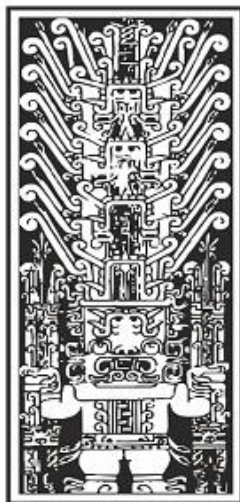


**UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL**

**FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

ESCUELA PROFESIONAL DE LABORATORIO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

ESPECIALIDAD DE LABORATORIO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA



**TESIS**

“Propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada en *Candida albicans*”

PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN TECNOLOGIA MÉDICA

Autor:

JHONATAN RABANAL SANCHEZ

Asesor:

ROSA GUITIERREZ PAUCAR

Lima, Perú

**2018**

Todos los hombres, por naturaleza, desean saber. Así nos lo indica el amor a los sentidos; pues, al margen de su utilidad, son amados por sí mismos, y el más apreciado, el de la vista. En efecto, no solo por la acción, sino también en los momentos de reposo, preferimos la vista, por decirlo así, al resto de los sentidos. Y la causa es que, de los sentidos, este es el que nos hace conocer más, y nos muestra más diferencias.

Aristóteles. *Metafísica I*

## **Agradecimientos**

Agradezco a mis padres por todo el apoyo brindado en mi desarrollo profesional y por apoyarme en todo momento.

Asimismo, quiero agradecer a todos los profesores de la Facultad de Tecnología médica por su apoyo y comprensión, en especial al profesor Lic. Roberto Rojas por el apoyo brindado en el desarrollo de esta tesis.

De igual forma, agradezco a la profesora Dra. Rosa Gutiérrez, quien fue mi asesora, por su tiempo y sus recomendaciones que hicieron posible esta tesis.

Por último, agradezco a todos mis amigos y compañeros de la Facultad, por su confianza y su tiempo.

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	6
<b>I. Planteamiento del problema</b> .....	7
1.1 Identificación y descripción del problema.....	7
1.2 Formulación del problema.....	8
1.3 Planteamiento de objetivos.....	9
1.4 Justificación.....	9
<b>II. Marco teórico</b> .....	10
2.1 Bases teóricas.....	10
2.2 Hipótesis.....	17
2.3 Variables.....	17
2.4 Términos básicos.....	18
<b>III. Método</b> .....	22
3.1 Tipo y diseño de investigación.....	22
3.2 Unidad de análisis.....	22
3.3 Población de estudio .....	22
3.4 Tamaño de muestra.....	22
3.5 Selección de muestra.....	22
3.6 Operacionalización de variables.....	22
3.7 Matriz de consistencia.....	25
3.8 Recolección de datos.....	26
3.9 Procesamiento de datos.....	29
<b>IV. Resultados</b> .....	29
<b>V. Referencias Bibliográficas</b> .....	58

## RESUMEN

El eugenol es un fenilpropanoide con actividad antifúngica, siendo su actividad anti-Candida ampliamente estudiada. Asimismo, se ha propuesto que el eugenol genera estrés oxidativo y peroxidación lipídica en *Candida albicans*. Por otro lado, los productos de la peroxidación lipídica son muy reactivos y pueden formar aductos con otras moléculas. Por lo que, es factible la idea de aductos de productos de la peroxidación lipídica con derivados del eugenol (epóxido de eugenol y quinona metilada). Este estudio determinó que los aductos de epóxido de eugenol con derivados de la peroxidación lipídica, son termodinámicamente favorables. Asimismo, todos los aductos estudiados poseen grupos químicos que pueden ser metabolizados por el citocromo P450.

**Palabras clave:** Propiedades fisicoquímicas, eugenol, epóxido de eugenol, quinona metilada.

## ABSTRACT

Eugenol is a phenylpropanoid with antifungal activity, with its anti-Candida activity being extensively studied. It has been proposed that eugenol generates oxidative stress and lipid peroxidation in *Candida albicans*. The products of lipid peroxidation are highly reactive and may form adducts with other molecules. Therefore, the idea of adducts of lipid peroxidation products with eugenol derivatives (eugenol epoxide and methylated quinone) is feasible. This study determined that eugenol epoxide adducts with lipid peroxidation derivatives are thermodynamically favorable. Also, all the adducts studied have chemical groups that can be metabolized by cytochrome P450.

**Key words:** Physicochemical properties, eugenol, eugenol epoxide, methylated quinone.

## INTRODUCCIÓN

El eugenol es un fenilpropanoide con actividad antifúngica. Se ha demostrado la actividad anti-*Candida* del eugenol en *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*. (Abbaszadeh, Sharifzadeh, Shokri, Khosravi y Abbaszadeh, 2014., Carrasco et al., 2012., Charan-Raja, Srinivasan, Selvaraj y Mahapatra, 2015., Jianhua y Hai, 2009).

Diversos estudios han demostrado que el eugenol inhibe la biosíntesis de ergosterol en *Candida albicans*; siendo este mecanismo de acción similar al de muchos antifúngicos. (Ahmad, Khan, Manzoor y Khan, 2010., Charan-Raja et al., 2015) Un estudio en cepas de *Candida albicans*, resistentes a fluconazol, demostró que el eugenol inhibe la biosíntesis de ergosterol. (Ahmad et al., 2010)

Se realizó un estudio en el que se demostró la capacidad del eugenol de desestabilizar la membrana de *Candida albicans*; por lo que, se comprobó que el eugenol, al igual que otros terpenoides, puede alterar la fluidez de la membrana. (Zore, Thakre, Jadhav y Karuppayil, 2011)

Un estudio reciente ha demostrado la capacidad del eugenol de generar estrés oxidativo en *Candida albicans*. Dicha investigación demostró niveles altos de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, como el malondialdehído (MDA), este hecho demuestra la capacidad del eugenol de inducir peroxidación lipídica y estrés oxidativo en *Candida albicans*. (Khan et al., 2011)

Asimismo, el eugenol puede ser transformado a otros metabolitos, mediante el citocromo P450. Entre las reacciones que puede catalizar el citocromo P450, esta la epoxidación, pudiendo transformar alilbencenos, como el eugenol, en epóxidos. (Luo y Guenther, 2001)

El óxido de eugenol u epóxido de eugenol es una molécula altamente electrofílica, asimismo, puede formar aductos con proteínas y ADN. (Luo y Guenther, 2001)

Por otro lado, se ha propuesto que la quinona metilada, un producto del metabolismo de eugenol, puede reaccionar con diversas moléculas celulares, como el glutatión. (Khan et al., 2011)

Por último, en la peroxidación lipídica se generan productos secundarios que suelen ser muy reactivos, siendo el más abundante el MDA, y pueden formar aductos con otras moléculas. (Ayala, Muñoz y Arguelles, 2014)

# I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## 1.1. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En las últimas décadas, con el advenimiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el número de pacientes inmunodeprimidos ha ido en aumento. Por lo tanto, estarían en riesgo de contraer alguna infección oportunista. Entre los causantes más frecuentes de estas infecciones, se puede mencionar a los hongos. Siendo los géneros *Candida* spp, *Aspergillus* spp y *Cryptococcus* spp, los agentes más frecuentes que causan infecciones fúngicas oportunistas. (Astekar, Bhatiya y Sowmya, 2016., Nucci, Queiroz-Telles, Tobon, Restrepo y Colombo, 2010)

*Candida albicans* es una levadura cosmopolita que habita en las mucosas, es inofensiva en pacientes inmunocompetentes. Pero, bajo condiciones de inmunodepresión, puede ser muy virulenta. (Mayer, Wilson y Hube, 2013., Yapar, 2014) No obstante, la incidencia de *Candida albicans* en algunos países ha disminuido, al mismo tiempo la incidencia de otras especies de *Candida* se incrementó. (Yapar, 2014)

Asimismo, en los últimos años, la resistencia a los antifúngicos ha aumentado. Lo que conlleva a un mayor riesgo de contraer alguna infección fúngica sistémica. (Arendrup, 2014., Casalnuovo, Di Francesco y Garaci, 2004., Sanguinetti, Posteraro y Lass-Flörl, 2015) Por lo que, en las últimas décadas, diversos estudios han buscado tratamientos alternativos que reemplacen o suplementen a los actuales. (Sanguinetti et al., 2015)

El eugenol es un alilbenceno extraído de diversas plantas medicinales y aromáticas, principalmente de *Myristica fragrans*, *Cinnamomum verum* y *Zygium aromaticum*. Diversos estudios han demostrado su actividad anestésica, antioxidante, antimicrobiana, antihelmíntica, antiinflamatoria, anticancerígena y antifúngica. (Charan-Raja et al., 2015., Kong, Liu, Li y Yang, 2014)

La actividad anti-*Candida* del eugenol ha sido demostrada. Por consiguiente, se ha sugerido al eugenol como tratamiento para candidiasis. (Abbaszadeh et al., 2014., Carrasco et al., 2012., Charan-Raja et al., 2015., Jianhua y Hai, 2009).

Diversos estudios han propuesto tres mecanismos de acción del eugenol en *Candida albicans*: inhibición en la síntesis del ergosterol (Ahmad et al., 2010), estrés oxidativo (Khan et al., 2011) y daño de la membrana celular. (Khan, Ahmad y Cameotra, 2013., Rao, Zhang, Muend y Rao, 2010., Zore et al., 2011)

El epóxido de eugenol y quinona metilada son productos del metabolismo del eugenol. Debido a su estructura química, estas moléculas tienden a ser muy

reactivas; tienen la capacidad de formar aductos con proteínas y ADN. (Bolton, 2014., Luo y Guenthner, 2001)

Una de las consecuencias del estrés oxidativo, en células eucariotas, es la peroxidación lipídica. Un estudio reciente ha demostrado la presencia de peroxidación lipídica en *Candida albicans* tratada con eugenol. (Khan et al., 2011)

Por lo tanto, el presente estudio propone que una de las consecuencias de la peroxidación lipídica en *Candida albicans*, tratada con eugenol; es la formación de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con productos de la peroxidación lipídica. Por lo que, se realizará un estudio *in silico* de las propiedades fisicoquímicas y reactividad de estos aductos. Para tal fin se utilizarán programas informáticos.

## 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

### 1.2.1 Problema general:

¿Cuáles son las propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada en *Candida albicans*?

### 1.2.2 Problemas específicos:

1. ¿Cuáles son las propiedades fisicoquímicas *in silico* del MDA, 4-HHE y 4-HNE?
2. ¿Cuál es la reactividad *in silico* del 4-HHE y 4-HNE, frente al citocromo P450?
3. ¿Cuáles son propiedades fisicoquímicas *in silico* de los aductos de aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE?
4. ¿Cuál es la reactividad *in silico* de los aductos de epóxido de aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE, frente al citocromo P450?
5. ¿Cuál es el valor de la energía libre de Gibbs, de formación y reacción, para los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE, mediante el método de Joback?
6. ¿Cómo es el desplazamiento químico *in silico* de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE?



## 1.3 PLANTEAMIENTO DE LOS OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo General

Realizar un estudio de las propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada en *Candida albicans*.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar las propiedades fisicoquímicas *in silico* del MDA, 4-HHE y 4-HNE.
2. Realizar un estudio *in silico* de la reactividad del 4-HHE y 4-HNE, frente al citocromo P450.
3. Determinar las propiedades fisicoquímicas *in silico* de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE.
4. Realizar un estudio *in silico* de la reactividad de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE, frente al citocromo P450.
5. Determinar el valor de la energía libre de Gibbs, de formación y reacción, para los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE, mediante el método de Joback.
6. Realizar un estudio *in silico* del desplazamiento químico de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE.

## 1.4 JUSTIFICACIÓN

### 1.4.1 Justificación teórica

Estudiar la reactividad y las diferentes propiedades fisicoquímicas *in silico* de aductos de epóxido eugenol y quinona metilada con productos de la peroxidación lipídica en *Candida albicans*; contribuye a un mayor entendimiento en el estudio de los derivados del eugenol, y conocer más acerca del efecto anti-*Candida* del eugenol.

### 1.4.2 Justificación práctica

Conocer más acerca del mecanismo de acción del eugenol en *Candida albicans*, contribuye al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de candidiasis.

#### **1.4.3 Justificación metodológica**

Comprobar que la metodología de investigación usada en el estudio de la reactividad y propiedades fisicoquímicas *in silico* de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con productos de la peroxidación lipídica en *Candida albicans*; representa un estudio adecuado y viable en el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

#### **1.4.4 Justificación económica**

Se considera que el eugenol y derivados poseen un potencial terapéutico, pudiendo ser usado como antifúngico. Lo que contribuiría a dar una solución a los actuales problemas de salud pública.

### **1.5 LIMITACIONES**

Los resultados de este estudio presentan la limitación de ser *in-silico*, por lo que dichos resultados deben ser confirmados experimentalmente.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Bases Teóricas**

#### **2.1.1 *Candida albicans***

Es una levadura cosmopolita que habita como parte de la microbiota mucocutánea, genitourinaria y gastrointestinal. Suele ser inofensiva en individuos inmunocompetentes. (Mayer et al., 2013., Yapar, 2014., De la Calle-Rodríguez, Santa-Vélez, Cardona-Castro, 2012) El aumento de candidiasis sistemas ha ido en aumento, en los últimos años, debido a la alta incidencia de casos de VIH y enfermedades neoplásicas, el uso de corticoides y antibióticos. (Huaman-Reyes et al., 2014)

*Candida albicans* es una levadura dimórfica, posee dos estados en su desarrollo: estado saprófito o levaduriforme y parasitario o filamentoso. (Pardi, 2002)

Los factores de virulencia de *Candida albicans* son: capacidad para desarrollarse como comensal, capacidad de adherencia a células del hospedero, secreción de enzimas y dimorfismo. (Calle-Rodríguez et al., 2012., Mayer et al., 2013., Pardi, 2002)

La infección por *Candida albicans* comprende cuatro etapas: Colonización, infección superficial, infección profunda e infección diseminada. (De la Calle-Rodríguez et al., 2012)

En la fase inicial se produce la adhesión de *Candida albicans* a las células epiteliales, mediante adhesinas, asimismo, se liberan enzimas hidrolíticas; por último, en esta fase se forman las primeras hifas. (De la Calle-Rodríguez, et al., 2012) En la segunda fase se degrada la matriz extracelular, mediante enzimas hidrolíticas de *Candida albicans*. Asimismo, continúa la formación de hifas. (Calle-Rodríguez et al., 2012)

La infección profunda se genera por penetración tisular, invasión vascular y evasión de la respuesta inmune, por parte de *Candida albicans*. De la misma manera, continúa la formación de hifas y secreción de enzimas. (Calle-Rodríguez et al., 2012)

En la etapa final, *Candida albicans* infecta tejidos del hospedero, se adhiere al endotelio y se propaga por todo el organismo. (Calle-Rodríguez et al., 2012)

### **2.1.2 Estrés oxidativo en *Candida albicans***

El estrés oxidativo es un estado de desequilibrio en la célula, donde existen altos niveles de agentes oxidantes, producto de una alteración en la homeostasis oxido-reducción. La alteración de esta homeostasis puede ser causada por el aumento en el nivel de especies reactivas del oxígeno (ROS) y/o una alteración en los sistemas de respuesta al estrés oxidativo. (Birben, Murat-Sahiner, Sackesen, Erzurum y Kalayci, 2012., Burton y Jauniaux, 2011., Molina-Navarro, 2005)

Muchos organismos eucariotas, como *Candida albicans*, generan ROS en condiciones normales. Sin embargo, diversas sustancias tóxicas suelen incrementar los niveles de ROS, en *Candida albicans*, produciendo daños en el ADN, proteínas y lípidos. (Brown et al., 2014., Molina-Navarro, 2005)

Al igual que muchos eucariotas, en *Candida albicans*, las ROS se producen en la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias. (Da Silva-Dantas et al., 2015., Molina-Navarro, 2005)

### **2.1.3 Respuesta al estrés oxidativo en *Candida albicans***

*Candida albicans* posee una alta capacidad para resistir al estrés oxidativo, siendo más resistente que otras levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. (Brown et al., 2014., Da Silva-Dantas et al., 2015)

Las enzimas más importantes de respuesta al estrés oxidativo en *Candida albicans* son: catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa; codificadas por los genes CAT1, GPX y SOD, respectivamente. Asimismo, las glutaredoxinas y tioredoxinas juegan un papel importante en la reparación del daño oxidativo en proteínas. (Da Silva-Dantas et al., 2015)

