



**Universitat de les  
Illes Balears**

DEPARTAMENT DE QUÍMICA



Institut Universitari d'Investigació  
en Ciències de la Salut

**ESTUDIO DFT DE LA REACTIVIDAD SOBRE SUPERFICIES  
AMINOFOSFOLIPÍDICAS. MECANISMOS DE REACCIONES  
RELACIONADAS CON LA GENERACIÓN DE PRODUCTOS DE  
GLICACIÓN AVANZADA (AGEs)**

**Tesis Doctoral  
Química Teórica y Modelización Computacional**

**CHRISTIAN SOLIS CALERO**

**Palma de Mallorca 2013**



Los Directores de la tesis **Dr. Francisco Muñoz Izquierdo**, Catedrático del Área de Química Física del Departamento de Química de la Universitat de les Illes Balears, y el **Dr. Joaquin Ortega Castro**, Profesor contratado Doctor del Área de Química Física de la Universitat de les Illes Balears, y el doctorando **Christian Solís Calero**.

**DAN CONSTANCIA DE:**

Que el presente trabajo titulado “Estudio DFT de la reactividad sobre superficies aminofosfolipídicas. Mecanismos de reacciones relacionadas con la generación de productos de glicación avanzada (AGEs)” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química (Área de Química Física) de la Universitat de les Illes Balears por Christian Solís Calero durante los años 2008- 2012, constituyendo la Memoria que presenta para optar al grado de Doctor en Química Teórica y Modelización Computacional.

Palma de Mallorca, Noviembre de 2013.

Fdo. Francisco Muñoz Izquierdo

Fdo. Joaquin Ortega Castro

Fdo. Christian Solís Calero



¿Imapunim kachkan chay mayu patapi, taytallay ductur?

Largavistaykita urquykamuy, qawaykamuway, atispaqa.

José María Arguedas

Munakusqay mamachaypaq Gloria,  
wawqeypaq Danielcha,  
panichaykunapaq Pricila, Milagros.



## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido posible gracias al Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación y de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, a través del otorgamiento de una beca de estudios de post grado.

Es propicia la oportunidad para expresar mi agradecimiento a los doctores Francisco Muñoz Izquierdo y Joaquín Ortega Castro, bajo cuya dirección se ha llevado a cabo este trabajo, por su inestimable ayuda, disponibilidad y dedicación.

Agradecer también el compañerismo y la ayuda que siempre han mostrado el resto de miembros que pertenecen en la actualidad al área de Química Física y a todos los que han pasado por él durante estos cuatro años, personas con las que a partir de nuestra relación profesional me han permitido compartir su amistad y camaradería. A todos deseo mostrarles mi más profundo reconocimiento.





# INDICE

	Página
Índice	9
Abstract	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Membranas biológicas	19
2.1.1 Estructura y composición de la membrana celular	19
2.1.2 Interacción de la membrana con el medio acuoso	23
2.1.3 Estudios químico-computacionales	29
2.2 Glicación no enzimática	31
2.2.1 Formación de bases de Schiff	33
2.2.2 Formación de compuestos de Amadori	35
2.2.3 Formación de productos finales de la glicación avanzada (AGEs)	39
2.2.4 Inhibición de los efectos adversos de los AGEs	49
3. FUNDAMENTOS METODOLÓGICOS	55
3.1. Métodos ab initio	57
3.1.1 Sistemas de varias partículas	57
3.2 Teoría del funcional de densidad (DFT)	59
3.2.1 Teoremas de Hohenberg-Kohn	59
3.2.2 Ecuación fundamental de la teoría del funcional de la densidad	61
3.2.3 Ecuaciones de Kohn-Sham	61
3.3 Implementación DFT de la correlación e intercambio	64
3.3.1 Aproximación de densidad local (LDA)	65
3.3.2 Aproximación del Gradiente Generalizado (GGA)	65
3.4 Funciones de base	66
3.5. Modelos bajo condiciones de contorno periódicas	68
3.6 Análisis de la reactividad química	70
3.6.1 Cálculos de estados de transición	72
3.7 Análisis de los estados estacionarios y de transición	73
3.7.1 Análisis poblacional	73

3.7.2 Efectos del solvente	74
4. MATERIALES Y METODOS	77
4.1 Programas usados	79
4.2. Modelado de la superficie fosfolipídica	79
4.3 Determinación de los mecanismos de reacción	83
4.4 Cálculos de propiedades relacionadas con la reactividad química	84
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
5.1 Resultados	87
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artículo 1. Reactivity of a phospholipid monolayer model under periodic boundary conditions: a density functional theory study of the Schiff base formation between phosphatidylethanolamine and acetaldehyde.</li> </ul>	89
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artículo 2. A comparative DFT Study of the Schiff base formation from Acetaldehyde and Butylamine, Glycine and Phosphatidylethanolamine.</li> </ul>	99
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artículo 3. A DFT Study of the Amadori product rearrangement above a Phosphatidylethanolamine surface. Comparison to the reaction in an aqueous environment.</li> </ul>	113
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artículo 4. DFT Study of the formation of an Advanced glycation end-product Carboxymethyl-Phosphatidylethanolamine from reaction between Glyoxal and Phosphatidylethanolamine.</li> </ul>	127
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artículo 5. DFT Study on Amino-Phospholipids Surface-Mediated Decomposition of Hydrogen Peroxide.</li> </ul>	169
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artículo 6. DFT Study of the Mechanism of the Reaction of Aminoguanidine with Methylglyoxal. Comparison with aminoguanidine reaction above an aminophospholipid surface.</li> </ul>	181
5.2 Discusión de resultados	215
6. CONCLUSIONES	223
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	227

## ABSTRACT

Mechanisms for the formation of advanced glycation end-products on an amine-phospholipid monolayer model were realized by using density functional theory (DFT) calculations carried out at the PBE/GGA level under periodic boundary conditions. Each unit cell contained two phosphatidylethanolamine (PE) molecules, and a sufficient number of water molecules for forming hydrogen bond networks. These networks were involved in the reactions, stabilizing reactants, intermediates, products and transition states and performing as proton-transfer carriers, important in all steps of reactions. The studied reactions covered formation of Schiff bases, having acetaldehyde as carbonyl compound, the Amadori rearrangement since Schiff base from D-erythrose and PE, the hydrogen peroxide decomposition above PE surface, and the formation of carboxymethylated-PE from glyoxal and PE. In the studied reactions where there is a dehydration step, it was the limiting step, which is consistent with the experimental evidence available for such reactions. The most important outcome of our study is highlighting the catalytic role of PE-surface on the studied reactions which proceed on it. This catalytic effect is realized through PE-surface components as amine groups and phosphate groups which might enhance reaction forming hydrogen bonds with water molecules of the hydrogen bond network, and facilitating the water molecules accumulation in the proximity of the PE-surface, amine groups could participate additionally as donors or acceptors in the proton transfers. Based in our results, it is possible to hypothesize that cell membrane phospholipids surface environment modify the kinetic behavior of some biological reactions, being capable of catalyzing them.



## **1. INTRODUCCIÓN**



Las membranas biológicas desempeñan papeles clave en la vida celular, actuando como barreras de permeabilidad, permitiendo la comunicación selectiva entre el interior y el exterior de la célula (Jiang et al. 2012, García-Sáez & Schwille. 2009). En la superficie de las membranas biológicas acontecen numerosas reacciones, en las que la participación de las proteínas de membrana ha sido estudiada extensamente, dada su participación como reactivos, al ser sometidos a algún tipo de modificación en su estructura, o a su participación como catalizadores específicos. Los componentes lípidicos de la membrana siempre han sido destacados por su papel estructural, o como fuente para la generación de moléculas señalizadoras: diacilgliceroles, ceramidas, inositolfosfatos, etc, que intervienen en multitud de procesos celulares. No obstante, no se había destacado el posible rol catalítico de los componentes fosfolípidicos de las membranas biológicas en las reacciones que acontecen en su superficie.

Dentro de los componentes principales de las membranas biológicas, la fosfatidiletanolamina (PE) se reconoce como uno de los fosfolípidos más abundantes en su composición, con una distribución uniforme entre las capas interior y exterior de la membrana (Bouchet et al. 2009). Su papel como parte de las membranas se ha mostrado específica y no intercambiable con otros fosfolípidos (Wu et al. 2010, Hakizimana et al. 2008), llevando a cabo muchas funciones biológicas más allá de su papel estructural, teniendo por ejemplo una contribución a la apoptosis y señalización celular (Zhang et al. 2007, Falls et al. 2000).

Las fosfatidietanolaminas al poseer un grupo amino en su estructura son susceptibles de realizar un ataque nucleofílico a los grupos carbonilo de derivados cetónicos o aldehídicos, como los azúcares reductores, pudiendo formar bases de Schiff, que por una reacción de reordenamiento intramolecular pueden dar lugar a la formación de Compuestos de Amadori (Amadori-PE) (Bucala et al. 1993), todo este proceso es generalmente conocido como glicación no enzimática. El Amadori-PE a su vez conduce a la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) tales como la carboximetil-PE, que aceleran el proceso de peroxidación de lípidos y con ello, el estrés oxidativo de los tejidos celulares (Miyazawa et al. 2008, Miyazawa et al. 2005).

A diferencia de los procesos de glicación no enzimática de proteínas y ácidos nucleicos, que han sido investigadas intensamente por métodos experimentales (Luthra & Balasubramanian 1993, Li et al. 2008), poca atención se le había dado a la glicación fosfolípídica. Hoy se sabe de la relevancia biomédica de este proceso, ya que la formación de estos compuestos juegan un importante papel en la patología de la

ateroesclerosis, diabetes, otras enfermedades y el envejecimiento (Grillo & Colomatto 2008). Como un ejemplo específico podemos mencionar los estudios clínicos en pacientes diabéticos donde se ha detectado un aumento anormal en el plasma de la concentración del hidroperóxido de fosfatidiletanolamina (PCOOH), debido a la formación de un compuesto de Amadori de la fosfatidiletanolamina (Nagashima et al. 2002).

El objetivo del presente trabajo es estudiar los mecanismos de varias reacciones relacionadas con la formación de productos de glicación avanzada, teniendo como escenario las superficies de las membranas fosfolípídicas. Para ello se obtuvo primero un modelo periódico de estas superficies, que posteriormente permitió realizar cálculos de los mecanismos de algunas reacciones que conducen a la formación de productos de glicación avanzada, así como de otras reacciones, que limitan o inhiben la formación de productos de glicación avanzada sobre las superficies aminofosfolípídicas. Es de destacar que hasta el presente trabajo no se había realizado ningún estudio teórico acerca de la reactividad química de las monocapas o bicapas de fosfolípidos usando estos niveles de cálculo, y a la vez empleando condiciones de contorno periódicas en los modelos.



## **2. ANTECEDENTES**



## **2.1 MEMBRANAS BIOLÓGICAS**

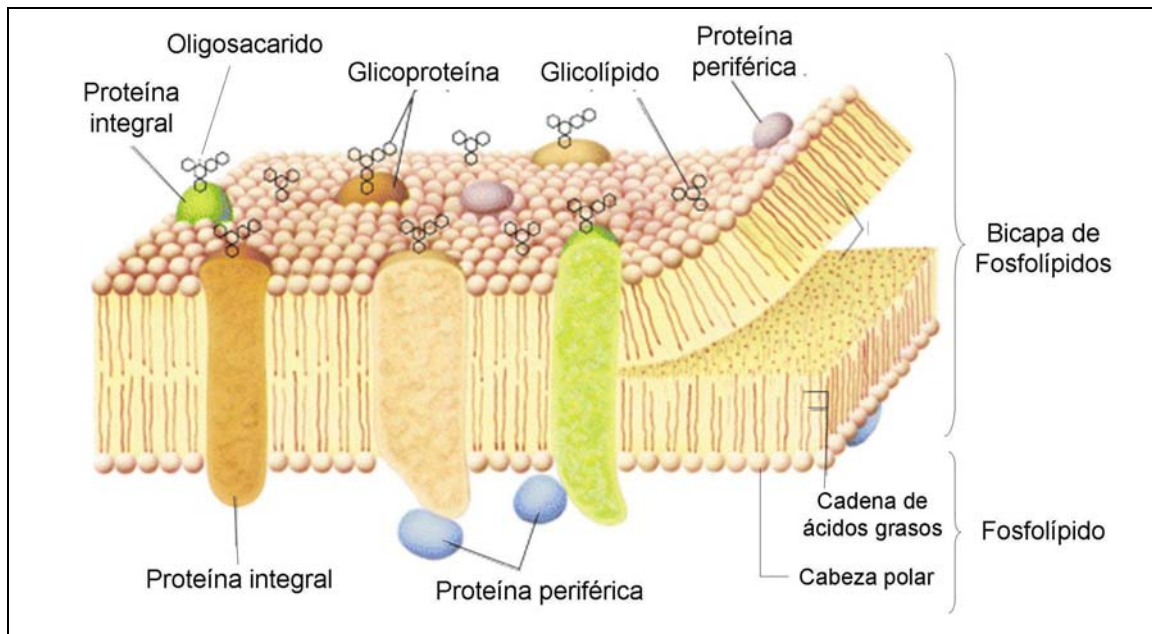
Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, es decir, tienen una región apolar hidrófoba que repele el agua y una región polar hidrófila que tienen afinidad por la misma. La región apolar de los fosfolípidos corresponde a las largas cadenas alquílicas de los ácidos grasos, que se denominan por ello "colas apolares"; la región polar corresponde al grupo fosfato, cargado negativamente, y una molécula unida a él, que puede estar cargada positivamente. Son componentes de las membranas biológicas y desempeñan un papel importante en los sistemas biológicos. En general los lípidos zwitterionicos como la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) han sido los más ampliamente estudiados (Pamplona 2008, Dowhan 1997).

La PE es de los más abundantes fosfolípidos presentes en las membranas celulares, particularmente en células de tejidos relacionados con el sistema nervioso, como la sustancia blanca del cerebro, nervios y medula espinal (van Meer et al. 2008). Debido a su cabeza polar la PE contribuye en mayor grado a la fluidez de la membrana comparado con la fosfatidilcolina. Normalmente se encuentra en su forma neutra zwitterionica hasta pH aproximado de 7, por encima de ese pH se encuentra en su forma aniónica (Dowhan 1997). La PE como una amina primaria puede reaccionar con compuestos carbonílicos dando lugar a la formación de bases de Schiff.

### **2.1.1 Estructura y composición de la membrana celular**

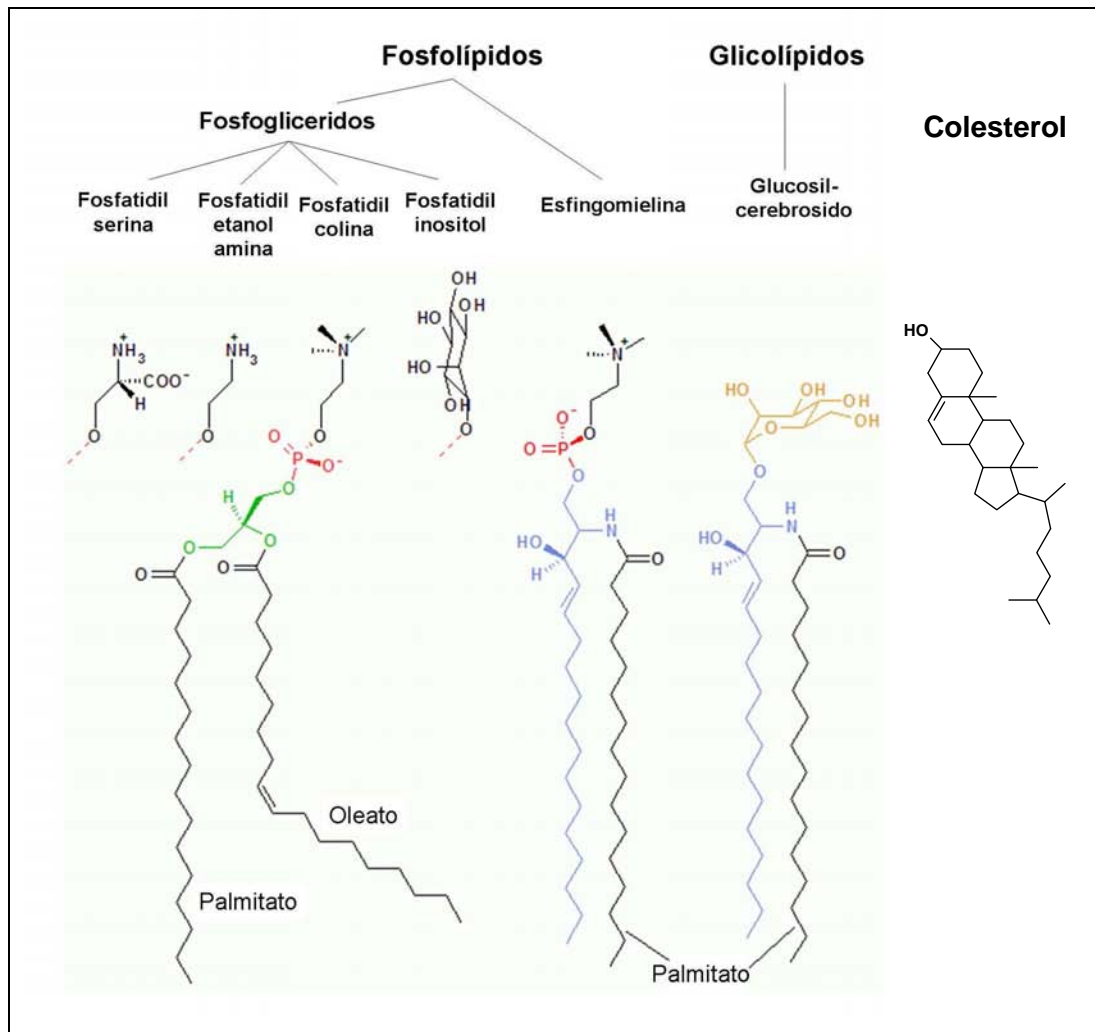
En 1972, SJ Singer y GL Nicolson propusieron el modelo de mosaico fluido para la estructura de la membrana, siendo las membranas consideradas como estructuras dinámicas compuestas de proteínas y fosfolípidos (Singer & Nicolson 1972). En este modelo, la bicapa de fosfolípidos es un líquido de matriz, en esencia, un disolvente de dos dimensiones para las proteínas. Tanto los lípidos como las proteínas son capaces de movimiento lateral y de rotación. Singer y Nicolson también señalaron que las proteínas pueden estar asociados con la superficie de esta bicapa o incrustadas en la bicapa en diversos grados (Fig. 1). Se definieron así dos tipos de proteínas de la membrana. La primera, llamada proteínas periféricas (o proteínas extrínsecas), que incluye a aquellas que no penetran en la bicapa de manera significativa y se asocian con la membrana en virtud de las interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno entre la superficie de la membrana y la superficie de la proteína. Las proteínas integrales (o proteínas intrínsecas), en cambio, poseen superficies hidrófobas que fácilmente pueden penetrar la bicapa lipídica en sí, así como las superficies que prefieren el contacto con el medio

acuoso. Estas proteínas pueden insertarse en la membrana y extenderse a través de la misma exponiéndose al solvente acuoso por ambos lados de la bicapa.



**Fig. 1. Modelo de mosaico fluido para la estructura de la membrana celular.**

Los componentes de las membranas biológicas, tales como los fosfolípidos, los glicolípidos y las proteínas integrales, presentan una naturaleza anfipática, conteniendo a la vez regiones hidrófilas e hidrófobas en su estructura. Dentro de este grupo, los fosfolípidos son los componentes que constituyen la matriz de las membranas biológicas, con sus cabezas polares de ambas capas orientadas al solvente acuoso. La membrana celular consta de tres clases de lípidos anfipáticos: fosfolípidos, glicolípidos y colesterol (Fig. 2). La proporción de cada uno en las membranas depende del tipo de célula, pero en la mayoría de los casos los más abundantes son los fosfolípidos (Lodish et al. 2004). Las cadenas de ácidos grasos en los fosfolípidos y glicolípidos suelen contener un número par de átomos de carbono, por lo general entre 16 y 20. Los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos son los más comunes. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados, con una configuración cis para los dobles enlaces mayoritariamente. La longitud y el grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos tienen un efecto profundo en la fluidez de la membrana, los fosfolípidos insaturados pueden crear un pliegue, previniendo el empaquetamiento de las cadenas de los ácidos grasos, lo que disminuye la temperatura de fusión de la membrana y aumenta su fluidez.

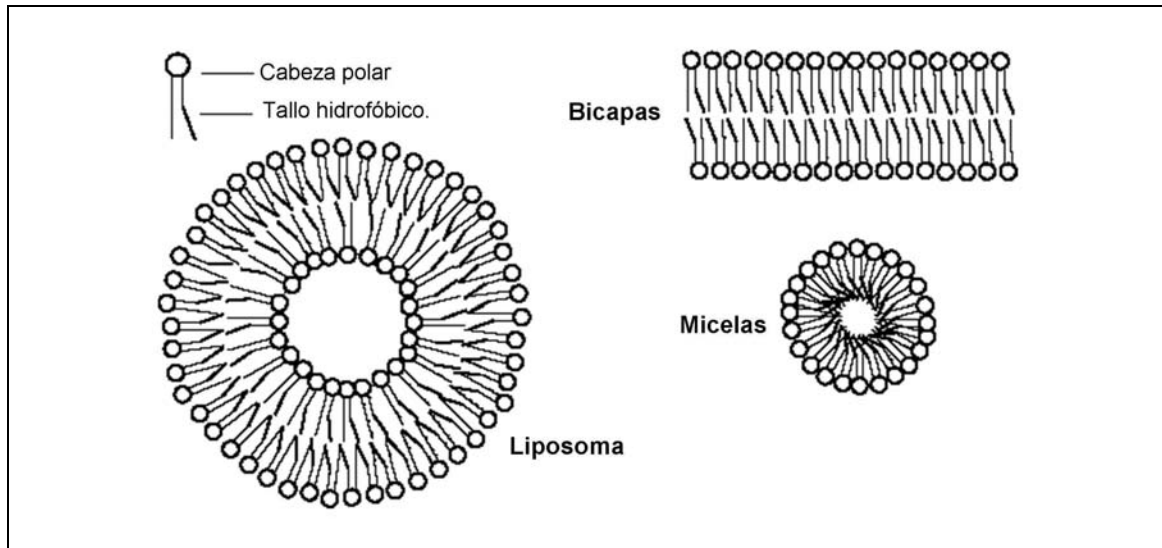


**Fig. 2. Estructura de algunos de los componentes lipídicos de la membrana celular.**

Las cabezas polares de los diferentes lípidos de las membranas biológicas presentan diferentes cargas netas, así la fosfatidilcolina, la esfingomielina y fosfatidiletanolamina, son fosfolípidos de naturaleza zwitterionica, siendo además los más abundantes en las membranas biológicas. Otros lípidos de membrana presentan en sus cabezas polares grupos con carga electrostática neta negativa (fosfatidilserina, ácido fosfátidico), carga positiva (lípidos catiónicos artificiales, esfingosinas), o carecen de residuos de carga (diacilglicerol, cerebrósidos).

Las bicapas de fosfolípidos se forman rápida y espontáneamente cuando los fosfolípidos se agregan al agua, y son estructuras estables en solución acuosa. Debido a que la exposición de los bordes de la bicapa al disolvente es muy desfavorable, las bicapas extensas normalmente se recubren a sí mismas formando vesículas cerradas como los liposomas (Fig. 3). Estas bicapas fueron vistas en un principio como una fase

hidrófoba inerte que permitía la 'solubilidad' de las proteínas de membrana y que actuaba solo como una barrera entre dos compartimientos. Sin embargo, la bicapa es, de hecho, un sistema altamente organizado sometido a diversas interacciones con su entorno que conducen a una estructura dinámica equilibrada y asimétrica.

