



Facultad de Química, Universidad de la Republica, Uruguay

***"RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE POLIFENOLES:  
DESARROLLO Y APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE  
FARMACOLOGÍA MOLECULAR Y ESTUDIOS DE UNIÓN A  
BLANCOS INVOLUCRADOS EN LOS MECANISMOS DE  
ACCIÓN".***

**TESIS DE DOCTORADO EN QUIMICA**

**Q.F Elena Maria Alvareda Migliaro**

Directores:

Dra. Margot Paulino Zunini

Dr. Guillermo Moyna Borthagaray

Dr. Pablo Denis

Año: 2016

## **DEDICATORIAS**

*A la misericordia Divina, a mis Padres y a mi Hermana por el amor que me dieron y me dan siempre, por sus ejemplos de vida, por los valores que me transmitieron, por no abandonarme nunca, por confiar en mí y apoyar mis sueños.*

*A mis abuelos y padrino por preocuparse y apoyar mis estudios cuando más lo necesite.*

*A mi amor Juan por enseñarme que el amor verdadero e incondicional aún existe, por elegirme como su compañera de ruta.*

*A mis mascotas a Flopy por ser tan compañera y seguirme desde el 2007 por todo el País y a India por revolucionar el hogar.*

*“El mundo esta en manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y de correr el riesgo de vivir sus sueños”, Paulo Coelho, El Alquimista.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Margot Paulino Zunini directora de esta Tesis por el apoyo brindado durante todos estos años desde el año 2000 cuando comencé a trabajar en su grupo, tanto en el ámbito académico como también en el personal por confiar en mí y por su amistad. A Fede por su guía y ayuda en todos estos años de mi formación académica por su buen compañerismo incondicional. A mis primeros compañeros del CeBioinfo Pablo, Roberto, Ana, a los de antes Pablo M., Antonella, los de ahora Emiliana, Brenda, Diego.

Este agradecimiento se extiende a los otros dos co Directores de Tesis el Dr. Pablo Denis con quien iniciamos por allá por el 1998 nuestro trayecto en el modelado biomolecular, y que hoy la vida nos dio la posibilidad de guiarme en el área de la química cuántica y al Dr. Guillermo Moyna primeramente por haber aceptado la invitación de participar en esta Tesis como Director, por abrirme las puertas de su grupo de trabajo para dejar esta línea de trabajo en el interior del País y sobre todo por confiar en mí.

Gracias a mis amigos del alma incondicionales Maria, Fernando, las Boninis, Andrea, a mis amigos de la Barra por haberme dado su amistad que es uno de mis tesoros más preciados que inyecta el espíritu para seguir adelante, a los compañeros del Clemente Estable en especial a Marcela Martínez y al Dr. Andrés Abin por colaborar con algunos reactivos para la Tesis, y por todos los momentos compartidos académicos y de diversión, a todos ellos Gracias por haberme hecho sentir querida y acompañada sobre todo en momentos difíciles. A mi querida familia chilena (Lucia, Vero y Carito) que me apoyaron y fueron un pilar importante en este camino. A la Profesora y amiga Victoria Espinosa por prestar su laboratorio, por su orientación con los ensayos *in vitro* de las actividades de *scavengers* e inhibición de ciclooxigenasas y también por los momentos de diversión compartidos. A las Profesoras Karen Ovsejevi y Carmen Manta por prestar las instalaciones del laboratorio y el equipo de ELISA de la Cátedra de Bioquímica de FQ donde se realizó el ensayo *in vitro* de xantina oxidasa.

Un agradecimiento muy especial a mis compañeros de hoy en día con los cuales convivo el día a día en el CENUR sede Salto, en especial Pablo mi nuevo jefe por confiar en mí para la etapa que se viene, a todos los demás mis compañeros de trabajo del Departamento del Agua, a Sonia y Ana. Desde mi

corazón un “gracias totales” mis amigas incondicionales del grupo “Las tías d Lu” que me dan siempre esa inyección afectiva de cariño que uno necesita, que le ponen luz y alegría a mis días.

En plan más “materialista”, pero no menor ya que sin ello no podría haber cumplido con la mayor parte de la investigación, no puedo dejar de agradecer al PEDECIBA QUIMICA, CSIC y CCI por el apoyo económico prestado en más de una ocasión durante el transcurso de esta Tesis para poder cumplir con los objetivos y también por la cantidad de medios que han puesto siempre a mi disposición así como su ayuda en esas tareas burocráticas. En este punto también incluyo a todos los funcionarios, compañeros de Facultad de Química, y del CENUR del Litoral Norte, que en más de una ocasión me dieron una mano.

## RESUMEN

El propóleo y el orujo de uvas son productos reconocidos por contener antioxidantes. Un extracto elaborado en base a ellos podría ser de gran aplicabilidad en las industrias alimenticia (alimentos funcionales, nutracéutico), farmacéutica (fitofármacos), y/o de aditivos preservantes de la oxidación.

El trabajo de investigación presentado en esta Tesis de Doctorado fue basado en la necesidad de generar conocimiento en cuanto a las características fisicoquímicas, farmacológicas y biológicas de esos dos productos naturales uruguayos. Con el mismo se aportó nuevo conocimiento científico en la aplicación de metodología *in silico* al estudio de mezclas complejas de fenoles en propóleos y orujos de uvas que se complementó con las de laboratorio húmedo o *in vitro*.

Los fenoles, moléculas antioxidantes detectadas en los propóleos y orujos de uvas, atrapan radicales libres modulando el estrés oxidativo celular. Presentan en su estructura grupos aromáticos hidroxilados e intervienen en los mecanismos redox de vegetales y animales, promoviendo un descenso de la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS). En los propóleos se han identificado flavonoides (como flavonas y flavanonas), ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas y triglicéridos fenólicos. Los orujos de uvas contienen estilbenos, antocianinas, taninos, catequinas, flavanoles, flavonoles y flavonas. El perfil estructural es complementario de tal manera, que un “cóctel polifenólico” elaborado a partir de propóleos y orujos de uvas uruguayos, contendrá un amplio rango de estructuras fenólicas que sirvan para desarrollar un extracto patronizado en cuanto a sus capacidades como antioxidante y antiinflamatorio.

Dado que es característica en los productos naturales la alta variabilidad en sus contenidos de fenoles, cualquier potencial aplicabilidad industrial implica la necesidad de analizarlos cualitativa y cuantitativamente así como su funcionalidad. Para lograrlo, se realizaron muestreos, se optimizaron los procesos extractivos, se analizaron los contenidos fenólicos totales, la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS, se realizó la dilucidación de sus huellas dactilares de protón por resonancia magnética nuclear (RMN  $^1\text{H}$ ), se estudió la reactividad de los grupos OH y la energía de disociación del enlace O-H de los polifenoles como formadores del radical libre mediante química cuántica DFT (M06-2X/6-311+G(3df,2p) y G4).

Con respecto a la medida del contenido de fenólico total CFT (mgGAE/L) y su vinculación con la capacidad antioxidante, se encontró que la relación entre CFT y capacidad *scavenger* DPPH (%) fue de

88% para todas las muestras, con una correlación de 63% para los propóleos y un 83% para orujos de uva. Este resultado podría estar indicando que para las diferentes composiciones fenólicas detectadas en ambos productos, en estas mezclas podrían existir moléculas fenólicas que no actúan como atrapadoras de radicales libres y que de igual manera fueron extraídas en el método utilizado.

Con respecto a las entalpías de formación a 0 K, estas se pudieron predecir a nivel M06-2X/6-311+G(3df,2p), resultando -919.6, -729.4, -753.2, -561.8, - 458.5 y -384,1 kJ/mol para quercetina, fisteina, lutelina, ácido cafeico, pinocembrina y ácido p-cumárico, respectivamente. El BDE (M06-2X/6-311 + G (3DF, 2p)), de los OH más reactivos se correlacionó un 95% con las medidas de DPPH (Alvareda E., et al., 2016).

En cuanto a las actividades biológicas, los extractos resultaron poseer actividad *in vitro* inhibitoria de xantina oxidasa, impidiendo la formación de ácido úrico y de radicales libres. A su vez, *in silico* se pudo modelar la inhibición mediante el anclaje de los polifenoles a XO el cual se validó previamente. Se determinó que los mejores polifenoles inhibidores eran aquellos provenientes del propóleos. Por otro lado los extractos resultaron ser potencialmente antiinflamatorios por la inhibición *in vitro* de las ciclooxigenasas 1 y 2. Se modeló el anclaje validado de los polifenoles a ambas enzimas, los resultados permitieron identificar polifenoles con un cierto grado de selectividad frente a COX-2, provenientes mayoritariamente de los orujos de uva (Paulino M. et al. 2015).

Se dejaron plasmadas las pautas para el diseño de un posible protocolo de estandarización para estos productos naturales, ofreciendo evidencia científica para poder elaborar recomendaciones para los consumidores y/o poder ser considerados como nuevos ingredientes en futuros alimentos funcionales, con aplicación real para el sector productivo. Se obtuvo coherencia entre los resultados *in vitro* e *in silico* obtenidos, los cuales aportaron conocimiento en la aplicación de técnicas de farmacología molecular en estudios de unión a blancos involucrados en los mecanismos de acción.

En esta Tesis se produjeron 3 publicaciones, se enviaron otras dos, así también como varias presentaciones a eventos nacionales e internacionales.

## CONTENIDO

<i>DEDICATORIAS</i> .....	2
<i>AGRADECIMIENTOS</i> .....	3
RESUMEN.....	5
CONTENIDO .....	7
ABREVIATURAS.....	12
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ÍNDICE DE TABLAS .....	17
CAPÍTULO I.....	18
1.1 TÍTULO .....	19
1.2 HIPÓTESIS .....	19
1.3 OBJETIVOS.....	19
1.3.1 Objetivo general .....	19
1.3.2 Objetivos específicos (OE) .....	19
1.4 FUNDAMENTACIÓN DEL PLAN DE TESIS.....	21
I a - MARCO TEÓRICO .....	24
1.5 INTRODUCCIÓN .....	24
1.5.1 El propóleos como fuente natural de polifenoles con acciones benéficas para la salud humana. .....	24
1.5.2 Los orujos de uva como fuente natural de polifenoles con acciones benéficas para la salud humana. ....	27
1.6 LOS POLIFENOLES.....	27

1.6.1 Características estructurales de algunos polifenoles presentes en propóleos y orujos de uva. .....	27
1.6.2 Estructuras químicas de Flavonoides y otros polifenoles. ....	28
1.6.3 Los Polifenoles y el beneficio de su ingesta. ....	31
1.7 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	35
1.7.1 Los Radicales libres. ....	35
1.7.2 El Estrés oxidativo. ....	36
1.7.3 Mecanismos de acción radicalarios y enzimáticos para la acción antioxidante. ....	37
1.7.4 Radicales libres e inflamación. ....	38
1.8 ANTIOXIDANTES COMO ATRAPADORES (SCAVENGERS) DE RADICALES LIBRES	39
1.8.1 Radical DPPH (2,2-difenilpicril hidrazil). ....	39
1.8.2 Radical ABTS <sup>•+</sup> (radical monocatiónico del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico). ....	42
1.9 ANTIOXIDANTES COMO INHIBIDORES ENZIMÁTICOS.....	44
1.10 ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIOS .....	45
I b - QUÍMICA TEORICA .....	47
2.1 MODELIZACIÓN MOLECULAR .....	47
2.1.1 Mecánica Molecular (MM) .....	47
2.1.2 Campos de fuerza.....	48
2.2 MÉTODOS QUÍMICO-CUÁNTICOS.....	49
2.2.1 Mecánica Cuántica (QC).....	49
2.2.2 Funciones de onda y orbitales .....	49

2.2.3 La aproximación de Born-Oppenheimer y otras simplificaciones de la ecuación de Schrodinger.....	51
2.2.4 Teoría de Orbitales moleculares .....	51
2.3 TEORÍA DE LOS FUNCIONALES DE DENSIDAD (DFT) .....	57
2.4 MINIMIZACIÓN DE ENERGÍA / OPTIMIZACIÓN GEOMETRÍA .....	60
2.5 ANCLAJE MOLECULAR ( <i>DOCKING</i> ) .....	61
2.5.1 Posicionamiento “ <i>Placement</i> ” .....	62
2.5.2 Funciones de puntuación “ <i>score</i> ” .....	62
2.5.3 Interacciones ligando-receptor .....	63
2.5.4 Mapas de Superficies Moleculares .....	63
2.6 IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN DE FENOLES POR “ <i>SITE FINDER</i> ” .....	64
2.7 MODELOS FARMACOFÓRICOS.....	65
2.8 BASE DE POLIFENOLES.....	67
2.9 DESCRIPTORES MOLECULARES Y DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS .....	68
2.9.1 Hidrofobicidad logP(o/w) .....	68
2.9.2 Índice de Lipinski.....	69
2.9.3 Descriptores electrónicos .....	69
I c - BLANCOS ENZIMÁTICOS .....	71
3.1 XANTINA OXIDASA .....	71
3.1.1 Estructura molecular y mecanismo de acción de la xantina oxidasa. ....	73
3.1.2 Xantina oxidasa como blanco enzimático de la actividad antioxidante de los polifenoles. Relación estructura actividad antioxidante de los polifenoles. ....	77
3.2 CICLOOXIGENASAS. ....	78

3.2.1 La inflamación y el rol de la ciclooxigenasa.....	78
3.2.2 Funcionamiento de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) .....	79
3.2.3 Estructura de las enzimas ciclooxigenasas.....	81
3.2.4 La ciclooxigenasa 2 (COX-2) como blanco de posible acción antiinflamatoria de los polifenoles.....	83
I d - PERFILES METABOLÓMICOS .....	84
4.1 ESTUDIOS METABONOMICOS Y METABOLÓMICOS DEL PROPÓLEOS.....	84
4.2 HUELLA DACTILAR DEL PROPÓLEOS MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN (RMN <sup>1</sup> H). .....	88
4.3 RECONOCIMIENTO DE PATRONES.....	91
4.4 TRATAMIENTO DE LOS DATOS - ESTADÍSTICA. ....	92
4.4.1 Pre tratamiento de datos .....	94
4.4.2 Análisis de componentes principales (PCA).....	94
4.4.3 Partial Least Squares regression o Projection to Latent Structures (PLS).....	96
CAPÍTULO II .....	98
MATERIALES Y MÉTODOS .....	99
II.1.1 METODOLOGIAS <i>In vitro</i> .....	99
II.1.1.1 Muestreo de propóleos .....	99
II.1.1.2 Método de extracción de polifenoles del propóleos .....	99
II.1.1.3 Compuestos fenólicos totales (CFT). .....	100
II.1.1.4 Actividades antioxidantes.....	100
II.1.1.5 Inhibición de blancos enzimáticos. ....	100
II.1.1.6 Análisis de perfiles Metabólomicos de los propóleos y orujos de uva. ....	101

II.1.2 METODOLOGIAS <i>In silico</i> .....	102
II.1.2.1 Construcción de bases de datos de fenoles.....	102
II.1.2.2 Optimización de la geometría y cálculo de Descriptores moleculares.....	103
II.1.2.3 Teoría del funcional de la Densidad (DFT).....	103
II.1.2.4 Análisis de la interacción ligando proteína: Métodos de Docking.....	104
CAPÍTULO III.....	106
DISCUSIÓN Y RESULTADOS* .....	107
ETAPA PREPARATIVA .....	107
III.1 EXTRACTOS Y ANALISIS DE CAPACIDADES ANTIOXIDANTES .....	110
III.2 HUELLAS DACTILARES DE PROPOLEOS POR RMN .....	120
III.3 ESTUDIOS DE DESCRIPTORES ELECTRÓNICOS Y DE BIODISPONIBILIDAD DE LAS ESPECIES NEUTRAS Y RADICALARIAS DE POLIFENOLES .....	128
III.4 BLANCOS ENZIMÁTICOS .....	142
CAPÍTULO IV.....	151
CONCLUSIONES GENERALES .....	152
PERSPECTIVAS .....	155
BIBLIOGRAFÍA .....	156
ANEXOS .....	161
ARTICULOS PUBLICADOS .....	186

## ABREVIATURAS

ABTS Ácido 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

Ab initio A partir de Primeros Principios.

ASCII Código Estándar Estadounidense para el Intercambio de Información.

BDE energía de disociación del enlace O-H.

COX-1 Ciclooxygenasa 1.

COX-2 Ciclooxygenasa 2.

DFT (Density Functional Theory) teoría del funcional de densidad.

$\Delta H^\circ$  Entalpia de formación a 1 atm.

DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

EROs Especies reactivas de oxígeno.

GAE equivalentes de ácido gálico

HOMO Highest occupied molecular orbital.

IC<sub>50</sub> Concentración inhibitoria máxima media.

MC Mecánica cuántica.

MM Mecánica molecular.

MM<sup>+</sup> Método de MM diseñado para moléculas orgánicas pequeñas.

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> Radical superóxido

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de Hidrogeno

PI Potencial de ionización.

RL Radicales libres.

RMN <sup>1</sup>H Resonancia magnética nuclear de protón.

SIMLES Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

TAE Energias totales de atomizacion.

UI unidades internacionales.

XDH: Xantina deshidrogenasa.

XO Xantina oxidasa.

XOR: Xantina oxidoreductasa.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema de la biosíntesis de metabolitos secundarios en las plantas. Donde G3P es el gliceril 3-fosfato IPP (Wu et. al., 2008)

**Figura 2.** Interacciones entre compuestos volátiles de plantas y el medio ambiente circundante (Dudareva, 2007).

**Figura 3.** Origen vegetal de los diferentes tipos de flavonoides, enlazados a azúcares (flavonoides glicosidados), o libres (flavonoides agliconas) como es el caso de las flavanonas (catequinas y proantocianidinas).

**Figura 4.** Estructura básica de los flavonoides con el sistema de anillos numerados.

**Figura 5.** Estructura química de la 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona), esqueleto de los flavonoides.

**Figura 6.** Estructura química de la 3-fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirona), esqueleto de los isoflavonoides.

**Figura 7.** Estructura química de la 4-fenilcumarina (4-fenil-1,2-benzopirona), esqueleto de los neoflavonoides.

**Figura 8.** Mecanismos y enfermedades ocasionadas por el daño celular en el Stress oxidativo.

**Figura 9.** HAT (hydrogen atom transference): transferencia de átomos de hidrógeno: donde un átomo de H es transferido a un radical libre, para su posible extinción por recombinación con otros radicales.

**Figura 10.** SET (*single electron transference*): transferencia de un solo electrón (uno o más electrones es transferido para reducir compuestos diana), donde AH es un antioxidante donador de H, PheOH es un fenol y M es un metal que sufre un cambio redox.

**Figura 11.** Formas oxidada y reducida del Radical DPPH. Donde Ar-OH es un polifenol.

**Figura 12.** Formación del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>

**Figura 13.** Mecanismo de acción de xantina oxidasa.

**Figura 14.** Estructura molecular de la XO de bovino en complejo con quercetina modelada a partir del cristal PDBid: 3NVY.

**Figura 15.** Degradación de las purinas por XO.

**Figura 16.** Mecanismo de acción de XO convirtiendo xantina en ácido úrico propuesto por Hille and Sprecher, 1987.

**Figura 17.** Estructuras químicas de alopurinol e hipoxantina.

**Figura 18.** Cascada de síntesis de productos del metabolismo del ácido araquidónico (AA) y sus efectos sobre el organismo humano.

**Figura 19.** Características generales de COX-1 y COX-2. Imagen extraída de la Revista de la Sociedad Española del Dolor 2005, 12(6) 357-372, autor Moreno-Brea M.R.

**Figura 20.** Estados energéticos del spin nuclear.

**Figura 21.** Movimiento de precesión del spin nuclear.

**Figura 22.** Perfiles del contenido de fenoles totales (CFT) mgGAE /L en los extractos. En amarillo los correspondientes a propoleos (P) y en azul los correspondientes a orujos de uva (MG) y mezclas de propoleos y orujos (MIXT).

**Figura 23.** Diferencias de %GAE entre varias regiones geográficas. NWUy = Noroeste Uruguay, SWUy = Suroeste Uruguay, CWUy = Centro oeste Uruguay, NChAD = Norte Chile desierto de Atacama, SChM = Sur Chile Maule, NUy = Norte Uruguay, SUy = Sur Uruguay, CUy = Centro Uruguay SEUy = Sureste Uruguay.

**Figura 24.** Comparación del porcentaje de GAE de muestras recogidas en Chile (rojo) y en Uruguay (azul) con los diversos procedimientos de extracción. En las abscisas se muestran los diferentes métodos de extracción. Ref: reflujo, EtOH-W: etanol-agua, macer: maceración, Son: sonicado, Sox: soxhlet, cantidad de muestra utilizada en gramos (g) y tipo de muestra CS: cabernet sauvignon, Tannat, Merlot, Arinoarnea.

**Figura 25.** Correlación entre mgGAE/L y % DPPH de las muestras,  $r^2= 63\%$ .

**Figura 26.** Comparación de ambos métodos de scavenger, DPPH y ABTS.

**Figura 27.** Comparación de perfiles de RMN  $^1\text{H}$ : superposición de huellas dactilares de protón. Se presentan los espectros RMN  $^1\text{H}$  1D a 500 MHz y 298 K de las 18 muestras disueltas en acetona- $d_6$ ,

expresadas ppm. En color marrón claro los propóleos, en color violeta los orujos y en color verde las mezclas. En color gris las zonas inhabilitadas excluidas para el estudio de componentes principales (PCA).

**Figura 28.** Superposición de espectros de RMN  $^1\text{H}$  1D de las muestras de propóleos. Región de los desplazamientos químicos correspondientes a los protones de los grupos hidroxilos (OH) fenólicos.

**Figura 29.** Resultados de los estudios de componentes principales (PCA) de los 18 espectros RMN obtenidos. A la derecha se muestra el listado de muestras analizadas, en color amarillo las muestras de propóleos, en color violeta muestras de orujos de uva y en color verde las mezclas orujo y propóleos. A la derecha el gráfico del PCA2 vs PCA1.

**Figura 30.** Modelo PCA-X de todas las muestras de propóleos representadas en una elipse de Hotelling, 95%.

**Figura 31.** Modelos farmacofóricos de 3 estructuras químicas diferentes. A) Ácidos fenólicos. B) Antocianinas y C) Flavonoides. En rosado se muestran las características catiónicas donadoras yceptoras (don&acc), en celeste las características aniónicas donadoras yceptoras (don&acc), en verde la característica hidrofóbica (hyd o aro), en azul la carga positiva de las antocianinas.

**Figura 32.** Resultados de cálculos M06-2X/6-311+G(3df,2p) de las Energías de disociación del enlace OH (BDE) para 9 polifenoles: quercetina, pinocembrina, ácido cafeico, fisetina, luteolina, ácido p-coumarico, epicatequina, epigallocatequina y (+)-galocatequina. Se muestra recuadrado en rojo el valor en KJ/mol del hidroxilo con la mejor BDE.

**Figura 33.** Correlación de las medidas de DPPH (Paulino, et al 2008) de los ácidos cafeico, cumárico, luteolina, pinocembrina, fisetina y quercetina vs los OH que resultaron más reactivos según cálculos DFT. Se presenta la ecuación y el coeficiente de correlación  $R^2$

**Figura 34.** Gráfico de Energía en Hartree versus el Ángulo diedro de torsión de la quercetina (C3-C2-C'1-C'6) que se muestra indicando que la de la derecha es la conformación más estable.

**Figura 35.** 2D Mapa de superficie molecular (izquierda) e Interacciones del ligando (derecha) mejor dockeado en el sitio activo de XO, (E)-cafeato de isoprenilo (score=-24.1955 kJ/mol) en amarillo.

**Figure 36.** Representación en barras (*barcode*) de las interacciones en el sitio de unión de los ligandos en XO. Cada una de las barras horizontales de color negro corresponde a cada compuesto estudiado e indica una interacción con el residuo aminoácido que se muestra en el eje x.

**Figura 37.** Porcentaje de la abundancia de los contactos en el *docking* de la base de datos a XO. El tipo de contactos codificado como ChDon, BkDon corresponden a interacciones donadoras de H en la cadena lateral. ChAcc and BkAcc corresponden a interaccionesceptoras de H en la cadena lateral. Surf corresponde a interacciones de superficie.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Origen geográfico, fuente vegetal y composición química de diferentes tipos de propóleos. (Banskota A.H., et al., 1998).

**Tabla 2.** Diferentes solventes utilizados para extraer diversos compuestos. (Wagh V.D, 2013)

**Tabla 3 A.** Resultados obtenidos del contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de cada extracto de propóleos, de orujos de uva. Muestras de propóleos (prop), orujos de uva (o) y mezclas (mixt). \*Valor medido en el 2013. \*Ref = Reflujo, EtOH = Etanol, W = Agua, Sox = Soxhlet, Hex = Hexano, Son = Sonicación, Cent = Centrifugación, Diss = Disolución, RV = Rotavaporación, RC = Reconstitución, macer = maceración, CS = Cabernet-Sauvignon, Reext = Re extracción.

**Tabla 3 B.** Resultados obtenidos de las actividades antioxidantes DPPH y ABTS de cada extracto de propóleos, de orujos de uva. Muestras de propóleos (prop), orujos de uva (o) y mezclas (mixt). \*Valor medido en el 2013. \*Ref = Reflujo, EtOH = Etanol, W = Agua, Sox = Soxhlet, Hex = Hexano, Son = Sonicación, Cent = Centrifugación, Diss = Disolución, RV = Rotavaporación, RC = Reconstitución, macer = maceración, CS = Cabernet-Sauvignon, Reext = Re extracción.

**Tabla 4.** Base de datos de polifenoles (especies neutras) provenientes de propóleos (P) y de orujos (G), con los códigos de identificación de compuestos de PubChem (CIP), en la tercer columna se identifica su estructura tipo, seguido de los valores de Lipinski, el coeficiente de reparto  $\log P(o/w)$  y el HOMO (KJ). Los compuestos derivados representados (CIP\*) se referencian a los códigos de los compuestos padres. Se considera dejar los nombres en ingles por mejor relación con el CIP.

**Tabla 5.** Energías de disociación del enlace de OH (BDE) para un set de fenoles. Los valores están en kJ/mol y en itálica y color rojo se muestra la energía más baja favorable para la formación del radical.

**Tabla 6.** Resultados *in vitro* de inhibición de XO., en la segunda columna la clasificación de las muestras, extractos de propoleos (prop), orujo de uva (o) and mexclas (mixt), año y en caso de uva su variedad.

# CAPÍTULO I



## **1.1 TÍTULO**

"RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE POLIFENOLES: DESARROLLO Y APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE FARMACOLOGÍA MOLECULAR Y ESTUDIOS DE UNIÓN A BLANCOS INVOLUCRADOS EN LOS MECANISMOS DE ACCIÓN".

## **1.2 HIPÓTESIS**

La aplicación de técnicas espectroscópicas y analíticas combinadas con técnicas computacionales, permite generar conocimiento respecto a la composición, propiedades y mecanismos de acción antioxidantes y antiinflamatorios de fenoles extraídos de fuentes naturales para su desarrollo como nutracéuticos o fitonutrientes.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 Objetivo general**

Estudio de las propiedades farmacoquímicas responsables de las actividades antioxidantes y antiinflamatorias de extractos de propóleos mediante ensayos de laboratorio húmedo (in vitro), computacional (in silico) y su asociación con la "huella dactilar" obtenida por Resonancia Magnética Nuclear.

### **1.3.2 Objetivos específicos (OE)**

OE1. Extractos y análisis de capacidades antioxidantes

1.1) Estudio del estado del arte: relevamiento bibliográfico de productos naturales y sintéticos conteniendo polifenoles a los que se les adjudican actividades benéficas para la salud humana.

1.2) Extracción de polifenoles

1.3 Determinación de contenido de fenoles totales (Folin Ciocalteu).

1.4) Análisis de las actividades antioxidantes por métodos de atrapamiento de radicales (*scavenging*) (ABTS<sup>+</sup> y DPPH).

### **OE2. Huellas dactilares de propóleos por RMN**

2.1) Estudios de perfiles estructurales del propóleos por resonancia magnética nuclear (RMN) de los extractos.

2.2) Análisis metabólicomico.

### **OE3. Estudios de descriptores electrónicos y de biodisponibilidad de las especies neutras y radicalarias de polifenoles**

3.1) Construcción de una base de datos de la estructura tridimensional de polifenoles presentes en propóleos y orujos de uva.

3.2) Modelos farmacofóricos de los polifenoles de la Base de datos.

3.3) Anotación de la base con:

3.3.1) descriptores electrónicos calculados por métodos semiempíricos (energía de orbitales de frontera) para especies neutras.

3.3.2) Índice de Lipinski (*drug likeness*).

3.3.3) coeficiente de reparto logP(o/w).

3.3.4) Actividades antioxidantes.

3.3.5) Descriptores electrónicos de especies radicalarias calculados por métodos de la Teoría del Funcional de Densidad o *Density Functional Theory* (DFT).

3.4) Estudios de relación estructura-actividad (SAR).

### **OE4. Estudios de inhibición de blancos de acción antioxidantes**

4.1) Medida de la inhibición de la enzima xantina oxidasa (XO).

4.2) Anclaje molecular a XO.

### **OE5. Estudios de inhibición de blancos de acción anti-inflamatorios**

5.1) Determinación de la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COX) 2 y 1.

5.2) Estudios de anclaje molecular (*docking*) de polifenoles en COX2 y COX1.

5.3) Estudios de Dinámica Molecular de los complejos fenol-COX 2(1) obtenidos por anclaje.

## 1.4 FUNDAMENTACIÓN DEL PLAN DE TESIS

En estas últimas décadas nuestro país ha incursionado en el uso de productos naturales con propiedades benéficas para la salud humana como es el caso del propóleo, constituyendo un gran desafío para los investigadores el poder colaborar con el consumidor ofreciendo un producto saludable y confiable. En el mercado uruguayo el propóleo se comercializa en forma de tinturas y apósitos para quemaduras. En el mercado chileno se lo encuentra también en presentaciones como pomadas de uso antiinflamatorio.

La investigación deberá aportar conocimiento que permita dar información certera que llegue hasta aquellos niveles médicos en donde aun se desconozca el uso y las propiedades benéficas de productos naturales como el propóleo y orujos de uva, en los cuales los polifenoles serían los responsables de estas acciones deseadas (Farre et al, 2004, Bido et al 2006, Alencar et al, 2007, Falcao et al, 2010, Paulino et al, 2010, Silva et. al 2011).

Desde otro punto de vista, esta investigación podrá generar las herramientas necesarias para crear un marco normativo que permita a los productores nacionales comercializar productos a base de propóleos uruguayos con valor agregado.

Existen numerosas evidencias que apoyan el papel preponderante de los polifenoles como compuestos bioactivos presentes en alimentos de origen vegetal y algunos de origen animal tales como los productos de la colmena: miel y el ya referido propóleo, los cuales, incluidos en una dieta balanceada, prometen al consumidor una variedad de acciones saludables en la prevención de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, o cáncer, entre otras (Del Valle, 2011). También se han reportado otros efectos de estos polifenoles como potenciales antiinflamatorios, antitrombóticos, antialérgicos, antivirales (Rice-Evans 1993), inhibidores enzimáticos, interviniendo en la regulación del crecimiento de las plantas, así como también en la activación y expresión de genes en mamíferos (C. Rice-Evans, 2004, C. Rice-Evans, 2006). Se conocen antecedentes los cuales se enfocan en la actividad antioxidante de los polifenoles del tipo flavonoides como responsable de estas acciones benéficas (Rice-Evans, 2004, Hyun K, 2010).

En cuanto al contenido de polifenoles de los propóleos y orujos de uva, se han utilizado en esta Tesis las evidencias ya existentes (Farre et al, 2004, Bido et al 2006, Alencar et al, 2007, Falcao et al, 2010, Paulino et al, 2010, Silva et. al 2011) y se ha profundizado en este concepto a través de ensayos de

huellas dactilares obtenidas por resonancia magnética nuclear de protón (RMN  $^1\text{H}$ ) de algunos de los extractos ensayados.

En la jerga social, los polifenoles son denominados como “antioxidantes” y se los asocia con la idea de poseer propiedades “enlentecedoras del envejecimiento”. Esta acción antioxidante puede ser relacionada por varios mecanismos entre ellos su función como “scavengers” (atrapadores), disminuyendo la formación de radicales libres de especies reactivas de oxígeno (ROS) formados de manera endógena en el organismo humano por diversas vías (Cos P. 1998, Rice-Evans 1993, Rice-Evans 2004, Williams 2004) como los radicales superóxido e hidroxilo, o de manera exógena (humo de cigarrillo, radiación UV, polución). Estos radicales libres tienden a acumularse en el organismo y si esta acumulación no es revertida de alguna manera por el metabolismo, una de las consecuencias es un desbalance del stress oxidativo al cual se lo correlaciona con desórdenes en los lípidos, cardiopatías, neuropatías, hepatopatías, envejecimiento, diabetes y/o aparición de diferentes tipos de cáncer, etc. (Del Valle, 2011).

La acción antioxidante se puede describir a través de 2 tipos de mecanismos de acción. El primero está relacionado con la ya referida capacidad de “scavenger” o atrapadora de electrones que tienen los fenoles y que ocurre a través de una transferencia acoplada de protón-electrón, donde ocurre una disociación homolítica de enlaces OH de compuestos polifenólicos. La reactividad de los grupos OH depende de la la energía de disociación (Bond Dissociation Energy o BDE) del enlace O-H del grupo OH y se estudiará mediante cálculos químico-cuánticos. Además, se analizarán los niveles energéticos de los orbitales fronteras como el HOMO (orbital molecular más alto ocupado) de la especie neutra y su correlación con las medidas experimentales en las cuales se utilizan los radicales DPPH $\cdot$  y ABTS $^+$ , como atrapadores de radicales libres.

En cuanto al segundo mecanismo antioxidante, el mismo está relacionado a sistemas enzimáticos endógenos involucrados en el stress oxidativo. Un ejemplo de ellos es el sistema xantina/xantina oxidasa, cuya disfunción está vinculada a una patología denominada gota, asociada a la enzima xantina oxidasa (XO) (J. Labat-Robert 2014).

Esta enzima cataliza la formación del radical superóxido endógeno. En presencia de oxígeno la XO cataliza la oxidación de la xantina a ácido úrico. A pesar de su corta vida media el superóxido además actúa como intermediario en la producción de otros radicales libres endógenos. Por ende, se estudiará la inhibición de la XO por los polifenoles de manera de evitar la generación del superóxido por esta vía y

al mismo tiempo evitar la formación de ácido úrico. Este estudio abarcará ensayos experimentales *in vitro* de los extractos de propóleos (Cos P, 1998) e *in silico* de anclaje para evaluar la unión de los polifenoles a la XO.

Otra de las acciones benéficas para la salud humana a estudiar en esta Tesis es la capacidad que puedan tener los fenoles contenidos en los propóleos y orujos de intervenir en los procesos inflamatorios, a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) la cual es inducida durante tales procesos. Por otro lado una isoforma de COX-2 la ciclooxigenasa 1 (COX-1), es constitutiva en todos los tejidos en especial en riñón y tubo gastrointestinal produciendo prostaglandinas (citoprotectoras) que intervienen en procesos fisiológicos tales como protección del epitelio gástrico, mantenimiento del flujo renal, agregación plaquetaria, migración de neutrófilos. (Dannhardt, G. K., 2001; Dogne, J. M. S et al., 2005). Por lo tanto se podrían asociar efectos secundarios no deseables como la pérdida de la protección gástrica, anti agregación plaquetaria y efectos adversos renales a la inhibición de COX-1.

En consecuencia, podemos plantearnos como objetivo el estudio de la actividad específica inhibitoria frente a COX-2 en detrimento de inhibición de COX-1 para minimizar los efectos adversos mencionados. Similarmente a lo desarrollado para XO, nuestra investigación abarcará ensayos experimentales *in vitro* de los extractos de propóleos y orujos de uva e *in silico* de anclaje molecular.

## I a - MARCO TEÓRICO

### 1.5 INTRODUCCIÓN

#### 1.5.1 El propóleo como fuente natural de polifenoles con acciones benéficas para la salud humana.

El propóleo es un producto natural resinoso, elaborado por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) a partir de productos que colectan de las plantas (néctar, polen) que mastican y procesan para diversos propósitos, como sellar su colmena y proteger la entrada de invasores usando las propiedades antimicrobianas para embalsamar insectos invasores que han muerto dentro y así evitar la contaminación de la colmena.

Se tienen registros de uso de este producto desde la antigüedad los sacerdotes del antiguo Egipto lo utilizaban frecuentemente como medicina y como parte integrante de ungüentos y cremas de embalsamar. Más tarde, lo utilizaron los griegos a quienes se les debe el origen del nombre (Pro que significa “delante de” y de polis que significa ciudad). Aristóteles lo menciona como remedio para infecciones de piel. Al final del siglo XIX, el propóleo fue ampliamente utilizado debido a sus propiedades curativas y en la Segunda Guerra Mundial que se empleó en varias clínicas soviéticas para el tratamiento de la tuberculosis, debido a la disminución observada de problemas pulmonares y la recuperación del apetito, a su vez se aplicó para tratar heridas y quemaduras, dolor de garganta y úlcera de estómago. El primer trabajo científico con propóleos fue publicado en 1908, incluyendo sus propiedades químicas y composición que se indexan más de química abstracta. Pero se sabe que tuvo importante uso en la guerra de África del Sur, en el tratamiento de heridas infectadas y como cicatrizante (Wagh V.D, 2013).

##### 1.5.1.1 Características, origen y composición bioactiva.

En cuanto a sus características generales es un material lipofílico que al estar frío es duro, quebradizo y al calentarlo se vuelve pegajoso, presentando un punto de fusión entre 60°-70°C. Posee un olor aromático característico y agradable. Las abejas procesan y liberan este producto fabricado en base a compuestos provenientes de plantas, polen y de sus propias enzimas. En términos generales entre las sustancias químicas que lo componen se encuentra un 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales,

5% de polen, y 5% de diversos compuestos orgánicos. Se han identificado más de 300 compuestos en diferentes cuyas proporciones dependen de su lugar geográfico, la flora y la época de la recolección (Tabla 1).

Este producto natural se ha estandarizado de acuerdo a su color (desde verde parduzco hasta el negro), su origen geográfico, origen botánico y su composición en sustancias bioactivas. Existe evidencia que refiere a la variación de la composición según su origen geográfico, climático y palinológico dependiendo en gran medida de las especies vegetales de la zona en cuestión (Marcucci M.C., 1995, Bankova et al, 2005, Popova et al, 2007, Peña et al 2008). Esto evidencia a su vez que los diferentes tipos de propóleos presenten diferentes propiedades químicas y farmacológicas, por lo cual la estandarización del producto es necesaria. Hoy en día se conocen una gran variedad de actividades biológicas (antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas, etc), la mayoría de estas atribuidas al alto contenido de flavonoides y ácidos fenólicos (Kumazawa et al. 2004, Alencar, et. al 2007, Palomino et al. 2010).

Muchos métodos analíticos se han utilizado para la separación y las sustancias identificadas pertenecen a los siguientes grupos de compuestos químicamente similares: los polifenoles; ácidos benzoicos y derivados; alcohol cinámico, ácido cinámico y su derivados; hidrocarburos sesquiterpénicos, triterpénicos; derivados del benzaldehído; otros ácidos y sus derivados respectivos; alcoholes, cetonas, y compuestos heteroaromáticos; terpeno y alcoholes de sesquiterpenos y sus derivados; hidrocarburos alifáticos; minerales; esteroides, hidrocarburos esteroides; azúcares y aminoácidos. Los compuestos volátiles están presentes en bajas cantidades, producidos por las plantas de origen. (De Castro S. L., 2011).

Se cree que los azúcares son introducidos durante la elaboración de propóleos y / o pasaje de abejas sobre la resina. Algunos compuestos son comunes en todas las muestras de propóleos y determinan sus propiedades características (Bankova V. et al. 1995). El propóleos de diferentes orígenes contiene diferentes componentes. Algunos compuestos están presentes en muestras de origen vegetal específico.

En cuanto a la solubilidad del propóleos, se debe tener presente que posee una matriz compleja y no puede ser utilizado directamente, por lo que se deben elegir los solventes adecuados para extraer los

compuestos deseados. Los solventes más comúnmente utilizados para la extracción son agua, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, éter y acetona (ver Tabla 2).

### **1.5.1.2 Efectos indeseables del propóleo.**

El propóleo puede poseer efectos secundarios no deseables, como es la conocida dermatitis de contacto del apicultor. Uno de los compuestos presentes en el propóleo responsable de esta alergia es un derivado del ácido cafeico siendo también un compuesto con propiedades sensibilizantes (Marcucci M.C., 1995). Otro de los compuestos alergénicos presente es el flavonoide tectocrisina aunque sus propiedades sensibilizantes son menores, (Angelini G, et al., 1987).

Estas evidencias demuestran que existe un porcentaje de personas alérgicas al propóleo y a los demás productos apícolas (polen, jalea real, miel, apitoxina). Desde el punto de vista terapéutico, estas acciones deben ser moduladas, si se van a usar los productos de la colmena “crudos” es necesario aplicarles a los pacientes pruebas de alergia antes de comenzar cualquier tratamiento con propóleos.

La dermatología, la medicina interna y hasta la cosmética se han beneficiado de las propiedades regeneradoras y cicatrizantes de estas sustancias, pero hay que tener presente estos efectos nocivos.

Por lo tanto uno de los desafíos es poder producir un extracto en el cual se vean minimizadas las propiedades no deseables brindando seguridad al consumidor.

### **1.5.1.3 El propóleo en el Mercado Uruguayo.**

En cuanto al mercado existente para este producto natural, se sabe que la primera patente se inscribió en Rumania (1965), totalizando 239 en el mundo hasta el año 2008. Esto promovió la valorización del producto de 5 a 200 dólares por kilogramo, apreciándose más aquellos con menor contenido de metales pesados, cumpliendo con los estándares de calidad del producto para su comercialización.

En Uruguay hay un mercado del propóleo de desarrollo incipiente, principalmente basado en un manejo que es artesanal. Muy pocas son las industrias que se dedican a producir formas farmacéuticas con este producto. Por tanto, se requiere de una amplia difusión de las diferentes propiedades de este producto para interesar a los productores y empresarios a incursionar en un rubro no tradicional dentro de la

actividad apícola y de este modo aumentar el valor agregado del producto. Por todo lo dicho, se estima necesario poner especial énfasis en el manejo y explotación de la colmena, para lograr insertar el propóleo uruguayo en el mercado nacional e internacional (Peña R., 2008).

### **1.5.2 Los orujos de uva como fuente natural de polifenoles con acciones benéficas para la salud humana.**

Se denomina “orujos de uvas” así al residuo de los racimos de uva una vez prensada para la obtención del vino. Está constituido por el escobajo (el soporte de las uvas), pulpa y semillas en una proporción variable. Los compuestos fenólicos presentes son metabolitos secundarios de la uva cuya biosíntesis parece responder a una serie de necesidades específicas de la planta, como ser la protección frente a la radiación UV o la defensa frente a ataques fúngicos. La composición fenólica dependerá de factores como la variedad (varietal), estado de madurez en el momento de la recolección de la uva, las condiciones de cultivo, las condiciones climáticas en especial la incidencia de la luz (Boido et al 2006).

## **1.6 LOS POLIFENOLES**

### **1.6.1 Características estructurales de algunos polifenoles presentes en propóleos y orujos de uva.**

Para entender la presencia de polifenoles en el propóleo es necesario conocer que los polifenoles (tipo flavonoides) aparecen como metabolitos secundarios exclusivamente de origen vegetal distribuidos en algunas plantas sintetizados a partir de las flavanonas derivadas a su vez de las chalconas provenientes de la vía fenilpropanoide, ruta común para otros metabolitos secundarios vegetales como son la lignina, salicilatos, ácido hidroxicinámico y cumarinas (Wu et al., 2008) (ver Figura 1). Estos metabolitos secundarios hacen a las plantas atractivas para la polinización como el color de las flores, el sabor de las frutas, el aroma, la resistencia y protección contra plagas, radiaciones y enfermedades (Drago, et al., 2007). Las interacciones planta-animal como ser la atracción de los polinizadores (abejas) por las plantas (Figura 2) describen el camino seguido por estos compuestos químicos hasta aparecer en los productos de las abejas para nuestro caso en particular en el propóleo (Dudareva et al., 2007) a ser estudiado por sus propiedades antes mencionadas. En cuanto a la estructura química, estos compuestos abarcan una gran cantidad de familias con estructuras y propiedades diferentes entre sí. Esto implica que no existe un método único para utilizar ya sea para su extracción, identificación y cuantificación sino que se deben plantear diferentes rutas para analizar al propóleo y enfocar el análisis de los mecanismos de acción

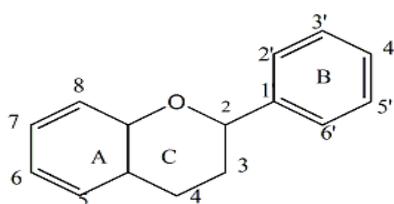
que se quieran estudiar dependiendo de las estructuras químicas aisladas. Extractos con mayor concentración de fenoles poseerían mejores actividades antioxidantes (Kumazawa et al, 2004, Alencar et al, 2007, Falcao et al, 2010, Paulino et al, 2010).

Existen evidencias que demuestran la existencia en las uvas de altos contenidos de compuestos del tipo flavan-3-oles (glicosidados y agliconas) en semillas y piel. Se han encontrado otros tipos de flavonoides, así como antocianinas, procianidinas y ácidos fenólicos (Boido et al, 2006; Boido et al 2011, Amico et al, 2004).

A lo largo de estos últimos años acompañando la evolución de la tecnología científica, los polifenoles y sus metabolitos *in vivo* han sido catalogados con diversos tipo de acciones que van desde ser antioxidantes hasta moduladores sobre el sistema celular a través de la acción directa sobre diversas vías de señalización. Estas vías incluyen la proteína quinasa, tirosina quinasas, la proteína quinasa C. Varias acciones inhibitoras o estimulantes de flavonoides sobre estas vías afectan en gran medida las funciones celulares mediante la alteración de la fosforilación de moléculas específicas. Además, los flavonoides también modulan varias expresiones de genes a través de la activación de diversos factores de transcripción (Mansuri M. et al., 2014).