En presencia de ROS, se activa el factor de transcripción Cap1 en *Candida albicans*. Este factor de transcripción activa la transcripción de genes de

respuesta al estrés oxidativo como los genes CAT 1. (Da Silva-Dantas et al., 2015)

En los últimos años, se ha descrito la activación de la cascada MAPK en respuesta al estrés oxidativo. Por lo que, *Candida albicans* en presencia de peróxido de hidrogeno, puede activar la cascada MAPK, lo que conlleva a la activación y acumulación en el núcleo del Hog1, esta proteína regula proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo. (Brown et al., 2014., Da Silva-Dantas et al., 2015)

En *Candida albicans* tratadas con peróxido de hidrogeno, se ha demostrado la activación de la quinasa Rad 53. Esta quinasa activada puede desencadenar la formación de hifas. (Brown et al., 2014., Da Silva-Dantas et al., 2015)

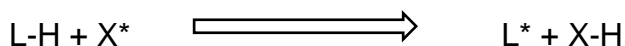
## 2.1.4 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un proceso en el que los radicales libres dañan la membrana celular, generándose productos que suelen ser dañinos para la célula. En determinadas condiciones un desequilibrio en el balance de sustancias pro-oxidantes y antioxidantes, puede llevar a una lesión celular por daño oxidativo. Un exceso de sustancias pro-oxidantes genera niveles altos de ROS en la célula. Uno de los efectos de los niveles altos de ROS es la peroxidación lipídica. (Ayala et al., 2014)

Los radicales libres tienen electrones desapareados y son muy reactivos; debido a esto suele reaccionar con diversos tipos de moléculas intracelulares. En este sentido, los radicales libres reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS). Este proceso consta de tres etapas generales: iniciación, propagación y terminación. (Ayala et al., 2014)

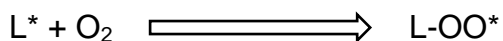
### 2.1.4.1 Iniciación

En esta etapa un radical libre ( $X^*$ ) reacciona con un ácido graso poliinsaturado, extrayendo un protón de un átomo de hidrogeno del PUFA. (Ayala et al., 2014)



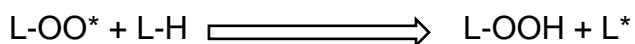
Donde L-H es el ácido graso poliinsaturado,  $X^*$  es el radical libre y  $L^*$  es el ácido graso con un electrón desapareado. (Ayala et al., 2014)

Luego el  $L^*$  reacciona con el oxígeno molecular, produciéndose la siguiente reacción: (Ayala et al., 2014)



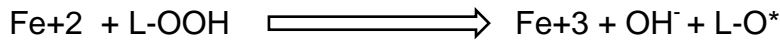
### 2.1.4.2 Propagación

El radical peroxilo lipídico ( $L-OO^*$ ) reacciona con otro ácido graso poliinsaturado. (Ayala et al., 2014)



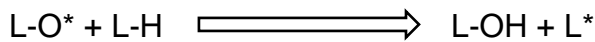
El radical lipídico (L\*) formado en la última reacción puede reaccionar con una molécula de oxígeno y seguir los pasos anteriormente explicados, produciéndose una reacción en cadena. (Ayala et al., 2014)

Luego el hidroperóxido lipídico (L-OOH) puede reaccionar con un ion ferroso (Fe+2). (Ayala et al., 2014)



La oxidación del ion ferroso (Fe+2) a un ion férrico (Fe+3), genera la reducción del hidroperóxido lipídico (L-OOH) a un radical alcóxido (L-O\*) y un radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>). El radical alcóxido (L-O\*) actúa de manera similar al radical lipídico. (Ayala et al., 2014)

Asimismo el radical alcóxido puede reaccionar con un ácido graso poliinsaturado. (Ayala et al., 2014)



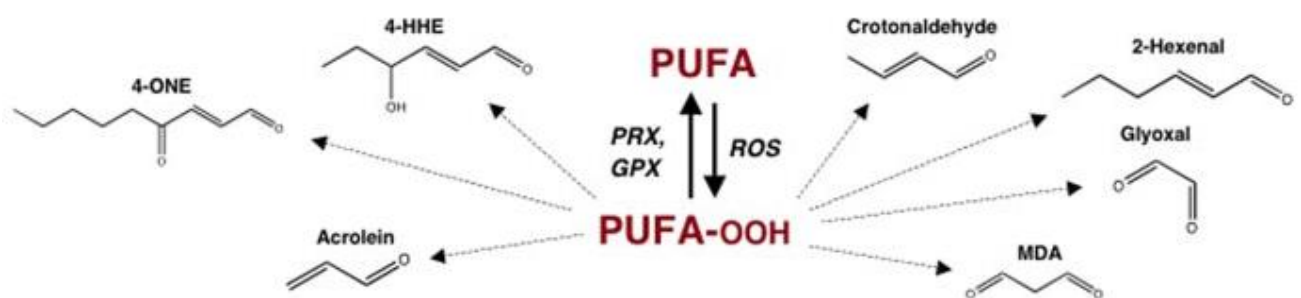
En la última reacción podemos ver la formación de más radicales lipídicos (L\*). (Ayala et al., 2014)

### 2.1.4.3 Terminación

Por último, los radicales hidroperóxidos lipídico pueden descomponerse en diversos aldehídos y fragmentos lipídicos, conocidos como productos secundarios de la peroxidación lipídica. (Ayala et al., 2014)

### 2.1.4.4 Productos secundarios

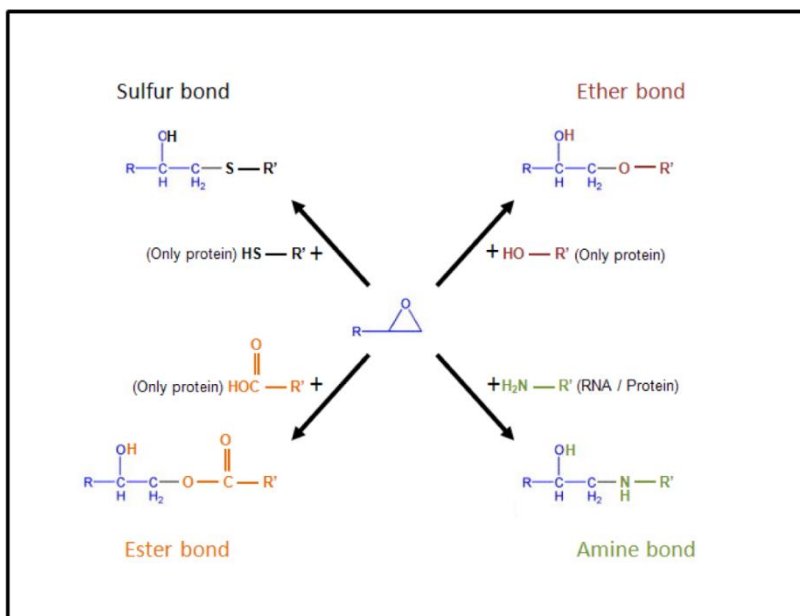
En la última etapa de la peroxidación lipídica se produce la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos en fragmentos lipídicos y aldehídos, siendo los más importantes: malondialdehído (MDA), propanal, hexanal, 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (Ayala et al., 2014), 4-hidroxi-2-hexanal (4-HHE), glioxal, acroleína, crotonaldehído y 4-oxononenal (4-ONE). (Grimsrud, Xie, Griffin y Bernlohr, 2008)



**Figura 1.** Productos secundarios de la peroxidación lipídica. (Grimsrud et al., 2008)

### 2.1.5 Epóxidos

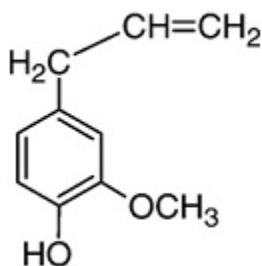
Los epóxidos u oxiranos son éteres cíclicos, estructuralmente es un anillo de dos átomos de carbono y un átomo de oxígeno. La tensión en este anillo es alta, lo que ocasiona que estas moléculas sean muy reactivas (figura 2). Por lo tanto, los epóxidos suelen participar en reacciones que alivien la tensión generada en el anillo. (García- Sánchez, 2005., Solomons, 2004)



**FIGURA 2.** Reacciones de los epóxidos. (Maresca, 2013)

### 2.1.6 Eugenol

El eugenol o 4 - alil - 2 - metoxifenol es un fenilpropanoide (Figura 3). Este compuesto es extraído de aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales; principalmente de las especies de *Zygium aromaticum*, *Myristica fragrans* y *Cinnamomum verum*. Asimismo, se han demostrado sus propiedades anestésicas, antioxidantes, antimicrobianas, antihelmínticas, antiinflamatorias, anticancerígenas y antifúngicas. (Charan-Raja et al., 2015., Kong et al., 2014)



**FIGURA 3.** Estructura química del eugenol. (Charan-Raja et al., 2015)

#### 2.1.6.1 Actividad antioxidante

Al igual que muchos compuestos fenólicos, el eugenol, puede reaccionar con las ROS e inactivarlos. No obstante, dichos mecanismos aún faltan esclarecer. (Kong et al., 2014)

Se ha demostrado la capacidad del eugenol de inhibir radicales hidroxilo y 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Asimismo, se ha descrito la capacidad del eugenol para evitar el daño en el ADN. (Charan-Raja et al., 2015., Kong et al., 2014)

#### **2.1.6.2 Actividad antibacteriana**

El eugenol puede inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas del género *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Listeria*; asimismo, gram-negativas como *Escherichia coli* y otras enterobacterias. (Charan-Raja et al., 2015., Kong et al., 2014)

#### **2.1.6.3 Actividad antiparasitaria**

El eugenol posee la capacidad para inhibir el crecimiento de *Leishmania spp*, *Plasmodium spp* y *Tripanosoma spp*. No obstante, existen aspectos, de esta actividad antiparasitaria, que aún no se conocen. (Charan-Raja et al., 2015)

#### **2.1.6.4 Actividad antifúngica**

El eugenol puede inhibir el crecimiento de hongos filamentosos (*Alternaria spp*, *Penicillium spp*, *Fusarium spp*, *Rhizopus oryzae*, *Cladosporium spp* y *Botrytis cinérea*). (Abbaszadeh et al., 2014) Asimismo, diversos estudios, han demostrado la capacidad anti-*Candida* del eugenol (*C. krusei*, *C. glabrata* y *C. albicans*). (Charan-Raja et al., 2015)

#### **2.1.6.5 Actividad anticancerígena**

Diversos estudios han sugerido que el eugenol puede tener actividad anticancerígena. Células del carcinoma cervical fueron tratadas con eugenol y gemcitabina, se reportó una disminución en el crecimiento de este cáncer. Asimismo, estudios en cáncer gástrico, sugieren que el eugenol inhibe la metástasis y angiogénesis. De la misma forma, se encontró indicios de la probable actividad anticancerígena del eugenol en cáncer de piel, próstata y mama. (Charan-Raja et al., 2015)

#### **2.1.6.6 Actividad antiinflamatoria**

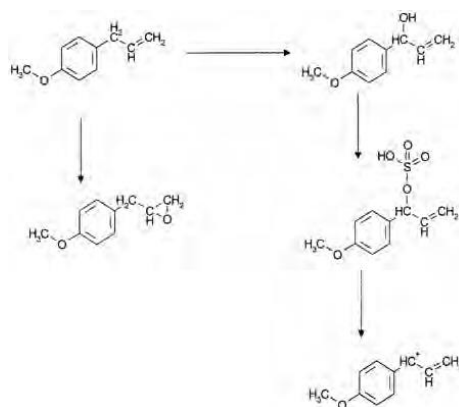
El eugenol inhibe la cicloxigenasa-2(COX-2), lo que conlleva a una inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Asimismo, se ha demostrado que inhibe la infiltración de neutrófilos en animales de experimentación e inhibe la quimiotaxis de neutrófilos. (Charan-Raja et al., 2015)

#### **2.1.7 Epóxido de eugenol**

El epóxido de eugenol o 2-metoxi-4-oxiranilmetil fenol es un epóxido producto del metabolismo del eugenol. (Elgendy y Khayyat, 2008., Luo y Guentner, 2001)

Al igual que la mayoría de epóxidos, el epóxido de eugenol, puede obtenerse a partir de un hidroperóxido orgánico y eugenol en presencia de luz ultravioleta. (Elgendy y Khayyat, 2008) Ya que se pueden obtener epóxidos a partir de un alqueno y un peróxido orgánico. (Solomons, 2004) En esta reacción un hidroperóxido orgánico transfiere un átomo de oxígeno al grupo metino del eugenol. (Elgendy y Khayyat, 2008)

*In vivo* las reacciones de epoxidación pueden ser catalizadas por el citocromo P450. Por lo que, el eugenol puede ser metabolizado a epóxido de eugenol (Figura 4). (Luo y Guentner, 2001)

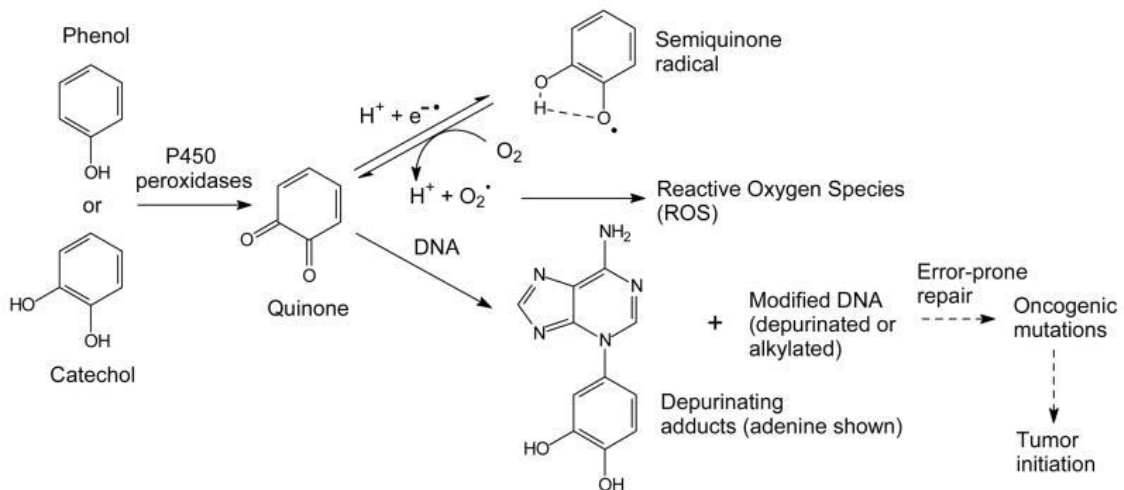


**Figura 4.** Metabolismo del eugenol en presencia de citocromo P450. (Luo y Guentner, 2001)

### 2.1.8 Quinona metilada

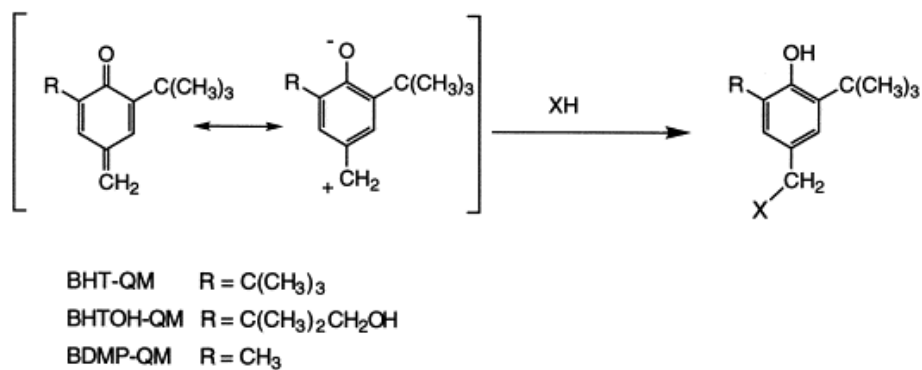
Las quinonas son moléculas aromáticas, *in vivo* pueden formarse por oxidación de compuestos fenólicos. Estas oxidaciones pueden ser catalizadas por monooxigenasas, peroxidasas, moléculas oxidantes o citocromos P450. Las quinonas suelen causar citotoxicidad, inmunotoxicidad y/o genotoxicidad. Asimismo, al ser moléculas muy reactivas, suelen formar aductos con ADN y proteínas (Figura 5). (Tu, Giblin y Gross, 2011)





**FIGURA 5.** Formación de quinonas y derivados. (Tu et al., 2011)

La quinona metilada es similar a las quinonas; sin embargo, difiere en que posee un grupo metileno en reemplazo de uno de los átomos de oxígeno del carbonilo de las quinonas. Igualmente, la quinona metilada *in vivo* puede formar aductos con proteínas y ácidos nucleicos. (Bolton, Turnipseedb y Thompsonb, 1997., Da Silva-Marrinez, 2016)



**Figura 6.** Reacciones de la quinona metilada. (Bolton et al., 1997)

## 2.2 Hipótesis

La presente investigación propone que una de las consecuencias del estrés oxidativo en *Candida albicans*, tratada con eugenol, es la formación de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con productos de la peroxidación lipídica en *Candida albicans*.

