donde X representa el número de distribuciones gaussianas primitivas que componen cada función de base orbital nuclear. Y y Z indican que cada orbital de valencia consta de dos funciones de base. La primera consiste en una combinación lineal de Y funciones gaussianas primitivas, la otra es una combinación lineal de Z funciones gaussianas primitivas. En este caso, la presencia de dos números después del guión significa que este conjunto de base es un conjunto de base doble  $\zeta$  de valencia dividida. También se utilizan conjuntos de base triple  $\zeta$  y cuádruple  $\zeta$  de valencia dividida llamados X-YZWg, X-YZwVg, etc [22, 25]. Éstos pueden contener funciones polarizadas y difusas.

Otros conjuntos de funciones de base muy utilizados son los desarrollados por Dunning y colaboradores, las cuales son bases de correlación consistente [24].

Las funciones de base de Dunning se nombran como cc-pVNZ, donde  $N = D, T, Q$ , etc. (D= doble  $\zeta$ , T= triple  $\zeta$ , Q= cuádruple  $\zeta$ , etc.). 'cc-p' significa 'correlación-polarizada consistente' y 'V' indica que son funciones de base de valencia. Contienen funciones de polarización (correlación) ( $d, f, g$ , etc.). Estos conjuntos de base de 'polarización de correlación consistente' son ampliamente utilizados para los cálculos que incluyen correlación electrónica como los métodos post-Hartree-Fock [24].

Otros tipos de conjuntos de base utilizan funciones de tipo Slater, funciones numéricas, ondas planas extendidas y funciones gaussianas. Una de éstas es la aproximación de la densidad de *spin* local (LSD, *Local Spin Density*), que supone que las variaciones de la densidad son lentas y trata la densidad local como un gas de electrones uniforme. Las bases optimizadas de densidad de *spin* local

(LSD) conducen a geometrías moleculares precisas. Son una clase de aproximaciones al funcional de energía de intercambio-correlación que dependen únicamente del valor de la densidad electrónica en cada punto del espacio [25, 26]. Dentro de este grupo están por ejemplo las funciones de base de DGDZVP, DGDZVP2 y DGTZVP [27, 28]. Estas son funciones de base de funcional de todos los electrones (*All-electron basis set*). Éstas surgen inicialmente para sistemas con elementos más pesados que Kr, que requieren que todos los electrones sean tratados explícitamente para obtener una energía precisa y para estudiar propiedades que dependen de una representación confiable de los electrones y de la densidad de *spin* cerca del núcleo o en el núcleo. Sin embargo, se han desarrollado diferentes conjuntos de base *All-electron* que se adaptan a distintos requisitos de cada tratamiento siendo capaces de cubrir la mayoría de las necesidades de cada investigación [29].

### 3.3 Índices de reactividad química global

En el enfoque de la teoría de DFT conceptual (c-DFT) para la reactividad química, la descripción de los parámetros globales y funciones locales son clave para la comprensión del comportamiento de los sistemas moleculares. La teoría c-DFT ha tenido mucho éxito en la explicación de las propiedades moleculares y los conceptos químicos [30, 31]. En este contexto, se han propuesto y utilizado varios descriptores de reactividad para analizar la reactividad química y la selectividad de sitios reactivos en la molécula. Los descriptores de reactividad global y local evaluados por DFT son muy útiles para describir el comportamiento de reactivos y productos en reacciones orgánicas. En este sentido, los índices de reactividad global, como el potencial químico ( $\mu$ ), la electronegatividad ( $\chi$ ), la dureza ( $\eta$ ), la blandura ( $s$ ) y el índice de electrofilicidad ( $\omega$ ), pueden indicar la viabilidad de distintas reacciones de interés [32, 33]. El potencial químico ( $\mu$ ) se refiere el cambio de energía del sistema con respecto al número de electrones  $N$  en un potencial externo fijo  $v(r)$ , es decir, el potencial creado por los núcleos. El potencial químico electrónico está asociado con la viabilidad de un sistema para

intercambiar densidad de electrones con el entorno en el estado fundamental. La electronegatividad ( $\chi$ ) es una medida de resistencia a la pérdida de densidad de electrones, describe la tendencia de un átomo o grupo funcional a atraer electrones. Se refiere a un átomo en una molécula, así pues puede variar ligeramente cuando varía el “entorno” en ésta, dependiendo también de la hibridación y del estado de oxidación. La dureza ( $\eta$ ) y la blandura ( $s$ ) se pueden entender en el marco de la teoría HSAB (ácido-base duro-blando). La dureza es la resistencia de una molécula a la polarización de la nube de electrones, es decir a intercambiar densidad de electrones con el entorno, y la blandura es su inverso. Son medidas de estabilidad y reactividad de las moléculas. Finalmente, el índice de electrofilicidad ( $\omega$ ) mide la estabilización en energía cuando el sistema adquiere una carga electrónica adicional del entorno, lo que significa el proceso de reducción de energía al absorber electrones de los donadores. Éste se define por la tendencia de un electrófilo a adquirir una cantidad adicional de densidad electrónica, dada por  $\mu$ , y la resistencia de la molécula a intercambiar densidad electrónica con el entorno, dada por  $\eta$  [30].

Las ecuaciones que describen estos parámetros de reactividad utilizando el enfoque de campo autoconsistente vertical ( $\Delta$ SCF) son las siguientes [34]:

$$\mu = -\frac{(I+A)}{2} \quad (4)$$

$$\chi = \frac{(I+A)}{2} \quad (5)$$

$$\eta = \frac{(I-A)}{2} \quad (6)$$

$$s = \frac{1}{\eta} \quad (7)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (8)$$

El potencial de ionización vertical y la afinidad electrónica vertical se obtienen a partir de la diferencia de energía entre la molécula en estado fundamental y sus correspondientes especies ionizadas de las estructuras optimizadas.

### 3.4 Índices de reactividad química local

En primer lugar, se consideran cantidades globales o descriptores como el potencial químico, la electronegatividad, la blandura y la dureza, como se describieron en la sección anterior, pero también existen descriptores locales como la función de Fukui, la blandura local, la dureza local o las funciones de Parr. La función de Fukui o función frontera es una función que describe la densidad electrónica en un orbital frontera como resultado de un pequeño cambio en el número total de electrones [35]. Las funciones de Fukui tienen un carácter local y las propiedades locales son esenciales en la descripción de la reactividad de los sistemas moleculares para identificar, por ejemplo, cuál es la ubicación más favorable para quitar o agregar un electrón a una molécula, o como criterio para caracterizar los sitios más reactivos para un ataque electrofílico,  $f_k^-$ , o nucleofílico,  $f_k^+$ . Mientras que el descriptor dual,  $f_k^2$ , indica un ataque nucleofílico sobre el átomo  $k$  si su valor es positivo y entonces el átomo  $k$  actúa como un electrofílico, inversamente, cuando su valor es negativo indica un ataque electrofílico sobre el átomo  $k$ , el cual actúa como nucleófilo [31].

En el enfoque de la teoría c-DFT, los descriptores de reactividad local, como las funciones de Fukui  $f_k$  para ataques electrofílicos  $f_k^-$  y nucleofílicos  $f_k^+$ , y el descriptor dual  $f_k^2$  se calculan utilizando las siguientes ecuaciones:

$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N - 1) \quad (9)$$

$$f_k^+ = q_k(N + 1) - q_k(N) \quad (10)$$

$$f_k^2 = f_k^+ - f_k^- \quad (11)$$

donde las  $q_k$  son la población electrónica del  $k$ -ésimo átomo de la molécula con  $N - 1$ ,  $N$  y  $N + 1$  electrones. Las funciones de Fukui se calculan a partir de las cargas condensadas atómicas. Éstas pueden ser cargas de Mulliken, de Hirshfeld, de orbitales de enlace natural (NBO), etc. En este caso, se usa un análisis de población NBO.

Un orbital de enlace natural o NBO es un orbital de enlace calculado con la máxima densidad de electrones [36]. El análisis de población NBO es una

herramienta de análisis para evaluar la carga electrónica de una molécula. El análisis de un complejo dimérico proporciona una serie de energías de perturbación de segundo orden que corresponden al resultado energético de la transferencia de carga de un orbital de una molécula a otro orbital de una segunda molécula. Lo hace considerando todas las interacciones posibles entre los NBO donadores llenos y los aceptores vacíos, y estimando su importancia energética con la energía de estabilización asociada con la deslocalización de electrones entre el donador y el aceptor [37, 38].

El análisis de población NBO, de acuerdo a la definición en el “Glosario de términos utilizados en química orgánica teórica” de Minkin [39] para la IUPAC es: “El análisis de la distribución de la densidad de electrones en un sistema molecular basado en los orbitales atómicos naturales ortonormales. Las poblaciones naturales,  $n_i(A)$  son las ocupaciones de los orbitales atómicos naturales. Éstos cumplen rigurosamente el principio de exclusión de Pauli:  $0 < n_i(A) < 2$ . La población de un átomo  $n(A)$  es la suma de las poblaciones naturales:

$$n(A) = \sum_A n_i(A) \quad (12)$$

De manera simplificada, el análisis de población NBO se puede entender como el uso de una matriz de densidad de un electrón para establecer la forma de los orbitales atómicos en el ambiente molecular y derivar enlaces moleculares de la densidad de electrones entre átomos [40]. El método NBO transforma las funciones de onda completamente deslocalizadas *ab-initio* en funciones que se pueden interpretar en términos de los conceptos clásicos de estructuras de Lewis [37].

### 3.5 Interacciones intermoleculares

Los enlaces por puentes de hidrógeno son importantes en la estructura y función de las proteínas, como por ejemplo en la arquitectura local y en la dinámica macromolecular. Distintos aminoácidos que contienen grupos en sus cadenas laterales que tienen un átomo de hidrógeno unido a un átomo de oxígeno o nitrógeno forman numerosos puentes de hidrógeno. Los átomos de azufre también participan formando puentes de hidrógeno [41]. Por ejemplo, el residuo de

metionina, Met<sub>35</sub> C-terminal, tiene un rol importante en la toxicidad del péptido amiloide, se ha observado que la agregación y la toxicidad de  $\beta$ -amiloide (25-35) se puede interrumpir por algunas sustituciones de este residuo [42], siendo el aminoácido con azufre en este fragmento del péptido que puede potencialmente participar en las interacciones moleculares con los diterpenos del romero.

Los puentes de hidrógeno se caracterizan por la distancia entre donador-aceptor. Se pueden clasificar como enlaces fuertes con distancias de enlace de 2.2-2.5 Å, como moderados de 2.5-3.2 Å y como débiles de 3.2-4.0 Å. Los enlaces de hidrógeno fuertes tienen ángulos de enlace entre 170 y 180°, y los enlaces de hidrógeno débiles tienen ángulos de enlace menores a 120°. Sus energías son de 40-14, 15-4 y <4 kcal/mol, para los puentes de hidrógeno fuertes, moderados y débiles, respectivamente. En promedio las distancias donador-aceptor en los elementos de la estructura secundaria de la proteína están cerca de 3.0 Å [43].

Los puentes de hidrógeno no son muy frecuentes entre los residuos de metionina debido que esta es hidrófoba y, por lo tanto, está rodeada principalmente por átomos de carbono (en lugar de átomos de nitrógeno y oxígeno), haciendo a la metionina un aceptor pobre de enlaces H. Los puentes de hidrógeno en metionina no presentan diferencias geométricas muy grandes y los ángulos de enlace son de 141.1 ° [41]. A pesar de ello, se ha observado que el entorno hidrófobo alrededor de Met<sub>35</sub> en A $\beta$  (1-42) parece ser importante para las propiedades oxidativas, neurotóxicas y de agregación de éste, al participar por ejemplo en la peroxidación lipídica en la membrana celular (generando estrés oxidativo) [44]; en otros estudios además se plantea el rol de Met<sub>35</sub> en la oligomerización del péptido, pues al ser oxidado los péptidos A $\beta$  se fibrilan más lentamente (aunque hay reportes contradictorios por lo que esto no es concluyente) [45] y en un estudio más reciente se observaron cambios con la oxidación de metionina en el mecanismo de unión del fragmento A $\beta$  (10-40) a la bicapa zwitteriónica del 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC), un mimético de la membrana lipídica [46].

## CAPÍTULO 4

### 4. METODOLOGÍA

#### 4.1 Cálculo de las estructuras moleculares de los diterpenos del romero

En este trabajo se estudian 6 diterpenos del romero: el ácido carnósico (1) (ID JUWDAG) [47], el carnosol (2) (ID SEYCAA) [48], cuyas estructuras cristalográficas fueron extraídas de la base de datos CCDC [49]; el 12-metoxil ácido carnósico (3) (ID 9974918) [50], el ácido rosmarínico (4) (ID 5281792) [51], el epirosmanol (5) (ID 9884612) [52] y el rosmadial (6) (ID 15801061) [53], cuyas estructuras fueron obtenidas de la base de datos de PubChem [54]. Sus estructuras químicas se muestran en la Figura 5.

Las estructuras moleculares se optimizaron con el funcional M06-2X [20] empleando el conjunto de base DGDZVP2 [27, 28] para sus formas neutras. También se realizó el cálculo de frecuencias vibracionales para asegurar que no haya frecuencias imaginarias, lo cual indica que la estructura obtenida es un mínimo de energía sobre la superficie de energía potencial. Para sus estructuras catiónicas y aniónicas se utilizó el enfoque de campo autoconsistente vertical ( $\Delta$ SCF) [30, 31], en el cual se realizan cálculos *single point* sobre la estructura de su forma neutra optimizada, las cuales fueron calculadas con carga +1 y -1, respectivamente, ambas con multiplicidad 2 (doblete). Los cálculos se realizaron en el programa Gaussian 16 [55] y los resultados se visualizaron en el programa GaussView 6.0 [56].

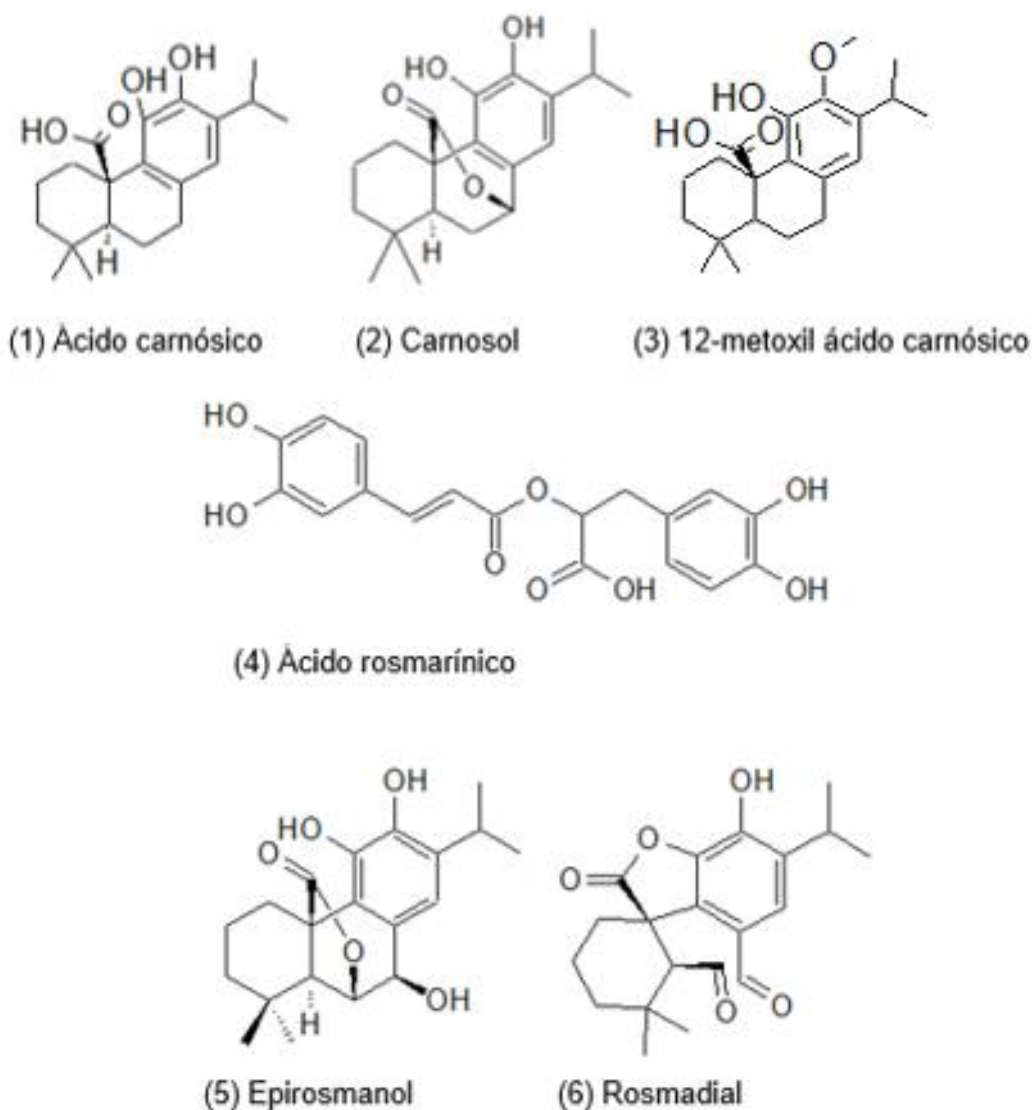


Figura 5. Estructuras químicas de los diterpenos de romero en estudio.