### **1.6.2 Estructuras químicas de Flavonoides y otros polifenoles.**

Los flavonoides son los compuestos fenólicos más importantes integrados por subfamilias con una estructura química común. Se han descrito más de 8150 flavonoides naturales (Andersen O.M., and Markham K.R, 2005) y a medida que avanza la tecnología se siguen encontrando nuevos. Se encuentran ampliamente distribuidos en frutas, vegetales, semillas, nueces, tallos y flores, así como en productos derivados de estos, como te, vino, cerveza y en productos de la colmena como el propóleo los cuales son importantes constituyentes de la dieta humana (Figura 3). Las estructuras químicas básicas de ácidos fenólicos y algunas subclases de flavonoides comparten la misma estructura química básica. Esta estructura química común comprende un esqueleto hidrocarbonado del tipo C6-C3-C6 (difeníl-propano o benzo- $\gamma$ -pirano) designadas como A, B y C, derivado del ácido shiquímico y de 3 restos de acetato (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura básica de los flavonoides con el sistema de anillos numerados.

De acuerdo con la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), pueden clasificarse según su esqueleto y vía metabólica en: Flavonoides, derivados de la estructura 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona), Isoflavonoides, derivados de la estructura 3-fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirona) y Neoflavonoides, derivados de la estructura 4-fenilcumarina (4-fenil-1,2-benzopirona), (Figuras 5-7).

#### 1.6.2.1 Flavonoles y Flavonas

Estos tipos de flavonoides se dice que son los más abundantes de los flavonoides. Ambos se caracterizan por la presencia de un grupo ceto en el carbono C4 y una instauración entre C2 y C3 del anillo C, pero se diferencian entre sí por la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 de dicho anillo en los flavonoles (quercetina) y la ausencia del mismo en las flavonas (luteolina).

#### 1.6.2.2 Flavanonas

Estos compuestos son dihidroflavonas, análogos de las flavonas pero que presentan el anillo C saturado con dos centros quirales. Casi siempre con un centro quiral 2S que coloca al anillo B de manera ecuatorial. Se los encuentra en los citrus (*Citrus paradisi*, *Citrus aurantium*), por ejemplo la naringenina (en pomelo) y hesperetina (en naranja) que son dos de las agliconas más representativas de este grupo.

#### 1.6.2.3 Chalconas

Las chalconas son precursores de la síntesis de flavonoides en las plantas y son considerados minoritarios. Son estructuras carecen del anillo heterocíclico central y por ello se les da una numeración diferente de sus átomos que al resto de flavonoides. Presentan diversas actividades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos y antileishmaniasis, dependiendo de la sustitución aromática (Ramírez Escobedo et al. 2012).

#### **1.6.2.4 Flavan-3-oles**

Son flavonoides que carecen del grupo ceto en posición 4, tienen el anillo C totalmente saturado y poseen dos carbonos quirales en posiciones 2 y 3. Existen tanto formas 2R, 3S (trans), (como catequina), como sus correspondientes isómeros 2R, 3R (cis), en los cuales se antepone al nombre el prefijo epi (epicatequina). Las formas 2R comúnmente se denominan con el prefijo (+) y las 2S como (-). Se suelen denominar generalmente catequinas a los monómeros de estos flavan-3-oles. Se pueden encontrar en la naturaleza como derivados metilados, glicosidados o como ésteres, por ejemplo con el ácido gálico (epigallocatequina-3-galato, en el té verde). Existen habitualmente en forma polimerizada, originando los denominados taninos condensados. Estos tienen la capacidad de dar lugar a antocianidinas por calentamiento en medio ácido mineral, por lo que también se les denomina proantocianidinas.

#### **1.6.2.5 Procianidinas**

Según lo mencionado anteriormente estos taninos condensados se clasifican, de acuerdo al número de unidades básicas elementales que entren a formar parte de su estructura, en oligómeros y polímeros (con más de 5 unidades flavan-3-ol básicas). Las proantocianidinas dimericas que presentan enlaces tipo carbono-carbono (C-C) corresponden a los compuestos inicialmente designados como proantocianidinas de tipo B. Existen también dímeros llamados de tipo A, que presentan una doble unión interflavónica: además del enlace C-C, poseen otro enlace de tipo éter entre C2 y C7 o C5.

#### **1.6.2.6 Isoflavonas**

Las isoflavonas poseen un esqueleto 3-fenilcromano derivado de la reestructuración del sistema flavonoide 2-fenilcromano por medio de un reordenamiento 1,2-aril. Las isoflavonas se encuentran mayoritariamente en especies de la familia Leguminosae. Las principales fuentes de isoflavonas en la dieta humana son la soja y los productos derivados de ella. Presentan algunas características estructurales similares a los estrógenos. Aunque no son esteroides, presentan grupos hidroxilo en las posiciones 4' y 7 de la molécula, configuración análoga a la de los hidroxilos en la molécula de estradiol. Este hecho les confiere propiedades del tipo hormonales, por lo que son clasificadas como fitoestrógenos.

### **1.6.2.7 Antocianinas**

El término antociano, proviene del griego *anthos*, que significa flor y *kianos* que significa azul. Estos compuestos son pigmentos característicos de vegetales, frutas, flores, siendo responsables de los colores de las mismas. Se encuentran en abundancia en uvas tintas, arándanos, frutillas, etc. En sus medios naturales se encuentran presentes en forma de heterósidos, cuyo aglicón, derivado del ion flavilio o fenil-2-benzopirilio, está hidroxilado y metoxilado en diferentes posiciones. Puede estar unido a una o varias moléculas de azúcar.

### **1.6.2.8 Ácidos fenólicos**

Son ácidos carboxílicos derivados de fenilpropanoide con estructura C6-C3. Se encuentran como ácidos libres como por ejemplo los ácidos cafeico, ferulico, gálico, sinapico, cumárico, esterificados, o conjugados como lo son el ácido caftárico (combinación de cafeico y tartárico), fertárico (ferulico y tartárico). Generalmente se encuentran en frutas (se han encontrado en uva los ácidos conjugados ferulico y caftárico), verduras, plantas y en mayor concentración que los flavonoides. En propóleos se han encontrado ácido p-cumárico, cafeico, gálico.

### **1.6.2.9 Estilbenos**

Esta familia de polifenoles naturales incluye los derivados hidroxilo y metoxi del estilbeno simple (cuya estructura base es un hidrocarburo aromático del tipo C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>) así como sus formas glicosido y polímeros. Se encuentran en muchas plantas superiores en respuesta a los ataques de agentes patógenos externos (insectos, hongos), en uvas se ha encontrado el resveratrol. Permiten comprender por qué algunas variedades de vid son más o menos resistentes a los ataques de hongos, al producir elevadas cantidades de estos que actúan como antimicrobianos.

### **1.6.3 Los Polifenoles y el beneficio de su ingesta.**

Como se ha descrito, estos compuestos polifenólicos están extensamente distribuidos en nuestra dieta. Se han reportado estudios epidemiológicos del beneficio de determinadas dietas en la salud humana:

-Los beneficios del té (té verde principalmente) se ha visto que su consumo frecuente tiene influencia en la prevención de ciertos tipos de cáncer (estómago) y enfermedades cardiovasculares. Se atribuyen los efectos beneficiosos a la presencia de catequina en el té verde, (Yang, C. S. y Wang, Z.-Y., 1993).

-Disminución del riesgo cardiovascular en el sur de Francia (donde tienen un consumo alto de comida rica en ácidos grasos saturados), comparado con otros países, debido a la ingesta de vino especialmente el tinto, (De Lorgeril M y Salen P., 1999).

-Los beneficios del alto consumo de aceitunas y el aceite de oliva en la zona del Mediterráneo, debido a la presencia de polifenoles capaces de atrapar radicales libres (Gutfinger, T., 1981; Chimi, H. et al, 1991).

-El uso de un alimento a base de propóleos y polen de abejas para pollos de engorde como promotor inmunológico, evitando diversas enfermedades y como estimulante del desarrollo corporal (Tesis de grado en Ingeniería Agropecuaria Pontificia Universidad Católica de Ecuador Autor: Carmen Luna, 2011).

### **1.6.3.1 Los Polifenoles como antioxidantes.**

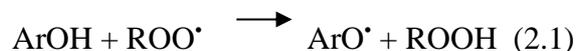
Muchas de estas acciones benéficas mencionadas anteriormente están dadas por su mecanismo de acción relacionado a su poder antioxidante por lo que debemos primero entender de qué hablamos cuando nos referimos a ellos como “antioxidantes”. Para ello debemos analizar la implicancia de estos en el proceso de estrés oxidativo en el organismo humano que veremos posteriormente (ver 2.4).

El término “antioxidante” se refiere a la capacidad que poseen de formar radicales libres (RL). Estos intervienen en el estrés oxidativo modificándolo ya sea reduciendo la producción de RL en el organismo siendo un proceso favorable o generando RL mas reactivos que los propios RL endógenos en un proceso desfavorable actuando como pro-oxidantes. Actúan como atrapadores (*scavengers*) de RL, así como también por medio de inhibición enzimática, o bien por quelación con los metales de transición responsables de la generación de algunos RL (Rice-Evans 1993, Cos P. 1998, Martinez, 2000, Rice-Evans 2004, Williams 2004, Paulino, 2010).

Para los polifenoles se han descrito las características estructurales que hacen favorable a la acción antioxidante. En el caso de actuar como atrapadores de RL contribuye a la acción antioxidante el grado de hidroxilación y la posición de los hidroxilos en la molécula. Los grupos hidroxilos aromáticos, son relativamente reactivos, permitiendo el establecimiento de enlaces de hidrógeno, así como también pueden formar complejos con iones metálicos como el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) y el hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) favoreciendo su acción quelante. Las posiciones relevantes de estos hidroxilos en el caso de los flavonoides son en los carbonos C3' y C4' del anillo B, C5 del anillo A y C3 del anillo C. Adicionalmente se ha observado que la presencia del doble enlace entre los carbonos C2-C3 y el grupo oxo en C4, son fundamentales para potenciar la actividad antioxidante (Rice-Evans, 1996, Rice-Evans 2004). En cuanto a los ácidos fenólicos se ha observado principalmente que los derivados del ácido cinámico al presentar un grupo etilénico, entre el anillo fenol con una hidroxilación, y el grupo carboxílico, como el ácido p-cumárico, tiene un efecto positivo sobre la capacidad antioxidante. La presencia de hidroxilos en posición orto (adyacentes) (por ej. ác. cafeico), mejora aún más la actividad (Martinez, 2000).

En esta Tesis se estudiarán dos tipos de mecanismos de acción antioxidante para los polifenoles:

El primer mecanismo de acción está relacionado con la capacidad de *scavenger* y se basa en una transferencia acoplada de protón-electrón. En esta transferencia, el antioxidante ( $\text{ArOH}$ ) elimina los RL (radical peroxilo  $\text{ROO}^\bullet$ , radical DPPH ( $\text{DPP}^\bullet$ ), etc.) por la transferencia de un átomo de H de los grupos OH al radical libre según la Ecuación 2.1:



El radical fenoxilo producido ( $\text{ArO}^\bullet$ ) puede ser estabilizado mediante transferencia de un átomo de H y la formación de quinonas (ganado un electrón), o reaccionar con otro radical, incluyendo otro radical fenoxilo, interrumpiendo así el inicio de una nueva cadena de reacción. Este primer mecanismo antioxidante corresponde a la disociación homolítica de enlaces OH de compuestos polifenólicos. Esta

reacción puede ocurrir en cada grupo OH del compuesto fenólico (ArOH) dependiendo de la energía de disociación del enlace O-H denominada BDE (*bond dissociation energy*) del grupo OH y la entalpía de reacción.

El BDE es un parámetro termodinámico intrínseco de un grupo OH dado en un compuesto fenólico, mientras que la entalpía de reacción depende de la diferencia entre el radical reaccionando con el polifenol. Cuanto menor sea el BDE, más fácil es la ruptura del enlace OH y más importante su papel en la reactividad antioxidante. Para ser activo el grupo OH en un radical libre debe poseer una entalpía negativa (reacción exotérmica) (Trouillas et al 2006), por lo cual también considerar la entalpía de esa reacción.

En consecuencia, se estudiara la reactividad de estos fenoles como especies radicalarias mediante cálculos químico-cuánticos de descriptores electrónicos como la densidad de carga analizando los orbitales HOMO (orbital molecular más alto ocupado) de la especie neutra para saber cuál será el que más fácilmente ceda el electrón transformándose en radical (ArO<sup>•</sup>) y la energía de disociación del enlace O-H (BDE) de cada hidroxilo presente en la molécula (Zhang H. et al 2003, Trouillas et al 2006). Estos descriptores serán usados para los estudios de correlación estructura actividad utilizando las medidas experimentales de *scavenging* (atrapadores), a realizar con los métodos de los radicales DPPH y ABTS.

En cuanto al segundo mecanismo antioxidante, el estudio se basará en relación a los sistemas enzimáticos endógenos involucrados en el stress oxidativo como el sistema xantina oxido reductasa (XOR) / xantina deshidrogenasa (XHD) / xantina oxidasa (XO). Algunas publicaciones evidencian que la disfunción de algunas enzimas cuya acción es modulada por el nivel de estrés oxidativo celular, ha sido vinculada a diversas patologías, tales como la gota asociada a la enzima xantina oxidasa (XO) (Labat J.-Robert 2014) que cataliza la formación del radical superóxido endógeno. En presencia de oxígeno, la xantina oxidasa (XO) cataliza la oxidación de la xantina a ácido úrico. Los fenoles interactúan a nivel del sitio activo Mo-Co de XO al competir con el sustrato (inhibidores competitivos), o por la interacción con otro sitio de la enzima, disminuyendo así la actividad de esta con el sustrato. A

estos inhibidores se les denomina inhibidores acompetitivos. Sin embargo, algunos polifenoles tienen la cualidad de inhibir de ambas formas a la enzima (Rojas, 2008).

A pesar de su corta vida media el superóxido generado por la xantina oxidasa además actúa como intermediario en la producción de otros radicales libres endógenos. Por ende, se estudiará la inhibición de la xantina oxidasa por los polifenoles de manera de evitar la generación del superóxido por esta vía y al mismo tiempo evitar la formación de ácido úrico.

### **1.6.3.2 Los Polifenoles como potenciales antiinflamatorios (inhibidores de ciclooxigenasas).**

Existen evidencias que indican que los fenoles podrían tener capacidad antiinflamatoria por inhibición de sistemas enzimáticos involucrados en los procesos inflamatorios. La inflamación es un proceso multifactorial. Refleja la respuesta del organismo a diversos estímulos y se relaciona con muchos trastornos tales como artritis, asma, psoriasis y que requieren un tratamiento prolongado o repetido.

Varios son los procesos que desencadenan la inflamación, uno de ellos está controlado por la ciclooxigenasa (COX), que es la enzima limitante de la vía de biosíntesis de eicosanoides, y cataliza la conversión del ácido araquidónico a importantes mediadores antiinflamatorios tales como las prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI) y tromboxano (TXA<sub>2</sub>) (Vane 1996).

La ciclooxigenasa presenta dos isoformas, una de ellas la ciclooxigenasa 2 (COX-2) se produce en respuesta a la liberación de varios mediadores pro-inflamatorios y será el target para los polifenoles, buscando una acción inhibitoria de la misma como resultado para una posible terapia antiinflamatoria. Esto se tratará en el apartado del Capítulo Ic (Blancos enzimáticos).

## **1.7 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO.**

### **1.7.1 Los Radicales libres.**

En los sistemas moleculares, la cohesión entre los átomos se atribuye a diferentes interacciones repulsivas y atractivas. La naturaleza del enlace depende de los átomos y sus propiedades físico-químicas

(por ejemplo, potencial iónico, electronegatividad). La excitación de las moléculas por las radiaciones (luz solar, ultravioleta etc) o por colisión (por ejemplo, agitación térmica) conduce a una ruptura del enlace en la que cada átomo unido puede mantener sus propios electrones (disociación homolítica), para formar los denominados radicales libres (RL). En nuestro organismo se producen diversos procesos químicos que son fundamentales para la vida, ya que obtenemos la mayor parte de energía de ellos, como ser los procesos de oxidación-reducción.

Desde el punto de vista químico los RL son átomos o moléculas con un electrón desapareado en su capa externa (capa de valencia) y usualmente se los nombra como  $R\cdot$ . La presencia de este electrón desapareado hace a estas especies extremadamente reactivas, provocando el ataque a especies vecinas en particular sobre las moléculas biológicas como ADN, proteínas, lípidos, etc.

Al considerar un organismo vivo, los radicales libres pueden ser endógenos o exógenos. Los radicales libres endógenos son originados principalmente por la cadena respiratoria, los leucocitos activados y enzimas. Los radicales libres exógenos podrían originarse en el humo del cigarrillo, la contaminación, la radiación (en particular, la luz UV) y el estrés. Por lo general son tóxicos y son los agentes claves del estrés oxidativo.

### **1.7.2 El Estrés oxidativo.**

Como se mencionó anteriormente, la presencia del electrón desapareado en la capa externa hace que los radicales libres sean altamente reactivos, que al reaccionar con moléculas biológicas vecinas como ADN, proteínas y lípidos producen daño muchas veces irreversible. Cuando se produce un desequilibrio a favor de los fenómenos de oxidación, generándose un aumento de RL (ya sean especies reactivas de oxígeno (EROs) o especies reactivas de nitrógeno (ERNs)) o una disminución de antioxidantes endógenos (glutación, o del tipo enzimático como la superóxido dismutasa) o los exógenos por ingesta ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno etc), se produce el denominado Estrés Oxidativo llevando hacia un sinnúmero de enfermedades (Rice-Evans, 1993).

Las células pueden tolerar los estados leves de estrés oxidativo, pero en situaciones severas puede producir efectos deletéreos para la salud, induciendo daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. Por lo tanto podemos definir al estrés oxidativo como un proceso en el

que la producción de radicales libres supera a las defensas antioxidantes, lo que puede producir defectos en el organismo cuando es severo, desencadenando una serie de procesos que terminan en daño celular y ciertas enfermedades (Figura 8).

### **1.7.3 Mecanismos de acción radicalarios y enzimáticos para la acción antioxidante.**

Se deben diferenciar 3 situaciones si se quiere definir a un polifenol como antioxidante, partiendo de esto se podrá diseñar un experimento in vitro o in vivo que represente fielmente lo que se quiere expresar (Schaich K.M., Tian X., Xie J., 2015). Comencemos definiendo entonces:

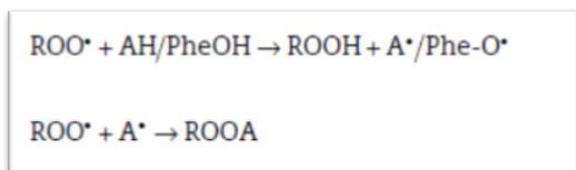
Capacidad antioxidante: es el número total de electrones donados o moléculas diana convertidos por mol de antioxidante en una reacción completa en determinadas condiciones. Esto por lo general se aproxima el número de grupos -OH fenólicos, o dos electrones por grupo -OH, aunque no siempre. Desafortunadamente, el requisito para la reacción completa ignora a la velocidad de reacción, donde la situación en la reacción lenta se traduce en que los antioxidantes con muchos grupos fenólicos tienen un mayor valor, mientras que aquellos antioxidantes con pocos fenoles reaccionan más rápido y el resultado del valor puede ser subestimado en gran medida o incluso pasado por alto.

Actividad antioxidante: es la concentración de antioxidante requerido para dar una respuesta relacionada a la velocidad de la reacción en cuestión. Es algo muy genérico.

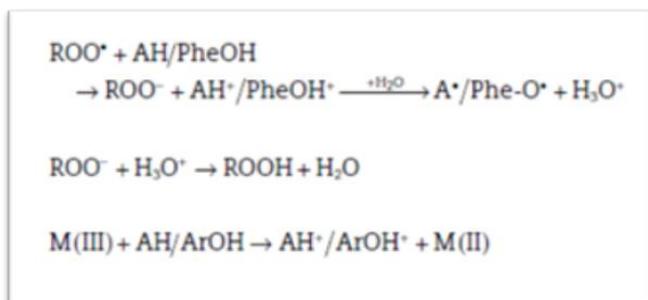
Potencial antioxidante: es un término general utilizado que no es del todo claro, en donde se describe la expectativa de que un antioxidante puede atrapar radicales en condiciones específicas. Este término puede ser fácilmente confundido con potencial termodinámico, por lo que su aplicación puede dar lugar a dudas.

Al definir qué es lo que estamos expresando al usar un cierto tipo de método experimental para evaluar a un antioxidante, debemos poder explicarlo mediante el tipo de mecanismo molecular. Para ello se definen 2 grandes tipos:

Los radicales libres son comúnmente inactivados o apagados mediante dos mecanismos uno mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno denominado HAT y el otro mediante la transferencia de un electrón para convertir al radical en una especie estable denominado SET (Figuras 9 y 10).



**Figura 9.** HAT (*hydrogen atom transference*): transferencia de átomos de hidrógeno: donde un átomo de H es transferido a un radical libre, para su posible extinción por recombinación con otros radicales.



**Figura 10.** SET (*single electron transference*): transferencia de un solo electrón (uno o más electrones es transferido para reducir compuestos diana), donde AH es un antioxidante donador de H, PheOH es un fenol y M es un metal que sufre un cambio redox.

#### 1.7.4 Radicales libres e inflamación.

Hemos descripto algunos mecanismos de como los polifenoles capturan radicales libres actuando como antioxidantes pues se sabe también que han resultado ser potenciales antiinflamatorios *in vivo* e *in vitro* como lo demuestran un sin fin de estudios publicados que intentan explicar los mecanismos por los cuales ejercen su acción. Algunos de estos estudios afirman que intervienen como inhibidores

enzimáticos bloqueando rutas metabólicas generadoras de mediadores de los procesos inflamatorios, como por ejemplo la formación de eicosanoides a través de la inhibición de fosfolipasa A2, lipooxigenasas, ciclooxigenasas (Gil del Valle L. 2010).

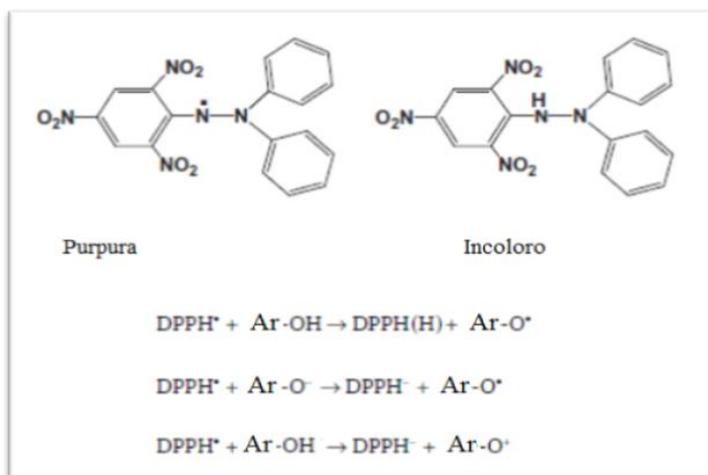
Es interesante revisar la interconexión que existe entre la inflamación y la generación de radicales libres. Las reacciones inflamatorias son eventos bien orquestados, conocidos por ser extremadamente complejos. La expresión de ciertos genes que codifican varias proteínas inflamatorias, como las interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral TNF $\alpha$ , son promovidas al desatarse los procesos inflamatorios. Estas citoquinas contienen NF-kB que son sitios redox-sensibles específicos de unión al ADN en las regiones promotoras y su producción está muy influenciada por el estado oxidativo. Se ha demostrado que el stress oxidativo favorecer la activación de NF-kB. En este escenario una retroalimentación positiva se activa con la generación de ROS, y a su vez sirve para aumentar aún más de la cascada de procesos inflamatorios y exacerbar la inflamación induciendo el daño celular y de tejidos. (Gil del Valle L. 2010).

Al usar polifenoles como potenciales inhibidores de ciertas enzimas que intervienen en los procesos inflamatorios como lo son las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2), cuyo mecanismo de acción lo describiremos en el apartado Capítulo Ic (Blancos enzimáticos), estaríamos impidiendo parte del desencadenamiento del estrés oxidativo.

## **1.8 ANTIOXIDANTES COMO ATRAPADORES (SCAVENGERS) DE RADICALES LIBRES**

### **1.8.1 Radical DPPH (2,2-difenilpicril hidrazil).**

Es un radical estable de color violeta que al reaccionar con otros radicales o electrones o átomos de H lleva a una pérdida de color a  $515 \pm 2$  nm y pérdida de la absorbancia, (Figura 11).



**Figura 11.** Formas oxidada y reducida del Radical DPPH. Donde Ar-OH es un polifenol.

Así como en el  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ , el DPPH posee impedimento estérico en su centro radical ya que está altamente protegido. En contraste con el  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  que es hidrosoluble, el DPPH es hidrófobo por lo que sus reacciones se deben ejecutar en disolventes orgánicos.

Aunque la literatura describe que las reacciones DPPH son atribuidas mayoritariamente a mecanismos HAT, las reacciones en solventes con fuertes enlaces de hidrógeno tales como el metanol, interfieren con la liberación de átomos de hidrógeno y por lo tanto mejora fuertemente el mecanismo SET sobre el HAT (Barclay, Edwards, y Vinqvist, 1999; Foti, Daquino, y Geraci, 2004; Foti et al., 2008).

Resultados descritos en la discusión de este artículo sugieren que domina la transferencia de electrones (SET) en los disolventes orgánicos necesarios para disolver DPPH. Un inconveniente es que los ensayos de DPPH se realizan en condiciones similares a los de  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ .

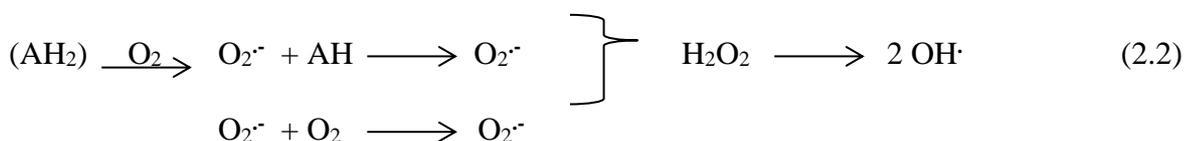
El procedimiento es simple: una solución madre de DPPH concentrada en metanol se diluye a una absorbancia de  $\sim 1$  a 515 nm, se mide la absorbancia de partida ( $A_0$ ), y el antioxidante se añade para iniciar la reacción. La metodología tradicional luego mide la absorbancia final ( $A_f$ ) a 515 nm después

de los tiempos de reacción que van desde los 4 minutos a varias horas, o incluso días, nosotros usamos 30 minutos de incubación a 517 nm.

La cantidad (A0-Af) se utiliza para generar un valor para la clasificación de las muestras ensayadas, por ejemplo representado por EC<sub>50</sub> (concentración requerida para reducir al 50% la concentración de antioxidante DPPH ensayada (Bondet, Brand-Williams, y Berset, 1997; Brand-Williams, Cuvelier, y Berset, 1995) o también se expresa como la pérdida de DPPH o DPPH% remanente (Burda y Oleszek, 2001; Stratil, Klejdus, y Kuban, 2006), o la eficiencia antirradical [1 / [EC<sub>50</sub> (Muestra) × CE<sub>50</sub> (Trolox)]] (Awika, Rooney, Wu, Prior, y Cisneros-Zevallos, 2003; Butkovic, Klasinc, y Bors, 2004).

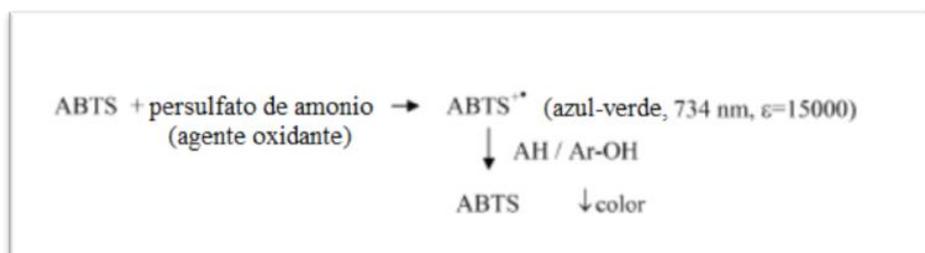
Los antioxidantes reaccionan con DPPH por transferencia de electrones más rápidamente y por transferencia de átomos hidrogeno más lentamente. En cuanto a las reacciones por transferencia de electrones, estas son bastante rápidas pero más lentas que las de ABTS<sup>•+</sup> debido al acceso del fenol al radical DPPH, el cual posee su centro radicalario más obstaculizado, (Salamone, DiLabio, y Bietti, 2011; Salamone, Martella, y Bietti, 2012; Xie y Schaich, 2014).

Los compuestos que reaccionan rápidamente (dominando la transferencia de electrones) son el ácido ascórbico (AH<sub>2</sub>) y fenoles simples; luego algunas reacciones lentas con adición de grupos ácidos u otras cadenas laterales a anillos aromáticos, y hay algunos efectos inductivos en los anillos, dentro de las diferentes clases de fenoles (ver ecuación 2.2).



### 1.8.2 Radical ABTS<sup>•+</sup> (radical monocatiónico del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico).

ABTS<sup>•+</sup> es un radical catiónico generado directamente con persulfato de potasio como el agente oxidante a partir del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), (Re et al., 1999). Los antioxidantes (en este caso polifenoles del tipo AH, o Ar-OH), después reaccionarían únicamente con ABTS<sup>•+</sup> y el color se ve disminuido por una sola de reacción (Figura 12):



**Figura 12.** Formación del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>

Para la reacción, se utilizan alícuotas de solución de ABTS<sup>•+</sup> y se diluyen hasta una absorbancia de ~ 1,0 a 734 nm que se registra como el punto de partida. Se añade y se mezcla el antioxidante y la caída de la absorbancia (A<sub>0</sub>-A<sub>f</sub>) se mide después de períodos de reacción variando de minutos a horas. (Nosotros utilizamos un periodo de 7 minutos durante 3 veces total 21 min).

La acción antioxidante se reporta como equivalentes de Trolox comparando (A<sub>0</sub>-A<sub>f</sub>) de la prueba antioxidante contra los valores de (A<sub>0</sub>-A<sub>f</sub>) de soluciones de estándares de Trolox, o también la concentración de antioxidante que dan la misma respuesta que 1 mM Trolox (ecuación 2.3).

$$\text{TEAC (ABTS)} = \frac{(A_0 - A_f)_{\text{muestra}} - \text{blanco}}{(A_0 - A_f)_{1 \text{ mM Trolox}} - \text{blanco}} \quad (2.3)$$

Lo que sucede es que la reacción es tan rápida que los resultados exactos sólo pueden obtenerse con métodos de mezcla rápida, tales como lectores de placas con auto dispensadores o mezcladores de flujo detenido equipamiento que no todos los laboratorios poseen.

De esta forma, se está ignorando la velocidad de reacción y la cinética del radical. Los cálculos del TEAC se basan en la caída de absorbancia (A0-Af) y esto proporciona solo parte de la estequiometría de la reacción completa o sea los moles totales del ABTS<sup>•+</sup> reducidos por mol antioxidante. El TEAC se correlaciona estrechamente con la cantidad de grupos fenólicos presentes en una estructura de un determinado tipo pero cuando aparecen otros tipos de estructuras ahí la correlación desaparece.

Si graficamos la Absorbancia en el tiempo mientras transcurre la reacción veremos la cinética y veremos que el perfil de las curvas refleja un comportamiento diferente si el mecanismo está siendo dirigido por un proceso SET o por HAT.

Algunos antioxidantes reaccionan completamente en menos de tiempo de reacción, algunos reaccionan lentamente y poco a poco, y otros mezclan reacciones iniciales rápidas y lentas (Tian y Schaich, 2013). Estas diferencias entre las velocidades de reacción del antioxidante son críticas, ya que reflejan la capacidad de atrapar radicales reactivos de corta duración que están presentes en sistemas biológicos y en los alimentos. Dicha capacidad se perdió por completo en los procedimientos normales de ensayo.

Entonces la pregunta que cae por su propio peso es: cuáles son aquellas propiedades químicas moleculares que reflejan estas diferencias en los perfiles de velocidad inicial para ambos mecanismos? Y se podrían diferenciar los mecanismos?

Dos factores controlan las velocidades de reacción y las curvas de respuesta o sea los perfiles cinéticos: por un lado SET vs HAT y por otro el acceso estéricamente impedido al sitio del radical ABTS<sup>•+</sup>. Los antioxidantes que actúan por transferencia de electrones y accediendo totalmente al sitio del radical ABTS<sup>•+</sup> reaccionan en milisegundos.

Las reacciones se hacen lentas por la presencia de múltiples grupos OH, de anillos con aductos voluminosos, por uso de altas concentraciones de antioxidante, y por la transferencia de átomo de hidrógeno. Entonces por un lado para los polifenoles, la velocidad es lenta al disminuir la eficiencia de la reacción con cada OH adicional. Por lo tanto, el ensayo debe llevarse a cabo en un intervalo de

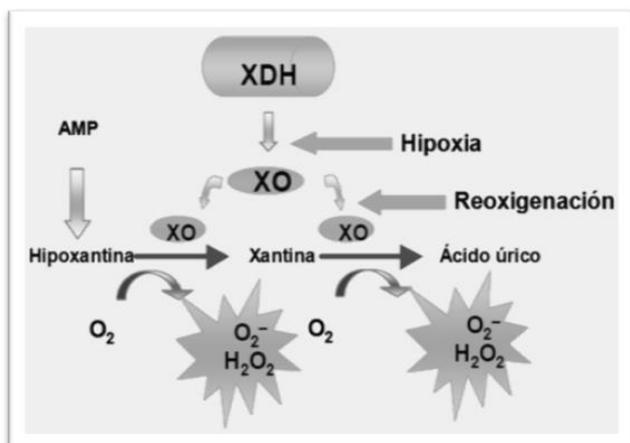
concentraciones de fenol conocidas para obtener comparaciones con la actividad de extractos o de compuestos fenólicos a diferentes concentraciones.

Por otro lado la velocidad depende de la accesibilidad estérica que se ve apoyada por falta de correlación con la velocidad de reacción inicial y la estequiometría o por las propiedades antioxidantes tales como el potenciales redox, donde se obtienen correlaciones débiles ( $p = 0,75$  hasta  $0,86$ ) entre los valores TEAC y velocidades de reacción con el número de grupos OH fenólicos (Tian y Schaich, 2013). Generalmente en un compromiso entre la estequiometría de TEAC, el valor de TEAC aumentaría con el número de OH mientras que la velocidad disminuye con el número de grupos -OH fenólicos.

## **1.9 ANTIOXIDANTES COMO INHIBIDORES ENZIMÁTICOS**

De los sistemas enzimáticos antioxidantes en nuestro organismo, se destacan a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa. Inicialmente se produce la dismutación de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  por la SOD, finalmente glutatión peroxidasa y catalasa convierten al  $H_2O_2$  en  $H_2O$ .

Pero por otro lado existen sistemas enzimáticos en el organismo que son generadores de radicales libres, el ejemplo más relevante es una forma de xantina oxido reductasa (XOR) denominada xantina oxidasa (XO) una de las principales fuentes generadoras de radicales libres. La xantina deshidrogenasa (XDH) puede ser convertida en XO por una oxidación reversible de un grupo sulfhidrilo. La principal función de XO es su participación en la degradación de purinas (Figura 13), utilizando hipoxantina y oxígeno para dar lugar a xantina, radical superóxido y peróxido de hidrógeno, a su vez xantina de igual forma es convertida a ácido úrico. También se ha observado que XO cataliza la reacción de reducción de nitritos a  $NO^*$  en condiciones de hipoxia. Así mismo se ha encontrado aumento en la actividad XO en plasma con producción de especies reactivas de oxígeno (radical superóxido) en diabetes y luego de episodios de isquemia (Tan S., et al, 1993).



**Figura 13.** Mecanismo de acción de xantina oxidasa.

Se han reportado a los flavonoides apigenina, quercetina, luteolina, entre otros, como inhibidores de la XO similares a un análogo estructural de la hipoxantina de nombre comercial Alopurinol, usada en la terapia contra la gota (enfermedad provocada por niveles elevados de ácido úrico en sangre).

La inhibición de XO es comúnmente de tipo competitiva, ya que se debe principalmente a la unión de ciertas moléculas al sitio catalítico de la enzima (Mo-Co), provocando un impedimento para el ingreso del sustrato de ésta, ya sea hipoxantina o xantina, (Ya-Di Li et al, 2013). En consecuencia al bloquear el ingreso del sustrato, también se inhibe la generación de aquellos radicales libres producidos por esta vía. El mecanismo de acción lo veremos más en detalle en el apartado Ic Blancos enzimáticos (3.1).

## 1.10 ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIOS

La evidencia científica ha demostrado que debido a su estructura, los polifenoles del tipo flavonoides pueden tener potentes efectos inhibidores en varias enzimas, incluidas la tirosina quinasa, las proteínas C quinasa, fosfoinositol quinasa-3, las cuales están muy involucradas en la regulación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), (Mutoh M, et al, 2000).

Estos compuestos bioactivos presentan muchas propiedades terapéuticas, entre ellas la de inhibir a COX-2, enzima clave para la producción de prostaglandinas (PGs) que causan con frecuencia inflamación y el dolor cuando se sobreexpresa, como se han mencionado anteriormente. Son conocidos por sus efectos antiinflamatorios en tratamiento de la artritis (Yadi L., 2011), y se ha visto que algunos flavonoides (miricetina y luteolina) actúan como potentes inhibidores duales de COX-2 y de XO (Yadi L., 2013), El mecanismo de acción lo veremos más en detalle en el apartado Ic Blancos enzimáticos. Por lo que si se quiere elaborar un nutraceutico, con estos polifenoles, se deberá tener en cuenta que estos compuestos intervienen en varias rutas del metabolismo humano.

## I b - QUÍMICA TEORICA

### 2.1 MODELIZACIÓN MOLECULAR

En estos últimos años los avances en la química, la farmacología, las herramientas bioinformáticas, la biología molecular, la genómica y en general las ciencias de la salud han logrado un grado de avance tal en el descubrimiento de fármacos que las industrias biotecnológicas y farmacéuticas han tenido que acudir a la academia como pilar fundamental en esta transferencia de conocimiento. Parte de estos avances fueron reportados por Jürgen Drews, (Drews J. et al. 2000, Drug Discovery: A Historical Perspective, *Science*, 287, 1960-1964), también en Morgan B. P. & Harris C. L. 2015, Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases, *Nature Reviews Drug Discovery* 14, 857–877.

#### 2.1.1 Mecánica Molecular (MM)

Dentro de la denominada química computacional, existen técnicas aplicadas a la solución de sistemas de ecuaciones diferenciales que se obtienen, a su vez, de la solución de sistemas de ecuaciones químicas. El modelado molecular es una técnica relativamente nueva de estudio de la relación entre la estructura molecular y las propiedades químicas macroscópicas de la materia. La base del modelado molecular es el uso de métodos computacionales para simular, explicar o predecir la estructura tridimensional y las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, con la ayuda esencial de métodos gráficos. Fue el nombre dado en un principio a la aplicación de la Mecánica Molecular para la determinación estructural. Hoy en día se incluye también el uso de los métodos de la Química Cuántica.

En la Mecánica Molecular se estudia el movimiento de los núcleos y los electrones no se tratan explícitamente, se asume que se distribuyen óptimamente alrededor de los núcleos. Es un método de cálculo diseñado para obtener energías y estructuras de moléculas. El método surge de las nociones simples de enlaces, ángulos y diedros y la idea básica es que estos poseen valores naturales a los cuales las moléculas ajustan sus geometrías en los casos simples.

El cálculo de la energía potencial (y otras propiedades como geometría, calores de formación, espectros, etc.) de una molécula se lleva a cabo utilizando los llamados campos de fuerza (force fields) que son un conjunto de ecuaciones cuya forma es familiar a la mecánica clásica, y las cuales se derivan empíricamente.

### 2.1.2 Campos de fuerza

En un campo de fuerza se define que la energía potencial de un sistema molecular es función de las coordenadas atómicas (ecuación 2.4):

$$E(x) = E_{\text{str}} + E_{\text{ang}} + E_{\text{stb}} + E_{\text{oop}} + E_{\text{tor}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{ele}} + E_{\text{sol}} + E_{\text{res}} \quad (2.4)$$

La expresión de energía de energía implica la suma de determinados tipos de interacciones atómicas, los cuales se describen en el paquete computacional utilizado: Molecular Operating Environment (MOE 2011.10).

En ella se definen términos como la energía de estiramiento del enlace ( $E_{\text{str}}$ ), la energía del ángulo de enlace ( $E_{\text{ang}}$ ), la energía de estiramiento y flexión del enlace ( $E_{\text{stb}}$ ), la energía de enlaces fuera del plano que se extiende a tres átomos vecinos ( $E_{\text{oop}}$ ), la energía del ángulo diedro o de torsión ( $E_{\text{tor}}$ ), las interacciones de Van der Waals ( $E_{\text{vdw}}$ ), tiene en cuenta parámetros del campo de fuerza, factores de escala entre interacciones 1-2, 1-3, 1-4., además de una función de suavizado (smoothing, cutoff) y un factor de interacción de escala usado para interacciones no enlazantes. La energía electrostática ( $E_{\text{ele}}$ ) considera parámetros de Coulomb y dieléctricos. La energía de solvatación implícita ( $E_{\text{sol}}$ ) mediante el modelo de Born Generalizado, tiene en cuenta la energía propia del átomo, las constantes dieléctricas en el interior del soluto y del soluto, y factores que tienen que ver con las energías de van der Waals. La energía de restricción (*constraint* y *restraint*) ( $E_{\text{res}}$ ) los términos de restricción y de amarre (*tethers*), son términos extras agregados a la función potencial para imponer condiciones geométricas. Mientras que los *constraint* son condiciones más duras, los sistemas de restricción denominados *restraint* son más suaves en cuanto al peso que se usa para crear valores altos de energía cuando los valores de *constraint* son violados.

## 2.2 MÉTODOS QUÍMICO-CUÁNTICOS

### 2.2.1 Mecánica Cuántica (QC)

En los estudios de QC las moléculas se consideran como un conjunto de átomos que poseen propiedades electrónicas características en función de su arreglo espacial y de acuerdo a ello cada electrón de esa estructura tiene un comportamiento que influye en la formación de estados energéticos producidos por las interacciones entre orbitales. La QC permite describir los fenómenos electrónicos como la formación y ruptura de enlaces (reacciones) por medio de sistemas pequeños que influyen en las propiedades fisicoquímicas del sistema.

La mecánica molecular (MM) generalmente provee cálculos rápidos (antagónica a la QC), generalmente sus datos resultan imprecisos debido a que esta considera el sistema molecular en grande, como un conjunto de esferas y resortes, que para ser modelado necesita ser tomado como un sistema de campos de fuerza, en el cual se aplican las leyes de la física clásica del mundo macroscópico en un sistema nanoscópico. Esto requiere parámetros controlados y aproximaciones que convierten a este método en poco acertado para el modelamiento de un sistema electrónico, en el cual conceptos de dualidad y de energía cuantizada del electrón deben ser tenidos en cuenta.

### 2.2.2 Funciones de onda y orbitales

La Mecánica Cuántica postula que cualquier sistema puede ser representado por una función de onda, la cual posee toda la información sobre el sistema en cuestión. La ecuación central de la mecánica cuántica es la ecuación de Schrödinger que en su forma independiente del tiempo establece (ec. 2.5):

$$H\Psi = E\Psi \quad (2.5)$$

H es la notación abreviada de un operador (Hamiltoniano) que se aplica a una función matemática, en este caso, la función de onda  $\Psi$ , y E es la energía del sistema. Esta ecuación es de tipo diferencial, o más bien un conjunto de ecuaciones con funciones  $\Psi_n$ , a la que le corresponde un valor de energía (Schrödinger, 1926, por una revisión consultar Levine, 1983; Daudel *et al.*, 1983).

La función de onda varía con las coordenadas geométricas de un sistema, puesto que los problemas se dan para sistemas moleculares tridimensionales. Para el átomo de hidrógeno, las funciones de onda permitidas son conocidas. Estas funciones, una para cada energía o valor propio, deben satisfacer las condiciones de la Mecánica Cuántica: deben ser funciones "bien comportadas", tender a cero en el infinito y no poseer discontinuidades ni cambios bruscos en su curvatura. Existe un operador apropiado para cada observable físico diferente. Como se mencionó, para el observable Energía total, el operador correspondiente es el Hamiltoniano.

Las funciones de onda que satisfacen la ecuación de Schrödinger para el átomo de hidrógeno, son llamadas orbitales. En átomos polieletrónicos, se adopta la llamada aproximación orbital, que permite tratar cada electrón separadamente, cada uno con su función u orbital. La función de onda total para un átomo polieletrónico ( $\Psi$ ) es un producto de las funciones de onda individuales de cada electrón,  $\chi_i$ .

La función de onda total incluye los factores de spin (además de la parte espacial), con lo que los orbitales atómicos serán expresados como  $\chi_\alpha$  o  $\chi_\beta$ , según el orbital  $\chi$  esté asociado al factor de spin  $\alpha$  o  $\beta$ , respectivamente. Los orbitales ahora se llamarán spin-orbitales y ellos son los que conformarán la función de onda total.

Tomando ahora la función de onda total como el producto de los spin-orbitales atómicos, surge el inconveniente que, al intercambiar cualquier par de electrones y asignarles diferentes orbitales atómicos, la función de onda total seguirá incambiada, lo cual violaría el principio de exclusión de Pauli. Este establece que la función de onda para un sistema ( $\Psi$ ) debe cambiar de signo si se intercambian cualquier par de electrones, puesto que los electrones son partículas fermiónicas idénticas. Entonces, para respetar el principio de Pauli, la función de onda total deberá cambiar de signo, al cambiar de spin. Para superar este problema, se propuso como solución tomar la función de onda total como el producto antisimetrizado de los spin-orbitales atómicos (el determinante de Slater).