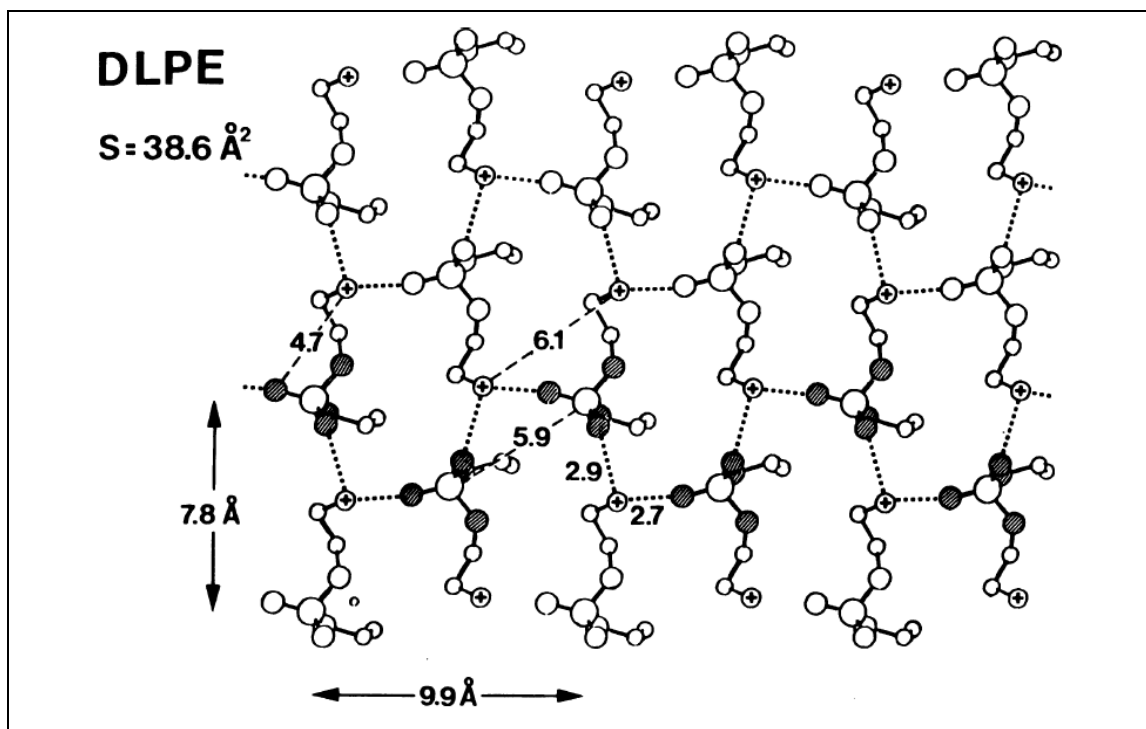


**Fig. 3. Agregados moleculares de los fosfolípidos en medios acuosos**

Para comprender las propiedades biofísicas de las bicapas lipídicas presentes en las membranas biológicas, ha sido útil estudiar primero los sistemas binarios de fosfolípidos y agua. En estos sistemas el contenido de agua y la temperatura son las principales variables. Dependiendo de estas, el grado de repulsión entre las cabezas polares de modo lateral se incrementa de modo diferente entre los distintos tipos de fosfolípidos. En fosfolípidos como la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina el grupo polar se orienta perpendicularmente con respecto a las cadenas hidrocarbonadas, estabilizándose sus estructuras en la bicapa lipídica mediante interacciones de carácter hidrófobo entre las cadenas hidrocarbonadas y atracciones electrostáticas entre los grupos polares vecinos.

No obstante, el empaquetamiento molecular de las bicapas de fosfatidilcolina es más abierto, existiendo espacios en las bicapas, altamente polares donde se ubican moléculas de agua que, cuando están en exceso, producen la separación de las bicapas y como consecuencia un mayor desorden debido a la desaparición de las atracciones electrostáticas en el interior de las bicapas que estabilizan sus estructuras. El empaquetamiento de las bicapas de fosfatidiletanolamina es más compacto (Fig. 4). Ello se debe al menor tamaño y mayor carga efectiva de sus grupos  $\text{NH}_3^+$  comparados con

los más voluminosos  $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$  presentes en las fosfatidilcolina. Por ello es más difícil que el agua u otros compuestos logren separar sus bicapas dado a que están fuertemente unidas por enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre cargas positivas de sus grupos amino, y las negativas de los grupos fosfatos (Elder et al. 1977).

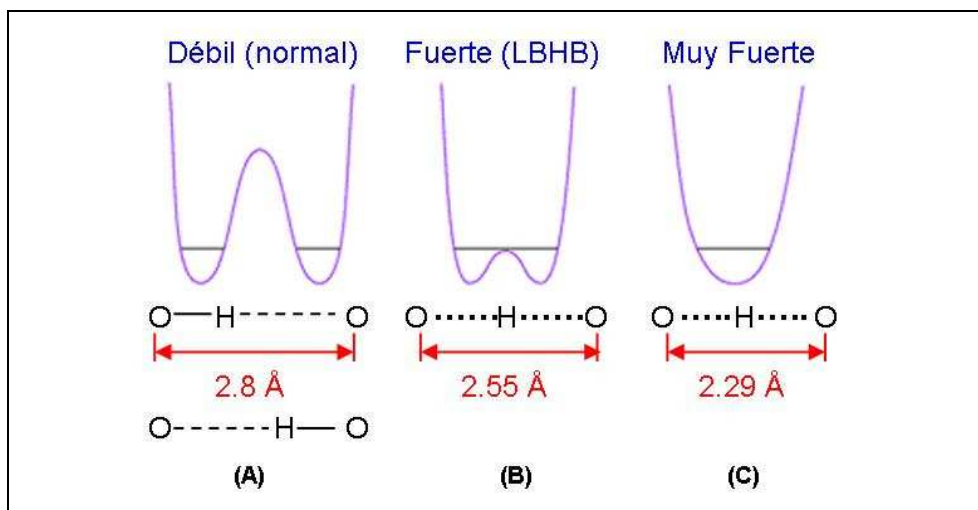


**Fig. 4. Empaquetamiento de las cabezas polares de las moléculas de fosfatidiletanolamina en fase cristalina lamelar.** Se muestra el área molecular  $S$  de  $38.6 \text{ \AA}^2$ . Se indican también los parámetros de celda así como las distancias de contacto intramoleculares e intermoleculares (Fuente: Elder et al. 1977).

### 2.1.2 Interacción de la membrana con el medio acuoso

La organización de las moléculas de agua alrededor de los grupos polares en las superficies de las membranas biológicas influye en el potencial electrostático de las mismas. Las moléculas de agua en la superficie de la membrana forman una red de enlaces de hidrógeno que interactúan con los grupos polares de los fosfolípidos. Los enlaces de hidrógeno son una de las más importantes interacciones "débiles", definen el empaquetamiento cristalino de muchas moléculas orgánicas y organometálicas, la estructura de macromoléculas biológicas y modulan la reactividad de los diferentes grupos dentro de una molécula. Los enlaces de hidrógeno se pueden definir como una interacción atractiva entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido

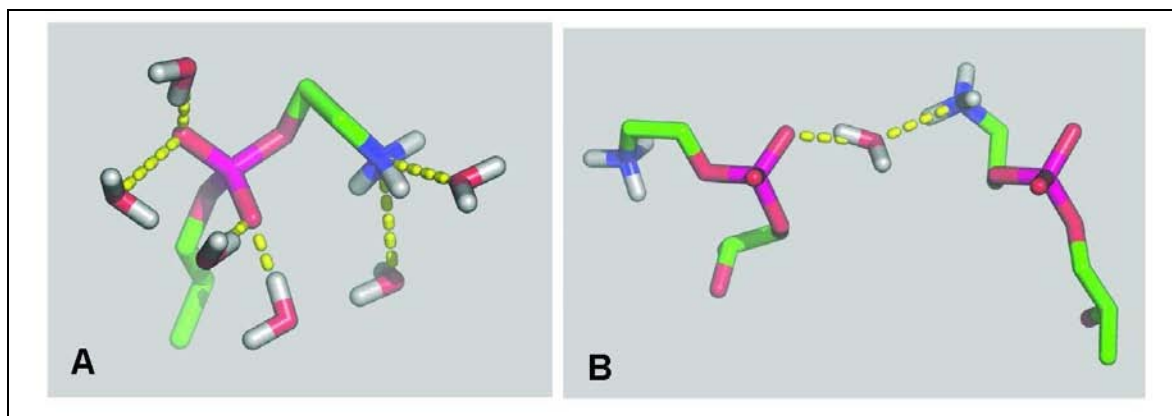
covalentemente a otro átomo electronegativo. Se han definido tres clases de enlaces de hidrógeno: débil (2-8 kcal/mol), fuerte (10-20 kcal/mol), y muy fuerte (24-40 kcal/mol) (Perry et al. 2004), que se diferencian entre sí por la distancia entre los dos átomos electronegativos o heteroátomos (Fig. 5). En los enlaces de hidrógeno muy fuertes la distancia entre los heteroátomos es menor que 2.4 Å y el protón se encuentra casi centrado entre ellos (Fig. 5 C). El diagrama de energía para el movimiento de hidrógeno en el enlace de hidrógeno simétrico es un pozo de potencial, en lugar del doble pozo de potencial para los otros dos tipos de enlace que son asimétricos. Ejemplos de enlaces de hidrógeno simétricos se encuentran a menudo en las estructuras cristalinas (Perrin 2010).



**Fig. 5. Clases de enlaces de hidrógeno.**

Los estudios teóricos indican que las moléculas de agua cerca de la superficie polar de las membranas fosfolipídicas se orientan por un campo electrostático asociado con los grupos cargados de la superficie. Los grupos funcionales con los que interaccionan las moléculas de agua incluyen en el caso de la fosfatidiletanolamina, los grupos fosfatos y los grupos aminos cargados. Los ordenamientos en que se dan estas interacciones son variados, pudiendo encontrarse casos de moléculas de agua que interaccionan con dos moléculas de fosfolípidos a la vez (Fig. 6) a través de los diferentes grupos funcionales de estos (Suits et al. 2005, Róg et al. 2003).





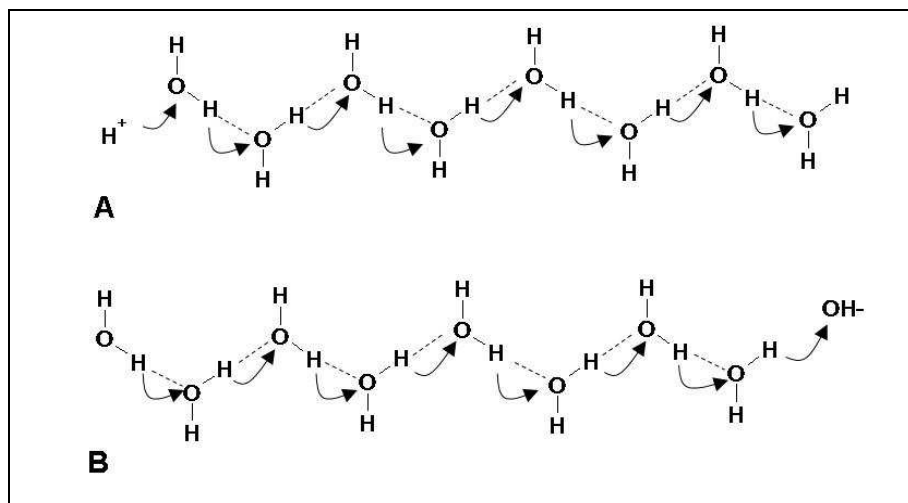
**Fig. 6. Ejemplos de interacciones intermoleculares en moléculas de fosfatidiletanolamina.** A: Interacción de moléculas de agua con el grupo fosfato. B: Interacción entre el grupo amino y el grupo fosfato de dos aminofosfolípidos usando una molécula de agua como puente (Fuente: Murzyn et al. 2005).

Se sabe que la función de distribución radial para las moléculas de agua alrededor del grupo fosfato tiene un pico bien definido alrededor de  $3.8 \text{ \AA}$ , lo que indica una alta solvatación del grupo fosfato, con un promedio de 4 moléculas de agua alrededor de cada átomo de oxígeno no esterificado del grupo fosfato. Los enlaces P-O no esterificados de los grupos fosfato preferentemente se orientan fuera de la membrana, interaccionando con las moléculas de agua que orientan sus dipolos de modo que se genera una polarización que tiene una influencia importante en las propiedades electrostáticas de las membranas.

La complejidad de los sistemas con enlaces de hidrógeno se incrementa si se considera la influencia del entorno sobre los átomos del enlace. Estudios teóricos muestran que la estabilización proporcionada por los enlaces de hidrógeno a un sistema químico, por ejemplo en vacío, no es extrapolable a un entorno diferente como, por ejemplo, el sometido a condiciones de solvatación (Warshel et al. 1996). Estudios experimentales usando como modelos monocapas fosfolípicas, han determinado que el potencial de superficie en estas membranas depende no solamente de los grupos funcionales de la cabeza polar, sino también existe una contribución importante de los grupos carbonilo próximos a las regiones de más baja constante dieléctrica (Hauser et al. 1981, Fort & Alexander 1959). Se ha sugerido, en base a estudios de estas monocapas, que los grupos metilo de las cadenas alifáticas también tendrían una contribución en el potencial de superficie que debe tenerse en cuenta (Vogel & Möbius 1988a).

Las redes de enlaces de hidrógeno sobre las superficies de los fosfolípidos a su vez pueden ser el medio por el que se presente una transferencia concertada de protones desde un grupo funcional donador a otro aceptor. Existen antecedentes que reportan la transferencia de protones entre los grupos amino de moléculas de fosfatidiletanolamina usando moléculas de agua como puente (Ralph et al. 1985), así como la conducción de protones en la interfase entre el agua y la monocapa polar lipídica (Teissié et al. 1985, Prats et al. 1987). La transferencia de protones a través de moléculas de agua en el entorno de la superficie de la membrana se potenciaría debido a que este microambiente presenta constantes dieléctricas diferentes a las del agua como solvente puro, por lo que la reactividad del agua aumenta. Se ha reportado valores en el rango de 10-30 para las constantes dieléctricas en la superficie fosfolipídica de la membrana, comparado con el valor de 78 para la fase acuosa (Fernández & Fromherz 1977, Lelkes & Miller 1980, Cevc et al. 1981), habiéndose demostrado asimismo que este ambiente de baja constante dieléctrica provoca el incremento de una unidad en el pKa de los grupos ácidos (Fernández & Fromherz 1977). En el caso de las superficies de las membranas biológicas, estas redes de enlaces de hidrógeno pueden servir adicionalmente como un mecanismo de almacenamiento de protones en solución (esponjas de protones), al permitir que los protones liberados puedan permanecer por un tiempo a lo largo de la superficie de la membrana antes de que se disipen en el medio acuoso del “bulk” de agua (Mulkidjanian et al. 2006, Heberle et al. 1994).

Este mecanismo de transferencia concertada de protones dentro de una extendida cadena de moléculas de agua conectadas por puentes de hidrógeno, fue inicialmente conocido como “Grotthuss”, en honor al químico alemán Theodor von Grotthuss, quien en 1806 propuso una teoría única de la conductividad del agua, en la que se describía una reacción electrolítica como un túnel en la que cada átomo de oxígeno al mismo tiempo pasaba y recibía un solo átomo de hidrógeno (de Grotthuss 1806). Era una teoría asombrosa para ser propuesta en aquel momento, ya que la molécula de agua se pensaba que tenía como fórmula empírica OH y no H<sub>2</sub>O, no entendiéndose completamente entonces la existencia de iones. La difusión de los protones de acuerdo con el mecanismo de “Grotthuss” se produce mucho más rápido que un alternativo mecanismo de difusión molecular usando un transportador ácido (por ejemplo H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) para los protones, ya que se desacopla de la difusión libre de su masa.

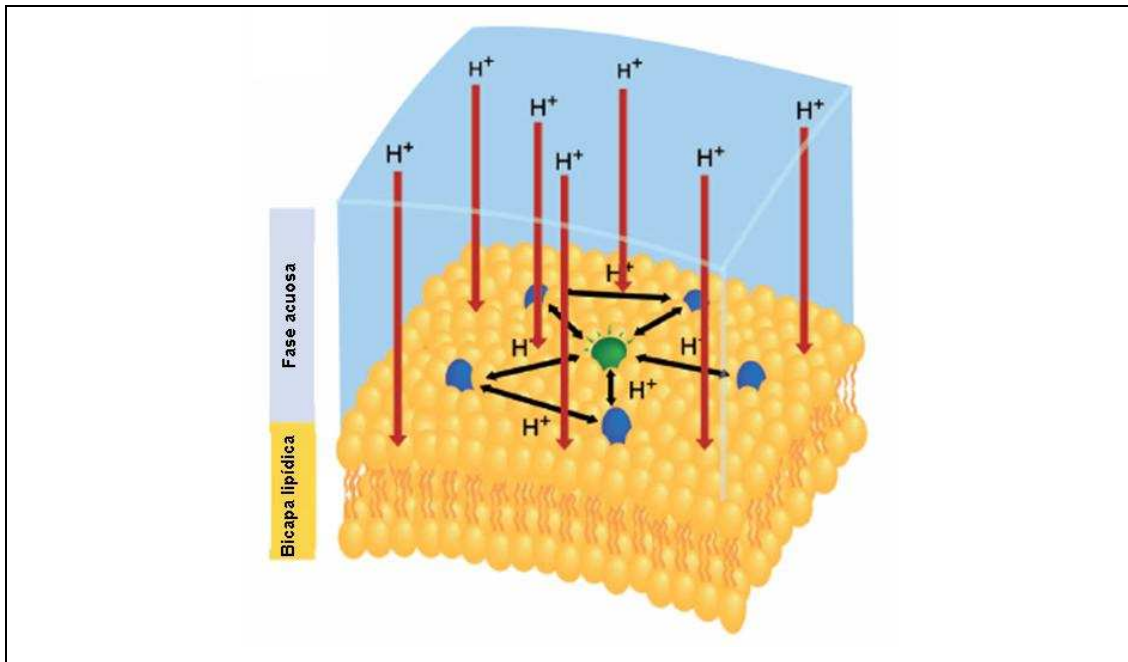


**Fig. 7. Mecanismos para la difusión de protones.**

A. Mecanismo Grotthuss. B Mecanismo de agujero de protones.

Actualmente se considera que en el mecanismo clásico de Grotthuss, la transferencia de protones se da de un donante ácido a un aceptor neutro, quedando este último bajo una forma ácida (Fig. 7A). En el mecanismo alternativo denominado "agujero de protones", la transferencia de protones se da de un donante neutro a un aceptor de naturaleza básica, quedando este último bajo una forma neutra al final de la transferencia (Fig. 7B). La energía relativa de los mecanismos de transferencia clásica de Grotthuss y de "agujero de protones" puede ser aproximadamente estimada en base a los valores de pKa de los grupos donante y aceptor de protones. Conociendo estos valores es posible predecir cual de las vías de transferencia de protones se puede presentar, así tenemos que cuando los grupos donador y aceptor de protones tienen a la vez valores de pKa mayores que 7, el mecanismo de agujero de protones puede ser energéticamente más favorable que el mecanismo clásico de Grotthuss (Riccardi et al. 2006).

Estudios experimentales han revelado que el intercambio de protones entre la superficie de las membranas biológicas y el "bulk" de agua tarda cerca de un milisegundo, existiendo una barrera de naturaleza electrostática entre la superficie de la membrana y la fase acuosa. La barrera podría surgir debido a la polarización del agua en la superficie de la membrana con carga negativa. Mientras que el intercambio de protones entre la superficie y la fase acuosa se retrasa por esta barrera interfacial, la difusión de protones a lo largo de la membrana se da en sólo microsegundos, como ha sido observado en el caso de transporte de protones entre proteínas transmembrana vecinas, donde los protones se difunde por la superficie de la membrana a través de una red de enlaces de hidrógeno presentes en la superficie (Fig. 8).



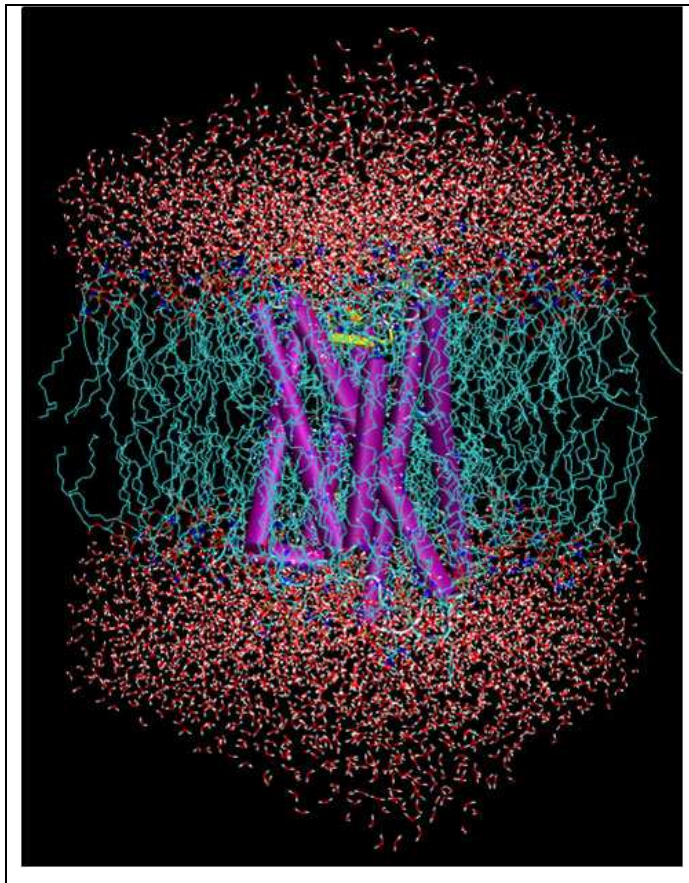
**Fig. 8. Efecto colector de protones de una superficie fosfolipídica de un liposoma.**

Se muestra en verde una molécula de fluoresceína anclada (marcador para detectar la transferencia de protones) y en azul el ácido fosfatídico. (Fuente: Mulkidjanian et al. 2006).

La escala de tiempo de microsegundos en que procede la transferencia de protones, está determinada por las propiedades de la superficie de la membrana (Gaczareck et al. 2004). Así tenemos que la carga neta negativa de las membranas biológicas impone limitaciones a la movilidad de las moléculas en su superficie como el agua, polarizándola. El entorno de la interfase en consecuencia adopta una constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) significativamente más baja que en la fase acuosa (Feniouk et al. 2002, Cherepanov et al. 2003). Se sabe que el valor de  $\epsilon$  de la primera capa de moléculas de agua en una superficie cargada es del orden de 4-6 (Riesle et al. 1996). La constante dieléctrica en la superficie de la bicapa lipídica se ha reportado que se encuentra en el intervalo de 10-30 (Adelroth & Brzezinski 2004, Nachliel et al. 1996). En la superficie de las membranas biológicas la barrera de energía interfacial y la capacidad de los protones de migrar rápidamente a lo largo de la superficie se debe a la alta densidad de carga negativa originada por los grupos fosfato de los fosfolípidos (Mulkidjanian et al. 2006). Otros factores a considerar en la transferencia de protones a lo largo de la membrana son la distancia entre la fuente de la transferencia y los receptores de la transferencia y la composición de la solución en contacto con la membrana (Antonenko & Pohl 2008, Cherepanov et al. 2004, Heberle et al. 1994, Antonenko et al. 1993).

### 2.1.3 Estudios químico computacionales

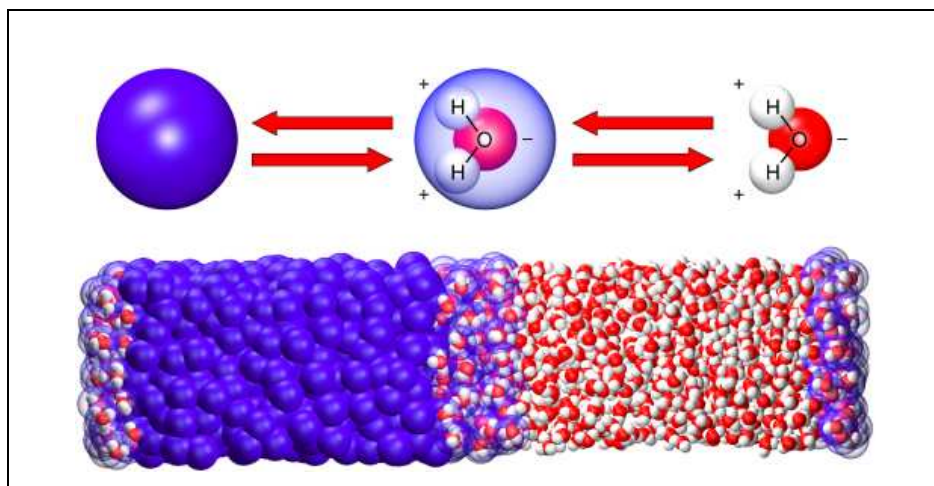
Las primeras investigaciones computacionales de los fosfolípidos se llevaron a cabo utilizando métodos estadísticos para describir sus propiedades generales (Scott et al. 1975, Israelachvili 1973). En la década de 1980 la simulación de las moléculas y su comportamiento mediante una descripción atómica explícita se empezó a extender a sistemas de gran tamaño, como proteínas y lípidos. Para ello se han venido desarrollando diferentes campos de fuerza. Para los lípidos, los campos de fuerza CHARMM27 (Feller & MacKerell 2000) y los de Berger et al. (Berger et al. 1997) han sido con los que se han obtenido resultados coherentes con la evidencia experimental (Prakash & Sankararamakrishnan 2010). También es posible realizar la combinación de diferentes campos de fuerza cuando el sistema molecular incluye diferentes tipos de moléculas, sin embargo esto requiere de un cuidadoso análisis lo que hace este tipo de cálculos complicados (Siu et al. 2008). Estas simulaciones por lo general llegaron a permitir tratar sistemas que incluían más de 100 000 átomos. Los modelos actuales incluyen a la membrana celular inmersa en el solvente acuoso, pudiendo tener incrustada alguna proteína de membrana de interés para el estudio (Fig. 9).