#### 4.2 Cálculo de los índices de reactividad química global

Los índices de reactividad global se calcularon a partir de las ecuaciones (4) a (8) para el potencial químico ( $\mu$ ), la electronegatividad ( $\chi$ ), la dureza ( $\eta$ ), la blandura ( $s$ ) y el índice de electrofilicidad ( $\omega$ ), respectivamente. Para los valores de potencial de ionización ( $I = E_{N-1} - E_N$ ) y de afinidad electrónica ( $A = E_N - E_{N+1}$ ) se usó la diferencia de las energías del sistema catiónico ( $E_{N-1}$ ) y aniónico ( $E_{N+1}$ ) respecto al sistema en estado fundamental ( $E_N$ ), siendo éstos el sistema con un electrón menos y un electrón extra, ambos con multiplicidad doblete.

### 4.3 Cálculo de los índices de reactividad química local

Las funciones de Fukui,  $f_k$ , se calcularon a partir de las ecuaciones (9) a (11) para para ataque electrofílico  $f_k^-$  y nucleofílico  $f_k^+$ , y el descriptor dual  $f_k^2$ , respectivamente, a partir de las cargas NBO obtenidas de los sistemas catiónico, aniónico y neutro. Además se graficaron las isosuperficies de las funciones de Fukui  $f_k^-$  y  $f_k^+$  a partir de las densidades electrónicas de los sistemas catiónico, aniónico y neutro con el programa GaussView 6.0 [56].

### 4.4 Cálculo de la interacción de los diterpenos del romero con el péptido $\beta$ -amiloide (25-35)

Los fragmentos de péptidos predominantes en las placas seniles (PS) o placas de amiloide están principalmente formados por los péptidos  $A\beta$  (1-40) y  $A\beta$  (1-42), aunque el segmento de 11 residuos  $A\beta$  (25-35) es ampliamente usado en estudios biológicos debido a que conserva las propiedades neurotóxicas de péptidos  $A\beta$  de mayor tamaño. La interacción entre el péptido  $\beta$ -amiloide  $A\beta$  (25-35) con los diterpenos del romero se calculó directamente del complejo formado por el  $A\beta$  (25-35) con cada diterpeno (1)-(6), donde las posiciones de los átomos de hidrógeno del  $A\beta$  (25-35) y cada diterpeno se optimizaron en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2. Para tomar en cuenta la naturaleza polimórfica de los agregados de  $A\beta$  se consideró un sistema extraído a partir de estructuras de fibras relevantes involucradas en la enfermedad de Alzheimer [57]. Específicamente, se usó el péptido  $A\beta$  (25-35) de las fibras  $A\beta^2$  obtenido de la estructura con ID 2LMP.pdb [58] de la base de datos PDB (Protein Data Bank) [59].

Las energías de interacción de los complejos  $A\beta$  (25-35)-diterpeno se calcularon usando la ecuación:

Energía de interacción =  $E(\text{Complejo } A\beta(25 - 35) - \text{diterpeno})$

$$- \left( E(A\beta(25 - 35)) + E(\text{Diterpeno}) \right) \quad (13)$$

Esta ecuación define a la energía de interacción entre dos fragmentos A y B como la diferencia entre la energía del dímero o complejo  $E_{A-B}$  completamente optimizado y la suma de las energías de los monómeros o fragmentos  $E_A$  y  $E_B$ , con geometrías no relajadas correspondientes a la estructura de equilibrio de A-B:  $E_{int} = E_{A-B} - (E_A + E_B)$ . Esta aproximación se puede extender a trímeros, tetrámeros y complejos más grandes, sin embargo se produce el error de superposición de base (BSSE, Basis Set Superposition Error), el cual se puede eliminar utilizando un procedimiento llamado *counterpoise* [60].

De las estructuras de los complejos se analizaron los puentes de hidrógeno formados entre los protones más lábiles de los diterpenos y el átomo de azufre del residuo de metionina, Met<sub>35</sub>, del A $\beta$  (25-35). Además, se graficaron y analizaron los potenciales electrostáticos moleculares (MEP) de los diterpenos, el A $\beta$  (25-35) y de los complejos de A $\beta$  (25-35) con los diterpenos, para identificar la naturaleza de las posibles regiones de interacción a lo largo de la estructura del A $\beta$  (25-35). Los MEP de los diterpenos, del A $\beta$  (25-35) y de los complejos se generaron con el programa GaussView 6.0 [56].

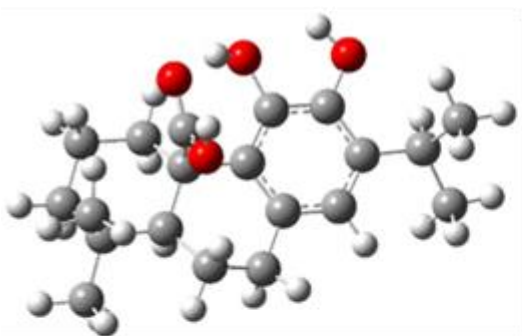
## CAPÍTULO 5

### 5. RESULTADOS

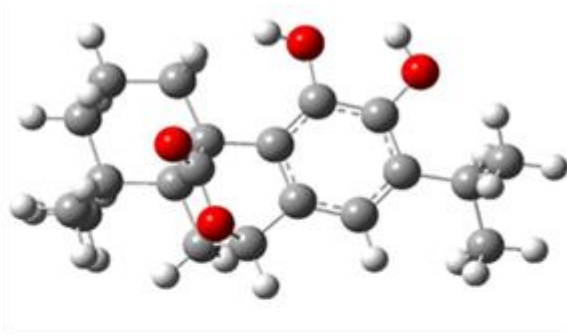
#### 5.1 Estructura molecular de los diterpenos del romero

Las estructuras optimizadas calculadas con el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2 se muestran en la Figura 6. Las moléculas en estudio son de tres tipos: diterpenos fenólicos como el ácido carnósico (**1**), carnosol (**2**), 12-metoxil ácido carnósico (**3**) y el epirosmanol (**5**), con éster de ácido cafeico como el ácido rosmarínico (**4**) y con aldehído como el rosmadial (**6**). A través de estas diferencias se pueden observar propiedades químicas distintas. A pesar de esto características como sus energías electrónicas, las energías de los orbitales moleculares frontera y otros índices de reactividad son similares, como se describe en las siguientes secciones. La Tabla 1 contiene los valores de las energías electrónicas absolutas en Hartrees y relativas en kcal/mol para las moléculas neutras, catiónicas y aniónicas, así como los momentos dipolares para las moléculas neutras optimizadas. Las energías relativas para las especies catiónicas muestran valores de 200.43 (**6**) a 176.71 (**1**) kcal/mol y para las especies aniónicas de 27.50 (**3**) a -11.49 (**6**) kcal/mol, respectivamente.

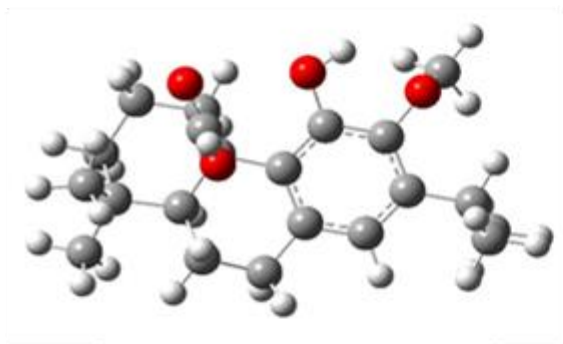
De las moléculas analizadas la de menor momento dipolar es el 12-metoxil ácido carnósico (**3**) con un valor de 2.89 Debyes, mientras el ácido rosmarínico (**4**) es el de mayor momento dipolar con 4.45 Debyes, ver Tabla 1.



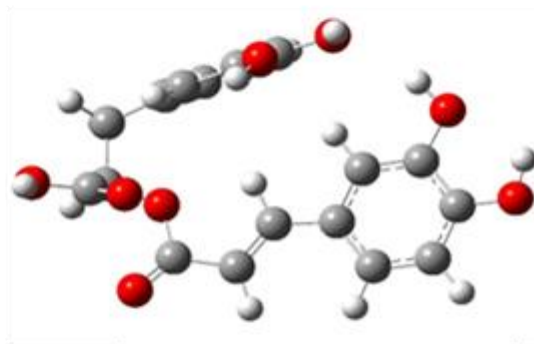
Ácido carnósico (1)



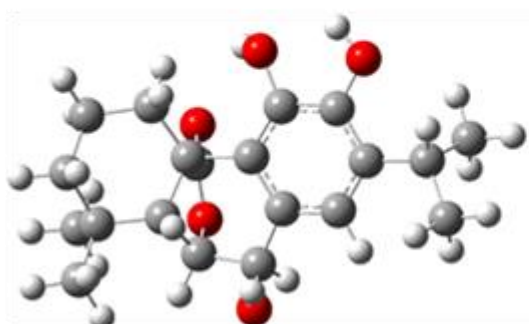
Carnosol (2)



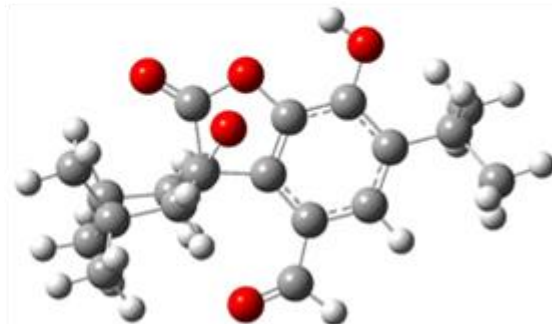
12-metil ácido carnósico (3)



Ácido rosmarínico (4)



Epirosmanol (5)



Rosmadiol (6)

**Figura 6.** Estructuras moleculares optimizadas de los diterpenos de romero calculadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.

**Tabla 1.** Energías electrónicas de las moléculas neutras,  $E_N$ , catiónicas,  $E_{N-1}$ , y aniónicas,  $E_{N+1}$  (en Hartrees (arriba) y en kcal/mol (abajo)) y los momentos dipolares (en Debyes) de los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.

	$E_N$	$E_{N-1}$	$E_{N+1}$	Momento dipolar
Ácido carnósico (1)	-1079.7633 0.00	-1079.4817 176.7117	-1079.7309 20.3307	3.23
Carnosol (2)	-1078.5475 0.00	-1078.2502 186.5975	-1078.5127 21.8179	3.78
12-metoxil ácido carnósico (3)	-1119.0429 0.00	-1118.7503 183.5923	-1118.9991 27.5050	2.89
Ácido rosmarínico (4)	-1297.1783 0.00	-1296.8872 182.6781	-1297.1873 -5.6470	4.45
Epirosmanol (5)	-1153.7662 0.00	-1153.4628 190.3381	-1153.7398 16.5110	3.29
Rosmadial (6)	-1152.5337 0.00	-1152.2143 200.4272	-1152.5520 -11.4878	3.17

## 5.2 Índices de reactividad química global

La Tabla 2 muestra los índices de reactividad global, obtenidos a partir del potencial de ionización vertical ( $I$ ) y la afinidad electrónica ( $A$ ), calculados como ( $I = E_{N-1} - E_N$ ) y ( $A = E_N - E_{N+1}$ ), respectivamente, usando el enfoque de campo autoconsistente vertical ( $\Delta$ SCF).

**Tabla 2.** Índices de reactividad global (en eV) de los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2. La energía gap,  $E_{\text{gap}}$ , está definida como  $E_{\text{gap}} = I - A$ .

	$I$	$A$	$\mu$	$\chi$	$\eta$	$s$	$\omega$	$E_{\text{gap}}$
Ácido carnósico (1)	7.6629	-0.8816	-3.3907	3.3907	4.2723	0.2341	1.3455	8.5445
Carnosol (2)	8.0916	-0.9461	-3.5728	3.5728	4.5189	0.2213	1.4124	9.0377
12-metoxil ácido carnósico (3)	7.9613	-1.1927	-3.3843	3.3843	4.5770	0.2185	1.2512	9.1540
Ácido rosmarínico (4)	7.9217	0.2449	-4.0833	4.0833	3.8384	0.2605	2.1719	7.6768
Epirosmanol (5)	8.2538	-0.7160	-3.7689	3.7689	4.4849	0.2230	1.5836	8.9698
Rosmadiol (6)	8.6913	0.4982	-4.5947	4.5947	4.0966	0.2441	2.5767	8.1932

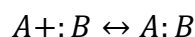
En la Tabla 2 se puede observar que el ácido carnósico es la molécula con valor menor de potencial de ionización,  $I$ . Uno de los mecanismos de actividad antioxidante, la transferencia de un solo electrón (SET, *Single Electrontransfer*), se relaciona con valores bajos de energía de ionización. Una energía de ionización baja, significa que se necesita una menor cantidad de energía para remover el electrón más externo. La tendencia de los valores calculados de  $I$  es: ácido carnósico (1) < ácido rosmarínico (4) < 12-metoxil ácido carnósico (3) < carnosol (2) < epirosmanol (5) < rosmadiol (6).

Al comparar la afinidad electrónica,  $A$ , se observa que el ácido rosmarínico (4) y el rosmadiol (6) tienen valores positivos, aunque bajos, mientras que el resto de moléculas tienen valores negativos, es decir, se requiere energía para añadir un electrón en estas últimas.

Los valores de potencial químico,  $\mu$ , indican que el rosmadiol (6) y el ácido rosmarínico (4) tienen los valores más bajos, indicando una mayor estabilidad, mientras que el 12-metoxil ácido carnósico (3) y el ácido carnósico (1), con los valores más altos de  $\mu$  indican que en estas moléculas la tendencia de escape de los electrones es mayor, es decir, tienen un mayor comportamiento de donadores

de electrones. Los valores de electronegatividad muestran la tendencia opuesta, siendo el rosmadial (6) y el ácido rosmarínico (4) los que tienen los valores más altos, lo cual indica una mayor habilidad para atraer electrones mostrando una alta reactividad. Mientras que el 12-metoxil ácido carnósico (3) y el ácido carnósico (1), con los valores más bajos de electronegatividad muestran una menor resistencia para perder densidad electrónica.