En una forma reducida, la función de estado, para un átomo, se puede escribir como (ecuación 2.6):

$$\Psi = \chi_1\chi_2\chi_3\dots\chi_n \quad (2.6)$$

Recordando que la expresión ahora no representa un simple producto, sino el determinante de la matriz anterior (determinante de Slater). El problema que sigue existiendo es el de encontrar la forma de las funciones que representan adecuadamente los spin-orbitales atómicos. La  $\Psi_i$  individual puede ser tomada como una función analítica hidrogenoide pero con diferentes exponentes apropiados para cada átomo en particular, o alternativamente, como un valor numérico para cada punto definido por las coordenadas. Este último tipo de funciones son llamadas funciones numéricas. Hartree introdujo algunas funciones orbitales atómicas extremadamente exactas del tipo numéricas que luego fueron transformadas a la forma analítica por Slater. La forma general de estas funciones es la siguiente:

$\chi_i =$  constante de normalización \* función exponencial en  $r$  \* armónicos esféricos en términos de  $\theta$  y  $\phi$

### **2.2.3 La aproximación de Born-Oppenheimer y otras simplificaciones de la ecuación de Schrodinger.**

La aproximación de Born-Oppenheimer, es la primera de varias aproximaciones usadas para simplificar la solución de la ecuación de Schrödinger. Consiste en la consideración de desacoplamiento de los movimientos electrónico y nuclear, dado que los núcleos poseen mayor masa que los electrones, el movimiento de los núcleos se desprecia, considerando que estos se encuentran en un estado estacionario con respecto a los electrones y que las nubes electrónicas tienen un movimiento independiente de los núcleos. Por lo tanto, los electrones perciben a los núcleos como si estuvieran inmóviles y se adaptan según la posición respecto a su núcleo.

### **2.2.4 Teoría de Orbitales moleculares**

La Teoría de Orbitales Moleculares es usada para determinar la estructura del compuesto, en la que los electrones no están asignados a enlaces entre átomos, sino que se toman de acuerdo a su naturaleza dual, como un movimiento que está bajo la influencia de los núcleos de toda la molécula. En esta teoría, cada molécula está formada por un grupo de orbitales moleculares representado por una función que se entiende como la suma de los  $N$  orbitales atómicos que constituyen la molécula.  $N$  orbitales atómicos

combinados dan N orbitales moleculares. Los orbitales moleculares son construidos de las combinaciones lineales de orbitales atómicos: cuando los orbitales atómicos interfieren constructivamente, ellos dan lugar a orbitales enlazantes; cuando interfieren destructivamente, ellos dan lugar a orbitales antienlazantes.

Según la teoría, los enlaces covalentes se forman por solapamiento de orbitales atómicos, de manera que los nuevos orbitales moleculares pertenecen a la molécula entera y no a un átomo. Cuanto mayor sea el solapamiento, mayor será la liberación de energía y por lo tanto, menor será la energía del orbital molecular enlazante. Si el proceso de aproximación de los átomos continúa, los núcleos atómicos pueden llegar a repelerse mutuamente, lo que hace que la energía del sistema aumente (orbital antienlace). Esto significa que la máxima estabilidad (mínima energía) se alcanza cuando los núcleos se encuentran a una distancia determinada que se conoce como longitud de enlace.

En términos matemáticos, la función de onda de una molécula es en principio diferente a la de un átomo. Se puede usar el símbolo  $\Psi$ , para representar una función de onda molecular y, como en el caso atómico, hacer la aproximación orbital (ecuación 2.7):

$$\Psi = \Phi_1 \Phi_2 \Phi_3 \dots \Phi_n \quad (2.7)$$

donde la función  $\Phi_i$  será una función tridimensional que determina las propiedades de un electrón en una molécula. Se puede también incluir el spin de manera que la función sea ahora un producto de spin-orbitales, en este caso, spin-orbitales moleculares.

El objeto de la mayoría de los cálculos cuánticos es la producción de una función de onda molecular. Esto sería logrado si se conocieran todos los constituyentes  $\Phi_i$ . En la mayoría de los métodos corrientemente empleados para casos moleculares, se utiliza una expansión del orbital molecular desconocido en una combinación lineal de orbitales atómicos conocidos (ecuación 2.8):

$$\Phi_i = \sum c_{ik} \chi_k \quad (2.8) \text{ donde cada } \chi_k \text{ es una función de la forma:}$$

$\chi_k =$  constante X función exponencial (en r) X armónico esférico (función de  $\theta$  y  $\varphi$ ), i = índice de un orbital molecular particular, k = índice de la suma tan alto como expandida sea ésta.

Ahora el problema se reduce a la determinación de los coeficientes de la expansión ( $c_{ik}$ ), los cuales se obtienen mediante la resolución de las llamadas ecuaciones seculares (ecuación 2.9):

$$\sum c_{ik}(H_{Ik} - \epsilon_i S_{Ik}) = 0 \quad (2.9)$$

Tal conjunto de ecuaciones puede tener una solución no trivial si se da la siguiente condición (ecuación 2.10):

$$\det(H_{Ik} - \epsilon_i S_{Ik}) = 0 \quad (2.10)$$

Esta ecuación es la base del método de orbitales moleculares. Casi siempre, estos métodos parten directamente de un determinante secular.

Los cálculos de orbitales moleculares más claramente definidos están basados en el método de Hartree-Fock, el cual apunta a resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. Para resolver esta ecuación, se deben de hacer un buen número de aproximaciones, en particular las dos más importantes: aproximación de los núcleos fijos y aproximación de Born-Oppenheimer.

De esta manera, se asume que el movimiento de los electrones es independiente del movimiento de los núcleos y es posible calcular la energía total del sistema como la suma de las energías electrónicas más la energía de repulsión nuclear. Entonces la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo se puede escribir como (ecuación 2.12):

$$\left\{ -\frac{\nabla^2}{2} - \sum_v \frac{Z_v}{r_{iv}} + \sum_{j=1}^n \Phi_j^2(2) \frac{1}{r_{12}} d\nu_2 \right\} \Phi_i(1) = \epsilon_i \Phi_i(1) \quad (2.12)$$

En esta ecuación, el primer sumando describe la energía cinética de electrones y núcleos, el segundo la interacción núcleos-electrones y el tercero la interacción interelectrónica. Esta ecuación, derivada por

Hartree, debe ser corregida ya que nuestra función de onda orbital es un determinante y no un simple producto. Para tomar en cuenta la forma determinantal de  $\Psi$  se llega a las ecuaciones autoconsistentes (cuyas siglas en inglés son SCF *self-consistent field*;) de Hartree-Fock (para la componente electrónica del sistema) que consideran términos de interacción coulombiana interelectrónica y de intercambio.

Los últimos términos surgen como consecuencia del principio de exclusión de Pauli que lleva a determinantes más que a productos de funciones, y en consecuencia se obtienen expresiones de integrales de los productos cruzados de determinantes expandidos.

El hecho que estos operadores dependan de las funciones spin-orbitales moleculares lleva a que el cálculo de la energía de un sistema proceda de una manera "autoconsistente". Los valores de los coeficientes de la expansión de las funciones de orbitales moleculares permiten calcular las integrales involucradas, con las cuales se determina el valor de la energía. Esta a su vez realimenta el cálculo de los nuevos valores de los coeficientes de la expansión. Este proceso puede ser repetido hasta que los coeficientes resultantes sean idénticos dentro de ciertos límites previamente aceptados. Los resultados entonces serán autoconsistentes.

#### **2.2.4.1 Funciones de onda aproximadas**

Todas las funciones de onda tienen algún carácter de aproximación, algunas más que otras. La ecuación de Schrödinger se puede resolver exactamente solamente para el caso del átomo de hidrógeno y ciertos sistemas hidrogenoides. Los métodos basados en el desarrollo Hartree-Fock (HF) más corrientes son los *ab initio* y los semiempíricos.

El método inicial para calcular la energía electrónica de una determinada configuración nuclear es el denominado *ab initio*, cuya palabra proviene del latín y significa "desde el principio", sea desde la ecuación de Schrödinger sin incluir información experimental. Los cálculos *ab-initio* son procedimientos iterativos basados en métodos del campo autoconsistente (SFC: Self-consistent field).

El tipo más común de cálculo *ab initio* es llamado cálculo Hartree Fock (HF), en el cual la aproximación principal es llamada aproximación de campo central. Este método no incluye las repulsiones Coulombicas electrón-electrón en el cálculo. Sin embargo, su efecto neto está incluido en el cálculo. Debido a la aproximación de campo central, las energías de los cálculos HF son siempre más grandes que la energía exacta y tienden a un valor límite llamado límite Hartree-Fock. La segunda aproximación en los cálculos HF es que la función de onda debe ser descrita por una forma funcional, la cual sólo es conocida exactamente para unos cuantos sistemas electrónicos. Las funciones usadas más a menudo son las combinaciones lineales de orbitales tipo Slater ( $e^{-ax}$ ) u orbitales tipo Gaussian ( $e^{-ax^2}$ ), abreviados STO y GTO respectivamente. La función de onda está constituida de combinaciones lineales de orbitales atómicos o sea, de combinaciones lineales de funciones base tipo Slater (STO), y tipo Gaussianas (GTO). A causa de esta aproximación, la mayoría de los cálculos Hartree Fock producen una energía mayor al límite Hartree Fock. El conjunto exacto de funciones base usado es especificado por una abreviación, tal como STO-NG.

Es importante resaltar que los cálculos son costosos en tiempo computacional y quedan aún defectos inherentes a las aproximaciones usadas para poder resolver la ecuación de Schrödinger, donde todavía subsistirá el error de energía de correlación, que surge por el efecto de los pares electrónicos. Este efecto no será constante cuando existan enlaces que se acortan o separan al límite de la disociación. Por lo tanto, el defecto será detectable cuando se calculan energías de disociación, o potenciales de ionización y cálculos de  $pK_a$ .

El diseño de los métodos semiempíricos ha solucionado en mucho el problema de la extensión del tiempo computacional de los métodos *ab initio*. Las técnicas semiempíricas más comunes realizan los cálculos teniendo en cuenta en forma explícita solamente a los electrones de valencia (*All valence electrons*, AVE). El resto de los electrones se consideran dentro del centro o "core" molecular junto a los núcleos (no se calculan explícitamente).

Algunos métodos semiempíricos se parametrizan y ajustan a valores experimentales para reproducir algunos valores teóricos o experimentales. Algunas de las aproximaciones semiempíricas son AM1 (*Austin model 1*), MNDO (*modified neglect of diatomic overlap*), PM3 basados en MNDO y AM1, etc. En muchos casos con los métodos semiempíricos se obtienen resultados aceptables, sin embargo, con el avance en la tecnología de las computadoras cada vez más veloces, los métodos *ab initio* han cobrado mayor valor en la actualidad (Stewart, 1989; Stewart 1991). Un método *ab initio* alternativo que desarrollaremos más adelante (ver Sección 2.3) es la Teoría de funcionales de la Densidad (DFT), en el cual la energía total se expresa en términos de la densidad electrónica total, en vez de usar la función de onda.

En esta Tesis se utilizaron los conjuntos de bases tipo gaussianas contraídas de la serie 6-31G definida para los átomos comprendidos entre el H-Zn, 6-31G(6-311+G(3df,2p)), desarrollados por Pople y colaboradores (Hehre W. J., et al., 1986).

#### **2.2.4.2 Los orbitales frontera y su relación con las propiedades químicas**

Las especies químicas, átomos, iones y moléculas tienen orbitales periféricos que pueden considerarse como determinantes de sus propiedades químicas. Los orbitales de la capa de valencia juegan un rol importante en las propiedades de las sustancias. Se definen como el HOMO orbital ocupado de más alta energía (Highest Occupied Molecular Orbital) y el LUMO al orbital desocupado de más baja energía (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Estos orbitales determinan la formación o no de productos de acuerdo a la interacción de orbitales frontera y los orbitales de otra especie. El tipo de interacción y sus consecuencias dependen principalmente de la naturaleza de dichos orbitales; la teoría de los orbitales frontera permite relacionar la estructura electrónica de las especies con su reactividad.

Esto incluye predecir o explicar la estabilidad de las especies formadas, el mecanismo de la reacción y la forma geométrica de las especies finales, además de factores termodinámicos y cinéticos.

La interacción energética de los orbitales frontera HOMO y LUMO, permiten explicar la existencia de estados de transición que son intermediarios para la formación de un producto por medio de una estabilización energética del sistema o por el contrario la imposibilidad de la reacción.

En este sentido estos orbitales han sido utilizados para predecir por ejemplo parte del mecanismo de acción antioxidante, y se los ha relacionado con otras propiedades como el potencial de ionización (PI) de acuerdo al teorema de Koopman`s (Alov P. et al.; 2015) (ver ecuación 2.20):

$$IP = - E_{HOMO} \quad (2.20)$$

### 2.3 TEORÍA DE LOS FUNCIONALES DE DENSIDAD (DFT)

La teoría del funcional de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés) es un procedimiento computacional de cálculo elemental de máximos y mínimos de funciones reales de una variable, que se presenta como alternativa para la solución de la ecuación de Schrödinger, en el que el parámetro a optimizar es la densidad electrónica que relaciona la distribución probabilística de los electrones con la energía de un sistema. Los métodos de DFT proceden de la mecánica cuántica, concretamente del modelo Thomas-Fermi-Dirac (1920) y el trabajo fundamental de Slater (1950). Coloquialmente hablando un funcional es una función cuya variable es otra función.

La aproximación de la teoría del funcional de densidad se basa en la estrategia de introducir la correlación electrónica (interacción entre electrones en un sistema cuántico) usando funcionales de la densidad electrónica. Estos métodos usan el teorema de Hohenberg-Kohn, 1964 (Joubert D., 1998) en el cual se demuestra la existencia de un funcional que permite concluir que la energía del estado basal es funcional de la densidad electrónica. Un funcional es una función de una función (ecuación 2.21):

$$F = f(g) = f(g(r)) \quad \text{Donde } g = f(r) \text{ y } F[g] = \text{numero} \quad (2.21)$$

Se define a la densidad electrónica como el número de electrones (e-) por unidad de volumen en un estado dado, representada por:

$$\rho = \sum_{i=1}^N |\Psi_i(r)|^2$$

$$\text{Donde } \int \rho(r) d(r) = N \text{ en } r \equiv (x, y, z) \quad (2.22)$$

Por lo cual, los métodos DFT se basan en la premisa de que la energía de una molécula puede determinarse a partir de la densidad electrónica en lugar de usar la función de onda lo cual es computacionalmente mucho más eficiente, y se representa matemáticamente como (ecuación 2.23):

$$E = f(\rho) \quad \text{Donde E es un funcional de la densidad electrónica } (\rho) \quad (2.23)$$

Los métodos DFT más utilizados en nuestros procedimientos fueron:

- B3LYP. Este es un típico funcional híbrido global que tiene aproximadamente un 20% de HF para la energía de intercambio, implementa los tres parámetros de Becke y Lee-Yang-Parr. La expresión de energía de intercambio mecánico-cuántica tiene la forma siguiente (ecuación 2.24) (Romano R. et al., 2002):

$$E_{\text{B3LYP}}^{\text{XC}} = (1-a) E_{\text{LSD}}^{\text{X}} + a E_{\lambda=0}^{\text{XC}} + B E_{\text{B88}}^{\text{X}} + c E_{\text{LYP}}^{\text{C}} + (1-c) E_{\text{LSD}}^{\text{C}} \quad (2.24)$$

Donde los valores de los coeficientes determinados por Becke son a=0,20, b=72, c=0.81.

- M06. Son funcionales desarrollados por Truhlar y Zhao para grupos principales aplicados al estudio de la termoquímica y cinética, interacciones no-covalentes, estados excitados y compuestos de transición. En total son cuatro funcionales: M06 (27% HF), M06-2X (54% de HF), M06-HF (100% HF) y M06-L (0% HF). Los tres primeros clasificados como funcionales híbridos meta-GGA y el funcional M06-L perteneciente a la familia de los funcionales puros. La energía híbrida de correlación de intercambio mecánocuántica se expresa según la ecuación 2.25 (Zhao Y., Truhlar D., 2008):

$$E_{XC}^{HYB} = x/100 E_X^{HF} + (1 - x/100) E_X^{DFT} + E_C^{DFT} \quad (2.25).$$

donde  $x$  es el porcentaje de intercambio HF (Hartree–Fock) en el funcional híbrido,  $E_X^{HF}$  es la energía de intercambio no-local HF,  $E_X^{DFT}$  es la energía de intercambio local DFT y  $E_C^{DFT}$  es la energía de correlación local DFT.

En la actualidad el avance en las tecnologías informáticas ha permitido aumentar la capacidad y la velocidad de cálculo. Hoy en día se realizan cálculos de sistemas complejos en pocas horas cosa impensable hace años atrás.

En esta Tesis se aplica para un set de polifenoles la Teoría Gaussian 4 (G4) (Curtiss L.A. et al., 1998), utilizando un funcional meta híbrido de correlación de intercambio denominado M06-2X, recomendado para cálculos de termoquímica, cinéticos, en caso de interacciones no covalentes, energías de excitación electrónica de valencia y estados de Rydberg, a su vez para su aplicación en la química organometálica e inorganometálica e interacciones no covalente (Zhao Y., Truhlar D.G., 2008).

La Teoría G4 formulada por Curtiss y colaboradores (Curtiss L. A., et al., 2005, Curtiss L. A., et al., 2007), se aplica para el cálculo de las energías moleculares de compuestos con átomos presentes en el primer periodo (Li-F), en el segundo periodo (Na-Cl) y los principales del tercer periodo (K, Ca, Ga-Cr). Este nuevo procedimiento teórico, que se basa en la teoría molecular *ab initio*, la cual presenta una desviación media absoluta de 3,4694 kJ/mol para 455 energías compuestas por entalpías de formación, potenciales de ionización, afinidades electrónicas, protónicas y energías de enlaces de hidrogeno evaluadas por G3/05 (Curtiss L. A., et al., 2007).

La teoría G4 está basada en una secuencia de cálculos de la energía del punto único de energía denominado en ingles single-point. Modifica a la teoría G3 de cinco maneras haciéndola más precisa. En primer lugar, se utiliza un procedimiento de extrapolación para obtener el límite de Hartree-Fock

para su inclusión en el cálculo total de energía. En segundo lugar, los sistemas de polarización se incrementan a 3d en los átomos de primera fila y en 4d en los átomos de la segunda fila, con re-optimización de los exponentes de este último. En tercer lugar, existe una sustitución de métodos para el más alto nivel de tratamiento de correlación (método de interacción de configuraciones denominado QCISDT se sustituye por el método de cluster acoplados CCSDT). En cuarto lugar, las geometrías optimizadas y energías de punto cero se obtienen con la densidad del funcional B3LYP. En quinto lugar, se añaden dos nuevas correcciones de nivel superior para tener en cuenta las deficiencias en los cálculos de energía (Curtiss L. A. et. al, 2005; Curtiss L.A., et. al, 2007).

## **2.4 MINIMIZACIÓN DE ENERGÍA / OPTIMIZACIÓN GEOMETRÍA**

La Minimización de la energía consiste en encontrar un conjunto de coordenadas atómicas que corresponden a un mínimo local de la función de energía molecular (tales como el modelo de energía potencial). Esto se hace mediante la aplicación de técnicas de optimización no lineales a gran escala para calcular una conformación (cerca de la geometría de partida) para la cual las fuerzas sobre los átomos son cero.

La optimización de la geometría requiere en primer lugar una estructura molecular de estudio, que permite conocer dos de las propiedades moleculares como la energía y la geometría y para ello se necesita una estructura bien definida con una geometría de partida, construida con base en reportes científicos e intuición química. Luego se tiene en cuenta algunas consideraciones tales como: la energía de un sistema es función de su geometría y de acuerdo a esta se presentan diferentes grados de libertad (conformaciones).

Dado que las moléculas por lo general contienen varios átomos y se requieren muchos parámetros para describir la geometría, es difícil calcular y dibujar este tipo de superficies, por lo tanto por medio de una aproximación es posible visualizar una superficie tridimensional como una sábana de crestas y valles, que son puntos estacionarios.

Durante la realización de los cálculos de la mejor geometría molecular se obtienen valores de energía para cada conformación, los cuales varían según el estado de rotación de los enlaces químicos. Para los estados de transición se obtienen valores que equivalen a máximos de la función energética, mientras los valores más bajos corresponden a mínimos locales o globales en función de su geometría. La optimización geométrica es una técnica del modelamiento molecular, cuyo objetivo es obtener las conformaciones estructurales de más baja energía por medio de la determinación de los puntos críticos de la función de la energía potencial frente a las rotaciones de los enlaces químicos que forman la molécula.

## **2.5 ANCLAJE MOLECULAR (*DOCKING*)**

El cálculo de anclaje molecular o “docking” es un procedimiento utilizado para evaluar las posibles orientaciones o poses de uno o varios ligandos (que se encuentran generalmente en una base de datos) en el sitio activo del receptor, el cual brinda como resultado los puntajes o “score”, que corresponden a las energías de interacción que tienen las diferentes poses del ligando con el receptor.

La búsqueda generalmente se limita a regiones específicas del receptor. El poder predictivo del *docking* se ve correlacionado con los grados de libertad rotacionales de cada ligando ensayado, teniendo mejores resultados con aquellas moléculas que tengan una flexibilidad limitada.

Para iniciar el *docking* se debe tener la estructura tridimensional del posible receptor (en este caso, una proteína) en la cual se requiere identificar las poses de los ligandos. Esta estructura debe ser preparada con anterioridad, estableciendo el campo de fuerza a utilizar. Un campo de fuerza es una función, la cual corresponde a la suma de una serie de términos que modelizan las tensiones de los enlaces, los ángulos, las torsiones, las interacciones de van del Waals, electrostáticas y de enlaces de hidrogeno. En este caso se utilizó un campo de fuerza específico para proteínas, llamado “AMBER 99”.

Docking requiere establecer la metodología de posicionamiento de los ligandos, la cual realiza una variedad de poses para interactuar con el receptor. Y se elige aquella que mejor represente el modelo en cuanto a la energía (tomando el valor de score) y a la distancia con el ligando en el cristal elegido (RMSD).

### 2.5.1 Posicionamiento “*Placement*”

La metodología utilizada para la evaluación del *placement* fueron “*Alpha Triangle*” y “*Triangle Matcher*”, que superponen un triplete de átomos y triplete de puntos del ligando en el sitio activo del receptor con determinadas características estructurales. Estos puntos son los llamados centros de alfa esferas, utilizadas para limitar la enorme cantidad de orientaciones posibles dentro del sitio de interacción.

### 2.5.2 Funciones de puntuación “*score*”

A las diferentes poses entregadas por las metodologías de posicionamiento, se les determina el “score” o puntaje por diversos métodos de evaluación, expresados en kJ/mol. En este caso se utilizaron dos tipos: “Affinity  $\Delta G$ ” el cual estima la contribución entálpica de energía libre, utilizando una combinación lineal de los siguientes términos (ecuación 2.26):

$$G = C_{hb}f_{hb} + C_{ion}f_{ion} + C_{mlig}f_{mlig} + C_{hh}f_{hh} + C_{hp}f_{hp} + C_{aa}f_{aa} \quad (2.26)$$

Donde los términos *f* describen aportes específicos a la energía libre y los *C* son coeficientes que pesan las contribuciones de la afinidad estimada (Edelsbrunner, Weighted Alpha Shapes). Los términos individuales son: *hb*: Interacciones entre pares dadores y aceptores de hidrógeno, *ion*: Interacciones iónicas del tipo Coulombicas. Esto puede sumar o restar, según el caso, a la energía de unión, *mlig*: interacciones entre Nitrógenos o Azufres y metales de transición, *hh*: interacciones hidrofóbicas, *hp*: interacciones entre átomos polares e hidrofóbicos. Estas interacciones en general son desfavorables, *aa*: interacciones entre cualquiera de dos átomos. Esta interacción es débil y en general favorable.

“London  $\Delta G$ ” Esta función de puntuación estima la energía libre de unión del ligando de una determinada pose. La forma funcional es una suma de los siguientes términos (ecuación 2.27):

$$\Delta G = c + E_{flex} + \sum_{h-bonds} c_{HB} f_{HB} + \sum_{m-lig} c_M f_M + \sum_{atoms\ i} \Delta D_i \quad (2.27)$$

Donde  $c$  representa el promedio de la ganancia / pérdida de la entropía de rotación y de traslación;  $E_{flex}$  es la energía debido a la pérdida de flexibilidad del ligando (calculado a partir de la topología de ligando solamente);  $f_{HB}$  mide imperfecciones geométricas de enlaces de hidrógeno y tiene un valor en  $[0,1]$ ;  $C_{HB}$  es la energía de un enlace de hidrógeno ideal;  $f_M$  mide imperfecciones geométricas de interacciones de metal y tiene un valor en  $[0,1]$ ;  $C_M$  es la energía de una ligadura de metal ideal; y  $D_i$  es la energía desolvatación de  $i$  átomo.

Los coeficientes  $\{c, C_{HB}, C_M, c_i\}$  son promedio de  $\sim 400$  estructuras cristalinas de rayos X de los complejos proteína-ligando con los datos de  $pK_i$  experimentales disponibles.

### 2.5.3 Interacciones ligando-receptor

El diagrama se obtiene seleccionado al ligando como la pieza central, se dibuja con un estilo esquemático tradicional para moléculas. Una selección de las entidades que interactúan incluye los residuos con enlaces de hidrógeno, residuos cercanos, residuos no enlazantes, las moléculas de solvente e iones que son atraídos por el ligando. Este diagrama muestra posiciones en 2D que se eligen para representar las distancias 3D observadas, así como también consideraciones estéricas y propiedades adicionales como superficie accesible al solvente.

### 2.5.4 Mapas de Superficies Moleculares

La aplicación “Superficies y Mapas” se utiliza para generar representaciones visuales de superficies moleculares, y se puede utilizar para predecir los lugares preferidos de átomos de ligando (en ausencia del ligando en sí). La aplicación Superficies y mapas es capaz de calcular una serie de superficies moleculares - superficies cercanas a la de van der Waals o superficies accesibles al solvente de una molécula.

La superficie molecular es una aproximación a la superficie del solvente excluido, ampliamente conocida como la superficie Connolly. Esta superficie encierra el volumen del que se excluye una sonda tipo esfera (generalmente con radio de 1.4Å de agua) cuando rueda sobre una molécula. Si los átomos de la molécula se representan como esferas que tienen radios de van der Waals, entonces el volumen de esfera del solvente-excluido comprende estos volúmenes más las regiones en el medio que son demasiado pequeñas para encajar en la sonda [Connolly 1996]. Las superficies de las regiones entre los átomos vecinos son concavidades lisas, y se refieren a veces como re-entrante [Lee 1971] [Richards 1977]. La superficie de solvente excluido está relacionada con la superficie accesible, que es la superficie trazada por el centro de una esfera que sondea sobre los átomos de la molécula. En contraste con la superficie de reentrada, la superficie accesible, tiene valles afilados donde la superficie de la sonda toca esferas de van der Waals de dos o más átomos.

El MOE utiliza el método de conjuntos de nivel propuesto por Sethian [Sethian 1998]. Este método es basado en grillas y es considerablemente más rápido que los enfoques analíticos.

## **2.6 IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN DE FENOLES POR “*SITE FINDER*”**

El buscador de sitios o “*Site Finder*” es una aplicación del programa MOE cuyo propósito es hallar posibles sitios activos en un receptor a partir de sus coordenadas atómicas cristalográficas 3D. Tal cálculo es útil, por ejemplo, para experimentos de mutagénesis dirigidas, ayudar a determinar sitios potenciales para la unión de ligandos por “docking”, para el diseño de superficies moleculares parciales, etc.

Este método pertenece a la categoría de los métodos geométricos donde las posiciones relativas y accesibilidad de los átomos del receptor son consideradas junto con una clasificación general de tipo químico. La metodología Site Finder en MOE se basa en “alpha spheres”, que es una generalización del modelo de casquetes convexos desarrollados por Edelsbrunner (Edelsbrunner, 1995).

Una esfera alfa es una esfera que mantiene contacto con 4 átomos en su frontera y sin contener ningún átomo en su interior. Cada alfa esfera es única, ya que ninguna otra puede contactar con los mismos cuatro átomos. Las esferas muy pequeñas identifican el interior de la proteína, las grandes corresponden al exterior, mientras que las esferas de tamaño mediano se encuentran en los bolsillos y las cavidades de la proteína, los cuales son candidatos potenciales para la ubicación de un sitio activo. Los sitios activos en las proteínas son generalmente bolsillos hidrofóbicos que involucran a los átomos de cadena lateral.

*Site Finder* calcula en primer lugar una colección de todas las alfa esferas. La colección de éstas se limpia, eliminando las regiones inaccesibles correspondientes al interior del receptor, así como aquellas que están expuestas a solvente. Sólo se mantienen las esferas que correspondan a lugares de ensamblaje atómico estricto en el receptor. Luego, cada alfa esfera se clasifica como “hidrofóbica” o “hidrofílica”, dependiendo de si la esfera está en un lugar de enlace de hidrógeno en el receptor. Las alfa esferas se agrupan mediante algoritmos, para producir una colección de sitios. Cada sitio se compone de varias alfa esferas, al menos, uno de los cuales es hidrofóbico. Solo se mantienen las agrupaciones de un tamaño determinado, tanto en términos del número de esferas y en la medida geométrica. Por último, los sitios se clasifican según el número de contactos hidrofóbicos realizados con el receptor, es decir, el número de átomos hidrofóbicos dentro de una distancia de contacto de cualquiera de las alfa esferas.

## **2.7 MODELOS FARMACOFÓRICOS**

El farmacóforo fue definido por Paul Ehrlich en 1909 como "una unidad central molecular que transporta (phoros) los rasgos esenciales responsables para la actividad biológica" de una droga

(=pharmacon) (Ehrlich P., 1909). La definición de la IUPAC de un farmacóforo es "un conjunto de rasgos estéricos y electrónicos que es necesario para asegurar las óptimas interacciones supramoleculares con un blanco biológico específico y para gatillar (o bloquear) su respuesta biológica", (Wermuth C.G. et al.1998).

Se define farmacóforo como aquella parte de la molécula responsable de la acción. La herramienta implementada en MOE para la derivación de farmacóforos supone una de las aproximaciones más sencillas para la generación de hipótesis, ya que la generación del modelo es manual, e incorpora de forma automatizada la flexibilidad conformacional en la formulación de la hipótesis. Tanto la molécula sobre las que se genera la hipótesis farmacofórica (por ejemplo en esta Tesis se utilizó el ligando del cristal utilizado), como las de la base de datos de búsqueda se caracterizan según un esquema farmacofórico, que incluye el modo de anotación de los ligandos, es decir, aquellos puntos en el espacio donde se indica la ausencia/presencia de una determinada característica o *feature* farmacofórica. Los esquemas farmacofóricos disponibles en MOE, descritos según el motivo *Polarity-Charge-Hydrophobicity* (PCH), son varios, se eligió el esquema: PPCH el cual diferencia entre aceptores dadores de enlace de hidrógeno planos (sp<sup>2</sup>) o no (sp<sup>3</sup>) y entre áreas hidrofóbicas planos o no.

El proceso para generar la hipótesis o *query* parte de un conjunto de ligandos alineados. Este alineamiento inicial se obtuvo por superposición de las estructuras cristalográficas de los ligandos en el sitio activo de la proteína, a partir de los resultados de un *docking* en la proteína diana.

La hipótesis incluye restricciones acerca de una *feature* farmacofórica que un punto en el espacio debe satisfacer, dentro de un radio de tolerancia. Esta *feature* puede corresponder a un único punto de anotación del ligando (por ejemplo, que el átomo sea dador) o etiquetarse con una asignación múltiple como combinación de varios (por ejemplo, dador o aceptor). Se permite también la inclusión de restricciones sobre la forma de la molécula mediante la definición de volúmenes.

Una vez formulado el modelo farmacofórico, la búsqueda se realiza sobre la base de datos de polifenoles, cada una de las entradas de la base de datos se superpone de forma rígida sobre la hipótesis. Entonces,

se realiza el emparejamiento exhaustivo de todos los puntos de anotación del ligando con los puntos potenciales farmacofóricos (PPPs) del modelo. El resultado de la búsqueda refleja el cuadrado promedio de las distancias (RMSD) de la superposición entre los PPPs de la hipótesis y los puntos del ligando emparejados con ellos, por lo que puede ordenarse la base de datos en función de esta RMSD para comparar.

## **2.8 BASE DE POLIFENOLES**

El propósito de la preparación de datos 3D es hacer que los datos de entrada crudos de los ligandos 3D que puede contener errores, anotaciones que faltan, y posiblemente otras omisiones, queden listos para la experimentación computacional. Las operaciones típicas incluyen la enumeración de tautómeros y los estados de protonación, la normalización de la estructura molecular (por ejemplo, con respecto a patrones de unión) y, en algunos casos, el análisis conformacional. Un componente importante de la preparación de datos está filtrando compuestos no deseados – que puede reducir significativamente el tiempo de funcionamiento por la reducción del número de moléculas para procesar. De este modo, se puede eliminar moléculas indeseables o incluso químicamente imposibles, sirviendo así para el desorden de los datos.

Una base de datos de estructura 3D contiene coordenadas atómicas de datos y se utilizan para almacenar moléculas completas y fragmentos moleculares; en este último caso, la base de datos se refiere a menudo como una base de datos de fragmentos. Todas las bases de datos de estructura 3D se preparan esencialmente de la misma manera, con diferencias menores en los ajustes de parámetros entre las moléculas enteras y/o fragmentos.

Los datos de entrada utilizados para generar una base de datos estructura 3D normalmente se originan con algún editor para la construcción molecular o con archivos en formato de texto ASCII (Código Estándar Estadounidense para el Intercambio de Información) para almacenar moderadamente un gran

número de pequeñas moléculas (ligandos). La fuente de datos también puede ser un texto de formato SMILES (sus siglas en inglés significan especificación de introducción lineal molecular simplificada: Simplified Molecular Input Line Entry Specification) o una base de datos MOE.

Para la construcción de la base de fenoles usada en esta Tesis, se tomaron 123 estructuras fenólicas identificados en propóleos y orujos de uva (Paulino et al, 2010; Silva et al 2011; Falcão et al 2010; Alencar et al, 2007; Boido et al 2006), se modelaron mediante una herramienta de construcción denominada “*builder*”, y se refinaron las estructuras por medio de minimización de energía empleando el campo de fuerzas MMFF94x (Halgren, 1999). Para la optimización se utilizó el hamiltoniano semiempírico PM3 (Stewart, 1989). Las cargas y otros parámetros de campo de fuerza fueron evaluados para asegurar una parametrización adecuada.

Se añadieron los nombres comunes, tiempo de retención cromatográfico y códigos SMILES. Este código es una especificación para describir sin ambigüedades la estructura de una molécula usando cadenas ASCII cortas. La familia de moléculas fenólicas de la base se clasificó en siete subclases estructurales: ácidos fenólicos, flavonas, flavanonas, flavonoles, estilbenos, antocianinas y procianidinas.

## **2.9 DESCRIPTORES MOLECULARES Y DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS**

### **2.9.1 Hidrofobicidad $\log P(o/w)$**

Como descriptor de hidrofobicidad hemos usado el coeficiente de reparto octanol /agua denominado  $\log P(o/w)$ . Es el descriptor más recurrido para estudiar efectos hidrofóbicos, junto con el parámetro de hidrofobicidad  $p$  desarrollado por Hansch. Existen varios modelos para calcularlo, normalmente por modelos fragmentales, donde se adicionan contribuciones atómicas, definidas para cada tipo de átomo e hibridación. Es un modelo lineal basado en tipos atómicos ajustado sobre un set de moléculas.

## 2.9.2 Índice de Lipinski

En nuestra base de fenoles agregamos a este descriptor estructural. Este índice es un concepto cualitativo utilizado en el diseño de fármacos para saber qué tan biodisponible será esa droga y se la puede estimar a partir de la estructura molecular antes de que la sustancia sea sintetizada y testeada *in vivo*. Es una estimación y no evalúa el efecto específico real que alcanza el fármaco (actividad biológica). Se trata del cumplimiento de la Regla de los Cinco de Lipinski (Lipinski C., 1997; Lipinski C.A, 2001). La regla de Lipinski de los Cinco es una regla para determinar si un compuesto químico con una cierta actividad farmacológica o biológica tiene propiedades que lo haría un fármaco activo por vía oral probablemente en los seres humanos. Se describen las propiedades moleculares importantes para la farmacocinética, incluyendo absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). Sin embargo, no predice si un compuesto es farmacológicamente activo.

Durante la última década esta herramienta ha dado lugar a nuevas investigaciones ampliando las herramientas de perfilado de propiedades de los compuestos con la esperanza del descubrimiento temprano de compuestos y ahorrando tiempo y costos.

## 2.9.3 Descriptores electrónicos

Se han elegido descriptores electrónicos que evalúen la reactividad de la molécula para formar el radical libre para la mejor comprensión de los mecanismos de acción antioxidante planteados. Se ha utilizado en esta Tesis los orbitales frontera que se describen a continuación.

### 2.9.3.1 Orbital HOMO

Es un descriptor que mide la nucleofilia (reactividad) del compuesto. Se evaluaron los valores energéticos de los HOMO (orbital ocupado de más alta energía (Highest Occupied Molecular Orbital)) en KJ/mol por medio del Hamiltoniano semiempíricos PM3 y por funcionales de densidad DFT (M06-2X / 6-311 + G (3df, 2p)).

### **2.9.3.2 Energía de Disociación de enlace O-H (BDE)**

Las entalpías de Disociación del enlace O-H (BDE) fueron evaluadas por el Hamiltoniano semiempírico PM3 y por funcionales de densidad DFT (M06-2X / 6-311 + G (3df, 2p)) (Truhlar, 2008; Ditchfeld R. y Hehre WJ, 1971; Curtiss A, 2007). El rendimiento de la última metodología se evaluó mediante cálculos G4 en el OH BDE de los dos grupos OH del ácido p-cumárico. Los cálculos M06-2X y G4 se realizaron con el paquete computacional Gaussian 2009 (J. Frisch 2009).

## I c - BLANCOS ENZIMÁTICOS

### 3.1 XANTINA OXIDASA

La xantina oxidoreductasa (XOR) es una molibdoflavoenzima que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (desde micro organismos hasta el ser humano). Existe bajo dos formas funcionales distintas: la xantina deshidrogenasa NAD<sup>+</sup>-dependiente (XDH) que utiliza como aceptor de electrones el NAD<sup>+</sup> durante la oxidación de la hipoxantina, produciendo NADH y urato. La misma puede ser transformada en xantina oxidasa, oxígeno dependiente (XO) que utiliza el O<sub>2</sub> como aceptor de electrones formando el radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y/o peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y urato (Parks, D. A., and Granger, D. N., 1986).

En tejidos de mamíferos se la localiza mayoritariamente en hígado, intestino y también en sangre y corazón. Su principal función a nivel fisiológico, es que cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina en ácido úrico. El ácido úrico, es el producto final del catabolismo de las bases purínicas en el hombre y primates (Saksela M. y Raivio K. O., 1996).

*In vivo*, la enzima se encuentra fundamentalmente un 80% bajo la forma XDH (Saksela M. y Raivio K. O., 1996). La XDH se puede convertir en oxidasa mediante la oxidación de grupos sulfhidrilos de manera reversible o mediante proteólisis limitada por tripsina y quimiotripsina, de manera irreversible. Este último proceso está catalizado por una proteasa calcio dependiente que libera un péptido de unos 20KD de cada subunidad (Della Corte, E., y Stirpe, F., 1968). La hipoxia y algunos factores de necrosis tumoral pueden ocasionar la transformación de XDH a XO (Parks, D. A., and Granger, D. N., 1986). Además, algunos mediadores de la inflamación como el factor de necrosis tumoral también producen una conversión de la forma deshidrogenasa en la forma oxidasa.

La enzima es target de fármacos contra la gota y la hiperuricemia y sobre todo la conversión de XDH a XO es de gran interés, ya que ha sido implicada en enfermedades caracterizadas por daño tisular inducido por radicales oxígenos, tal como la lesión por reperfusión postisquémica (Enroth C. et al, 2000).

La gota es una enfermedad producida por una acumulación de cristales de urato monosódico (sal derivada de ácido úrico) en distintas partes del cuerpo, sobre todo en las articulaciones, tejidos blandos y riñones. Se manifiesta por una artritis que causa intenso dolor y enrojecimiento en la articulación metatarsfalángica del dedo gordo del pie. El factor fundamental que causa la gota es la hiperuricemia (elevación de los niveles de ácido úrico en sangre). Los dos motivos principales por los que son demasiado altos los niveles de ácido úrico en sangre son el aumento de su producción por el organismo y la disminución de su eliminación por el riñón. La gota es uno de los trastornos metabólicos más comunes que afectan los seres humanos y es considerada una de las condiciones inflamatorias más dolorosas que los seres humanos pueden experimentar. A nivel mundial se han registrado datos sobre la incidencia de estas patologías (hiperuricemia y la gota) y se ha visto un aumento gradual debido a un mayor consumo de alcohol, carne y mariscos en China, y en los Estados Unidos, se manifiesta en 840 de cada 100000 personas.

La hiperuricemia y pueden aumentar el riesgo del desarrollo de la hipertensión, hiperlipidemia, cáncer, diabetes y obesidad. Los actuales medicamentos para el tratamiento de la gota (antigotosos), tales como el alopurinol, sulfinpirazona y probenecid, fueron desarrollados en los años 1950 y 1960. Aunque el alopurinol es el más conocido, presenta algunas preocupaciones sobre su toxicidad como ser, incluyendo nefritis intersticial, insuficiencia renal, toxicidad hepática, vasculitis, diferentes grados de erupciones en la piel, así como un síndrome de hipersensibilidad. Sulfinpirazona y probenecid, también causan en pacientes un leve a moderado deterioro de la función renal (Ya-Di Li et al, 2013).

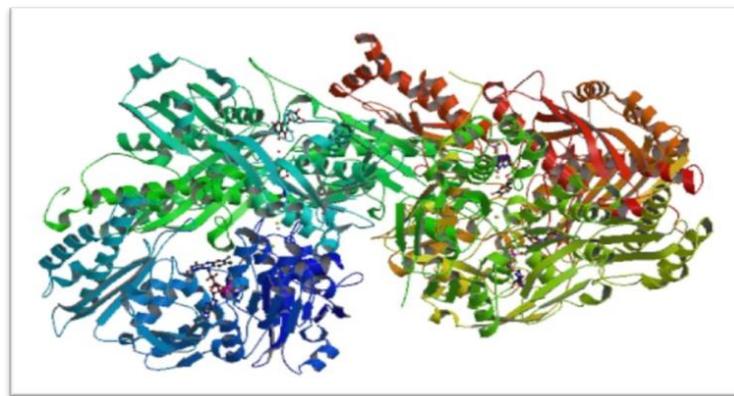
En las últimas décadas se ha trabajado mucho en la búsqueda de compuestos extraídos de productos naturales que puedan actuar como posibles agentes terapéuticos y que minimicen todos aquellos efectos colaterales tóxicos para la salud humana. Este es el caso de los flavonoides que se consideran componentes importantes en la dieta humana debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud humana.

La mayor parte de las propiedades terapéuticas de los flavonoides se han atribuido a su acción como antioxidantes e inhibidores enzimáticos (Havsteen B.H., 2002). Entre ellos se han descrito como inhibidores de la enzima XO similares hasta mejores que el alopurinol en el tratamiento de la gota, como lo revelo la bibliografía mostrando a la baicaleina, robinetina, y la 3,6-dimetoxiapigenina como los más potentes inhibidores de XO, en tanto la luteolina, diosmetina, quercetina, y naringenina presentaron altos valores de inhibición todos ellos mayores que el alopurinol (Hayashi et al. 1988). Por esta razón, la

investigación de obtener un posible antigotoso a partir de polifenoles de productos naturales parece prometedora.

### 3.1.1 Estructura molecular y mecanismo de acción de la xantina oxidasa.

Estructuralmente, como se mencionó anteriormente, pertenece a una de las 2 formas funcionales de la molibdo flavoenzima xantina oxidoreductasa (XOR), distribuida ampliamente en diversas especies, observándose un 90% de similitud entre XO humana y XO de la glándula mamaria de bovino (Enroth C. et al, 2000), (Figura 14).



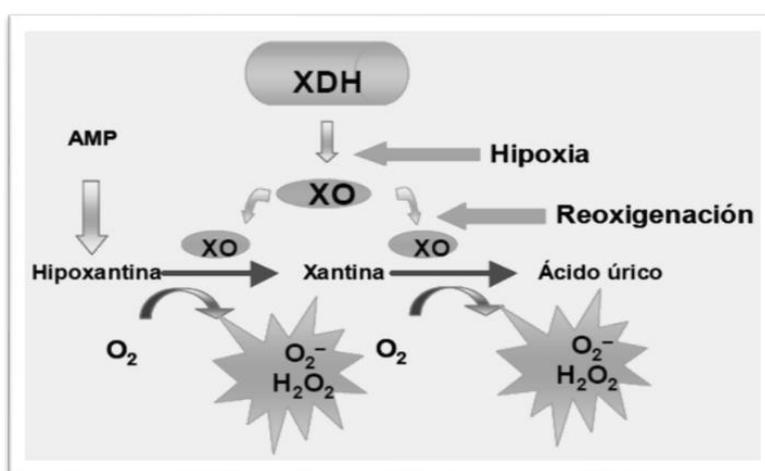
**Figura 14.** Estructura molecular de la XO de bovino en complejo con quercetina modelada a partir del cristal PDBid: 3NVY.