**Fig. 9. Instantánea de una simulación molecular que incluye la bicapa fosfolipídica, una proteína integral de membrana y moléculas de solvente.**

El uso de los campos de fuerza ha permitido el estudio de las propiedades físicas y químicas de los fosfolípidos de las membranas biológicas mediante simulaciones de dinámica molecular. Se ha obtenido aproximaciones de las interacciones de moléculas pequeñas con los fosfolípidos, inicialmente mediante modelos estáticos de sus conformaciones e interacciones (Sum et al. 2003, Kyrychenko 2010a, Kyrychenko et al. 2010b, Notman et al. 2007). Además, se han determinado otras propiedades de las membranas biológicas incluyendo comportamiento de las fases (Pogodin & Baulin 2010, Esteban-Martín et al. 2009), la estabilidad y propiedades mecánicas (Berkowitz 2009, Boek et al. 2005, Sum et al. 2003), y parámetros estructurales (Berkowitz 2009, Hyvönen & Kovanen 2003).

Estas simulaciones permiten caracterizar las interacciones átomo-átomo de modo detallado. Sin embargo, estos modelos son extremadamente limitados en relación al tamaño del modelo y el tiempo de la simulación, esto significa que a lo sumo se consiguen tratar sistemas de varios nanómetros y, en el mejor de los casos, varios cientos de nanosegundos. Para superar estas limitaciones se han desarrollado los modelos de grano grueso “coarse grained”, que son modelos más sencillos de la estructura molecular (Fig. 10), que carecen del detalle atómico de los modelos convencionales, pero permiten calcular las propiedades moleculares que determinan la física del sistema en estudio, a una escala mayor de tiempo y espacio (Bennun et al. 2009). De este modo, estos modelos permiten explorar fenómenos en escalas de tiempo y espacio que son inaccesibles mediante simulaciones atomísticas.



**Fig. 10. Modelo “coarse grained” para el agua.** Se observa el modelo atomístico a la derecha y el modelo “coarse grained” a la izquierda. (Fuente: Praprotnik et al. 2007)

Desafortunadamente a pesar de estos avances el uso de los campos de fuerza presenta varias limitaciones. Al considerar independientemente de la conformación adoptada, valores fijos para las cargas atómicas parciales y los momentos dipolares, se ignoran las transferencias de carga, efecto que puede jugar un papel muy importante en la descripción de los enlaces de hidrógeno. Estos métodos además no permiten una descripción adecuada de los cambios en la estructura electrónica y por ello no son válidos para los estudios de estados excitados y de la reactividad química, en donde se forman y escinden enlaces. Para estos casos lo conveniente es usar métodos químico-cuánticos o combinados QM/MM.

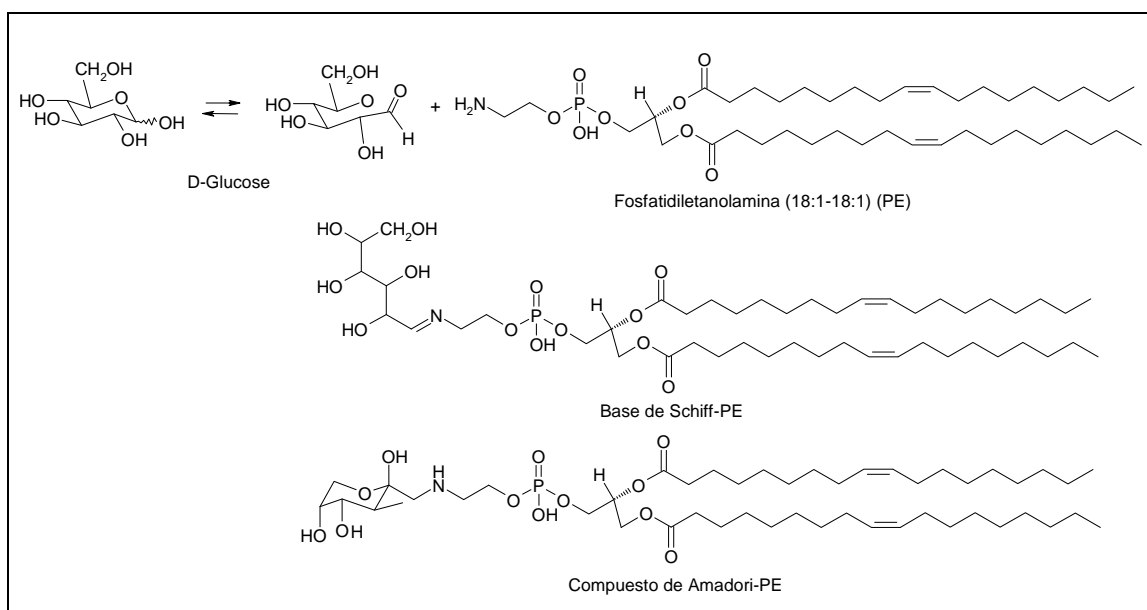
Usando métodos químico cuánticos hay muy pocos estudios que tengan relación con las membranas biológicas y sus componentes. Podemos mencionar al respecto estudios de la foto-oxidación de los lípidos por el oxígeno singulete con cálculos de nivel DFT (Tejero et al. 2004) el modelaje de la interacción entre los grupos de la cabeza fosfolipídica y las partículas de sílice (Snyder & Madura 2008) y el estudio del espacio conformación al de algunas moléculas de fosfolípidos (Sugimori et al. 2009, Krishnamurty et al. 2008). No obstante, estos estudios teóricos son de moléculas aisladas y no consideran las interacciones entre los fosfolípidos y el solvente de modo explícito.

## **2.2 GLICACIÓN NO ENZIMÁTICA**

La reacción de Maillard o “glicación no enzimática” fue caracterizada en 1912 por el científico francés Louis Camille Maillard en un tratado sobre “Matières humiques et protéiques, action de la glycérine et les sucres sur les acides amines”, al observar colores amarillo-marrón caramelo al calentar una solución de azúcares reductores y aminoácidos (Maillard 1912). La importancia de su contribución es el haber postulado que estas reacciones, que luego tomaron su nombre, se producían también en los seres vivos. Una década más tarde, en 1922, el químico italiano Mario Amadori determinó el producto de la reacción, que por ello lleva su nombre y que describe los primeros estadios de la combinación de los azúcares reductores con los grupos amino primarios pertenecientes a distintas moléculas (Rossi 2005, Amadori 1929).

La reacción de Maillard no es una sola reacción, sino una serie de reacciones no enzimáticas en las que primero se da la adición de un grupo amina primario de las proteínas, ácidos nucleicos o fosfolípidos a los grupo carbonilo de los azúcares reductores, formando bases de Schiff, que posteriormente sufren reacciones de

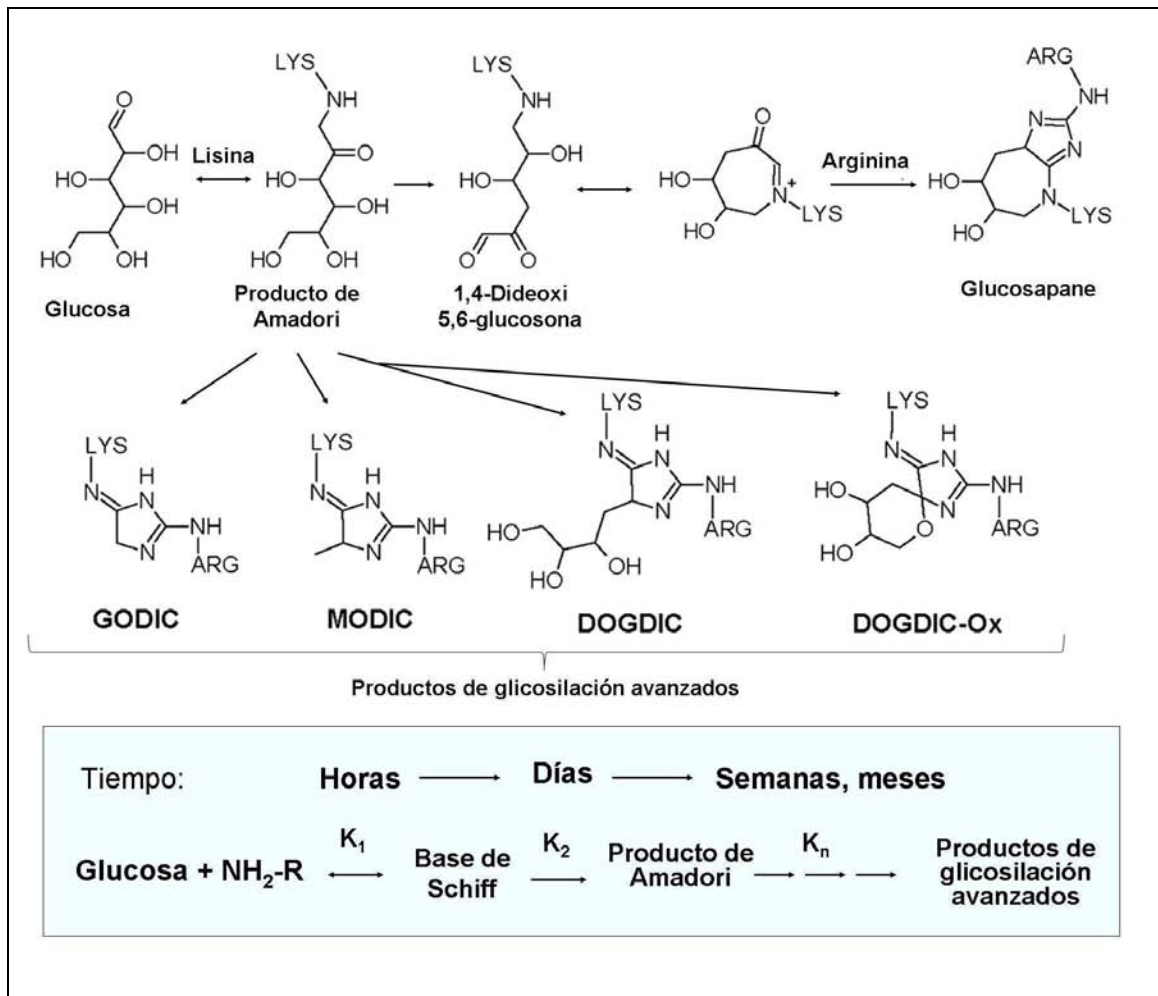
reordenamiento intramolecular, formando compuestos más estables, productos cetamina conocidos como compuestos de Amadori (Fig. 11).



**Fig. 11. Esquema para la glicación de la fosfatidiletanolamina.**

Posteriormente los compuestos de Amadori pueden sufrir reacciones de descomposición, fragmentación, condensación, etc, para producir los denominados productos finales de la glicación avanzada (AGEs o “advanced glycation end products”). Dado que los productos de Amadori poseen un grupo carbonilo, éste puede seguir reaccionando con otros grupos amino. El mecanismo de estas reacciones no se conoce con detalle aunque se sabe que es un proceso que involucra complejos reordenamientos intramoleculares, y en algunos casos la asociación entre varios de estos compuestos. Durante esta etapa se forman también compuestos altamente reactivos 1,2-dicarbonilo tales como el glioxal, la glucosona y otros (Fig. 12), que poseen dos grupos carbonilo y que actúan como propagadores de la reacción. La alta electrofilicidad de estos compuestos 1,2-dicarbonilo da lugar a reacciones rápidas con los grupos amino presentes en biomoléculas como las proteínas, y con las subsiguientes modificaciones glioxidativas que llevan a la formación de productos como las proteínas entrecruzadas (Reddy et al. 2002). A diferencia de la formación de bases de Schiff y de compuestos de Amadori, que son reversibles, la formación de AGEs es un proceso irreversible.





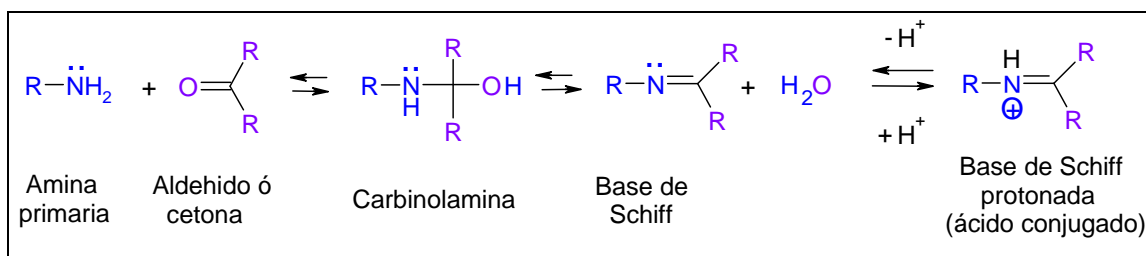
**Fig. 12. Esquema de la formación de productos de glicosilación avanzados.**

GODIC: dímero de glioxal-lisina, MODIC: dímero de metilglioxal-lisina, DOGDIC: dímero de 3-deoxiglucosona-lisina, DOGDIC-Ox: forma oxidada del DOGDIC (Fuente: Sell et al. 2005)

### 2.2.1 Formación de bases de Schiff

Las bases de Schiff son compuestos que poseen un grupo funcional aldimina que tiene la fórmula general  $R_1R_2C=N-R_3$ , donde  $R_3$  es un grupo arilo o alquilo, lo que hace que la base de Schiff sea una imina relativamente estable. Su denominación se debe a Hugo Joseph Schiff, químico alemán descubridor en 1964 del grupo funcional al estudiar la reacción de la anilina con diversos aldehídos como el acetaldehído, valeraldehído, cinnamaldehído y el benzaldehído (Tidwell 2008). En general las bases de Schiff se forman por la condensación de un grupo amino primario con el grupo carbonilo de un aldehído o cetona. Esta reacción consta de dos etapas, en la primera se da la formación del derivado carbinolamina, seguido de una etapa de deshidratación con la formación de la base de Schiff (Fig. 13). Dado que el nitrógeno del producto resultante de la reacción de condensación tiene carácter básico (posee un par de electrones solitarios), puede

captar un protón para formar el ácido conjugado de la base de Schiff, o la base de Schiff protonada.



**Fig. 13. Esquema general de la reacción de formación de bases de Schiff.**

En el contexto biológico, la formación de las bases de Schiff y su funcionalidad son importantes en el mecanismo de una serie de enzimas que utilizan el fosfato de piridoxal como cofactor, tales como las aldolasas y las aminotransferasas. En estos casos, la amina primaria suele ser el grupo ε-amino de un residuo de lisina. Otro ejemplo, es el caso de las bacteriorodopsinas, que son proteínas que atraviesan las membranas de las halobacterias, y en las que una molécula de retinal se encuentra unida covalentemente a un residuo de lisina mediante una base de Schiff protonada. La protonación reversible de esta base de Schiff en la bacteriorodopsina, es fundamental en su mecanismo de captura de la energía luminosa y la generación de un gradiente protónico que posteriormente se convierte en energía química (Bondar et al. 2011).

Los mecanismos de formación de las bases de Schiff a partir de diversos compuestos han sido objeto de numerosos estudios debido a su relevancia química, biológica y tecnológica. Se han estudiado sus procesos de formación e hidrólisis en función del pH y temperatura (Adrover et al. 2009, Vázquez et al. 1991a, Vázquez et al. 1991b, Vázquez et al. 1990a, Vázquez et al. 1990b, Vázquez et al. 1990c). Se han propuesto esquemas cinéticos de la reacción de formación de bases de Schiff y de compuestos de Amadori a altas temperaturas (100 °C) (Martins & Van Boekel 2005, Knol et al. 2005), se han calculado los parámetros termodinámicos de algunas reacciones entre azúcares y aminoácidos (Shipar 2004). Antecedentes importantes son los estudios teóricos del mecanismo de reacción de la formación de bases de Schiff a partir de análogos de la vitamina B6 (Ortega-Castro et al. 2010a, Salvà et al. 2003), así como de la posterior reacción de transaminación (Salvà et al. 2002). Se ha demostrado experimentalmente que varias moléculas con grupos aldehído y cetona pueden formar bases de Schiff con la fosfatidiletanolamina (Bach et al. 2009, Wachtel et al. 2006, Fishkin et al. 2005, Oak et al. 2002, Kenney 1984).

La importancia del solvente en estas reacciones, se evidenció al estudiarse mediante cálculos teóricos la formación de bases de Schiff a partir de la metilamina y el formaldehído, encontrándose que la inclusión de 2 moléculas de agua en el modelo permitía reducir las barreras de energía de la reacción, al actuar como agentes donadores y aceptores de protones al mismo tiempo, en una catálisis ácida de tipo Brønsted (Hall & Smith. 1998).

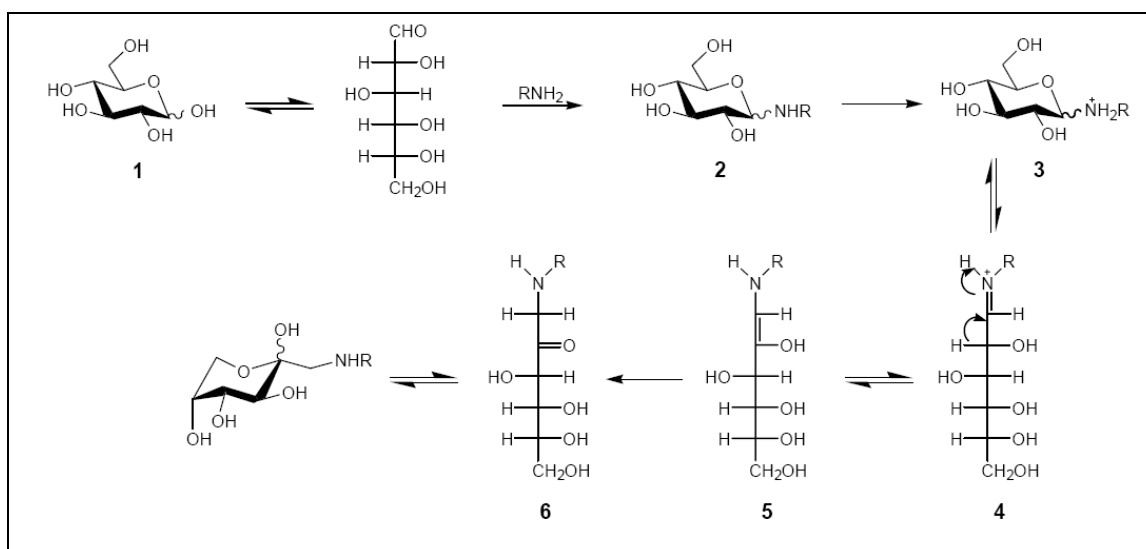
El pH del medio también es determinante en la deshidratación de la carbinolamina, paso limitante del proceso (García del Vado et al. 1994). El aumento en la acidez del medio debería dar lugar a un aumento en la tasa de deshidratación de dicho compuesto y por lo tanto en la velocidad de reacción. No obstante, ya que a valores de pH muy bajos casi todos los grupos amino de las moléculas reactivas están en su forma protonada, no reactiva, la reacción no se ve favorecida a estos valores de pH. En el otro extremo, a valores de pH muy altos, las transferencias protónicas que dan lugar primero a la protonación del grupo carbonilo y luego a la deshidratación serán menos probables (Borisova et al. 2007).

La influencia del entorno en que se realiza esta reacción, ha sido ejemplificada en un estudio sobre de formación de bases de Schiff teniendo como reactivos al péptido poli-L-lisina y al piridoxal (García del Vado et al. 1997, García del Vado et al. 1991). En este caso, las cargas de los grupos funcionales localizadas en las cadenas laterales de la cadena peptídica, su conformación y la formación de enlaces de hidrógeno con el disolvente favorecen la catálisis ácida intramolecular en la deshidratación del intermedio carbinolamina, que como se ha comentado anteriormente es el paso limitante de esta reacción.

## **2.2.2 Formación de compuestos de Amadori**

Las bases de Schiff generadas de azúcares como la glucosa pueden sufrir posteriormente una reacción de reordenamiento intramolecular para formar un compuesto más estable, un producto amino-cetosa, el compuesto de Amadori. El hecho de que ambas reacciones sean reversibles y consecutivas determina que de acuerdo al tiempo de evolución del sistema considerado, habrá predominio de la base de Schiff (horas) o del producto de Amadori (días) (Ge & Lee 1997). La velocidad de la reacción varía también según sean los reactivos que dieron lugar a la base de Schiff. Estudios experimentales han demostrado que cuando el reordenamiento molecular se da a partir de la base de Schiff de fosfatidiletanolamina y glucosa, su compuesto de Amadori respectivo se produce

después de 12 horas de incubación. En el caso de las bases de Schiff generadas de la reacción de proteínas y glucosa, éstas se reordenan también a su producto de Amadori correspondiente, pero luego de una incubación de varias semanas (Levi et al. 2008). Por ello se ha afirmado que la cinética de la glicación lipídica es más rápida que la de la glicación de proteínas, atribuyéndosele al entorno fosfolipídico una influencia en ello. Un primer mecanismo de reacción para el reordenamiento de Amadori fue sugerido por Kuhn y Weygand en 1937 (Fig. 14). Después de la formación de la base de Schiff, se debe dar su protonación (estructura 4 en Fig. 14), la base de Schiff protonada mantiene un equilibrio tautomérico con su forma enólica (estructura 5 en Fig. 14) Este enol se estabiliza por la formación de una 1-amino-1-deoxi cetohehexosa, más conocida como producto de Amadori (estructura 6 en Fig. 14).



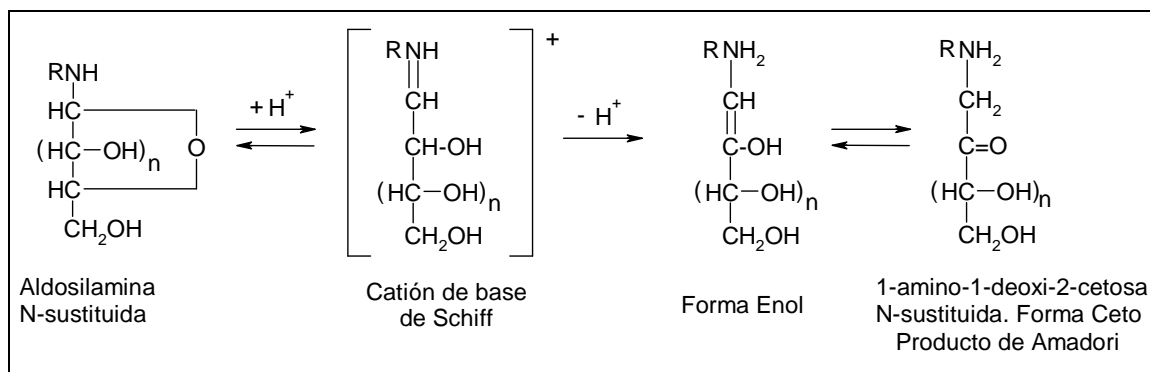
**Fig. 14. Reordenamiento de Amadori sugerido por Kuhn & Weygand**

(Fuente: Kuhn & Weygand 1937).

No obstante, no fue hasta 1952 (Hodge & Rist 1952, Gottschalk 1952) que se tuvo una evidencia experimental del reordenamiento de Amadori, como parte del proceso de glicación no enzimática, estableciéndose el mecanismo de un modo general (Fig. 15).

En un principio se considero que el reordenamiento de Amadori solo se producía con los derivados de aminas aromáticas primarias (Mitts & Hixon 1944), pero más tarde se demostró que la transposición también se podía producir con derivados N-glicosilo de aminas primarias y secundarias arilalquílicas y de alquilaminas (Hodge & Rist 1953, Hodge & Rist 1952). Trabajos posteriores demostraron que había una influencia de la posición de los sustituyentes en las aminas aromáticas (Micheel & Schleppinghoff

1956), así como de la basicidad de la amina sobre el reordenamiento (Rosen et al. 1957), considerándose que la transposición de Amadori tenía que ser en general un ejemplo de catálisis ácido-base (Wrodnigg & Eder 2001, Weygand, 1940). Palm y Simon (1963) basados en resultados experimentales, sugirieron que en este mecanismo de reacción el paso determinante de la velocidad era la sustracción del protón del segundo carbono y que la reacción podía ser favorecida por una catálisis ácida.