De acuerdo a la reactividad química, las moléculas más blandas serán más reactivas que las moléculas duras para reacciones unimoleculares como la isomerización y la disociación. En reacciones bimoleculares, se puede usar como modelo una reacción basada en el concepto general de ácido-base de Lewis:



donde A es el ácido y es un aceptor de electrones o electrófilo y la base B es un donador de electrones, nucleófilo. De acuerdo a la teoría de la perturbación, hay tres interacciones de enlace principales en la reacción anterior: la deslocalización de electrones, polarización y la electrostática clásica. Los reactivos duros, donde la densidad de electrones es difícil de cambiar, deben basarse en efectos electrostáticos clásicos o enlaces iónicos [60].

En cuanto al valor de dureza,  $\eta$ , la tendencia encontrada es de ácido rosmarínico (4) < rosmadial (6) < ácido carnósico (1) < epirosmanol (5) < carnosol (2) < 12-metoxil ácido carnósico (3), lo cual indica que el ácido rosmarínico (4) es el más reactivo y presenta menor resistencia a cambiar su densidad de electrones. Por otro lado, los valores de blandura,  $s$ , muestran que el 12-metoxil ácido carnósico (3) es el de menor valor, con lo cual es menos propenso a interacciones moleculares en comparación con el resto, aunque el valor de blandura en general en todas las moléculas es bajo.

El índice de electrofilicidad,  $\omega$ , mide el poder electrofílico, es decir, qué tan propenso es el sistema a aceptar electrones. En este caso, los valores de electrofilicidad muestran que el epirosmanol (5), el ácido rosmarínico (4) y el rosmadial (6) tienen mayor capacidad de aceptar electrones, por otro lado, los sistemas que muestran mejores propiedades de donadores son el 12-metoxil ácido carnósico (3), el ácido carnósico (1) y el carnosol (2) con los valores

menores de  $\omega$ . Finalmente, el valor de la energía gap, definida como  $E_{\text{gap}} = I - A$ , muestra que el ácido rosmarínico (**4**) es el de menor valor. Una energía gap menor se puede interpretar como que la molécula es más fácil de polarizar y es relativamente más reactiva, ya que puede donar electrones más fácilmente a un aceptor.

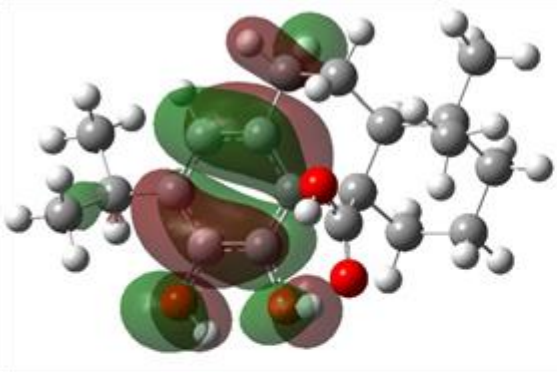
Por otro lado, los orbitales frontera HOMO y LUMO dan información importante de la reactividad y la estabilidad cinética. La Tabla 3 muestra los valores de las energías de los orbitales frontera HOMO y LUMO, así como de la energía gap entre ellos, definida como  $E_{\text{gap}} = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$ . Los orbitales HOMO y LUMO se pueden relacionar con la capacidad de donar o aceptar electrones, respectivamente. Una mayor energía del orbital HOMO indica un mayor comportamiento como donador de electrones, mientras que una menor energía del orbital LUMO indica un mayor comportamiento como aceptor de electrones, es decir, una mayor afinidad electrónica. Por lo tanto, las moléculas de ácido carnósico (**1**), ácido rosmarínico (**4**) y 12-metoxil ácido carnósico (**3**) tienen mayor capacidad de donar electrones, mientras que el rosmadial (**6**) y el mismo ácido rosmarínico (**4**) son propensos a aceptar electrones. Por otro lado, un valor pequeño de la energía gap,  $E_{\text{gap}}$ , favorece las condiciones para la interacción donador-aceptor e indica una alta reactividad. Se puede observar que el ácido rosmarínico (**4**) y el rosmadial (**6**) tienen la menor energía gap, por lo que son más reactivos y menos estables cinéticamente. Por otro lado el 12-metoxil ácido carnósico (**3**) tiene la mayor energía gap, por lo que es el menos reactivo y más estable cinéticamente que el resto de las moléculas.

Las isosuperficies de los orbitales moleculares frontera se muestran en la Figura 7, los cuales se graficaron con un isovalor de 0.02 u.a. De la Figura 7 se puede observar que el orbital HOMO se localiza principalmente en el anillo aromático y en algunos de los grupos hidroxilo sustituidos en éste, mientras que el orbital LUMO se localiza en el anillo aromático, en los grupos hidroxilo y ácido de los ácidos carnósico (**1**), 12-metoxil carnósico (**3**) y rosmarínico (**4**), y se extiende a algunos otros grupos de las moléculas como el éster cíclico del carnosol (**2**) y epirosmanol (**5**), y el grupo aldehído del rosmadial (**6**).

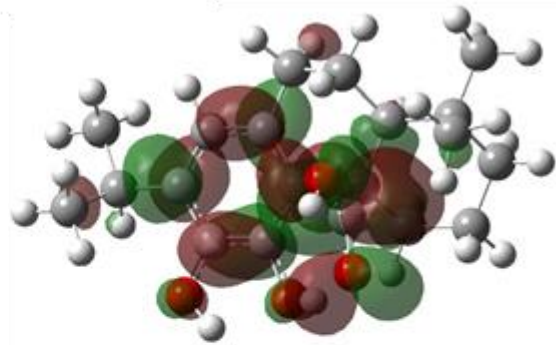
**Tabla 3.** Energías de los orbitales frontera HOMO y LUMO (en eV) y energía gap,  $E_g$ , de los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2. La energía gap,  $E_g$ , está definida como  $E_{gap} = E_{LUMO} - E_{HOMO}$ .

	HOMO	LUMO	Energía gap
Ácido carnósico (1)	-7.0211	0.2514	7.2725
Carnosol (2)	-7.4594	0.3137	7.7732
12-metoxil ácido carnósico (3)	-7.3509	0.5823	7.9332
Ácido rosmarínico (4)	-7.1979	-0.9276	6.2703
Epirosmanol (5)	-7.6208	0.0879	7.7087
Rosmadial (6)	-8.0752	-1.1682	6.9071

Ácido carnósico (1)

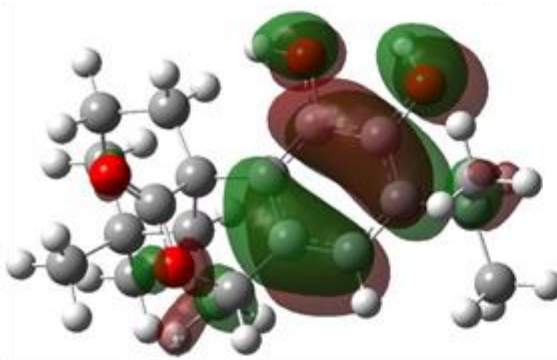


HOMO

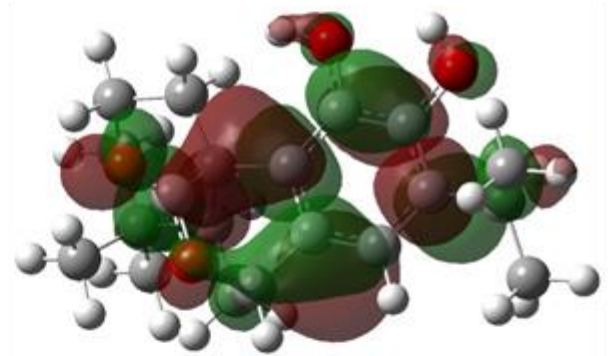


LUMO

Carnosol (2)

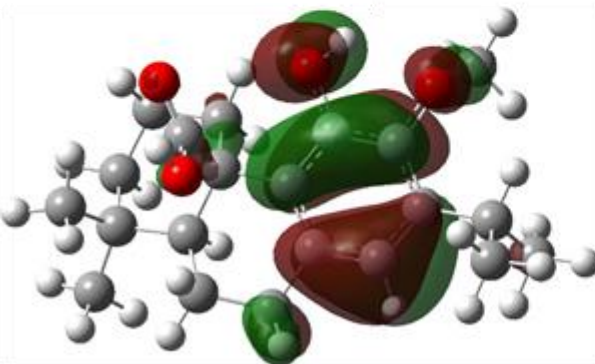


HOMO

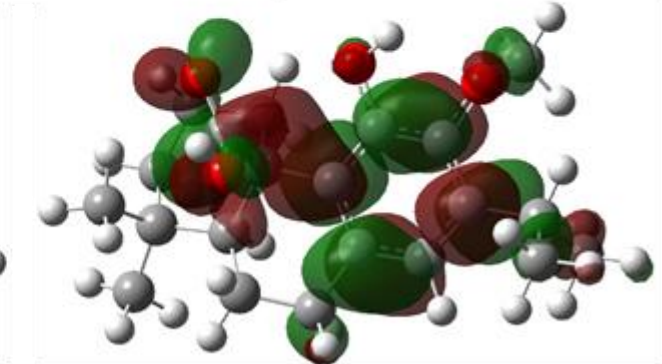


LUMO

12-metoxil ácido carnósico (3)

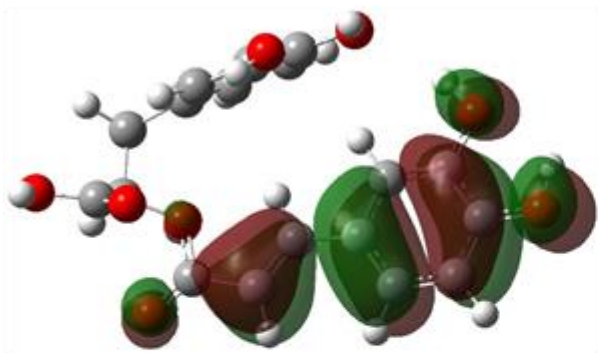


HOMO

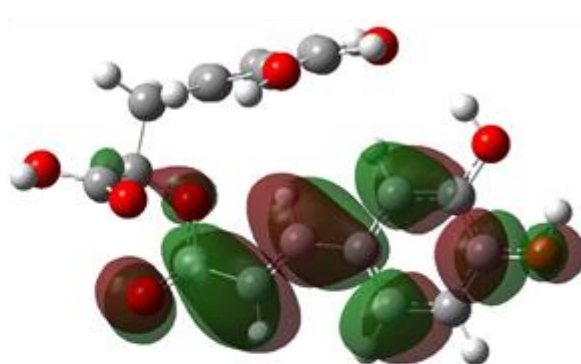


LUMO

Ácido rosmarínico (4)

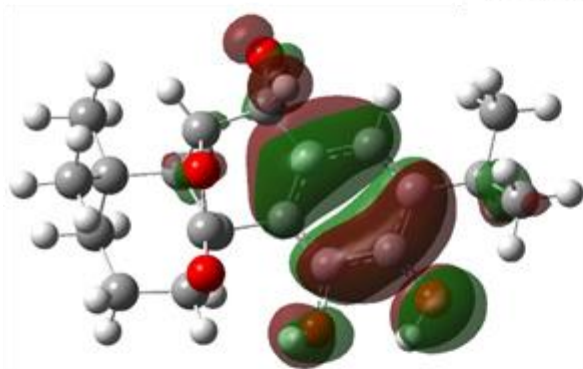


HOMO

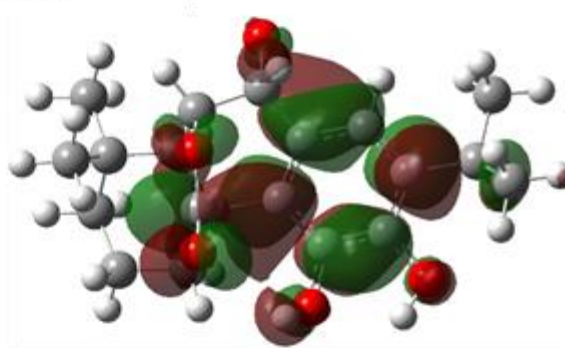


LUMO

Epirosmanol (5)

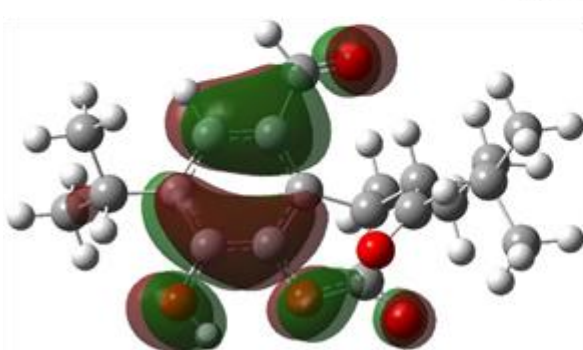


HOMO

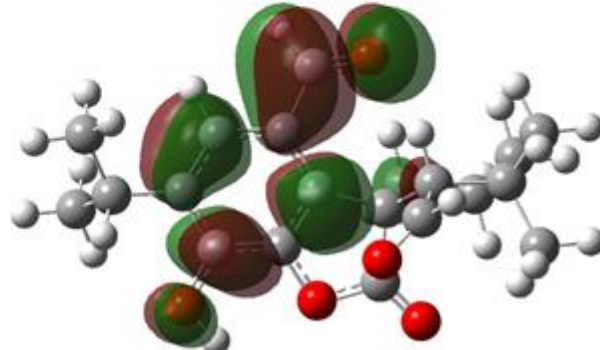


LUMO

Rosmadial (6)



HOMO



LUMO

**Figura 7.** Orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO de los diterpenos de romero calculadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.

### 5.3 Índices de reactividad química local

En la Tabla 4 se muestran los valores de la función de Fukui para ataque electrofílico  $f_k^-$ , para ataque nucleofílico  $f_k^+$ , y el descriptor dual  $f_k^2$  para los principales átomos en cada molécula. Los valores más altos de la función de Fukui  $f_k^+$  corresponden con los sitios más propensos a ataques nucleofílicos. En este caso nos interesa caracterizar a los protones más lábiles para formar un puente de hidrógeno o algún tipo de interacción no-covalente con el átomo de azufre de la metionina Met<sub>35</sub>, del Aβ (25-35).

**Tabla 4.** Funciones de Fukui para ataque electrofílico  $f_k^-$ , para ataque nucleofílico  $f_k^+$ , y el descriptor dual  $f_k^2$  para los principales átomos de los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2 usando análisis de población NBO. La numeración de los átomos corresponde a la de la Figura 9.