XOR es un homodímero que consiste de dos monómeros de 155 kDa, Cada monómero contiene un dominio N-terminal de 20 kDa con dos centros Fe-S, un dominio intermedio de 40 kDa que contiene al dinucleótido de flavinadenina (FAD) y un dominio C-terminal de 85 kDa que contiene al molibdeno cofactor (Mo-Co) y el sitio de unión al sustrato (Enroth C. et al, 2000). Los centros Fe-S se denominan como Fe-S I y Fe-S II, lo cual dependerá de la distancia que lo separe de Mo-Co. El dominio FAD corresponde a una profunda hendidura donde se localiza la molécula de FAD. El cofactor molibdeno (Mo-Co), es el dominio con el que interaccionan los sustratos, considerándose como el sitio de unión al sustrato o sitio catalítico de la enzima (Mendoza, 2005).

La XOR se encuentra principalmente como xantina deshidrogenasa (XDH) en la célula, sin embargo puede convertirse rápidamente a XO, encontrándose en tejido sano alrededor de un 10-30%. La conversión de XDH a XO puede ser reversible o irreversible. La conversión reversible ocurre por la

oxidación de los grupos sulfhidrilos de la enzima, y la conversión reversible se lleva a cabo mediante proteólisis parcial de la enzima (Mendoza, 2005).

La principal función de XO es su participación en la degradación de purinas (Figura 15), utilizando hipoxantina y oxígeno para dar lugar a xantina, radical superóxido y peróxido de hidrógeno, a su vez xantina de igual forma es convertida a ácido úrico. También se ha observado que XO cataliza la reacción de reducción de nitritos a  $\text{NO}^{\bullet}$  en condiciones de hipoxia. Debido a la generación de estos radicales libres es que XO corresponde a una de las principales fuentes generadoras de radicales libres.



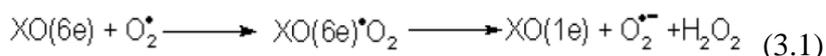
**Figura 15.** Degradación de las purinas por XO.

El papel fisiológico de la enzima reside principalmente en su implicación en el catabolismo purínico. Al final de éste catabolismo, se produce ácido úrico, que se postula como un importante agente antioxidante. La concentración plasmática de ácido úrico en humanos es mucho más alta que en otros primates dado que tenemos inactivada la urato oxidasa (uricasa).

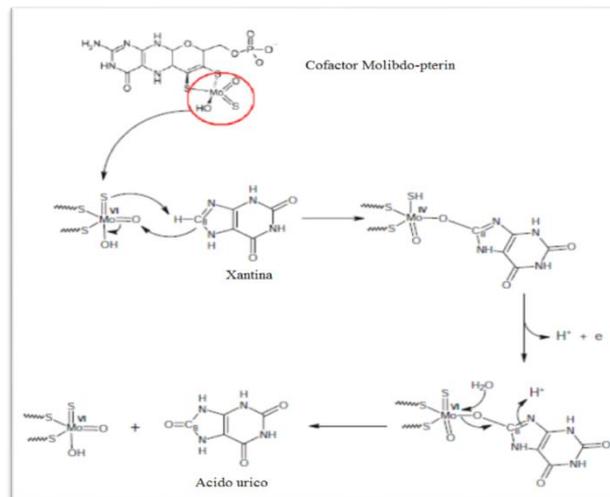
La actividad catalítica de la enzima está dada por su estructura. La clase de molibdopterinas (molibdo-flavoenzimas o molibdo-proteínas) poseen como elemento central en la estructura el Molibdeno (Mo). Como cofactor contienen a la pterina, molécula que se encarga de coordinar el enlace ditiol (Mo-S). El conjunto del centro molibdénico con la pterina se conoce como Molibdopterina (Molybdopterin- MPT) o como cofactor Molibdeno (Mo-Co) (Hille, 2006). La XOR es una enzima con actividad pro y antioxidante, de ahí su importancia fisiológica y fisiopatológica, siendo indispensable en la homeostasis

del organismo humano. El sitio activo de XO se encuentra en la cadena C terminal de la enzima y está compuesto por una unidad de molibdopterina, átomos de azufre y un hidroxilo terminal.

El mecanismo de acción de xantina oxidasa consta de dos reacciones catalíticas, una reductora y otra oxidativa. La reductora, es a través de la cual se produce la reducción de xantina a ácido úrico, esta reacción ocurre a nivel del centro molibdeno de la enzima, en donde Mo (VI) es convertido a su forma reducida Mo (IV). La oxidativa tiene lugar a nivel del centro FAD, en donde se oxida Mo (IV) a Mo (VI) por el oxígeno molecular, con la formación de  $2O^-$  o  $H_2O_2$  (Alnajjar, 2008). La reacción de oxidación consiste en la unión de oxígeno molecular al centro FAD con participación de los centros Fe/S (que actúan como reservorios de electrones), con  $O_2$  y  $NAD^+$  que sirven como aceptores de electrones para las formas oxidasa y deshidrogenasa de la enzima, respectivamente. Esto da lugar a la transferencia de electrones a XO, logrando la oxidación de ésta y a la vez la producción de superóxido y peróxido de hidrogeno (Ecuación 3.1):

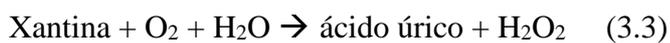
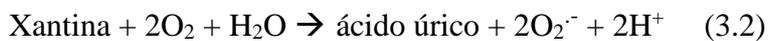


En cuanto a la reacción catalítica de XO, se encontraron algunas propuestas del mecanismo (Alnajjar, 2008), que difieren tanto en la fuente como en la forma de incorporación del átomo de oxígeno, pero concordando en que ocurre la hidroxilación de C-8 de xantina. Se ha observado que el átomo de oxígeno incorporado a xantina, se obtiene del Mo-Co, el que posteriormente es regenerado por una molécula de agua. Uno de los mecanismos propuestos señala que ocurre una desprotonación en la posición C-8 de xantina, seguido de un ataque nucleofílico del carbanión resultante en el Mo (VI)=O para dar Mo (IV)-O-R (Figura 16).



**Figura 16.** Mecanismo de acción de XO convirtiendo xantina en ácido úrico propuesto por Hille and Sprecher, 1987.

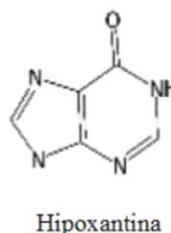
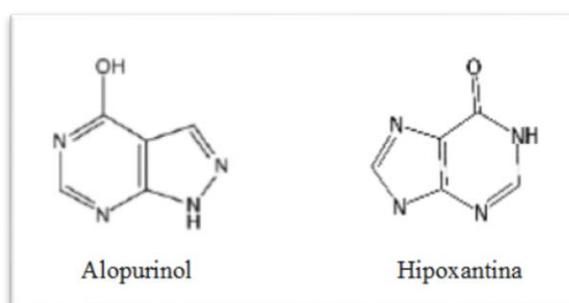
En su mecanismo de acción nivel molecular enzima XO cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina en ácido úrico. Durante la re-oxidación de xantina oxidasa, el oxígeno molecular actúa como aceptor de electrones, produciendo superóxido de hidrógeno y el radical peróxido. Estas reacciones se pueden describir de manera general como (ecuaciones 3.2, 3.3):



En consecuencia, la XO se considera que es una fuente biológica importante de radicales superóxido. Por lo cual inhibiendo a la XO se podría reducir la generación de radicales libres del tipo ROS en nuestro organismo al menos por esta vía metabólica.

### 3.1.2 Xantina oxidasa como blanco enzimático de la actividad antioxidante de los polifenoles. Relación estructura actividad antioxidante de los polifenoles.

El principal inhibidor alostérico de xantina oxidasa usado en la terapia de la gota es el alopurinol (Figura 17), un análogo estructural de hipoxantina. Esta unión al sustrato y la consecuente oxidación, tienen lugar en el centro Mo (Mo-pt), bloqueando el acercamiento del sustrato.



**Figura 17.** Estructuras químicas de alopurinol e hipoxantina.

La inhibición de XO por polifenoles es comúnmente de tipo competitiva, ya que se debe principalmente a la unión de ciertas moléculas al sitio catalítico de la enzima (Mo-Co), provocando un impedimento para el ingreso del sustrato de ésta, ya sea hipoxantina o xantina (Cao H. et al 2014; Cos P et al., 1998). En consecuencia al bloquear el ingreso del sustrato, también se inhibe la generación de aquellos radicales libres producidos por esta vía.

Esta inhibición se debe en principio a su similitud estructural y/o electrónica entre el anillo A de los flavonoides y el anillo de purina (hipoxantina, xantina o ácido úrico). Varios autores han investigado la influencia de la naturaleza sustituyente y su posición en el grado de inhibición de la xantina oxidasa en algunos flavonoides (Cos P et al., 1998).

Entre los requisitos estructurales favorables para la inhibición en ese sitio de la XO, se encuentran: la presencia de la estructura benzo- $\gamma$ -pirona, que actúa como un antioxidante en diversos sistemas biológicos, la presencia de grupos hidroxilo libres en las posiciones 7, 3 y/o 5 en las estructuras de flavonoides (Cos et al., 1998), una estructura del tipo plana con presencia del doble enlace en C2-C3 del anillo C (Nagao et al. 1999) pero esta característica por sí sola no es suficiente sino que debe ir

acompañada de la presencia de por lo menos un grupo hidroxilo (OH) en el anillo A o B pero la adición de un segundo OH podría disminuir notoriamente la inhibición.

En este trabajo se analizó la estructura cristalina de la XO en complejo con quercetina cuya resolución fue de 2,0 Å (PDBid: 3NVY). Se encontró que el modo de unión de la quercetina en este cristal es mediante interacciones del tipo  $\pi$ - $\pi$  entre su resto benzopirano intercalado entre los residuos de fenilalanina conservados Phe 914 y Phe 1009, y el anillo B apuntando hacia el canal de solvente que conduce al centro activo de molibdeno. Además la presencia de interacciones específicas de enlaces de hidrógeno con los residuos catalíticos Arg 880 y Glu 802, correlaciona bien con la relación estructura-actividad informada antes en bibliografía (Cao H. et al 2014). Este complejo XO-quercetina proporciona una base estructural para el diseño racional de inhibidores de tipo flavonoide contra la xantina oxidasa útiles para el tratamiento de la hiperuricemia, la gota y estados de enfermedad inflamatorios.

## **3.2 CICLOOXIGENASAS.**

### **3.2.1 La inflamación y el rol de la ciclooxigenasa.**

Los organismos vivos están inmersos en un ambiente determinado del cual reciben estímulos en todo momento. Un estímulo es cualquier agente benéfico o perjudicial capaz de cambiar el comportamiento de un ser vivo, así como producir lesiones celulares. Estos estímulos pueden dar lugar a una reacción compleja en el tejido conectivo que se denomina inflamación. El proceso inflamatorio se caracteriza por la reacción de los vasos sanguíneos, que da lugar a la acumulación de líquido y leucocitos en los tejidos extravasculares que causan enrojecimiento, tumefacción, calor y dolor, así como la pérdida de la función del tejido, (Marnett et. al, 1999). Normalmente, la inflamación termina cuando se elimina el estímulo lesivo y desaparecen o se inhiben los mediadores inflamatorios.

Entre los mediadores de la inflamación encontramos las prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, histamina, serotonina, citoquinas y interleuquinas, entre otros como el ácido araquidónico (AA), el cual es liberado por células bajo procesos de stress o muerte celular (necrosis) y cumple un papel importante en desarrollo de la respuesta inflamatoria.

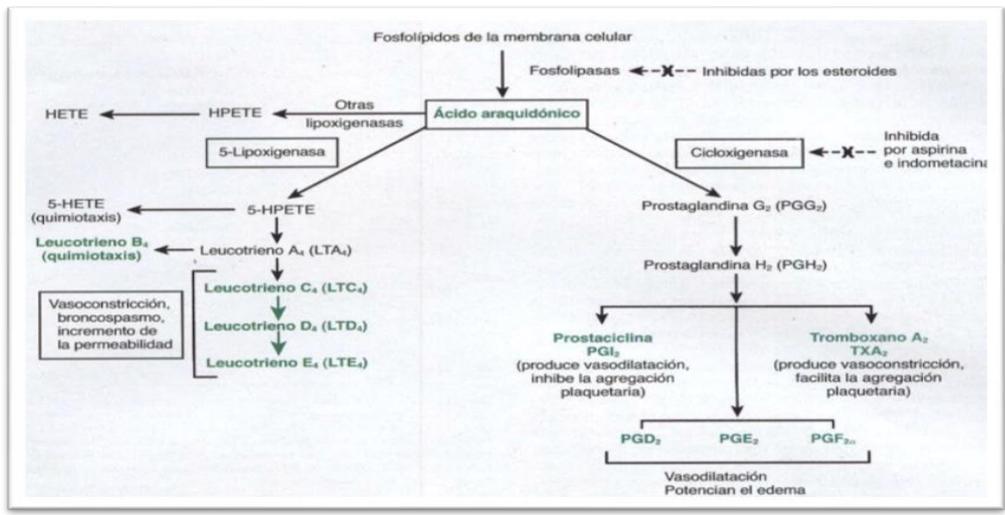
La enzima ciclooxigenasa (COX) cataliza la conversión de ácido araquidónico (AA) en un eicosanoide con características estructurales de endoperóxido cíclico (PGG<sub>2</sub>) (Marnett et. al, 1999). La prostanglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) es el primer intermediario en la vía enzimática de la COX. Bajo condiciones normales, es rápidamente metabolizada por la actividad peroxidasa intrínseca de las COX para dar PGH<sub>2</sub>, por medio de la reducción del grupo hidroperóxido del C15 a grupo hidroxilo (Blobaum, 2007). La PGH<sub>2</sub> es el precursor biosintético común de las prostaglandinas de la serie 2 y tromboxanos. Estos lípidos median la aparición de diferentes signos y síntomas como respuesta del sistema inmunológico frente a antígenos, entre ellas se encuentran, la fiebre, la inflamación, la homeostasis, la regulación de la función renal y el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica (Kurumbail, 2001).

El mecanismo inflamatorio de las reacciones de hipersensibilidad a sustancias potencialmente mortales como venenos de animales, fármacos o sustancias tóxicas, puede causar la necrosis del tejido. Algunas enfermedades crónicas como la artritis reumatoide, la aterosclerosis y la fibrosis pulmonar también pueden generar la muerte del tejido a partir de la respuesta inflamatoria. Los fármacos potenciales antiinflamatorios buscan controlar la respuesta inflamatoria, sin embargo al igual que otros medicamentos pueden tener contraindicaciones, que describiremos más adelante (Serhan C et al. 2010).

### **3.2.2 Funcionamiento de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)**

La actividad de la ciclooxigenasa (COX), también llamada Prostaglandina G/H sintetasa, resulta inhibida por un grupo de fármacos conocidos como AntiInflamatorios No Esteroideos o AINEs.

Los AINEs constituyen uno de los grupos de medicamentos más prescritos, con múltiples usos terapéuticos por sus efectos analgésicos, antipirético, antiinflamatorio y antiagregante plaquetario. Se usan para combatir el dolor, bajar la hinchazón y quitar la fiebre. Por ello, son el grupo de medicamentos más usados mundialmente para el tratamiento de estas dolencias (por ejemplo aspirina, ibuprofeno, diclofenac etc), y tienen la capacidad de inhibir las isoenzimas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). Estos medicamentos poseen algunas contraindicaciones, que generan la aparición de enfermedades como la úlcera péptica, la insuficiencia renal y alteraciones cardiovasculares, algunas de las graves que pueden ocasionar la muerte. (Figura 18).



**Figura 18.** Cascada de síntesis de productos del metabolismo del ácido araquidónico (AA) y sus efectos sobre el organismo humano.

Existen dos isoformas de COX en animales (Figura 19): COX-1 es constitutiva y mantiene una producción fisiológica normal de prostaglandinas, tiene funciones gástricas y renales homeostáticas y por otro lado COX-2, que es inducida por citoquinas, mitógenos y endotoxinas en células inflamatorias cuando nuestro organismo sufre alguna lesión, es la responsable de la producción de prostaglandinas en el proceso inflamatorio.

Las dos formas guardan un alto grado de homología entre ellas, en particular los cristales usados en esta Tesis (COX-1 pdb: 3LN1 y COX-2 pdb: 3KK6) presentaron un 64.7% de homología.

	<i>COX-1</i>	<i>COX-2</i>
Gen responsable	Cromosoma 9q32-33,3	Cromosoma 1q25,2-25,3
Nº aminoácidos	600-602	603-605
Tejido donde se expresa	Constitutiva mayoría tejidos. ↑↑ monocitos/macrófagos, plaquetas. TGI, riñón	Constitutiva: SNC, riñón Inducida: células endoteliales, fibroblastos, FML miometrial y vascular, cuádrucitos...
Localización intracelular	Reticulo endoplásmico	Reticulo endoplásmico y membrana nuclear
Inductores	Desconocidos	Inespecíficos: IL-1 (a y b), FNTa, endotoxina, FCE Específicos: lipoproteínas HDL, en FMLiisas, LH en ovario

IL: interleucinas; FNT: factor de necrosis tumoral; FCE: factor de crecimiento epidérmico; LH: hormona luteinizante.

**Figura 19.** Características generales de COX-1 y COX-2. Imagen extraída de la Revista de la Sociedad Española del Dolor 2005, 12(6) 357-372, autor Moreno-Brea M.R.

Los potenciales antiinflamatorios inhibidores de ciclooxigenasas conocidos actualmente actúan sobre los dos tipos (COX-1 y COX-2). Al actuar sobre COX-2 se bloquean los mediadores del dolor y la inflamación por medio de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos causando efectos antiinflamatorio, analgésico y antipirético.

La inhibición de COX-1 induce efectos colaterales como hemorragias gastrointestinales, úlceras y perforación de la mucosa gástrica. Los efectos perjudiciales en el aparato digestivo son los más frecuentes, fortuitos y pueden llegar a ser muy graves.

En cuanto a la inhibición selectiva de COX-2, puede traer problemas vasculares pues los tromboxanos no quedan inhibidos, como es el caso de algunos fármacos como el rofecoxib, celecoxib, traen aparejado efectos cardiacos graves causando algunas muertes, por lo que la FDA ha prohibido su uso (Głuszko P., Bielińska A., 2009), por lo que convendría en este caso que sea también un inhibidor leve de COX-1. Por lo que la búsqueda de selectividad y la modulación de estos efectos son cruciales para minimizar efectos secundarios nocivos para la salud. Para ello, se estudiara el mecanismo de acción de los polifenoles de nuestra base de datos, en COX 2 y su selectividad frente a su isoforma COX 1, como potenciales antiinflamatorios.

### **3.2.3 Estructura de las enzimas ciclooxigenasas**

La estructura de la COX-1 procedente de vesículas seminales de carnero se pudo resolver mediante cristalografía de rayos X en 1994. En el cristal aparece como un dímero, y en cada uno de los monómeros se pueden distinguir 3 dominios:

El primer dominio (residuos 33-72) forma un pequeño módulo compacto que es similar al factor de crecimiento epidérmico. El segundo dominio (residuos 73-116) forma una espiral en el sentido de las agujas del reloj de cuatro segmentos alfa-helicoidales a lo largo de una cara de la proteína. Este es el dominio de unión a la membrana. Los segmentos helicoidales son anfipáticos, con la mayor parte de sus residuos hidrofóbicos orientados hacia fuera de la proteína, donde pueden interactuar con una de las capas lipídicas de la membrana. El tercero (residuos 117-583) es el dominio catalítico, una estructura

globular que contiene los centros activos ciclooxigenasa y peroxidasa. El centro activo peroxidasa incluye un grupo hemo. El  $\text{Fe}^{3+}$  que se encuentra en el centro de este grupo hemo está coordinado por His-372, His-374, His-193 e His-200. El centro activo ciclooxigenasa se encuentra al fondo de un estrecho túnel o canal hidrofóbico. Tres de las hélices alfa del dominio de unión a la membrana están en la entrada de este túnel. Las paredes del túnel están definidas por cuatro hélices alfa, formadas por los residuos 106-123, 325-353, 379-384 y 520-535. Al fondo de este canal hidrofóbico se encuentra un importante residuo catalítico, la Tyr-385. La actividad peroxidasa hemo-dependiente está implicada en la formación de un radical Tyr-385, que es necesario para desempeñar la actividad ciclooxigenasa (Zarghi et. al, 2011).

El ácido acetil salicílico (AAS) y otros AINEs bloquean la síntesis de prostaglandinas bloqueando el túnel y previniendo la migración del ácido araquidónico hasta el centro activo. Se distinguen al menos cuatro mecanismos de acción diferentes para inhibir la actividad COX:

El AAS inhibe la COX de forma irreversible al acetilar el residuo de Ser 530 y dejar el resto de salicilato en el interior del túnel. El ibuprofeno actúa compitiendo de modo reversible por el sitio de unión al sustrato en el túnel. Flurbiprofeno e indometacina son miembros de una tercera clase de inhibidores que producen una inhibición lenta, tiempo-dependiente COX-1 y COX-2. En estos complejos es de destacar la interacción electrostática entre el grupo carboxilato de los inhibidores (cargado negativamente) y la Arg-120 (cargada positivamente) presente en el canal, y que supuestamente sirve para atraer al sustrato de ácido araquidónico durante la catálisis. La cavidad donde se unen estos inhibidores tradicionales a la COX-1 está limitada por la cadena lateral de la Ile-523.

La presencia de una valina en la COX-2 en la posición ocupada por Ile-523 en la COX-1 permite a algunos inhibidores (como la nimesulida) acceder a una cavidad adyacente al sitio activo y establecer interacciones adicionales con otros residuos de la enzima, por ejemplo la arginina que sustituye a la histidina en la posición 513. De este modo actuarían como inhibidores débiles de COX-1 pero inhiben la COX-2 de forma lenta y tiempo-dependiente. Con esta inhibición selectiva de COX-2 se esperaría que este tipo de fármacos sean capaces de bloquear la inflamación sin dar lugar a las toxicidades gastrointestinal y renal características de los AINEs tradicionales que probablemente son el resultado de la inhibición de la COX-1. Hoy en día se sabe que todos los fármacos antiinflamatorios inhibidores de

ciclooxigenasas, que se comercializan (por lo menos en nuestro país), tienen un efecto no deseado sobre COX-1.

#### **3.2.4 La ciclooxigenasa 2 (COX-2) como blanco de posible acción antiinflamatoria de los polifenoles.**

Existe evidencia científica (como se menciona en el Capítulo I apartado 1.9), que demuestra que flavonoides distribuidos en diversos alimentos y bebidas de origen vegetal, han sido reconocidos como una importante fuente de agentes terapéuticamente eficaces para varias enfermedades.

La quercetina y el kaempferol pueden inhibir mediadores del proceso inflamatorio tales como la proteína C reactiva o diversas moléculas de adhesión. A su vez intervienen como inhibidores de enzimas involucradas en los procesos inflamatorios como es el caso de miricetina, luteolina entre otros, uniéndose al sitio activo de la COX-2 (Ya-Di. Li et al., 2013). Entonces podemos usar a los polifenoles del tipo flavonoides como punto de partida para nuestros estudios ya que como lo venimos viendo hasta el momento estos pueden ser agentes terapéuticos para enfermedades inflamatorias (Chi Y. et al., 2001; Rice-Evans C., 2004; González-Gallego J, et al., 2007), evidenciando además su acción antioxidante inhibiendo la xantina oxidasa (Ya-Di. Li et al., 2013).

## I d - PERFILES METABOLÓMICOS

### 4.1 ESTUDIOS METABONOMICOS Y METABOLÓMICOS DEL PROPÓLEOS

La diversidad en la composición química del propóleos, sus efectos benéficos sobre la salud humana y también aquellos efectos que provocan determinados procesos tóxicos en algunos individuos, sumado al empleo generalizado en la industria, ha traído como consecuencia la necesidad de su normalización. Con el fin de ofrecer un producto seguro al consumidor debemos poder llegar a dar respuesta a las posibles causas de su toxicidad. Para ello es necesario analizar además de la identidad, composición y calidad de cada propóleos recolectado, su perfil metabólicomico.

Para ello primeramente debemos introducir algunos términos, se define “metabonómica” como la medida cuantitativa de la respuesta dinámica metabólica de los sistemas vivos ante estímulos patofisiológicos o modificaciones genéticas (Nicholson JK, et al. 1999). Es el *"estudio sistemático de las huellas únicas que dejan los procesos celulares específicos en su paso"* (Daviss, Bennett, 2005), es decir, el estudio del perfil de los metabolitos de una molécula pequeña

En paralelo, una aproximación diferente basada en la obtención del perfil metabólico de muestras biológicas *in vitro* mediante espectrometría de masas acuñó el término “metabolómica” como el análisis comprensivo y cuantitativo de todos los metabolitos de un sistema vivo (Fiehn O., 2002).

Podemos decir entonces que la metabonómica es un enfoque de sistemas metabólicos, complementaria a la genómica y proteómica, que permite la caracterización de procesos de enfermedades metabólicas, modificaciones genéticas y toxicidad del producto natural, fármaco, o muestras biológicas. En particular, se centra en el estudio de toda alteración del control metabólico en un organismo y de la homeostasis en los sistemas complejos donde hay muchos tipos de células que interactúan y realizar diferentes funciones bioquímicas al mismo tiempo.

A pesar de las diferencias en los conceptos iniciales, la metodología y filosofía de ambas ciencias son muy similares, convirtiéndolas en disciplinas convergentes muy difíciles de distinguir. Esto ha hecho que los términos “metabolómica” y “metabonómica” sean usados intercambiabilmente en el mundo científico marcado principalmente por razones históricas (Nicholson JK, et al. 1999).

De todas maneras existe un consenso creciente en creer que la metabolómica tiene un mayor énfasis en el perfilado metabólico en nivel celular o de órganos y su campo de trabajo primario es el metabolismo endógeno normal. La metabonómica extiende el perfilado metabólico para incluir información acerca de las perturbaciones en el metabolismo causadas por factores ambientales (incluyendo dietas y toxinas), procesos de enfermedad y contribuciones por influencias de tipo extragenómico, como los componentes de la flora intestinal. Esto no es una diferencia trivial; los estudios metabolómicos deberían, por definición, excluir las contribuciones de fuentes extragenómicas, ya que esas son externas en relación al sistema estudiado. Sin embargo, en la práctica, particularmente en el campo de investigación de enfermedades humanas, sigue habiendo un empalme en la forma en que ambos términos son utilizados, siendo en ocasiones sinónimos (Robertson D.G., 2005).

Por lo tanto debido a la naturaleza integradora de estos enfoques se puede añadir un valor significativo a la información derivada convencionalmente en la utilidad de drogas en varias etapas del descubrimiento. El estudio completo de los efectos de los medicamentos en organismos por metabonómica depende de la medición multiparamétrica de las alteraciones en el metabolismo provocado por un factor de estrés o intervención cosa que se logra con la ayuda de herramientas estadísticas. En un estudio metabolómico generalmente se requiere detectar la mayor cantidad de metabolitos por medio de una metodología altamente reproducible. Actualmente, las técnicas analíticas como la Resonancia Magnética Nuclear, la Espectrometría de Masas y la Espectroscopia de Infrarrojo Cercano conforman las utilizadas. Las tecnologías de metabolómica se han aplicado a diferentes áreas de investigación clínica, entre ellas el descubrimiento de biomarcadores y fármacos, la toxicología y la nutrición (Shah SH et al., 2012; Shintu L. et al., 2012; Lin C.Y. et al. 2007)

Una aplicación de estos estudios es el desarrollo y aplicación de la metabonómica en estudios de intervención nutricional (controlados o no controlados) con voluntarios sanos y no sanos para evaluar el impacto en el metabolismo a causa del consumo de dietas ricas en alimentos de origen vegetal con alto contenido de polifenoles como es el caso del propóleo, vino, cacao, etc.

Estos estudios permitirían plantear la obtención de biomarcadores del consumo de alimentos ricos en polifenoles (biomarcadores exógenos) y por otro lado se podría apuntar también a la identificación de metabolitos endógenos que reflejen la respuesta del metabolismo humano a estos componentes de los alimentos (biomarcador de efecto).

Un ejemplo de esto, es ensayo descrito en ratones, a los cuales se les suministro propóleos como alimento por varios días y se ha detectado en orina y plasma los siguientes flavonoides (pinobanksina-5-metil eter, pinobanksina, kaempferol, crisina, pinocembrina, y galangina), los cuales fueron usados tanto como biomarcadores del consumo (biomarcadores exógenos), y como biomarcadores de efecto ya que se supone que los flavonoides del propóleos una vez absorbidos en el cuerpo pueden atrapar radicales libres protegiendo así contra la lipoperoxidación lipídica, (Kumasawa s. et al., 2004). Por lo que con una técnica menos invasiva para el animal de experimentación se podría utilizar la orina en estudios de perfiles por resonancia magnética nuclear para evaluar la correlación entre el tipo de metabolito en orina y la actividad antioxidante ensayada in vivo.

Por otro lado, existen registros bibliográficos del uso de la metabonomía con el propósito de estandarizar extractos de propóleos, ofreciendo resultados útiles en los procesos de control de calidad de los extractos en la industria, ya que como sabemos la composición química del propóleos se ve afectada por factores ambientales y la estación de la cosecha, por lo que es difícil de estandarizar sus extractos para uso medicinal (Tomazzoli M., et. al 2015; Maraschin M., et al., 2015).

Uno ejemplo de ello es la *Baccharis dracunculifolia*, una planta nativa de Brasil que se encuentra comúnmente en el estado de Minas Gerais (sudeste de Brasil), es la fuente de una resina verde, y es la principal fuente del ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinámico conocido como ARTEPILLIN C<sup>®</sup>, (patentado para el tratamiento de tumores). Según la interacción entre *B. dracunculifolia* y *A. mellifera* (abejas), la mejor época para producir propóleos ricos en ARTEPILLIN C<sup>®</sup> es de diciembre a abril, es decir, tiempo de verano en el hemisferio sur. En este contexto, se puede observar la importancia de identificar el efecto estacionalidad en el perfil químico propóleos y su calidad resultante como fuente de metabolitos secundarios importantes.

En Uruguay, nuestros propóleos son relativamente ricos en los flavonoides comparados con otros países (Kumasawa S. et al., 2004), en especial se detectaron altos niveles de crisina, pinocembrina, pinobanksina (Paulino M. et al 2010), y se ha descrito que el origen botánico del propóleos uruguayo proviene mayoritariamente de las especies *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Populus* sp. (álamo), *Betula* sp. (abedul), y *Salix* sp (sauce) (Kumasawa S. et al., 2002).

Normalmente existen variabilidades entre muestras debido a su origen botánico y geográfico, en consecuencia, obtener huellas dactilares confiables que representen componentes químicamente característicos no es tarea fácil. Por ello, en el desarrollo de métodos para el análisis de extractos de propóleos se debe:

- Seleccionar adecuadamente el método de extracción, dependiendo de qué tipo de estructura química se quiera extraer. Los analitos buscados pueden tener problemas en su extracción con solventes o ser térmicamente lábiles.
- La variación en la composición de la muestra recogida que luego será utilizada con fines farmacológicos.
- Estandarizar el análisis de componentes activos en una matriz compleja y algunas veces desconocida, teniendo en cuenta la falta de sustancias químicas de referencia.

Finalmente existe otro parámetro a considerar, el cual no es tomado en cuenta en el diseño de los experimentos y a la hora del análisis de resultados y es el tipo de abeja que produce el propóleos.

En Uruguay, los apicultores utilizan las abejas "nativas" y algunas cepas de abejas europeas. Por otro lado, las abejas criadas en Brasil para recoger propóleos son principalmente las abejas africanas. Las abejas africanas (*Apis mellifera scutellata*) se introdujeron en el sudeste de Brasil hace más de 40 años y se fueron extendiendo por otras regiones. Este es un detalle que podría llegar a ser importante ya que las abejas europeas tenderían a recoger los exudados de los brotes de álamo, mientras que las abejas africanas tienden a recoger los exudados del brote de las especies de *Baccharis* que también tenemos presentes en nuestro País, generando un producto diferente. Por lo tanto, se considera que los componentes de propóleos también se relacionan con el tipo de abejas que lo elabora, este último punto en el Uruguay necesita tener más desarrollo.

Por lo tanto la seguridad, eficacia y calidad de un extracto final patronizado de propóleos depende de la calidad misma del propóleos, de cómo ha sido adquirido, de los planes de muestreo que se adopten, de la caracterización lo más completa posible, como lo es la dilucidación a través de la huella dactilar de protón por RMN. De este modo, llevando a cabo cada uno de los desafíos planteados, basándonos en un método rápido exacto y eficaz como lo es la obtención de la huella dactilar por medio de RMN  $^1\text{H}$ ,

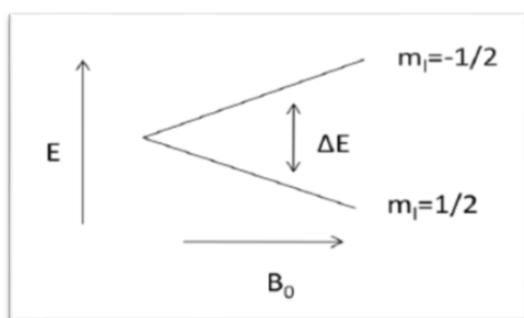
se pueden establecer pautas para la identificación y el control que lleven a producir a escala macro un producto de calidad, garantizando inocuidad alimentaria.

#### 4.2 HUELLA DACTILAR DEL PROPÓLEOS MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN (RMN $^1\text{H}$ ).

Para comenzar a describir los perfiles del propóleos mediante huella dactilar de protón por RMN debemos introducirnos en la teoría de la técnica.

La Resonancia Magnética Nuclear es un fenómeno basado en la existencia de núcleos con momento dipolar magnético no nulo. El momento dipolar magnético,  $\mu$ , viene dado por:  $\mu = \gamma I$ , siendo  $I$  el momento angular de spin y  $\gamma$  la razón giromagnética. En circunstancias normales, estos momentos no tienen una orientación fija por lo que no hay un campo magnético resultante (Hore P.J., 1995).

Sin embargo, cuando se localizan los núcleos en un campo magnético externo  $B_0$  los núcleos alinean su momento dipolar magnético en las direcciones dictadas por las leyes de la física cuántica. Tomemos por ejemplo un núcleo con espín  $1/2$ . Este podrá adoptar dos orientaciones, paralela o antiparalela (Figura 20).



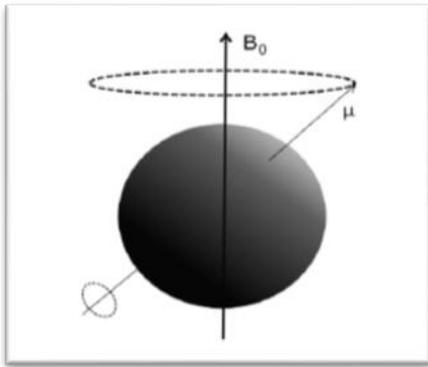
**Figura 20.** Estados energéticos del spin nuclear.

La mayoría de los núcleos se alinearán de forma paralela al campo debido a su menor energía, donde la diferencia de energía entre estos dos niveles consecutivos viene dada por la ecuación 4.1 y la distribución de niveles por la ley de Boltzmann (Ecuación 4.2):

$$\Delta E = h \omega_0 = h \gamma B_0 / 2 \pi \quad (4.1)$$

$$N_+ / N_- = e^{\Delta E / k_B T} \quad (4.2)$$

En términos de la física clásica, cuando el espín se sitúa en un campo magnético "precesa" alrededor de  $B_0$  en un movimiento análogo al de un trompo (Figura 21).



**Figura 21.** Movimiento de precesión del spin nuclear.

La frecuencia de precesión se corresponde con la frecuencia de Larmor (ecuación 4.3). En caso de equilibrio térmico, la magnetización  $M$  y el campo magnético principal  $B_0$  son paralelos. En el caso en que  $M$  apunte en una dirección diferente a la de  $B_0$  evoluciona de acuerdo a la ecuación 4.4 que corresponde a un movimiento de precesión de  $M$  alrededor del eje creado por  $B_0$  con una velocidad angular  $\omega_0 = \gamma B_0$ .

$$\omega_0 = h \gamma B_0 / 2 \pi \quad (4.3)$$

$$dM/dt = M \times \gamma B_0 \quad (4.4)$$

Las descripciones de la física clásica y cuántica son equivalentes, en ambos casos resulta un momento magnético macroscópico o magnetización neta,  $M_0$ , creada por el campo magnético principal que proporciona la base de la señal de RMN.

Para detectar esta señal se introduce un segundo campo magnético identificado por  $B_1$  (Pulso de Radiofrecuencia). Este Pulso de Radiofrecuencia, aplicado a la Frecuencia de Larmor, excita los espines nucleares llevándolos al estado superior de energía. Clásicamente esto puede ser representado por una rotación de  $M$  alrededor del eje de  $B_1$ , lo que hace que este deje de ser paralelo a  $B_0$ , dependiente del ángulo de inclinación (flip) y de la duración del pulso. Ahora lo que encontraremos será una componente transversal  $M_T$  precesando alrededor de  $B_0$  que nos permitirá detectar la señal de resonancia gracias a la ley de inducción de Faraday. Al desconectar el pulso RF obtendremos una señal de resonancia conocida como Señal de Precesión Libre (FID). Durante el periodo de precesión libre la magnetización vuelve a su estado de equilibrio original por un proceso conocido como relajación, que estará caracterizado por dos constantes de tiempo  $T_1$  y  $T_2$ , correspondientes a la relajación longitudinal y transversal, descrita por las ecuaciones de Bloch (Ecuación 4.5).

$$dM/dt = M_x \gamma B_0 - M_x x + M_y y / T_2 - (M_z - M_0) z / T_1 \quad (4.5)$$

La espectroscopía de RMN se basa en que no todos los núcleos de un mismo isótopo resuenan a la misma frecuencia debido a que estos núcleos están rodeados por una nube de electrones diamagnéticos la cual generará un campo magnético local opuesto al campo magnético principal.

Esta modificación dependerá de la distribución de electrones alrededor del núcleo y, por tanto, de la estructura química molecular. Esta pequeña modificación de la señal de resonancia de los núcleos se conoce como desplazamiento químico del spin ( $\delta$ ).

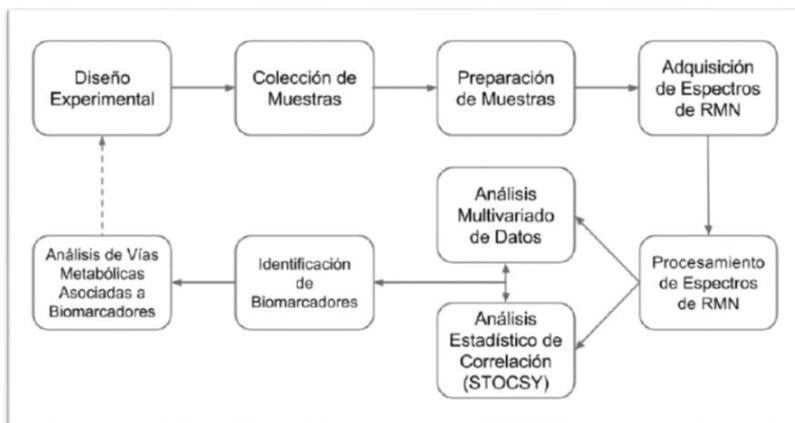
Las señales de núcleos individuales pueden mostrar desdoblamientos debidos al acoplamiento indirecto espín-espín ( $J$ ). Para dos núcleos con espín  $1/2$  como es el caso de los protones, las líneas de resonancia de cada protón se desdoblaron en un doblete, dos líneas correspondientes a las dos posibles orientaciones del protón adyacente respecto al campo magnético. Extendiendo la cadena de acoplamientos, cada componente de un doblete puede desdoblarse, a su vez, en otro doblete, formando tripletes, dobles dobletes, etc. De esta forma, el acoplamiento  $J$  es un parámetro evaluable para la distinción entre isómeros y para las medidas de conformación molecular.

### 4.3 RECONOCIMIENTO DE PATRONES

En la década de los 80, el análisis de los numerosos metabolitos detectados en los espectros de resonancia magnética impulsó el desarrollo de nuevas técnicas para clasificar las muestras en función de su estatus biológico. De esta forma, el concepto de huella dactilar metabólica nace al aplicar técnicas estadísticas multivariantes en la interpretación de los cada vez más complejos datos espectroscópicos de muestras biológicas.

Los métodos quimiométricos o de reconocimiento de patrones nos permiten extraer la información relevante de la compleja matriz de datos metabólicos. Estos métodos podemos dividirlos en dos vertientes, métodos no-supervisados y métodos supervisados. Los métodos no supervisados se encargan de reducir la complejidad de una manera robusta, produciendo representaciones gráficas fácilmente interpretables. En los métodos supervisados, un conjunto de muestras de clase conocida son utilizadas para construir y entrenar un modelo matemático que será evaluado con un conjunto independiente de muestras. Entre los métodos no supervisados destaca el Análisis de Componentes Principales (PCA), mientras que entre los supervisados diversas técnicas como el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA), el Análisis Lineal Discriminante (LDA), Redes Neuronales o Análisis por Vecinos Cercanos (KNN) han sido utilizados con éxito en los estudios metabonómicos.

Los datos espectrales resultan de una enorme complejidad como para ser analizados manualmente como lo hemos mencionado entonces la interpretación de los datos metabonómicos requerirá el uso de una serie de herramientas estadísticas multivariantes (MV) supervisadas y no supervisadas. El análisis metabonómico completo presentará diferentes fases como se muestra en el Esquema 4.1.



**Esquema 4.1.** Procedimiento posible de trabajo para el procesado de datos en un análisis metabólico por RMN.

Tras la adquisición de los espectros por RMN, será necesario realizar un pretratamiento de las señales con el fin de evitar varianzas propias de la adquisición y hacer los análisis posteriores más robustos. Una vez preprocesados los datos espectrales, podremos comenzar el análisis estadístico. Como primer paso, generalmente se ejecuta un análisis multivariante no supervisado; principalmente un análisis de componentes principales (PCA). El PCA nos destacará las regiones espectrales que están sometidas a una mayor variabilidad (posibles biomarcadores) o que presenten señales no reproducibles (posibles contaminaciones), e identificará las muestras que se diferencian en exceso del conjunto general (posibles “outliers”). El análisis no supervisado nos permitirá filtrar los datos, mejorando su robustez y a través de él podremos identificar los posibles biomarcadores, que serán validados a través de un análisis multivariante supervisado o un modelado posterior.

#### **4.4 TRATAMIENTO DE LOS DATOS - ESTADÍSTICA.**

Los datos químicos son normalmente multidimensionales, definiéndose un objeto a partir de varios componentes de datos. En el caso de las moléculas éstas se caracterizan a través de una gran variedad

de descriptores entre ellos los que provienen del tipo de determinación química experimental como lo es el espacio de 16 K de datos obtenidos en el ensayo de RMN  $^1\text{H}$ .

En general, una vez que se calcula un conjunto de descriptores éstos no pueden utilizarse directamente para generar un modelo, ya que deben solventarse tres tipos de problemas: i) existe una gran correlación entre las variables, de manera que diferentes descriptores codifican el mismo aspecto estructural, ii) puede existir descriptores que no aporten información relevante al modelo y iii) el número de descriptores es demasiado elevado como para ser tratable computacionalmente y no es representable. Con ello, resulta difícil extraer interrelaciones y asociaciones entre estas variables y los objetos de estudio.

Para evaluar la calidad de un conjunto de descriptores normalmente se analizan dos medidas estadísticas: la varianza y la correlación entre ellos. La varianza permite ver el grado de variación de un descriptor a lo largo del conjunto de datos, de manera que si esta es muy baja, el descriptor aporta muy poca información al conjunto. La correlación entre descriptores aporta información del grado de redundancia interna. Descriptores independientes presentan un coeficiente de correlación nulo, denominándose ortogonales. Se establece que el coeficiente de correlación entre dos descriptores no debe ser superior a 0.6, aunque se acepta trabajar en un margen de 0.4 a 0.9.

Así, se realiza un pre-procesado del conjunto de descriptores reduciéndose la dimensionalidad del problema y obteniéndose un conjunto reducido de descriptores con una mayor densidad de información relacionada con la propiedad objetivo (actividad biológica). Este procesado implica también un autoescalado de los datos, de manera que descriptores con mayor orden de magnitud no tengan más peso en el análisis.

Entre los métodos de reducción de dimensionalidad destacan diferentes métodos por ejemplo aquellos que transforman los descriptores, generándose un conjunto reducido. Entre ellos, el PCA y métodos de

regresión como el *Partial Least Squares regression* o *Projection to Latent Structures* (PLS), la regresión lineal múltiple (MLR) y la regresión con componentes principales (PCR).

Los métodos de regresión (PLS, MLR, PCR) establecen un modelo predictivo de una o más variables dependientes (actividad) en función de las variables independientes (descriptores), por lo que son ampliamente usados en QSAR (especialmente PLS). Para aplicar estos métodos, es aconsejable diseñar un plan de muestreo que permita contar con un número de muestras mayor a 30 para que sea un modelo predictivo y no fracase.

#### **4.4.1 Pre tratamiento de datos**

Los métodos de pre tratamiento ayudan a corregir aspectos que dificultan la interpretación de las señales que se obtienen del espectro de resonancia. Se tiene el centrado, el escalado y el auto-escalado:

Centrado: consiste en convertir los datos a fluctuaciones alrededor de cero, restando el promedio a cada variable, de este modo ajusta las diferencias entre los metabolitos altamente concentrados y aquellos que no lo están, por medio del centrado se observa sólo la variación relevante a lo largo del set de datos.

Escalado: divide cada variable por un factor, por lo cual se van a observar las diferencias de concentraciones de cada señal respecto al factor de escalado.

Auto-escalado: utiliza la desviación como factor de escalado, después del auto-escalado todas las señales tienen desviación estándar de uno, por tanto los datos son analizados en base a las correlaciones en lugar de las covarianzas.

#### **4.4.2 Análisis de componentes principales (PCA)**

El PCA es una de las técnicas exploratorias más comunes en el análisis metabolómico, al poder representar datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad (Trygg et al, 2007). Los componentes principales son autovectores de la diagonalización de la matriz de covarianza, provenientes de la matriz de datos original.