**Fig. 15. Mecanismo para el reordenamiento de Amadori de Hodge.**

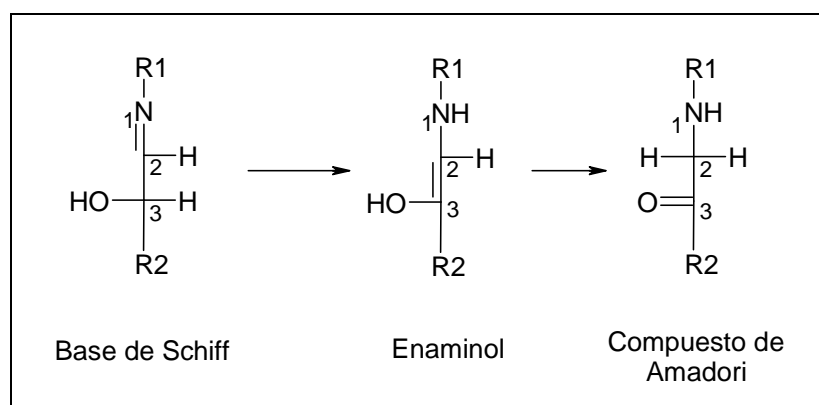
(Fuente: Hodge & Rist 1953).

A pesar de los trabajos iniciales al respecto, el estudio experimental de la reacción de reordenamiento intramolecular de Amadori ha sido limitado, debido a su complejidad. Varios pasos de esta reacción son reversibles y una gama de productos secundarios pueden ser formados. Además, es difícil aislar el producto de transposición de la mezcla de compuesto obtenido y materiales de partida sin reaccionar (Wrodnigg et al. 2008). Hay que agregar que el producto de transposición se puede producir como una mezcla de las formas furanoide y piranoide, anómeros  $\alpha$  y  $\beta$ . Además el mismo producto de Amadori puede entrar en una serie de reacciones en cascada que pueden conducir a la obtención de productos de degradación (Davidek & Blank 2005).

A pesar de su importancia, existen pocos estudios teóricos de la formación del compuesto de Amadori. Un estudio teórico de la reacción de Maillard entre el gliceraldehído y la glicina (Shipar 2004) de acuerdo al esquema de Hodge (Fig. 15), encontró que la forma deprotonada de la glicina como reactivo, era la más propicia para la reacción, ya que permitía la formación de las formas cetona y enol del producto de Amadori en su reordenamiento intramolecular. La reacción con las formas protonada y zwitterionica de la glicina no fueron favorables para la formación del producto de Amadori. Este estudio tuvo un nivel de cálculo DFT, RB3LYP/6-31G(d) con

solvatación implícita PCM, y se limito solo a plantear la espontaneidad de la reacción en sus diferentes pasos.

Otro estudio teórico comparativo, con un nivel de calculo DFT B3LYP/6-31+G(d) para la reacción de glicina y c-ribosa, considerando el entorno con fase gas y con solvatación implícita CPCM (Bao et al. 2011), señala que el reordenamiento de Amadori partiendo de la base de Schiff se puede dar en dos pasos de isomerización. En un primer paso se da la transferencia intramolecular hacia el nitrógeno iminico, del protón de un carbono secundario unido a un grupo hidroxilo (C3), con la formación concertada de un doble enlace entre este carbono y el carbono del grupo funcional aldimina (C2) (Fig. 16). El segundo paso es una tautomerización ceto-enólica, con la transferencia de un protón del grupo hidroxilo unido al C3 hacia el C2, y el corrimiento de un enlace pi simultáneamente, formándose el grupo ceto (Fig. 16).

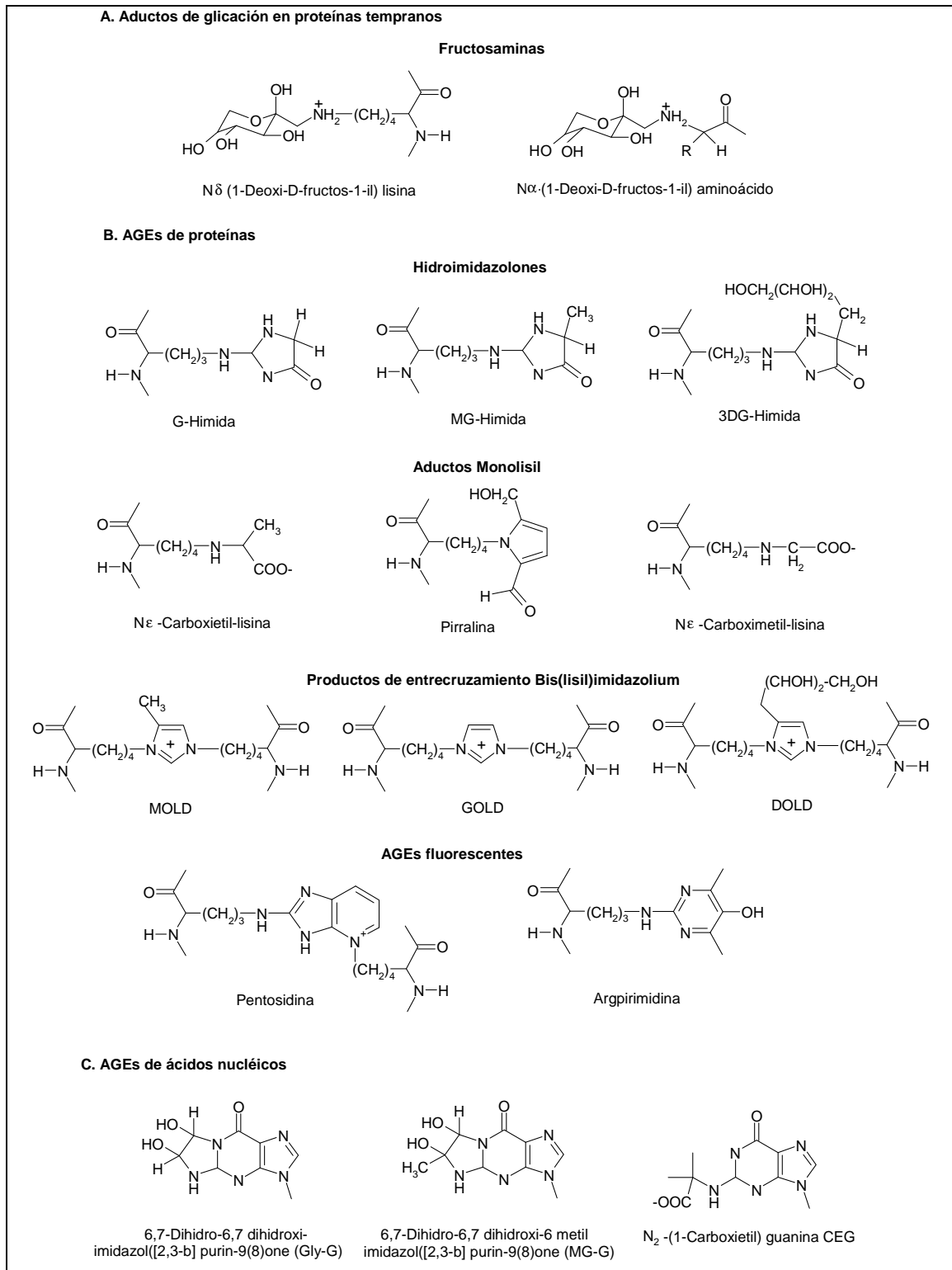


**Fig. 16. Reacción de reordenamiento de Amadori.**

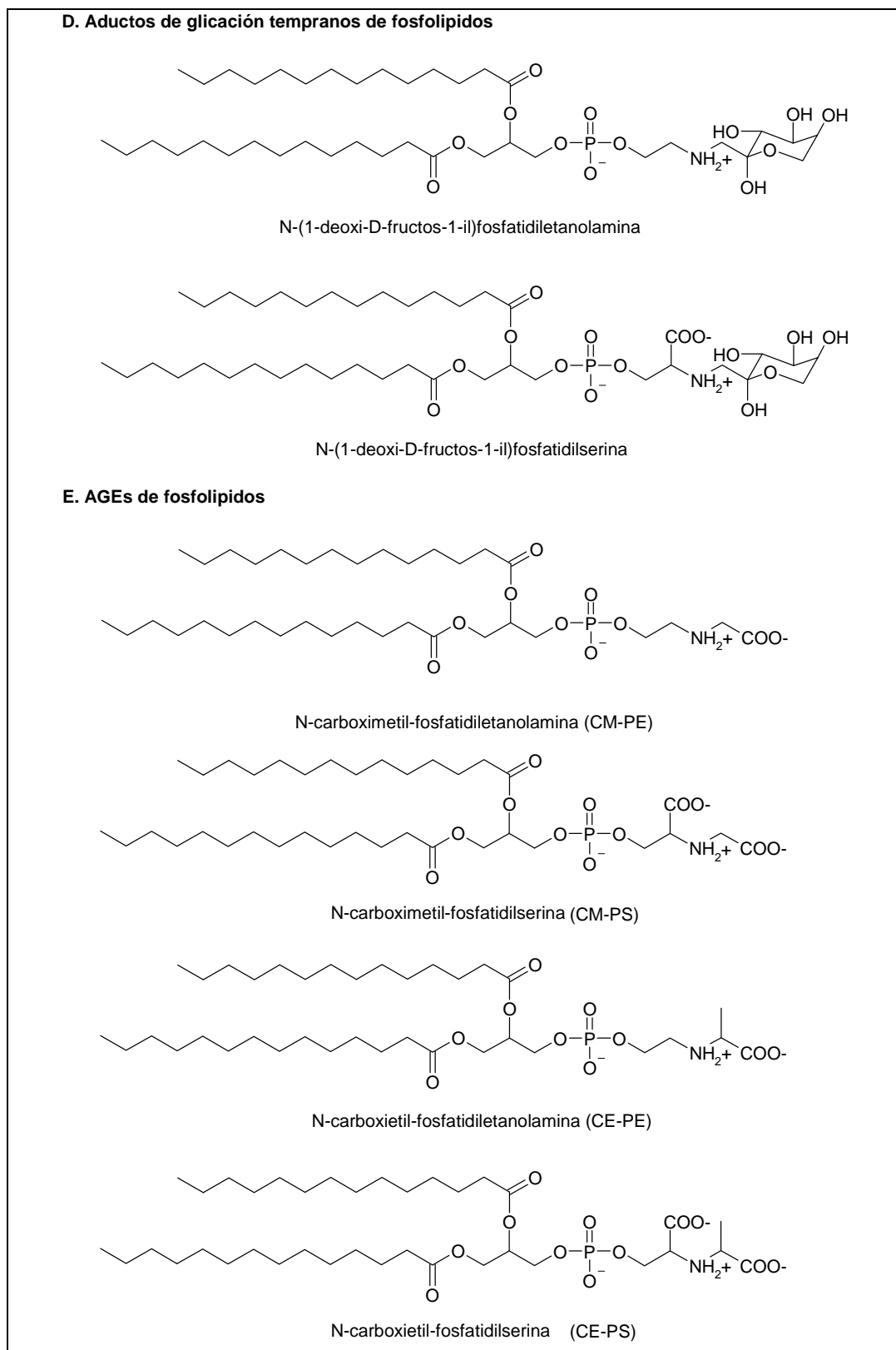
De acuerdo con los resultados de este grupo de investigación, el primer y segundo pasos presentaron unas barrera de 58.3 y 36.0 kcal mol<sup>-1</sup> en fase gas respectivamente, y de 81.7 y 65.2 kcal mol<sup>-1</sup> usando un modelo de solvatación implícita CPCM. Los autores señalan que tales barreras son muy altas, pero que podrían reducirse en caso de incluir en los modelos moléculas de agua con actividad catalítica. De hecho la tautomerización ceto-enólica puede ser catalizada tanto por ácidos como por bases. En la catálisis por bases, la base extrae un hidrógeno alfa de la forma cetónica formando un anión enolato, la deslocalización de la carga y posterior protonación del anión lleva a la forma enólica. En la catálisis por ácidos, se protona el oxígeno del grupo carbonilo, y la desprotonación de un carbono alfa da la forma enólica.

### 2.2.3 Formación de productos finales de la glicación avanzada (AGEs)

Los productos finales de la glicación avanzada (AGEs) son el resultado de las múltiples reacciones oxidativas y no oxidativas, denominados colectivamente la reacción de Maillard (Fig. 12), que se presentan en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Fig. 17).



**Fig. 17. Productos finales de la glicación avanzada.**



**Fig. 17. Productos finales de la glicación avanzada (continuación).**

Su formación puede tener importantes consecuencias en la función de las biomoléculas, debido a que la glicosilación afecta su estructura y función, habiéndose estimado los



daños entre 0.1-1% para los residuos de lisina y arginina en las proteínas, 1 en 107 nucleótidos en el ADN y 0,1% en los fosfolípidos básicos (Thornalley 2003).

La formación de AGEs es un proceso relativamente lento bajo condiciones fisiológicas, por lo que la acumulación de AGEs es prominente en biomoléculas de larga vida como las proteínas del cristalino en el tejido óptico y el colágeno. Pero en condiciones patológicas como la diabetes, se produce una mayor formación de AGEs *in vivo*. Algunos estudios señalan que la ingesta en la dieta de AGEs o los productos finales de lipoxidación avanzada, así como el hábito de fumar, pueden ser también una fuente de AGEs importante. Los complejos formados por los AGEs con los iones metálicos (tales como  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Fe}^{2+}$ ) pueden dar lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Por ello la reacción de Maillard, se encuentra involucrada en la patogénesis no solo de la diabetes mellitus, sino también de enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer (Ahmed et al. 2005, Ahmed 2005, Thomas et al. 2005, Cameron et al. 2005, Reddy et al. 2002). Se ha sugerido además, que la generación de AGEs puede ser fundamental para el fenómeno del envejecimiento, debido a que la exposición crónica de las biomoléculas que constituyen la matriz celular y extracelular de los organismos vivos a azúcares reductores, puede iniciar la reacción de Maillard *in vivo* (Monnier 1989).

Dos de los mecanismos principales a través de los cuales se ha propuesto que los AGEs de proteínas ejercen su efecto patogénico son el entrecruzamiento de ciertas proteínas estructurales de baja tasa de recambio, y la acción mediada por receptores tales como el R1-R3, los receptores de la galectina 3 y, especialmente los RAGEs (Receptor for the Advanced Glycated End-Product) (Tebar & Escobar 2009). Los RAGEs pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, pero, a diferencia de estas, sólo parece tener ligandos endógenos. Una importante consecuencia de la interacción AGE/RAGE es la activación de múltiples vías de señalización intracelulares conducentes a la activación del NF- $\kappa$ B. A su vez, estimulan la generación de ROS y la migración y activación de los macrófagos (Semba et al. 2010).

Los fosfolípidos que poseen un grupo amino libre, tales como la fosfatidiletanolamina o la fosfatidilserina, son susceptibles a la glicosilación (Fig. 17D). Los productos de la glicosilación de fosfolípidos en la membrana celular modifican las interacciones de la membrana con otros componentes celulares ya que aumentan la fluidez de membrana (Requena et al. 1997, Ravandi et al. 1996, Pamplona et al. 1995). Uno de los productos de la glicosilación de fosfolípidos es el producto de amadori de la fosfatidiletanolamina

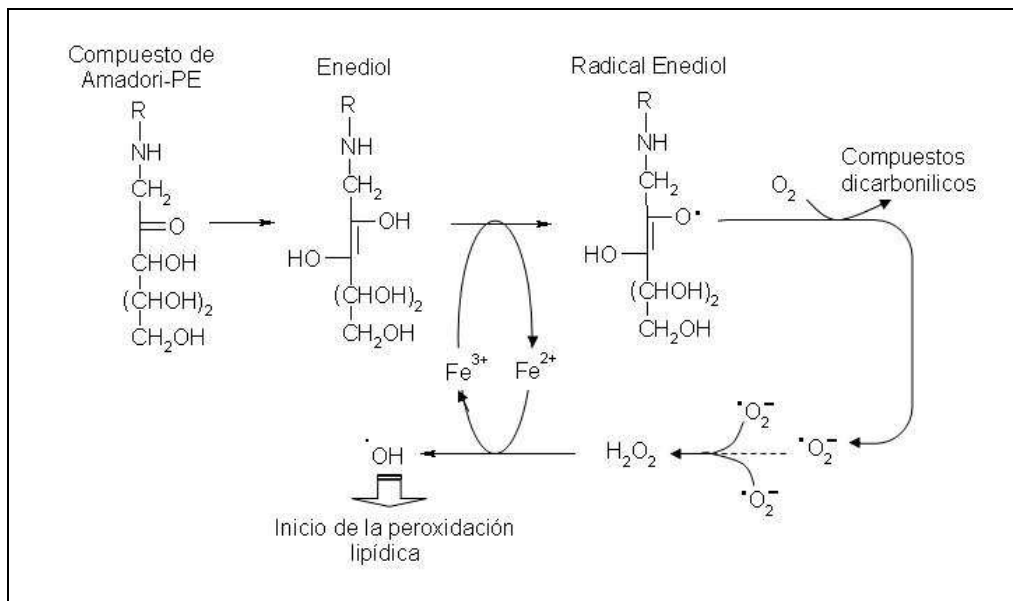
(Amadori-PE), este a su vez puede pasar por una serie de reacciones complejas para producir los productos finales de glicación avanzada (AGEs), tales como la carboximetil-fosfatidiletanolamina y la pirrol-carbaldehído-fosfatidiletanolamina (Utzmann & Lederer 2000, Requena et al. 1997).

La glicosilación de lípidos puede promover también la peroxidación lipídica, lo que resulta en el daño oxidativo de los mismos (Breitling-Utzmann et al. 2001, Oak et al. 2000, Bucala et al. 1993). El deterioro de la estructura de las membranas puede conducir a un trastorno en el mantenimiento de la integridad celular y su supervivencia, contribuyendo a la patogénesis. Se ha demostrado experimentalmente que el producto de Amadori-PE promueve la peroxidación de lípidos, pudiendo causar daño oxidativo a los componentes lipídicos de las membranas biológicas al menos parcialmente (Breitling-Utzmann et al. 2001). La generación del producto de Amadori-PE, favorece la formación de especies reactivas de oxígeno, y a través de estos induce la peroxidación de lípidos, algo que ya se ha demostrado en el caso de compuestos de Amadori de proteínas (Bierhaus et al. 1998).

Se han obtenido resultados experimentales que indican que el producto de Amadori-PE puede contribuir también a desencadenar la modificación oxidativa de lípidos a través de la generación de superóxido, relacionando de modo directo a la glicosilación de lípidos de la membrana con la peroxidación de los mismos, y en consecuencia con la patogénesis de la diabetes y el envejecimiento (Oak et al. 2000). La incubación en un sistema micelar, del producto de Amadori-PE con ácido linoleico en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  trajo como resultado la notable formación de hidroperóxidos de lípidos y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) junto con el aumento de hidroperóxidos de lípidos. Las TBARs están formadas mayoritariamente por malondialdehído, y son marcadores experimentales de la peroxidación lipídica y por ende del estrés oxidativo. Esta peroxidación lipídica causada por el producto de Amadori-PE fue eficazmente inhibida por la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, el manitol y agentes quelantes de metales (Oak et al. 2000).

Basándose en todos estos hallazgos se ha inferido un posible mecanismo para la peroxidación lipídica inducida por el producto de Amadori-PE (Fig. 18). La auto-oxidación del producto de Amadori-PE genera superóxido en la presencia del ión  $\text{Fe}^{3+}$ . El superóxido a su vez sufre una reacción de dismutación formándose el peróxido de hidrógeno. Posteriormente la reacción de Fenton entre el peróxido de hidrógeno con el

ión  $\text{Fe}^{2+}$  da como producto, radicales hidroxilo, que inician la peroxidación de lípidos (Oak et al. 2000).

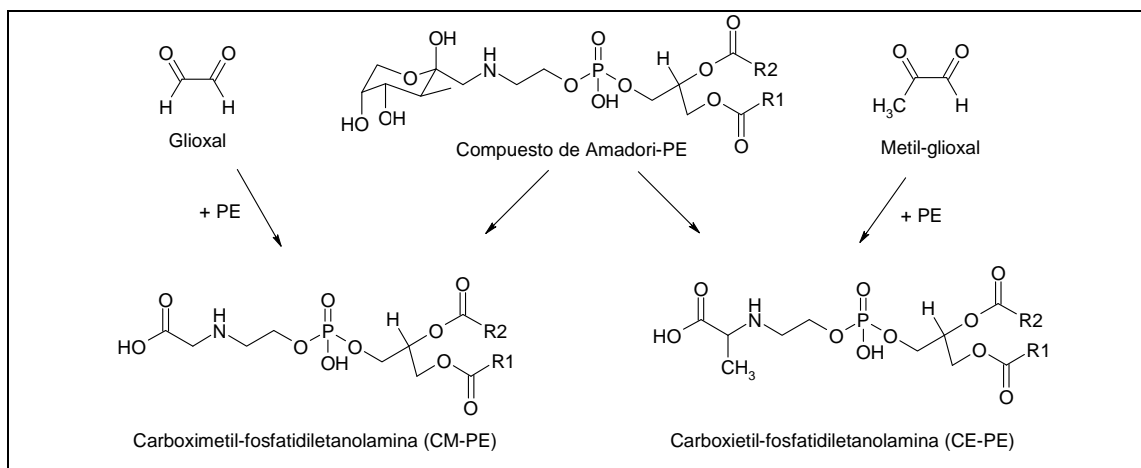


**Fig. 18. Mecanismo propuesto para la peroxidación lipídica mediada por el producto de Amadori-PE.** (Fuente: Oak et al. 2000).

En ausencia de  $\text{Fe}^{3+}$ , la incubación del producto de Amadori-PE con ácido linoleico no genera una cantidad significativa de TBARS, lo que sería una evidencia que el  $\text{Fe}^{3+}$  es necesario para la peroxidación lipídica inducida por el producto de Amadori-PE. En el plasma de pacientes diabéticos se ha encontrado un incremento de iones metálicos tales como hierro (Phelps et al. 1989) y cobre (Mateo et al. 1978), por lo que sería viable en tales situaciones la peroxidación lipídica inducida por el producto de Amadori-PE.

Producto de la autoxidación del producto de Amadori-PE se podría generar un compuesto dicarbonilo unido a la fosfatidiletanolamina, que posteriormente puede ser fragmentado en dos ácidos carboxílicos, uno de ellos la carboximetil-fosfatidiletanolamina (CM-PE) o la carboxietil-fosfatidiletanolamina (CE-PE). Estos AGEs de PE, también pueden formarse por la reacción de la PE con el glioxal o metilglioxal respectivamente (Fig. 19). Pese a que se infiere los AGEs de PE están relacionados con varios procesos patológicos (Utzmann & Lederer 2000, Lederer & Baumann 2000), solo se tiene un número limitado de trabajos experimentales acerca de ellos (Shoji et al. 2010, Breitling-Utzmann et al. 2001, Pamplona et al. 1998, Requena et al. 1997), no teniéndose trabajos de investigación sobre los mecanismos de sus reacciones de formación. Por ello, solo se puede hipotetizar que las reacciones se

producen del mismo modo que en las proteínas, donde pueden generarse a partir de los compuestos de Amadori o por la reacción del glioxal con los grupos aminos de las proteínas o fosfolípidos.