## 2.3 Variables

### 2.3.1 Variable independiente

- Propiedades fisicoquímicas del MDA, 4-HHE y 4-HNE.
- Reactividad del 4-HHE y 4-HNE, frente al citocromo P450.

### 2.3.2 Variable dependiente

- Propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE.

-Reactividad de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE, frente al citocromo P450.

## 2.4 Términos básicos

### **Aducto**

Es un enlace covalente entre moléculas con afinidad química. *In vivo* suelen estar asociados a daño celular. (Nestmann, Bryant y Carr, 1996)

### **Alilbencenos**

Es un tipo de fenilpropanoide, contiene en su estructura un grupo alilo unido a su anillo aromático. (Luo y Guenther, 2001)

### **Cascada MAPK**

Es una vía de transducción de señal formada por quinasas. Suelen estar involucradas en la activación de factores de transcripción. (Cargnello y Roux, 2011)

### **ChemAxon**

Es una multiplataforma *on-line* que permite la predicción de propiedades fisicoquímicas. Posee múltiples aplicaciones en química y biológica. (Southan y Stracz, 2013., Harding, Wedge y Popelier, 2009)

### **Chemeo**

Es una plataforma *on-line* que permite realizar predicciones teóricas de propiedades fisicoquímicas. Dichas predicciones son generalmente utilizando el método de Joback. (Watkins, 2012)

### **Citocromo P450**

Es una familia de isoenzimas, presente en organismos eucariotas, participa en el metabolismo de sustancias xenobióticas. (Ogu y Maxa, 2000., Zhou, Liu y Chowbay, 2009)

### **Complemento de análisis topológico de ChemAxon**

Es un programa informático, de la plataforma ChemAxon, que permite predecir de las características topológicas de una molécula, como por ejemplo la superficie topológica polarizada. (Harding, Wedge y Popelier, 2009)

### **Complemento de refractividad de ChemAxon.**

Es un programa informático, de la plataforma ChemAxon, que permite predecir la refractividad molar. Utiliza el método de Viswanadhan y colaboradores. (Harding et al., 2009)

### **Energía libre de Gibbs**

Es una función de estado, definida por la siguiente ecuación:

$$G=H-TS$$

Donde G, H, T y S son energía libre de Gibbs del sistema, entalpia del sistema, temperatura del sistema y entropía del sistema; respectivamente.

La energía libre de Gibbs determina la espontaneidad de una reacción química. (Chang, 2008)

### **Energía libre de Gibbs de formación**

Es la energía libre de Gibbs de una sustancia y determina el valor de la energía libre de Gibbs de reacción. (Chang, 2008)

### **Energía libre de Gibbs de reacción**

La energía libre de Gibbs de reacción queda definida por la siguiente ecuación:

$$\Delta_r G^0 = \sum v \Delta_f G^0 (\text{productos}) - \sum v \Delta_f G^0 (\text{reactivos})$$

Donde  $\Delta_r G^0$ ,  $\Delta_f G^0$  y  $v$  son energía libre de Gibbs de reacción en condiciones estándar, energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar y coeficiente estequiométrico; respectivamente. (Chang, 2008)

### **Epoxidación**

Es el proceso de adición de un átomo de oxígeno a un grupo metino para formar epóxidos. (Solomons, 2004)

### **Especies reactivas del oxígeno (ROS)**

Es una especie química, donde uno de sus átomos de oxígeno presenta electrones desapareados. Lo que le confiere la capacidad de reaccionar con otras moléculas. (Pham-Huy, He y Pham-Huy, 2008)

### **Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)**

Los núcleos atómicos de los elementos químicos pueden interactuar con un campo magnético externo. Siendo los núcleos atómicos del hidrogeno ( $^1\text{H}$ ) y carbono ( $^{13}\text{C}$ ) los más estudiados. Cuando los núcleos atómicos se colocan en un campo magnético y se irradian paralelamente con energía electromagnética, estos núcleos, pueden absorber energía mediante un proceso conocido como resonancia magnética. Por lo que, la RMN de los núcleos atómicos nos permite cuantificar esa interacción electromagnética. (Chang, 2008., Solomons, 2004)

### **Fenilpropanoide**

Son compuestos aromáticos, sintetizados como metabolitos secundarios en plantas. Derivan del metabolismo de aminoácidos aromáticos. (Khan et al., 2011)

### **Fenol**

Es un compuesto aromático que posee un grupo hidroxilo unido al anillo bencénico. (Solomons, 2004)

### **Genotóxicos**

Son sustancias con la capacidad de producir daño en el ADN. (Sarsour, Kumar, Chaudhuri, Kalen y Goswami, 2009).

### **Grupo metino**

Es un grupo derivado de un alqueno. (Solomons, 2004)

### **Hidroperóxido orgánico**

Son compuestos orgánicos que se forman en la peroxidación lipídica, pues el radical peroxilo reacciona con ácidos grasos poliinsaturados y se generan hidroperóxidos orgánicos como productos de reacción. (Birben et al., 2012)

### **4-hidroxi-2-hexanal (4-HHE)**

Es un aldehído formado en la peroxidación lipídica, tiene la capacidad para reaccionar con moléculas celulares, como el ADN y proteínas. (Anderson, Katunga y Willis, 2012)

### **4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE)**

Es un producto secundario de la degradación de hidroperóxidos lipídicos, suele formar aductos con ADN y proteínas. (Ayala et al., 2014)

### **Malondialdehído (MDA)**

Es un aldehído altamente reactivo, se utiliza in vitro para la cuantificación del daño oxidativo. El MDA puede reaccionar con el ácido tiobarbitúrico generando un color y de esta manera se puede cuantificar la peroxidación lipídica. Diversos estudios señalan que el MDA puede formar aductos con proteínas y ADN. (Ayala et al., 2014., Grimsrud et al., 2008)

### **MetaPrint2D-React**

Es un *software on-line* que permite realizar predicciones del metabolismo de moléculas frente al citocromo P450. (Kingsley et al., 2015., Rydberg et al., 2010)

### **Método de Joback**

Es un método desarrollado por Joback y Reid que permite predecir propiedades termodinámicas. Este método pertenece al método de contribución de grupos; permite realizar predicciones, utilizando la información proporcionada por sus grupos químicos. (Fierro, Faúndez y Valderrama, 2016)

### **Peróxido de hidrógeno**

Es uno ROS que se forma a partir del radical superóxido. (Birben et al., 2012)

### **Predictor 1D 1H NMR spectra**

Es un *software on-line* que permite hacer predicciones del espectro de resonancia magnética nuclear de átomos de hidrogeno. (Castillo, Bernal, Patiny y Wist, 2014., Zhou, Liu y Chowbay, 2009., Banfi y Patiny, 2008)

### **Predictor 1D 1C NMR spectra**

Es un *software on-line* que permite hacer predicciones del espectro de resonancia magnética nuclear de átomos de carbono. (Castillo et al., 2014., Zhou et al., 2009., Banfi y Patiny, 2008)

### **Propiedades fisicoquímicas**

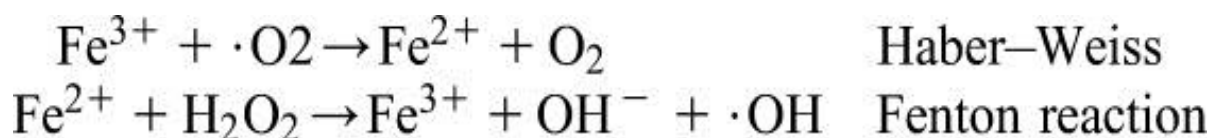
Son propiedades definidas por la naturaleza química (composición) y física de una sustancia. (Chang, 2008)

### **Radical alquilo**

Es un radical libre derivado de un alcano. (Solomons, 2004)

### **Radical hidroxilo**

Es un producto de las reacciones Haber-Weiss y Fenton (Figura 9). (Birben et al., 2012)



**Figura 9.** Reacciones de óxido-reducción para la formación de radicales hidroxilo. (Birben et al., 2012)

### **Radical libre**

Es una especie química con electrones desapareados. (Pham-Huy, He y Pham-Huy, 2008)

### **Radical peroxilo**

Es un radical libre derivado del oxígeno. Posee en su estructura dos átomos de oxígeno unidos a una cadena lateral; además, uno de sus átomos de oxígeno presenta electrones desapareados. (Birben et al., 2012)

### **Radical superóxido**

Se forma por la adición de un electrón al oxígeno molecular. (Birben et al., 2012)

### **Reacciones de Oxido-reducción**

Se refiere a reacciones en las que se transfieren electrones de un donante (agente reductor) a un aceptor (agente oxidante). (Sarsour et al., 2009)

### **Reactividad**

Es la capacidad que tienen las moléculas de reaccionar con otras moléculas, generalmente mediante el rompimiento y formación de enlaces. (Solomons, 2004)

#### **Refractividad molar**

Es la polarizabilidad de un mol de una molécula. Esta propiedad está relacionada con volumen de las moléculas y las fuerzas de London. (Harding et al., 2009)

#### **Relación de ocurrencia normalizada de los átomos reactivos (NOR)**

Es la probabilidad relativa de que el metabolismo se produzca en un sitio particular de la molécula, suponiendo que esta se metabolice. (Kingsley et al., 2015., Rydberg et al., 2010)

#### **SMILES (Sistema de Línea de Entrada Molecular Simplificado)**

En un método de codificación de moléculas; permite representar la estructura de una molécula utilizando letras que representan a los elementos. Por lo tanto, cada molécula cuenta con un SMILES que lo identifica; además, este sistema de codificación puede ser decodificado por un *software*. (Sliwoski, Kothiwale, Meiler y Lowe, 2014)

#### **Superficie topológica polarizada**

Es la sumatoria de la superficie molecular de los átomos polares que conforman la molécula. (Harding et al., 2009)

### **III.- METODO**

#### **3.1 Tipo y diseño de investigación**

El tipo de investigación que se adapta el presente trabajo es el observacional de tipo descriptivo. El método de estudio es cuantitativo.

#### **3.2 Unidad teórica de análisis**

Aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con productos de la peroxidación lipídica en *Candida albicans*.

#### **3.3 Población de estudio**

El presente estudio no presenta población de estudio.

#### **3.4 Tamaño de la muestra**

El presente estudio no presenta muestra de estudio.

#### **3.5 Selección de la muestra**

El presente estudio no presenta muestra de estudio.

### 3.6 Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN	NATURALEZA O TIPO	ESCALA O MEDICIÓN	INDICADOR O MÉTODO	INTERRELACIÓN
<p>Propiedades fisicoquímicas del MDA, 4-HHE y 4-HNE.</p> <p>En esta variable están incluidas las siguientes dimensiones:</p> <p>1. Superficie topológica polarizada.</p> <p>2. Refractividad molar.</p> <p>3. Desplazamiento químico de los átomos de <sup>1</sup>H.</p> <p>4. Desplazamiento químico de los átomos de <sup>13</sup>C.</p> <p>5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción.</p>	<p>1. Superficie topológica polarizada: sumatoria de la superficie molecular de los átomos polares, principalmente oxígeno y nitrógeno.</p> <p>2. Refractividad molar: es la polarizabilidad de un mol de una molécula.</p> <p>3. Desplazamiento químico del <sup>1</sup>H: interacción de un campo magnético externo con el núcleo atómico de los átomos de hidrogeno de una molécula.</p> <p>4. Desplazamiento químico de <sup>13</sup>C RMN: interacción de un campo magnético externo con el núcleo atómico de los átomos de carbono de una molécula.</p> <p>5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción: es una función de estado que determina la espontaneidad de una reacción química.</p>	Cuantitativo	<p>La medición de estas propiedades fisicoquímicas se hará en estas unidades:</p> <p>1. Superficie topológica polarizada: Å<sup>2</sup>.</p> <p>2. Refractividad molar: cm<sup>3</sup>/mol.</p> <p>3. Desplazamiento químico de <sup>1</sup>H: ppm.</p> <p>4. Desplazamiento químico de <sup>13</sup>C: ppm.</p> <p>5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción: kJ/mol.</p>	<p>Para estas propiedades fisicoquímicas se utilizaran los siguientes métodos teóricos o programas informáticos:</p> <p>1. Superficie topológica polarizada: Complemento de análisis topológico de ChemAxon.</p> <p>2. Refractividad molar: método de Viswanadhan y colaboradores.</p> <p>3. Desplazamiento químico de <sup>1</sup>H: predictor 1D 1H NMR spectra.</p> <p>4. Desplazamiento químico de <sup>13</sup>C: predictor 1D 1C NMR spectra.</p> <p>5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción: método de Joback.</p>	Independiente
<p>Reactividad del MDA, 4-HHE y 4-HNE, frente al citocromo P450.</p> <p>En esta variable están incluida la siguiente dimensión:</p>	<p>1. Relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos reactivos: probabilidad relativa de que el metabolismo se produzca en un sitio</p>	Cuantitativa	<p>La medición de la reactividad frente al citocromo P450 se hará en estas unidades:</p> <p>1. Relación de ocurrencia normalizada</p>	<p>Para la reactividad frente al citocromo P450 se utilizaran los siguientes programas informáticos:</p> <p>1. Relación de</p>	Independiente

1. Relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos reactivos.	particular de la molécula, suponiendo que esta se metabolice.		(NOR) de los átomos reactivos: sin unidades.	ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos reactivos: MetaPrint2D-React.	
Propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE. En esta variable están incluidas las siguientes dimensiones: 1. Superficie topológica polarizada. 2. Refractividad molar. 3. Desplazamiento químico del <sup>1</sup> H. 4. Desplazamiento químico del <sup>13</sup> C. 5. Energía libre de Gibbs de formación y reacción en condiciones estándar de reacción.	1. Superficie topológica polarizada: sumatoria de la superficie molecular de los átomos polares, principalmente oxígeno y nitrógeno. 2. Refractividad molar: es la polarizabilidad de un mol de una molécula. 3. Espectro de <sup>1</sup> H RMN: interacción de un campo magnético externo con el núcleo atómico de los átomos de hidrogeno de una molécula. 4. Espectro de <sup>13</sup> C RMN: interacción de un campo magnético externo con el núcleo atómico de los átomos de carbono de una molécula. 5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción: es una función de estado que determina la espontaneidad de una reacción química.	Cuantitativa	La medición de estas propiedades fisicoquímicas se hará en estas unidades: 1. Superficie topológica polarizada: Å <sup>2</sup> . 2. Refractividad molar: cm <sup>3</sup> /mol. 3. Desplazamiento químico del <sup>1</sup> H: ppm. 4. Desplazamiento químico del <sup>13</sup> C: ppm. 5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción: kJ/mol.	Para estas propiedades fisicoquímicas se utilizaran los siguientes métodos teóricos o programas informáticos: 1. Superficie topológica polarizada: Complemento de análisis topológico de ChemAxon. 2. Refractividad molar: método de Viswanadhan y colaboradores. 3. Desplazamiento químico del <sup>1</sup> H: predictor 1D 1H NMR spectra. 4. Desplazamiento químico del <sup>13</sup> C : predictor 1D 1C NMR spectra. 5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción: método de Joback.	Dependiente
Reactividad de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE y epóxido de	1. Relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos reactivos: probabilidad relativa de que el	Cuantitativa	La medición de la reactividad frente al citocromo P450 se hará en estas unidades: 1. Relación de	Para la reactividad frente al citocromo P450 se utilizaran los siguientes programas	Dependiente



eugenol-4-HNE, quinona metilada-MDA, quinona metilada-4-HHE y quinona metilada-4-HNE frente al citocromo P450. En esta variable están incluida la siguiente dimensión: 1. Relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos reactivos.	metabolismo se produzca en un sitio particular de la molécula, suponiendo que esta se metabolice.		ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos reactivos: sin unidades.	informáticos: 1. Relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos reactivos: MetaPrint2D-React.	
--	---	--	---	--	--