De esta forma, el primer componente principal consistirá en una combinación lineal de todas las variables espaciales ponderadas para explicar el máximo de la varianza total del espacio original. El segundo componente principal será ortogonal al primero y explicará el máximo de la varianza residual, y así con el resto hasta que la varianza total esté explicada.

Este método se reduce un conjunto de datos parcialmente correlacionados en un número de nuevas variables ortogonales, los componentes principales (PC), con pérdida mínima en la contribución a la variación.

Los PC se establecen como combinación lineal de las variables originales: se aproxima la matriz de los datos  $X$ , de dimensión  $n$  (número de objetos, moléculas)  $\cdot m$  (número de variables, descriptores) mediante dos matrices más reducidas: la matriz de los *scores*  $T$  ( $n$  objetos  $\cdot d$  variables) y la matriz de los *loadings*  $P$  ( $d$  objetos y  $m$  variables),  $E$  es una matriz de errores, según la ecuación 4.6 (Trygg et. al., 2007):

$$X = TP^T + E \quad (4.6)$$

La matriz de los *loadings* contiene los coeficientes de la combinación lineal, indicando qué variables influyen el modelo y cómo éstas están correlacionadas. La matriz de *scores* recoge la proyección de los objetos en el espacio de las componentes principales.

Normalmente, antes de realizar un PCA los datos se procesan mediante centrado en la media y escalado. Geométricamente, al representar en un espacio  $m$ -dimensional los  $n$  objetos, el primer componente principal (PC1) corresponde al vector que representa la máxima varianza dentro de los datos, el segundo componente principal (PC2) es ortogonal al primero y presenta la siguiente máxima varianza, y así sucesivamente. Estas direcciones ortogonales corresponden a los vectores propios de la matriz  $X^T X$  y sus valores propios ( $m$ ) corresponden a la varianza asociada a cada uno de ellos.

En la mayor parte de los casos, con 3 a 5 componentes principales (PCs) se explica la mayor parte de la varianza de los datos, de manera que la representación tridimensional de los tres primeros componentes principales suelen cubrir el 60-80% de la varianza.

La principal ventaja del PCA es que no asume distribuciones de probabilidad de las variables originales, aunque es muy sensible a puntos extremos y datos pobremente distribuidos.

#### 4.4.3 Partial Least Squares regression o Projection to Latent Structures (PLS)

Los denominados Mínimos Cuadrados Parciales de Regresión o su sigla en inglés (PLS) o proyección sobre estructuras latentes, es una técnica reciente que combina características generales del análisis de componentes principales (PCA) y de la regresión lineal múltiple. Su objetivo es predecir un conjunto de variables dependientes de un conjunto de variables o factores predictivos independientes. Esta predicción se logra mediante la extracción de los predictores un conjunto de factores ortogonales llamadas variables latentes que tienen el mejor poder de predicción. Estas variables latentes se pueden utilizar para crear pantallas similares a las pantallas de PCA.

El método PLS está basado en un modelo bilineal respecto a los objetos y variables de las matrices X e Y, que podrán expresarse según las siguientes ecuaciones:

$$X = T P^t + E \quad (4.7)$$

$$Y = T Q^t + F \quad (4.8)$$

donde P es la matriz de loadings de X; Q es la matriz de loadings de Y; T y U son las matrices de scores; E y F son las matrices de los errores residuales.

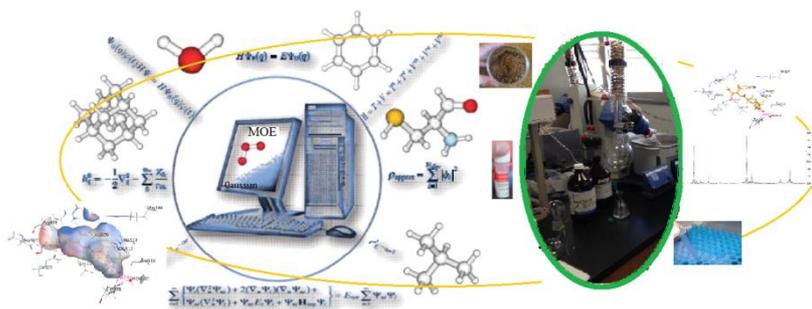
El PLS es un método comúnmente utilizado cuando se busca una relación cuantitativa entre dos tablas de datos X e Y. La matriz X, por lo general comprende los datos espectrales de un conjunto de muestras (ppm) y la otra matriz, Y, contiene valores cuantitativos, por ejemplo, concentraciones de metabolitos, o podría contener datos discretos 0 o 1 en el caso de análisis discriminante denominado PLS-DA (Trygg et. al., 2007).

Los coeficientes PLS nos permiten simplificar la interpretación de modelos con muchas variables PLS en un único vector, representando la respuesta global de las variables espectrales, pero perdiendo la correlación estructural del modelo. La calidad de la predicción obtenida a partir de un modelo de regresión PLS se evalúa con técnicas de validación cruzada (*cross validation*). Hay dos variantes

principales de PLS: el más común separa las funciones de las variables dependientes de las independientes; el segundo utiliza las mismas funciones para ambas variables dependientes.

Se discutirá en el Capítulo III la posibilidad de aplicar o no el método PLS según el diseño de nuestro experimento.

# CAPÍTULO II



## MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1.1 METODOLOGIAS *In vitro*

A continuación se describen algunos de los materiales y métodos que serán presentados en forma de artículos científicos publicados y/o enviados para publicación. Estos se detallan en el Capítulo III Discusión y Resultados.

#### II.1.1.1 Muestreo de propóleos

Se eligieron por muestreo geográfico 31 muestras de propóleos las cuales fueron donadas por apicultores y acopiadores, se rotularon según su origen geográfico, y el año de recolección año. Se almacenaron en heladera hasta la extracción.

#### II.1.1.2 Método de extracción de polifenoles del propóleos.

El procedimiento extractivo previamente desarrollado (Paulino et al, 2015) consiste en una primer etapa de decerado en Soxhlet (extracción de ceras) de las muestras con 200 mL de hexano por 1 hora de reflujo.

Posteriormente se extraen los fenoles, mediante reflujo de 25 mL de mezcla Etanol/Agua (80:20). Se coloca 1 gramo de la muestra descerada en un balón con una columna de refrigeración utilizando agua como refrigerante. El dispositivo descrito se colocó en plancha calefactora y se calentó la mezcla con agitación. El extracto obtenido se filtró con papel de filtro y se llevó hasta un volumen final, con mezcla de Etanol/Agua (80:20), de 50 mL. Luego se procedió a numerar los extractos los cuales se mantuvieron en heladera (4 a 7 °C) protegidos de la luz hasta el momento de su análisis.

Durante la extracción se controló la temperatura de modo de no superar los 60 °C para evitar la pérdida de capacidad antioxidante.

Algunas muestras fueron extraídas por maceración mediante 25 mL del solvente de extracción etanol/agua (80:20) durante 7 días y protegidas de la luz.

Para el caso de la técnica de maceración se tomó 1 gramo de muestra y se colocaron en frascos de vidrio oscuro, se les añadió la mezcla de Etanol/Agua (80:20) y se dejaron 7 días a temperatura ambiente protegidos de la luz. Los extractos así obtenidos, se filtraron utilizando papel de filtro y se llevaron a un

volumen final de 50 mL con su respectiva mezcla de solvente de extracción. Finalizado el proceso, se numeraron las muestras y se guardaron en refrigeración (4 a 7 °C) protegidas de la luz hasta el momento de su utilización.

### **II.1.1.3 Compuestos fenólicos totales (CFT).**

El contenido fenólico total se determinó utilizando el método de Folin Ciocalteu descrito por Singleton (Singleton et al, 1999) adaptado a una técnica que utiliza volúmenes del tenor de los microlitros. Se determinó el CFT para algunos extractos de orujos de uva. Se expresa el contenido de fenoles totales en equivalentes de ácido gálico % GAE (g/g) (peso de muestra en bruto), y también como mgGAE/L extracto.

### **II.1.1.4 Actividades antioxidantes**

Se obtuvieron medidas de atrapamiento de radicales libres por dos métodos de “*scavenging*”:

#### **II.1.1.4.1 Radical DPPH.**

Se utilizó el método colorimétrico del radical 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH). Como blanco, se utilizó metanol. Como control positivo, se utilizó ácido gálico. Se trabaja en condiciones idénticas a las descritas por Brand-Williams (1995) y Molyneux (2004).

#### **II.1.1.4.2 Radical ABTS<sup>+</sup>**

El ensayo se realizó adaptándose a la técnica de Re (Re et al, 1999; Kuskoski et al, 2004). Se construyó una curva de calibración con ácido ascórbico (vitamina C) y se repitió para soluciones de muestra entre 0 y 20µL.

### **II.1.1.5 Inhibición de blancos enzimáticos.**

#### **II.1.1.5.1 Inhibición de Xantina oxidasa (XO).**

Se midió la inhibición de XO de 6 extractos de propóleos, 4 extractos de orujos y 2 mezclas de extractos de propóleos y orujos de las 94 muestras presentadas en la DOI. Se utilizó el kit comercial de Sigma Aldrich® (código MAK078) y se trabajó como indica el manual del proveedor. Se utilizó un volumen de 5 µl del extracto (preparado en II.1.1.2, 20 µg/µL) por cada muestra, y el tiempo de ensayo fue de 15 minutos, se trabajó por triplicado. La actividad de XO se determinó de manera colorimétrica (570 nm) del producto coloreado azul, lo que resulta proporcional a la cantidad de peróxido de hidrógeno generado. La lectura se realizó en un Lector de Elisa ThermoLabsystems Multiskan RC. Una unidad de

XO se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de xantina, obteniéndose 1,0 mmoles de ácido úrico y de peróxido de hidrógeno por minuto a 25° C.

#### **II.1.1.5.2 Ciclooxygenasas I y II (COX-I y COX-II).**

El ensayo de inhibición se realizó mediante la técnica del proveedor del Kit de inhibición de COX. (Cayman Chemical Company<sup>®</sup> Code: 560131). Se utilizaron 20 µg/µL de cada extracto. Se trata de una medida directa de la cantidad de prostaglandina tipo F (PGF2α) generada por reducción del complejo derivado COX-PGH2 por el cloruro de estaño (SnCl2) en presencia del inhibidor y se cuantificó mediante la técnica de inmunoensayo ELISA.

#### **II.1.1.6 Análisis de perfiles Metabólicos de los propóleos y orujos de uva.**

##### **II.1.1.6.1 Preparación de la muestra para el análisis espectroscópico por resonancia magnética de protón.**

Para preparar muestras de RMN, se pesan 20-30 mg de cada extracto seco, transfiere a un tubo de RMN. Y se disuelve en 0,5 mL de acetona deuterada (acetona - d6), seleccionada por su alta capacidad de disolvente y 20 de µL de tetrametilsilano (TMS) como compuesto de referencia. Cada muestra se analiza y se utiliza inmediatamente tanto para los experimentos de RMN <sup>1</sup>H 1D. Para eliminar el agua residual se vuelve a rotaevaporar con acetona-d6 y se vuelve a re disolver en el mismo solvente.

Los experimentos se realizan a 300 K y los espectros de RMN <sup>1</sup>H se midieron a 500,13 MHz. Se procesan los resultados en el software MNova 10.1 (Mestrelab Research, S. L.).

##### **II.1.1.6.2 Análisis de Componentes Principales (PCA) de los espectros de RMN.**

Se aplicó el procedimiento estándar descrito en el software MNova para el análisis de los 18 espectros obtenidos de propóleos y de orujos de uva (MestReNova, MestreLab<sup>®</sup> Research S.L)

Para refinar y optimizar la matriz de datos originales que se utilizará para el análisis de componentes principales, se eliminan valores extremos del espectro al realizar la alineación espectral corrigiendo línea de fase y línea de base. Se setearon los siguientes parámetros:

Bin Size: 0.05 ppm, Binning Method: Peak, Components: 3, Data Integrity Check: True, Normalization: Sum, Scaling: Pareto.

#### **II.1.1.6.3 Análisis de OPLS-DA de los espectros de RMN.**

Para el Análisis estadístico de Mínimos cuadrados ortogonales del tipo discriminante (OPLS-DA) se realice el procesamiento de los datos con el paquete SIMCA® 14 de UMETRICS ([www.umetrics.com](http://www.umetrics.com)).

### **II.1.2 METODOLOGIAS *In silico***

Los materiales, métodos y resultados de la parte *in silico* de este trabajo de Tesis son presentados en forma de artículos científicos publicados y enviados para publicación.

Éstos son presentados, relacionándolos a los objetivos específicos, y de acuerdo al orden cronológico en el que fueron analizados los datos obtenidos en esta tesis.

Para aquellos resultados que aún no han sido enviados para publicación, que se describen al final de esta sección, se hace una descripción de los materiales, métodos y resultados.

#### **II.1.2.1 Construcción de bases de datos de fenoles.**

Se modelaron todas las estructuras fenólicas identificadas en los propóleos (Paulino et al., 2010; Silva et al., 2011), incorporando las presentes en los orujos de uva (Boido et al., 2006), luego se procedió al refinamiento por medio de minimización de energía empleando un campo de fuerzas MMF94x (Halgren, 1999). Se utilizó el paquete computacional Molecular Operating Environment (MOE 2011.10) versión Linux en una estación de trabajo con un procesador de tipo quad-core Hyperthread (I7).

Hoy en día, los métodos de modelado molecular se ven alimentados en el uso de las grandes bibliotecas virtuales de moléculas potencialmente bioactivas, dichas bases de datos pueden alcanzar los 800000 estructuras cristalográficas 3D de datos precisos y validados por expertos, como rayos X, difracción, entre otros datos estructurales. Un ejemplo es la de Cambridge (The Cambridge Structural Database, CSC). Estas bases de datos tienen un rol preponderante a la hora del diseño para el descubrimiento de fármacos. Esta Tesis logró crear una base de datos de 123 compuestos pertenecientes a los propóleos y

los orujos de uva con descriptores moleculares 2D y 3D del tipo hidrófobicos, electrónicos y topológicos entre otros (ver 6.2.2).

Se identifico a cada uno de los 123 compuestos por el código de identificación (CIP) de compuestos de la base de datos de PubChem operada por el National Center for Biotechnology Information (NCBI), (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### **II.1.2.2 Optimización de la geometría y cálculo de Descriptores moleculares.**

Como se ha descrito anteriormente se diseñaron las 123 estructuras químicas polifenólicas, se refinó la geometría utilizando Mecánica Molecular (MM+) y se optimizó la energía por cálculos semiempíricos (PM3), alcanzando el estado estacionario a partir de una geometría deformada inicial.

Se calcularon los descriptores electrónicos HOMO para las especies neutras según PM3, se calculó como descriptor de hidrofobicidad el  $\log P(o/w)$  y los índices de Lipinski (MOE 2007.09) de cada uno de los polifenoles de la base de datos.

Estos últimos índices sirven como descriptores para evaluar cualitativamente que tan adecuado podría resultar el polifenol para cumplir determinada actividad biológica una vez que es ingerido como medicamento de forma oral en seres humanos (Lipinski 2001). Finalmente se calcularon las energía de disociación del enlace O-H (*BDE*) en los niveles DFT (M06-2X/6-311+G(3df,2p)) (Truhlar, 2008) para un set prueba de 5 polifenoles que luego se ampliará a la base de fenoles.

### **II.1.2.3 Teoría del funcional de la Densidad (DFT).**

En una primera etapa se aplicó la metodología DFT, (M06-2X/6-311+G(3df,2p), G4) (Curtiss et al, 2007), realizando un ensayo preliminar con una subpoblación, se eligieron de la base de datos algunas estructuras representativas de los grupos 2 y 3 diferenciados por los HOMO, los ácidos fenólicos coumarico, cafeico, y los flavonoides pinocembrina, quercetina y luteolina. Se midió por cálculos DFT (M06-2X/6-311+G(3df,2p)),(Truhlar, 2008) la BDE de los OH presentes y se encontró una correlación

del 95% entre la BDE de los OH más reactivos (valores bajos de BDE) y las medidas de DPPH (Paulino et al, 2008).

En una segunda etapa se amplió el set a 9 polifenoles. Para seis de ellos: quercetina, pinocembrina, ácido cafeico, fisetina, luteolina y ácido p-coumarico se calcularon la BDE de todos lo OH a nivel G4 (Curtiss et al 1998), con el fin de evaluar el desempeño del funcional M06-2X al evaluar la estabilidad de los radicales libres formados al romperse el enlace O-H.

#### **II.1.2.4 Análisis de la interacción ligando proteína: Métodos de Docking.**

##### **II.1.2.4.1 Anclaje molecular a COX-1 y COX-2**

Estudios de anclaje molecular (docking) de los polifenoles a dos cristales con el ligando (celecoxib) cristalizado en COX2 (PDB id: 3LN1) y en COX1 (PDI id: 3KK6). Ambas poseen 2 sitios de unión por lo tanto se trata de un dímero. Se desarrolló un procedimiento de acoplamiento para encontrar las mejores poses de fenoles en el sitio activo de las enzimas COX2 y COX1. Como primer paso se requiere definir un "receptor", un "sitio de unión" y un "ligando".

Como un segundo paso, se construyó un farmacóforo para el ligando y uno para el receptor. En tercer lugar, se usan funciones de poses (*placement*) y puntuación (*score*) para orientar los ligandos adecuadamente en el sitio y medir la energía de unión, respectivamente. Finalmente, después de analizar todos los resultados, se define un protocolo que se aplica a todos los ligandos antes integrados a la base de datos de fenoles. (MOE 2007.09).

##### **II.1.2.4.2 Anclaje molecular a XO**

Se estudió el anclaje molecular (docking) de los polifenoles al cristal con el ligando (quercetina) cristalizado en xantina oxidasa (XO) (PDB id: 3NVY), indicando el campo de fuerza para proteínas AMBER 99, ajustando hidrógenos y cargas. Luego se desarrolló un procedimiento de acoplamiento para

encontrar las mejores poses de fenoles en el sitio activo de la enzima XO aplicado a toda la base de datos de fenoles, utilizando las coordenadas del ligando (quercetina) presente en el cristal como referencia. Se usan funciones de *placement* (poses) y *score* (puntuación) para orientar los ligandos adecuadamente en el sitio y medir la energía de unión, respectivamente.

Se utilizó como función de *placement* (posicionamiento) la denominada “Alpha Triangle”, y como función de scoring “*London  $\Delta G$* ” que estima la contribución entálpica a la energía libre de unión usando una función lineal (MOE 2007.09).

# CAPÍTULO III



## DISCUSIÓN Y RESULTADOS\*

### ETAPA PREPARATIVA

La Tesis tuvo una etapa previa de preparación y adiestramiento para el desarrollo del posgrado. En esta etapa inicial de mi formación de posgrado, participé en un trabajo de investigación que concluyó en:

***“Studies of trypanocidal (inhibitory) power of naphthoquinones: Evaluation of quantum chemical molecular descriptors for structure-activity relationships”***. (2008). Paulino-Zunini, M., Alvareda E., Denis P., Barreira E., Sperandio Da Silva G., Dubin M., Gastellu C., Aguilera S., Tapia O. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 2238-2246.

En el mismo se planteó el estudio de mecanismos antioxidantes de quinonas tripanocidas, provenientes del lapacho (*Tabebuia spp.*), arrojando un indicio de cómo podrían llegar a comportarse los polifenoles como atrapadores de radicales libres. Se realizaron estudios QSAR-2D que indicaron que los mejores inhibidores de crecimiento tripanocidas resultaron ser aquellas moléculas en su estado electrónico radicalario (semiquinona), con las siguientes características: alto valor negativo de energía del orbital frontera HOMO, alta carga negativa de los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo, alta carga positiva en el átomo de carbono de uno de los restos carbonilo y alta electronegatividad. De manera complementaria, se construyó un QSAR-3D indicando que el campo electrostático correlacionaba con la actividad tripanocida y la presencia de fragmentos voluminosos podría aumentar la actividad. El radical hidroquinona fue la especie activa resultante como asociada a la actividad tripanocida.

La estructura electrónica del radical hidroquinona estudiado es similar a la de la especie radicalaria proveniente de un polifenol. Ambos provienen de diferentes especies químicas (quinona y polifenol) y evolucionan a través de una reacción de reducción (la quinona a semiquinona) u oxidación (el polifenol a polifenol radical).

\* Algunos de los materiales, métodos y resultados son presentados en este capítulo en forma de artículos científicos publicados y/o enviados para publicación. Se desarrollan aquellos resultados que aún no han sido enviados para publicación.

Este punto de encuentro entre las estructuras electrónicas de las especies nos permitió transferir el conocimiento adquirido y aplicarlo al estudio de los mecanismos de acción que planteados en esta Tesis. Luego, y dentro de esta etapa inicial de mi formación de postgrado, participé en los inicios de la línea de investigación de polifenoles provenientes del propóleo y su acción como antioxidantes, que concluyó en la publicación:

***“Phenolic contents and antioxidant activity in central southern Uruguayan propolis extracts”***. (2010) Paulino-Zunini, M., Rojas, C., Depaula, S., Elingold, I., **Alvareda, E.**, Casanova, M.B., Iribarne, F., Aguilera, S., Dubin, M. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 551, 141-146.

En esta parte de la investigación se realizó un estudio sobre el contenido fenólico y las propiedades antioxidantes del propóleo uruguayo. Se identificaron y cuantificaron dos ácidos fenólicos (gentístico y p-cumárico) y ocho flavonoides (fisetina, miricetina, luteolina, quercetina, kaempferol, pinocembrina, crisina y tectocrisina) y se determinó la actividad antioxidante mediante la medida de la actividad antirradical (AAD), por ensayos de peroxidación lipídica microsomal (MLP) y atrapamiento del radical DPPH. Se postuló la existencia de otros cinco fenoles. La gran diferencia entre rango de valores de actividad captadora de AAD (entre 60% y 100%) y la inhibición de la lipoperoxidación (entre 15% y 92%), sugiere que los propóleos poseen efecto antioxidante y dejan asentado los posibles mecanismos de acción antioxidantes de los fenoles.

Luego de estas etapas preparativas de mi proyecto de Tesis, el mismo comenzó con el estudio de extractos de propóleos y orujos de uvas y el análisis de sus capacidades antioxidantes, continuó con el análisis espectroscópico por NMR de algunos de ellos, el desarrollo de bases de datos y estudios de propiedades farmacofóricas y electrónicas y de biodisponibilidad de especies neutras y radicalarias, para concluir con estudios *in vitro* e *in silico* de propiedades antioxidantes (por inhibición de xantina oxidasa) y antiinflamatorias (por inhibición de ciclooxigenasas) medidas por blancos farmacológicos.

Las siguientes son las referencias bibliográficas de las publicaciones realizadas en el periodo de la Tesis, (adjuntadas en la sección Anexos):

***Antiinflammatory activity of phenolic compounds extracted from Uruguayan propolis and grape.*** **Alvareda E.**, Miranda P., Espinosa V., Pardo H., Aguilera S. & Paulino Zunini M. (2015) *Journal of*

Biomolecular Structure and Dynamics. ISSN: 0739-1102 (Print) 1538-0254 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/tbsd20>.

*Towards the understanding of the molecular basis for the inhibition of COX-1 and COX-2 by phenolic compounds present in Uruguayan propolis and grape pomace.* Paulino M., Alvareda, E., Iribarne, F., Miranda P., Espinosa V., Aguilera S., Pardo H., (2015). Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2015.1124808>.

*Bond dissociation energies and enthalpies of formation of flavonoids: a G4 and DFT investigation.* **Alvareda E.**, Denis P., Iribarne F., Paulino M. (2016). Publicado en Computational and Theoretical Chemistry. <http://dx.doi.org/10.1016/j.comptc.2016.06.021>

Enviados a publicar:

- *Antioxidant Capacity and Spectroscopic Characteristics of Uruguayan and Chilean Propolis and Vitis Vinifera Pomace.* Margot Paulino, **Elena Alvareda**, Emiliana Fariña, Sara Aguilera, Yisel Rodriguez, Victoria Espinosa, Antonella Roascio, Valentina Villamil and Claudio Olea. Enviado a: Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- *Xanthine oxidase inhibition by Uruguayan Propolis and Grape pomace (Vitis Vinifera).* **Elena Alvareda**, Victoria Espinosa F, Pablo Miranda, Brenda Vera, Margot Paulino Z. Enviado a: Journal of Biomolecular Structure & Dynamics

En elaboracion:

- *Antioxidant activity by Molecular modeling and Quantum Chemical DFT calculations of polyphenolic compounds from Uruguayan Propolis and Vitis Vinifera Grape Pomace.* Paulino M., **E. Alvareda E.**, Denis P., Iribarne F., Miranda P. and Aguilera S., Olea-Azar C.

### III.1 EXTRACTOS Y ANALISIS DE CAPACIDADES ANTIOXIDANTES

Titulo del trabajo: **“Antioxidant Capacity and Spectroscopic Characteristics of Uruguayan and Chilean Propolis and *Vitis Vinifera* Pomace.”** Autores: Margot Paulino, **Elena Alvareda**, Emiliana Fariña, Sara Aguilera, Yisel Rodriguez, Victoria Espinosa, Antonella Roascio, Valentina Villamil and Claudio Olea.

El trabajo se envió a publicar al Journal of Agricultural and Food Chemistry.

En dicho trabajo, se aplicaron protocolos experimentales desarrollados anteriormente para extraer y analizar compuestos fenólicos de extractos de propóleos y orujos de uva de diferentes regiones geográficas chilenas y uruguayas. Las técnicas experimentales utilizadas de Folin-Ciocalteu y métodos de barrido de radicales DPPH y ABTS<sup>+</sup>, permitieron caracterizar el contenido fenólico y evaluar los extractos como antioxidantes. La mejor extracción de compuestos polifenólicos en propóleos se obtuvo utilizando la mezcla etanol/agua (80:20) y para orujos de uva utilizando etanol/agua 50/50. En el propóleos, se obtuvieron entre 16 a 845 mgGAE/L, equivalentes de ácido gálico (GAE) por litro de extracto, dependiendo de la procedencia geográfica, el método de extracción, y el año de muestreo. En los extractos de orujos de uva, se observaron valores de 72 a 468 de mgGAE/L.

La relación entre el contenido total de fenoles y capacidad DPPH *scavenger* fue de 88% para todas las muestras. Esto indica que la mayoría de los fenoles extraídos tienen la capacidad de ser secuestrantes de radicales libres, siendo los métodos ABTS y DPPH una medida directa de la capacidad antioxidante.

En la etapa final de este trabajo, se desarrolló una mezcla con dos partes de orujos de uva y una parte de los propóleos para el diseño de un producto de costo minimizado que se utilizaría en proyectos futuros con fines productivos para la industria. Después de la preparación, se chequeó el contenido fenólico total de compuestos fenólicos. Los resultados de estas mezclas mostraron valores medios de contenido fenólico en comparación con los de los productos puros. Estos resultados permiten ofrecer al mercado nuestros extractos como antioxidantes calificados y de costo minimizado, siendo materia prima para la industria en cuanto al desarrollo de alimentos nutraceuticos o funcionales.

### **III.1.1 Evaluación de los extractos de Propóleos y de orujos**

Para el tratamiento de las muestras se utilizó el mismo procedimiento de extracción evaluado y presentado en un trabajo anterior (Tesis de grado autora Rodriguez Yisel 2011), de modo de tener trazabilidad de las muestras relevadas y evaluar las propiedades respecto al tiempo. Se utilizaron las muestras preparadas, almacenadas entre el 2008-2013.

Es importante aclarar que la mezcla de extracción utilizada extrae la mayor cantidad de fenoles totales pero además extrae sus derivados glicosidados y algunos carbohidratos, lo que se pudo constatar al realizar el perfil del propóleos en los estudios de RMN H<sup>1</sup> que discutiremos más adelante.

Nuestra experiencia y el conocimiento desarrollado en esta Tesis podría ser incorporada a otras, para promover el desarrollo de una Norma, tomando como ejemplo lo que ha hecho el Instituto Argentino de Normalización - Subcomité de productos agroalimentarios del NOA (2004) (IRAM-INTA) así como el Ministerio de Agricultura de Brasil (1999).

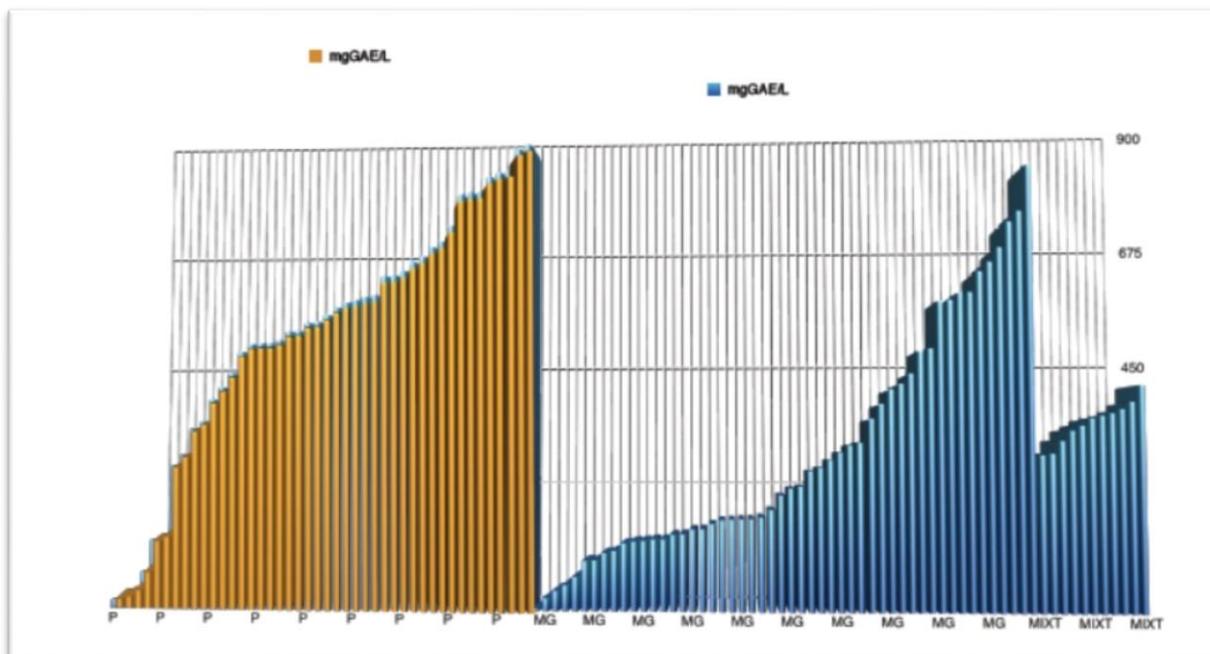
#### **III.1.1.1 Efecto del decerado**

En un trabajo previo, se cuantificó el porcentaje de ceras extraídas por método gravimétrico. Para expresar los resultados se consideró el peso total de la muestra pura en gramos y el peso seco obtenido del remanente luego de la eliminación de las ceras. Las muestras tenían entre un 6.33-25.33 % (14,5% promedio) de ceras. Después de la eliminación de las ceras, se extrajeron fenoles en las muestras. Dada la presencia de ceras así como su contenido altamente variable, esta etapa se considera muy importante, pudiendo afectar el resultado de otros ensayos experimentales como veremos más adelante. En extractos de propóleos desarrollados en Brasil se indica en el rotulado el porcentaje de ceras extraído (Propolis Extract “Polenectar™ – Wax Free 60 – Green” (<http://www.polenectar.com/eng-produtos-propolis-7.asp>, acceso junio 2016)). Esto avala nuestra observación.

### III.1.1.2 Evaluación del contenido de fenoles totales de los extractos

Los resultados del contenido de fenoles totales (CFT) por el método de Folin Ciocalteu de 101 extractos, se presentan en la Tabla 3.

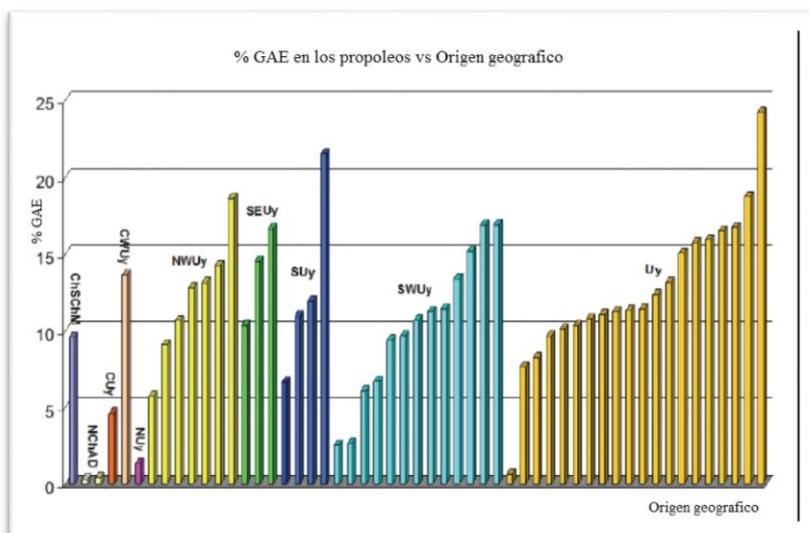
El CFT en los propóleos fue desde un 16-845 mgGAE/L y desde 72-468 mgGAE/L para los orujos en función de la procedencia geográfica, el método de extracción, y el año de muestreo (Figura 22).



**Figura 22.** Perfiles del contenido de fenoles totales (CFT) mgGAE /L en los extractos. En amarillo los correspondientes a propóleos (P) y en azul los correspondientes a orujos de uva (MG) y mezclas de propóleos y orujos (MIXT).

### III.1.1.3 Incidencia del origen geográfico de las muestras de propóleos

Para evaluar éste punto se tomó el % GAE (g/g) como índice, y se compararon los valores de diversas regiones geográficas (Figura 23). Las muestras de la región más variable fueron las del Centro oeste de Uruguay (media = 9,8525% y CV = 49,96%), seguida de las del Suroeste de Uruguay (media = 7,4675% y CV = 48,28%), el Noroeste de Uruguay (media = 11,31 % y CV = 29,85%), Sur Uruguay (media = 10,13% y CV = 29,47%) y el Norte de Chile Desierto de Atacama (media = 0,38% y CV = 18,61%).



**Figura 23.** Diferencias de %GAE entre varias regiones geográficas. NWUy = Noroeste Uruguay, SWUy = Suroeste Uruguay, CUy = Centro oeste Uruguay, NChAD = Norte Chile desierto de Atacama, SChM = Sur Chile Maule, NUy = Norte Uruguay, SUy = Sur Uruguay, CUy = Centro Uruguay SEUy = Sureste Uruguay.

El propóleo uruguayo tiene valores medios entre 8% y 11% de GAE sin que se pueda observar una gran diferencia entre los productos de diferentes regiones. En cuanto a las muestras chilenas, las procedentes del sur de Chile fueron similares a las uruguayas. Considerando que el Uruguay y el sur de Chile son regiones con altos contenidos de vegetación, y habiendo tenido la oportunidad de comparar este resultado con el de muestras de regiones desérticas, se puede concluir que para obtener productos con altas concentraciones en fenoles se deben utilizar aquellos precedentes de regiones con suficiente vegetación necesaria para el proceso de elaboración de las abejas.

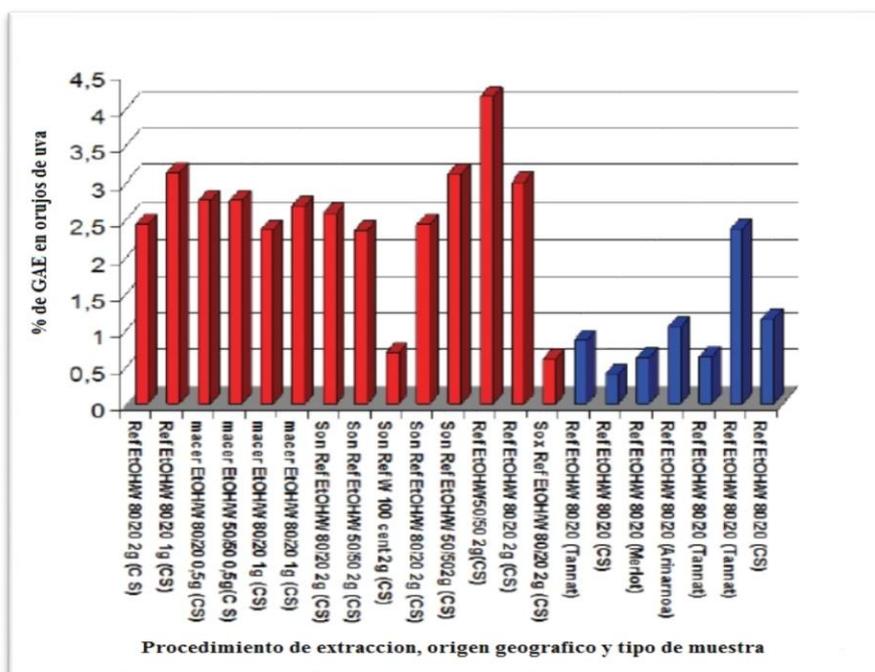
### III.1.1.4 Evaluación del método de extracción en los propóleos

Para la evaluación del método de extracción en propóleos se ensayaron varias mezclas de extracción etanol/agua (80:20, 50:50) y 100% agua. Por otra parte además se ensayaron dos métodos diferentes la maceración y la extracción por reflujo. La muestra con la que se realizaron los diversos métodos extractivos fue el propóleo número 8 (prop 8) (ver Tabla 3).

Para cada muestra preparada se midió el CFT que se utilizó como índice para comparar la mejor extracción de compuestos fenólicos. La mezcla de extracción óptima se obtuvo mediante reflujo de etanol/agua (80:20).

### III.1.1.5 Evaluación del método de extracción en los orujos de uva

Con respecto a los orujos de uva, los resultados indicaron que la mejor mezcla de extracción fue etanol/agua (50:50) aunque las mezclas 80:20 demostraron ser suficientemente buenas (Figura 24). Estos resultados se pueden comprender si se tiene en cuenta la polaridad de fenoles extraídos en propóleos, estos son relativamente más hidrófobos que los extraídos en los orujos de uva (14; 22; 23).



**Figura 24.** Comparación del porcentaje de GAE de muestras recogidas en Chile (rojo) y en Uruguay (azul) con los diversos procedimientos de extracción. En las abscisas se muestran los diferentes métodos de extracción. Ref: reflujo, EtOH-W: etanol-agua, macer: maceración, Son: sonicado, Sox: soxhlet, cantidad de muestra utilizada en gramos (g) y tipo de muestra CS: cabernet sauvignon, Tannat, Merlot, Arinoarnea.

Con respecto a los diferentes procedimientos de extracción (maceración, reflujo, sonicación) la extracción de reflujo fue la mejor para ambos productos. Sin embargo, para el caso de los orujos de uva, se decidió utilizar la maceración que demostró ser lo suficientemente buena para extraer los fenoles y sobre todo, con el objetivo del desarrollo de un producto que pueda ser implementado a nivel industrial, ofrece mucho mas simplicidad en la logística (equipamiento y control del proceso) que el sistema de extracción por reflujo.

#### **III.1.1.6 Evaluación del tipo de muestra.**

Se compararon los mismos tipos de extractos de orujos de uva, propóleos de diferentes regiones, y las mezclas de propóleos y orujos de uva (Tabla 3 y Figura 3). Globalmente se puede ver que los extractos de propóleos tienen una mayor cantidad de polifenoles en comparación con los orujos de uva.

#### **III.1.1.7 Incidencia del año de muestreo.**

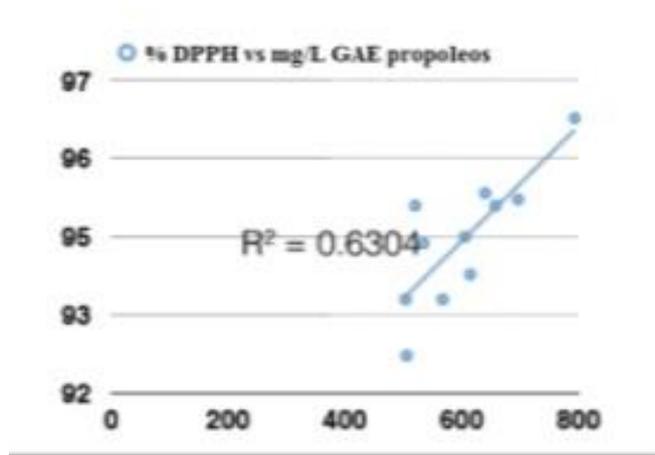
Se pudo observar la cantidad de fenoles en función del año de recolección de los propóleos, de los orujos de uva y las mezclas. Los resultados tienden a mostrar un contenido más rico de polifenoles en los propóleos que en los orujos de uva (teniendo las mezclas un CFT intermedio), no habiendo una correlación con respecto al año de muestreo.

#### **III.1.1.8 Evaluación de la capacidad antioxidante por métodos de scavenger: los radicales DPPH y ABTS<sup>+</sup>**

La capacidad de atrapar radicales libres (*scavenging*) por parte de estos extractos fue evaluada según dos métodos diferentes que hemos descripto en el Capítulo I secciones 1.7 y 1.8.

Los extractos de propóleos del periodo 2008-2009 presentan una medida similar de neutralización del radical DPPH con valores altos promediando el 92%.

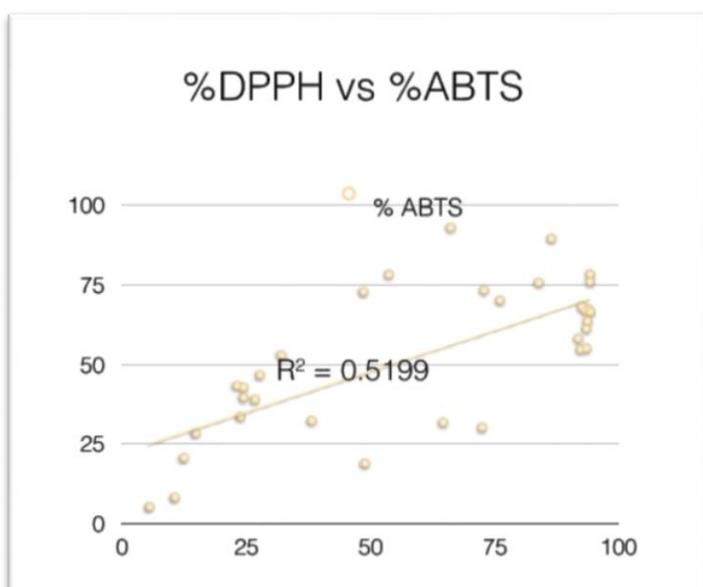
La relación entre el contenido de fenoles totales y capacidad de captura del radical DPPH resultó de 63% (Figura 25). Esto indica que en éste caso la mayoría de los fenoles extraídos tienen la capacidad de ser secuestrantes de radicales libres.



**Figura 25.** Correlación entre mgGAE/L y % DPPH de las muestras,  $r^2= 63\%$ .

Se podría conjeturar que si todos los fenoles son capaces de atrapar radicales libres, el resultado de utilizar las técnicas ABTS y/o DPPH dará una medida directa de la capacidad antioxidante. En este caso, el contenido fenólico total debería estar relacionado con la capacidad antioxidante.

Si comparamos ambos métodos DPPH y ABTS (Tabla 3), ambos radicales exhiben una excelente estabilidad bajo condiciones experimentales, pero su relación es del 52% (Figura 26).



**Figura 26.** Comparación de ambos métodos de *scavenger*, DPPH y ABTS.

Las técnicas experimentales de atrapamiento de radicales DPPH y ABTS<sup>•+</sup> en mezclas de fenoles, plantean algunas interrogantes (Xie y Schaich, 2014). Las correlaciones obtenidas entre los diferentes métodos se pueden racionalizar en base a varios criterios como ser que ambos métodos puedan presentar diferencias en el mecanismo de generación de radicales, solubilidades, espectros de absorbancia UV-Vis, mecanismos y cinéticas en la entrega de electrones, sensibilidad a la exposición a la luz o al oxígeno, influencia de la estequiometría, presencia de oxígeno.

Mecanismo de generación de los radicales: es un hecho de que ambos métodos tienen diferente mecanismo de generación de radicales: el radical libre DPPH se puede obtener directamente sin preparación, mientras que el ABTS<sup>•+</sup> tiene que ser generado después de una reacción química.

Solubilidad: otra diferencia es que ABTS<sup>•+</sup> es útil para medir la actividad de los compuestos hidrófilicos y lipófilicos, mientras que el DPPH sólo puede disolverse en medios orgánicos. Esta diferencia en la polaridad de los medios orgánicos entre los ensayos de DPPH y ABTS podría tener un impacto especialmente en los extractos de propóleos, que es que los fenoles provenientes del propóleos son en general menos polares y/o cargados que los encontrados en los orujos de uva.

Espectros de absorbancia: El radical ABTS<sup>•+</sup> tiene también la ventaja de que el espectro muestra una absorbancia máxima a 414, 654, 754 y 815 nm en un medio alcohólico, mientras que el radical DPPH tiene un pico de absorbancia a 515 nm, siendo esto importante a la hora de estudiar posibles interferencias.

Cinética: Con respecto a la cinética, no podríamos asegurar si se está en presencia de un único mecanismo del tipo HAT (transfiriendo un átomo de hidrogeno a un radical) o tipo SET (transfiriendo un solo electrón) o si se trata de una combinación de ambos efectos, con el predominio según el fenol, de uno sobre otro.

En el caso del ensayo ABTS<sup>•+</sup> lo que sucede es que la reacción es tan rápida que no se tiene en cuenta la velocidad de reacción y la cinética del radical. Algunos autores piensan que se podría obtener resultados exactos con métodos de mezclado rápido, tales como lectores de placas con auto dispensadores o mezcladores de flujo detenido, equipamiento que no todos los laboratorios poseen.

Otros autores indican que algunos antioxidantes reaccionan completamente en menor de tiempo de reacción, algunos reaccionan lentamente y otros mezclan reacciones iniciales rápidas con reacciones lentas (Tian y Schaich, 2013). Estas diferencias entre las velocidades de reacción del antioxidante son críticas, ya que reflejan la capacidad de atrapar radicales reactivos de corta duración.