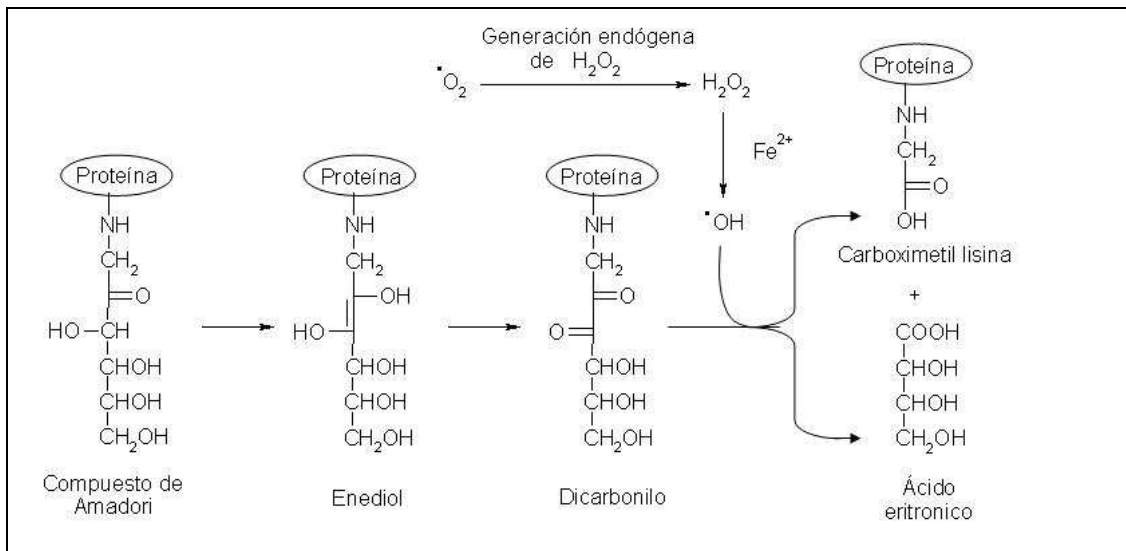


**Fig. 19. Posibles rutas para la formación de CM-PE y CE-PE.**

(Fuente: Shoji et al. 2010).

La N-carboximetil-lisina (CML) es uno de los productos de la glicosilación no enzimática de proteínas, siendo uno de los AGEs mejor caracterizados por presentar concentraciones más altas en comparación a las de otros AGEs (Fu et al. 1994, Ahmed et al. 1997). Además, la CML es uno de los principales epítopes reconocidos por los anticuerpos producidos contra proteínas modificadas por AGEs (Reddy et al. 1995). La CML se puede formar por tres mecanismos concurrentes en vivo:

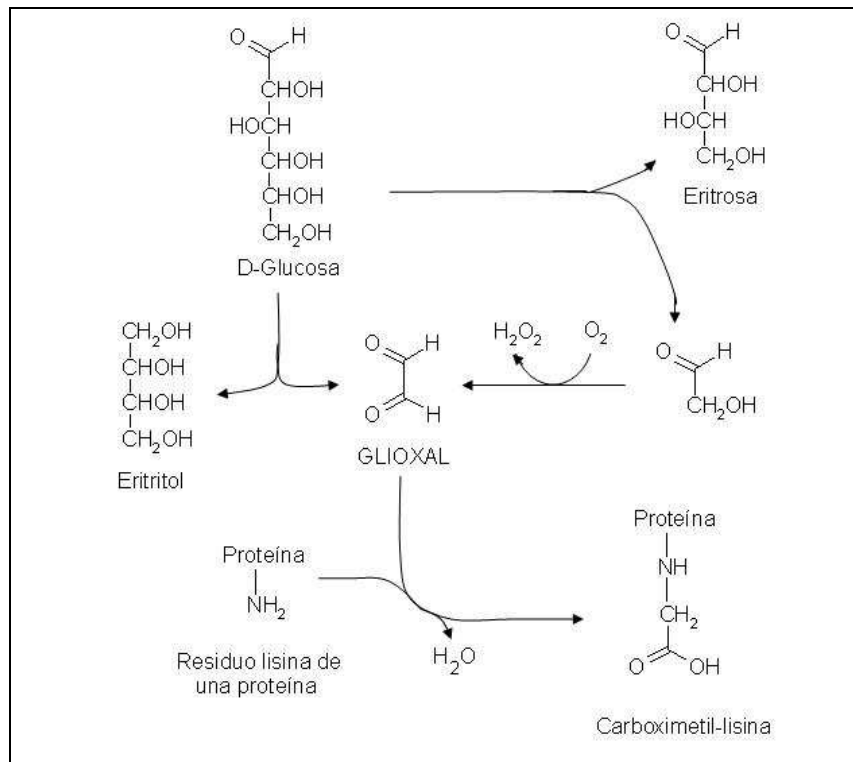
**a) La vía de glicosilación clásica** (Fig. 20). La base de Schiff, que resulta de la reacción entre la glucosa y el residuo aminoácido lisina, se reordena formando el producto de Amadori, que luego oxidativamente se fragmenta para dar entre otros productos la CML. La reacción procede a través de un intermediario enediol, del que se genera un compuesto dicarbonilo unido a la proteína. Este compuesto dicarbonilo es posteriormente escindido por radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), entre las posiciones C-2 y C-3 de su cadena de carbono. Los productos fragmentos de la escisión son la carboximetil-lisina (CML) y el ácido eritronico (Nagai et al. 1997, Ahmed et al. 1986).



**Fig. 20. Mecanismo propuesto para la formación de CML mediada por el radical •OH (Fuente: Nagai et al. 1997).**

Durante estas reacciones, la catalasa y manitol puede inhibir la formación de la CML, al eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el radical •OH respectivamente, la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha demostrado que acelera la formación de CML inducida por Fe<sup>2+</sup>, al aumentar la producción del radical •OH. La conversión química de un compuesto dicarbonilo en dos ácidos carboxílicos por incubación con 0.40 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se sabe que puede realizarse por un mecanismo de tipo Baeyer-Villiger (Reid & Fortenbaugh 1951). Sin embargo, la participación de este mecanismo en la formación de la CML a partir del compuesto de amadori es poco probable ya que experimentalmente se ha probado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en concentración 1 mM, por si solo no es suficiente para generar CML, siendo necesario la presencia del ión metálico Fe<sup>2+</sup>. Este ión participaría en la reacción de Fenton, donde se daría la formación del radical •OH a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El radical •OH sería el agente que actúa de modo directo en la escisión oxidativa de los compuestos de Amadori a CML (Nagai et al. 1997).

**b) La vía de Wolf o vía de 'glicosilación autoxidativa'** (Fig. 21). La CML se forma por la reacción entre la lisina y el glioxal, siendo el glioxal producto de la autoxidación de la glucosa catalizada por metales (Wolff & Dean 1987, Wells-Knecht et al. 1995).

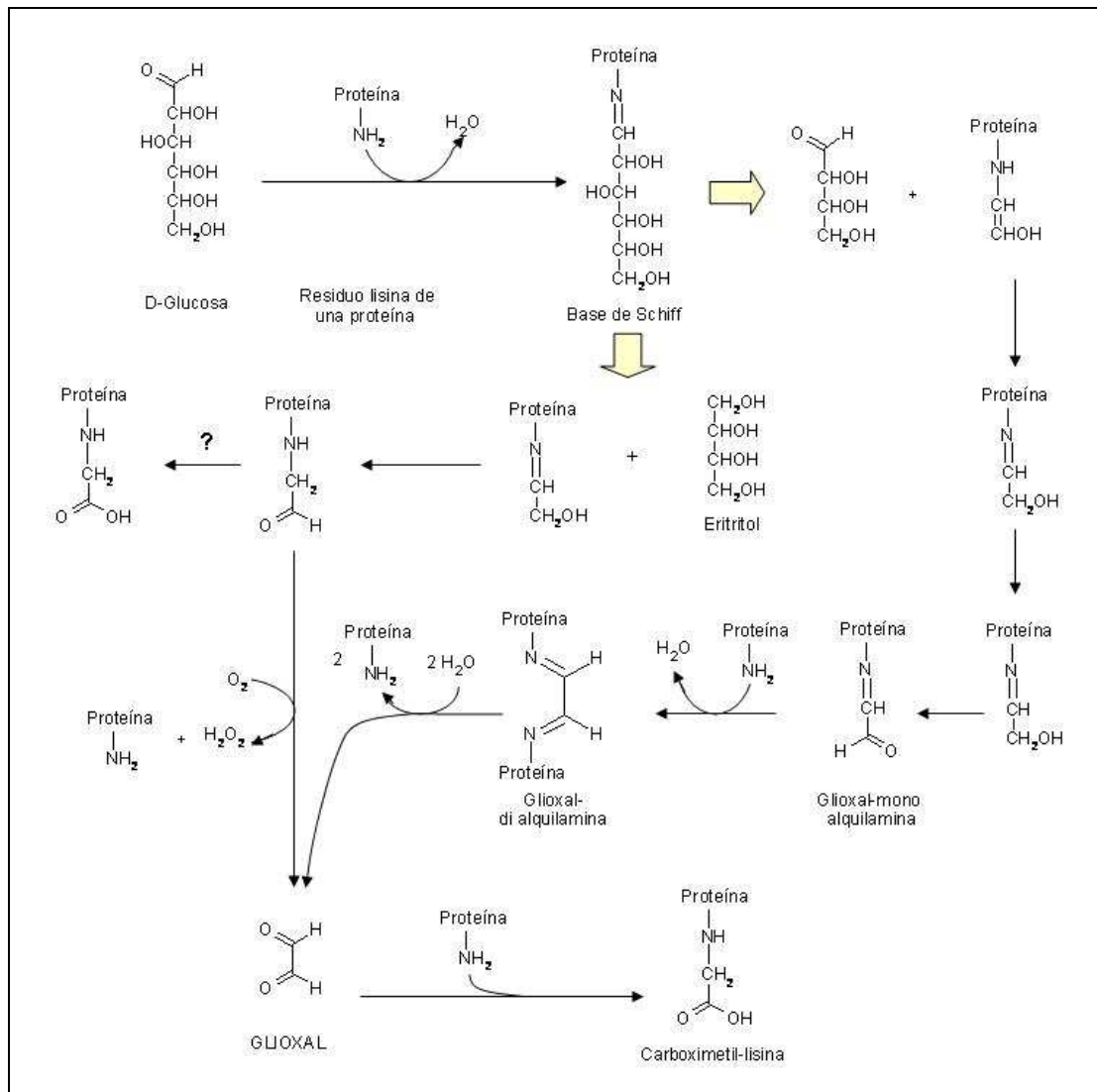


**Fig. 21. Vía de glicosilación autoxidativa de Wolf**

(Adaptado de: Wolff & Dean 1987)

**c) La vía de Namiki** (Fig. 22). La fragmentación y la oxidación de la base Schiff dan lugar a dos fragmentos de carbono, uno de los cuales es el glioxal, que posteriormente pueden generar derivados carboximetilados como la CML (Glomb & Monnier 1995).

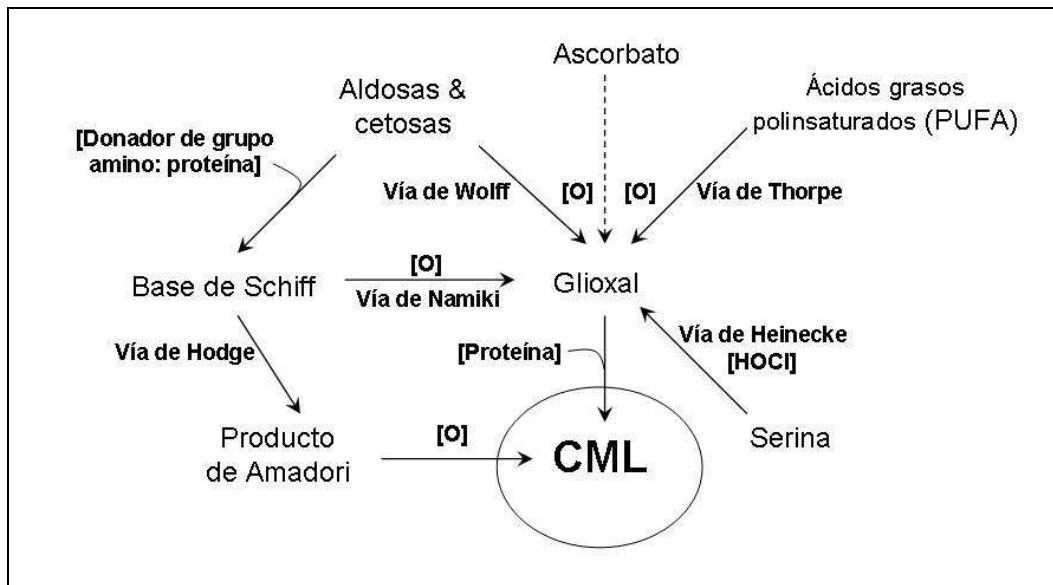
Los intentos para establecer la contribución relativa de cada una de estas vías para la generación de CML hasta ahora no han sido concluyentes o incluso hasta cierto punto han sido contradictorios (Ferreira et al. 2003, Degenhardt et al. 1998, Glomb & Monnier, 1995, Wells-Knecht et al. 1995). No obstante, la evaluación de la contribución relativa de cada una de estas vías es crucial para elucidar las defensas fisiológicas potenciales contra la reacción de Maillard, así como para guiar el desarrollo de fármacos que se dirigen a la reducción de la acumulación de AGEs *in vivo*. Como un primer paso en esta dirección, Khalifah y colaboradores clasificaron a los inhibidores de la reacción de Maillard en función al efecto de estos en cada una de las vías simultáneas de generación de CML (Khalifah et al. 1999).



**Fig. 22. Vía de Namiki.**

(Adaptado de: Eskin & Shahidi 2013, Namiki & Hayashi 1983, Glomb & Monnier 1995)

Otros carbohidratos diferentes a la glucosa, tales como el ascorbato, la fructuosa e intermediarios de la glicólisis, también pueden ser una fuente primaria *in vivo* de CML y otros AGEs (Fig. 23). La complejidad de la reacción de Maillard en los sistemas biológicos se demuestra por las múltiples fuentes identificadas al menos *in vitro* que pueden dar origen al CML. Aquí hay que mencionar no solo a los de la autoxidación de carbohidratos, sino también a los que involucran la degradación oxidativa de aminoácidos como la serina por la vía de Heinecke (Anderson et al. 1997) o de ácidos grasos poliinsaturados por la vía de Thorpe (Fu et al. 1996).



**Fig. 23. Vías para la formación de CML *in vitro***

(Fuente: Degenhardt et al. 1998 )

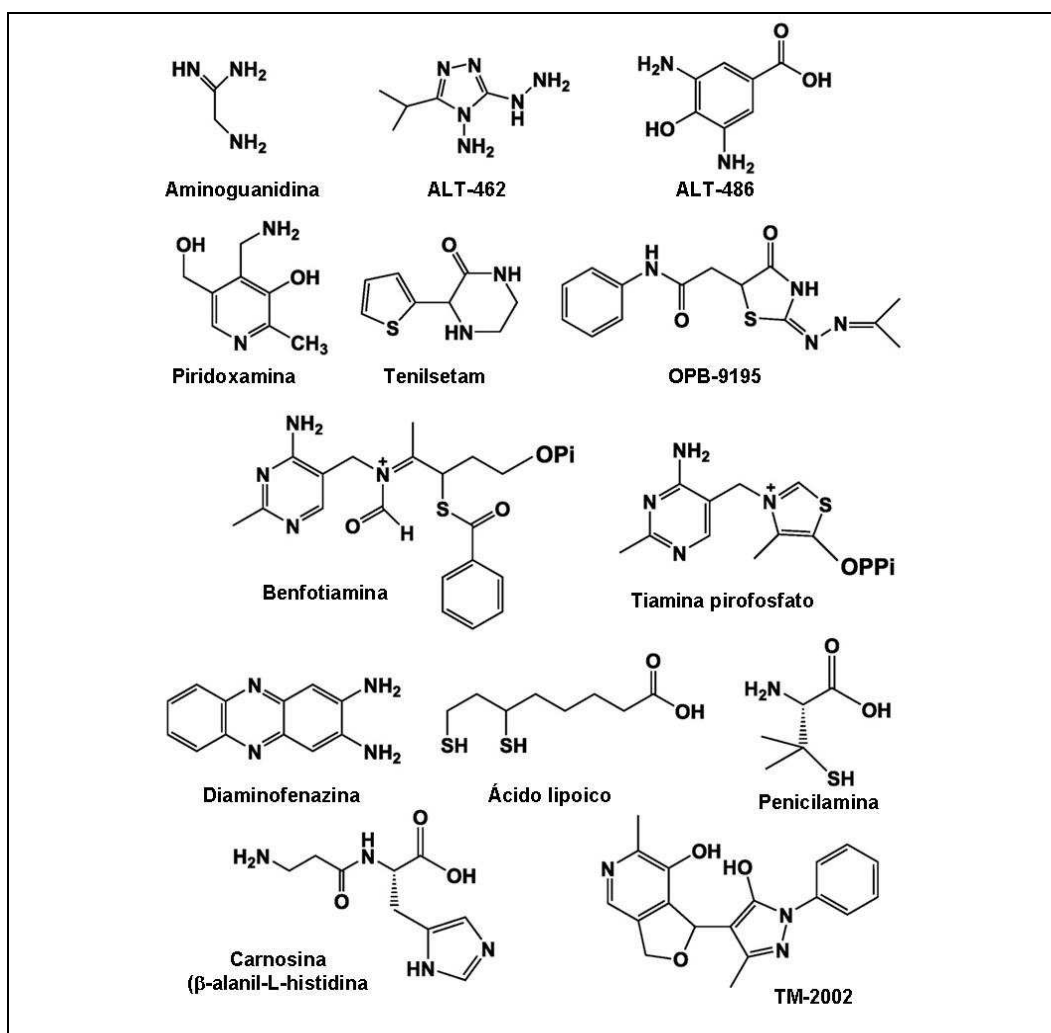
#### 2.2.4 Inhibición de los efectos adversos de los AGEs

De modo general los mecanismos de acción de los agentes que tienen como efecto reducir los efectos adversos de los AGEs (Fig. 24) se puede clasificar en:

- Secuestro de compuestos carbonílicos ó 1,2-dicarbonilos.
- Atenuación de las glicoxidaciones.
- Escisión de los entrecruzamientos de AGEs en las proteínas.

**a) Inhibición por captura de compuestos carbonílicos ó 1,2-dicarbonilos.** Estos compuestos pueden suprimir la formación de AGEs, secuestrando intermedios 1,2-dicarbonilos y carbonílicos, estos últimos importantes precursores de los AGEs. En este grupo se encuentran las Amadorinas, siendo la piridoxamina (piridonina) una de las moléculas de este grupo más estudiadas (Monnier 2003, Khalifah et al. 1999). Se ha evidenciado que la piridoxamina posee múltiples mecanismos para inhibir la formación de AGEs: 1) Bloqueando la oxidación del producto de Amadori; 2) por captura de los compuestos carbonilo y dicarbonilo derivado del compuesto de Amadori; 3) por quelación de iones de metales catalizadores de oxidación química, y 4) por eliminación de ROS (Voziyan & Hudson 2005).





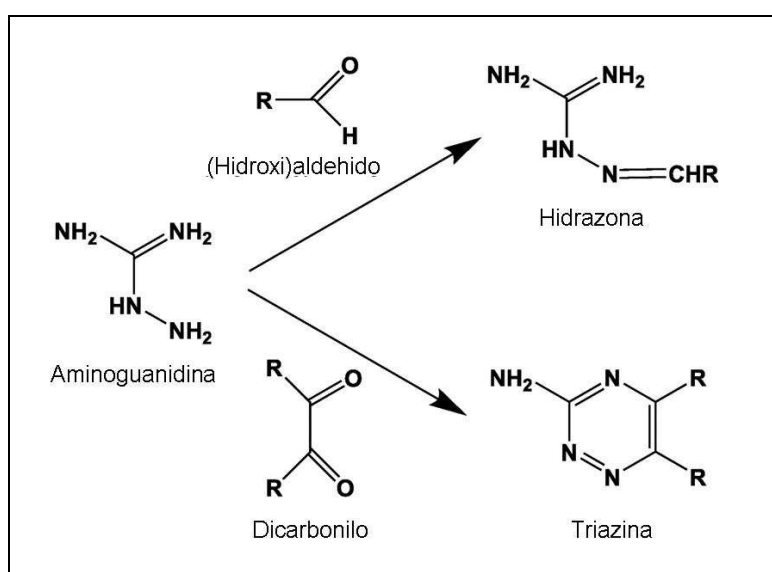
**Fig. 24. Estructuras de algunos inhibidores de la formación de AGEs.**

(Fuente: Nagai et al. 2013)

En este grupo también se encuentran la 2,3-diaminofenazina, OPB-9195, tenilsetam, penicilamina y varios derivados de la aminoguanidina (Schalkwijk & Miyata 2012, Peyroux & Sternberg 2006, Reddy & Beyaz 2006). Estos compuestos, con grupos funcionales nucleófilos reactivos, han evidenciado tanto *in vitro* como *in vivo* poseer capacidad de captura de compuestos carbonílicos y 1,2-dicarbonílicos, y como consecuencia inhibir la formación de AGEs. No obstante, todavía no se ha identificado *in vivo* los productos de su reacción con los compuestos intermediarios en las reacciones de glicación o glicoxidacion (Nagai et al. 2013).

Uno de los compuestos más destacados de este grupo es la aminoguanidina, que ha sido el inhibidor de la formación de AGEs más estudiado, habiéndose demostrado experimentalmente su eficacia de modo extenso (Carvalho et al. 2011, Schmaderer et al. 2011, Di Naso et al. 2010, El Shazly et al. 2009, Sugimoto et al. 2007, Chen et al. 2003,

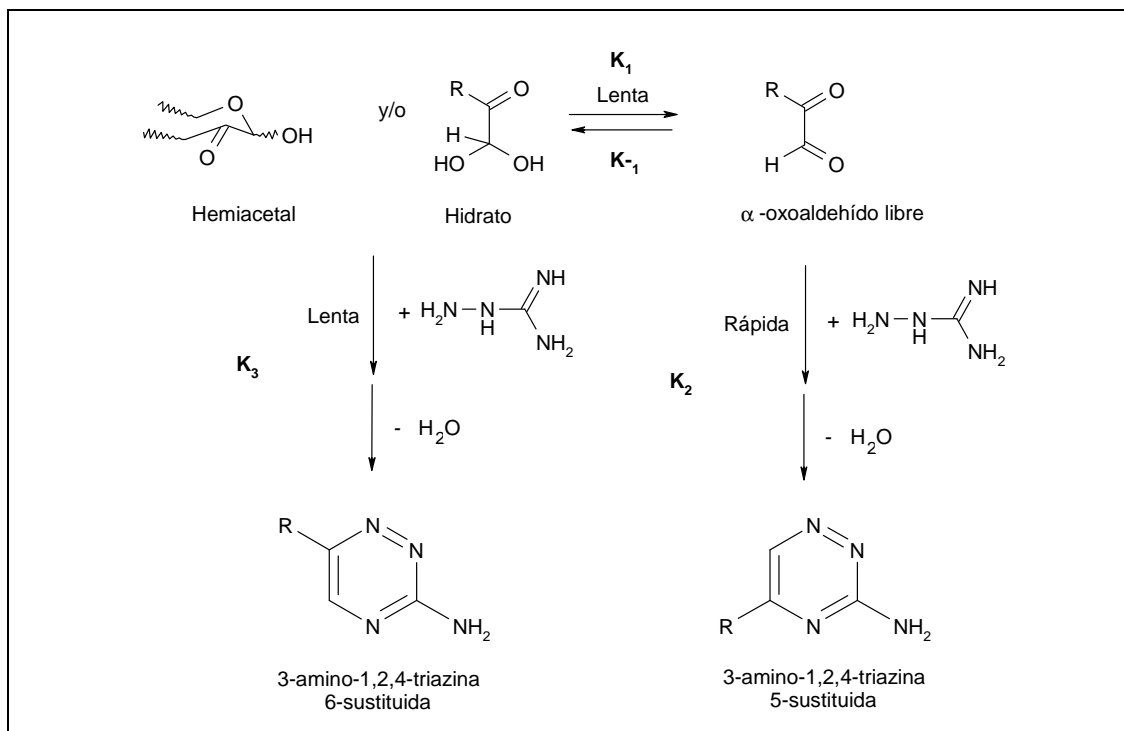
Thornalley 2003, Méndez 2003). La aminoguanidina es una hidrazina que fue presentada en 1986 como el primer inhibidor de la formación de AGEs (Brownlee et al. 1986) y que actúa secuestrando los grupos carbonilos reactivos formados durante la reacción de Maillard. La aminoguanidina posee un grupo amino y otro aminoacetal, que en conjunto presentan una mayor reactividad que los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos del aminoácido lisina de las proteínas, por lo que inhibe competitivamente la reacción de estos últimos con los grupos carbonilo y dicarbonilo. Como consecuencia de ello se podrían obtener solo productos de la glicación no reactivos, bloqueándose la cascada de reacciones que generan otros AGEs más reactivos (Picard et al. 1992, Brownlee et al. 1985). Se ha demostrado *in vitro* que la aminoguanidina inhibe la formación de AGEs en proteínas, como consecuencia de bloquear los grupos carbonilo reactivos de los productos de Amadori y sus derivados (glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglucosona y glucoaldehído) (Webster et al. 2005, Monnier 2003, Thornalley 2003). Cuando la aminoguanidina reacciona con compuestos con un grupo aldehído o cetona en su estructura forma hidrazonas, y cuando reacciona con compuestos dicarbonilo forma triazinas (Nagai et al. 2012). (Fig. 25).