### 3.7 Matriz de consistencia

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	HIPOTESIS DE LA INVESTIGACION	VARIABLES DE ESTUDIO	METODOLOGIA DE INVESTIGACION
<p><u>Problema general</u></p> <p>¿Cuál es la reactividad y propiedades fisicoquímicas <i>in silico</i> de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con productos de la peroxidación lipídica en <i>Candida albicans</i>?</p> <p><u>Problemas específicos</u></p> <p>1. ¿Cuáles son las propiedades fisicoquímicas <i>in silico</i> del MDA, 4-HHE y 4-HNE?</p> <p>2. ¿Cuál es la reactividad <i>in silico</i> del 4-HHE y 4-HNE, frente al citocromo P450?</p> <p>3. ¿Cuáles son propiedades fisicoquímicas <i>in silico</i> de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE?</p>	<p><u>Objetivo General</u></p> <p>Realizar un estudio <i>in silico</i> de la reactividad y propiedades fisicoquímicas de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con productos de la peroxidación lipídica en <i>Candida albicans</i>.</p> <p><u>Objetivos específicos</u></p> <p>1. Determinar las propiedades fisicoquímicas <i>in silico</i> del MDA, 4-HHE y 4-HNE.</p> <p>2. Realizar un estudio <i>in silico</i> de la reactividad del 4-HHE y 4-HNE, frente al citocromo P450.</p> <p>3. Determinar las propiedades fisicoquímicas <i>in</i></p>	<p>La presente investigación propone que una de las consecuencias del estrés oxidativo en <i>Candida albicans</i>, tratada con eugenol, es la formación de aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con productos de la peroxidación lipídica en <i>Candida albicans</i>.</p>	<p><u>Variable dependiente</u></p> <p>- Propiedades fisicoquímicas del MDA, 4-HHE y 4-HNE.</p> <p>- Reactividad del 4-HHE y 4-HNE, frente al citocromo P450.</p> <p><u>Variable independiente</u></p> <p>- Propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y</p>	<p><u>Tipo de investigación</u></p> <p>El tipo de investigación que se adapta el presente trabajo es el observacional de tipo descriptivo.</p> <p><u>Método de investigación</u></p> <p>El método de investigación es cuantitativo.</p>

<p>4. ¿Cuál es la reactividad <i>in silico</i> de los aductos de epóxido de aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE, frente al citocromo P450?</p> <p>5. ¿Cuál es el valor de la energía libre de Gibbs, de formación y reacción, para los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE, mediante el método de Joback?</p> <p>6. ¿Cómo es el desplazamiento químico <i>in silico</i> del <math>^1\text{H}</math> y <math>^{13}\text{C}</math> de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE?</p>	<p><i>in silico</i> de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE.</p> <p>4. Realizar un estudio <i>in silico</i> de la reactividad de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE, frente al citocromo P450.</p> <p>5. Determinar el valor de la energía libre de Gibbs, de formación y reacción, para los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE, mediante el método de Joback.</p> <p>6. Realizar un estudio <i>in silico</i> del desplazamiento químico del <math>^1\text{H}</math> y <math>^{13}\text{C}</math> de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE.</p>		<p>quinona metilada-4-HNE.</p> <p>-Reactividad de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HNE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE, frente al citocromo P450.</p>	
---	--	--	---	--

### 3.8 Recolección de datos

Para una mejor identificación de las moléculas estudiadas se utilizara la especificación SMILES (Sistema de Línea de Entrada Molecular Simplificado). (Sliwoski et al., 2014) Asimismo, para una mejor descripción se utilizara el software MOLVIEW y de esta manera obtener las estructuras en 3D.

#### 3.5.1 Determinación de las Propiedades fisicoquímicas del MDA, 4-HHE y 4-HNE

Para el análisis de las propiedades fisicoquímicas se utilizaran los siguientes SMILES:

-MDA: O\C=C\C=O

-4-HHE: CCC(O)\C=C\C=O

-4-HNE: CCCCCC(O)\C=C\C=O

Se determinaran las siguientes propiedades fisicoquímicas:

1. Superficie topológica polarizada.
2. Refractividad molar.
3. Desplazamiento químico de los átomos de hidrogeno  $^1\text{H}$ .
4. Desplazamiento químico de los átomos de carbono  $^{13}\text{C}$ .
5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción.

Para la determinación de estas propiedades fisicoquímicas se hará uso de los siguientes programas informáticos:

1. Superficie topológica polarizada: Complemento de análisis topológico de ChemAxon. (Southan y Stracz, 2013., Harding et al., 2009)
2. Refractividad molar: método de Viswanadhan y colaboradores. Los cálculos se realizaran utilizando el programa ChemAxon. (Southan y Stracz, 2013., Harding et al., 2009)
3. Desplazamiento químico de  $^1\text{H}$  : predictor 1D  $^1\text{H}$  NMR spectra. (Castillo et al., 2014., Zhou et al., 2009., Banfi y Patiny, 2008)
4. Desplazamiento químico de  $^{13}\text{C}$  : predictor 1D  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. (Castillo et al., 2014., Zhou et al., 2009., Banfi y Patiny, 2008)
5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción: método de Joback. Los cálculos se realizaran utilizando el programa chemo. (Watkins, 2011., Fierro et al., 2016)

### 3.5.2 Determinación de la reactividad del MDA, 4-HHE y 4-HNE, frente al citocromo P450

Se determinaran los siguientes parámetros:

1. Relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos reactivos.

-Para la determinación del NOR de los átomos reactivos de esta molécula, se utilizara el programa MetaPrint2D-React. (Kingsley et al., 2015., Rydberg et al., 2010)

### 3.5.3 Determinación de las Propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE

Para el análisis de las propiedades fisicoquímicas se utilizaran los siguientes SMILES:

Epóxido de eugenol-MDA: COC1=CC=C(CC(O)CO\C=C\C=O)C=C1O

Quinona metilada-MDA: COC1=CC=C(\C=C\CO\C=C\C=O)C=C1O

Epóxido de eugenol-4-HHE: CCC(OCC(O)CC1=CC(O)=C(OC)C=C1)\C=C\C=O

Quinona metilada-4-HHE: CCC(OC\C=C\C1=CC=C(OC)C(O)=C1)\C=C\C=O

Epóxido de eugenol-4-HNE: CCCCC(OCC(O)CC1=CC=C(OC)C(O)=C1)C=CC=O

Quinona metilada-4-HNE: CCCCC(OC\C=C\C1=CC=C(OC)C(O)=C1)C=CC=O

Se determinaran las siguientes propiedades fisicoquímicas:

1. Superficie topológica polarizada.
2. Refractividad molar.
3. Desplazamiento químico de los átomos de hidrogeno<sup>1</sup>H.
4. Desplazamiento químico de los átomos de carbono<sup>13</sup>C.
5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción.

Para la determinación de estas propiedades fisicoquímicas se hará uso de los siguientes programas informáticos:

1. Superficie topológica polarizada: Complemento de análisis topológico de ChemAxon. (Southan y Stracz, 2013., Harding et al., 2009)
2. Refractividad molar: método de Viswanadhan y colaboradores. Los cálculos se realizaran utilizando el programa ChemAxon. (Southan y Stracz, 2013., Harding et al., 2009)

3. Desplazamiento químico de  $^1\text{H}$  : predictor 1D  $^1\text{H}$  NMR spectra. (Castillo et al., 2014., Zhou et al., 2009., Banfi y Patiny, 2008)

4. Desplazamiento químico de  $^{13}\text{C}$  : predictor 1D  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. (Castillo et al., 2014., Zhou et al., 2009., Banfi y Patiny, 2008)

5. Energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar de reacción: método de Joback. Los cálculos se realizaron utilizando el programa chemo. (Watkins, 2011., Fierro et al., 2016)

#### **3.5.4 Determinación de la reactividad de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE y epóxido de eugenol-4-HNE, frente al citocromo P450**

Se determinarán los siguientes parámetros:

1. Relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos reactivos.

-Para la determinación del NOR de los átomos reactivos de esta molécula, se utilizará el programa MetaPrint2D-React. (Kingsley et al., 2015., Rydberg et al., 2010)

#### **3.5.5 Determinación de la reactividad de los aductos de quinona metilada-MDA, quinona metilada-4-HHE y quinona metilada-HNE, frente al citocromo P450**

Se determinarán los siguientes parámetros:

1. Relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos reactivos.

-Para la determinación del NOR de los átomos reactivos de esta molécula, se utilizará el programa MetaPrint2D-React. (Kingsley et al., 2015., Rydberg et al., 2010)

### **3.9 Procesamiento de datos**

Los resultados serán presentados en gráficos y tablas.

Para el análisis estadístico se hallará el coeficiente de correlación de Pearson( $r$ ) de las relaciones lineales entre las siguientes variables: (Camacho-Sandoval, 2008., Watkins, 2012)

Correlación entre los desplazamientos químicos de los átomos de hidrogeno y átomos de carbono de las moléculas estudiadas.

Para los cálculos y presentación de resultados se usara el programa Excel 2013.

## IV. RESULTADOS

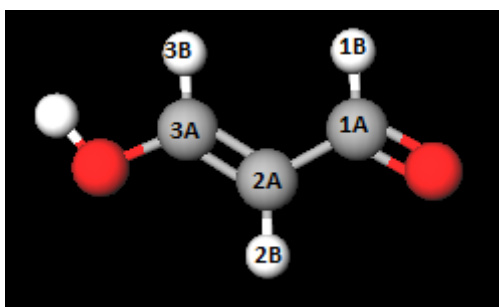
### 4. 1 Determinación de las Propiedades fisicoquímicas del MDA, 4-HHE y 4-HNE

En la tabla 1 se presentan las propiedades fisicoquímicas del MDA, 4-HHE y 4-HNE.

**Tabla 1.** Resultados de las propiedades fisicoquímicas del MDA, 4-HHE y 4-HNE.

	Superficie topológica polarizada	Refractividad molar	Energía libre de Gibbs de formación
MDA	37.30 Å <sup>2</sup>	18.34 cm <sup>3</sup> /mol	-181.74 KJ/mol
4-HHE	37.30 Å <sup>2</sup>	32.76 cm <sup>3</sup> /mol	-158.92 KJ/mol
4-HNE	37.30 Å <sup>2</sup>	46.56 cm <sup>3</sup> /mol	-133.66 KJ/mol

Se determinó la estructura en 3D del MDA, se le asignó un número a cada átomo de carbono para su identificación (figura 10).



**Figura 10.** Estructura en 3D del MDA, los átomos de carbono están representados de color gris, los átomos de oxígeno de color rojo y los átomos de hidrógeno de color blanco.

En la tabla 2 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del MDA.

**Tabla 2.** Resultados del desplazamiento químico del MDA

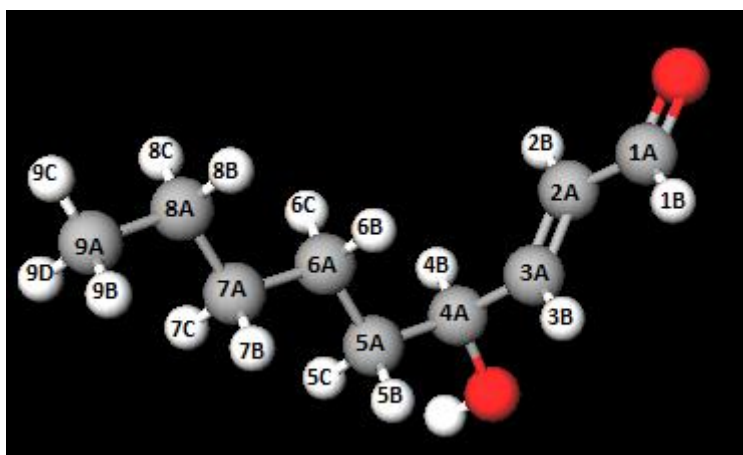
Número de carbono	δ (ppm)
A1	190.8
A2	119.1
A3	146.1

En la tabla 3 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno del MDA.

**Tabla 3.** Resultados del desplazamiento químico del MDA de los átomos de hidrógeno. Se usó como referencia a los números asignados a los átomos de carbono.

Número de hidrógeno	$\delta$ (ppm)
1B	9.39
2B	5.91
3B	7.76

Se determinó la estructura en 3D del 4-HNE, se le asignó un número a cada átomo de carbono para su identificación (figura 11).



**Figura 11.** Estructura en 3D del 4-HNE, los átomos de carbono están representados de color gris, los átomos de oxígeno de color rojo y los átomos de hidrógeno de color blanco.

En la tabla 4 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del 4-HNE.

**Tabla 4.** Resultados del desplazamiento químico del 4-HNE.

Número de carbono	$\delta$ (ppm)
1A	193.3
2A	130.5
3A	132.2
4A	71.8
5A	36.8

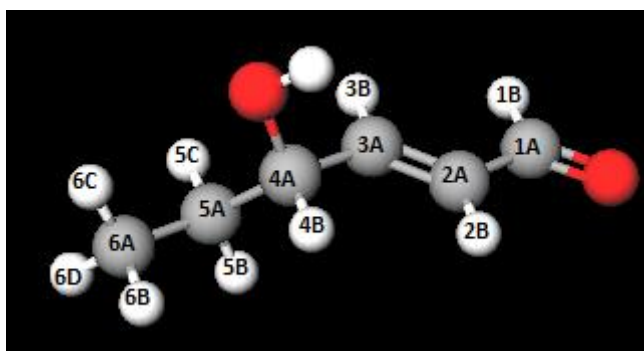
6A	25
7A	31.7
8A	22.6
9A	14

En la tabla 5 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno del 4-HNE.

**Tabla 5.** Resultados del desplazamiento químico del 4-HNE de los átomos de hidrógeno. Se usó como referencia a los números asignados a los átomos de carbono.

Número de hidrógeno	$\delta$ (ppm)
1B	9.53
2B	6.12
3B	6.75
4B	4.29
5B, 5C	1.74
6B, 6C	1.37
7B,7C	1.37
8B,8C	1.37
9B,9C,9D	0.86

Se determinó la estructura en 3D del 4-HHE, se le asignó un número a cada átomo de carbono para su identificación (figura 12).



**Figura 12.** Estructura en 3D del 4-HHE, átomos de carbono están representados de color gris, átomos de oxígeno de color rojo y átomos de hidrógeno de color blanco.



En la tabla 6 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del 4-HHE.

**Tabla 6.** Resultados del desplazamiento químico del 4-HHE.

Número de carbono	$\delta$ (ppm)
1A	193.3
2A	130.5
3A	132.1
4A	67.3
5A	27.5
6A	10

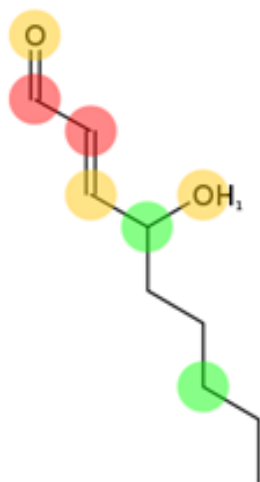
En la tabla 7 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno del 4-HHE.

**Tabla 7.** Resultados del desplazamiento químico del 4-HHE de los átomos de hidrógeno. Se usó como referencia a los números asignados a los átomos de carbono.

Número de hidrógeno	$\delta$ (ppm)
1B	9.53
2B	6.12
3B	6.65
4B	4.27
5B,5C	1.80
6B,6C,6D	0.92

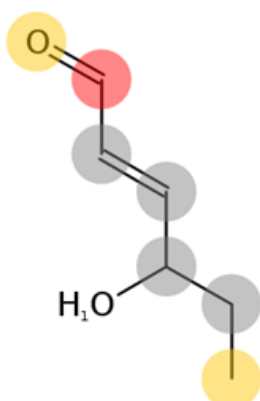
## 4.2 Determinación de la reactividad del 4-HHE y 4-HNE, frente al citocromo P450

En la figura 13 se presenta la relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos de carbono más reactivos del 4-HNE.