Ácido carnósico (1)			
Átomo	$f_k^-$	$f_k^+$	$f_k^2$
O1	0.0054	0.0717	0.0663
O2	0.0208	0.1499	0.1291
O3	0.0610	0.0304	-0.0306
O4	0.1389	0.0298	-0.1091
C17	-0.0073	0.2328	0.2255
<b>H43</b>	0.0124	<b>0.0217</b>	0.0093
H45	0.0226	-0.0071	-0.0156
H46	0.0227	0.0057	-0.0170
Carnosol (2)			
Átomo	$f_k^-$	$f_k^+$	$f_k^2$
O1	0.0242	0.0345	0.0103
O2	0.0486	0.0908	0.0422
O3	0.1452	0.0346	-0.1105

O4	0.0498	0.0294	-0.0204
C24	-0.0164	0.0581	0.0417
H49	0.0254	0.0128	-0.0126
H50	0.0249	<b>0.0140</b>	-0.0109

12-metoxil ácido carnósico (3)

Átomo	$f_k^-$	$f_k^+$	$f_k^2$
O1	-0.0005	0.0221	0.0217
O2	0.0329	0.0861	0.0533
O3	0.1382	0.0212	-0.1170
O4	0.0246	0.0143	-0.0103
C17	-0.0159	0.0712	0.0552
<b>H44</b>	0.0143	<b>0.0183</b>	0.0040
H46	0.0243	0.0136	-0.0107

Ácido rosmarínico (4)

Átomo	$f_k^-$	$f_k^+$	$f_k^2$
O1	0.0092	0.0184	0.0092
O2	0.0128	0.0160	0.0032
O3	0.0027	0.0075	0.0048
O4	-0.0082	0.0014	-0.0068
O5	-0.0057	-0.0028	-0.0029
O6	0.0759	0.1220	0.0461
O7	0.0623	0.0245	-0.0378
O8	0.1187	0.0385	-0.0802
C14	-0.0021	0.0000	-0.0021
<b>H38</b>	0.0081	<b>0.0158</b>	0.0038
H39	0.0038	0.0032	-0.0006
H40	0.0038	0.0045	0.0008

H41	0.0232	0.0091	-0.0140
H42	0.0233	0.0144	-0.0089

Epirosmanol (5)

Átomo	$f_k^-$	$f_k^+$	$f_k^2$
O1	0.0164	0.0300	0.0136
O2	0.0430	0.0308	-0.0122
O3	0.0363	0.0886	0.0523
O4	0.0416	0.0266	-0.0150
O5	0.1447	0.0342	-0.1106
C15	-0.0133	0.0734	0.0601
H42	0.0008	0.0053	0.0045
<b>H44</b>	0.0246	<b>0.0198</b>	-0.0048
H45	0.0253	0.0120	-0.0132

Rosmadiol (6)

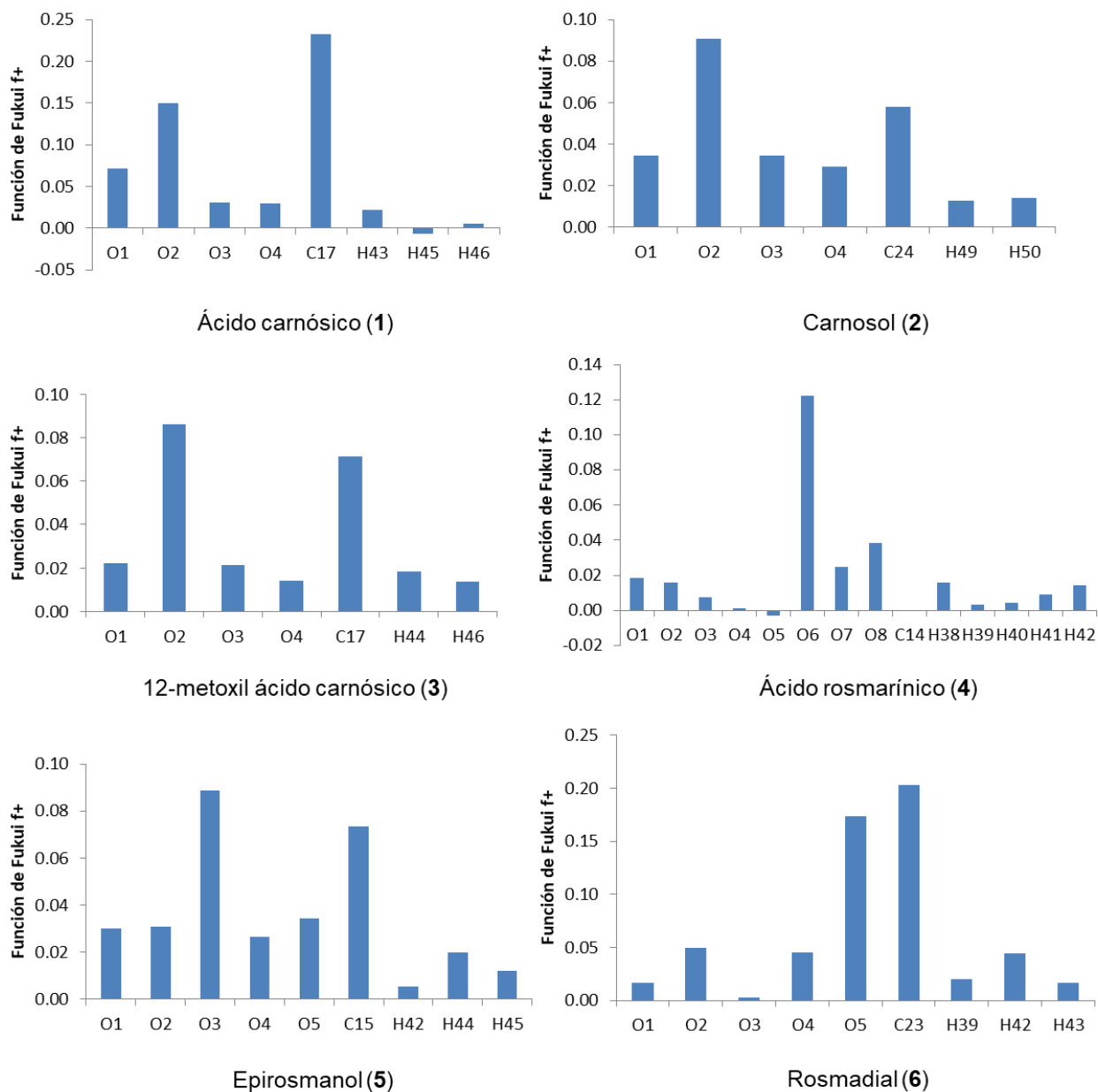
Átomo	$f_k^-$	$f_k^+$	$f_k^2$
O1	0.0702	0.0168	-0.0534
O2	0.0803	0.0493	-0.0310
O3	-0.0136	0.0029	-0.0107
O4	0.1331	0.0447	-0.0884
O5	0.1038	0.1733	0.0695
C23	-0.0246	0.2028	0.1782
<b>H39</b>	0.0223	<b>0.0200</b>	-0.0022
<b>H42</b>	0.0262	<b>0.0443</b>	0.0181
<b>H43</b>	0.0217	<b>0.0164</b>	-0.0052

En la Tabla 4 se puede observar que los valores más altos de  $f_k^+$  corresponden a los protones H43, H44 y H38, del grupo ácido para el ácido carnósico (1), el 12-

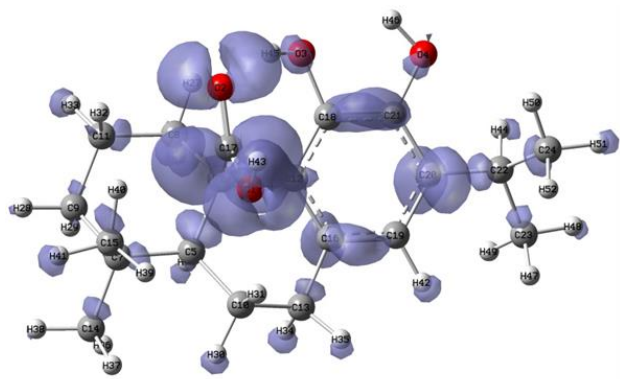
metoxil ácido carnósico (**3**) y el ácido rosmarínico (**4**), los cuáles son los más propensos a sufrir un ataque nucleofílico por parte del azufre de la Met<sub>35</sub> del Aβ (25-35). En el caso del carnosol (**2**) y el epirosmanol (**5**), los dos protones de los grupos hidroxilo compiten para recibir el ataque nucleofílico del átomo de azufre, sin embargo el H50 y el H44, respectivamente, presentan un valor de la función de Fukui electrofílica  $f_k^+$  mayor y serían los más propensos para formar un puente de hidrógeno con el átomo de azufre de la Met<sub>35</sub>. Finalmente, en el rosmadial (**6**), el protón H43 del grupo hidroxilo y los protones H39 y H42 de los grupos aldehído presentan los valores de  $f_k^+$  más altos. Sin embargo, el protón más lábil es el del H43 del grupo hidroxilo y es el más propenso para formar el puente de hidrógeno con el átomo de azufre de la Met<sub>35</sub>. En la Figura 8 se muestran las gráficas de los valores de la función de Fukui electrofílica  $f_k^+$  para los átomos seleccionados en la Tabla 4.

En la Figura 9 se muestran las isosuperficies de las funciones de Fukui electrofílicas  $f_k^+$ , obtenidas de graficar la diferencia de las densidades electrónicas de las especies aniónica y neutra. Las isosuperficies se graficaron con un isovalor de 0.002 u.a. En la Figura 9 se puede observar que las  $f_k^+$  están localizadas sobre diferentes átomos de C y O en las seis moléculas en estudio. Sin embargo, los átomos de interés para sufrir un ataque nucleofílico son los protones más lábiles para poder interactuar con el azufre de la Met<sub>35</sub> vía enlaces no-covalentes. En el ácido carnósico (**1**), en el 12-metoxil ácido carnósico (**3**) y el ácido rosmarínico (**4**) se puede observar que los protones del grupo ácido carboxílico, H43, H44 y H38, respectivamente, tienen una mayor contribución de la  $f_k^+$ , respecto a los otros protones lábiles de los grupos hidroxilo. En el caso del carnosol (**2**) y del epirosmanol (**5**) se ven contribuciones de la  $f_k^+$  sobre los protones de los grupos hidroxilo sustituidos en el anillo fenilo, H49 y H50 para el carnosol (**2**); y H44 y H45 para el epirosmanol (**5**), mientras que para el rosmadial (**6**) se observa contribución tanto en el protón del grupo hidroxilo, H43, como en los protones de los grupos aldehído, H39 y H42. En la siguiente sección se analizarán los complejos formados entre el Aβ (25-35) y los diterpenos en estudio mediante la

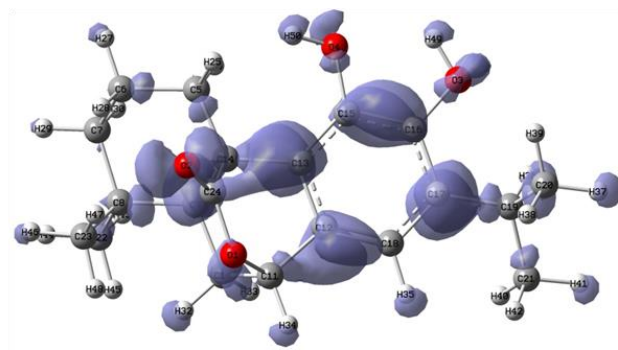
formación de los puentes de hidrógeno O–H···S, entre los protones más lábiles de los diterpenos y el átomo de azufre de la Met<sub>35</sub> del Aβ (25-35).



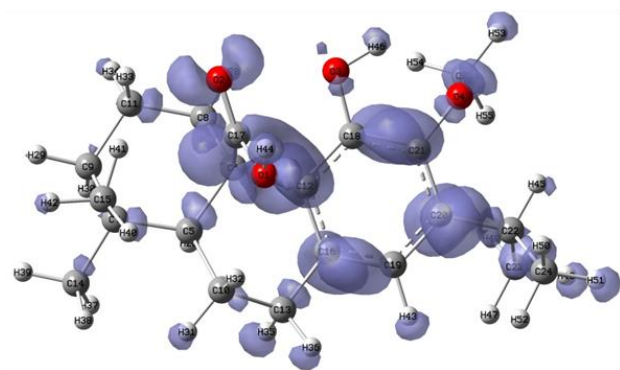
**Figura 8.** Gráficas de las funciones de Fukui para ataque nucleofílico  $f_k^+$  para los principales átomos de los diterpenos de romero calculadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2 usando análisis de población NBO.



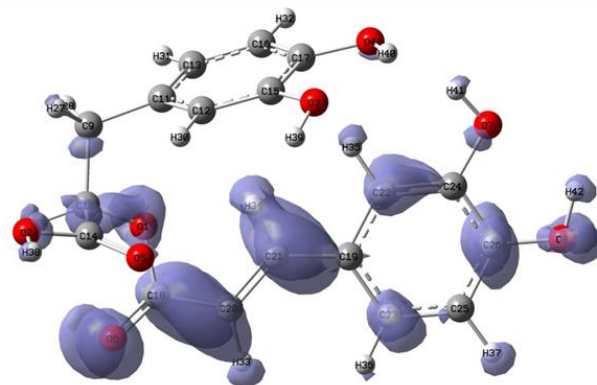
Ácido carnósico (1)



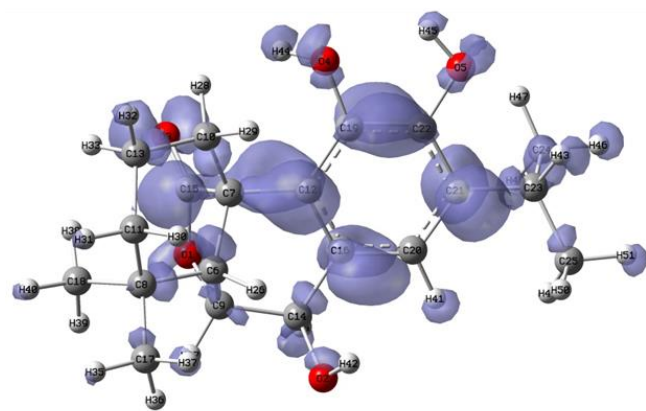
Carnosol (2)



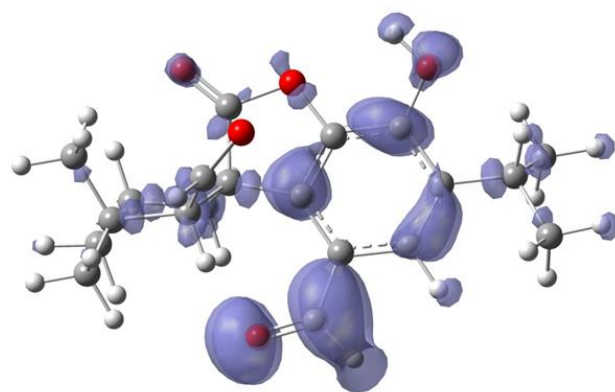
12-metoxil ácido carnósico (3)



Ácido rosmarínico (4)



Epirosmanol (5)



Rosmadiol (6)

**Figura 9.** Isosuperficies de las funciones de Fukui para ataque nucleofílico  $f_k^+$  de los diterpenos de romero calculadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.

## 5.4 Interacción de los diterpenos del romero con el péptido $\beta$ -amiloide (25-35)

La Tabla 5 muestra las energías de interacción para los complejos formados entre el péptido  $\beta$ -amiloide (25-35) y los diferentes diterpenos del romero obtenidas de acuerdo a la ecuación (13).