Schaich y colaboradores (Schaich et al, 2015), plantean que los mecanismos SET, son pH dependientes varían con el pH y el grado de ionización en cambio los mecanismos HAT son independientes. Estos han desarrollado pruebas con compuestos que son dominados por el HAT (por ej. glutatión) y su velocidad aumenta al aumentar la proporción de agua en las muestras pero no varía con el pH. En cambio los compuestos en donde domina el SET (por ej. hidroquinona) reaccionaran rápido en metanol, muestran poco cambio al ir agregando agua y aumentan notablemente con el cambio de pH de la fase acuosa. Entonces se puede evaluar el mecanismo SET graficando las velocidades iniciales de DPPH vs pH, de este modo altos valores de pendientes indican un mecanismo del tipo SET.

Según Xie y Schaich, (Xie y Schaich, 2014), ni las velocidades iniciales y ni la estequiometría final se contemplan en el ensayo DPPH. Lo determinante en la velocidad de la reacción es el impedimento estérico, y con una contribución secundaria el balance entre los mecanismos SET y HAT. A su vez la velocidad de reacción inicial y la estequiometría están mal correlacionadas con la estructura molecular y las características químicas, incluyendo el número de OH y el potencial redox (Xie y Schaich, 2014).

En cuanto a la estequiometría, las moléculas con estructuras complejas consiguen más fácilmente por un camino u otro impedir el acceso a DPPH a bajas concentraciones y bloquean la reacción a altas concentraciones. Schaich plantea que las concentraciones de antioxidantes individuales son claramente inadecuadas para cuantificar y comparar la reactividad antioxidante con DPPH. Se deben conocer las concentraciones de fenoles en los extractos para realizar comparaciones precisas, y además se deberán usar más de un rango de concentración razonable para entender lo que está sucediendo, especialmente cuando las estructuras fenólicas son diferentes o desconocidas. En nuestros ensayos siempre hemos evaluado mezclas y no sustancias puras, por lo que podemos decir que nuestras comparaciones resultan ser precisas en este sentido.

Sinergismos? Podríamos pensar en la posible existencia de sinergismos o antagonismos entre los componentes del mismo. Se sabe que el valor de DPPH de una muestra compleja es siempre menor que

la suma de los compuestos fenólicos individuales porque los factores estéricos controlan estas reacciones. Hay autores que aseguran que en general las sinergias y los antagonismos son difíciles de detectar (Xie y Schaich, 2014).

Cantidad de grupos fenólicos: En cuanto a los cálculos del ensayo ABTS, se basan en la caída de absorbancia (A0-Af) y esto proporciona solo parte de la estequiometría de la reacción completa o sea los moles totales del ABTS<sup>•+</sup> reducidos por mol antioxidante. Esto se correlaciona estrechamente con la cantidad de grupos fenólicos presentes en una estructura de un determinado tipo pero cuando aparecen otros tipos de estructuras la correlación podría desaparecer, o podría verse enmascarado por algunos fenómenos estructurales. Estos fenómenos podrían llegar a ocurrir intramolecularmente como ha sido descrito por algunos autores que apoyan la hipótesis sobre la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre C3-OH del anillo C de los flavonoides y el C2 ' / C6' en el anillo B (Alov et. al, 2015), que podría estabilizar las conformaciones planas en los flavonoles teniendo comprometido la formación del radical y por ende la medida experimental.

Sensibilidad a Presencia de luz, Oxígeno, pH: En cuanto a las condiciones de ambos ensayos, las reacciones con DPPH son muy sensibles al medio de reacción, por ejemplo en agua (incluso más que ABTS<sup>•+</sup>), pH, oxígeno y la exposición a la luz.

pH: En el caso de la técnica de DPPH existen autores, que han cuestionado la falta de estandarización en los procedimientos de ensayo (Huang et al., 2005; Schaich et.al, 2015), sobre todo en los factores que influyen en el ensayo como ser pH y no son considerados (Xie et al., 2014).

Presencia de oxígeno: En cuanto a evaluar cómo influye en nuestros resultados la presencia de oxígeno, algunos autores (Xie et al., 2014) indican que algunas reacciones de radicales varían con el oxígeno disuelto reduciéndolo a O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. En el caso del ABTS los valores de actividad antioxidante resultan extremadamente altos. En cambio con DPPH se vio que reacciona muy poco, porque se genera la oxidación de fenoles a quinonas menos reactivas o no reactivas eliminando de la reacción estos productos competitivos y reduciendo la reactividad del DPPH. Estos ensayos sugieren el uso de una atmósfera inerte como puede ser argón.

En definitiva y evaluando todos los riesgos posibles de estos ensayos a la hora de obtener resultados confiables, el problema global radica en llegar a un acuerdo para el estudio de mezclas complejas y que

se puedan extrapolar resultados. El desafío mayor es entender cómo se comportan los productos naturales y sobre todo como los encontramos en la matriz de estudio.

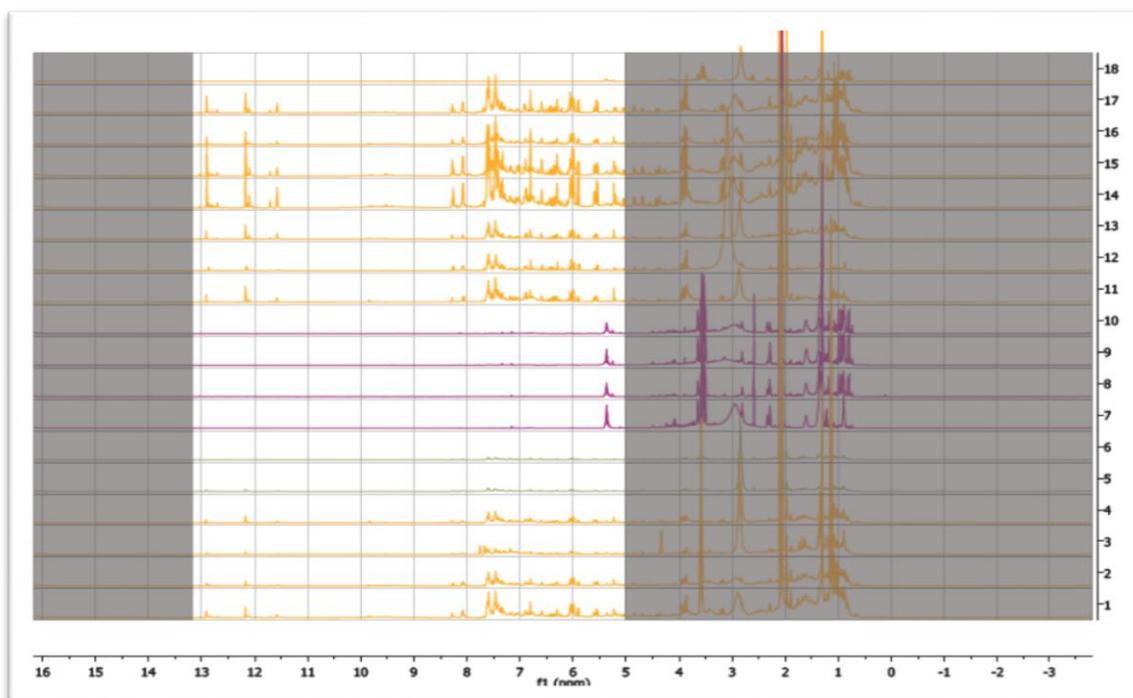
## **III.2 HUELLAS DACTILARES DE PROPOLEOS POR RMN**

### **III.2.1 Evaluación de los Perfiles de propóleos y orujos de uva por resonancia magnética nuclear de protón (RMN $^1\text{H}$ ).**

En cuanto a las condiciones del experimento, las mezclas de propóleos resultaron ser un tanto complejas para trabajar, debido a la presencia de azúcares. Para futuras investigaciones será necesario separar la fracción de componentes orgánicos de la fracción acuosa.

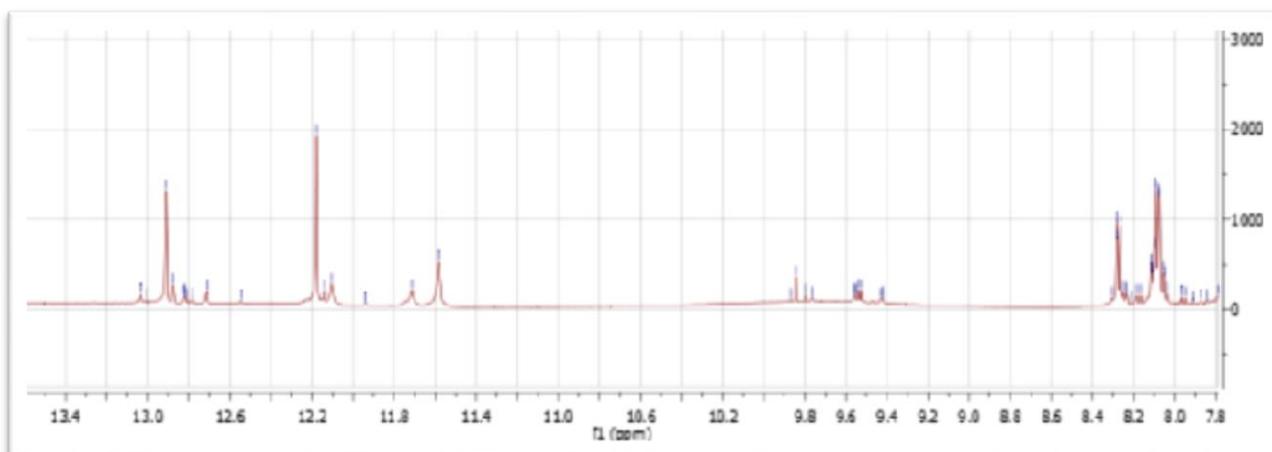
Por lo tanto se eliminó mediante rotavapor la mayor cantidad de agua presente en los extractos y se retomaron en acetona deuterada, a pesar que la bibliografía menciona que habitualmente se usa dimetilsulfoxido deuterado para disolver propóleos, este no logro disolverlo completamente teniendo que recurrir a la acetona deuterada. Siendo ambos solventes polares aproticos, la acetona es menos polar que el dimetilsulfoxido por lo que los extractos poseen una proporción de compuestos poco polares y polares. Todos los experimentos se obtuvieron a la misma temperatura y pH.

Nuestros experimentos permitieron determinar 15 huellas dactilares del protón de los propóleos y 3 huellas de muestras de orujo de uva, obtenidos por espectros de resonancia magnética nuclear del tipo 1D  $^1\text{H}$ . (Figura 27). Dichos perfiles servirán para la creación de una base de datos que vuelque información para continuar con futuras investigaciones.



**Figura 27.** Comparación de perfiles de RMN  $^1\text{H}$ : superposición de huellas dactilares de protón. Se presentan los espectros RMN  $^1\text{H}$  1D a 500 MHz y 298 K de las 18 muestras disueltas en acetona- $d_6$ , expresadas ppm. En color marrón claro los propóleos, en color violeta los orujos y en color verde las mezclas. En color gris las zonas inhabilitadas excluidas para el estudio de componentes principales (PCA).

Una descripción cualitativa de los espectros permite apreciar algunas señales de hidrógenos de grupos alcoholes, protones  $\alpha$  a cetonas ( $\delta$  entre 3.0 y 4.0 ppm), olefínicos ( $\delta$  entre 4.0 y 6.0 ppm) y aromáticos ( $\delta$  entre 6.0 y 8.0 ppm). Las señales características de los grupos hidroxilos (OH) de los flavonoides se obtuvieron entre 8.0 y 13.0 ppm (Figura 28). Para dos muestras en particular los propóleos rojo (M7) y propóleos del noroeste uruguayo (prop 12), se obtuvieron señales relativamente débiles a campos bajos, correspondientes a protones aromáticos entre 6.0 y 8.0 ppm, sugiriendo un bajo contenido de compuestos aromáticos.



**Figura 28.** Superposición de espectros de RMN  $^1\text{H}$  1D de las muestras de propóleos. Región de los desplazamientos químicos correspondientes a los protones de los grupos hidroxilos (OH) fenólicos.

La muestra de propóleos del sur este uruguayo (prop 23), cualitativamente posee una mayor proporción de señales de protones fenólicos lo que puede correlacionarse con sus medidas experimentales de CFT (contenido fenólico total), a su vez esta muestra presenta mayor capacidad de *scavenger* según su valor de DPPH (Paulino et al, 2016) (ver Tablas 3 A y 3 B).

Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de las señales entre 8.0 y 13.0 ppm son similares para los propóleos denominados prop 2, prop 8, prop 12, prop 23, M5, M6, 306, 307 y 308.

En cuanto a la asignación de señales, según lo reportado en bibliografía (Bertelli D. et al., 2012; Charisiadis P. et al, 2014), de acuerdo a los perfiles obtenidos podemos sugerir cualitativamente lo siguiente:

- el protón del grupo hidroxilo ubicado en posición 5C del anillo A de los flavonoides (C-5 OH) podría ser el que aparece como singulete entre 12-13 ppm.

- el protón del grupo hidroxilo ubicado en posición 3C del anillo C de los flavonoides (C-3 OH) podría ser atribuido a señales que aparecen en 9.1-9.6 ppm pero que a su vez, esos mismos desplazamientos corresponden a las señales de los protones de los grupos hidroxilos en posición 3`C y 4`C del anillo B.

En esta Tesis, este análisis espectroscópico permitió una descripción global de los perfiles protónicos de los extractos de propóleos. Se pudo conjeturar sobre algunas señales de protones fenólicos pero no se logró asignarlas fielmente, por lo que para continuar analizando e identificando los componentes del sistema es necesario diseñar un protocolo de pre-tratamiento de estos extractos para que puedan ser analizados por RMN.

La bibliografía sugiere algunas técnicas de pre tratamiento de extractos provenientes de productos naturales antes de obtener los espectros de manera de optimizar parámetros experimentales que influyen en la resolución de los protones correspondientes a los grupos fenólicos como ser pH, la temperatura y la naturaleza de los solventes de extracción (Charisiadis P. et al, 2014).

En nuestro trabajo logramos optimizar estos parámetros trabajando a una misma temperatura, sin cambios de pH, y eliminando el solvente de la muestra pero de todas maneras, las muestras contenían otros tipos de compuestos que podrían llegar a interferir, como ser la aparición de perfiles de azúcares en las zonas que interfieren en la asignación de señales.

Cuando se trabaja con este tipo de mezclas complejas es conveniente disminuir el ancho de la señal para obtener mejor resolución de las señales, y para ello hay trabajos que sugieren agregar a las mezclas ácido pícrico (Charisiadis P. et al, 2014), lo cual se tendrá en cuenta a futuro.

En cuanto a los extractos utilizados, sería necesaria la aplicación de técnicas cromatografías para separar en fracciones de diversa polaridad de manera de ir purificando los extractos en los diversos componentes que podrían haber sido extraídos conjuntamente con los polifenoles para una mejor caracterización espectroscópica.

A su vez, se deberán mejorar las condiciones experimentales de la muestra para permitir la aplicación de experimentos 2D como ser HMBC-RMN de correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (que muestra los carbonos que se encuentran a 2 o 3 enlaces de distancia de los protones) o HSQC (que muestra los carbonos a 1 enlace de distancia de los protones), para revelar las constantes de acoplamiento de largo alcance de los protones hidroxilo y, por tanto, para proporcionar inequívocamente la asignación de señales.

El RMN es una técnica analítica de alta resolución, muy prometedora para el análisis de productos naturales complejos como el propóleos. Es sumamente útil para el reconocimiento y detección de compuestos en muestras con matrices complejas. En un experimento de RMN se genera gran cantidad de información que debe ser procesada con herramientas estadísticas adecuadas y que se ajusten al diseño experimental planteado. O lo que es mejor, se debe diseñar un muestreo y tratamiento de muestra, adecuados para poder hacer un uso racional y rutinario de estas herramientas de análisis espectros de RMN.

De esta manera se proporcionaría una mejora considerable en el estudio de los nutraceuticos o alimentos funcionales ricos en compuestos correspondientes de salud.

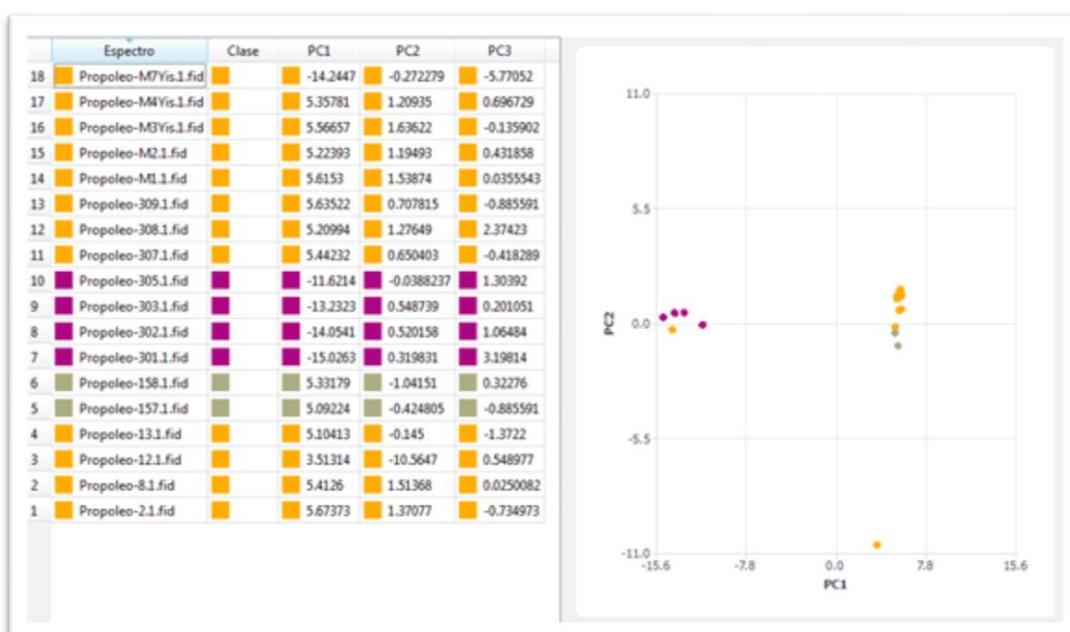
Como perspectivas para este punto en la investigación con la información obtenida hasta el momento de presentar la Tesis, será apuntar a la necesidad de crear y aplicar protocolos de muestreo, de pre tratamiento de los extractos y de análisis de espectros simultáneamente con la cuantificación de los componentes identificados.

### **III.2.2 Análisis metabólicomico.**

Para el tratamiento de datos espectroscópicos se aplicó el análisis de componentes principales (PCA), que se recomienda siempre como punto de partida para el análisis de datos multivariados ya que proporciona una visión general de la información oculta en los datos.

El PCA se realizó para todas muestras (Figura 29) donde se observa la dispersión de los datos según su origen formando dos *clusters*. El PCA 1 explica el 77.3 % de toda la población y el PCA2 muestra un máximo de la varianza residual siendo de un 7.6 %. Siendo las señales entre 7-8 ppm y 12-13 ppm las variables que más contribuyen al modelo.

Se encontró un outlier correspondiente a una muestra de propóleos que se estaría comportando similarmente a las de orujo de uva, o podría tratarse de una posible contaminación cruzada de esa muestra o se podría pensar a priori que la ubicación de las colmenas donde fue recolectada la muestra estaría en un entorno geográfico cercano a plantaciones de vid.

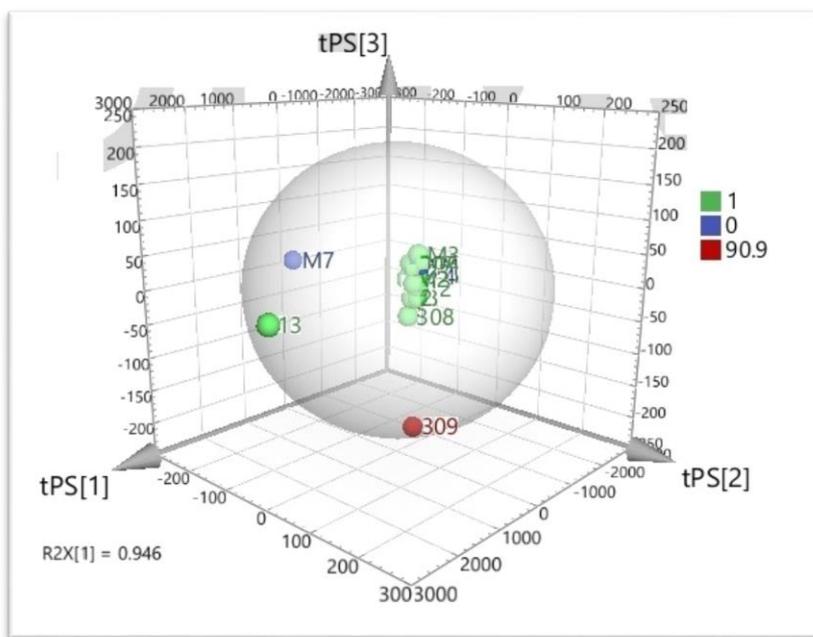


**Figura 29.** Resultados de los estudios de componentes principales (PCA) de los 18 espectros RMN obtenidos. A la derecha se muestra el listado de muestras analizadas, en color amarillo las muestras de propóleos, en color violeta muestras de orujos de uva y en color verde las mezclas orujo y propóleos. A la derecha el grafico del PCA2 vs PCA1.

La información adicional al PCA que se puede extraer de estos perfiles surge del uso de métodos multivariantes discretos más avanzados, como los PCA-X y/o OPLS-DA, (Kaiser K. et al., 2009).

Con este propósito se diseñó un experimento para modelar un tipo de dato de nuestra población de datos espectrales que alcanza unos 16K de tamaño. De esta manera estaríamos aumentando la separación entre clases, y así simplificar, interpretar, y encontrar biomarcadores potenciales. Para ello, se utilizó el experimento PCA-X con un escalado del tipo pareto, el cual da la variable de una varianza igual a su desviación estándar en lugar de utilizar la varianza unidad, obteniendo una interpretación más sencilla del conjunto de datos espectrales separando por clase X.

La clase elegida (X) para el modelo PCA-X fue la actividad antioxidante DPPH de cada extracto, y se tomó como criterio 0 para muestras con menos del 50% capacidad antioxidante y 1 para muestras mayores del 50%. Se generó una elipse de Hotelling con un 95% de intervalo de confianza y el resultado mostro una correlación de  $r^2=0.94$  y se separaron las muestras en cuatro *clusters* (Figura 30), Se podría conjeturar a priori que estos resultados estadísticos muestran que nuestros propóleos serian de 4 tipos diferentes de acuerdo a su capacidad antioxidante.



**Figura 30.** Modelo PCA-X de todas las muestras de propóleos representadas en una elipse de Hotelling, 95%.

Sin embargo para seguir apoyando esta hipótesis, sería necesario aplicar otros tipos de estudios estadísticos que ofrecen un nuevo marco para el análisis de datos metabonómicos. Un ejemplo de ello

sería el OPLS-DA mencionado (proyección ortogonal discriminante de PLS), pero que no fueron posibles de realizar para esta Tesis a causa del tipo de diseño experimental aplicado en la preparación de las muestras y del tipo de muestreo. Por lo que una vez definido el diseño experimental, el pretratamiento de la muestra, y la realización de experimentos 1D y los de correlación 2D mencionados en el punto anterior se tendrán los datos espectroscópicos necesarios para poder realizar experimentos que permitan correlaciones estadísticas (Clendinen C. S. et al., 2014).

En términos generales el uso de la quimiometría en la metabonomía es que los beneficios del diseño experimental estadístico conjuntamente con el uso de métodos de modelización del tipo PLS y OPLS de los perfiles metabonómicos obtenidos por RMN se podrían llegar a aplicar para detectar biomarcadores en muestras complejas, como sugiere la bibliografía relevada (Kaiser K. et al., 2009; Geiszler et. al 2013). La investigación de biomarcadores en productos naturales ha adquirido relevancia en estos últimos tiempos como método de screening para buscar metabolitos relevantes para alguna actividad biológica benéfica o perjudicial para la salud humana.

En esta Tesis se aplicó un procedimiento para la búsqueda de polifenoles en el propóleo como biomarcadores de efecto antioxidante, los datos adquiridos mostraron la presencia de protones característicos del esqueleto tipo flavonoide, pero fueron insuficientes para llevar a cabo el análisis estadístico que propone la bibliografía para determinar cuáles son los flavonoides presentes. Se necesita complementar con experimentos 2D, de correlación con espectros de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ). Un ejemplo de ello es el procedimiento que se conoce con su sigla en inglés STOCSY, es una técnica de espectroscopia del tipo estadístico de correlación total. La misma se aprovecha de la multicolinealidad de las variables de intensidad en un set de espectros (como pueden ser los espectros RMN  $^1\text{H}$  1D) para generar un pseudo-espectro bidimensional de RMN que muestra la correlación entre las intensidades de los diversos picos de toda la muestra.

Por lo tanto, como perspectivas para este punto, se propone diseñar un plan de muestreo y un protocolo de pre-tratamiento de las muestras que se ajusten a los métodos estadísticos de análisis que se sugieren en bibliografía para la identificación de moléculas potenciales biomarcadores en estudios metabonómicos basado en datos espectroscópicos de NMR (Cloarec O. et al. 2005).

### **III.3 ESTUDIOS DE DESCRIPTORES ELECTRÓNICOS Y DE BIODISPONIBILIDAD DE LAS ESPECIES NEUTRAS Y RADICALARIAS DE POLIFENOLES**

“Antioxidant activity by Molecular modeling and Quantum Chemical DFT calculations of polyphenolic compounds from Uruguayan Propolis and Vitis Vinifera Grape Pomace”

Margot Paulino, Elena Alvareda, Pablo Denis, Federico Iribarne, Pablo Miranda and Sara Aguilera, Claudio Olea-Azar. (Publicacion en preparación).

Esta investigación se realizó en dos etapas. En la primera se estudió la asociación entre la actividad antioxidante y determinados descriptores moleculares que permitieran caracterizar cada compuesto y racionalizar su actividad antioxidante. Con ese objetivo se estudiaron el índice de Lipinski, el coeficiente de reparto  $\log P(o/w)$ , la estructura química, las representaciones farmacofóricas, el valor de energía del HOMO (KJ/mol), y las energías de disociación del enlace OH (BDE) mediante cálculos DFT (M06-2X/6-311+G(3df,2p).

En la segunda etapa, se optimizó la medida de las energías de disociación del enlace OH utilizando un nivel de cálculo más avanzado (DFT-G4 y MO6-2X)

En todos los casos se utilizó de la base de datos de 123 polifenoles descrita en I b 2.8.

#### **III.3.1 Índice de Lipinski.**

Este índice permite evaluar cualitativamente determinadas condiciones que puede cumplir una molécula, para ser candidata a ser suministrada vía oral. La regla de “5 de Lipinski” indica una molécula debiera: a) presentar menos de 10 átomos aceptores o donadores de enlace de hidrógeno, b) poseer valores de  $\log P(o/w)$  entre -5 y 5, y c) poseer un peso molecular menor a 500 D. Si una molécula cumple con hasta 3 de esos requisitos, se le asigna un índice de Lipinski igual a 1 y en otro caso, igual a 0. Si el resultado es 1 eso permite conjeturar que las propiedades de biodistribución son las adecuadas para que pueda funcionar farmacológicamente una vez que se administra como un medicamento via oral en seres humanos.

En nuestro caso, aplicado a la base de fenoles en estudio, se tuvo como resultado (Tabla 4) que las antocianinas y procianidinas poseen un valor 0, interpretándose que no serían adecuadas en cuanto a su

reparto entre las membranas y lipoproteínas, siendo a priori inadecuadas como futuros componentes bioactivos para el desarrollo de medicamentos de uso oral.

### **III.3.2 Coeficiente de reparto octanol/agua (logP(o/w))**

En cuanto al **coeficiente de reparto octanol/agua (logP(o/w))** (Tabla 4), se encontró que aquellos compuestos que dieron un coeficiente de reparto negativo (muy hidrófilos): son: Delfinidin-3,7-diglucosido (44256889), Petunidin-3,7-diglucosido (44256973), Quercetin-7-O-neohesperidosido, Malvidin-3,7-diglucosido (44256982), Naringina (442428), Miricetin-3-O-galactosido (5491408), Quercetin-3-O-galactosido (5281643), Laricitrin-3-O-glucosido (44259475), Miricetin-3-O-glucoside (5486615), Quercetin-3-O-glucosido (54758678), Isorhamnetin-3-O-glucosido (5318645), Siringetin-3-O-glucosido (44259492). De estos 12 compuestos identificados, 7 son flavonoides glicosidados.

En general, todos los flavonoides (excepto los flavanoles) se encuentran glicosilados en los alimentos y la posición más frecuentemente implicada en la glicosilación es la 3, aunque también puede darse en 5 y 7, siendo la glucosa el azúcar más frecuente, aunque también aparecen xilosa, ribosa, fructosa y ramnosa o diglicosidos como rutinosa. Este hecho limita la absorción en el organismo. Probablemente la mayoría de los glicósidos resisten la hidrólisis ácida en el estómago, pudiendo llegar intactos al duodeno. Una vez que son hidrolizados por enzimas del tracto gastrointestinal o en la microflora, la mayoría de polifenoles O-glicósidos liberarían su aglicón para ser absorbidos. En el intestino delgado solamente se absorben los aglicones y algunos glicosidos siendo estos metabolitos más hidrófobos siendo transportados eficientemente (Manach C, 2004). Por lo cual para aumentar la biodisponibilidad de aquellos polifenoles promitentes en cuanto a su acción como antioxidantes o inhibidores de ciclooxigenasas (potenciales antiinflamatorios), estos factores deberán ser considerados, a la hora del diseño de la forma farmacéutica que contendrá el extracto del producto natural enriquecido.

### **III.3.3 Estructura química.**

También podríamos observar nuestra muestra desde el punto de vista de su estructura química. Estudios anteriores (Trouillas P, 2003) sugieren que aquellos polifenoles candidatos a ser los mejores antioxidantes captadores de radicales libres, serían quienes posean: presencia de doble enlace C2-C3 que aumenta la actividad antioxidante por aumento de la conjugación electrónica y presencia del OH en

C3 del anillo C que aumenta la actividad como se vio con valores de DPPH altos en flavonoles (quercetina) y flavonas (luteolina) y muy bajos para flavanonas (pinocembrina, naringenina) (Paulino et al, 2008).

De acuerdo a este criterio, podemos indicar que existe un subgrupo de interés farmacológico dentro de nuestra base de polifenoles que serían los ácidos fenólicos y los flavonoides, que serían buenos formadores de radicales libres y con una relativa buena biodisponibilidad para ser ingeridos vía oral.

### **III.3.4 Modelos farmacofóricos de los polifenoles de la Base de datos.**

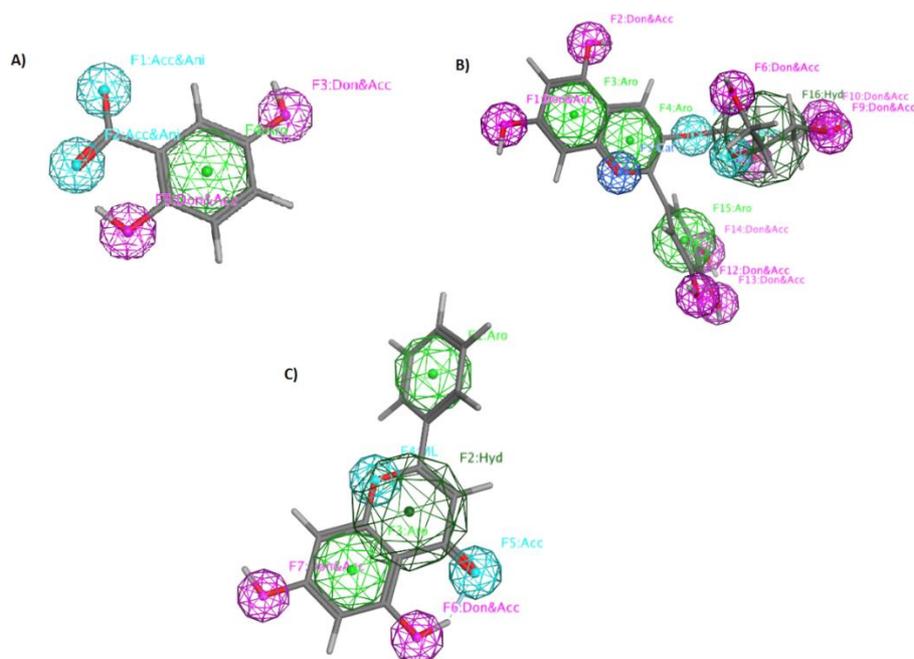
Los modelos farmacofóricos se muestran en la Figura 31. Estos fueron obtenidos mediante el esquema PPCH (Polar Planar Charged Hydrophobic). Este esquema diferencia entre aceptores y dadores de hidrógeno planos ( $sp^2$ ) o no ( $sp^3$ ) y entre áreas hidrofóbicas planas o no.

Con este esquema se generaron tres tipos de farmacóforos con los cuales se pudo identificar tres grupos estructurales diferentes: ácidos fenólicos, antocianinas y flavonoides (Figura 31).

El farmacóforo para ácidos fenólicos incluye tres características: aceptor de enlace de hidrógeno (Acc), aromático (Aro) y aniónico (Ani). El grupo carboxilato estuvo representado por una combinación de Acc y Ani (Acc & Ani). Cuando se utilizó este farmacóforo para buscar dentro de la base de datos, se seleccionaron 27 moléculas con estas características.

El farmacóforo de antocianinas, si bien es complejo, tiene como principal característica la presencia de la carga positiva (característica catiónica). Si se utiliza solamente esta propiedad farmacofórica, en un primer filtro se obtuvieron 27 del total de antocianinas. Eso implica que considerar solamente esta característica no contempla la complejidad de estas estructuras. Por ejemplo se observa para el caso de la Delfinidina-3-O-glucosido, además de su característica catiónica, presenta nueve grupos hidroxilos que farmacofóricamente podrían actuar como regiones aceptoras o donadoras de H, una característica adicional de aceptor de hidrógeno (el oxígeno del glicosilo) otras dos características de ligando metálico, tres características aromáticas (anillos fenólicos) y una hidrofóbica no aromática (el anillo de glicosilo). El farmacóforo de los flavonoides fue construido con características hidrofóbica (Aro), Acc, y Don & Ac que describe la función de los hidróxidos polares. Se encontraron 38 moléculas que contienen estas características. Algunos de ellos combinan otras características como por ejemplos las cargas positivas

(antocianos), ésteres, glucósidos. La crisina fue seleccionada como un ejemplo y se muestra en la Figura 31.



**Figura 31.** Modelos farmacofóricos de 3 estructuras químicas diferentes. A) Ácidos fenólicos. B) Antocianinas y C) Flavonoides. En rosado se muestran las características catiónicas donadoras yceptoras (don&acc), en celeste las características aniónicas donadoras yceptoras (don&acc), en verde la característica hidrofóbica (hyd o aro), en azul la carga positiva de las antocianinas.

### III.3.5 Energías de los orbitales moleculares ocupados de más alta energía (HOMO) de los polifenoles.

Se obtuvieron (Tabla 4) las energías de los HOMO en KJ/mol por cálculos semiempíricos mediante el Hamiltoniano PM3 para las moléculas neutras.

La molécula neutra con el valor más alto de HOMO podría ser la que en términos energéticos tuviese más facilidad para perder el H por lo que sería más fácil de oxidar y ser, a su vez, el mejor compuesto antioxidante.

Según el valor de este descriptor, los resultados muestran que se definen claramente tres grupos. El primer grupo con las energías más altas de HOMO que son la de los ácidos fenólicos, el segundo los flavonoides con valores intermedios y el tercero las antiocianinas y procianidinas con los valores de HOMO más bajos. Por lo cual *a priori* se podría decir que las estructuras del tercer grupo no serían buenas formadoras de radicales libres. Si consideramos que además estos grupos estructurales resultaron tener índices de Lipinski 0 y poseer una carga positiva, su biodisponibilidad estaría comprometida.

### **III.3.6 Energías de disociación del enlace OH (BDE) mediante teoría de funcionales de densidad DFT, (M06-2X/6-311+G(3df,2p))**

Existe otro escenario que podría ser propuesto para estudiar la reactividad de estas especies fenólicas como antioxidantes: una vez que ingresan en el metabolismo y forman un radical libre (i.e. ROS), deben interferir en el estrés oxidativo, atrapando otro radical o incluso volver a ser oxidados formando especies del tipo quinonas.

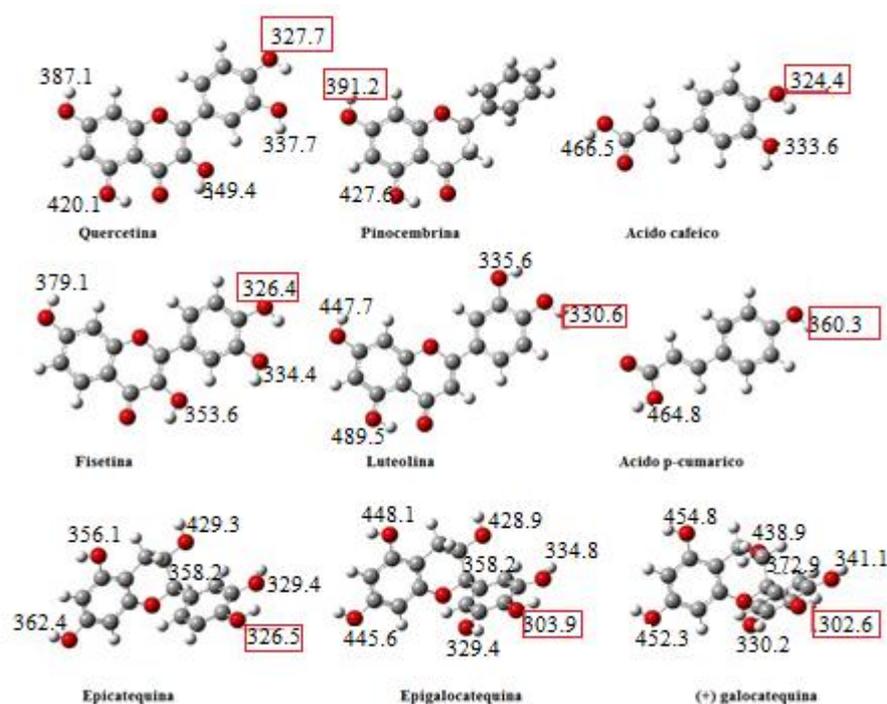
Otros mecanismos clave de estos polifenoles antioxidantes como atrapadores de radicales libres fueron descritos por Trouillas, Marsal, Siri, Lazzaroni y Duroux, 2006; Wright, Jonhson y DiLabio, 2001; Pratt, Brigati, Pedulli y Valgimigli, 2001, siendo uno de los más significativos el que involucra las entalpías de disociación del enlace O-H (BDE), según la siguiente ecuación (III.4.1)

$$\text{BDE (ArOH)} = \text{H (ArO}\cdot\text{)} + \text{H (H)} - \text{H (ArOH)} \quad (\text{III.4.1})$$

Donde H (ArO $\cdot$ ) es la entalpía de los radicales generados después de la substracción del H, H (H) es la entalpía para el átomo de hidrógeno (-0,49765 Hartrees como se cita en Zhang et al., 2006) y H (ArOH) es la entalpía del polifenol. Un valor de entalpía de disociación del enlace relativamente baja de la molécula de fenol ArOH (BDE), facilita la pérdida de H entre el antioxidante, formando el radical, sugiriendo una posible mejor capacidad antioxidante.

Para confirmar lo mencionado anteriormente y además apoyar la hipótesis de que los ácidos fenólicos y los flavonoides serían antioxidantes ejerciendo su acción como atrapadores de radicales libres es que es necesario aplicar cálculos químico cuánticos con un nivel de cálculos de mayor precisión (DFT, DFT (M06-2X/6-311+G(3df,2p)), (Frisch et al 2009).

Se realizó un ensayo con una subpoblación de fenoles. Estos se eligieron de la base de datos algunas estructuras representativas de los grupos 2 y 3 diferenciados por los HOMO, los ácidos fenólicos cumárico y cafeico, y los flavonoides pinocembrina, quercetina y luteolina. Se obtuvieron las energías de enlace (BDE) de los OH presentes (ver Figura 32).



**Figura 32.** Resultados de cálculos M06-2X/6-311+G(3df,2p) de las Energías de disociación del enlace OH (BDE) para 9 polifenoles: quercetina, pinocembrina, ácido cafeico, fisetina, luteolina, ácido p-cumarico, epicatequina, epigallocatequina y (+)-galocatequina. Se muestra recuadrado en rojo el valor en kJ/mol del hidroxilo con la mejor BDE.

Los resultados de las BDE se muestran en la Tabla 5, se indica cuáles serían los OH tendientes a ceder el H más fácilmente y por ende el lugar donde después se formaría el radical.

Nombre	Estructura	3OH	5OH	7OH	3`OH	4`OH	5`OH
--------	------------	-----	-----	-----	------	------	------

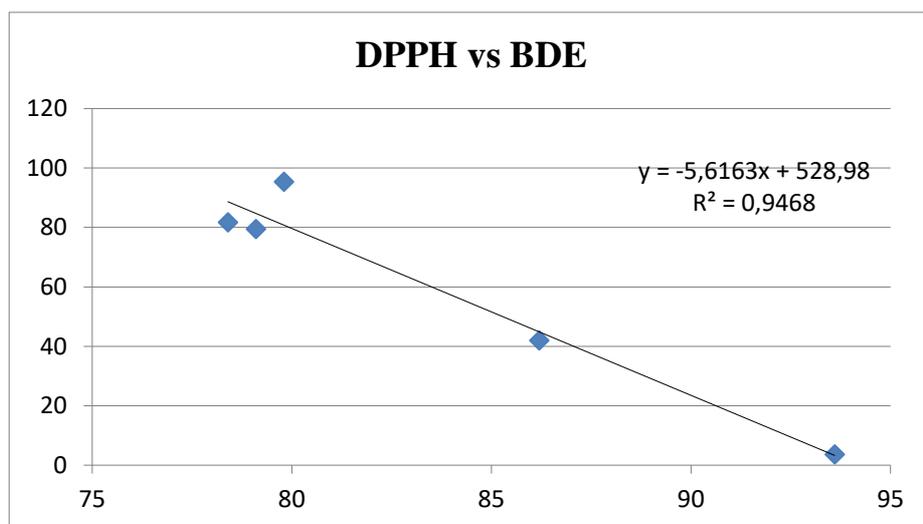
Quercetina	Flavonol	349.4	420.1	387.1	337.7	<b>327.7</b>	
Pinocembrina	Flavanona		427.6	<b>391.2</b>			
Fisetina	Flavonol	353,6		379,1	334,4	<b>326,5</b>	
Luteolina	Flavona				335,7	<b>330,6</b>	
Ácido Cafeico	Acido fenólico				333,6	<b>324,4</b>	
Ácido p-coumarico	Ácido fenólico					<b>343,6</b>	
Epicatequina	(Flavanol) Catequina	429,3	356,1	362,4	329,4	<b>326,5</b>	
Epigallocatequina	(Flavanol) Catequina	428,9	448,1	445,6	334,8	<b>303,9</b>	329,4
(+)-galocatequina	(Flavanol) Catequina	438,9	454,8	452,3	341,1	<b>302,6</b>	330,2

**Tabla 5.** Resultados de cálculos M06-2X/6-311+G(3df,2p) de las Energías de disociación del enlace de OH (BDE) para un set de fenoles. Los valores están en kJ/mol y en negrita se muestra la energía más baja favorable para la formación del radical.

- Estos cálculos estarían mostrando termodinámicamente donde estaría localizado el radical fenólico.
- Según los resultados, se puede ver que el factor fundamental que determina que tan estable es el radical que queda al romper el enlace O-H es el número de enlaces de hidrogeno intramoleculares que formaría. Por ej. en la epigallocatequina y en la (+)-galocatequina, si se saca el H del OH en para, ese radical O\* puede formar dos enlaces de H con los OH adyacentes y eso hace que sea muy estable el radical C-O\*. Así la BDE baja hasta 300 para estas catequinas en relación con la epicatequina que

solo tiene un OH adyacente, y cuyo valor de BDE es de 321.9 kJ, más alto por tener un enlace de H menos.

- Según Bakalbassis et al., 2003 la estructura más probable de una molécula antioxidante en solución es la que favorece la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares; la adopción de enlace de hidrógeno intramolecular es el más probable en la fase de gas y/o en soluciones muy diluidas. Por lo tanto podríamos estar en nuestro caso ante dos situaciones que se contraponen en medio fisiológico, por un lado las catequinas son muy buenas a la hora de formar el radical pero al presentar la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno intramoleculares hace que ese radical se estabilice impidiendo en esa parte su acción como antioxidante haciéndolos menos reactivos, y lo mismo podría suceder en cualquier molécula que presente la posibilidad de formar enlaces de hidrogeno intramoleculares que comprometan la acción del radical.
- Por otro lado, se encontró una correlación del 95% entre la BDE de los OH más reactivos (valores bajos de BDE) y las medidas de DPPH (Paulino et al, 2008), (ver Figura 33). Al usar el modelo para predecir los valores de DPPH de las catequinas resulto que solamente se podía predecir el valor de epicatequina con un 90.3 % DPPH, este valor es el que debería darnos *in vitro* pero por lo que estuvimos discutiendo de los enlaces intramoleculares experimentalmente este valor probablemente sea diferente. En la bibliografía relevada se encontraron buenos valores de inhibición del radical DPPH *in vitro* por parte de las catequinas provenientes de infusiones de té, con una alta correlación entre el contenido fenolico total y el DPPH, y en particular una fuerte correlación entre la presencia del 3'OH del anillo B y el DPPH y a su vez destacan que la presencia de un grupo galato sustituyendo el OH en el carbono 3 (ej. Epigalocatequina) favorece la acción antioxidante observando un aumento en la inhibición del DPPH (Roy M.K. et al., 2010).
- Por lo tanto las catequinas son buenas antioxidantes. El desafío estaría en dilucidar cual o cuales serían los verdaderos mecanismos por el cual ejercen su acción, ya que si extrapolamos para dos catequinas (epigalocatequina y (+)-galocatequina) nuestro modelo predictivo sobre valora el DPPH (>100), esto podría estar indicando que estas moléculas son antioxidantes pero que la medida de BDE no explicaría del todo el mecanismo propuesto sino que se estaría necesitando otro parámetro para explicarlo.