**Figura 13.** Cada uno de los átomos más reactivos esta coloreado, el color rojo representa un NOR de  $0.66 \leq \text{NOR} \leq 1$ , el amarillo de  $0.33 \leq \text{NOR} \leq 0.66$  y el verde de  $0.15 \leq \text{NOR} \leq 0.33$ .

En la figura 14 se presenta la relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos de carbono más reactivos del 4-HHE.



**Figura 14.** Cada uno de los átomos más reactivos esta coloreado, el color rojo representa un NOR de  $0.66 \leq \text{NOR} \leq 1$ , el amarillo de  $0.33 \leq \text{NOR} \leq 0.66$  y el gris representa una falta de datos.

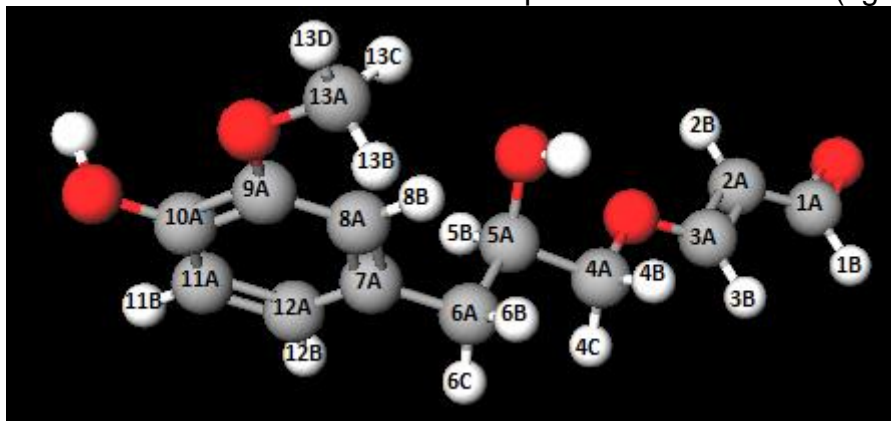
### 4.3 Determinación de las Propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE

En la tabla 8 se presentan las propiedades fisicoquímicas los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE.

**Tabla 8.** Resultados de las propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, quinona metilada-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, quinona metilada-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE y quinona metilada-4-HNE.

Aducto	Superficie topológica polarizada	Refractividad molar	Energía libre de Gibbs de formación	Energía libre de Gibbs de reacción
Epóxido de eugenol-MDA	75.99 Å <sup>2</sup>	66.87 cm <sup>3</sup> /mol	-361.82 KJ/mol	-31.19 KJ/mol
Quinona metilada-MDA	55.76 Å <sup>2</sup>	66.47 cm <sup>3</sup> /mol	-142.34 KJ/mol	17.92 KJ/mol
Epóxido de eugenol-4-HHE	75.99 Å <sup>2</sup>	81.28 cm <sup>3</sup> /mol	-339 KJ/mol	-31.19 KJ/mol
Quinona metilada-4-HHE	55.76 Å <sup>2</sup>	80.88 cm <sup>3</sup> /mol	-119 KJ/mol	18.44 KJ/mol
Epóxido de eugenol-4-HNE	75.99 Å <sup>2</sup>	95.09 cm <sup>3</sup> /mol	-313.74 KJ/mol	-31.19 KJ/mol
Quinona metilada-4-HNE	55.76 Å <sup>2</sup>	94.69 cm <sup>3</sup> /mol	-94.26 KJ/mol	17.92 KJ/mol

Se determinó la estructura en 3D del aducto de epóxido de eugenol-MDA, se le asignó un número a cada átomo de carbono para su identificación (figura 15).



**Figura 15.** Estructura en 3D del aducto de epóxido de eugenol-MDA, los átomos de carbono están representados de color gris, los átomos de oxígeno de color rojo y los átomos de hidrógeno de color blanco.

En la tabla 9 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del aducto de epóxido de eugenol-MDA.

**Tabla 9.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de epóxido de eugenol-MDA.

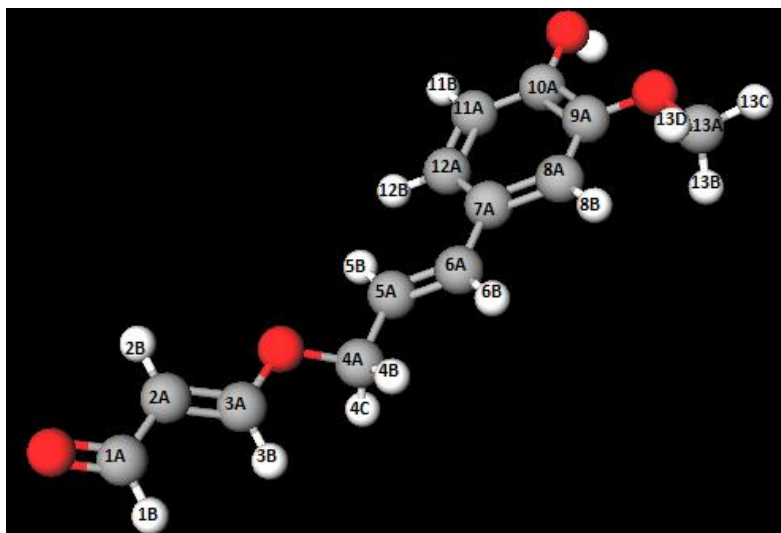
Número de carbono	$\delta$ (ppm)
1A	190.8
2A	119.1
3A	150.2
4A	66.7
5A	70.9
6A	35.7
7A	129.8
8A	115.4
9A	146.3
10A	148.2
11A	112.4
12A	127.8
13A	56.2

En la tabla 10 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno del aducto de epóxido de eugenol-MDA.

**Tabla 10.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de epóxido de eugenol-MDA de los átomos de hidrógeno. Se usó como referencia a los números asignados a los átomos de carbono.

Número de hidrógeno	$\delta$ (ppm)
1B	9.41
2B	5.83
3B	7.85
4B,4C	4.42
5B	3.94
6B,6C	2.61
8B	6.60
11B	6.63
12B	6.56
13B,13C,13D	3.72

Se determinó la estructura en 3D del aducto de quinona metilada-MDA, se le asignó un número a cada átomo de carbono para su identificación (figura 16).



**Figura 16.** Estructura en 3D del quinona metilada-MDA, los átomos de carbono están representados de color gris, los átomos de oxígeno de color rojo y los átomos de hidrógeno de color blanco.

En la tabla 11 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del aducto de quinona metilada-MDA.

**Tabla 11.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de quinona metilada-MDA.

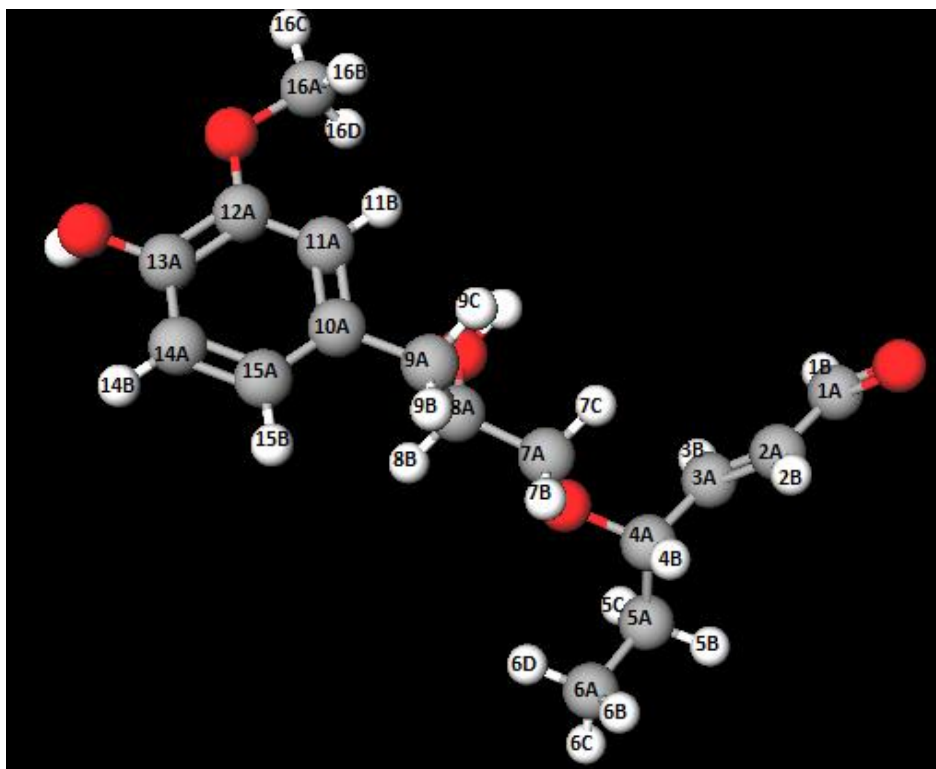
Número de carbono	$\delta$ (ppm)
1A	190.8
2A	119.1
3A	150.2
4A	66.6
5A	123
6A	132.2
7A	130.7
8A	112.6
9A	146.1
10A	148.2
11A	112
12A	120.8
13A	56.2

En la tabla 12 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno del aducto de quinona metilada-MDA.

**Tabla 12.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de quinona metilada-MDA de los átomos de hidrógeno. Se usó como referencia a los números asignados a los átomos de carbono.

Número de hidrógeno	$\delta$ (ppm)
1B	9.41
2B	5.84
3B	7.86
4B,4C	4.53
5B	6.31
6B	6.49
8B	7.10
11B	6.69
12B	7.50
13B,13C,13D	3.86

Se determinó la estructura en 3D del aducto de epóxido de eugenol-4-HHE, se le asignó un número a cada átomo de carbono para su identificación (figura 17).



**Figura 17.** Estructura en 3D del aducto de epóxido de eugenol-4-HHE, los átomos de carbono están representados de color gris, los átomos de oxígeno de color rojo y los átomos de hidrógeno de color blanco.

En la tabla 13 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del aducto de epóxido de eugenol-4-HHE.

**Tabla 13.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de epóxido de eugenol-4-HHE.

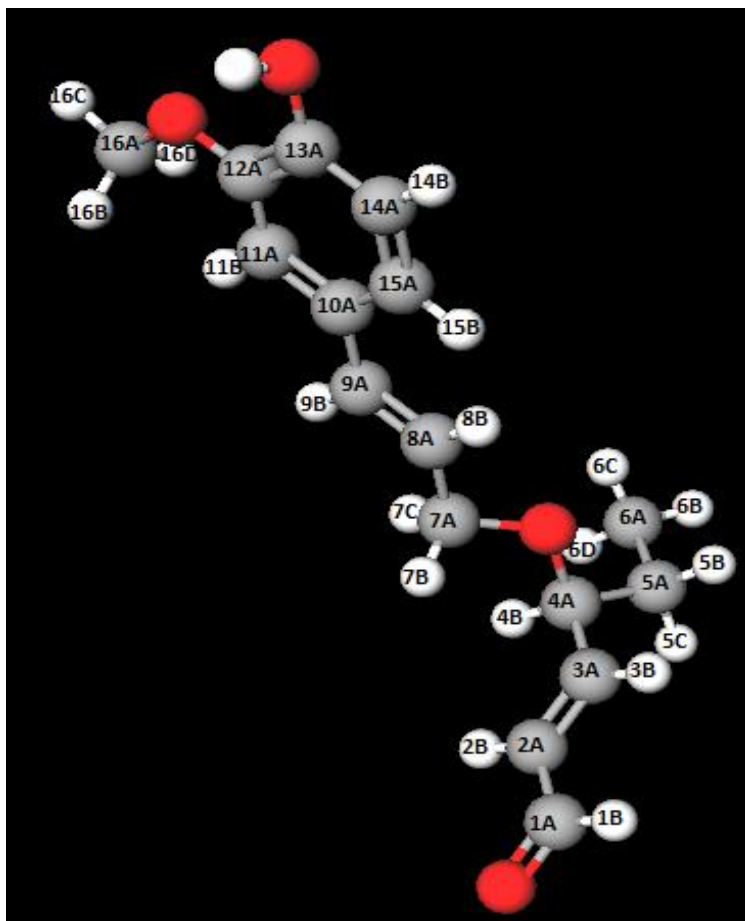
Número de carbono	$\delta$ (ppm)
1A	193.3
2A	130.5
3A	132.1
4A	72.6
5A	27.9
6A	9.2
7A	66.7
8A	70.9
9A	35.7
10A	129.8
11A	115.4
12A	146.3
13A	148.2
14A	112.4
15A	127.8
16A	56.2

En la tabla 14 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno del aducto de epóxido de eugenol-4-HHE.

**Tabla 14.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de epóxido de eugenol-4-HHE de los átomos de hidrógeno. Se usó como referencia a los números asignados a los átomos de carbono.

Número de hidrógeno	$\delta$ (ppm)
1B	9.54
2B	6.13
3B	6.92
4B	4.28
5B,5C	1.91
6B,6C,6D	0.96
7B,7C	3.57
8B	3.82
9B,9C	2.66
11B	6.60
14B	6.63
15B	6.63
16B,16C,16D	3.72

Se determinó la estructura en 3D del aducto de quinona metilada-4-HHE, se le asignó un número a cada átomo de carbono para su identificación (figura 18).



**Figura 18.** Estructura en 3D de aductos de quinona metilada-4HHE, los átomos de carbono están representados de color gris, los átomos de oxígeno de color rojo y los átomos de hidrógeno de color blanco.

Número de carbono	$\delta$ (ppm)
1A	193.3
2A	130.5
3A	132.1
4A	72.6
5A	27.9
6A	9.2
7A	66.6



8A	123
9A	132.2
10A	130.7
11A	112.6
12A	146.1
13A	148.2
14A	112
15A	120.8
16A	56.2

En la tabla 15 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del aducto de quinona metilada-4-HHE.

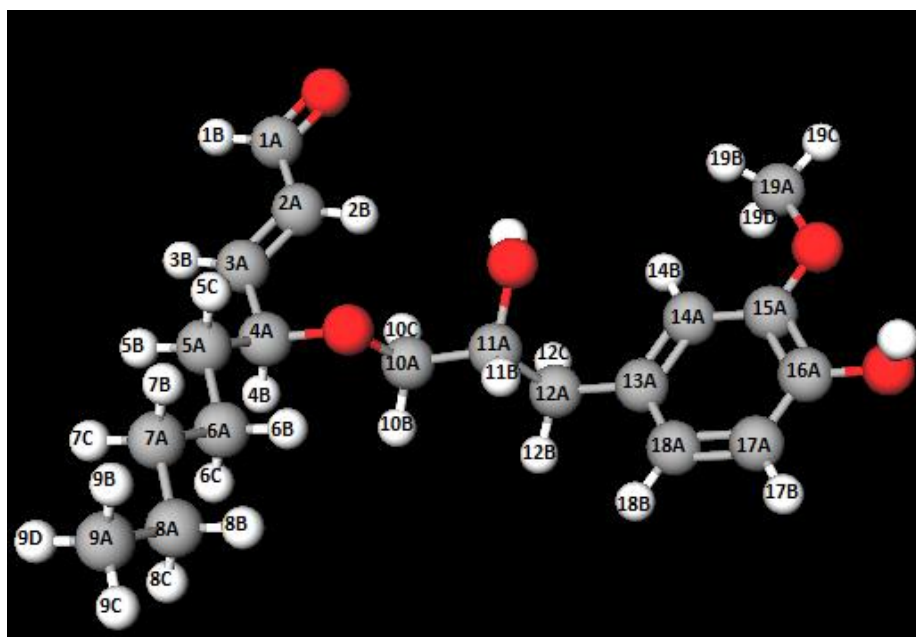
**Tabla 15.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de quinona metilada-4-HHE.

En la tabla 16 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno del aducto de quinona metilada-4-HHE.

**Tabla 16.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de quinona metilada-4-HHE de los átomos de hidrógeno. Se usó como referencia a los números asignados a los átomos de carbono.

Número de hidrógeno	$\delta$ (ppm)
1B	9.54
2B	6.13
3B	6.92
4B	4.26
5B,5C	1.92
6B,6C,6D	0.96
7B,7C	3.79
8B	6.13
9B	6.49
11B	7.10
14B	6.69
15B	7.50
16B,16C,16D	3.86

Se determinó la estructura en 3D del aducto de epóxido de eugenol-4-HNE, se le asignó un número a cada átomo de carbono para su identificación (figura 19).



**Figura 19.** Estructura en 3D de aductos de epóxido de eugenol-4-HNE, los átomos de carbono están representados de color gris, los átomos de oxígeno de color rojo y los átomos de hidrógeno de color blanco.