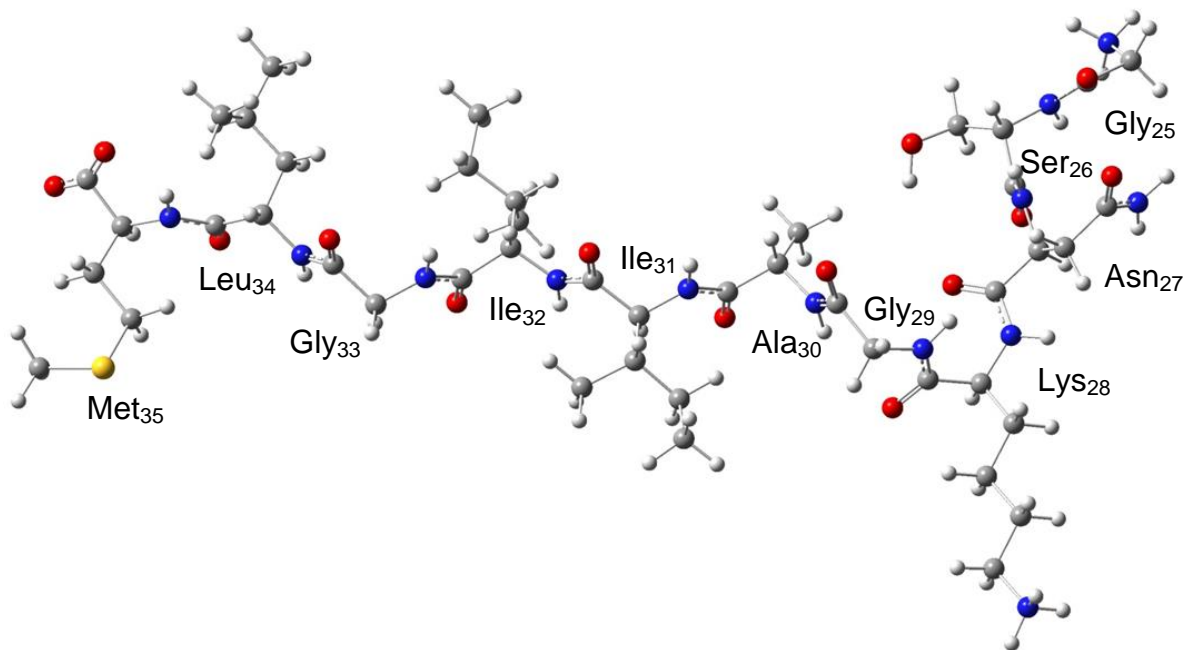
**Tabla 5.** Energías electrónicas del péptido  $\beta$ -amiloide (25-35),  $E_{A\beta}$ , de los diterpenos,  $E_{diterpeno}$ , y de los complejos formados entre el  $A\beta(25-35)$  y los diterpenos del romero,  $E_{A\beta-diterp}$  (en Hartrees (arriba) y las energías de interacción,  $E_{inter}$  (en kcal/mol) calculadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.

Complejo	$E_{A\beta}$	$E_{diterpeno}$	$E_{A\beta-diterpeno}$	$E_{interacción}$
$A\beta(25-35)$ -ácido carnósico ( <b>C1</b> )	-3926.1129	-1079.7633	-5005.9044	-17.6876
$A\beta(25-35)$ -carnosol ( <b>C2</b> )	-3926.1129	-1078.5475	-5004.6865	-16.3666
$A\beta(25-35)$ -12-metoxil ácido carnósico ( <b>C3</b> )	-3926.1129	-1119.0429	-5045.1737	-11.2223
$A\beta(25-35)$ -ácido rosmarínico ( <b>C4</b> )	-3926.1129	-1297.1783	-5223.3109	-12.3410
$A\beta(25-35)$ -epirosmanol ( <b>C5</b> )	-3926.1129	-1153.7662	-5079.9014	-14.0184
$A\beta(25-35)$ -rosmadial ( <b>C6</b> )	-3926.1129	-1152.5337	-5078.6703	-14.8302

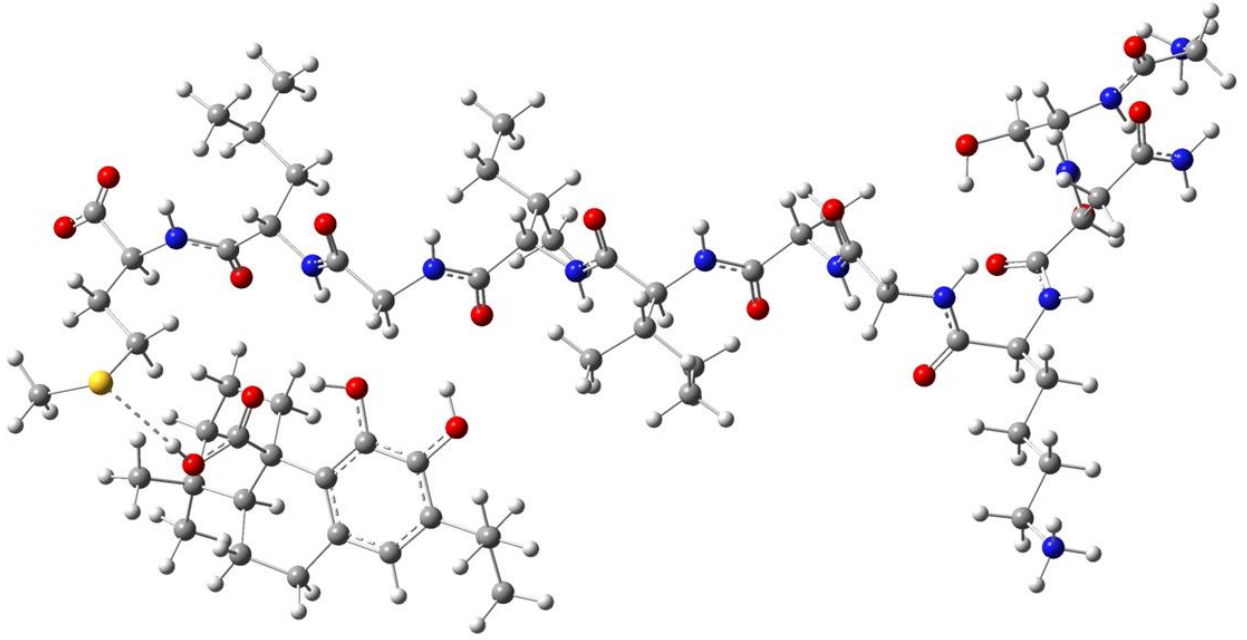
Se puede observar que el complejo con mayor energía de interacción es el complejo **C1** con ácido carnósico, seguido del complejo **C2** formado con carnosol. Mientras que los complejos con menor energía de interacción son los complejos **C3** y **C4** con 12-metoxil ácido carnósico y ácido rosmarínico, respectivamente. El valor negativo de la energía de interacción indica que tanto la estructura de los complejos formados entre el  $A\beta$  (25-35) y los diterpenos de romero, así como la estructura del  $A\beta(25-35)$  no son puntos estacionarios.

En la Figura 10 se muestra la estructura del  $A\beta(25-35)$  utilizada para los complejos con los diterpenos de romero y en la Figura 11 se muestran los diferentes

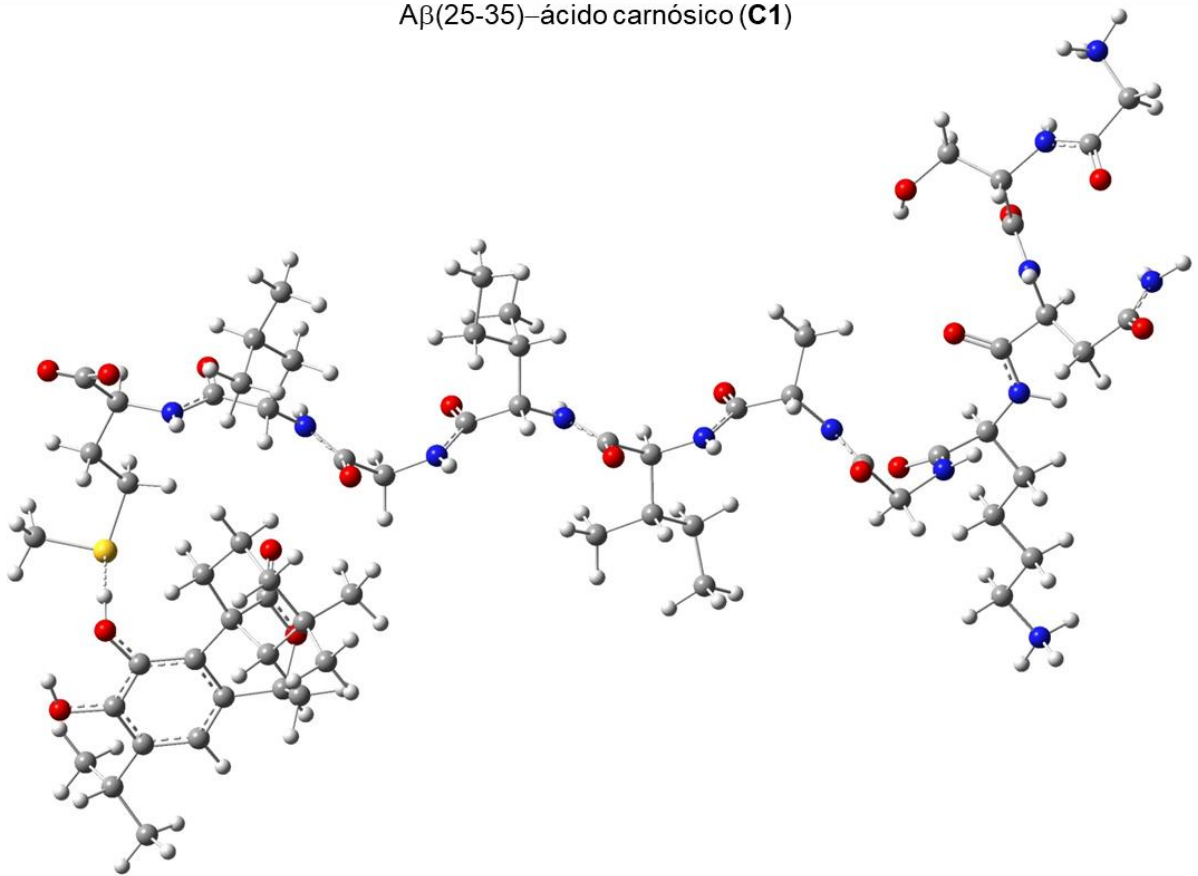
complejos indicando el puente de hidrógeno formado entre el protón más lábil de cada diterpeno y el átomo de azufre de la Met<sub>35</sub> del A $\beta$ (25-35).



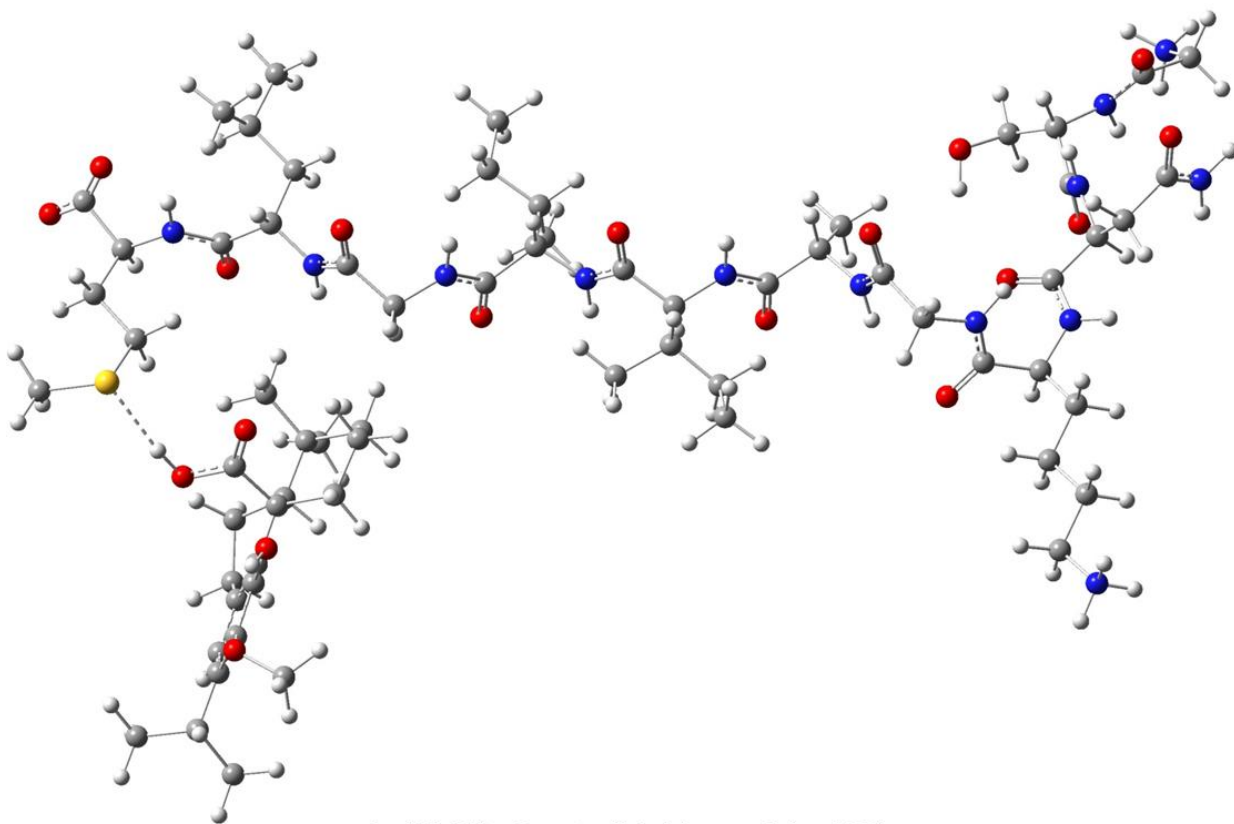
**Figura 10.** Estructura del  $\beta$ -amiloide (25-35) calculado en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.



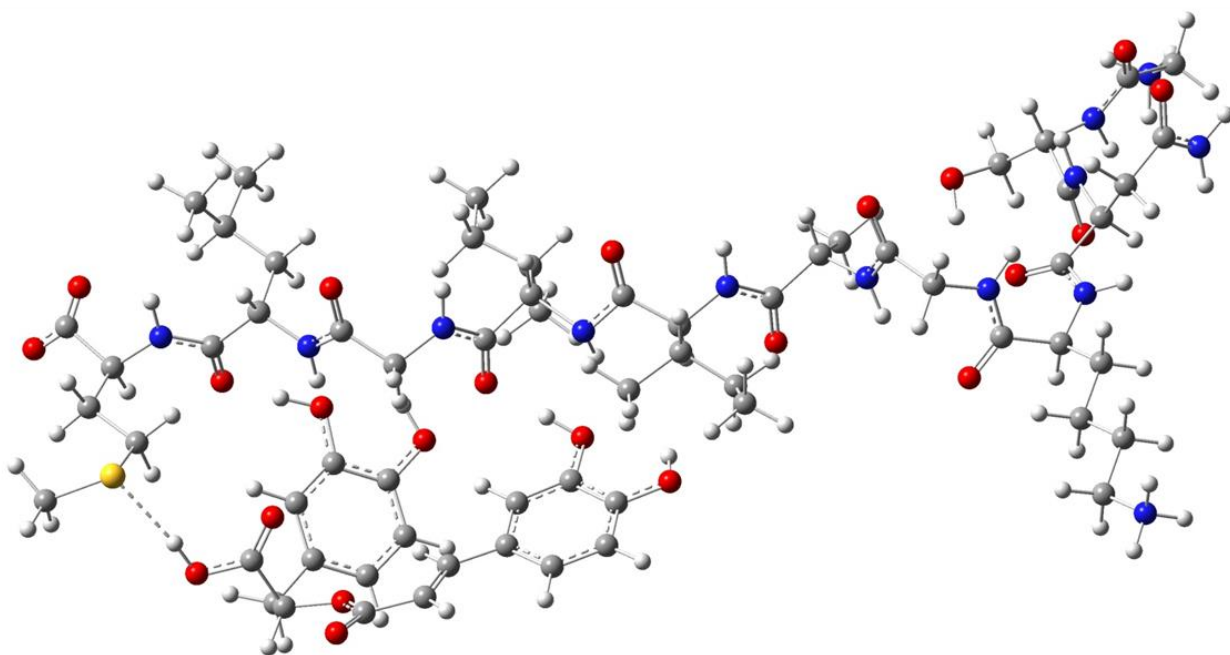
Aβ(25-35)-ácido carnósico (C1)