**Figura 33.** Correlación de las medidas de DPPH (Paulino, et al 2008) de los ácidos cafeico, cumárico, luteolina, pinocembrina, fisetina y quercetina vs los OH que resultaron más reactivos según cálculos DFT. Se presenta la ecuación y el coeficiente de correlación  $R^2$

A nivel químico cuántico podemos inferir según estos resultados que para el caso de quercetina, fisetina, luteolina, epicatequina, epigallocatequina, (+)-galocatequina, y el ácido p-cumárico, el OH en posición para (en el caso de los flavonoides sería 4'OH del anillo B) tendría la termodinámica favorable para formar el radical fenilo en ese lugar y continuar con el mecanismo antirradicalario reaccionando con los radicales libres.

Este resultado concuerda con lo informado en bibliografía (Zhang H. et al 2003; Trouillas P. et. al., 2006) donde describían al mecanismo de acción antioxidante relacionado con la capacidad de *scavenger* de los fenoles en una transferencia acoplada de protón-electrón (descrito en el Capítulo II-sección 2.5). En este mecanismo, antioxidante se producía la disociación homolítica de enlaces OH de compuestos polifenólicos. Esta reacción podía ocurrir en cada grupo OH del compuesto fenólico (ArOH) dependiendo de la energía de disociación del enlace O-H (BDE) del grupo OH y la entalpía de reacción. Cuanto menor es la BDE, más fácil es la ruptura del enlace OH y más importante su papel en la reactividad antioxidante.

Cuando llevamos a cabo un estudio piloto QSAR vimos que existe correlación entre la BDE de los OH más reactivos y las medidas de DPPH. Según los valores energéticos obtenidos, los derivados catequínicos mostraron los valores más bajos del enlace O-H, aquellos polifenoles con hidroxilos

presentes en el anillo B en la posición 3' y 4' serían los candidatos a formar el radical más estable. Esto concuerda con las características estructurales para ser un buen antioxidante y también mencionado en Sawai Y. et al 2000, donde realizaron el ensayo de DPPH pero detectando por RMN la pérdida del H de los OH 4' y/o 3', siendo los que intervienen en la captura del radical DPPH. Estos hidroxilos presentes en el anillo B pueden donar fácilmente sus hidrógenos y electrones a diferentes radicales ya que el radical flavonoide que se genera esta muy estabilizado, (Cao G. et al 1997), lo que quedaría demostrado con nuestros cálculos DFT.

De todas maneras hay que tener presente que podría haber una competencia en algunos casos con el OH en 3 del anillo C como es el caso de la flavona luteolina cuyo H más débil es aquel ubicado en el OH en posición 4' y la energía para el 3' es bastante similar.

En el caso del ácido cafeico la posición favorable para formar el radical es la 3' como lo indica el resultado de su menor energía, este resultado concuerda con lo encontrado en bibliografía (Bakalbassis E.G. et al., 2003).

En el caso de las catequinas (epicatequina, epigallocatequina y (+)-galocatequina) el más débil es el ubicado en posición 4'. Por lo cual la presencia de un grupo catecol en el anillo B aumenta considerablemente la capacidad antioxidante, pero según los cálculos DFT en la flavonona pinocembrina carente de este grupo también se formaría un radical en el OH en posición 7 del anillo A, algunos autores mencionan que esos radicales son relativamente inestables y serian malos neutralizantes de otros radicales (Burda et al., 2001).

### **III.3.7 Entalpias de formación de los flavonoides por métodos G4 y M06-2X/6-311+G(3df,2p).**

Como resultados de esta etapa se presenta la siguiente publicación:



Contents lists available at ScienceDirect

Computational and Theoretical Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/comptc](http://www.elsevier.com/locate/comptc)

## Bond dissociation energies and enthalpies of formation of flavonoids: A G4 and M06-2X investigation



Elena Alvareda\*, Pablo A. Denis\*, Federico Iribarne, Margot Paulino

Computational Nanotechnology, DETEMA Facultad de Química, Gral. Flores 2124, CC 1157, 11800 UDELAR, Montevideo, Uruguay

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 May 2016  
 Received in revised form 16 June 2016  
 Accepted 17 June 2016  
 Available online 17 June 2016

### ABSTRACT

By means of G4 theory and M06-2X calculations we investigated the thermochemistry and C–OH bond ruptures of quercetin, fistein, lutelin, caffeic acid, pinocembrin and p-coumaric acid. Notwithstanding the fact that we observed a good agreement for the prediction of the weakest O–H bond, the mean absolute deviation (MAD) between the bond dissociation energies (BDE) computed at the G4 and M06-2X/6-311+G(3df,2p) levels was 5.0 kcal/mol. With regard to the  $\Delta H_{f,0}^{\circ}$  computed at the M06-2X/6-311+G(3df,2p) level, the MAD was 10.0 kcal/mol. Therefore, thanks to error cancellation the error found for the O–H BDE was smaller. Intramolecular hydrogen bond is one of the key factors stabilizing the oxygen radicals formed when the CO–H bonds are broken. Finally, we propose the following enthalpies of formation at 0 K: –222.0, –174.5, –180.2, –134.4, –109.7 and –91.9 kcal/mol for quercetin, fistein, lutelin, caffeic acid, pinocembrin and p-coumaric acid, respectively.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### Resumen:

En este trabajo se demuestra en un nivel atómico que algunos flavonoides extraídos de productos naturales interactúan en el estrés oxidativo como antioxidantes. En consecuencia, estos fitoquímicos son responsables de algunas acciones beneficiosas sobre la salud humana.

Los flavonoides pueden reducir el estrés oxidativo actuar como secuestrantes de radicales libres a través de una posible vía, por medio de la cual se produce la disociación del enlace O–H, y se transfiere el H al radical. Por esta razón, se han realizado varias investigaciones para identificar los sitios donde pueden ser encontradas las energías de disociación enlace CO–H (BDE) más bajas.

Por el momento se han encontrado trabajos, de determinaciones de BDE para C–OH usando un nivel de cálculo por funcionales de densidad (DFT). A pesar de que los métodos DFT son muy útiles para estudiar las propiedades termoquímicas, su exactitud puede no coincidir con la de ciertos métodos *ab initio*.

Para ello se analizaron las energías aplicando la teoría G4, que pueden llegar a proporcionar resultados de mejor calidad. Por otra parte se decidió realizar una comparación de G4 con los valores obtenidos de entalpías de formación y las BDE de C–OH mediante el cálculo del funcional M06-2X. Para dicho

análisis se utilizó un set de seis compuestos, 4 flavonoides y dos ácidos fenólicos: quercetina, fisetina, lutelina, ácido cafeico, pinocembrina y ácido p-cumárico.

Debido al tamaño de las moléculas investigadas y algunas consideraciones en cuanto al cálculo, no es posible utilizar la teoría de Coupled Clusters (CCSD (T)) para calcular las entalpías de formación ( $\Delta H_f^\circ$ ) de set de polifenoles elegido. Por lo tanto, las  $\Delta H_f^\circ$  se calcularon usando un método que es menos exigente computacionalmente, pero mantiene un cierto nivel de precisión. La metodología elegida fue de nivel G4 de la teoría. Según Curtiss et al. 2007, la teoría G4 tiene una desviación media absoluta (AAD) con respecto al experimento de 3,3 kJ/mol, cuando calcula más de 270 especies y es pequeña (2,8 kJ/mol) al considerar hidrocarburos sustituidos.

En cuanto a nuestras capacidades de cálculo (12 núcleos, con un consumo de 2 TB de espacio en disco y 64 GB de RAM), nos permitieron obtener los resultados para las especies radicalarias de quercetina, fisetina y luteoloina en 7 meses.

Con fines comparativos, se calcularon las energías de disociación del enlace CO-H empleando el funcional M06-2X, mediante el conjunto de bases 6-311 + G (3df, 2p) y empleando el nivel G4.

La discrepancia más importante entre ambos métodos ensayados se relaciona con cuál es la posición de más baja BDE en quercetina. En el nivel G4, la posición 5` tiene un BDE 8,4 kJ/mol más bajo que el valor determinado por la posición 4`. Aunque la diferencia es pequeña, está en contradicción con la mayoría de los resultados disponibles.

Para fisetina hay un excelente acuerdo entre G4 y M06-2X / 6-311 + G (3df, 2p) el valor de BDE en la posición 5` se diferencia por sólo 0,4 kJ/mol. En el mismo sentido, para luteoloina, G4 y M06-2X / 6-311+G (3df, 2p) predicen que el BDE más bajo se produce en la misma posición, es decir, 4`; aunque el valor G4 es de 18,4 kJ/mol más bajo.

Para unos 24 valores de C-OH BDE calculados, encontramos que la desviación absoluta media entre la M06-2X/6-311+ G (3df, 2p) y los valores G4 es de 21,1 kJ/mol, con una desviación máxima de 83,2 kJ/mol. Curiosamente, los errores más grandes siempre están asociados con los grupos OH unidos a los anillos A y B.

En general, se puede decir que el desempeño del método M06-2X /6-311+G (3df, 2p) fue razonable, pero es necesario más trabajo para mejorar la exactitud de los métodos DFT la hora de predecir la BDE. La desviación media de M06-2X / 6-311 + G (3DF, 2p) de las  $\Delta H_f^\circ$  es de 41,8 kJ/mol, un valor mucho más grande que la observada previamente para miembros de cinco anillos que contienen átomos de N (alrededor de 4.2 kJ/mol). Esto puede estar relacionado con el mayor número de átomos presentes en los flavonoides estudiados. En la misma línea, la desviaciones para fisetina y luteolina resultaron similares, mientras que pinocembrina y ácido cafeico resultaron por debajo de 33,4 kJ/mol para su  $\Delta H_f^\circ$ .

Los valores de CO-H BDE mediante nivel G4 muestran una gran variación, desde el valor más bajo para quercetina (296,4 kJ/mol) y el más alto para el ácido cafeico (441,0 kJ/mol). Sin embargo, el grupo OH que presenta la BDE más baja en el anillo C no es siempre el mismo.

Para el ácido cafeico y luteolina el vínculo más débil de C-OH es en posición 4'. Sus valores de BDE son muy similares, 316,0 y 312,2 kJ/mol, para ácido cafeico y luteolina respectivamente. Es muy importante hacer hincapié en el papel desempeñado por los enlaces de hidrógeno intramoleculares para estabilizar los radicales C-O\* formados. A nivel de G4, se determinó que el enlace de hidrógeno intramolecular COH::OC en el ácido cafeico y en la lutelina contribuye con 33,4 y 37,2 kJ/mol, respectivamente, a la estabilidad del radical formado cuando se pierde H. Esto explica por qué la capacidad de inhibición de los flavonoides con el anillo B orto-dihidroxilado sería el doble de la de los flavonoides con sólo un grupo OH en el anillo B.

De acuerdo con los resultados experimentales, la quercetina tiene mayor poder antioxidante y esta actividad se correlaciona con el hecho de que su BDE es más baja, (296.4,9 kJ/mol) en la posición 5'. En cuanto a la BDE determinada para el anillo C en quercetina, fisetina y luteolina, esta revela que los grupos funcionales presentes es el anillo A y B influyen en el BDE de los grupos OH presentes en el anillo C. Por ejemplo, la eliminación de un grupo OH a partir de la posición 5 aumenta el BDE en el 5' y el 4' por 29,7 y 38,0 kJ/mol, respectivamente, al comparar la quercetina y fisetina. Aunque en menor medida, la eliminación de OH en la posición 3 también aumenta el BDE por 20,9 y 7,5 kJ/mol, para las posiciones 5' y 4', respectivamente.

Esta comparación se hizo utilizando la posición 3' de luteolina y la 5' de la quercetina, dado que la eliminación del grupo OH en 3 cambia la orientación del anillo C en luteolina con respecto a la quercetina.

Estos resultados arrojaron datos sobre que la luteolina no es plana, con una desviación de 22.0°. En cambio para la quercetina, los cálculos M06-2X / 6-311+ G (3df, 2p), sugieren que no es plana con un ángulo de 10.0°, valor que está de acuerdo con el ángulo de torsión experimental de 7° observado para la estructura cristalográfica del cristal de xantina oxidasa (PDBid: 3NVY).

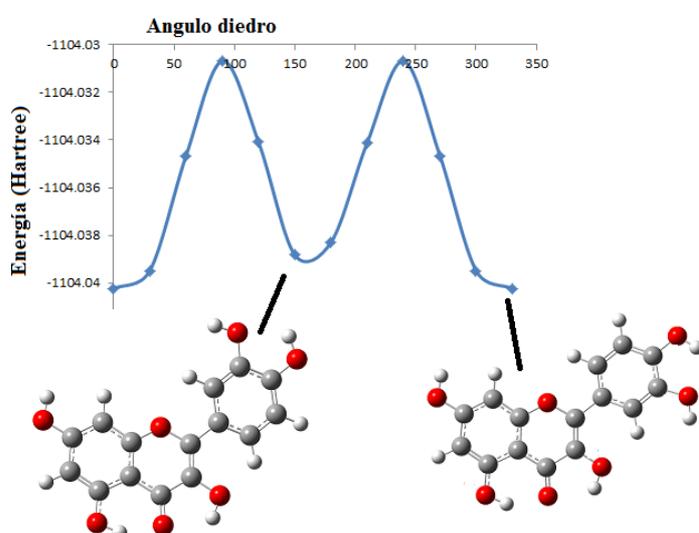
Por último, los valores más bajos de BDE en los anillos A y B se encuentran en la posición 3. En efecto, para la quercetina el BDE del grupo OH en 3 es baja (338,2 kJ/mol). Esto concuerda con los resultados reportados en bibliografía (Trouillas et al. 2006), y hemos encontrado que cuando los grupos OH están presentes en el anillo C se obtienen valores de BDE más bajos.

Sin embargo, hay algunas discrepancias con este autor, con respecto a la BDE más baja en el anillo C. Por ejemplo, el método B3LYP / 6-311 + G (d, p) utilizado por Trouillas et al. 2006 y las estimaciones usadas del G B3LYP 311++G(d,p) por Zhang et al. 2013, sugieren que el BDE más bajo encontrado sería en 4'. Sin embargo, nuestros cálculos G4 y M06-2X / 6 a 3111 + G (3df, 2p) indicaron que sería el 5' como el sitio con BDE más bajo en línea con el B3LYP / 6-31G/ que concuerda con los resultados reportados por Sadeghipour et al. 2005.

Otro estudio que se realizó simultáneamente en esta etapa fue el análisis del ángulo de torsión para la Quercetina versus la Energía. Los perfiles de torsión alrededor de los enlaces C3-C2-C'1-C'6, que muestran la planaridad de esa fracción molecular y el efecto sobre las propiedades moleculares de la rotación del resto catecol (anillo B), se estudiaron para relacionar la influencia de los posibles diferentes sustituyentes hidroxilos, y esto también se relacionó con la deslocalización de la carga. Esto sugiere que se podrían dar diferentes posibilidades de enlaces de hidrogeno intramolecular entre las diferentes posiciones.

El resultado del estudio mostró que la barrera de torsión del ángulo diedro posee un mínimo a los -10.8 ° para la conformación de la derecha siendo la más estable con una energía de 4615,5 kJ, e indicando que la conformación más contribuyente a la estabilidad es aquella que posee el OH en 3' en el mismo plano del carbonilo con se muestra en la Figura 34.

Se encontró en bibliografía (Aparicio S., 2010) que el ángulo diedro entre el anillo de catecol (anillo B) y el plano formado por los anillos A y C, es de alrededor de 20 ° para las flavonas y los flavonoides sin presencia del hidroxilo en la posición 3 del anillo C (por ejemplo luteolina), mientras que para aquellas moléculas con presencia del hidroxilo en posición C3, como es el caso de la quercetina, el ángulo diedro es de 0 ° y los tres anillos, A, B y C, serían coplanares. Sin embargo nuestros resultados indican que no hay coplanaridad. Otros autores afirman que no existe tal planaridad en los flavonoides que presentan el grupo 3-OH (Russo N., et al., 2000). Esto es importante respecto a que la deslocalización desde el anillo C hasta el B será más efectiva con una estructura plana forzada con la presencia del grupo 3-OH.



**Figura 34.** Gráfico de Energía en Hartree versus el Ángulo diedro de torsión de la quercetina (C3-C2-C'1-C'6) que se muestra indicando que la de la derecha es la conformación más estable.

La conformación más estable estaría colocando al hidroxilo en posición C'3 en el mismo plano del hidroxilo en C3, con una distancia entre el posible radical formado en O-C'3 y el hidrogeno del grupo 3OH de 4.5 Å. Esta conformación es la misma que se obtuvo al crear la base de polifenoles dejando una densidad de carga negativa sobre el fragmento O-C'3.

### III.4 BLANCOS ENZIMÁTICOS

El avance en las investigaciones de hoy en día se dirige hacia una línea que es el uso de fármacos capaces de actuar sobre varios blancos o dianas terapéuticos teniendo en cuenta que mediante tales mecanismos

pueden desencadenar efectos deseados y también efectos secundarios nocivos sobre la salud humana. Si bien existen fármacos que actúan sobre dianas moleculares individuales, se ha visto que en general tienden a ejercer efectos terapéuticos ineficaces o toxicidad grave en el tratamiento de tumores, diabetes, inflamación y otras enfermedades complicadas.

La terapéutica denominada multi blancos (en inglés *multitarget*) que regula múltiples nodos de la red de la enfermedad al mismo tiempo muestra efectos sinérgicos y podría llegar a proporcionar un uso clínico óptimo. Hay investigadores que afirman que los fármacos que afectan a varios objetivos al mismo tiempo son mejores para el control de sistemas de enfermedades complejas. Un caso interesante es el de la enfermedad de la gota (Xu Y., Xa-Di Li, 2009) que se caracteriza a nivel metabólico por la generación de concentraciones elevadas de ácido úrico. En este caso y en particular la artritis gotosa aguda (inflamación de las articulaciones provocada por la gota), los procesos patológicos suelen ir acompañados de una respuesta inflamatoria.

A su vez la generación de ácido úrico libera al medio un gran número de especies reactivas de oxígeno que también puede activar la vía inflamatoria (Kopke A y Greeffa OBW., 2015). Esta vía está asociada a la presencia de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), una enzima clave para la producción de prostaglandinas (PGs), quienes con frecuencia causan la inflamación y el dolor. La inhibición de la COX-2, que suele sobreexpresarse inducida en los procesos inflamatorios, promovería la inhibición de la producción de PGs. Por lo tanto, se podría decir que la COX-2 es una enzima clave para el desarrollo de potenciales antiinflamatorios aplicables para el tratamiento de la gota.

Vinculando ahora el concepto antes desarrollado de los fármacos multitarget, se han encontrado investigaciones que señalan que existen compuestos del tipo flavonoides (luteolina y miricetina) o polifenoles con una alta eficiencia como potenciales antiinflamatorios por inhibir a la COX-2, que inhiben al mismo tiempo a XO (Ya-Di Li et al, 2013).

### III.4.1 Inhibición de Xantina Oxidasa

*“Xanthine oxidase inhibition by Uruguayan Propolis and Grape pomace (Vitis Vinifera)”*.

**Elena Alvareda**, Brenda Vera, Victoria Espinosa, Pablo Miranda, Federico Iribarne, Margot Paulino Z

Enviado y en revisión en el Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.

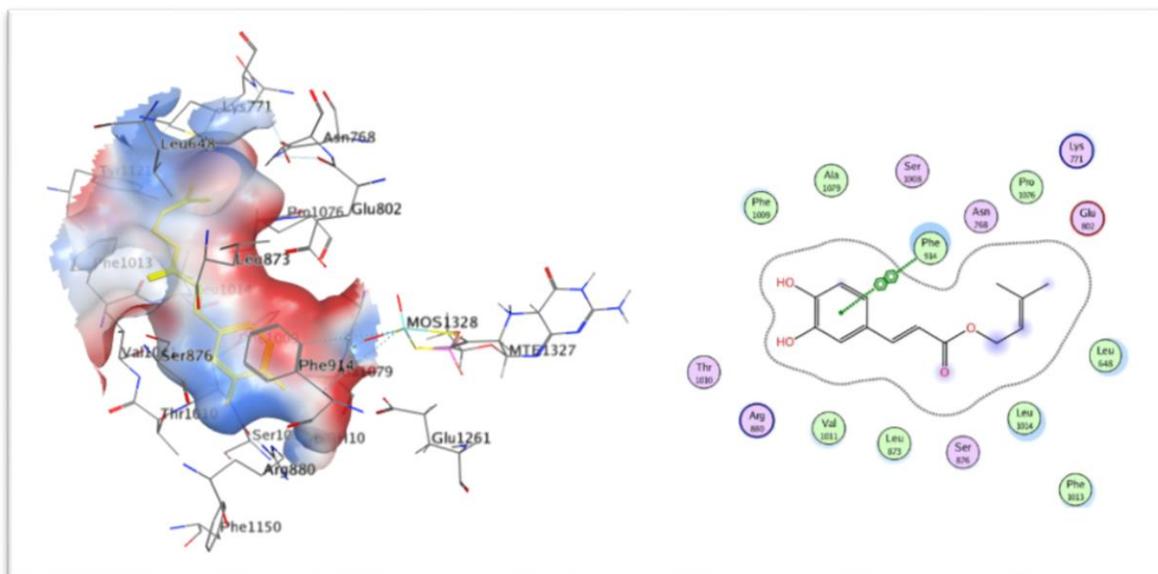
En este trabajo se evaluaron algunos extractos de propóleos y de orujos de uva como posibles inhibidores de la xantina oxidasa (XO), aplicando ensayos experimentales (*in vitro*) complementando con estudios *in silico*. Esta enzima está involucrada en el metabolismo de las bases purinicas y cataliza la formación de ácido úrico con liberación de radicales libres a partir de xantina. Se evaluó la inhibición de la misma, lo cual indirectamente estaría disminuyendo la producción de radicales libres y por ende de ácido úrico y sus patologías asociadas.

En cuanto a las medidas experimentales (*in vitro*), se obtuvo un rango de porcentaje de inhibición de 15.3-68.8%. Las muestras de propóleos (x= 44%) presentaron mayor inhibición que las muestras de orujos (x=31%) (Tabla 6). Por otra parte se ensayó la posibilidad de correlacionar estas medidas inhibitorias con el contenido de fenoles totales (CFT) y no se encontró correlación entre ambas medidas. Estos resultados obtenidos sugieren que nuestros extractos con la mezcla de extracción utilizada etanol/agua (80:20) contienen compuestos que pueden ser antioxidantes participando en mecanismos de antioxidación mediante inhibidores de la XO.

En cuanto a los ensayos *in silico*, estos se realizaron mediante el estudio de anclaje de los 123 polifenoles de la base de datos utilizada anteriormente, como posibles inhibidores competitivos el sustrato xantina. Se utilizó como modelo las coordenadas cristalográficas de XO en complejo con un inhibidor (quercetina) (PDBid: 3NVY).

Otro objetivo de este trabajo consistió en vincular la actividad inhibidora de la enzima con las características estructurales de los componentes de la base de datos mediante el uso de los descriptores estructurales de hidrofobicidad (LogP(o/w)) y la biodisponibilidad usando el índice de Lipinski antes descrito. Tal como se ha descrito en el punto III.3.

En cuanto al procedimiento de anclaje (*docking*), este fue diseñado y validado para reproducir la posición de la quercetina en el cristal. Luego el *docking* se aplicó a todos los polifenoles de la base de datos. El resultado de acoplamiento mostro un 64% de las estructuras con mejor energía que la quercetina. El mejor fenol anclado fue el (E)-cafeato de isoprenilo proveniente del propóleos (Figura 35).



**Figura 35.** 2D Mapa de superficie molecular (izquierda) e Interacciones del ligando (derecha) mejor dockeado en el sitio activo de XO, (E)-cafeato de isoprenilo (score=-24,1955 kJ/mol) en amarillo.

Según los antecedentes (Cao H., Pauff J.M., Hille R., 2014) esta sería una inhibición del tipo competitiva. Teniendo en cuenta esto se extrajeron valores de inhibición ( $IC_{50}$ ) de bibliografía (Cos et al., 1998) y transformándolos en valores de energías libre mediante la aplicación de la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y, Prusoff W.H, 1973), se los correlacionó con las energías (scores) de unión, obtenidas del anclaje, obteniendo una correlación de  $R^2=0.60$ .

Se realizó el análisis de las interacciones de los ligandos con los residuos aminoacídicos del sitio activo, se generó un mapa de contactos del tipo barra (*barcode*), y con la ayuda de una herramienta basada en el software estadístico R<sup>®</sup> (Figuras 36 y 37).



**Figura 37.** Porcentaje de la abundancia de los contactos en el *docking* de la base de datos a XO. El tipo de contactos codificado como ChDon, BkDon corresponden a interacciones donadoras de H en la cadena lateral. ChAcc and BkAcc corresponden a interacciones aceptoras de H en la cadena lateral. Surf corresponde a interacciones de superficie.

Como conclusión de este trabajo podemos decir que los flavonoides y los ésteres de ácidos fenólicos resultaron ser los mejores inhibidores de la enzima XO y a la vez, al poseer índices de biodisponibilidad adecuados, podrían pensarse como componentes bioactivos en el diseño de medicamentos anti gotosos a ser administrados vía oral.

Esto podría explicarse según las interacciones presentes en el microambiente del sitio activo.

A nivel general observando todos los contactos moleculares que se forman en los compuestos anclados, los residuos que intervienen son: Asn650, Met770, Lys771, Glu802, His875, Ser876, Phe914, Thr1010, Val1011. Entre ellos, la Ser876 se presenta con 65,9% de frecuencia o abundancia de contactos del tipo aceptor en su cadena lateral y la Phe914 con un 69,1% mediante una interacción de su superficie aromática lo que parece ser esenciales para la actividad inhibitoria. En particular, dado que el compuesto mejor anclado resultó ser un éster del ácido cafeico, estas interacciones se observaron entre su anillo aromático y el de la Phe914 y entre el grupo OH de la cadena lateral de la Ser876 y el carbonilo del éster.

### **III.4.2 Inhibición de Ciclooxygenasas**

Se presentan dos trabajos publicados que resultaron de la investigación de la actividad inhibitoria de ciclooxigenasas del propóleos y los orujos de uva como potenciales antiinflamatorios:

El primero de ellos en modalidad *proceeding*:



## 196 Antiinflammatory activity of phenolic compounds extracted from Uruguayan propolis and grape

Elena Alvareda, Pablo Miranda, Victoria Espinosa, Helena Pardo, Sara Aguilera & Margot Paulino Zunini

To cite this article: Elena Alvareda, Pablo Miranda, Victoria Espinosa, Helena Pardo, Sara Aguilera & Margot Paulino Zunini (2015) 196 Antiinflammatory activity of phenolic compounds extracted from Uruguayan propolis and grape, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 33:sup1, 129-129, DOI: [10.1080/07391102.2015.1032833](https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1032833)

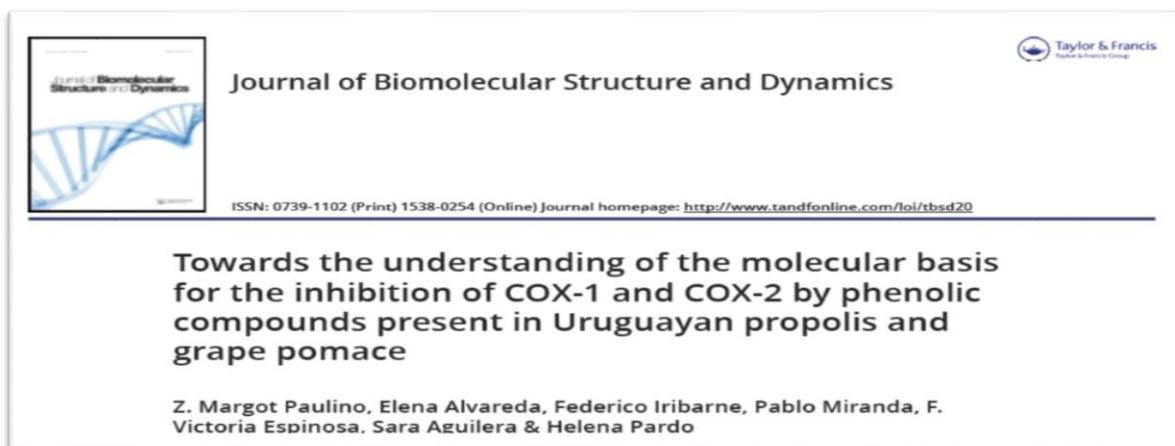
To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2015.1032833>

 Published online: 23 Jun 2015.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 Article views: 130

El segundo trabajo publicado es:



En esta investigación se estudió la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2) por parte de los extractos de propóleos y orujos de uva, analizando su actividad como potenciales antiinflamatorios. Se indicó a nivel molecular aquellas características involucradas con la selectividad frente a COX-2. Se realizaron los análisis por dos enfoques *in vitro* en *in silico*.

Se testearon extractos almacenados desde el 2008 hasta el 2013 de propóleos y de orujos de uva uruguayos directamente sobre ambas enzimas. El resultado mostró un rango de inhibición de las

muestras de 24.7-77.1 % en COX-2 (con un promedio de inhibición de 58.8 %) y un rango de 39.4-72.7 % en COX-1 (con un promedio de 61.2 %). No se encontraron diferencias significativas de inhibición entre propóleos y orujos de uva.

Para los ensayos *in silico* se utilizó la base de datos de 123 polifenoles (Tabla 4), objeto de investigación de esta Tesis, y tomando como referencia las estructuras cristalográficas obtenidas del *Protein Data Bank* de COX-1 (PDBid: 3KK6) y COX-2 (PDBid: 3LN1) en complejo con el fármaco comercial Celecoxib<sup>®</sup>, se ajustaron los 123 modelos moleculares en los sitios de unión del fármaco en ambas enzimas.

Se desarrolló un procedimiento de anclaje y se validó el mismo mediante el uso de una función de puntuación (*scoring*) denominada *Affinity ΔG*, además se complementó el análisis de la superficie molecular del sitio activo de ambas enzimas, creando un farmacóforo del sitio con características moleculares relacionadas con la polaridad. Luego de realizar el anclaje de la base de datos de los polifenoles, se aplicó como filtro este farmacóforo para toda la base de polifenoles.

Los ensayos *in silico* del anclaje (*docking*) en ambas enzimas, mostraron que el mejor inhibidor de COX-2 resultó ser el ácido (Z)-ferrárico proveniente de los orujos de uva. Tomando como índice de selectividad el cociente entre ambos valores de score (COX-2/COX-1), el resultado para el ácido (Z)-ferrárico fue de 1.9 respecto a COX-1. Esto sugiere que es el mejor inhibidor selectivo de COX-2 de la muestra estudiada.

Cuando se estudiaron a nivel molecular ambos sitios de anclaje, se visualizó una diferencia de polaridad: los aminoácidos del sitio de unión (Tyr341, Tyr101, Val74, Pro71, Arg106, Glu510, Leu109 y Ser105) en el caso de la COX-2 y Glu524, Pro86 y Arg120 en el caso de la COX-1, mostraron que el sitio activo de COX-2 presenta mayor polaridad.

Los resultados más importantes de este trabajo dieron a conocer que los extractos tienen una inhibición muy similar en COX-1 y COX-2, es decir, que no poseen la inhibición selectiva la actividad de la COX-2. Sin embargo, 10 compuestos de la base de datos fenólica resultaron ser más selectivos y 94 fenoles resultaron con selectividad similar al Celecoxib<sup>®</sup>, un resultado correlacionado con medidas de inhibición experimentales (IC<sub>50</sub>) (Badiéyan et al., 2012; Ya-Di et al., 2011).

En cuanto a las características de los sitios de unión los resultados mostraron una mayor polaridad en la COX-2 en comparación con la COX-1, lo que sugiere que la polaridad es la clave para la selectividad. En consecuencia, la proyección y análisis de los contactos moleculares logro señalar a los residuos:

Arg106, Gln178, Leu338, Ser339, Tyr341, Tyr371, Arg499, Ala502, Val509 y Ser516, que explicarían, en el nivel atómico, el efecto inhibidor de COX-2 como potencial efecto antiinflamatorio, de los compuestos fenólicos. Entre ellos, se encontró que los residuos Gln178 y Arg499 parecen ser esenciales para la inhibición selectiva de COX-2.

# CAPÍTULO IV



## CONCLUSIONES GENERALES

Esta Tesis aportó conocimiento científico mediante la aplicación de metodología *in silico* al estudio de mezclas complejas de polifenoles en propóleos y orujos de uvas, que se vincularon a estudios de capacidades antioxidantes realizadas en laboratorio húmedo o *in vitro*.

El propóleo es un producto relativamente variable en su composición dada la presencia de ceras así como su contenido altamente variable. Se verificó que la mayor extracción de polifenoles se obtuvo con la mezcla de extracción etanol/agua (80:20) y el procedimiento de extracción a reflujo. El orujo de uvas por su parte presentó su mejor rendimiento de extracción con maceración y una mezcla etanol/agua (50:50).

En las muestras de Uruguay, el origen geográfico no parece influir en el contenido total de compuestos fenólicos, lo cual fue corroborado al evaluar los perfiles de protón por resonancia magnética nuclear. Todas las regiones de Uruguay fueron aptas para la obtención de extractos de propóleos con altas concentraciones en fenoles por poseer la vegetación necesaria para el proceso de elaboración de las abejas. Con respecto al muestreo anual, se observó una desviación de 10% de en los valores medios anuales que podría atribuirse a cambios climáticos. Los extractos de propóleos presentaron cantidades relativamente mayores de polifenoles que los de orujos de uva, siendo el contenido de la variedad Tannat el que presentó los valores máximos en el caso de estos últimos.

Las medidas experimentales de acción antioxidante variaron según la cantidad de fenoles totales (CFT) presentes en las muestras. Se encontró que la relación entre CFT y capacidad atrapadora de radicales libres medida por DPPH fue de 63% para los propóleos y un 83% para orujos de uva. Este resultado podría estar indicando que para las diferentes composiciones fenólicas detectadas en ambos productos y corroboradas por los perfiles de RMN  $^1\text{H}$ , estas mezclas presenten moléculas fenólicas que no actúan como atrapadoras de radicales libres, o que presentan eficiencias o mecanismos diferentes en su capacidad de atrapar radicales libres.

Se obtuvo una correlación del 52% entre las medidas DPPH y ABTS para todas las muestras, lo cual se revisó teniendo en cuenta que los fenoles presentes en las mezclas pueden realizar su acción antioxidante a través de dos mecanismos de acción diferentes (SET y HAT) para la transferencia del protón, dependiendo de las características del medio de reacción (como el pH, presencia de oxígeno, presencia de luz), la estequiometría, factores cinéticos y/o posibles sinergismos o antagonismos de los componentes de la mezcla.

En consecuencia, la búsqueda de la relación entre la estructura y la reactividad antioxidante se investigó mediante el uso de estrategias químico cuánticas usando la base metodológica de la Teoría de Funcionales de Densidad (DFT) con las que se calcularon energías de disociación de enlace (BDE) para quercetina, pinocembrina, ácido cafeico, fisetina, luteolina, ácido p-coumarico, epicatequina, epigallocatequina y (+)-galocatequina.

Se realizó el cálculo del BDE mediante funcionales M06-2X/6-311 + G (3df, 2p) de cada uno de los OH de los fenoles estudiados, resultando el BDE de los OH más reactivos correlacionado en un 95% con las medidas de DPPH de esos mismos fenoles reportados en la literatura. También, en base a los valores obtenidos de BDE se observó que la presencia de más de un grupo OH en la estructura de los polifenoles, estaría influyendo en la estabilidad o desestabilización molecular del radical fenoxilo ya que la importancia de la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares sería un factor clave en la estabilidad del radical comprometiendo su función como posible atrapador de radicales libres. Esta característica sería un indicador molecular que permita encontrar este tipo de configuraciones tendientes a disminuir o aumentar la capacidad antioxidante.

Con respecto a las entalpías de formación a 0 K, estas se pudieron predecir a nivel M06-2X/6-311+G(3df,2p), resultando -919.6, -729.4, -753.2, -561.8, - 458,5 y - 384,1 kJ / mol para quercetina, fisteina, lutelina, ácido cafeico, pinocembrina y ácido p-cumárico, respectivamente (Alvareda E., et al., 2016). A su vez, la desviación absoluta media (MAD) entre las energías de disociación (BDE) calculadas por G4 y por M06-2X/6-311 + G (3df, 2p) fue de 20,9 kJ/mol.

En cuanto a las actividades biológicas, los extractos resultaron poseer actividad *in vitro* inhibitoria de xantina oxidasa, impidiendo la formación de ácido úrico y de radicales libres. A su vez, *in silico* se pudo modelar la inhibición mediante el anclaje de los polifenoles a XO el cual se validó previamente utilizando valores de IC<sub>50</sub> de algunos flavonoides. Se determinó que los mejores polifenoles inhibidores eran aquellos provenientes del propóleos. Por otro lado los extractos resultaron ser potenciales antiinflamatorios por la inhibición *in vitro* de las ciclooxigenasas 1 y 2. Se modeló el anclaje validado de los polifenoles a ambas enzimas, los resultados permitieron identificar compuestos polifenólicos con un cierto grado de selectividad frente a COX-2, provenientes mayoritariamente de los orujos de uva. Esta selectividad podría verse favorecida variando la polaridad de los extractos (Paulino M. et al. 2015).

Como materias primas, el propóleos tienen alto valor agregado en oposición al orujo de uvas, un subproducto relativamente de bajo valor comercial, configurando la mezcla una materia prima de mediano costo a la que se le agrega valor con esta investigación, lo que la califica como interesante para futuros proyectos innovadores de desarrollo de productos nutracéuticos y alimentos funcionales. Siendo además un producto biodegradable y sustentable, lo cual minimiza el impacto en el medioambiente.

Finalmente, se puede concluir en vista de los resultados obtenidos, que esta investigación confiere evidencia científica para evaluar la calidad de los propóleos y orujos de uva, proporcionando valor agregado a estos productos, para sus posibles usos como fármacos o alimentos funcionales, con propiedades antioxidantes y potencialmente antiinflamatorias comprobadas. El aporte de conocimiento general y específico en diversas áreas además ofrece un marco al consumidor para que estos productos puedan ser comercializados de diversas maneras. En el caso del extracto etanol/agua (80:20), este fue el que mejor extrajo los polifenoles bioactivos en los propóleos, en cambio para los orujos de uva fue el extracto etanol/agua (50:50). Si estos extractos llegan a ser utilizados como parte de un alimento funcional y dependiendo el caso, sería necesario posiblemente evaluar las características organolépticas y sensoriales para enmascarar el sabor (a propóleos o a uvas), como ser mediante el uso de nanopartículas como se viene investigando por parte de otros grupos de investigación de la UdelaR. Se comprobó que los extractos de propóleos presentaron una concentración alta de fenoles totales y se pudo evaluar que, en particular ciertas estructuras (flavonoides y ácidos fenólicos) serían las responsables de conferirle mayor capacidad antioxidante. El desafío estaría dado en patronizar estos extractos, concentrándolos en

estos compuestos bioactivos. En cuanto al poder antiinflamatorio (por inhibición de COXs) de los extractos, este resultó ser relativamente bueno. El extracto de orujo de uva presentó concentraciones menores de compuestos fenólicos, sugiriendo que a pesar de poseer menor cantidad de compuestos fenólicos totales, estos se correlacionaron mejor con las actividades antioxidantes de scavengers (DPPH) y al mismo tiempo los mejores compuestos potencialmente antiinflamatorios obtenidos de los estudios *in silico* (el ácido ferarico, algunos derivados antocianos) provinieron de estos extractos.

## **PERSPECTIVAS**

- ❖ Redacción de un artículo científico con los datos obtenidos y que se discuten en el apartado III.3, referido a los descriptores moleculares, en especial a las energías de disociación de enlace O-H de los polifenoles, mediante el uso de cálculos DFT y G4, de manera de analizar posibles correlaciones con nuevas medidas experimentales de actividad antioxidante y antiinflamatoria que se ensayen. Del mismo modo, ir retroalimentando los ensayos *in silico* con aquellos compuestos polifenólicos identificados de los ensayos de RMN como promisorios biomarcadores.
  
- ❖ Continuar con la divulgación a nivel nacional e internacional nuestros resultados, mediante publicaciones y/o participación en congresos o eventos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alencar, S. et al. (2007) *J. Ethnopharmacol* 113(2): 278-83.
- Alov P., Tsakovska I. and Pajeva I. (2015) *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15 (2), 89
- Amico, V. et al. (2004) *Food Chem.*, 88, 599-607.
- Andersen O. and Markham K. (2005) *Taylor and Francis, CRC Press*, 1-1256.
- Angelini G, Vena G. and Meneghini C. (1987) *Contact Dermatitis* 17, 251-253.
- Aparicio S. (2010) *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2017-2038.
- Badieyan, Z., et al. (2012) *The Open Medicinal Chemistry Journal*, 6, 15–19.
- Bakalbassis E. et al (2003) *JAOCS*, 80(5), 459-467.
- Bankova V. et al. (1995) *Naturforsch.* 50, 167 -172.
- Bankova, V., de Castro S., and Marcucci. M. (2000) *Apidologie* 31(1), 3-15.
- Banskota A. et al., (1998) *J. Nat. Prod.*, 61(7), 896–900.
- Blobaum, A. and Marnett, L. (2007) *J. Med. Chem* 50(7), 1425-1441.
- Boido, E. et al., (2006) *J. Agric. Food Chem* 54, 6692–6704.
- Brand-Williams, W. (1995) *Food Science and Technology* 28: 25-30.
- Cao H., Pauff J.M., and Hille R. (2014) *Journal of Natural Products* 25; 77 (7), 1693-9.
- Cayman Chemical Company Copyright 2014, from <https://www.caymanchem.com/pdfs/560131.pdf>.  
Acceso: mayo 2013.
- Cheng Y. and Prusoff W. (1973) *Biochem Pharmacol* 22 (23), 3099–108.
- Chi Y., Cheon B. and Kim H. (2001) *Biochem Pharmacol* 61, 1195–203.
- Chimi, H. et al. (1991) *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68 (5), 307-312.
- Clendinen C. et al. (2014) *Anal. Chem.* 86, 9242–9250.
- Cloarec O. et al. (2005) *Anal. Chem.* 77, 1282-1289.
- Cronstein B. and Weissmann G. (1995) *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35, 449-62.
- Cos, P. (1998) *Journal of Natural Products*, 61, 71-76.
- Curtiss L. et al. (1998) *J. Chem. Phys.*, 109(8), 18.
- Curtiss L., Redfern P., and Raghavachari K., (2005) *J. Chem. Phys.*, 123, 124107
- Curtiss L., Redfern P., and Raghavachari K., (2007) *J. Chem. Phys.*, 126, 084108.
- Curtiss L. Redfern P., Raghavachari K. (2007) *The journal of chemical physics* 126, 084108.

- Daviss, B. (2005) *The Scientist* 19(8), 25–28.
- De Lorgeril, M. and Salen P. (1999) *Lancet*, 353(9158), 1067–1067
- De Castro, S. (2011) *Annual Review of Biomedical Sciences* 3, 49–83.
- Del Valle, G. (2011) *Biomedicine & Aging Pathology* 1, 1–7.
- Drago, M. (2007) *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 38(2), 42-47
- Drews, J. et al. (2000) *Science*, 287, 1960-1964.
- Dudareva, N. et al., (2006) *Crit Rev Plant Sci*, 25, 417-440.
- Edelsbrunner, H. (1995) *Proceedings of the 28th Hawaii International Conference on Systems Science*, 256-264.
- Enroth, C. (2000) *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 97, 10723-10728.
- Ehrlich P. (1909) *Dtsch. Chem. Ges.* 42, 17.
- Falcão, S., et al. (2010) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(2), 887-897.
- Farré, R., Frasquet, I., and Sánchez, A. (2004) *Ars. Pharmaceutica* 45, 21-43.
- Fiehn O. (2002) *Plant MolBiol* 48(1-2), 155-171.
- Gil del Valle, L. (2010) *Biomedicine&Pharmacotherapy* 1(2), 129-133.
- González-Gallego J, Sánchez-Campos S, and Tuñón M. (2007) *Nutr Hosp.* 22(3), 287-93.
- Głuszko P., and Bielińska A. (2009) *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 119(4), 231-235.
- Gutfinger, T. (1981) *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58 (11), 966-968
- Halgren, T. (1999) *Journal of Computational Chemistry* 20(7), 720-729.
- Havsteen, B. (2002) *Pharm Therap.* 96, 67–202.
- Hayashi T. et al. (1988) *J Nat Prod* 51, 345–348.
- Hehre W., Radom L., Schleyer PvR., Pople J., *Molecular Orbital Theory*; John Wiley & Sons, Inc. New York. 1986.
- Hille, R. and Sprecher H. (1987) *The Journal of Biological Chemistry*, 262(23), 10914-10917.
- Hille, R. (2006) *European Journal of Inorganic Chemistry*, 1913-1926.
- Hore P. (1995) *Nuclear magnetic resonance*. Oxford University Press, Oxford; New York.
- Hyun, K. et al., (2010), *Food Chemistry* 119, 619-625.
- Joubert, D. (1998). *Ed. Density Functionals: Theory and Applications*, Publisher: Springer-Verlag, Heidelberg, Copyright Holder: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kaiser K., Barding Jr G. and Larive C. (2009) *Magn. Reson. Chem.* 47, 147–156

- Kopke, A and Greeffa O. (2015) *South African Family Practice*; 57(1), 6-12.
- Kumazawa, S., Hamasaka, R., and Nakayama, T. (2004) *Food Chem* 84(3), 329-339.
- Kumazawa, S., et al. (2002). *J Agric Food Chem* 50(17), 4777-82.
- Kurumbail RG, Kiefer JR, Marnett LJ. (2001) *Curr Opin Struct Biol.* 11(6), 752-60.
- Kuskoski, M., et al. (2005) *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4), 726-732.
- Labat R. (2014) *Pathologie Biologie*, 62(2), 61-66.
- Lipinski, C. A., et al. (1997) *Adv. Drug Deliv.* 23: 3-26.
- Lipinski C.A et al. (2001) *Adv. Drug Deliv.* 41(1.3), 3-23.
- Lin C.Y. et al. (2007) *Metabolomics* 3(1), 55-67.
- Luna C. (2011) Tesis de grado en Ingeniería Agropecuaria Pontificia Universidad Católica de Ecuador  
 Autor: Carmen Luna acceso: <http://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/161/1/T72598> Acceso:  
 octubre 2015.
- Manach C., Donovan J. (2004) *Free Radical Research.* 38(8), 771-785.
- Mansuri M., Parihar P., Solanki I., and Parihar M. (2014) *Genes Nutr.* 9(3), 400.
- Maraschin M. et al. (2015) *Journal of Natural Products* ASAP DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00315
- Marcucci, M. (1995) *Apidologie*, 26, 83-99.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M., and Ros, G. (2000) *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50(1), 5-18.
- Marnett L., Rowlinson S., Lanzo C., Goodwin D., Kalgutkar A. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 22903-22906.
- Mendoza, U., Garcia J., Gastell, P., and Armenteros, A. (2005) *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 24(2).
- MNOVA 10.0.2. NMR MestReNova versión, MestreLab© Research S.L
- Molyneux, P. (2004) *Songklanakarín J. Sci. Technol* 26: 211-219.
- Morgan, B. and Harris C. (2015) *Nature Reviews Drug Discovery* 14, 857–877.
- Mutoh M. et al., (2000) *Jpn J Cancer Res.* 91(7): p. 686-91.
- Nicholson JK, Lindon JC, and Holmes E. (1999) *Xenobiotica*: 29(11):1181-1189.
- Nagao, A., Seki, M., Kobayashi, H., (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1787.
- Pace-Asciak, C. R., et al. (1995) *Clinica Chimica Acta* 235: 207-219.
- Palomino, P (2010) *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 63(1), 5373-5383.