En la tabla 17 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del aducto de epóxido de eugenol-4-HNE.

**Tabla 17.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de epóxido de eugenol-4-HNE.

Número de carbono	$\delta$ (ppm)
1A	193.3
2A	130.5
3A	132.1
4A	72.6
5A	34.5
6A	23.8
7A	31.7
8A	22.6
9A	14
10A	66.6
11A	70.9
12A	35.7
13A	129.8
14A	115.4
15A	146.3
16A	148.2
17A	112.4
18A	127.8
19A	56.2

En la tabla 18 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno del aducto de epóxido de eugenol-4-HNE.

**Tabla 18.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de epóxido de eugenol-4-HNE de los átomos de hidrógeno. Se usó como referencia a los números asignados a los átomos de carbono.

Número de hidrógeno	$\delta$ (ppm)
1B	9.54
2B	6.10
3B	6.86
4B	4.26
5B,5C	1.77
6B,6C	1.43
7B,7C	1.43
8B,8C	1.28
9B,9C,9D	0.86
10B,10C	3.57
11B	3.83
12B,12C	2.66
14B	6.63
17B	6.63
18B	6.63
19B,19C,19D	3.72

Se determinó la estructura en 3D del aducto de quinona metilada-4-HNE, se le asignó un número a cada átomo de carbono para su identificación (figura 20).

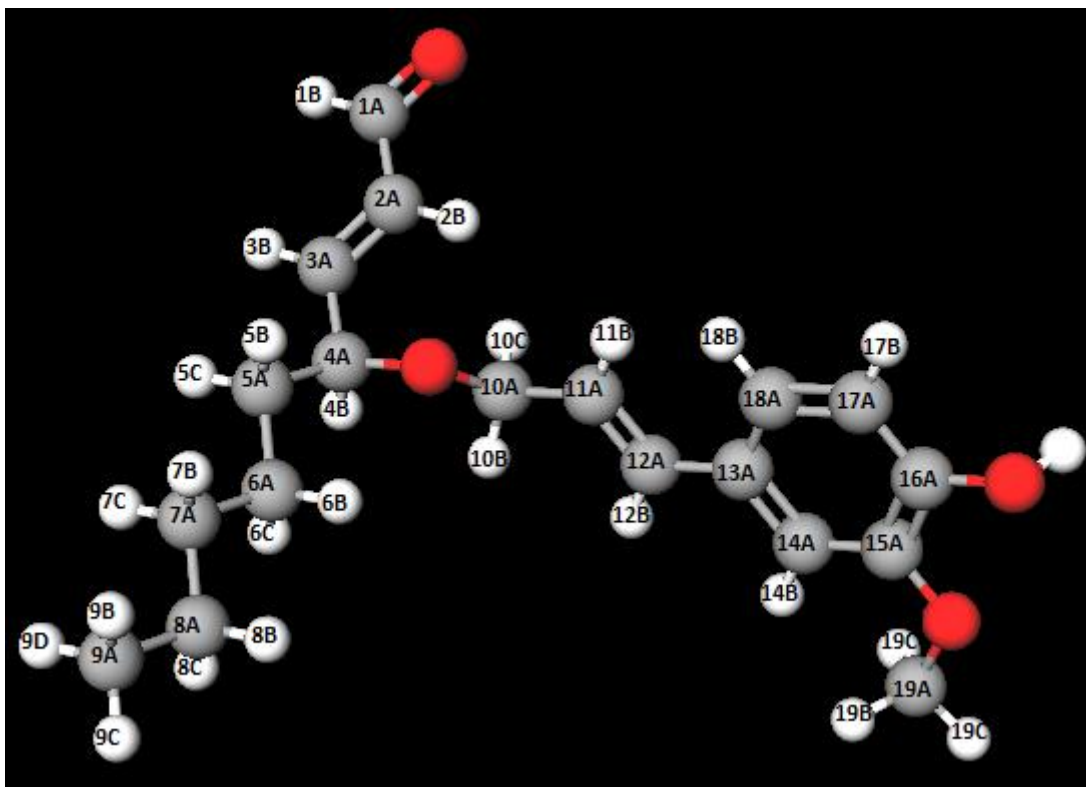


Figura 20. Estructura en 3D de aductos de quinona metilada-4-HNE, los átomos de carbono están representados de color gris, los átomos de oxígeno de color rojo y los átomos de hidrógeno de color blanco.

En la tabla 19 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del aducto de quinona metilada-4-HNE.

**Tabla 19.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de quinona metilada-4-HNE.

Número de carbono	$\delta$ (ppm)
1A	193.3
2A	130.5
3A	132.1
4A	72.6
5A	34.5
6A	23.8
7A	31.7
8A	22.6
9A	14
10A	66.6
11A	123
12A	132.2
13A	130.7

14A	112.6
15A	146.1
16A	148.2
17A	112
18A	120.8
19A	56.2

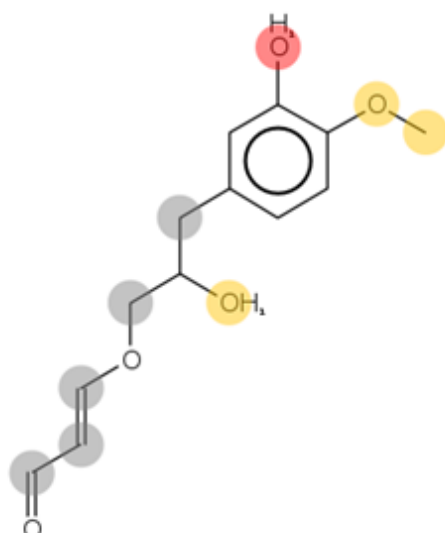
En la tabla 20 se presentan los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno del aducto de quinona metilada-4-HNE.

**Tabla 20.** Resultados del desplazamiento químico del aducto de quinona metilada-4-HNE de los átomos de hidrógeno. Se usó como referencia a los números asignados a los átomos de carbono.

Número de hidrógeno	$\delta$ (ppm)
1B	9.54
2B	6.10
3B	6.87
4B	4.27
5B,5C	1.77
6B,6C	1.43
7B,7C	1.43
8B,8C	1.28
9B,9C,9D	0.86
10B,10C	3.79
11B	6.10
12B	6.49
14B	7.10
17B	6.63
18B	7.50
19B,19C,19D	3.86

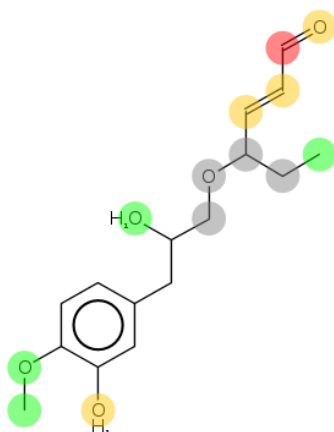
#### **4.4 Determinación de la reactividad de los aductos de epóxido de eugenol-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE y epóxido de eugenol-4-HNE, frente al citocromo P450**

En la figura 21 se presenta la relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos de carbono más reactivos del aducto de epóxido de eugenol-MDA.



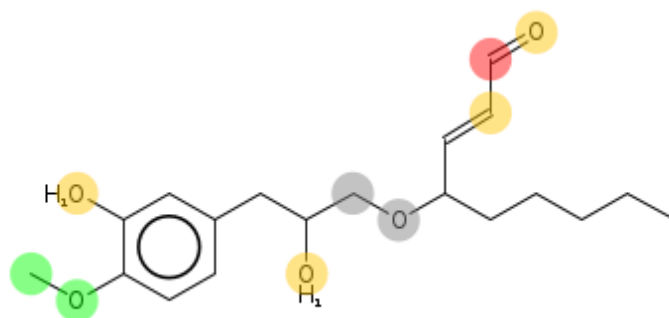
**Figura 21.** Cada uno de los átomos más reactivos esta coloreado, el color rojo representa un NOR de  $0.66 \leq \text{NOR} \leq 1$ , el amarillo de  $0.33 \leq \text{NOR} \leq 0.66$  y el gris representa una falta de datos.

En la figura 22 se presenta la relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos de carbono más reactivos del aducto de epóxido de eugenol-4-HHE.



**Figura 22.** Cada uno de los átomos más reactivos esta coloreado, el color rojo representa un NOR de  $0.66 \leq \text{NOR} \leq 1$ , el amarillo de  $0.33 \leq \text{NOR} \leq 0.66$ , el verde de  $0.15 \leq \text{NOR} \leq 0.33$  y el gris representa una falta de datos.

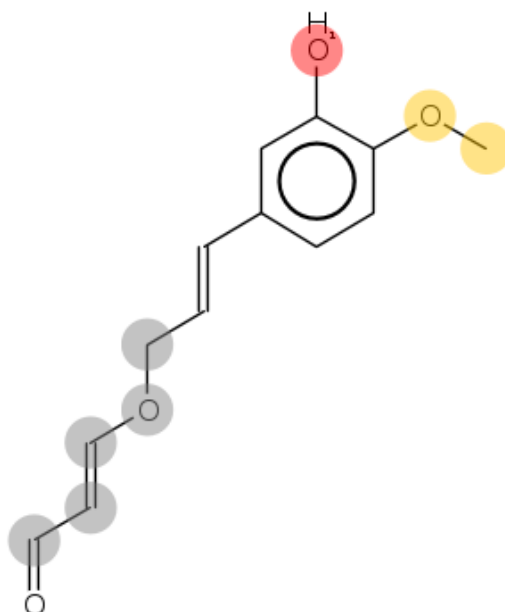
En la figura 23 se presenta la relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos de carbono más reactivos del aducto de epóxido de eugenol-4-HNE.



**Figura 23.** Cada uno de los átomos más reactivos está coloreado, el color rojo representa un NOR de  $0.66 \leq \text{NOR} \leq 1$ , el amarillo de  $0.33 \leq \text{NOR} \leq 0.66$ , el verde de  $0.15 \leq \text{NOR} \leq 0.33$  y el gris representa una falta de datos.

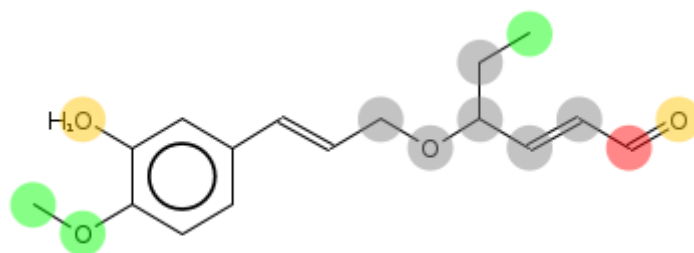
#### 4.5 Determinación de la reactividad de los aductos de quinona metilada-MDA, quinona metilada-4-HHE y quinona metilada-4-HNE, frente al citocromo P450

En la figura 24 se presenta la relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos de carbono más reactivos del aducto de quinona metilada-MDA.



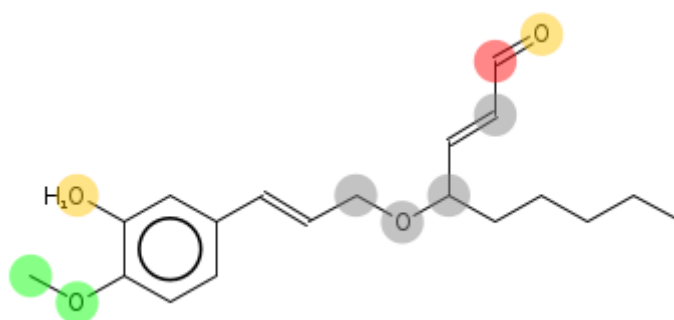
**Figura 24.** Cada uno de los átomos más reactivos está coloreado, el color rojo representa un NOR de  $0.66 \leq \text{NOR} \leq 1$ , el amarillo de  $0.33 \leq \text{NOR} \leq 0.66$  y el gris representa una falta de datos.

En la figura 25 se presenta la relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos de carbono más reactivos del aducto de quinona metilada-4-HHE.



**Figura 25.** Cada uno de los átomos más reactivos esta coloreado, el color rojo representa un NOR de  $0.66 \leq \text{NOR} \leq 1$ , el amarillo de  $0.33 \leq \text{NOR} \leq 0.66$ , el verde de  $0.15 \leq \text{NOR} \leq 0.33$  y el gris representa una falta de datos.

En la figura 26 se presenta la relación de ocurrencia normalizada (NOR) de los átomos de carbono más reactivos del aducto de quinona metilada-4HNE.



**Figura 26.** Cada uno de los átomos más reactivos esta coloreado, el color rojo representa un NOR de  $0.66 \leq \text{NOR} \leq 1$ , el amarillo de  $0.33 \leq \text{NOR} \leq 0.66$ , el verde de  $0.15 \leq \text{NOR} \leq 0.33$  y el gris representa una falta de datos.

## 4.6 Procesamiento de resultados

En la tabla 21 se muestra los desplazamientos químicos de los átomos de carbono más reactivos y el NOR de estos átomos.

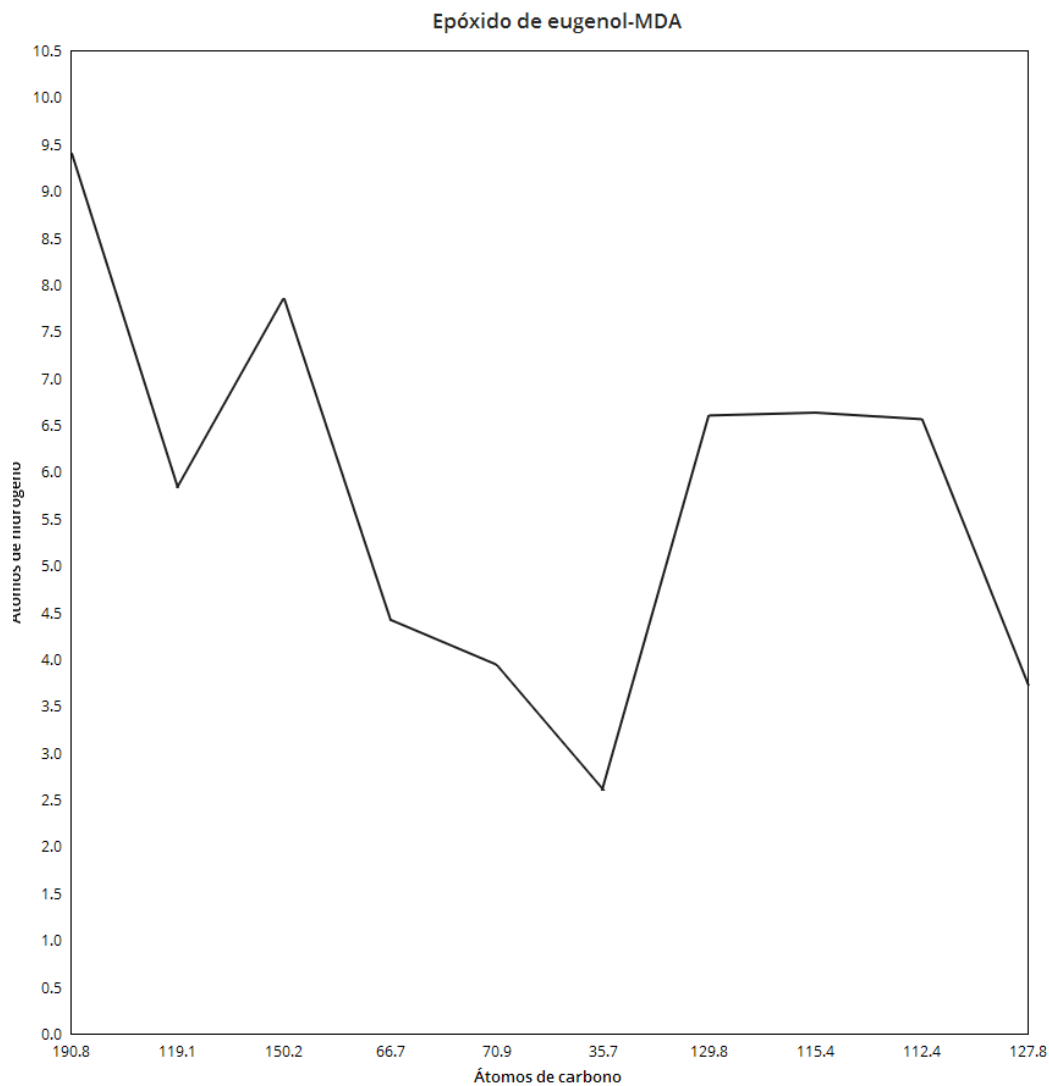
**Tabla 21.** Relación entre los desplazamientos químicos de los átomos de carbono más reactivos y el NOR.