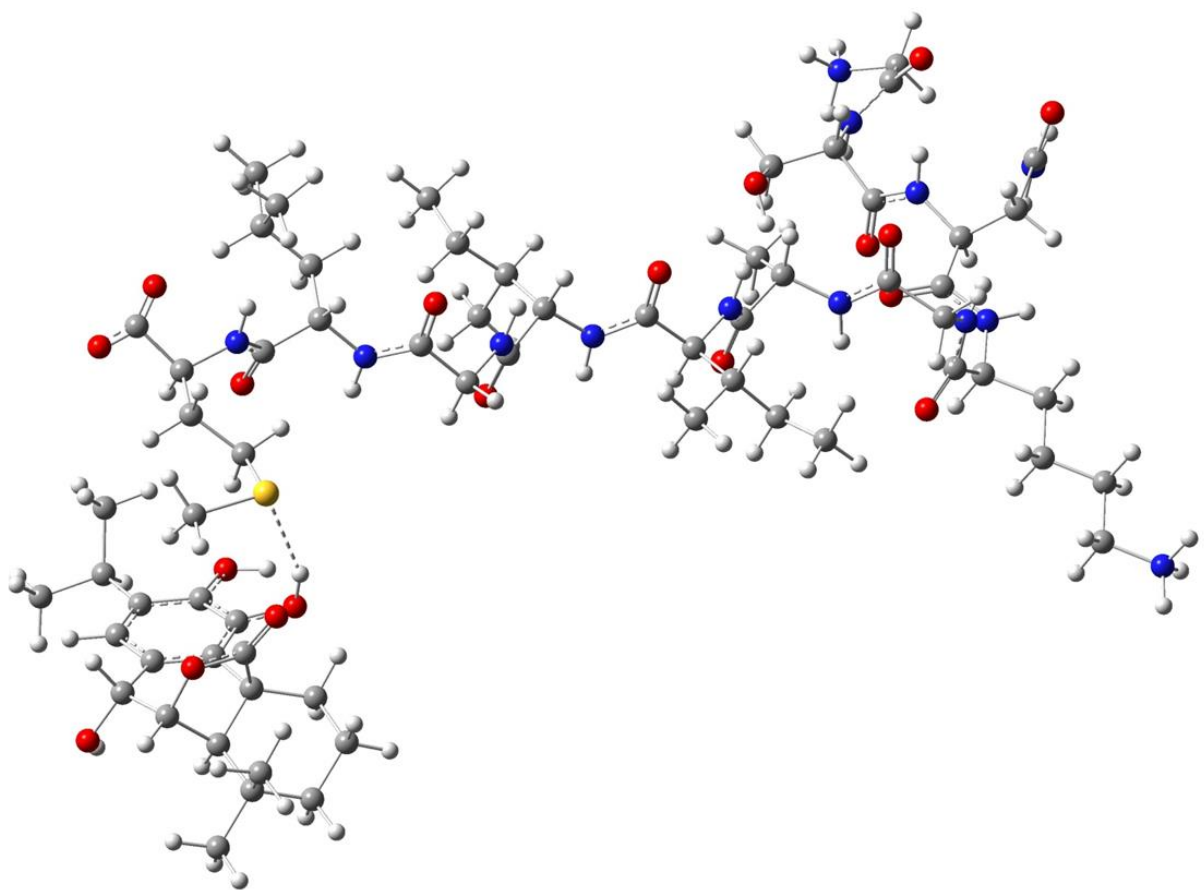
Aβ(25-35)-carnosol (C2)



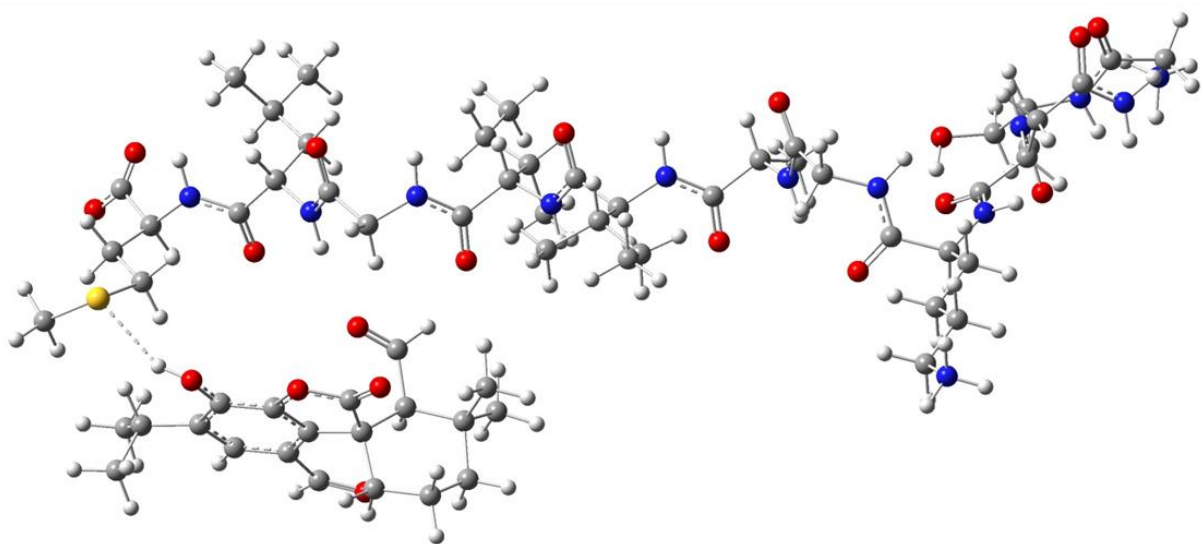
A $\beta$ (25-35)– 2-metoxil ácido carnósico (C3)



A $\beta$ (25-35)– ácido rosmarínico (C4)



A $\beta$ (25-35)– epirosmanol (C5)



A $\beta$ (25-35)– rosmadial (C6)

**Figura 11.** Estructuras de los complejos formados entre el A $\beta$  (25-35) y los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.

En la Tabla 6 se muestran los valores de las distancias y los ángulos de valencia de los puentes de hidrógeno formados entre el protones más lábiles de los diterpenos con el átomo de azufre de la Met<sub>35</sub> del A $\beta$ (25-35).

**Tabla 6.** Parámetros de los puentes de hidrógeno de los complejos formados entre el A $\beta$ (25-35) y los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.

	O-H...S (Å)	$\angle$ O-H...S (°)
A $\beta$ (25-35)-ácido carnósico (C1)	2.44162	149.85010
A $\beta$ (25-35)-carnosol (C2)	2.23068	150.28413
A $\beta$ (25-35)-12-metoxil ácido carnósico (C3)	2.20249	169.20356
A $\beta$ (25-35)-ácido rosmarínico (C4)	2.21384	164.14712
A $\beta$ (25-35)-epirosmanol (C5)	2.31101	151.82194
A $\beta$ (25-35)-rosmadial (C6)	2.36896	154.8971

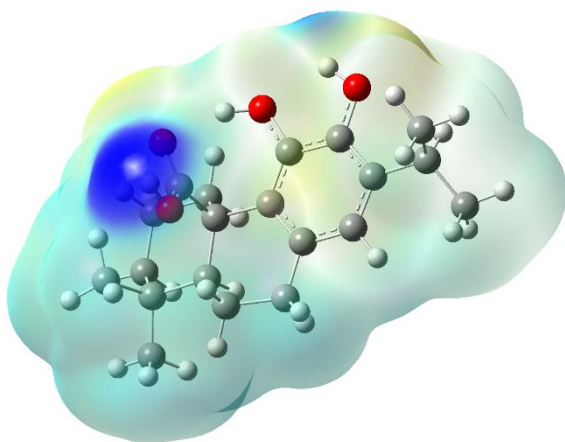
De la Tabla 6 se puede observar en general que en todos los casos, los complejos A $\beta$ (25-35)-diterpeno forman enlaces de puente hidrógeno fuertes con base en la distancia del enlace. Se pueden considerar enlaces fuertes con una distancia de entre ~ 2.0 y 2.8 Å. Por otra parte se puede considerar que el enlace es ideal si el átomo donador, el hidrógeno, el par solitario y el átomo aceptor se encuentran todos colineales, es decir, mientras más se acerque el ángulo de valencia a los 180°. Tomando en cuenta que los enlaces de hidrógeno fuertes tienen ángulos de enlace entre 170 y 180°, y los enlaces de hidrógeno débiles tienen ángulos de enlace menores a 120°, ninguno de los complejos forma enlaces débiles. Los puentes de hidrógeno típicos en la metionina suelen ser de 141.1 ° aproximadamente [41].

En particular, los complejos que forman los puentes de hidrógeno más fuertes son los complejos **C3** y **C4** con el 12-metoxil ácido carnósico y el ácido rosmarínico, con distancias de enlace menores y ángulos de valencia mayores en la interacción formada con el átomo de azufre de Met<sub>35</sub> del Aβ(25-35), ver Tabla 6.

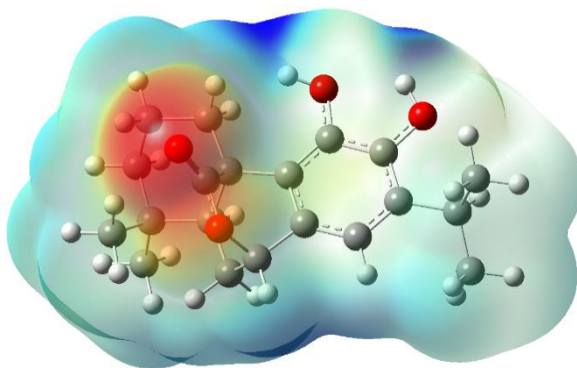
En el análisis de los mapas de potencial electrostático molecular (MEP) de los diterpenos del romero mostrados en la Figura 12, se pueden observar las regiones en color rojo, naranja y amarillo, que son las zonas nucleofílicas y son más susceptibles a ataques electrofílicos, mostrando en el potencial electrostático una mayor densidad electrónica. Las regiones electrofílicas se muestran en azul, son las zonas de menor densidad electrónica y se corresponden con los protones lábiles de los diterpenos de romero susceptibles a ataques nucleofílicos por parte del átomo de azufre de la Met<sub>35</sub>, tal como se menciona en el análisis de las funciones de Fukui electrofílicas  $f_k^+$  y como se muestran en la Figura 9, ver sección 5.3. En el ácido carnósico (**1**), el 12-metoxil ácido carnósico (**3**) y el ácido rosmarínico (**4**) los protones del grupo ácido carboxílico, que corresponden a los átomos de H43, H44 y H38, respectivamente, se observan claramente en color azul. En el carnosol (**2**) se ven estas zonas electrofílicas sobre los protones de los grupos hidroxilo sustituidos en el anillo fenilo, H49 y H50, mientras en el epirosmanol (**5**) se observan en H44 y H45. En el rosmadial (**6**) se observan las zonas electrofílicas en el protón del grupo hidroxilo, H43, así como en los protones de los grupos aldehído, H39 y H42. Los MEP fueron graficados con un isovalor de 0.02 u.a. en una escala de  $-5.5 \times 10^{-2}$  a  $3.50 \times 10^{-2}$ .

Por otro lado, en la Figura 13, en el MEP del Aβ(25-35) se observa que la mayor densidad electrónica, i.e. la zona nucleofílica, se encuentra en el grupo carboxilato y el átomo de azufre de la metionina, Met<sub>35</sub>, en esta región se lleva a cabo el ataque nucleofílico por parte del azufre de este aminoácido a los protones más lábiles de los diterpenos de romero. El MEP del Aβ(25-35) se graficó con un isovalor de 0.02 u.a. en una escala de -0.110 a 0.241. Finalmente, en los MEP de los complejos Aβ(25-35)-diterpeno, en la Figura 14, se puede observar para todos los complejos en la región del enlace O-H...S una zona de densidad electrónica

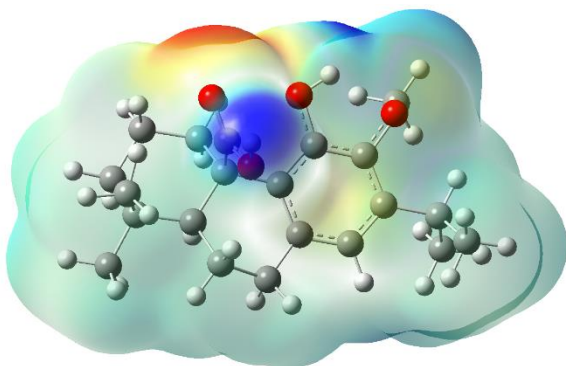
intermedia que corresponde al tipo de enlace de puente de hidrógeno formado entre los hidrógenos más lábiles de los diterpenos y el átomo de azufre de la Met<sub>35</sub>. En general, en la escala de potencial electrostático molecular estas zonas tienden a coloraciones amarillo a verde-dorado, que muestran densidades electrónicas intermedias entre los extremos (rojo y azul oscuro). Los MEP de los complejos A $\beta$ (25-35)-diterpeno se graficaron con un isovalor de 0.02 u.a. en una escala de -0.110 a 0.241.



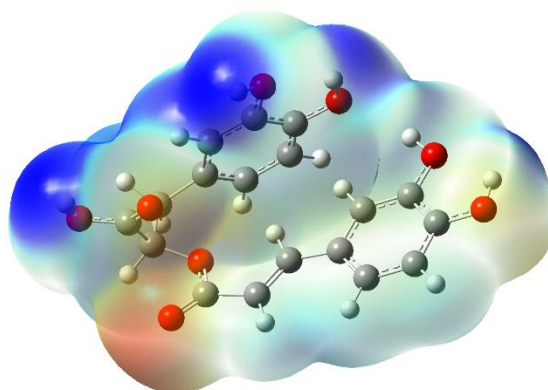
Ácido carnósico (1)



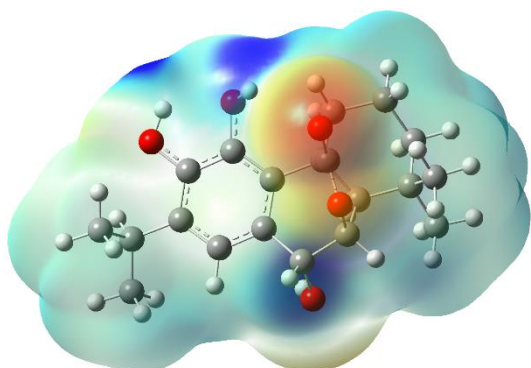
Carnosol (2)



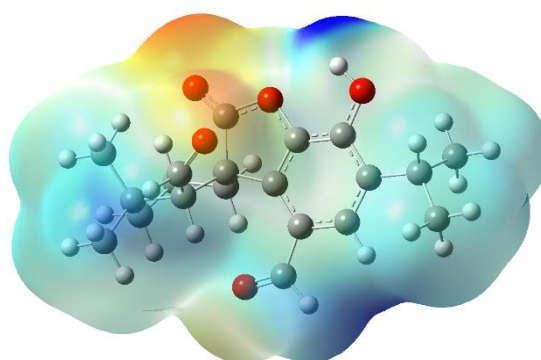
12-metoxil ácido carnósico (3)



Ácido rosmarínico (4)