**Fig. 25. Mecanismo de acción propuesto de la aminoguanidina como agente secuestrador de compuestos carbonilo y dicarbonilo.** (Fuente: Nagai et al. 2012)

Experimentalmente se ha demostrado también que la aminoguanidina inhibe la formación de AGEs con fosfolípidos (Gogasyavuz et al. 2002, Bucala et al. 1993, Picard et al. 1992).

A pesar que la aminoguanidina se ha considerado el inhibidor de la formación de AGEs prototipo, su mecanismo de acción propuesto se basa completamente en estudios químicos del modelo *in vitro* (Fig. 26).



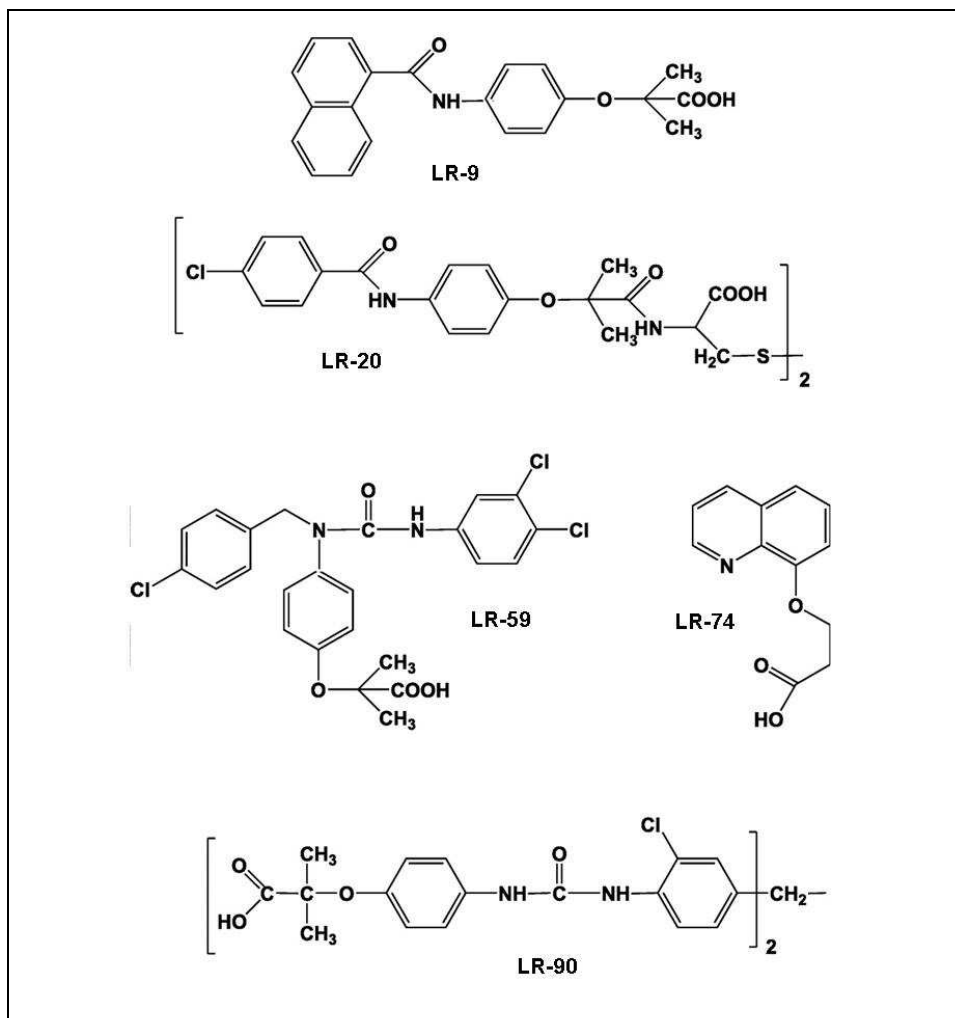
**Fig. 26. Modelos cinéticos para la reacción de la aminoguanidina con  $\alpha$ -oxoaldehídos** (Fuente: Thornalley 2003)

De este modo se ha estudiado la cinética de reacción de la aminoguanidina con el glicoxal y el metilglicoxal bajo condiciones fisiológicas, pH 7.4 y 37 °C (Thornalley et al. 2000). En ambos casos la reacción se presentó tanto con el compuesto dicarbonilo en su forma de  $\alpha$ -oxoaldehído con sus dos grupos carbonilos expuestos, o en la forma monohidratada menos reactiva con un solo grupo carbonilo disponible para la reacción. La cinética de la reacción con glicoxal fue de primer orden con respecto a los dos reactantes. En el caso del metilglicoxal la cinética de la reacción modelada fue más compleja, debido al equilibrio químico entre las formas hidratada y no hidratada del metilglicoxal (Thornalley 2003). Los resultados posteriores estudiando las reacciones de aminoguanidina con varios compuestos  $\alpha$ -dicarbonilo por espectrometría de masas, demuestran la formación de triazinas como productos de la reacción, así como la de otras formas policíclicas como productos de la posterior condensación de las triazinas (Saraiva et al. 2012).

**b) Inhibición por atenuación de las glicoxidaciones.** En este caso se suprime la formación de AGEs a través de la prevención de las glicoxidaciones. Los inhibidores que previenen las glicoxidaciones, actúan principalmente como quelantes, inhibiendo

las reacciones de oxidación catalizadas por metales que forman los AGEs (Nagai et al. 2013, Monnier 2003, Miyata & van Ypersele de Strihou 2003). Dentro de este grupo se puede incluir:

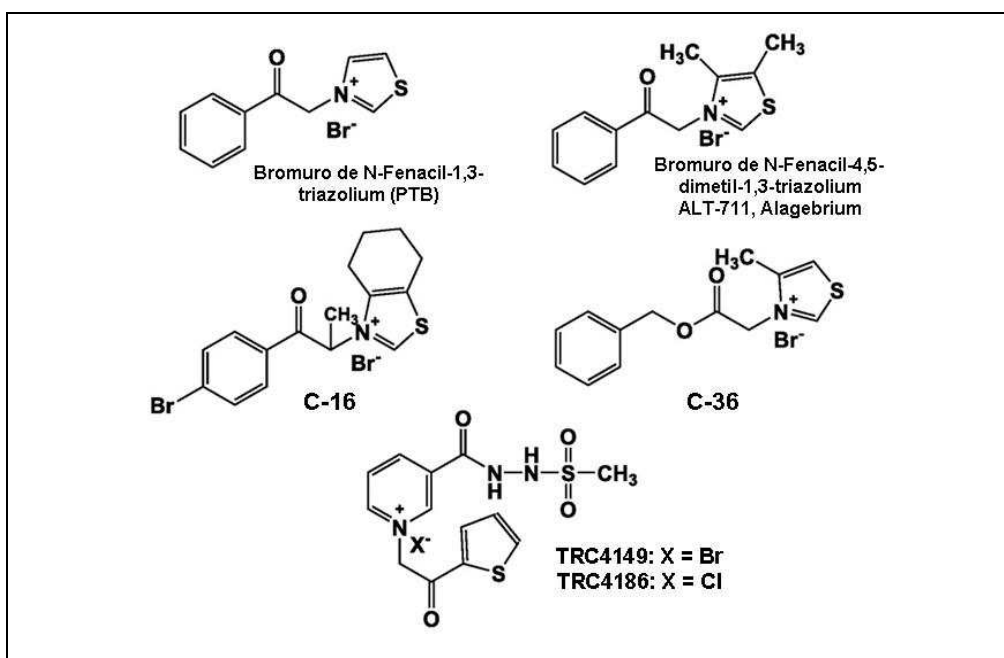
- La carnosina ( $\beta$ -alanil-L-histidina) y sus análogos, que son antioxidantes eficaces debido a su capacidad de quelar iones de metales de transición (Babizhayev et al. 2004, Hipkiss et al. 1994).
- Fármacos potenciales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, tales como desferrrioxamina y el clioquinol, que son eficaces agentes quelantes de metales y que se ha sugerido que podrían ser usados también como inhibidores de AGEs (Doraiswamy & Finefrock 2004). Estos fármacos también reducen el estrés oxidativo y adicionalmente ofrecen protección en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson (Youdim et al. 1999).
- Los compuestos Lalezari-Rahbar (LR), comprenden un grupo diverso de ácidos orgánicos aromáticos con grupos funcionales ureido y carboxamida (Fig. 27). Estos quelantes no sólo inhiben la glicosilación autooxidativa y glicoxidación sino que también inhiben la producción enzimática de ROS catalizada por metales, que acontece después de la unión de AGEs con moléculas receptoras, tales como RAGE, poseyendo aparentemente una amplia gama de efectos sobre el estrés oxidativo y la inflamación (Nagai et al. 2012). El comportamiento de estos compuestos sugiere que la quelación sola, independiente de la captura de carbonilo, podría ser un mecanismo suficiente para inhibir la formación de AGEs y proteger contra complicaciones de la diabetes (Rahbar & Figarola 2002, Rahbar & Figarola 2003, Rahbar et al. 2000, Rahbar et al. 1999).



**Fig. 27. Estructuras de los compuestos Lalezari-Rahbar (LR), inhibidores de la formación de AGEs.**

(Fuente: Rahbar et al. 2000, Rahbar et al. 1999, Nagai et al. 2012)

**c) Inhibición por escisión de los entrecruzamientos de AGEs en las proteínas.** Una vía paralela para atenuar las complicaciones relacionadas con la formación de AGEs, es la de revertir los entrecruzamientos de AGEs en las proteínas. El grupo de compuestos a los que se les atribuye este mecanismo de acción comprende el bromuro de N-fenaciltiazolio (PTB) (Vasan et al. 1996), su análogo dimetiltiazolio ALT-711 (Wolffenbuttel et al. 1998), y los análogos de piridinio TRC4186 y TRC4149 (Joshi et al. 2009, Chandra et al. 2009) (Fig. 28). Su mecanismo de acción está relacionado con su capacidad de liberar AGEs de albúmina de complejos albúmina-AGE-colágeno preformados, de liberar inmunoglobulinas de su unión a eritrocitos de ratas diabéticas, y de revertir o disminuir el entrecruzamiento del colágeno en las ratas diabéticas (Nagai et al. 2012).



**Fig. 28. Estructuras de los compuestos inhibidores de la formación de AGEs por escisión de los entrecruzamientos de proteínas**

(Fuente: Nagai et al. 2012)

### **3. FUNDAMENTOS METODOLÓGICOS**





### 3.1. METODOS AB INITIO

La mecánica cuántica permite la descripción matemática correcta del comportamiento de los electrones en átomos y moléculas. La ecuación de Schrödinger independiente del tiempo para un sistema unidimensional de una partícula se puede expresar como:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \left( \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V(x, y, z) \psi(x, y, z) = E \psi(x, y, z) \quad (3.1)$$

El primer término de la ecuación corresponde a la energía cinética  $T$  y el segundo término a la energía potencial  $V$ . El operador hamiltoniano ( $\hat{H}$ ) es la suma de los operadores correspondientes a esas energías:

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} = -\frac{\hbar^2}{2m} \left( \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V(x, y, z) \quad (3.2)$$

Con lo que la ecuación de Schrödinger puede escribirse como:

$$\hat{H}\psi_i = E_i\psi_i \quad (3.3)$$

Dado que la ecuación Schrödinger para un sistema polielectrónico no tiene solución exacta, es necesario el uso de métodos aproximados.

#### 3.1.1 Sistemas de varias partículas

Para un sistema más complejo como una molécula, que presenta varias partículas (núcleos y electrones), el operador hamiltoniano se puede descomponer en muchos términos de Energía que incluyan la repulsión y atracción de las diferentes partículas del sistema:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_k \frac{1}{m_k} \nabla_k^2 - \frac{\hbar^2}{2m} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_k \sum_{l>k} \frac{z_k z_l e^2}{r_{kl}} - \sum_k \sum_i \frac{z_k e^2}{r_{ik}} + \sum_i \sum_{i>j} \frac{e^2}{r_{ij}} \quad (3.4)$$

Energía cinética de núcleos	Energía cinética de electrones	Energía de repulsión de núcleos	Energía de atracción electrones -núcleos	Energía de repulsión de electrones
--------------------------------------	---	---	--	--

donde  $k$  y  $l$  se refieren a los núcleos,  $i$  y  $j$  a los electrones,  $r$  a las distancias entre partículas y  $Z$  a los números atómicos. Dado que se puede considerar que los electrones se mueven mucho más rápidamente que los núcleos, se puede realizar el desacoplamiento del movimiento electrónico y nuclear, conocido como la aproximación de Born-Oppenheimer.

Para el cálculo de la estructura molecular está muy extendido el uso de la teoría de los orbitales moleculares. Según esta teoría, los electrones no son parte de un enlace en particular sino que se distribuyen en toda la molécula. Las funciones de onda de un electrón que se obtienen resolviendo la ecuación de Schrödinger  $\hat{H}\psi_i = E_i\psi_i$  se denominan orbitales moleculares. Un orbital molecular  $\psi_i$  indica, a través del valor de  $|\psi_i|^2$ , la distribución del electrón en la molécula. Dado que la ecuación de Schrödinger no se puede resolver a sistemas poliatómicos usando esta aproximación en su forma original, se requiere otros procedimientos más simples. Uno de ellos es el método de orbitales moleculares como una combinación lineal de orbitales atómicos, ó método CLOA, que considera que el orbital molecular  $\phi_i$ , es el resultado de una combinación lineal, es decir, una suma de los orbitales atómicos implicados  $\chi_r$ . Una descripción matemática es:

$$\phi_i = c_1\chi_1 + c_2\chi_2 + \dots + c_n\chi_n \quad (3.5)$$

$$\phi_i = \sum_r c_{ri}\chi_r \quad (3.6)$$

donde  $\phi_i$  es un orbital molecular representado como la suma de n orbitales atómicos  $\chi_r$ , cada uno multiplicado por su correspondiente coeficiente  $c_{ri}$ . Los coeficientes son los pesos de las contribuciones de los n orbitales atómicos para el orbital molecular. Minimizando la energía total del sistema, se determina un apropiado conjunto de coeficientes de la combinación lineal.

No obstante, este método es insuficiente para describir correctamente muchos sistemas, ya que considera a los movimientos de los electrones como independientes unos de otros, desconociendo la correlación entre los movimientos de los electrones dentro de un sistema molecular, especialmente entre los electrones de spin opuesto. Esto conduce a una energía de repulsión electrón-electrón alta y como consecuencia también a una energía total alta. La energía de correlación se define como la diferencia entre la energía exacta y la energía de Hartree-Fock:

$$E_{\text{correlacion}} = E_{\text{exacta}} - E_{\text{HF}} \quad (3.7)$$

Para incluir la correlación electrónica, se han desarrollado otros métodos “post Hartree-Fock” que pertenecen a tres categorías: los de interacción de configuraciones, los perturbativos y los de *Coupled Cluster*. Con estos esquemas aproximados es posible

realizar un cálculo mecánico cuántico de una exactitud y precisión aceptable. Sin embargo hay que tener en cuenta que esta mayor fiabilidad de los cálculos requiere exponencialmente de cantidades crecientes de poder computacional, conforme se incrementa el número de átomos del sistema a estudiar. Un método alternativo que introduce los efectos de correlación electrónica a un costo computacional menor es la Teoría del Funcional de Densidad (DFT).

### 3.2 TEORÍA DEL FUNCIONAL DE DENSIDAD (DFT)

La DFT representa una forma alternativa a la de los métodos ab initio convencionales para resolver la ecuación de Schrödinger electrónica. De acuerdo con la DFT, la energía fundamental de un sistema polieletrónico puede expresarse a partir de la densidad electrónica  $\rho(\mathbf{r})$ . Esta función de densidad electrónica depende de las tres variables espaciales,  $x$ ,  $y$ ,  $z$ , mientras que las funciones de onda polieletrónicas requieren tres variables para cada uno de los  $N$  electrones del sistema molecular. Esta reducción en el número de variables de la función, tiene como consecuencia una disminución del tiempo de computación para un procedimiento basado en la teoría del Funcional de la Densidad en comparación a otros métodos, como los basados en la teoría post-Hartree-Fock (Parr & Yang 1989).

#### 3.2.1 Teoremas de Hohenberg-Kohn

La teoría del funcional de densidad se basa formalmente en los teoremas formulados por Hohenberg y Kohn (1964):

**a) Primer teorema.** "Cualquier observable de un estado estacionario fundamental no-degenerado puede ser calculado, en principio de forma exacta, a partir de la densidad electrónica de este estado fundamental".

Como consecuencia de ello

- Cualquier observable puede escribirse como funcional de la densidad electrónica del estado fundamental.
- Existe una relación uno a uno entre la densidad electrónica y el potencial externo. Esto quiere decir que la densidad electrónica en el estado fundamental contiene la información de un sistema electrónico.
- La energía del estado fundamental es un funcional de la densidad electrónica, y en consecuencia sus componentes (ecuación 3.8).

$$E_{total}[\rho(r)] = E_{xc}[\rho(r)] + T_{ni}[\rho(r)] + V_{ne}[\rho(r)] + V_{ee}[\rho(r)] \quad (3.8)$$

Donde la energía total  $E_{total}[\rho(r)]$  se presenta como funcional de la densidad electrónica,  $T_{ni}[\rho(r)]$  es una aproximación a la energía cinética real  $T[\rho(r)]$ ,  $V_{ne}[\rho(r)]$  es la energía de interacción núcleo- electrón,  $V_{ee}[\rho(r)]$  es la energía de interacción electrón-electrón ó repulsión coulombiana y  $E_{xc}$  es la energía de correlación e intercambio.

Como resultado de la aproximación de Born-Oppenheimer, el potencial de Coulomb de los núcleos se puede considerar como un potencial externo estático:

$$V_{ext}(r) = - \sum_k^{nucleo} \int \frac{Z}{|r - r_k|} dr \quad (3.9)$$

El hamiltoniano electrónico se puede escribir como:

$$\hat{F} = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 + \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{1}{|r_i - r_j|} \quad (3.10)$$

Por lo que el hamiltoniano total es:

$$\hat{H} = \hat{F} + \hat{V}_{ext} \quad (3.11)$$

El potencial externo  $V_{ext}$  ( $V_{ne}[\rho(r)]$  en la ecuación 3.8) determina de manera única la densidad electrónica del estado fundamental. Ello se demostró por primera vez mediante el *reductio ad absurdum* por Hohenberg y Kohn. La energía del sistema puede escribirse como:

$$E_V[\rho(r)] = F[\rho(r)] + \int V(r)\rho(r)dr \quad (3.12)$$

Donde F es el hamiltoniano electrónico de la ecuación 3.10.

**b) Segundo teorema.** “La densidad electrónica de un estado fundamental no-degenerado puede ser calculada en principio de forma exacta, determinando la densidad que minimice la energía del estado fundamental”

A partir de este teorema se deduce que dada una densidad electrónica de prueba  $\bar{\rho}(r)$ , que sea N representable, se ha de cumplir que:

$$E_0 \leq E_i[\bar{\rho}(r)] = E_{xc}[\bar{\rho}(r)] + T_{ni}[\bar{\rho}(r)] + V_{ne}[\bar{\rho}(r)] + V_{ee}[\bar{\rho}(r)] \quad (3.13)$$

Donde  $E_0$  es la energía del estado fundamental. La expresión 3.13 determina que dada una densidad de prueba se obtiene una energía mayor o igual que la energía exacta del estado fundamental. Por lo tanto, la densidad electrónica del estado fundamental no

degenerado se puede calcular encontrando aquella densidad que minimice la energía del estado fundamental.

### 3.2.2 Ecuación fundamental de la teoría del funcional de la densidad

La minimización del funcional de la energía con respecto a la densidad electrónica  $\delta E_v[\rho] = 0$ , debe ser realizada asegurando la conservación de la N representabilidad durante el proceso de optimización. Esto se hace introduciendo la restricción:

$$\int \rho(r) dr - N = 0 \quad (3.14)$$

mediante el método de los multiplicadores indeterminados de Lagrange. Para ello se construye una función, que al minimizarla se plantea como:

$$\delta \left[ F[\rho(r)] + \int V_{ext}(r) \rho(r) dr - \mu \left( \int \rho(r) dr - N \right) \right] = 0 \quad (3.15)$$

donde  $\mu$  es un multiplicador de Lagrange y posee el significado de un potencial químico, y donde los términos referidos al potencial externo  $V_{ext}(r)$  y el hamiltoniano electrónico  $F[\rho(r)]$  pueden agruparse como  $E_v[\rho]$ , que se refiere a la energía para una densidad de prueba:

$$F[\rho(r)] + \int V_{ext}(r) \rho(r) dr = E_v[\rho(r)] \quad (3.16)$$

reemplazando (3.15) en (3.16), y a partir de la definición del diferencial de un funcional, se obtiene la expresión:

$$\int \frac{\delta E_v[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} \delta \rho(r) dr - \mu \int \delta \rho(r) dr = 0 \quad (3.17)$$

y reagrupando:

$$\int \left\{ \frac{\delta E_v[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} - \mu \right\} \delta \rho(r) dr = 0 \quad (3.18)$$

lo que proporciona la condición de minimización restringida y que permite obtener el valor de  $\mu$  en el mínimo, se obtiene la ecuación fundamental de la teoría del funcional de densidad:

$$\frac{\delta E_v[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} = \frac{\delta F[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} + V_{ext}(r) = \mu \quad (3.19)$$

### 3.2.3 Ecuaciones de Kohn-Sham

La ecuación anterior proporciona una fórmula para minimizar la energía y determinar de ese modo la densidad del estado fundamental. Un problema se presenta cuando no se

conoce con exactitud la expresión que relaciona el hamiltoniano electrónico  $F$  con la densidad. En particular la forma exacta del funcional de la energía cinética  $T[\rho]$ . Por el contrario, la energía cinética se calcula fácilmente si se conoce la función de onda  $\psi$ . Basándose en la expresión de  $T[\psi]$  para una función monodeterminal, Kohn y Sham (Kohn & Sham, 1965) propusieron un método para calcular la energía.

Para ello consideraron como sistema de referencia un sistema de  $N$  electrones que no interactúan entre sí moviéndose bajo un potencial externo  $V_{ext}(r)$ . En este sistema la ecuación fundamental de la teoría del funcional de densidad, considerando la densidad y la energía cinética ( $T_{ni}$ ) exactas de los electrones no interactuantes, tiene la siguiente forma:

$$\frac{\delta E_v[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} = \frac{\delta T_{ni}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} + V_{ext}(r) = \mu \quad (3.20)$$

con:

$$E_v[\rho(r)] = T_{ni}[\rho(r)] + \int \rho(r) V_{ext}(r) dr \quad (3.21)$$

En un sistema real en el que los  $N$  electrones interactúan entre sí, la ecuación de la energía  $E_v[\rho(r)]$  tiene la forma:

$$E_v[\rho(r)] = T[\rho(r)] + \int \rho(r) V_{ne}[\rho(r)] dr + V_{ee}[\rho(r)] \quad (3.22)$$

donde  $V_{ne}[\rho(r)]$  se refiere al funcional de la energía potencial clásica entre el núcleo y los electrones, y  $V_{ee}[\rho(r)]$  al de la energía potencial clásica entre los electrones mismos. La energía cinética exacta para el sistema real  $T[\rho(r)]$  y la correspondiente al sistema de referencia  $T_{ni}[\rho(r)]$  son diferentes.