Número de carbono	$0.66 \leq \text{NOR} \leq 1$	$0.33 \leq \text{NOR} \leq 0.66$	$0.15 \leq \text{NOR} \leq 0.33$
C-13 de epóxido de eugenol-MDA		56.2 ppm	
C-1 de epóxido de eugenol-4-HHE	193.3 ppm		
C-2 de epóxido de eugenol-4-HHE		130.5 ppm	
C-3 de epóxido		132.1 ppm	



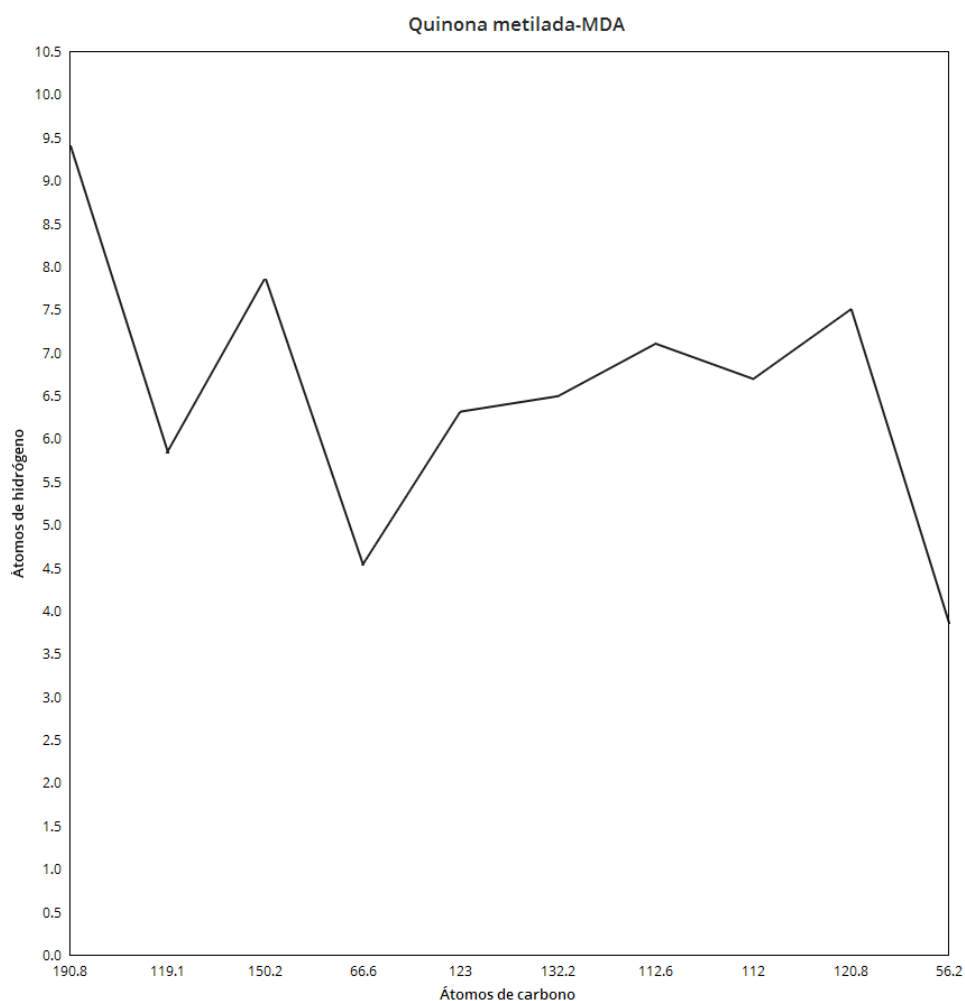
de eugenol-4-HHE			
C-6 de epóxido de eugenol-4-HHE			9.2 ppm
C-16 de epóxido de eugenol-4-HHE			56.2 ppm
C-1 de epóxido de eugenol-4-HNE	193.3 ppm		
C-2 de epóxido de eugenol-4-HNE		130.5 ppm	
C-19 de epóxido de eugenol-4-HNE			56.2 ppm
C-13 de quinona metilada-MDA		56.2 ppm	
C-1 de quinona metilada-4-HHE	193.3 ppm		
C-6 de quinona metilada-4-HHE			9.2 ppm
C-16 de quinona metilada-4-HHE			56.2 ppm
C-1 de quinona metilada-4-HNE	193.3 ppm		
C-19 de quinona metilada-4-HNE			56.2 ppm

En la figura 27 se presenta un gráfico en el que se relacionan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono y los desplazamientos de los átomos de hidrógeno del aducto de epóxido de eugenol-MDA. Para esta relación se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.



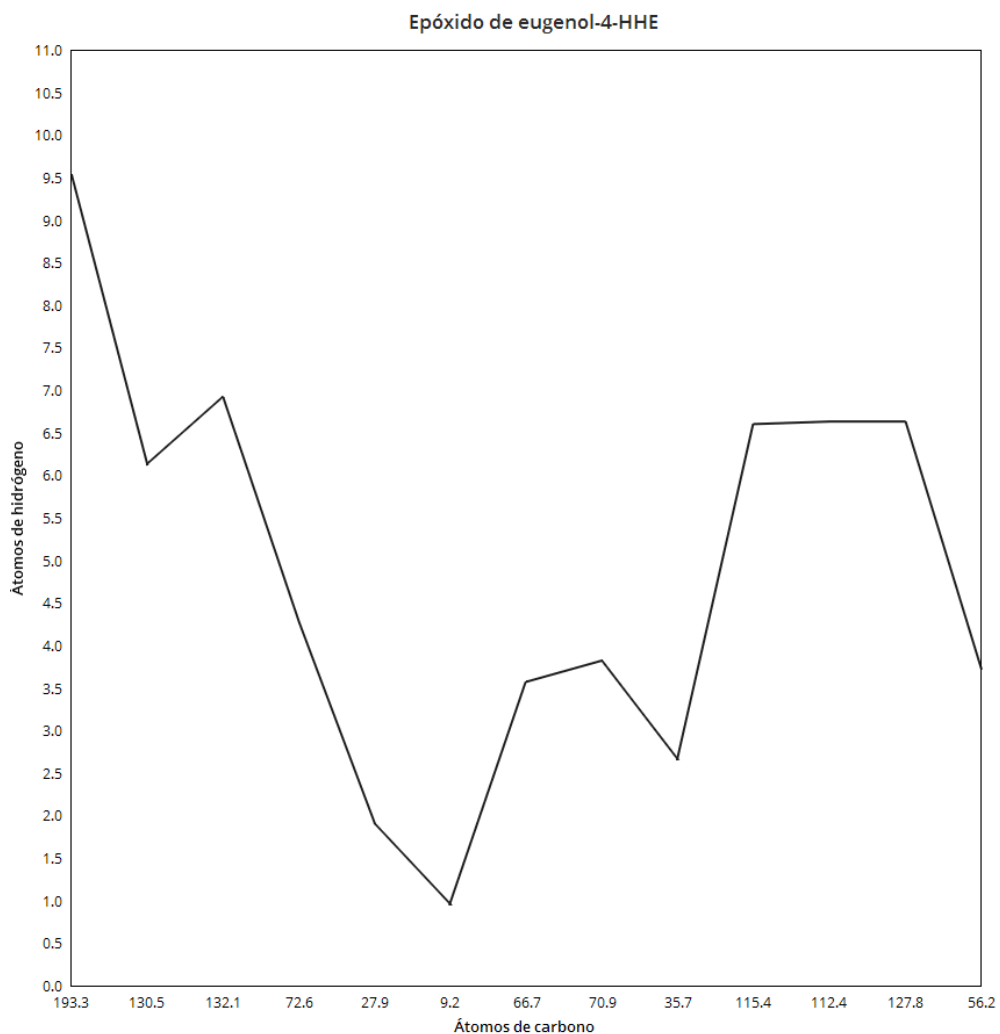
**Figura 27.** Correlación entre los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno y carbono del aducto de epóxido de eugenol-MDA.

En la figura 28 se presenta un gráfico en el que se relacionan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono y los desplazamientos de los átomos de hidrógeno del aducto de quinona metilada-MDA. Para esta relación se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.



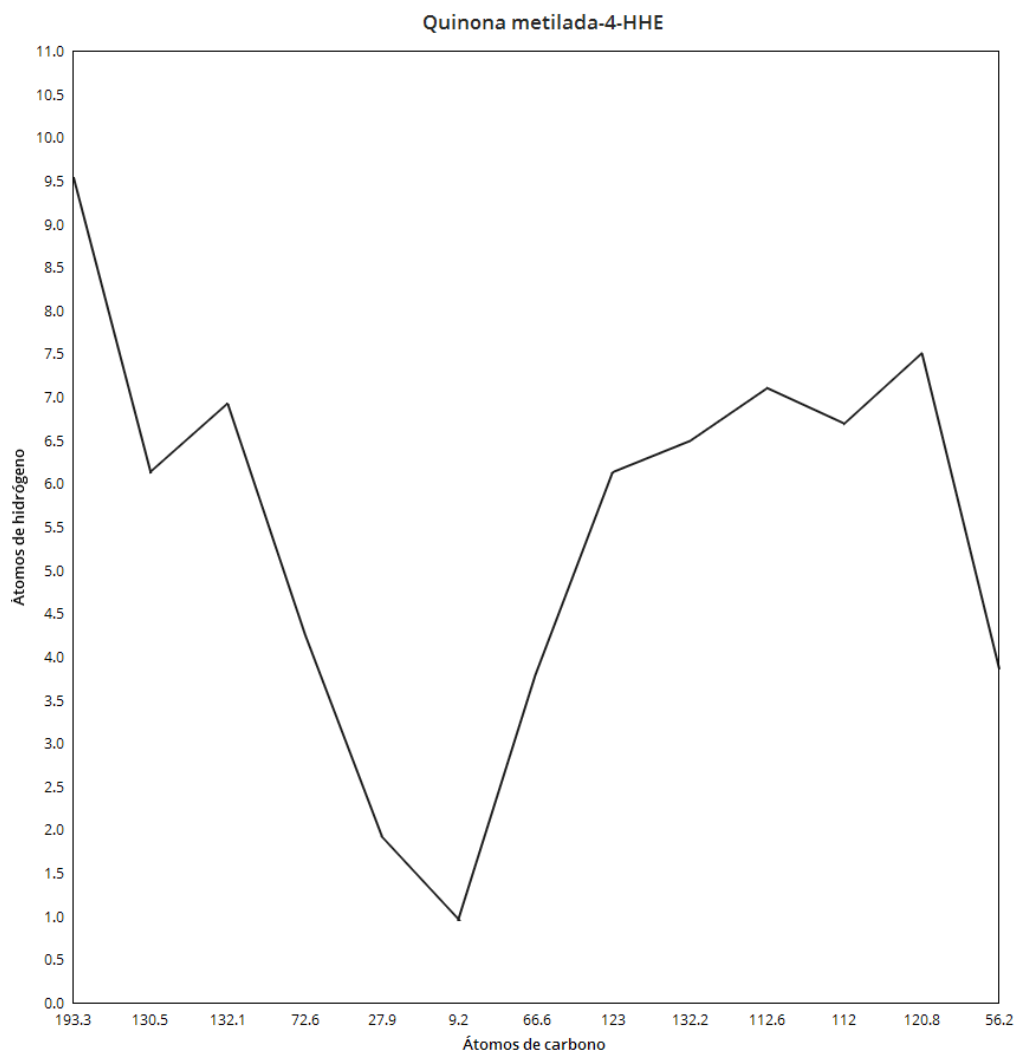
**Figura 28.** Correlación entre los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno y carbono del aducto de quinona metilada-MDA.

En la figura 29 se presenta un gráfico en el que se relacionan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono y los desplazamientos de los átomos de hidrógeno del aducto de epóxido de eugenol-4-HHE. Para esta relación se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.



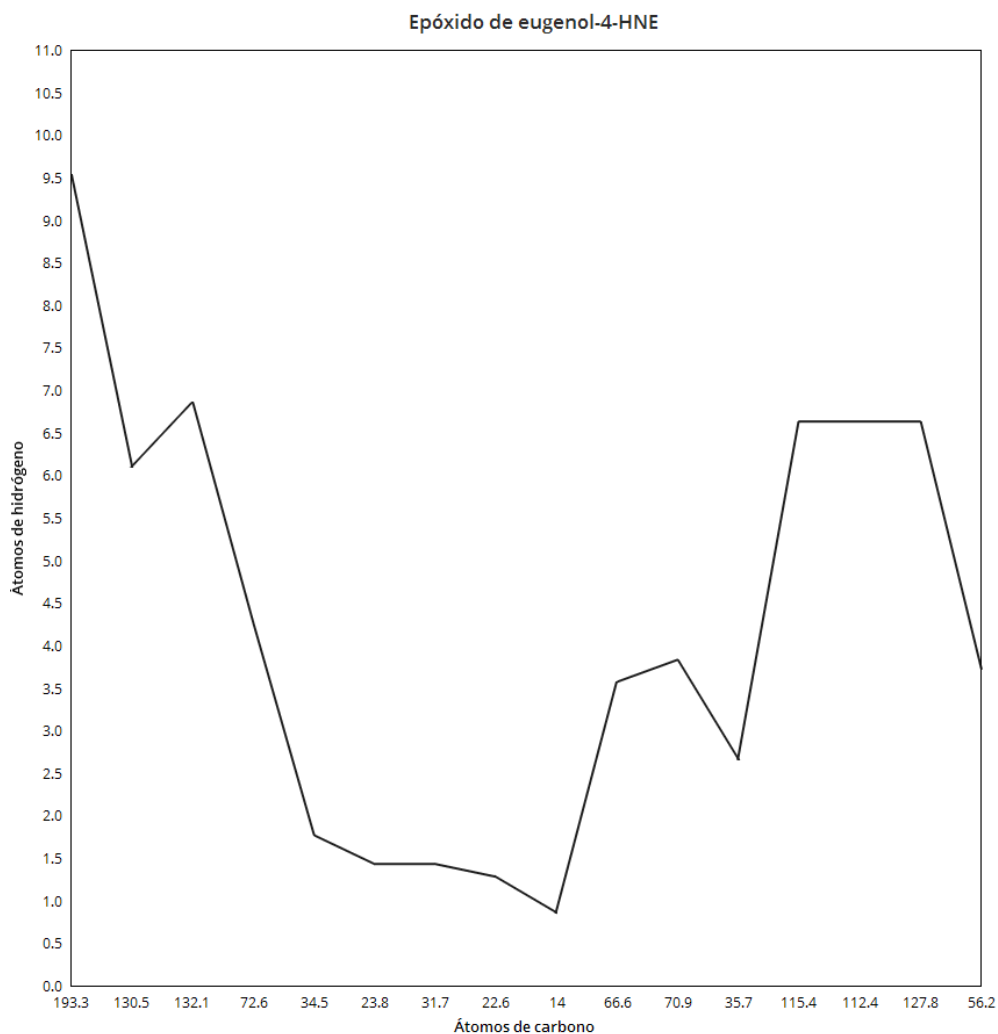
**Figura 29.** Correlación entre los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno y carbono del aducto de epóxido de eugenol-4-HHE.

En la figura 30 se presenta un gráfico en el que se relacionan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono y los desplazamientos de los átomos de hidrógeno del aducto de quinona metilada-4-HHE. Para esta relación se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.