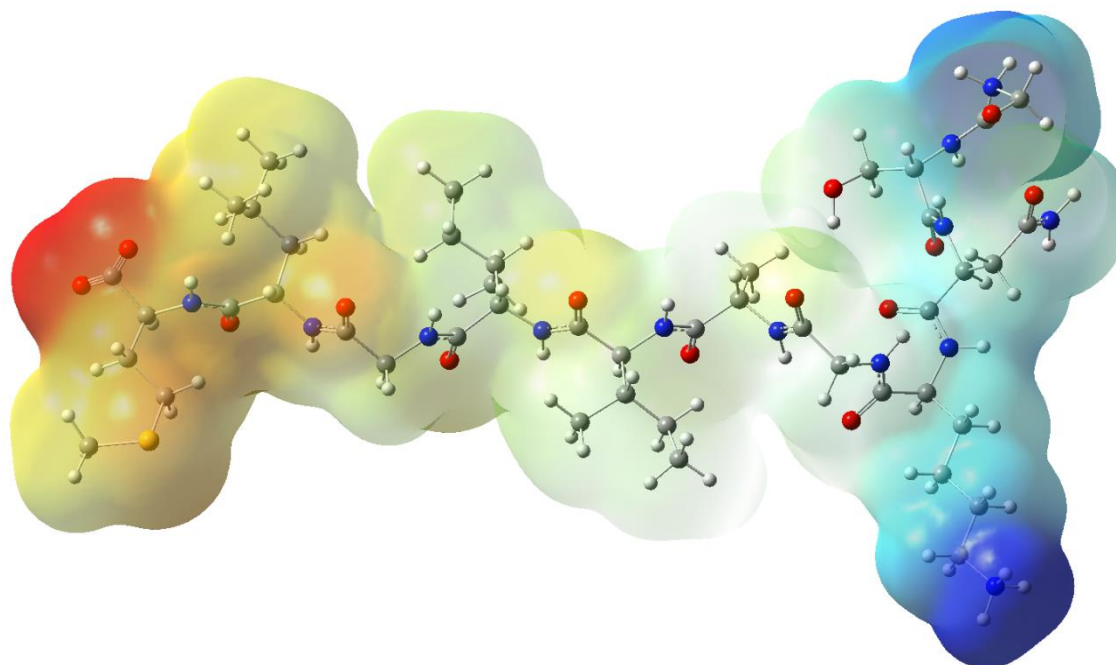


Epirosmanol (5)

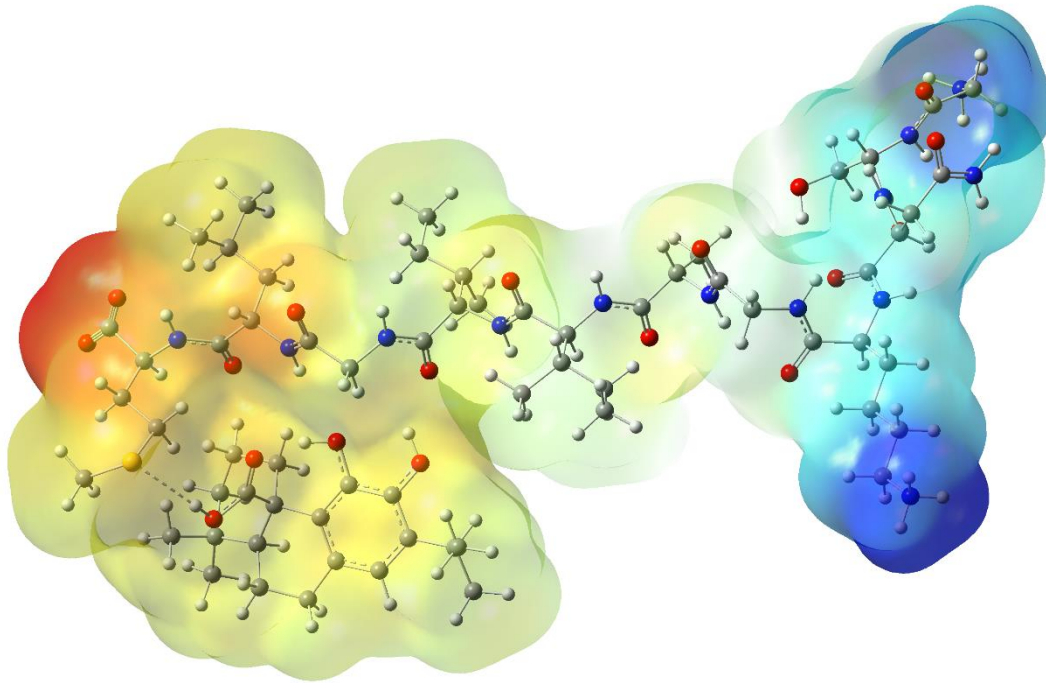


Rosmadiol (6)

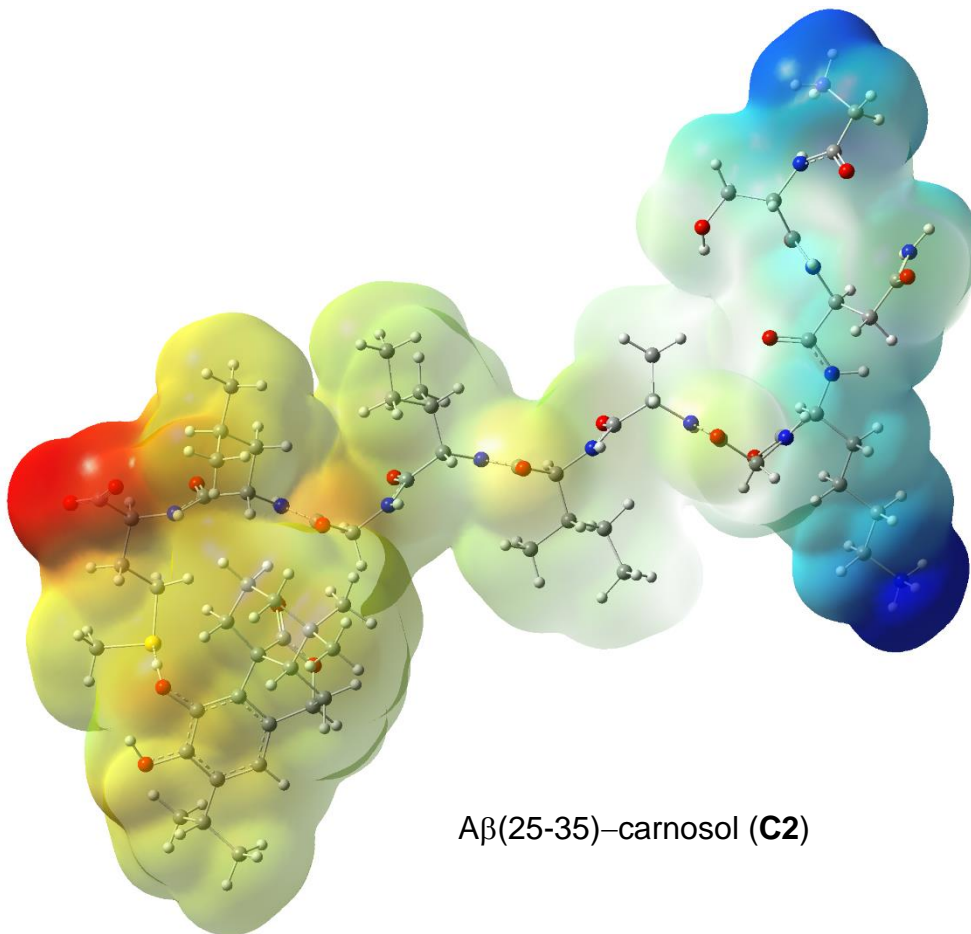
**Figura 12.** Mapas del potencial electrostático molecular (MEP) de los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.



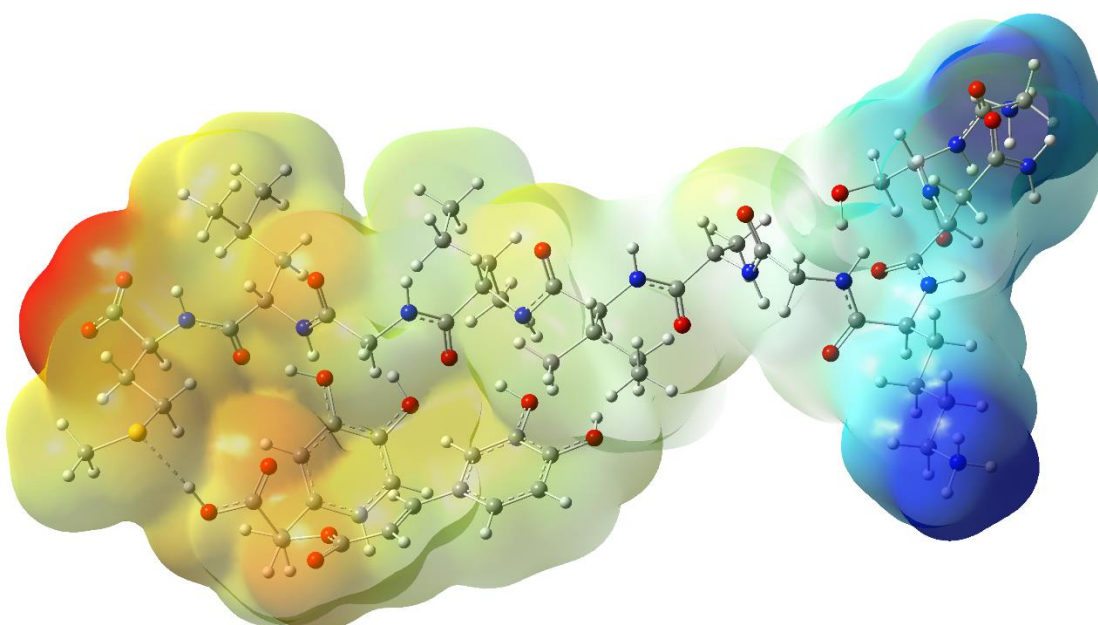
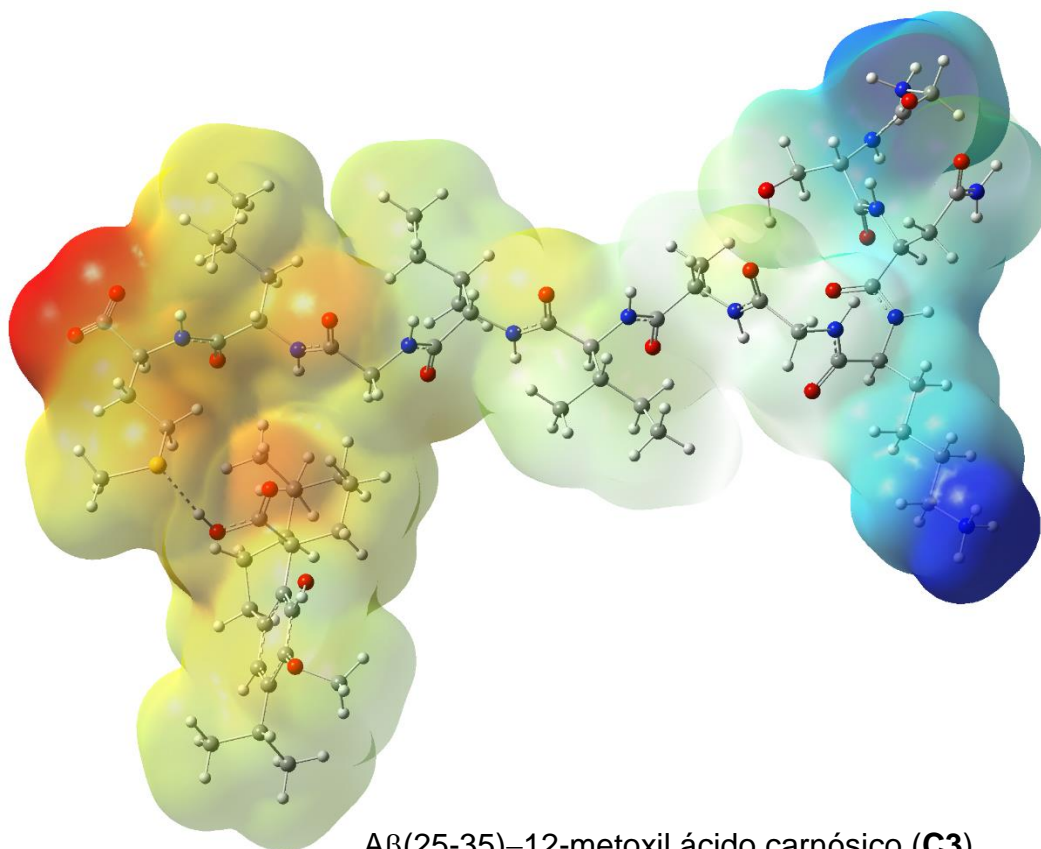
**Figura 13.** Mapa del potencial electrostático molecular (MEP) del  $\beta$ -amiloide (25-35) calculado en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.

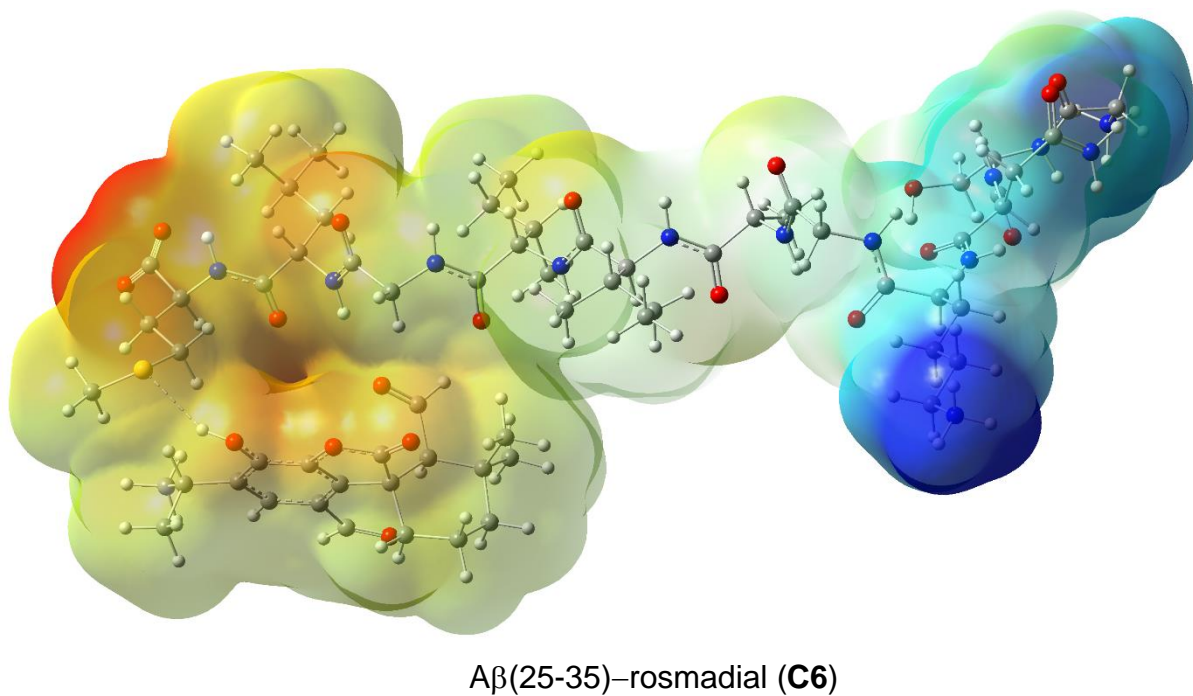
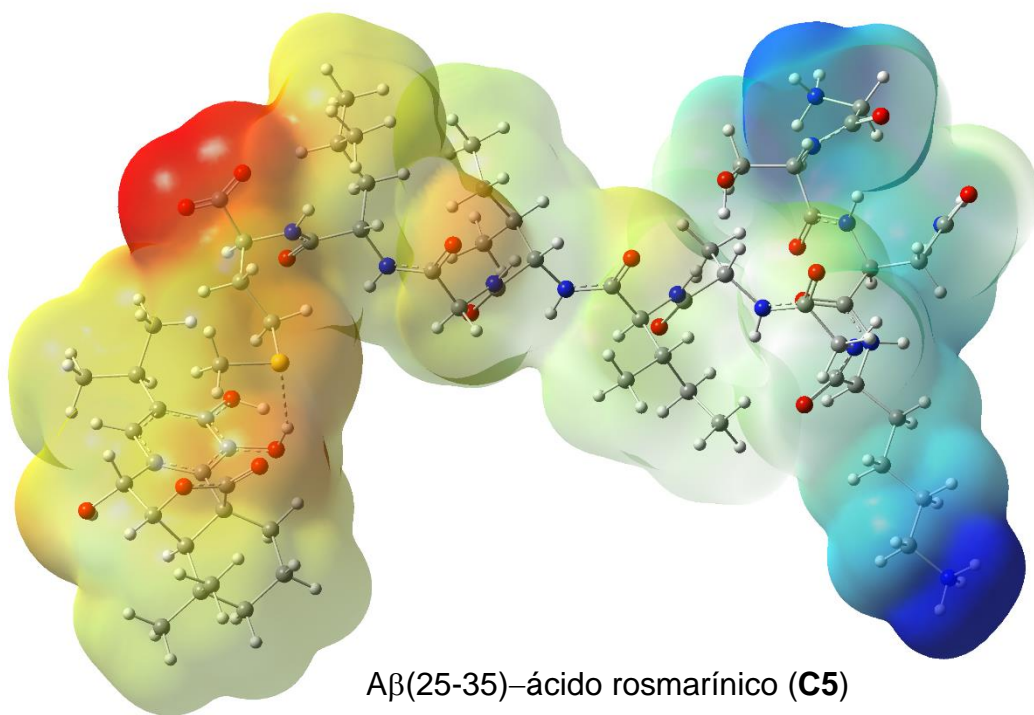


Aβ(25-35)-ácido carnósico (C1)



Aβ(25-35)-carnosol (C2)





**Figura 14.** Mapas del potencial electrostático molecular (MEP) de los complejos formados entre el Aβ (25-35) y los diterpenos de romero calculados en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2.