El mayor aporte de Kohn-Sham fue demostrar por primera vez que el hamiltoniano electrónico  $F[\rho(r)]$  puede ser separado en términos de la energía cinética  $T_{ni}$ , la energía de repulsión coulombiana y la energía de correlación-intercambio  $E_{xc}[\rho(r)]$ . Para demostrar ello primero se efectúa una partición de la energía dada por (3.22) de la siguiente manera.

$$E_v[\rho(r)] = T_{ni}[\rho(r)] + \int \rho(r) V_{ne}[\rho(r)] dr + J[\rho(r)] + (T[\rho(r)] - T_{ni}[\rho(r)]) + (V_{ee}[\rho(r)] - J[\rho(r)]) \quad (3.23)$$

donde  $J[\rho(r)]$  es la energía de repulsión coulombiana y viene dada por:

$$J[\rho(r)] = \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r-r'|} dr dr' \quad (3.24)$$

El termino  $T[\rho(r)] - T_{ni}[\rho(r)]$  de la ecuación (3.24) es la diferencia entre la energía cinética del sistema real y la del sistema de referencia y recibe el nombre de energía cinética de correlación, y el termino  $V_{ee}[\rho(r)] - J[\rho(r)]$ , es la energía de correlación-intercambio de la parte electrónica. Estas dos últimas contribuciones se suelen agrupar en un solo término,  $E_{xc}[\rho(r)]$ , que es la denominada energía de correlación-intercambio total:

$$E_{xc}[\rho(r)] = (T[\rho(r)] - T_{ni}[\rho(r)]) + (V_{ee}[\rho(r)] - J[\rho(r)]) \quad (3.25)$$

En  $E_{xc}[\rho(r)]$  están contenidas todas las contribuciones a la energía para las que no se tiene una expresión sencilla en función de la densidad electrónica. Con estas consideraciones la ecuación de la energía (3.23) queda.

$$E_v[\rho(r)] = T_{ni}[\rho(r)] + \int \rho(r) V_{ne}[\rho(r)] dr + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r-r'|} dr dr' + E_{xc}[\rho(r)] \quad (3.26)$$

La aplicación de la ecuación fundamental de la DFT (3.19) en (3.26) conduce a la expresión:

$$\frac{\delta E_v[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} = \frac{\delta T_{ni}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} + V_{ne}[\rho(r)] + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + \frac{\delta E_{xc}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} = \mu \quad (3.27)$$

Definiendo el potencial de correlación-intercambio por:

$$V_{xc}(r) = \frac{\delta E_{xc}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} \quad (3.28)$$

y el potencial de Coulomb como:

$$\phi(r) = V_{ne}[\rho(r)] + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' \quad (3.29)$$

se llega a la expresión.

$$\frac{\delta T_{ni}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} + V_{xc}(r) + \phi(r) = \mu \quad (3.30)$$

o bien:

$$\frac{\delta T_{ni}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} + V_{KS}(r) = \mu \quad (3.31)$$

donde  $V_{KS}(r)$  se denomina el potencial de Kohn-Sham. Al comparar la ecuación (3.31) con la ecuación (3.20) se concluye que la ecuación a resolver para un sistema de electrones con interacción, es la misma que para la de un sistema de electrones sin

interacción. En consecuencia la solución a la ecuación (3.31) es la misma que para (3.20), cambiando  $V_{ext}(r)$  por  $V_{KS}(r)$ .

Considerando que:

$$V_{KS}(r) = V_{ne}[\rho(r)] + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + V_{xc}(r) \quad (3.32)$$

Las ecuaciones a resolver para encontrar la densidad del estado fundamental,  $\rho_0(r)$ , que corresponda a la energía mínima del sistema electrónico serán la ecuación de Schrödinger simple para el sistema de un electrón, reescrita como:

$$\left[ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + V_{KS}(r) \right] \psi_i(r) = \epsilon_i \psi_i(r) \quad (3.33)$$

Estas funciones son muy similares a las ecuaciones de Hartree-Fock. Los orbitales  $\psi_i$  son los llamados orbitales de Kohn-Sham y permiten obtener la densidad electrónica por la relación:

$$\rho(r) = 2 \sum_{i=1}^{N/2} |\psi_i(r)|^2 \quad (3.34)$$

donde el factor 2, es debido a la degeneración de espín, generado por el supuesto de que los orbitales están ocupados solo una vez. Al igual que en el método de Hartree-Fock, en el procedimiento de resolución se parte de un conjunto de orbitales moleculares de prueba  $\{\psi_i(r)\}$ , con los que se determina la densidad electrónica usando la expresión (3.34). Esta densidad a su vez sirve para poder obtener el valor para el potencial de Kohn-Sham  $V_{KS}$  partir de (3.32), y solucionar a continuación la ecuación de valores y funciones propias (3.33). El proceso se repite hasta llegar a la convergencia, que indica que se ha alcanzado la energía del estado fundamental.

### 3.3 IMPLEMENTACIÓN DFT DE LA CORRELACIÓN E INTERCAMBIO

Considerando las consecuencias de la metodología de Kohn-Sham, es importante señalar que en la expresión (3.32) para obtener el potencial de Kohn-Sham  $V_{KS}(r)$ , todo es conocido excepto  $V_{XC}(r)$ . Por ello es de esperar que la densidad electrónica  $\rho(r)$  se aproxime a la densidad exacta a medida que  $V_{XC}(r)$  se acerque al potencial de correlación-intercambio exacto. Obteniendo de la ecuación (3.28), la expresión para el funcional  $E_{XC}[\rho(r)]$ :

$$E_{XC}[\rho(r)] = \int \epsilon_{XC}[\rho(r)] \rho(r) dr \quad (3.35)$$



se puede relacionar  $V_{XC}(r)$  con la energía de correlación-intercambio  $\epsilon_{xc}$ , energía que requiere buenas aproximaciones a fin de poner en práctica la teoría DFT.

### 3.3.1 Aproximación de la densidad local (LDA)

Es la aproximación más simple, en ella  $E_{XC}[\rho(r)]$  es un funcional que depende exclusivamente de la densidad  $\rho(r)$ , y las contribuciones a la correlación y al intercambio se suelen tratar separadamente. El tratamiento del término de intercambio, se basa en la suposición de que la densidad  $\rho_0(r)$  casi no varía con la posición –dicho de otro modo, que su derivada con respecto de la posición es aproximadamente cero- por lo que se puede igualar ésta a la densidad electrónica de un modelo el gas de electrones de densidad homogénea y  $\rho(r)$  constante, desarrollado a partir de la teoría de Thomas-Fermi.

En cambio, la energía de correlación no es conocida exactamente y es necesaria su determinación numérica (Vosko et al. 1980). Uno de los métodos más usados para estos cálculos es el método de Monte Carlo cuántico para un gas homogéneo de electrones no interactuantes (Ceperley & Alder 1980). Al final el cálculo de  $\epsilon_{xc}$  se basa únicamente en la posición local  $r_s$  que depende de  $\rho(r)$ , expresándose la energía de correlación-intercambio de LDA como:

$$\epsilon_{XC}^{LDA}[\rho(r)] = \epsilon_X[\rho(r)] + \epsilon_C[\rho(r)] = -\frac{0.458}{r_s} - \frac{0.44}{r_s + 7.8} \quad (3.36)$$

donde:

$$r_s = \left( \frac{3}{4\pi\rho(r)} \right)^{1/3} \quad (3.37)$$

### 3.3.2 Aproximación del Gradiente Generalizado (GGA)

Debido a que el modelo de gas de electrones regularmente no es efectivo para predecir con exactitud las propiedades de los enlaces químicos, se desarrolló un método que consiste en introducir gradientes de la densidad en la descripción de los efectos de correlación-intercambio. De esta forma se tienen en cuenta el valor de la densidad en cada punto (como el LDA) y como varía la densidad alrededor de cada punto. Este método se llama la aproximación del gradiente Generalizado (GGA). Bajo esta aproximación la energía de correlación-intercambio se redefine incluyendo valores locales de las derivadas de la densidad:

$$\varepsilon_{XC}^{GGA}[\rho(r)] = \varepsilon_{XC}^{LDA}[\rho(r)] + \Delta\varepsilon_{XC} \left[ \frac{|\nabla\rho(r)|}{\rho^{4/3}(r)} \right] \quad (3.38)$$

por ello se debe conocer la densidad y su derivada en cada punto.

Posteriormente se introdujeron mejoras cuantitativas del funcional de correlación-intercambio (Lieb & Oxford 1981, Lieb 1979), estableciéndose que la energía de correlación intercambio exacta satisface la relación:

$$E_{XC}[\rho(r)] \geq -1.68 \int \rho(r) r^{4/3} dr \quad (3.39)$$

El funcional usado en el presente trabajo fue el de Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE) del año 1996 (Perdew et al. 1996), funcional con el que se obtienen resultados semejantes a los obtenidos con otros funcionales, utilizando menos parámetros, haciendo los cálculos menos costosos computacionalmente. Una característica notable de este funcional es la incorporación de un parámetro  $k=0.804$  que afecta la parte del intercambio del PBE (Solana 2008).

$$E_{XC}[\rho(r)] = \int \rho(r) \varepsilon_x(r) dr = \int \rho(r) \varepsilon_x^{LDA}(r) F_x(s(r)) dr \quad (3.40)$$

$$F_x(s(r)) = 1 + k - \frac{k}{1 + \mu(s(r))^2 / k} \quad (3.41)$$

$$s(r) = \frac{|\nabla\rho(r)|}{2(3\pi^2)^{1/3} \rho(r)^{4/3}} \quad (3.42)$$

donde  $F_x(s(r))$  es el factor de mejora del funcional de intercambio, dependiente del gradiente de densidad  $s(r)$  y el parámetro  $k$ .

### 3.4 FUNCIONES DE BASE

Dado que la ecuación de Schrödinger para un sistema polielectrónico no tiene soluciones exactas, se construyen funciones polielectrónicas aproximadas. Uno de los métodos más antiguos con este propósito es el de Hartree-Fock (HF). Uno de los problemas de este método es la selección de las funciones matemáticas que representen los orbitales de HF. Este problema fue solventado por Roothaan y Hall, mediante un método conocido como combinación lineal de orbitales atómicos o más generalmente como combinación lineal de funciones de base. Existen históricamente varios tipos de funciones base: las funciones hidrogenoides, las de tipo Slater, las funciones gaussianas GTO, estas últimas, las más usadas.

Una base depende significativamente de dos aspectos: (i) el número de funciones de base por átomo, y (ii) el tamaño de la región usada por esas funciones de base. Para mejorar estos aspectos y hacer más eficientes los cálculos en sistemas periódicos y/o de gran tamaño, programas como SIESTA y DMOL3, utilizan otro tipo de orbitales atómicos, los llamados orbitales atómicos numéricos (Numerical Atomic Orbital) o NAO (tabla 1).

**Tabla 1. Bases utilizadas por el programa DMOL3.**

<b>Nombre de la Base</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ejemplos</b>
MIN	Base mínima. Un orbital atómico (AO) por cada orbital atómico ocupado. Tiene rendimientos de baja precisión pero rápido procesamiento.	H: 1s C: 1s 2s 2p Si: 1s 2s 2p 3s 3p
DN	Base doble numérica. MIN + un segundo conjunto de AOs de valencia. Mejora la precisión respecto a MIN.	H: 1s 1s' C: 1s 2s 2p 2s' 2p' Si: 1s 2s 2p 3s 3p 3s' 3p'
DND	Base doble numérica más funciones d. Como DN pero con una función d de polarización sobre todos los átomos que no son hidrógenos. Este conjunto de bases por defecto provee una precisión razonable con un costo computacional modesto.	H: 1s 1s' C: 1s 2s 2p 2s' 2p' 3d Si: 1s 2s 2p 3s 3p 3s' 3p' 3d
DNP	Base doble numérica más polarización. Como DND pero incluyen funciones de polarización p para todos los átomos de hidrógeno. Mejor precisión en los cálculos pero con un alto costo computacional. Importante en sistemas con puentes de hidrógeno.	H: 1s 1s' 1p C: 1s 2s 2p 2s' 2p' 3d Si: 1s 2s 2p 3s 3p 3s' 3p' 3d
TNP	Base triple numérica más polarización. Como DNP incluye funciones de polarización adicionales para todos los átomos Mejor precisión, pero con un alto costo computacional.	H: 1s 1s' 2p 1s'' 2p' 3d O: 1s 2s 2p 2s' 2p' 3d 2s'' 2p'' 3p 4d S: 1s 2s 2p 2s' 2p' 3s 3p 3s' 3p' 3d 3s'' 3p'' 3d' 4d

En este caso el conjunto de bases es una combinación lineal de orbitales atómicos numéricos muy general y flexible. Permite orbitales con momentos angulares arbitrarios, múltiple-zeta, polarizados y no centrados. Los orbitales numéricos son las soluciones numéricas del hamiltoniano de Kohn-Sham para los átomos aislados. Las funciones de base  $\chi_\mu$  se dan como valores numéricos sobre una malla esférica-polar centrada en el átomo, en lugar de funciones analíticas (como las de los orbitales gaussianos). La parte angular de cada función es un armónico esférico apropiado  $Y_{lm}(\theta, \phi)$ . La porción radial  $R(r)$  se obtiene al resolver numéricamente las ecuaciones DFT atómicas. Un nivel razonable de precisión se obtiene normalmente mediante el uso de alrededor de 300 puntos radiales desde el núcleo hasta una distancia exterior de 10 Bohr ( $\sim 5,3 \text{ \AA}$ ) (Ortega-Castro 2007).

Al igual que las funciones de base gaussianas, una mayor libertad variacional se consigue proporcionando grandes conjuntos de base. La generación de un segundo conjunto de funciones da como resultado la duplicación del tamaño del conjunto de bases, lo que se conoce como una base doble numérica (DN). Esta notación se utiliza por analogía con las bases gaussianas doble zeta (DZ), utilizando el N para enfatizar la naturaleza numérica de estos orbitales.

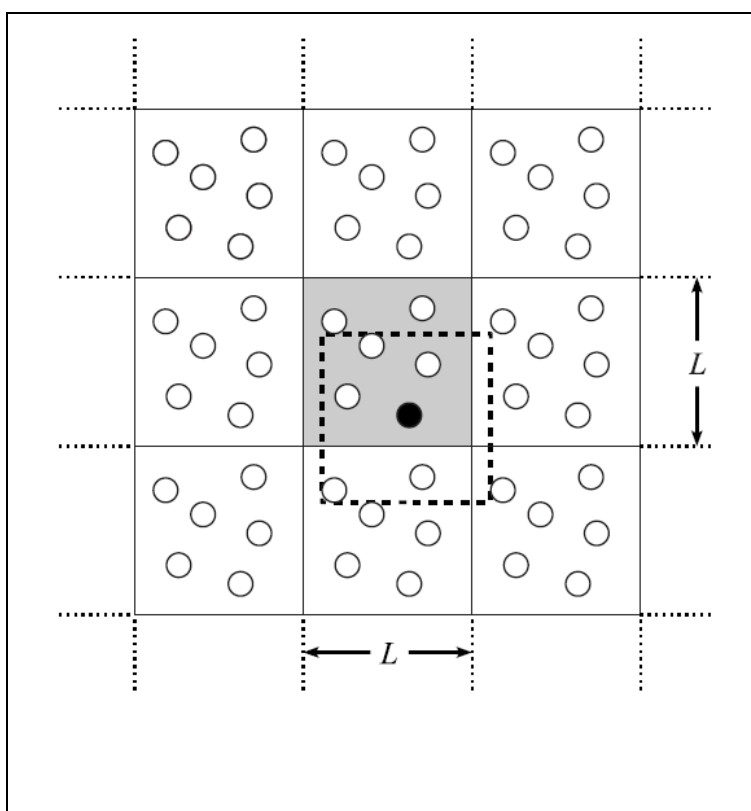
### **3.5. MODELOS BAJO CONDICIONES PERIODICAS DE CONTORNO**

Los modelos bajo condiciones de contorno periódicas (Allen & Tildesley 1987, Haile 1997) son modelos que se construyen en general considerando que una celda primaria que contiene al sistema de estudio, está rodeado por réplicas exactas de sí mismo en todas las direcciones, las celdas imágenes, formando una red infinita. Estas celdas imágenes contienen los mismos átomos que la celda primaria y, durante un cálculo como el de una simulación, cada uno de los átomos de las celdas imágenes se mueve de la misma forma que los átomos de la celda primaria. Así, si un átomo de la celda primaria la abandona por una de sus caras, su imagen de la cara opuesta entra en la celda primaria. De este modo ya no existen superficies limitantes del sistema (Fig. 29).

En principio por este procedimiento se puede generar un sistema periódico infinito, almacenando solo la información de los átomos de la celda primaria, pues los de las imágenes son reproducciones de ellos. La celda primaria ha de elegirse suficientemente grande como para que la periodicidad impuesta al sistema no afecte a sus propiedades fisicoquímicas, que se pretenden estudiar. No existen reglas establecidas para determinar su tamaño. El único procedimiento seguro consiste en

comprobar que los resultados obtenidos no se modifican si se aumenta el tamaño de la celda primaria.

La implementación de las condiciones de contorno periódicas requiere la evaluación de las fuerzas que se ejercen sobre cada molécula por todas las demás moléculas del sistema. Si se considera un sistema cuya celda primaria contiene  $N$  moléculas y se supone que el potencial se expresa como la suma de interacciones entre parejas de moléculas, entonces existen  $N-1$  términos en esa suma. Pero en principio se han de incluir también las interacciones con las moléculas de las celdas imágenes. Esta suma contiene, por tanto, infinitos términos, y en la práctica su evaluación requiere la realización de aproximaciones. Si las fuerzas que operan no son de corto alcance (interacciones de van der Waals) se puede limitar el número de términos de esta suma considerando que la molécula en cuestión se encuentra en el centro de una celda cúbica de las mismas dimensiones que la celda original y solo interactúa con las moléculas que están dentro de esta celda, es decir con las imágenes más próximas de las otras  $N-1$  moléculas (Fig. 29). Este procedimiento se denomina criterio de la mínima imagen (Allen & Tildesley 1987), y es una consecuencia natural del uso de las condiciones de contorno periódicas.



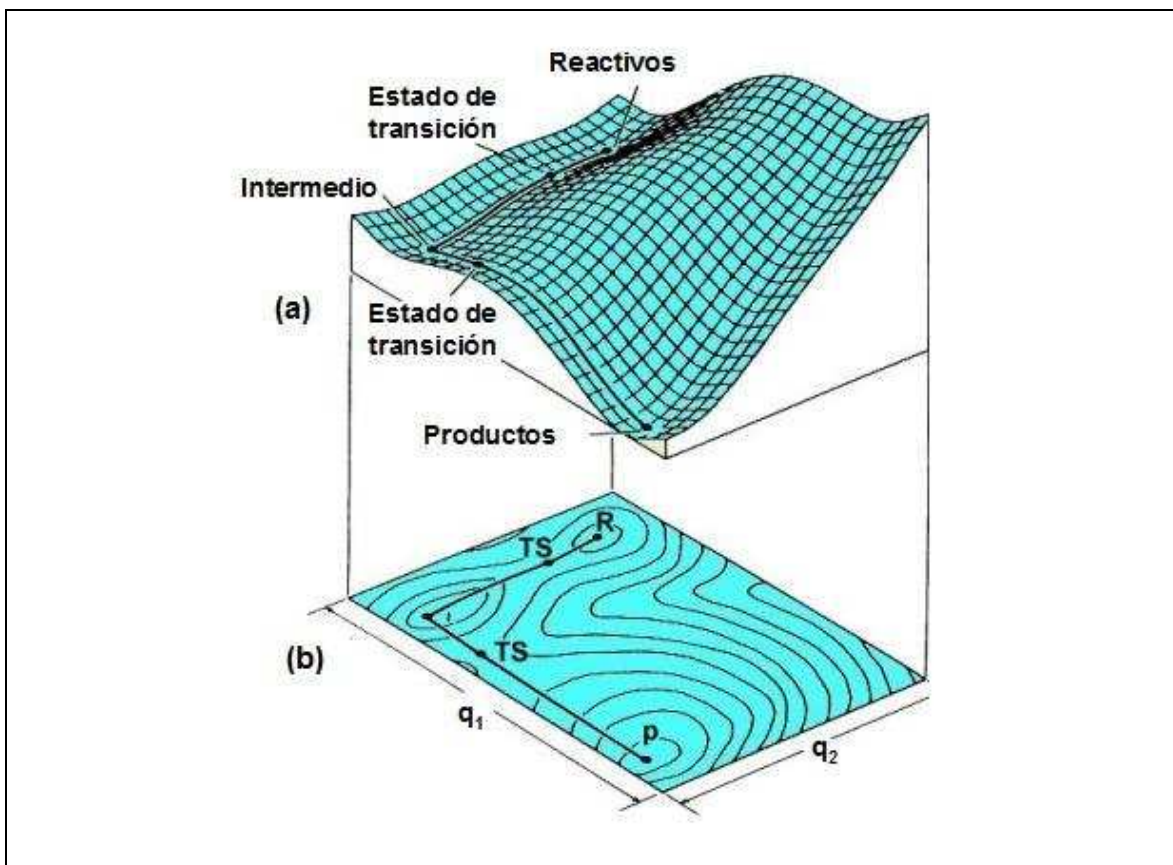
**Fig. 29. Condiciones de contorno periódicas en un sistema periódico bidimensional. La caja sombreada corresponde a la celda primaria.** En la figura se ejemplifica el criterio de la mínima imagen en un sistema periódico bidimensional. La molécula resaltada interactúa solo con las moléculas que están dentro de una celda centrada en ella de las mismas dimensiones que la celda primaria.

Las condiciones de contorno periódicas han sido usadas entre otras cosas para estudiar la fase condensada de la materia y compuestos sólidos cristalinos, dado que esta dentro de la naturaleza de estos el presentar una estructura ordenada. Un ejemplo son los estudios con nivel de cálculo DFT que se han hecho de superficies de óxidos metálicos (Makov & Payne 1995, Payne et al. 1992), zeolitas (Svelle et al. 2009, Grybos et al. 2009, Vener et al. 2009) y otras superficies inorgánicas (Foster et al. 2009, Vaiss et al. 2009, Ortega-Castro et al. 2010b, Ortega-Castro et al. 2010c, Ortega-Castro et al. 2008), estructuras orgánico-metálicas y las interacciones de estos sistemas con pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas (Piacenza et al. 2009, Natan et al. 2006). Para usar los modelos periódicos con estos niveles de cálculo la ecuación de Schrödinger se tiene que resolver sólo para los átomos de la celda unitaria, bajo la condición de que la función de onda (o la densidad electrónica) en un determinado punto no se altere al aplicar el operador de traslación. También se ha aplicado las condiciones de contorno periódicas en sistemas de miles de átomos pero usando un nivel de cálculo de mecánica molecular.

### **3.6 ANALISIS DE LA REACTIVIDAD QUIMICA**

Durante una reacción química se produce una reorganización de los enlaces de las moléculas. Una de las teorías que permite entender de modo aproximado como se produce esta reorganización y con que velocidad, es la teoría del estado de transición. Esta teoría presupone que la aproximación de Born-Oppenheimer es válida, pudiendo separarse los movimientos nuclear y electrónico, por tener escalas de tiempo muy diferentes entre sí. En su forma convencional esta teoría, está ligada al concepto de estructura del estado de transición de una hipersuperficie de energía potencial resultante de la aproximación de Born-Oppenheimer.

McIver & Komornicki (1972) definen la estructura del estado de transición como el punto en una superficie de energía potencial (Fig. 30), que cumple las siguientes condiciones: i) es un punto estacionario, es decir, de gradiente cero; ii) la matriz de constantes de fuerza en el punto debe tener un único valor propio negativo; iii) debe ser el punto de más alta energía potencial en una línea continua que conecte reactivos y productos; iv) debe ser el punto de menor energía potencial que cumpla las anteriores tres condiciones. La ubicación de un estado de transición está completamente definida en la superficie de energía potencial (PES), por la primera y segunda derivadas de la energía con respecto a cualquier coordenada.



**Fig. 30. Superficie de energía potencial en tres dimensiones.** (a) La trayectoria de una reacción química en el espacio configuracional se representa por las líneas continuas. (b) La superficie se puede representar también mediante mapas de contorno donde las líneas curvas que salen de los mínimos son líneas de gradiente, y las curvas cerradas son líneas equipotenciales (Adaptado de: Minyaev 1994).

La distinción entre un mínimo y un estado de transición se encuentra en las segundas derivadas. En el caso de un “punto de silla”, en la matriz del hessiano uno de los valores propios será negativo y todos los demás positivos. La frecuencia armónica de vibración molecular está relacionada con la matriz constante de fuerza de acuerdo con las ecuaciones. (3.43) - (3.45). La fuerza que actúa sobre un resorte armónico depende de la masa  $m$  y la constante de fuerza  $k$ , y se puede escribir como:

$$\vec{F} = m \frac{\partial^2 \vec{x}}{\partial t^2} \quad (3.43)$$

$$\vec{F} = -k \vec{x} \quad (3.44)$$

Esta ecuación diferencial tiene una solución periódica  $x(\omega)$ , donde  $\omega$  representa la frecuencia:

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (3.45)$$

Las frecuencias están relacionadas con la matriz hessiana H, y son posibles de calcular a partir de los valores propios  $f_{mwc}^i$  usando la ecuación (3.46), donde  $c$  es la velocidad de la luz,  $\nu_i$  son las frecuencias,  $\tilde{\nu}_i$  los números de onda y  $f_{mwc}^i$  los valores propios ponderados en masa de la matriz hessiana.