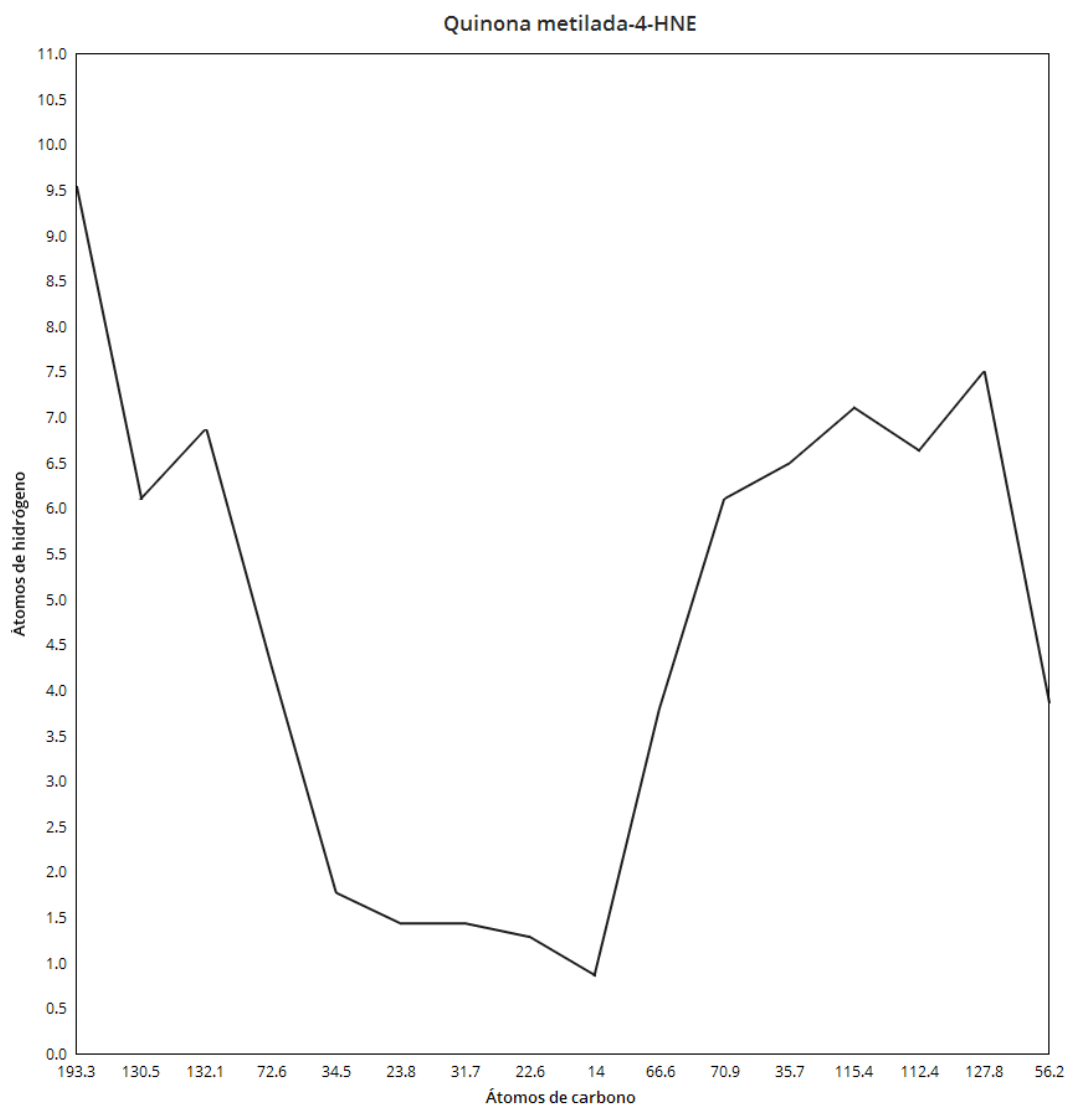
**Figura 30.** Correlación entre los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno y carbono del aducto de quinona metilada-4-HHE.

En la figura 31 se presenta un gráfico en el que se relacionan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono y los desplazamientos de los átomos de hidrógeno del aducto de epóxido de eugenol-4-HNE. Para esta relación se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.



**Figura 31.** Correlación entre los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno y carbono del aducto de epóxido de eugenol-4-HNE.

En la figura 32 se presenta un grafico en el que se relacionan los desplazamientos químicos de los átomos de carbono y los desplazamientos de los átomos de hidrógeno del aducto de quinona metilada-4-HNE. Para esta relación se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.



**Figura 32.** Correlación entre los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno y carbono del aducto de quinona metilada-4-HNE.

## 4.7 Discusión

El presente estudio determinó las propiedades fisicoquímicas de los aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada con algunos de los productos de la peroxidación lipídica de *Candida albicans* (MDA, 4-HHE y 4-HNE). Según reporta la revisión bibliográfica revisada, el epóxido de eugenol y quinona metilada poseen grupos químicos, grupo epóxido y metileno respectivamente, muy reactivos y que pueden formar aductos con moléculas con grupos hidroxilo (Da Silva-Marrinez, 2016., García- Sánchez, 2005., Solomons, 2012). Por lo que, se determinó la energía libre de Gibbs de reacción ( $rG^0$ ), en condiciones estándar de reacción, de los diferentes aductos. Siendo los aductos de epóxido de eugenol con productos de la peroxidación lipídica, los termodinámicamente más favorables, ya que presentaron resultados de  $rG^0$  negativos, en cambio los aductos de quinona metilada presentaron resultados de  $rG^0$  positivos.

Los resultados de la superficie topológica polarizada del MDA, 4-HHE y 4-HNE, fueron similares; lo que indica que poseen una capacidad similar para atravesar membranas lipídicas. Por otro lado, los resultados de la refractividad molar fueron distintos; esto guarda relación con lo esperado, ya que poseen distinta masa molar (Harding, Wedge y Popelier, 2009). Con respecto a la energía libre de Gibbs de formación, el MDA presentó un valor más negativo que las otras dos moléculas estudiadas. Lo que posiciona al MDA como un mejor candidato para formar aductos.

Asimismo, los resultados de la superficie topológica polarizada de los aductos; mostraron que los aductos de quinona metilada con productos de la peroxidación lipídica presentaron los valores más bajos lo que indica una mayor capacidad para atravesar membranas lipídicas. Por otro lado, los resultados de refractividad molar de los aductos, guardan relación con la masa molar de cada aducto.

De acuerdo con los resultados del desplazamiento de químico de los átomos de carbono de las moléculas estudiadas, se puede inferir que los átomos de carbono cercanos a átomos de oxígeno o enlaces dobles, presentan valores más altos; lo mismo se observó en el caso de los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno. Sin embargo, no se encontró relación entre los resultados de los desplazamientos químicos de los átomos de carbono e hidrógeno.

Por otro lado, la reactividad de las moléculas estudiadas frente al citocromo P450, se presentó principalmente en los grupos hidroxilo, carbonilo, éter y metino.



## 4.8 Conclusiones

1. Los resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas del MDA, 4-HHE y 4-HNE; demuestran que estas moléculas pueden atravesar membranas lipídicas y reaccionar con otras moléculas.
2. El MDA, 4-HHE y 4-HNE, poseen grupos químicos que pueden ser metabolizados por el citocromo P450.
3. Los aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada poseen propiedades fisicoquímicas que les permiten atravesar membranas lipídicas.
4. Los aductos de epóxido de eugenol y quinona metilada poseen grupos químicos que pueden ser metabolizados por el citocromo P450.
5. Los aductos de epóxido de eugenol-MDA, epóxido de eugenol-4-HHE, epóxido de eugenol-4-HNE son termodinámicamente más favorables.
6. No se encontró correlación entre el desplazamiento químico de los átomos de carbono y el desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno.

## 4.9 Recomendaciones

El presente estudio recomienda:

- Determinar experimentalmente las propiedades fisicoquímicas de las moléculas estudiadas.
- Elucidar los mecanismos moleculares involucrados en la actividad antifúngica del eugenol.
- Estudiar los derivados metabólicos del eugenol y sus posibles aplicaciones farmacológicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A.R., Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Medicale*; 24:51-56.
- Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N., Khan, L.A. (2010). Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis*; 48: 35-41.
- Anderson, E.J., Katunga, L.A., Willis, M.S. (2012). Mitochondrial as Source and Target of Lipid Peroxidation Products in Healthy and Diseased Heart. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 39(2): 1- 25.
- Arendrup, M.C. (2013). Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection*; 20(6): 42-48.
- Astekar, M., Bhatiya, P.S., Sowmya, G.V. (2016). Prevalence and characterization of opportunistic candidal infections among patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*; 20(2): 183–189.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Arguelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Mechanisms, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hidroxy-2-Nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*; 2014: 1-31.
- Banfi, D y Patiny, L. (2008). [www.nmrdb.org:Resurrecting](http://www.nmrdb.org) and Processing NMR Spectra On-line. *Chimia*; 62(4): 280-281.
- Bolton, J.L. (2014). Quinone Methide Bioactivation Pathway: Contribution to Toxicity and/or Cytoprotection? *Current Organic Chemistry*; 18(1): 61–69.
- Bolton, J.L., Turnipseed, S.B., Thompson, J.A. (1997). Influence of quinone methide reactivity on the alkylation of thiol and amino groups in proteins: studies utilizing amino acid and peptide models. *Chemico-biological interactions*; 107(3):185-200.
- Birben, E., Sahiner, M.U., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization journal*; 5(1): 9–19.
- Burton, G., Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. Best practice & research. *Clinical obstetrics & gynaecology*; 25(3): 287–299.
- Brown, A.J.P., Budge, S., Kaloriti, D., Tillmann, A., Jacobsen, M.D., Yin, Z., Ene, L.V., Bohovych, I., Sandai, D., Kastora, S., Potrykus, J., Ballou, E.R., Childers, D.S., Shahana, S., Leach, M.D. (2014). Stress

adaptation in a pathogenic fungus. *The journal of experimental biology*; 217(1):144-155.

Camacho-Sandoval, J. (2008). Asociación entre variables cuantitativas: análisis de correlación. *Acta Médica Costarricense*; 50(2): 94-96.

Cargnello, M., Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*; 75(1):50-83.

Carrasco, H., Raimondi, M., Svetaz, L., Di Liberto, M., Rodriguez, M.V., Espinoza, L., Madrid, A., Zacchino, S. (2012). Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. *Molecules*; 17: 1002-1024.

Casalinuovo, I.A., di Francesco, P., Garaci, E. (2004). Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*; 8: 69-77.

Castillo, A.M., Bernal, A., Patiny, L., Wist, J. (2014). A new method for the comparison of <sup>1</sup>H NMR predictors based on tree-similarity of spectra. *Journal of cheminformatics*; 6(9): 1-6.

Chang, R. (2008). *FISICOQUÍMICA para las ciencias químicas y biológicas*. México: Mc Graw-Hill Interamericana.

Charan-Raja, M.R., Srinivasan, V., Selvaraj, S., Mahapatra, S.K. (2015). Versatile and Synergistic Potential of Eugenol: A Review. *Pharmaceutica Analytica Acta*; 6(5): 367-372.

Da Silva-Dantas, A., Day, A., Ikeh, M., Kos, L., Achan, B., Quinn, L. (2015). Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules*; 5(1):142-65.

Da Silva-Martinez, C.M. (2016). *Study of the natural alkenylbenzenes compounds: mechanisms of ADN lesions and implications for human health* (tesis de doctorado). Universidad Nueva de Lisboa, Lisboa, Portugal

De la Calle-Rodríguez, N., Santa-Vélez, C., Cardona-Castro, N. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicina*; 26(1):43-55.

Elgendy, E.M., Khayyat, S.A. (2008). Oxidation Reactions of Some Natural Volatile Aromatic Compounds: Anethole and Eugenol. *Russian Journal of Organic Chemistry*; 44(6): 823-829.

Fierro, L.N., Faúndez, C.A., Valderrama, J.O. (2016). Método de Contribución de Grupos: una Herramienta Fundamental en cursos Avanzados de

Termodinámica y Física de Fluidos para la Estimación de Propiedades de Sustancias. *Formación universitaria*; 9(3): 99-108.

- García-Sánchez, A. (2005). *Isomerización de los epóxidos lineales en fase líquida sobre catalizadores heterogéneos* (tesis doctoral). Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España.
- Grimsrud, P.A., Xie, H., Griffin, T.J., Bernlohr, D.A. (2008). Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein with Bioactive Aldehydes. *The Journal of Biological Chemistry*; 283(32): 21837- 841.
- Harding, A.P., Wedge, D.C., Popelier, P.L. (2009). pK(a) prediction from "Quantum Chemical Topology" descriptors. *Journal of chemical information and modeling*; 49(8):1914-1924.
- Huamán Reyes, A.M., Béjar-Castillo, B.R., Sevilla-Andrade, C.R., Sáez- Flores, G.M., Tapia-Barcellandi, M., Guevara-Granados, J.M., Pareja-Cuadros, E.I., Valencia-Bazalar, E., Marocho-Chaguayo, L., Chumpitaz-Conde, J., Julca- Puente, D.G., Abanto-Díaz, P. (2014). Aislamiento de *Candida albicans* de hisopado nasal y faríngeo en alumnos de secundaria. *Anales de la Facultad de Medicina*; 75(2):181-183.
- Jianhua, W., Hai, W. (2009). Antifungal susceptibility analysis of *berberine*, *baicalin*, *eugenol* and *curcumin* on *Candida albicans*. *Journal of Medical Colleges of PLA*; 24(3): 142-147.
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L.A., Manzoor, N. (2011). Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Res*; 11:114-122.
- Khan, M.S., Ahmad, I., Cameotra, S.S. (2013). Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. *AMB Express*; 3(1):54-69
- Kingsley, L.J., Wilson, G.L., Essex, E.M., Markus, A.L. (2015). Combining Structure- and Ligand -Based Approaches to Improve Site of Metabolism Prediction in CYP2C9 Substrates. *Pharmaceutical research*; 32(3): 986-1001.
- Kong, X., Liu, X., Li, J., Yang, Y. (2014). Advances in Pharmacological Research of Eugenol. *Curr Opin Complement Alternat Med*; 1(1):8-11.
- Luo, G., Guenther, T.M. (2001). Investigation of the role of the 2,3-epoxidation pathway in the bioactivation and genotoxicity of dietary allylbenzene analogs. *Toxicology*; 160(1-3): 47-58.

- Maresca, M. (2013). From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. *Toxins*; 5(4): 784-820.
- Mayer, F.L., Wilson, D., Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*; 4(2):119-128.
- Molina-Navarro, M.M. (2005). *Las glutaredoxinas monotiólícas como reguladoras redox de proteínas: estudios funcionales y evolutivos en Saccharomyces cerevisiae* (tesis de doctorado). Universidad de Lérida, Lérida, España.
- Nestmann, E.R., Bryant, D.W., Carr, C.J. (1996). Toxicological significance of DNA adducts: summary of discussions with an expert panel. *Regulatory toxicology and pharmacology*; 24(1): 9- 18.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobon, A.M., Restrepo, A., Colombo, A.L. (2010). Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*; 51(5):561-570.
- Ogu, C.C., Maxa, J.L. (2000). Drug interactions due to cytochrome P450. *Proceedings / Baylor University Medical Center*, 13(4): 421–423.
- Pardi, G. (2002). Determinantes de patogenicidad de *Candida albicans*. *Acta odontológica Venezolana*; 40(2): 185-192.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*; 4(2): 89–96.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., Rao, R. (2010). Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 54(12): 5062-5069.
- Rydberg, P., Gloriam, D.E., Zaretski, J., Breneman, C., Olsen, L. (2010). SMARTCyp: A 2D Method for Prediction of Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *American Chemical Society medicinal chemistry letters*; 1(3): 96–100.
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., Lass-Flor, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*; 58(2):2-13.
- Sarsour, E.H., Kumar, M.G., Chaudhuri, L., Kalen, A.L., Goswami, P.C. (2009). Redox Control of the Cell Cycle in Health and Disease. *Antioxidants and redox signaling*; 11(12): 2985–3011.

- Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., Lowe, E.W. (2014). Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological reviews*; 66(1): 334–395.
- Solomons, T.W.G. (2004). *Química Orgánica*. Mexico:Limusa
- Southan, C., Stracz, A. (2013). Extracting and connecting chemical structures from text sources using chemicalize.org. *Journal of cheminformatics*; 5(20):1-10.
- Tu, T., Giblin, D., Gross, M.L. (2011). A Structural Determinant of Chemical Reactivity and Potential Health Effects of Quinones from Natural Products. *Chemical Research in Toxicology*; 24(9):1527-1539.
- Watkins, A.J. (2012). *A Survey of Culturable Methanogens in Contrasting Marine Sediments, their Substrates and Physiological Characteristics* (tesis de doctorado). Universidad de Cardiff, Reino Unido.
- Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*; 10: 95–105.
- Zhuo, S.F., Liu, J.P., Chowbay. B. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug metabolism reviews*; 41(2): 289- 295.
- Zore, G.B., Thakre, A.D., Jadhav, S.S., Karuppayil, M. (2011). Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*; 18: 1181– 1190.