- Paulino-Zunini, M., et al. (2010) *Journal of the Chilean Chemical Society* 551: 141-146.
- Paulino-Zunini, M., et al. (2015) *Journal of Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*.  
<http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2015.1124808>. Acceso junio 2016.
- Parks, D., and Granger, D. (1986) *Acta Physiol Scand Suppl* 548, 87-99.
- Peña, R. (2008). *Ciencia e investigación Agraria* 35: 17-26.
- Popova M., et al. (2007) *Apidologie* 38: 306-311.
- Ramírez Escobedo, M., et al. (2012) *Rev Mex Cienc Farm* 43:4, 7-14.
- Re, R., (1999) *Free Radic Biol Med*. 26(9-10): 1231-7.
- Rice-Evans, C. (2004) *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7) 827 – 828.
- Rice-Evans, C. (1993) *Free Radical Biology & Medicine*, (15) 77-96.
- Robertson D. (2005) *Toxicol. Sci.* 85(2): 809–22.
- Rodríguez Barboza Y. (2011) Tesis de grado para optar al título de Químico Farmacéutico. Título: Análisis *in vitro* e *in silico* de la actividad inhibitoria sobre xantina oxidasa, y análisis de la capacidad captadora de radicales libres de extractos etanólicos de propóleos provenientes de Uruguay. Departamento de Química y Farmacia-Facultad de ciencias-Universidad Católica del Norte-Antofagasta-Chile.
- Romano R., Della Védova C., and Downs A. (2002) *J. Phys. Chem. A* 106: 7235.
- Roy M. et al., (2010). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(2): 109–124.
- Russo, N. et at., (2000) *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3232–3237.
- Saksela, M., and Raivio, K. (1996) *Biochem J.* 315, 235-239.
- Sadeghipour M., Terreux R., and Phipps J. (2005) *Toxicol. In Vitro* 19, 155–165.
- Schaich, K.M., Tian X., and Xie J. (2015) *Journal of functional foods*, 14, 111-125.
- Sethian, J. (1998) *Acta Math. Univ. Comenianae* LXVII 3–15.
- Serhan C, Ward P, Gilroy D. (2010) *Fundamentals of inflammation*. New York USA: Cambridge university press; 253-317.
- Shah SH, Kraus WE, Newgard CB. (2012) *Circulation*. 126:1110-20.
- Shintu L, Baudoin R, Navratil V, Prot JM, Pontoizeau C, Defernez M, et al. (2012) *Anal Chem.*; 84:1840-8.
- Silva, V., G. Genta, et al. (2011). *Agric Food Chem* 59(12): 6430-7.

Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). *Methods in Enzymology* 299: 153-178.

Stewart, James J. P. (1989). *Journal of Computational Chemistry* 10(2):209, 221.

Stewart, James J. P. (1991). *Journal of Computational Chemistry* 12(3):320.

Tomazzoli M., et al., (2015) *Journal of Integrative Bioinformatics*, 12(4):279.

Trouillas, P., et al (2003) *Food Chemistry* 97(4): 679-688.

Trouillas P., et al., (2006) *Food Chem.* 97, 679.

Trygg J. et al. (2007) *Journal of Proteome Research.* 6, 469-479.

Valko, M., Rhodes, C., Monocol, J., and Izakovic-Mazur, M. (2006) *Chem Biol Interact* 160: 1-40.

Valls, J. et al., (2009) *Journal of Chromatography A*, 1216, 7143–7172.

Vom Endt, D. et al., (2002) *Phytochemistry*, 61(2): 107-114.

Wagh V., (2013) *Advances in Pharmacological Sciences*, Hindawi Publishing Corporation, 2013: 1-11.

Wang, J., et. al., (2000) *Journal of Computational Chemistry*, 21: 1049-1074.

Weiner, S.J et. al., (1986) *Journal of Computational Chemistry*, 7: 230–252.

Wermuth C. G. et al., (1998) *Pure Applied Chemistry* 70: 1129-1143.

Williams, R.J et al., (2004) *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7): 838 – 849.

Wu S. et al., (2008) *Biotechnology*, 19:145–152.

Xu, Y., and Li Ya-Di (2009) *Acta Pharmaceutica Sinica*, 44:226–230.

Ya-Di. Li et al., (2011) *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9(2): 0156–0160.

Ya-Di. Li et al., (2013) *Chem Biol Drug Des*; 81: 537–544.

Yang, C., and Wang, Z. (1993) *Journal of the National Cancer Institute*, 85 (13), 1038-1049.

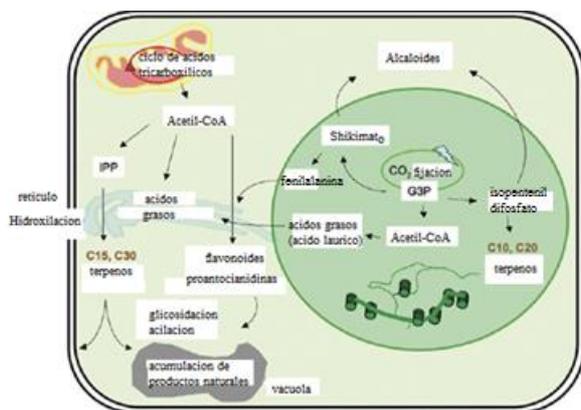
Zarghi A. and Arfaei S. (2011) *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 10(4): 655-683.

Zhang, H., et al., (2003) *Chem. Eur. J.*, 9(2): 502-508

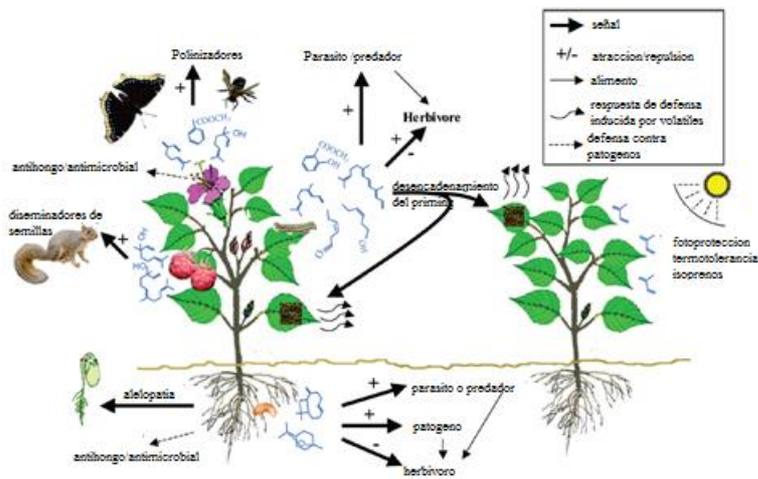
Zhang, H. et al., (2013) *J. Phys. Chem. A* 117, 1784–1794.

Zhao, Y. and Truhlar, D. (2008) *Theor. Chem. Acc.* 120: 215-241.

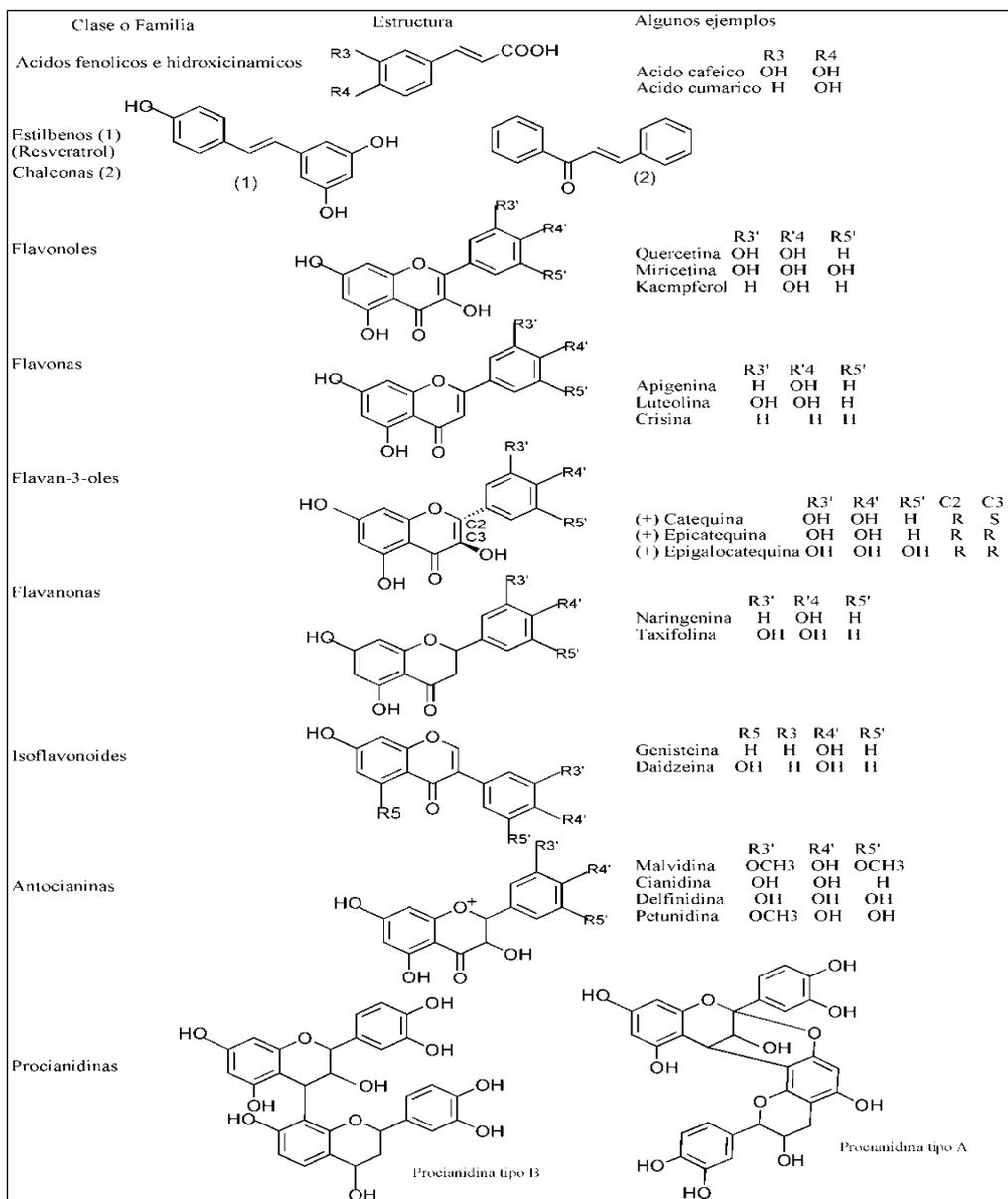
## ANEXOS



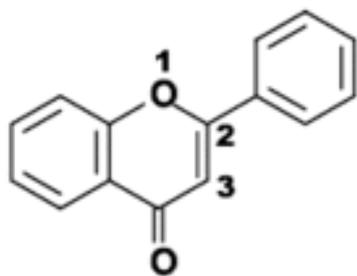
**Figura1.** Esquema de la biosíntesis de metabolitos secundarios en las plantas. Donde G3P es el gliceril 3-fosfato IPP (Wu et. al., 2008)



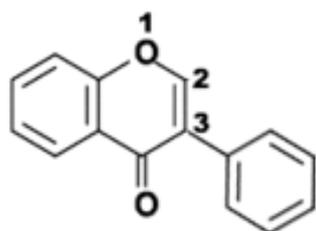
**Figura 2.** Interacciones entre compuestos volátiles de plantas y el medio ambiente circundante (Dudareva, 2007).



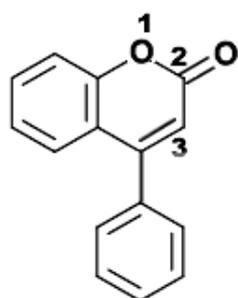
**Figura 3.** Origen vegetal de los diferentes tipos de flavonoides, enlazados a azucares (flavonoides glicosidados), o libres (flavonoides agliconas) como es el caso de las flavanonas (catequinas y proantocianidinas).



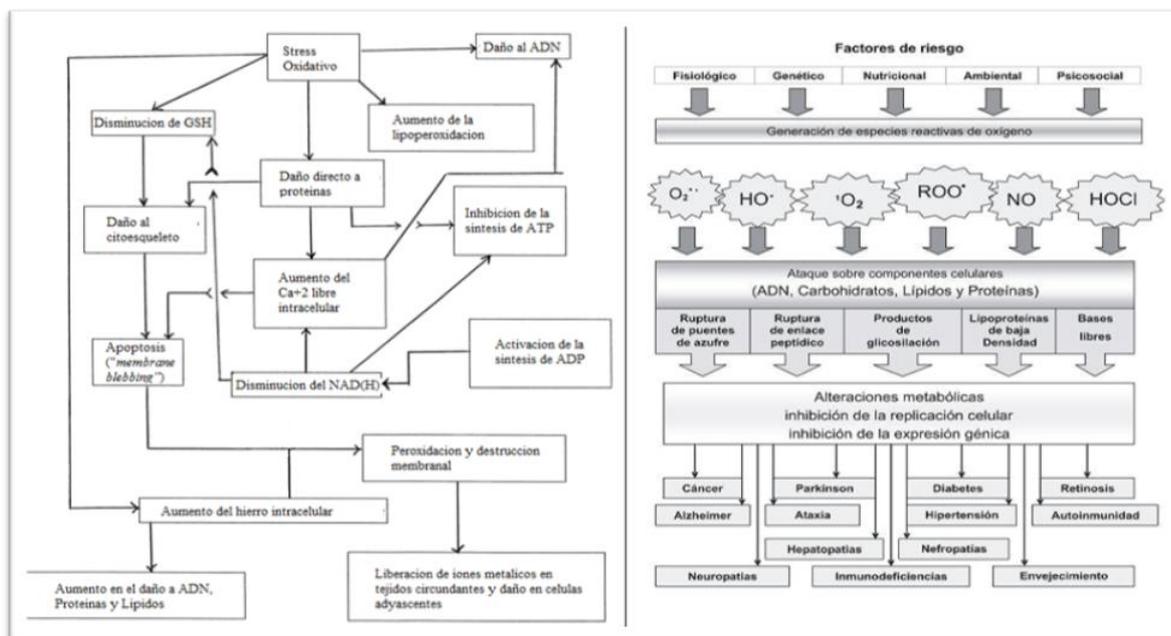
**Figura 5.** Estructura química de la 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona), esqueleto de los flavonoides.



**Figura 6.** Estructura química de la 3-fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirona), esqueleto de los isoflavonoides.



**Figura 7.** Estructura química de la 4-fenilcumarina (4-fenil-1,2-benzopirona), esqueleto de los neoflavonoides.



**Figura 8.** Mecanismos y enfermedades ocasionadas por el daño celular en el Stress oxidativo.

**Tabla 1.** Origen geográfico, fuente vegetal y composición química de diferentes tipos de propóleos.

(Banskota A. H., et al., 1998).

Tipo de propóleos	Origen Geográfico	Fuente vegetal	Principales compuestos bioactivos
Propóleos de álamo	Europa, América del Norte, regiones no tropicales de Asia.	<i>Populus</i> spp., comúnmente en <i>P. nigra</i> L.	Flavonas, flavanonas, ácidos fenólicos y sus esterés.
Propóleos de abedul	Rusia	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.	Flavonas y flavonoles
Propóleos verde (romero)	Brasil	<i>Baccharis</i> spp., predominantemente en <i>B. dracunculifolia</i> DC.	Ácidos p-cumárico prenilados, ácidos diterpenicos.
Propóleos rojo (clusia)	Cuba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas polipreniladas
Propóleos del Pacifico	Región del Pacifico (Okinawa, Taiwan)	Desconocida	C-prenilflavononas
Propóleos canario	Islas Canarias	Desconocida	Lignanós furofuranos.

**Tabla 2.** Diferentes solventes utilizados para extraer diversos compuestos. (Wagh V.D, et al. 2013)

<b>Agua</b>	<b>Metanol</b>	<b>Etanol</b>	<b>Cloroformo</b>	<b>Dicloroetano</b>	<b>Éter</b>	<b>Acetona</b>
Antocianinas	Antocianinas	Taninos,	Terpenoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoles
taninos	taninos	polifenoles	flavonoides	taninos	terpenoides	
saponinas	saponinas	poliacetilenos		polifenoles	cumarinas	
almidones	terpenoides	terpenoides		poliacetilenos	ácidos grasos	
terpenoides	xantoxilina,	esteroles		esteroles		
polipeptidos	totarol	alcaloides		alcaloides		
lectinas	quasinoides					
	lactonas					
	flavonas					
	fenonas					
	polifenoles					
	polipéptidos					
	lectinas					

**Tabla 3 A.** Resultados obtenidos del contenido fenólico total (CFT). Muestras de propóleos (prop), orujos de uva (o) y mezclas (mixt). \*Valor medido en el 2013. \*Ref = Reflujo, EtOH = Etanol, W = Agua, Sox = Soxhlet, Hex = Hexano, Son = Sonicación, Cent = Centrifugacion, Diss = Disolucion, RV

= Rotavaporacion, RC = Reconstitucion, macer = maceracion, CS = Cabernet-Sauvignon, Reext = Re extraccion

<b>Muestras</b>	<b>Método de extracción</b>	<b>Origen geográfico</b>	<b>mgGAE /L</b>
prop 1 2008	Ref EtOH/W 80/20	Noroeste Uruguay	614.58
prop 2 2008	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	504.17
prop 6 2008	Ref EtOH/W 80/20	Noroeste Uruguay	520.42
prop 8 2008	Sox hex Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	570.27
prop 8 2008	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	605.42
prop 8 2008	Son Ref EtOH/W 50/50 2g	Uruguay	380.32
prop 8 2008	Son Ref Cent W 100	Uruguay	32.63
prop 11 2008	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	402.5
prop 12 2008	Ref EtOH/W 80/20	Noroeste Uruguay	696.67
prop 12 2008	Son Sox hex Ref EtOH/W 80/20	Noroeste Uruguay	481.57
prop 16 2008	Ref EtOH/W 80/20	Suroeste Uruguay	131.67
prop 17 2008	Ref EtOH/W 80/20	Noroeste Uruguay	280.00
prop 18 2008	Ref EtOH/W 80/20	Centro oeste Uruguay	124.58
prop 19 2008	Ref EtOH/W 80/20	Sureste Uruguay	505.83
prop 41 2009	Sox hex Ref EtOH/W 80/20	Centro oeste Uruguay	758.36
prop 29(2) 2009	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	567.45

prop 3 2008	Ref EtOH/W 80/20	Norte Chile Atacama	16.25
prop 4 2008	Ref EtOH/W 80/20	Suroeste Uruguay	522.50
prop 5 2008	Ref EtOH/W 80/20	Norte Chile Atacama	21.25
prop 30(6) 2009	Ref EtOH/W 80/20	Noroeste Uruguay	640.18
prop 7 2008	Ref EtOH/W 80/20	Sur Chile Maule	467.50
prop 31(8) 2009	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	657.91
prop 9 2008	Ref EtOH/W 80/20	Centro oeste Uruguay	557.08
prop 32(9) 2009	Ref EtOH/W 80/20	Centro oeste Uruguay	667.91
prop 35(9) 2009	Sox hex Ref EtOH/W 80/20	Centro oeste Uruguay	483.36
prop 36(9) 2009	Sox hex Ref EtOH 100	Centro oeste Uruguay	607.00
prop 38 2009	Sox Ref EtOH/W 80/20	Centro oeste Uruguay	844.82
prop 10 2008	Ref EtOH/W 80/20	Norte Uruguay	66.67
prop 33 2009	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	482.91
prop 13 2008	Ref EtOH/W 80/20	Sur Uruguay	534.58
prop 14 2008	Ref EtOH/W 80/20	Suroeste Uruguay	548.33
prop 15 2008	Ref EtOH/W 80/20	Suroeste Uruguay	327.92
prop 20 2009	Ref EtOH/W 80/20	Sur Uruguay	630.91
prop 21 2009	Ref EtOH/W 80/20	Centro Uruguay	261.36

prop 22 2009	Ref EtOH/W 80/20	South West Uruguay	488.64
prop 23 2009	Ref EtOH/W 80/20	Sur este Uruguay	793.64
prop 24 2009	Ref EtOH/W 80/20	Sur Uruguay	340.91
prop 25 2009	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	561.92
prop 41(9) 2009	Ref EtOH/W 80/20	Centro oeste Uruguay	758.36
prop 47 2010	Sox hex Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	754.00
prop 48 2010	Sox hex Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	785.82
prop 49 2010	Sox hex Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	796.73
prop 50 2010	Sox hex Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	836.73
prop 159 2010	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	429
leaf1 2009	Sox hex Ref EtOH/W 80/20	Sur Chile Maule	72.27
leaf54 2009	Ref EtOH/W 80/20	Sur Chile Maule	90.91
Wine1 2009	Ref EtOH/W 80/20	Sur Chile Maule	468.18
mgrape1 2009	Ref EtOH/W 80/20 2g (C S)	Sur Chile Maule	121.82
mgrape1 2009	Ref EtOH/W 80/20 (CS) + RV + RC W	Sur Chile Maule	156.36
mgrape1 2009	macer EtOH/W 80/20 0,5g (CS)	Sur Chile Maule	146.44
mgrape1 2009	macer EtOH/W 50/50 0,5g (C S)	Sur Chile Maule	146.85
mgrape1 2009	macer EtOH/W 80/20 1g (CS)	Sur Chile Maule	251.03

mgrape1 2009	macer EtOH/W 80/20 1g (CS)	Sur Chile Maule	284.51
mgrape1 2009	Son Ref EtOH/W 80/20 2g (CS)	Sur Chile Maule	128.86
mgrape1 2009	Son Ref EtOH/W 50/50 2g (CS)	Sur Chile Maule	165.26
mgrape1 2009	Son Ref W 100 % 2g (CS)	Sur Chile Maule	36.40
mgrape1 2009	Son Ref EtOH/W 80/20 2g (CS)	Sur Chile Maule	136.81
mgrape1 2009	Son Ref EtOH/W 50/50 2g (CS)	Sur Chile Maule	125.10
mgrape26 2009	Ref EtOH/W50/50 3g (CS)	Sur Chile Maule	207.75
mgrape39 2009	Ref EtOH/W 80/20 (CS)	Sur Chile Maule	341.18
mgrape52 2010	Sox Ref EtOH/W 80/20 (CS)	Sur Chile Maule	61.27
mgrape161 2010	Ref EtOH/W 80/20 (Tannat)	Sur Uruguay	223.50
mgrape163 2010	Ref EtOH/W 80/20 (CS)	Sur Uruguay	104.00
mgrape165 2010	Ref EtOH/W 80/20 (Merlot)	Sur Uruguay	163.00
mgrape167 2010	Ref EtOH/W 80/20 (Arinarnoa)	Sur Uruguay	271.00
mixt34 2009	Sox Ref EtOH/W	Uruguay -Chile	402.09
mixt37 2009	Sox Ref EtOH/W 80/20 (CS)	Centro oeste Uruguay -Chile	402.09
mixt43 2009	Sox Ref EtOH/W 80/20 (CS)	Uruguay -Chile	345.64
mixt44 igual a 34 2009	Sox Ref EtOH/W 80/20 (CS)	Uruguay -Chile	322.45
mixt45 p2+och 2010	Sox Ref EtOH/W 80/20 (CS)	Uruguay -Chile	370.36

mixt46 p49+och 2010	Sox Ref EtOH/W 80/20 (CS)	Uruguay -Chile	331.27
mixt51 p50-och 2010	Sox Ref EtOH/W 80/20 (CS)	Uruguay -Chile	349.91
mixt155 p159-ot10 2010	Ref EtOH/W 80/20 (Tannat)	Sur Uruguay	357.25
mixt156 p159-om10 2010	Ref EtOH/W 80/20 (Merlot)	Sur Uruguay	304.25
mixt157 2010	Ref EtOH/W 80/20 (Arintarnoa)	Sur Uruguay	279.0
mixt158 2010	Ref EtOH/W 80/20 (CS)	Sur Uruguay	281.75

**Tabla 3 B.** Resultados de las actividades antioxidantes DPPH y ABTS de algunos extractos de propóleos, de orujos de uva. Muestras de propóleos (prop), orujos (o) y mezclas (mixt). \*Valor medido en el 2013. \*Ref = Reflujo, EtOH = Etanol, W = Agua, Sox = Soxhlet, Hex = Hexano, Son = Sonicación, Cent = Centrifugación, Diss = Disolución, RV = Rotavaporación, RC = Reconstitución, macer = maceración, CS = Cabernet-Sauvignon, Reext = Re extracción

Muestras	Método de extracción	Origen geográfico	DPPH (%)	ABTS (%)
prop 1 2008	Ref EtOH/W 80/20	Noroeste Uruguay	93,9	23,3
prop 2 2008	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	93,5	
prop 6 2008	Ref EtOH/W 80/20	Noroeste Uruguay	95,0	21,6
prop 8 2008	Sox hex Ref EtOH/W 80/20	Uruguay		23,5
prop 8 2008	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	94,5	

prop 12 2008	Ref EtOH/W 80/20	Noroeste Uruguay	95,1	14,21
prop 19 2008	Ref EtOH/W 80/20	Sureste Uruguay	92,6	23,1
prop 29(2) 2009	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	93,5	6,04
prop 4 2008	Ref EtOH/W 80/20	Suroeste Uruguay		23,4
prop 30(6) 2009	Ref EtOH/W 80/20	Noroeste Uruguay	95,2	23,4
prop 31(8) 2009	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	95,0	23,1
prop 38 2009	Sox Ref EtOH/W 80/20	Centro oeste Uruguay	3,8	23,5
prop 13 2008	Ref EtOH/W 80/20	Sur Uruguay	94,4	23,4
prop 23 2009	Ref EtOH/W 80/20	Sur este Uruguay	96,4	
prop 159 2010	Ref EtOH/W 80/20	Uruguay	24,6*	5,8

**Tabla 4.** Base de datos de polifenoles (especies neutras) provenientes de propóleos (P) y de orujos (G), con los códigos de identificación de compuestos de PubChem (CIP), en la tercer columna se identifica su estructura tipo, seguido de los valores de Lipinski, el coeficiente de reparto  $\text{LogP}(o/w)$ , y el HOMO (KJ). Los compuestos derivados representados (CIP\*) se referencian a los códigos de los compuestos padres. Se considera dejar los nombres en ingles por mejor relación con el CIP.

Nombre	Origen	Tipo de estructura	Lipinski	LogP(o/w)	HOMO ( $1 \times 10^{-22}$ KJ/mol)
(E)-caftaric acid (6440397)	G	ACIDO FENOLICO	1	0,7	-2,255
(Z)-coutaric acid (72551452)	G	ACIDO FENOLICO	1	1	-2,542
(E)-coutaric acid (57517924)	G	ACIDO FENOLICO	1	1	-2,882
(E)-fertaric acid (22298372)	G	ACIDO FENOLICO	1	1	-2,928
(Z)-caftaric acid (72551521)	G	ACIDO FENOLICO	1	0,7	-2,941
(Z)-fertaric acid (72551456)	G	ACIDO FENOLICO	1	1	-3,112
(E)-p-coumaric acid (637542)	P	ACIDO FENOLICO	1	2	-8,465
(E)-ferulic acid (445858)	P	ACIDO FENOLICO	1	2	-8,51
(E)-caffeic acid (717531)	P	ACIDO FENOLICO	1	1,8	-8,577

5-phenylpenta-2,4-dienoic acid (4024465)	G	ACIDO FENOLICO	1	3	-8,628
3,4-dimethoxycaffeic acid (717531)	P	ACIDO FENOLICO	1	2	-8,649
Protocatechuic acid (72)	G	ACIDO FENOLICO	1	1,1	-8,717
Gallic acid (370)	G	ACIDO FENOLICO	1	0,9	-8,767
Gentistic acid (3469)	P	ACIDO FENOLICO	1	1,1	-9,563
(E)-resveratrol (445154)	P/G	ESTILBENO	1	3,7	-16,135
(-)-epigallocatechin (65064)	G	CATEQUINA	1	1,7	-16,369
Procyanidin B7 (4R-6 (+)E(-)C) (474541)	G	PROCIANIDINA	0	3,7	-16,445
Procyanidin B3 (4R-8 (+)C(-)C) (146798)	G	PROCIANIDINA	0	3,7	-16,551
Pyruvic derivative of petunidin-3-O-(6-p-coumaroyl)-glucoside (72193651)	G	ANTOCIANINA	0	3,3	-16,568

Procyanidin B8 (4R-6 (+)C(+))E (130556)	G	PROCIANIDINA	0	3,7	-16,602
3,4-dihydroxyvinylbencene (151398)	P	ESTILBENO	1	2,2	-16,631
Procyanidin B1 (4S-8 (-)E(-)C) (11250133)	G	PROCIANIDINA	0	3,7	-16,642
Procyanidin B6 (4R-6 (+)C(-)C) (474540)	G	PROCIANIDINA	0	3,7	-16,648
Pyruvic derivative of petunidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside (44256961)	G	ANTOCIANINA	0	1,3	-16,652
Pyruvic derivative of delphinidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside (15385440)	G	ANTOCIANINA	0	1	-16,659
Procyanidin B4 (4R-8 (+)C(+))E (147299)	G	PROCIANIDINA	0	3,7	-16,661
Pyruvic derivative of petunidin-3-O-glucoside (443651)	G	ANTOCIANINA	0	0,7	-16,69
Pyruvic derivative of delphinidin-3-O-(6-p-coumaroyl)-glucoside (15922818)	G	ANTOCIANINA	0	3	-16,692

Pyruvic derivative of cyanidin-3-O-glucoside (187081)	G	ANTOCIANINA	0	0,7	-16,728
Procyanidin B2-3-gallate (*122738)	G	PROCIANIDINA	0	5,1	-16,73
Pyruvic derivative of peonidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside	G	ANTOCIANINA	0	1,6	-16,741
(+)-gallocatechin (65084)	G	CATEQUINA	1	1,7	-16,752
Pyruvic derivative of delphinidin-3-O-glucoside (165558)	G	ANTOCIANINA	0	0,4	-16,768
Fisetin (5281614)	P	FLAVONOIDE	1	2,3	-16,792
Procyanidin B5 (4S-6 (-)E(+))E (124017)	G	PROCIANIDINA	0	3,7	-16,802
Procyanidin B2 (4S-8 (-)E(+))C (122738)	G	PROCIANIDINA	0	3,7	-16,804
Pyruvic derivative of peonidin-3-O-glucoside (443654)	G	ANTOCIANINA	0	1	-16,804

Pyruvic derivative of malvidin-3-O-(6-p-coumaroyl)-glucoside (72193651)	G	ANTOCIANINA	0	3,6	-16,891
Pyruvic derivative of malvidin-3-O-glucoside (443652)	G	ANTOCIANINA	0	1	-16,912
(Z)-isoprenylcaffeate (5281790)	P	ACIDO FENOLICO	1	2,7	-16,923
(+)-catechin (9064)	G	CATEQUINA	1	2	-16,935
(E)-cinnamylcaffeate (5281787)	P	ACIDO FENOLICO	1	3,9	-16,942
Myricetin (5281672)	P/G	FLAVONOIDE	1	1,8	-16,942
(-)-epicatechin (72276)	G	CATEQUINA	1	2	-16,969
Quercetin (5280343)	P/G	FLAVONOIDE	1	2	-16,973
Pyruvic derivative of malvidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside	G	ANTOCIANINA	0	1,6	-16,999
Procyanidin B2 3'-gallate (*122738)	G	PROCIANIDINA	0	5,1	-16,999

(E)-isoprenylcaffeate (5281790)	P	ACIDO FENOLICO	1	2,7	-17,083
Kaempferol (5280863)	P/G	FLAVONOIDE	1	2,3	-17,121
Quercetin-3-O-galactoside (5281643)	G	FLAVONOIDE	0	-0,2	-17,136
(E)-benzylcaffeate (5919576)	P	ACIDO FENOLICO	1	3,7	-17,157
Quercetin-7-O- neohesperidoside (*5280343)	G	FLAVONOIDE GLICOSIDADO	0	-1,4	-17,172
Laricitrin-3-O-glucoside (44259475)	G	FLAVONOIDE GLICOSIDADO	0	-0,2	-17,254
Galangin (5281616)	P	FLAVONOIDE	1	2,6	-17,279
(Z)-isoprenyl-p-coumarate (*637542)	G	ACIDO FENOLICO	1	3	-17,301
(E)-isoprenyl-p-coumarate (*637542)	P	ACIDO FENOLICO	1	3	-17,353
Apigenin (5280443)	P	FLAVONOIDE	1	2,5	-17,423
Myricetin-3-O-galactoside (5491408)	G	FLAVONOIDE	0	-0,5	-17,425
Teachtchrysin (5281954)	P	FLAVONOIDE	1	3,1	-17,425

Myricetin-3-O-glucoside (5486615)	G	FLAVONOIDE	0	-0,2	-17,431
Quercetin-3-O-glucoside (54758678)	G	FLAVONOIDE	0	-0,2	-17,448
Isorhamnetin-3-O-glucoside (5318645)	G	FLAVONOIDE	0	0	-17,455
Luteolin (5280445)	P	FLAVONOIDE	1	2,3	-17,467
Pinobankin-3-O-isobutyrate (46886756)	G	FLAVONOIDE	1	3,5	-17,474
Syringetin-3-O-glucoside (44259492)	G	FLAVONOIDE	0	0	-17,499
Naringin (442428)	P	ANTOCIANINA	0	-1	-17,499
Oroxylin A (5320315)	G	ANTOCIANINA	1	2,8	-17,535
3-methoxygalangin (5281946)	P	DERIVADO FLAVONOIDE	1	2,9	-17,579
Methylgallate (7428)	G	FLAVONOIDE	1	1	-17,602
Chrysin (5281607)	P	ACIDO FENOLICO	1	2,8	-17,604
Hesperetin (72281)	P	FLAVONOIDE	1	2,4	-17,626
Alpinetin (4053302)	G	FLAVONOIDE	1	3	-17,643

Pinocembrin (68071)	P	FLAVONOIDE	1	2,7	-17,645
Pinobanksin-3-O-2-methylbutyrate (636686)	P	FLAVONOIDE	1	3,9	-17,689
Pinobanksin-3-O-acetate (148556)	P	FLAVONOIDE	1	2,6	-17,7
Pinobanksin-3-O-propionate (4686755)	P	FLAVONOIDE	1	3,1	-17,721
Pinobanksin (73202)	P	FLAVONOIDE	1	2	-17,773
5-methoxypinobanksin-3-O-pentanoate (147459)	G	FLAVONOIDE	1	4,2	-17,786
5-methoxychrysin (*5281607)	P	FLAVONOIDE	1	3,1	-17,801
(E)-phenethylcaffeate (CAPE) (5881787)	P	ACIDO FENOLICO	1	3,8	-17,852
3-hydroxy-5-methoxy-2-phenyl-2,3-dihydrochromen-4-one (73201)	G	FLAVONOIDE	1	2,5	-17,866
5-methoxypinobanksin (*147459)	P	FLAVONOIDE	1	2,3	-17,944

Petunidin-3-O-(6-(E)-p-coumaroyl)-glucoside (176449)	G	ANTOCIANINA	0	3,3	-19,781
Peonidin-3-O-(6-(E)-p-coumaroyl)-glucoside (443654)	G	ANTOCIANINA	0	3,5	-19,885
Vitisin B of malvidin-3-O-(6-p-coumaroyl)-glucoside (71308302)	G	ANTOCIANINA	0	3,4	-19,999
Delphinidin-3-O-(6-(E)-p-coumaroyl)-glucoside (15922818)	G	ANTOCIANINA	0	3	-20,146
Petunidin-3-O-(6-(Z)-p-coumaroyl)-glucoside (44256963)	G	ANTOCIANINA	0	3,3	-20,148
Peonidin-3-O-(6-(Z)-p-coumaroyl)-glucoside (44256849)	G	ANTOCIANINA	0	3,5	-20,29
Malvidin-3-O-(6-(E)-caffeoyl)-glucoside (44256989)	G	ANTOCIANINA	0	3,3	-20,34
Malvidin-3-O-(6-(Z)-p-coumaroyl)-glucoside (44256995)	G	ANTOCIANINA	0	3,5	-20,347

Cyanidin-3-O-(6-(E)-p-coumaroyl)-glucoside (5282067)	G	ANTOCIANINA	0	3,3	-20,465
Delphinidin-3-O-(6-(Z)-p-coumaroyl)-glucoside (44256898)	G	ANTOCIANINA	0	3	-20,568
Malvidin-3-O-(6-(E)-p-coumaroyl)-glucoside-4-vinylphenol (*44256995)	G	ANTOCIANINA	0	5,4	-20,649
Malvidin-3-O-(6-(E)-p-coumaroyl)-glucoside-4-vinylcatechol (*44256995)	G	ANTOCIANINA	0	5,1	-20,919
Cyanidin-3-O-(6-(Z)-p-coumaroyl)-glucoside (5282067)	G	ANTOCIANINA	0	3,3	-20,972
Malvidin-3-O-glucoside-4-vinyl(-)-epicatechin (*44257035)	G	ANTOCIANINA	0	3,2	-20,978
Delphinidin-3-O-glucoside-4-vinylphenol (*443650)	G	ANTOCIANINA	0	2,3	-21,316
Malvidin-3-O-glucoside-4-vinylphenol (44257035)	G	ANTOCIANINA	0	2,8	-21,326

Peonidin-3-O-glucoside-4-vinylphenol (*443654)	G	ANTOCIANINA	0	2,8	-21,377
Petunidin-3-O-glucoside-4-vinylphenol (*443651)	G	ANTOCIANINA	0	2,6	-21,421
Malvidin-3-O-glucoside-4-vinyl(+)-catechin (71308233)	G	ANTOCIANINA	0	3,2	-21,44
Petunidin-3-O-glucoside-4-vinylcatechol (*443651)	G	ANTOCIANINA	0	2,3	-21,443
Peonidin-3-O-glucoside-4-vinylguaiacol (*443654)	G	ANTOCIANINA	0	2,8	-21,538
Malvidin-3-O-glucoside-4-vinylcatechol (44257036)	G	ANTOCIANINA	0	2,5	-21,54
Malvidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside-4-vinylphenol (*44257035)	G	ANTOCIANINA	0	3,4	-21,605
Malvidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside-4-vinylcatechol (*44257036)	G	ANTOCIANINA	0	3,1	-21,607
Delphinidin-3-O-glucoside (443650)	G	ANTOCIANINA	0	0,4	-21,614

Malvidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside-4-vinylguaiacol (*44257037)	G	ANTOCIANINA	0	3,4	-21,69
Malvidin-3-O-glucoside-4-vinylguaiacol (44257037)	G	ANTOCIANINA	0	2,8	-21,814
Vitisin B of malvidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside (*71308302)	G	ANTOCIANINA	0	1,4	-22,053
Petunidin-3,7-diglucoside (44256973)	G	ANTOCIANINA	0	-1,6	-22,221
Malvidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside (44256986)	G	ANTOCIANINA	0	1,5	-22,26
Delphinidin-3,7-diglucoside (44256889)	G	ANTOCIANINA	0	-1,9	-22,272
Delphinidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside (15385440)	G	ANTOCIANINA	0	1	-22,279
Malvidin-3-O-glucoside (443652)	G	ANTOCIANINA	0	0,9	-22,295
Malvidin-3,7-diglucoside (44256982)	G	ANTOCIANINA	0	-1,3	-22,327

Petunidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside (44256961)	G	ANTOCIANINA	0	1,3	-22,335
Petunidin-3-O-glucoside (443651)	G	ANTOCIANINA	0	0,7	-22,407
Cyanidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside (44256831)	G	ANTOCIANINA	0	1,3	-22,418
Peonidin-3-O-(6-acetyl)-glucoside (44256847)	G	ANTOCIANINA	0	1,5	-22,787
Peonidin-3-O-glucoside (443654)	G	ANTOCIANINA	0	0,9	-22,817
Cyanidin-3-O-glucoside (441667)	G	ANTOCIANINA	0	0,7	-22,901

**Tabla 6.** Resultados *in vitro* de inhibición de XO., en la segunda columna la clasificación de las muestras, extractos de propoleos (prop), orujo de uva (o) and mexclas (mixt), año y en caso de uva su variedad.

Muestras	Clasificación	XO <sup>a</sup> Inhibición (%) ± SD
MP-2	prop 2 2008	68.8 ± 0.9
MP-8	prop 8 2008	41.7 ± 0.0
MP-12	prop 12 2008	68.1 ± 0.6

MP-13	prop 13 2009	39.6 ± 0.9
MP-23	prop 23 2009	20.8 ± 0.4
MP-157	mixt prop 159 + o2010 (arinoarnea)	20.8 ± 0.4
MP-158	mixt prop 159 + o2010 (cabernet sauvignon)	12.5 ± 0.6
MP-301	o 2010 (tannat) extraido en 2013	15.3 ± 0.5
MP-302	o 2010 (merlot) extraido en 2013	22.2 ± 0.5
MP-304	o 2013(tannat)	56.3 ± 0.9
MP-305	o 2013 (cabernet sauvignon)	51.4 ± 0.4
MP-306	prop 306 2013	25.0 ± 0.4

<sup>a</sup> promedio ± SD (n=3)

## ARTICULOS PUBLICADOS

A continuación se adjuntan los artículos de esta Tesis, y aquellos que fueron antecedente de la misma según el siguiente orden:

1. *Studies of trypanocidal (inhibitory) power of naphthoquinones: Evaluation of quantum chemical molecular descriptors for structure-activity relationships*. (2008). Paulino-Zunini, M., Alvareda E., Denis P., Barreira E., Sperandio Da Silva G., Dubin M., Gastellu C., Aguilera S., Tapia O. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 2238-2246.
2. *Phenolic contents and antioxidant activity in central southern Uruguayan propolis extracts*. (2010). Paulino-Zunini, M., Rojas, C., Depaula, S., Elingold, I., **Alvareda, E.**, Casanova, M.B., Iribarne, F., Aguilera, S., Dubin, M. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 551, 141-146.
3. *Antiinflammatory activity of phenolic compounds extracted from Uruguayan propolis and grape*. (2015). **Alvareda E.**, Miranda P., Espinosa V., Pardo H., Aguilera S. & Paulino Zunini M.. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. ISSN: 0739-1102 (Print) 1538-0254 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/tbsd20>.
4. *Towards the understanding of the molecular basis for the inhibition of COX-1 and COX-2 by phenolic compounds present in Uruguayan propolis and grape pomace*. (2015). Paulino M., **Alvareda, E.**, Iribarne, F., Miranda P., Espinosa V., Aguilera S., Pardo H. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2015.1124808>.
5. *Bond dissociation energies and enthalpies of formation of flavonoids: a G4 and DFT investigation*. (2016). **Alvareda E.**, Denis P., Iribarne F., Paulino M. *Computational and Theoretical Chemistry*. Submission manuscript number: COMPTC-D-16-00498.

Enviados a publicar:

1. *Antioxidant Capacity and Spectroscopic Characteristics of Uruguayan and Chilean Propolis and Vitis Vinifera Pomace*. Margot Paulino, **Elena Alvareda**, Emiliana Fariña, Sara Aguilera, Yisel Rodríguez, Victoria Espinosa, Antonella Roascio, Valentina Villamil and Claudio Olea. Enviado al *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

2. *Xanthine oxidase inhibition by Uruguayan Propolis and Grape pomace (Vitis Vinifera)*. **Elena Alvareda**, Victoria Espinosa F, Pablo Miranda, Brenda Vera, Margot Paulino Z. Enviado a Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.

En elaboracion:

- *Antioxidant activity by Molecular modeling and Quantum Chemical DFT calculations of polyphenolic compounds from Uruguayan Propolis and Vitis Vinifera Grape Pomace*. Paulino M., **E. Alvareda E.**, Denis P., Iribarne F., Miranda P. and Aguilera S., Olea-Azar C.