## CONCLUSIONES

En este proyecto de tesis se estudiaron las propiedades de reactividad química global y local de seis moléculas derivadas de diterpenos de romero: ácido carnósico (1), carnosol (2), 12-metoxil ácido carnósico (3), ácido rosmarínico (4), epirosmanol (5) y rosmadial (6). Los diterpenos de romero estudiados aquí se pueden caracterizar como candidatos potenciales para interactuar con el péptido A $\beta$ (25-35) involucrado en el proceso de agregación de placas seniles que se desarrolla en la enfermedad de Alzheimer. Las moléculas fueron optimizadas en el nivel de teoría M06-2X/DGDZVP2. Se distinguen principalmente por diferencias estructurales siendo de tres tipos: diterpenos fenólicos, con éster de ácido cafeico y con aldehído, lo cual puede explicar algunas de sus diferencias y cómo se comparan entre sí para ver cuáles forman interacciones más fuertes con A $\beta$ (25-35). Aún con sus diferencias estructurales, comparten muchas características en los índices de reactividad e incluso en la formación de los complejos con el A $\beta$ (25-35).

Los resultados de los índices de reactividad global muestran dos grupos, el primero con el ácido rosmarínico (4), el epirosmanol (5) y el rosmadial (6), que tienen mayor capacidad de aceptar electrones; y el segundo grupo con el ácido carnósico (1), el carnosol (2) y el 12-metoxil ácido carnósico (3), que muestran mejores propiedades como donadores.

Los descriptores locales, basados en la función de Fukui electrofílica, muestran que los protones más lábiles corresponden a los protones del grupo ácido del ácido carnósico (1), el 12-metoxil ácido carnósico (3) y el ácido rosmarínico (4), por lo que son más propensos a sufrir un ataque nucleofílico por parte del átomo de azufre de la Met<sub>35</sub> del A $\beta$  (25-35), formando interacciones no-covalentes.

A pesar de las diferencias en la tendencia de comportamiento, las interacciones de todas las moléculas con el A $\beta$ (25-35) muestran la formación de enlaces de puente de hidrógeno fuertes, manteniendo distancias cortas de enlace y los ángulos típicos de los puentes de hidrógeno que se forman con la metionina

En general, el presente estudio proporciona información valiosa sobre la estructura electrónica y la reactividad de estas moléculas, que pueden ser útiles para diseñar nuevos fármacos con las propiedades deseadas para ser usadas en el tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer (EA). En la literatura se describe cómo estos compuestos muestran una amplia gama de efectos farmacológicos, incluyendo su efecto en la formación, agregación y toxicidad de A $\beta$ , lo que los hace interesantes en el uso terapéutico potencial contra la EA. Siendo esta una enfermedad compleja con distintos procesos patológicos, resulta útil de atacar con fármacos multifuncionales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M., De Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., & Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 388(10043), 505-517.
2. Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroscience*, 25.
3. Castellani, R. J., Plascencia-Villa, G., & Perry, G. (2019). The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: theory versus observation. *Laboratory Investigation*, 99(7), 958-970.
4. Lowe, D. (2022). Faked Beta-Amyloid Data. What Does It Mean? *Science*
5. Viña, J., Lloret, A., Orti, R., & Alonso, D. (2004). Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Molecular aspects of medicine*, 25(1-2), 117-123.
6. Verdile, G., Fuller, S., Atwood, C. S., Laws, S. M., Gandy, S. E., & Martins, R. N. (2004). The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacological Research*, 50(4), 397-409.
7. Gra Menéndez, S., Padrón Pérez, N., & Llibre Rodríguez, J. D. J. (2002). Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(4), 253-261.
8. Rauk, A. (2009). The chemistry of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews*, 38(9), 2698-2715.
9. Cheng, S. Y., Chou, G., Buie, C., Vaughn, M. W., Compton, C., & Cheng, K. H. (2016). Data supporting beta-amyloid dimer structural transitions and protein-lipid interactions on asymmetric lipid bilayer surfaces using MD simulations on experimentally derived NMR protein structures. *Data in brief*, 7, 658-672.
10. Food Standards Agency, Current EU approved additives and their E Numbers, <https://www.food.gov.uk/science/additives/enumberlist>.
11. Habtemariam, S. (2016). The therapeutic potential of rosemary (*rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, article ID 2680409, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2016/2680409>
12. Zhang, Y., Smuts, J. P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J. C., & Armstrong, D. W. (2012). Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(36), 9305-9314.
13. Bicchi, C., Binello, A., & Rubiolo, P. (2000). Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 11(4), 236-242.

14. Hernandez, D. A., & Tenorio, F. J. (2018). Reactivity indexes of antioxidant molecules from *Rosmarinus officinalis*. *Structural Chemistry*, 29, 741-751
15. Meng, P., Yoshida, H., Matsumiya, T., Imaizumi, T., Tanji, K., Xing, F. & Satoh, K. (2013). Carnosic acid suppresses the production of amyloid- $\beta$  1–42 by inducing the metalloprotease gene TACE/ADAM17 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neuroscience Research*, 75(2), 94-102.
16. Frisch, A. E., & Foresman, J. B. (1996). Exploring chemistry with electronic structure methods. Pittsburgh PA: Gaussian Inc, 302, 3-2
17. Orio, M., Pantazis, D. A., & Neese, F. (2009). Density functional theory. *Photosynthesis research*, 102, 443-453.
18. Parr R.G., Yang W. (1989) Density-Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford Univ. Press, New York.
19. Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2008). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical chemistry accounts*, 120, 215-241.
20. Hohenstein, E. G., Chill, S. T., & Sherrill, C. D. (2008). Assessment of the performance of the M05–2X and M06–2X exchange-correlation functionals for noncovalent interactions in biomolecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(12), 1996-2000.
21. Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2011). Applications and validations of the Minnesota density functionals. *Chemical Physics Letters*, 502(1-3), 1-13.
22. Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2010). The Minnesota density functionals and their applications to problems in mineralogy and geochemistry. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 71(1), 19-37.
23. Haunschild, R., Barth, A., & French, B. (2019). A comprehensive analysis of the history of DFT based on the bibliometric method RPYS. *Journal of Cheminformatics*, 11(1), 1-15.
24. Papajak, E., & Truhlar, D. G. (2010). Efficient diffuse basis sets for density functional theory. *Journal of chemical theory and computation*, 6(3), 597-601.
25. Hofmann, M., & Schaefer, H. F. (2003). Computational Chemistry. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 487–506. doi:10.1016/b0-12-227410-5/00129-0
26. Davidson, E. R., & Feller, D. (1986). Basis set selection for molecular calculations. *Chemical Reviews*, 86(4), 681-696.
27. Godbout, N., Salahub, D. R., Andzelm, J., & Wimmer, E. (1992). Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation. *Canadian Journal of Chemistry*, 70(2), 560-571.

28. Sosa, C., Andzelm, J., Elkin, B. C., Wimmer, E., Dobbs, K. D., & Dixon, D. A. (1992). A local density functional study of the structure and vibrational frequencies of molecular transition-metal compounds. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(16), 6630–6636.
29. Pantazis, D. A., & Neese, F. (2014). All-electron basis sets for heavy elements. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 4(4), 363–374.
30. Domingo, L.R.; Ríos-Gutiérrez, M.; Pérez, P. (2016). Applications of the conceptual density functional theory indices to organic chemistry reactivity. *Molecules*, 21, 1–22, doi:10.3390/molecules21060748.
31. Frau, J., and Glossman-Mitnik, D. (2017). Conceptual DFT descriptors of amino acids with potential corrosion inhibition properties calculated with the latest Minnesota density functionals. *Front. Chem.* 5, 1–8. doi:10.3389/fchem.2017.00016.
32. Huzinaga, S. (1985). Basis sets for molecular calculations. *Computer Physics Reports*, 2(6), 281-339.
33. Sahu, V., Sharma, P., & Kumar, A. (2014). Impact of Global and Local Reactivity Descriptors on the Hetero-Diels-Alder Reaction of Enaminothione with Various Electrophiles. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 59(1), 2327-2334.
34. Vazquez-Rodriguez, S., Ramírez-Contreras, D., Noriega, L., García-García, A., Sánchez-Gaytán, B. L., Melendez, F. J., Castro, M. E., De Azevedo Jr, W. F. & González-Vergara, E. (2023). Interaction of copper potential metallodrugs with TMPRSS2: A comparative study of docking tools and its implications on COVID-19. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1128859.
35. Gilardoni, F., Weber, J., Chermette, H., & Ward, T. R. (1998). Reactivity indices in density functional theory: a new evaluation of the condensed Fukui function by numerical integration. *The Journal of Physical Chemistry A*, 102(20), 3607-3613.
36. Weinhold, F., Landis, C. R., & Glendening, E. D. (2016). What is NBO analysis and how is it useful? *International Reviews in Physical Chemistry*, 35(3), 399–440. doi:10.1080/0144235x.2016.1192262
37. Scheiner, S. (2021). Insights into the nature of non-covalent bonds accessible by quantum calculations, *Developments in Physical & Theoretical Chemistry, Intra- and Intermolecular Interactions Between Non-covalently Bonded Species*, Elsevier, 39-70, ISBN 9780128175866
38. Gangadharan, R., & Sampath Krishnan, S. (2014). Natural Bond Orbital (NBO) population analysis of 1-azanaphthalene-8-ol. *Acta Physica Polonica A*, 125(1), 18-22.

39. Minkin, V. I. (1999) Glossary of terms used in theoretical organic chemistry Pure and Applied Chemistry, 71(10), 1919-1981. <https://doi.org/10.1351/pac199971101919>
40. Ebrahimi, A., Deyhimi, F., & Roohi, H. (2003). Natural bond orbital (NBO) population analysis of the highly strained central bond in [1.1. 1] propellane and some [1.1. 1] heteropropellane compounds. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 626(1-3), 223-229.
41. Zhou, P., Tian, F., Lv, F., & Shang, Z. (2009). Geometric characteristics of hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 76(1), 151–163. doi:10.1002/prot.22327
42. Millucci, L., Ghezzi, L., Bernardini, G., & Santucci, A. (2010). Conformations and Biological Activities of Amyloid Beta Peptide 25-35. Current Protein & Peptide Science, 11(1), 54–67. doi:10.2174/138920310790274626
43. Jeffrey, G. A., (1997). An introduction to hydrogen bonding, New York: Oxford university press (12) 228.
44. Kanski, J., Aksenova, M., & Butterfield, D. A. (2002). The hydrophobic environment of Met35 of Alzheimer's A $\beta$  (1–42) is important for the neurotoxic and oxidative properties of the peptide. Neurotoxicity Research, 4, 219-223.
45. Hou, L., Kang, I., Marchant, R. E., & Zagorski, M. G. (2002). Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid A $\beta$ -(1–42) peptide of Alzheimer's disease. Journal of Biological Chemistry, 277(43), 40173-40176.
46. Lockhart, C., Smith, A. K., & Klimov, D. K. (2019). Methionine oxidation changes the mechanism of A $\beta$  peptide binding to the DMPC bilayer. Scientific Reports, 9(1), 1-12.
47. Estructura 3D del ácido carnósico <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/Search?Compound=carnosic%20acid&DatabaseToSearch=Published>. Último acceso: 21/03/2023
48. Estructura 3D del carnosol <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/Search?Compound=carnosol&DatabaseToSearch=Published>. Último acceso: 21/03/2023
49. The Cambridge Structural Database. C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot and S. C. Ward, Acta Cryst. (2016). B72, 171-179 DOI: 10.1107/S2052520616003954
50. Estructura 3D del 12-metoxil ácido carnósico <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12-O-Methylcarnosic-acid>. Último acceso: 21/03/2023
51. Estructura 3D del ácido rosmarínico <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rosmarinic-acid>. Último acceso: 21/03/2023

52. Estructura 3D del epirosmanol  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epirosmanol>. Último acceso: 21/03/2023
53. Estructura 3D del rosmadial  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rosmadial>. Último acceso: 21/03/2023
54. Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2023). PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Res.*, 51(D1), D1373–D1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>
55. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Petersson G. A., Nakatsuji H., Li X., Caricato M., Marenich A. V., Bloino J., Janesko B. G., Gomperts R., Mennucci B., Hratchian H. P., Ortiz J. V., Izmaylov A. F., Sonnenberg J. L., Williams-Young D., Ding F., Lipparini F., Egidi F., Goings J., Peng B., Petrone A., Henderson T., Ranasinghe D., Zakrzewski V. G., Gao J., Rega N., Zheng G., Liang W., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Throssell K., Montgomery Jr J. A., Peralta J. E., Ogliaro F., Bearpark M. J., Heyd J. J., Brothers E. N., Kudin K. N., Staroverov V. N., Keith T. A., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A. P., Burant J. C., Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Millam J. M., Klene M., Adamo C., Cammi R., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Farkas O., Foresman J. B. and Fox D. J., Gaussian 16 Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016
56. GaussView, Version 6, Dennington, R.; Keith, T. A.; Millam, J. M. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2016.
57. Noriega, L., Díaz, A., Limón, D., Castro, M. E., Caballero, N. A., Ramírez, R. E., Pérez, J. M. & Melendez, F. J. (2019). Inhibitory mechanism of 17 $\beta$ -aminoestrogens in the formation of A $\beta$  aggregates. *Journal of Molecular Modeling*, 25, 1-9.
58. Estructura 3D del péptido A $\beta$  (25-35) de las fibras A $\beta$ <sup>2</sup>  
<https://www.rcsb.org/structure/2LMP>. Último acceso: 15/05/2023
59. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank (2000) *Nucleic Acids Research* 28: 235-242 <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
60. Šponer, J., Hobza, P., & Leszczynski, J. (1999). Computational Approaches to the Studies of the Interactions of Nucleic Acid Bases. *Theoretical and Computational Chemistry*, 85–117. doi:10.1016/s1380-7323(99)80078-8.