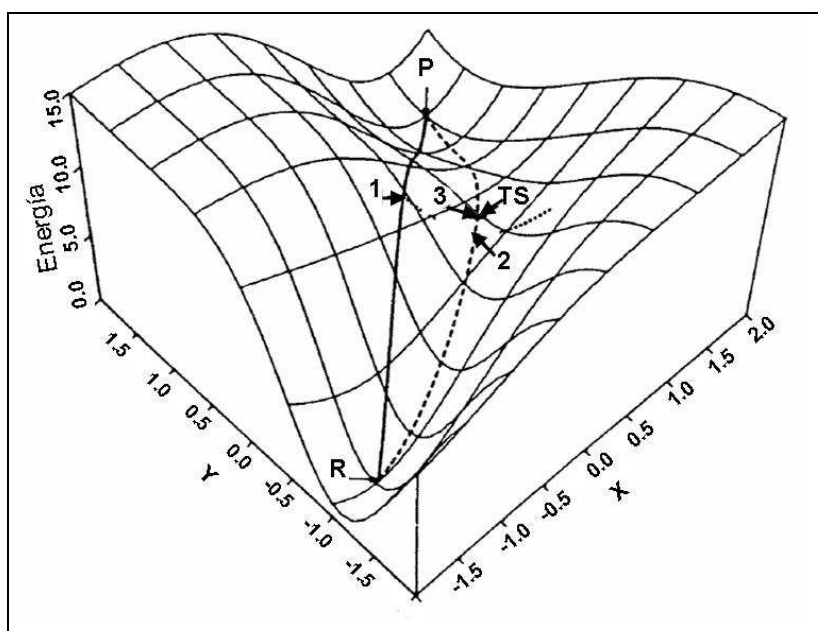
$$\nu_i = \frac{\sqrt{f_{mwc}^i}}{2\pi} \quad (3.46)$$

$$\tilde{\nu}_i = \frac{\sqrt{f_{mwc}^i}}{2\pi c} \quad (3.47)$$

En un mínimo, todas las constantes de fuerza son estrictamente positivas. En un estado de transición sin embargo, una de las constantes de fuerza es negativa, produciendo una frecuencia imaginaria.

### 3.6.1 Cálculos de estados de transición

Dentro de los métodos usados para el cálculo de los estados de transición en el presente trabajo se emplearon los métodos de transito sincrónico (LST/QST) (Fig. 31), y el método de los modos propios.



**Fig. 31. Representación de los métodos LST/QST. R, P y TS se refieren a los reactivos, productos y estado de transición respectivamente. (Fuente: Shaik et al. 1992).**



Los métodos de transito sincrónico (LST/QST) se utilizan para encontrar un estado de transición (TS) cuando las estructuras razonables para los reactivos y productos existen, pero la ubicación del TS es desconocida (Halgren & Lipscomb 1977). A partir de los reactivos y productos, los métodos de tránsito sincrónico interpolan una ruta de reacción para encontrar un estado de transición. Primero el procedimiento de tránsito sincrónico lineal (LST) asume que el camino de reacción es una línea recta que conecta reactivos con productos y bajo esa suposición el TS es la estructura de máxima energía a lo largo de esta línea recta (punto 1 de la línea continua en la Fig. 31). A continuación por el procedimiento de tránsito sincrónico cuadrático (QST), se realiza la minimización de energía respecto a todas las coordenadas perpendiculares a la línea recta que se ha supuesto como camino de la reacción (la estructura del punto 1 se minimiza, obteniéndose el punto 2 de la línea no continua de la Fig. 31), con lo cual se obtiene como un nuevo camino de la reacción, una línea curva, en el que la estructura de máxima energía corresponderá al TS candidato (punto 3 de la línea no continua de la Fig. 31).

Una vez obtenida una estructura cuya geometría se encuentra próxima a la del estado de transición, se pueden usar otros métodos como el método de seguir el vector propio (“eigenvector”) también llamado *método de los modos propios* (Tsai & Jordan 1993), en el que se realiza una optimización geométrica por minimización de energía, conservando el valor propio negativo del vector propio en el curso de la optimización, aunque su magnitud y dirección puede variar. En el caso del programa DMol3 este utiliza el método de optimización geométrica de Newton-Raphson, siendo la búsqueda la de un máximo de energía a lo largo de un modo normal y un mínimo a lo largo de todos los demás nodos.

### **3.7 ANÁLISIS DE LOS ESTADOS ESTACIONARIOS Y DE TRANSICIÓN**

Una vez localizado un estado estacionario o estado de transición, se puede realizar un análisis en detalle de su configuración electrónica y el cálculo de ciertas propiedades. Algunas propiedades, como la estructura electrónica o las fuerzas que se aplican en los átomos son directamente accesibles de la función de densidad electrónica o la función de onda. Otros, como el espectro vibracional, requieren el cálculo de diferentes configuraciones atómicas cercanas a la geometría a evaluar.

### 3.7.1 Análisis poblacional

El método del análisis poblacional puede usarse para el cálculo de las cargas parciales de los átomos, que permite particionar la densidad electrónica o en su defecto la función de onda, en cargas localizadas sobre los núcleos, órdenes de enlace, entre otros. En cuanto a las cargas, éstas no se observan experimentalmente, pero es posible realizar el análisis de las fracciones de carga que se depositan en los dominios de los átomos, en función de la probabilidad de que el electrón se encuentre cercano a un átomo determinado en un porcentaje de tiempo. Particularmente, el análisis poblacional de Mulliken no refleja la electronegatividad de los átomos involucrados, pues sugiere que el solapamiento entre dos orbitales es compartido de forma equivalente. El análisis de población natural (NPA), por otra parte, nos permite obtener ocupaciones y cargas, en la cual no se utilizan los orbitales moleculares directamente; se recurre a los orbitales naturales, que son las funciones propias de la matriz densidad reducida de primer orden. Estos orbitales naturales están localizados y son ortogonalizados.

Los aspectos en la geometría, como hibridaciones, coordenadas y órdenes de enlace, tienen implicaciones en la disponibilidad de electrones frente a las interacciones con especies electrofílicas. Por ejemplo, el orden de enlace (O.E), a la luz de la teoría del orbital molecular (Córdova et al. 2004) nos permite estimar el número de enlaces entre pares de átomos en una molécula y está relacionado directamente con la longitud de enlace y su energía. En general, un mayor orden de enlace corresponde a una mayor energía y a una menor longitud del mismo. También es posible apreciar una relación directa con la hibridación, pues a medida que aumenta el carácter *s* en el orbital híbrido, la densidad electrónica estará más cercana al núcleo y por tanto los electrones serán más fuertemente atraídos.

### 3.7.2 Efectos del solvente

La estrategia más directa para incluir el solvente a nivel de las aproximaciones mecánico-cuánticas es la de incluir un conjunto reducido de moléculas de disolvente de modo explícito en el sistema. Este método presenta tres problemas:

- Al ignorar efectos dinámicos, los conjuntos “clusters” resultantes de moléculas de solvente dan una imagen más cercana al hielo que al agua líquida.
- El tamaño de los sistemas es siempre excesivamente pequeño para representar un medio solvatado real.
- El coste computacional puede ser enorme en cuanto el tamaño del sistema aumenta.

Por ello los efectos del solvente se pueden tratar bien:

- Usando partículas clásicas que puedan muestrearse mediante cálculos de dinámica molecular o Montecarlo.
- Utilizando las representaciones macroscópicas del solvente (métodos continuos). Estos métodos continuos permiten reducir los grados de libertad asociados a las moléculas de solvente (Tomasi & Persico 1994).

Un modelo de solvatación de medio continuo es el modelo COSMO (Conductor-like Screening Model), modelo en el que se crea una cavidad alrededor de la molécula de soluto y el soluto interactúa con el disolvente, el cual es representado por un modelo dieléctrico continuo (Klamt & Schuurmann 1993). La distribución de carga del soluto polariza el medio dieléctrico. La respuesta del medio dieléctrico se da por la generación de cargas puntuales (polarización) sobre la superficie de la cavidad. En contraste a otras implementaciones de medio continuo, en este modelo la generación de estas cargas puntuales no requiere de la solución de las condiciones de contorno complejas del dieléctrico. Para su generación se emplea una condición de contorno más simple para el conductor, que depende de la constante dieléctrica  $\epsilon$  del solvente. En consecuencia, la polarizabilidad del material continuo se gobierna por su constante dieléctrica  $\epsilon$ . El valor utilizado para el agua es 78.4.

El método COSMO considera que si el solvente es un conductor ideal del potencial electrostático, se puede imponer la restricción de que el potencial electrostático ha de ser nulo en la superficie, por lo que este resulta menos sensible a la forma y tamaño escogidos para la cavidad. Si se conoce la distribución de la carga en la molécula de soluto, es posible calcular la carga  $q^*$  en la superficie. Al utilizar solventes reales se puede asumir que la carga  $q$  es menor que  $q^*$  por un factor  $f$ :

$$q = f(q^*) \quad (3.48)$$

A su vez el factor  $f$  es función de la constante dieléctrica  $\epsilon$  del solvente:

$$f(\epsilon) = \frac{\epsilon - 1}{\epsilon - x} \quad (3.49)$$

donde el valor de  $x$  es 0.5 (Andzelm et al. 1995) y en otras implementaciones cero (Barone & Cossi 1998). El método COSMO es más exacto para solventes que poseen una constante dieléctrica elevada, ya que un solvente con valores elevados de  $\epsilon$  se comporta como un conductor ideal.



## **4. MATERIALES Y METODOS**



#### **4.1 Programas usados**

En el presente trabajo se han hecho uso básicamente de los programas DMOL3 (Delley 2000) y Materials Studio 4.4 desarrollado por Accelrys Inc (Grillo et al. 2004), este último sirvió como interfase gráfica del programa DMOL3.

El programa DMOL3 permite hacer cálculos de estructura electrónica y simulaciones de dinámica molecular ab initio para moléculas, agregados moleculares y sistemas periódicos. Entre sus principales características podemos mencionar:

- Permite cálculos mediante la teoría del funcional de densidad (DFT), usando la aproximación de la densidad local (LDA) o la aproximación del gradiente generalizado (GGA).
- Permite hacer cálculos con pseudopotenciales o con todos los electrones.
- Emplea una combinación lineal de orbitales atómicos (LCAO) como conjunto de funciones base.
- En este programa el costo computacional y el tiempo de cálculo escalan linealmente con el número de átomos del sistema (orden N), a diferencia de otros programas que su escalamiento es  $N^2$ ,  $N^4$ , o incluso mayores potencias.
- Puede ser paralelizado, lo que significa que un mismo cálculo puede ser realizado por varios ordenadores, lo que reduce el tiempo de los cálculos.

#### **4.2. Modelado de la superficie fosfolipídica**

El modelado del sistema se inició considerando como estructura base la estructura cristalizada del 1,2-Dilauroil-DL-fosfatidiletanolamina, solvatada con ácido acético (Elder et al. 1977) y que se encuentra en una fase cristalina lamelar Lc. Las estructuras cristalinas han sido un buen punto de partida para estudiar la reactividad química en muchos casos, como el de las enzimas. Otro ejemplo son los estudios de dinámica molecular de las membranas biológicas, donde no se han dispuesto de estructuras cristalinas de bicapas lipídicas totalmente hidratadas como punto de partida para las simulaciones, por lo que muchos de los cálculos iniciales se han basado en la estructura cristalina de fosfolípidos como el dimiristoil fosfatidilcolina dihidrato (Tobias 2001).

La estructura base fue modificada de modo que se redujeron las dimensiones del cristal, con el fin de que esta incluyera 2 fosfolípidos, nueve moléculas de agua y una molécula de acetaldehído por celda, obteniéndose por condiciones de contorno periódicas una monocapa fosfolipídica. La imposición de las condiciones de contorno periódicas al modelo tiene sentido en el presente caso considerando la aproximada naturaleza

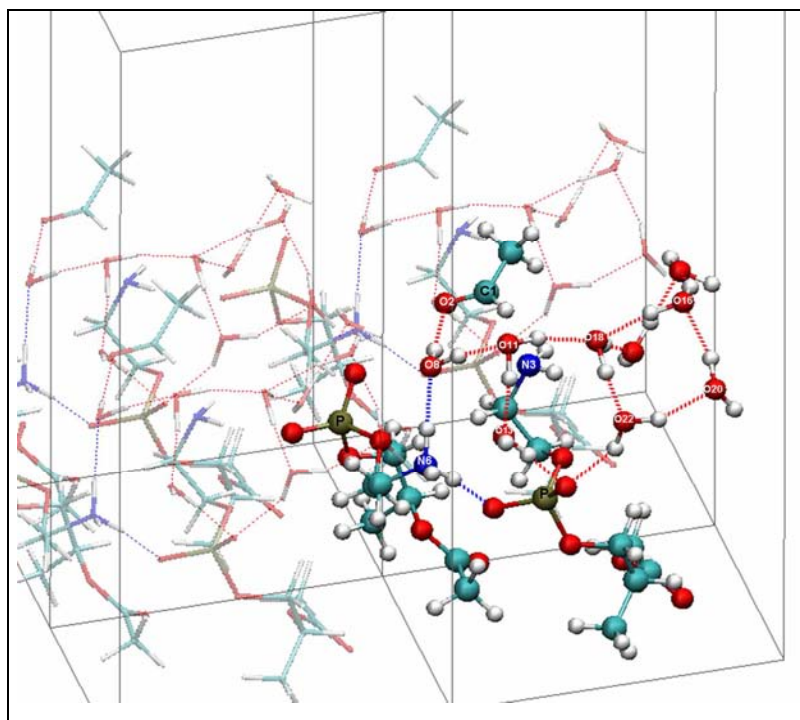
periódica de una capa exclusivamente formada por aminofosfolípidos en fase cristalina lamelar.

La membrana plasmática propiamente dicha no posee una naturaleza periódica dado que en ella los fosfolípidos se encuentran formando una bicapa en una constante transición entre una fase gel lamelar y una fase fluida, que presenta en su composición diversos fosfolípidos cuya distribución no es necesariamente simétrica. No obstante, el modelo presentado, a pesar de partir de una estructura en fase cristalina lamelar con un empaquetamiento molecular compacto y ordenado, no es muy diferente al correspondiente al de la fosfatidiletanolamina en fase gel lamelar, ya que este tipo de fosfolípidos en fase gel lamelar también presenta un empaquetamiento compacto debido a la presencia en su estructura de un grupo amino capaz de establecer enlaces de hidrógeno intermoleculares. En cambio la fosfatidilcolina, otro fosfolípido presente también en las membranas biológicas, tiene un empaquetamiento más abierto en fase gel lamelar, ubicándose una mayor cantidad de moléculas de agua en los espacios dejados por sus cabezas polares (Murzyn et al. 2005, Róg et al. 2004, McIntosh 1996). Además, La cabeza polar de la fosfatidiletanolamina presenta un menor tamaño y una mayor carga efectiva, en comparación a la cabeza polar de la fosfatidilcolina que es más voluminosa debido a su grupo colina  $^+N(CH_3)_3$ .

Las estructuras de las moléculas de fosfatidiletanolamina incluidas en el modelo, en comparación a las presentes en las membranas biológicas, presentaron reducida la región correspondiente a las cadenas de ácidos grasos. La Fig. 32 muestra el modelo, en donde cada celda contiene dos moléculas de fosfatidiletanolamina, un acetaldehído, y nueve moléculas de agua en una red de enlace de hidrógeno a lo largo de las cabezas polares de los fosfolípidos.

Este procedimiento de truncamiento de los fosfolípidos, se justifica por el hecho de que en las reacciones estudiadas solo participa de modo directo el grupo amino de la cabeza polar del fosfolípido y la influencia de las cadenas hidrocarbonadas sobre las reacciones se podría considerar menor a la de los otros grupos funcionales considerados en el modelo. Por todo ello, se puede considerar que el modelo reproduce el microentorno de la superficie aminofosfolípida de las membranas biológicas de un modo aproximado, pero que permite estudiar la reactividad química que se presenta en esta.





**Fig. 32. Sección de cuatro unidades de celda del modelo inicial de superficie aminofosfolipídica en el caso del estudio de reacción de formación de bases de Schiff.**

Por cada celda se tienen dos moléculas de fosfatidiletanolamina, un acetaldehído y la red de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno (líneas punteadas). En una celda representativa se muestran los átomos en esferas y varillas, con el fósforo y los átomos reactivos etiquetados.

La monocapa fosfolipídica es un sistema plano muy bien definido, su modelaje en un estudio teórico de nivel DFT no cuenta con antecedentes previos al presente trabajo. No obstante, otros autores han usado monocapas de fosfolípidos como modelos experimentales de estudio para obtener información relacionada a las propiedades biofísicas de la bicapa fosfolipídica (Baoukina et al. 2009). De este modo se ha podido estudiar las interacciones intermoleculares entre los lípidos y también entre los lípidos y las proteínas que se aproximan a la superficie. Las técnicas experimentales para su estudio comprenden técnicas microcalorimétricas, de fluorescencia, microscopía de fuerza atómica y cristalización 2D (Möhwald 1995).

De acuerdo con la reacción estudiada las dos moléculas de fosfatidiletanolamina se modelaron con su grupo amino protonado, o bajo su forma neutra. Así por ejemplo, para estudiar la formación de bases de Schiff entre el grupo amino de una fosfatidiletanolamina y el grupo aldehído del acetaldehído, una de las moléculas de fosfatidiletanolamina en la celda se modeló con un grupo amino neutro. La otra molécula de fosfatidiletanolamina fue modelada con un grupo amino cargado, ya que este grupo participa en varios pasos de las reacciones estudiadas como donante o aceptor de protones. En el estudio de la reacción de reordenamiento de Amadori una de las moléculas de fosfatidiletanolamina de la celda se modeló al inicio de la reacción formando una base de Schiff, producto de la reacción de la D-eritrosa y la fosfatidiletanolamina. En el caso de la reacción de formación de carboximetil

fosfatidiletanolamina al igual que la reacción de formación de bases de Schiff, se partió de un modelo en el que una de las moléculas de fosfatidiletanolamina presentaba un grupo amino no protonado, indispensable para su reacción con la forma monohidratada del glioxal.

Todos los modelos incluyeron como solvente explícito moléculas de agua que establecieron una red de enlaces de hidrógeno sobre la superficie aminofosfolipídica. Con excepción de la reacción de formación de bases de Schiff, en la mayoría de las reacciones estudiadas se incluyó además como solvente implícito el modelo COSMO (Klamt & Schüürmann 1993). El propósito de la inclusión de moléculas de agua en los modelos de superficie aminofosfolipídica no fue exclusivamente como solvente explícito, sino también por su participación como especies reactivas en los modelos de los mecanismos de reacción propuestos. Detalles del número de moléculas de agua incluidas por reacción así como otras características de los modelos periódicos de superficie aminofosfolipídica se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2. Características de los modelos periódicos de superficie aminofosfolipídica obtenidos.**

Sistema molecular de inicio, por celda	No de átomos	No de moléculas de agua (solvente explícito)	Solvente Implícito	Vacio (Å)	Artículos de Investigación
2 moléculas de fosfatidiletanolamina, y 1 de acetaldehído.	95	9	No	13.00	1, 2
1 molécula de fosfatidiletanolamina, 1 de la base de Schiff de D-eritrosa/ fosfatidiletanolamina.	92	6	COSMO	15.80	3
2 moléculas de fosfatidiletanolamina, 1 molécula de glioxal.	85	5	COSMO	13.80	4
2 moléculas de fosfatidiletanolamina, 2 moléculas de peróxido de hidrógeno.	93	9	COSMO	15.00	5
1 molécula de fosfatidiletanolamina, 1 del producto de Amadori de fosfatidiletanolamina/glucosa, 1 molécula de aminoguanidina.	103	4	COSMO	13.00	6

Las condiciones de contorno periódicas fueron usadas para el modelaje de la superficie de la capa de fosfolípidos y la red de solvatación sobre ella. Este modelo no sólo permitió que los átomos de una celda interactúen con sus imágenes en las celdas próximas, si no permitió el estudio de reactividad en la superficie de la capa de los

aminofosfolípidos modelada usando cálculos de nivel DFT, sin un costo computacional muy alto. En algunas etapas del mecanismo de reacción determinado el modelo periódico permitió el paso de los protones de una celda a otra, a través de una red de enlaces de hidrógeno de las moléculas de agua.

### **4.3 Determinación de los mecanismos de reacción**

Basados en el planteamiento preliminar de mecanismos para las reacciones estudiadas, primero se optimizó las geometrías de los reactivos, las moléculas intermedias y los productos generados, mediante cálculos basados en la teoría del funcional de densidad (DFT) y el algoritmo del gradiente conjugado, implementados en el programa DMOL3 (Delley 2000, Delley 1990), realizándose inmediatamente después el cálculo de las frecuencias de vibración molecular correspondientes a la estructura generada y obteniéndose la matriz hessiana correspondiente. Se consideró a las geometrías obtenidas como mínimos solo en el caso de la ausencia completa de frecuencias imaginarias. Todos los cálculos se realizaron con una base doble numérica más polarización (DNP), (Delley 1990) y como funcional de correlación-intercambio, el funcional de Perdew, Burke y Ernzerhof “PBE” (Perdew et al. 1996, Perdew et al. 1992), todo ello bajo condiciones de contorno periódicas.

En otro estudio se ha demostrado que el uso del funcional PBE permite cálculos satisfactorios de los valores de entalpías de reacción de las moléculas en fase gaseosa (Delley 2006). El tratamiento preciso de los enlaces de hidrógeno es importante para este trabajo. Se ha comprobado que el funcional PBE, las bases DNP y un radio de corte de 4 Å para el programa DMOL3, parámetros parecidos a los usados en el presente trabajo, permiten obtener una buena descripción de sistemas con enlaces de hidrógeno (Andzelm et al. 2003).

En todos los casos se utilizó como parámetro de entrada dependiente del tipo de átomo un radio de corte “cut off radii” de tamaño medio de 4.5 Å. El radio de corte se refiere al radio respecto a cada átomo más allá del cual su potencial es nulo y se establece con el propósito de disminuir el tiempo de cálculo.

Para los cálculos se escogió el número máximo de puntos de integración numérica de malla (“mesh points”) disponibles por el programa DMol3, el umbral de convergencia matriz densidad se estableció en  $10^{-06}$  y un parámetro “smearing” de 0.005. Dado que en el procedimiento de integración numérica en 3 dimensiones los elementos matriciales se aproximan mediante sumatorias finitas y que estas sumatorias se ejecutan en varios

puntos de integración numérica (“mesh points”), la selección del número de estos puntos esta relacionada con la precisión numérica de los resultados de los integrales, así como con el costo computacional de los cálculos. El parámetro “smearing” se refiere a la fracción de ocupación que pueden tener los electrones entre todos los orbitales y permite que la ocupación de los electrones no se restrinja solamente a los orbitales de menor energía que por defecto tienen asignados. Este procedimiento mejora la convergencia de los métodos de campo autoconsistentes (SCF) al permitir a los orbitales relajarse más rápidamente (Delley 1995).

Las estructuras de los puntos estacionarios optimizadas fueron seleccionadas como reactivos o productos según sea el paso de las reacciones estudiadas. Una primera búsqueda de estados de transición (TS) se realizó usando el método LST/QST (Halgren & Lipscomb 1977). La estructura resultante obtenida fue usada para una nueva búsqueda de TS mediante el método de los modos propios (Tsai & Jordan, 1993).

Después de este procedimiento se obtuvieron TSs correspondientes para cada etapa de la reacción, determinándose su validez como estados de transición solo si se obtenía una frecuencia imaginaria. Estos cálculos también permitieron obtener los parámetros termodinámicos de energía libre y entalpía a 298.15 K y 1 atm, con el propósito de obtener un perfil de su variación ( $\Delta G$  y  $\Delta H$ ) durante la reacción estudiada.

#### **4.4 Cálculos de propiedades relacionadas con la reactividad química**

Usando el programa DMOL3 y los parámetros de entrada similares a los de los anteriores procedimientos se realizó el cálculo de algunas propiedades moleculares que permiten establecer relaciones de estructura-reactividad.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSION**



## 5.1 RESULTADOS

En la presente memoria de tesis doctoral los resultados obtenidos se presentan en forma de artículos científicos publicados ya, o bien enviados para su publicación en revistas especializadas. Las reacciones estudiadas en el presente trabajo así como sus características se detallan en la tabla 3. Estas reacciones comprenden desde la formación de bases de Schiff, y compuestos de Amadori hasta la formación de productos de glicación avanzada como la carboximetil-PE. También se incluye el estudio de reacciones en la superficie aminofosfolipídica que pueden atenuar el estrés oxidativo al que están expuestos los componentes fosfolipídicos, tal como la descomposición del peróxido de hidrógeno, o inhibir directamente la formación AGEs, como es el caso de la reacción de la aminoguanidina con un intermedio dicarbonilo.

**Tabla 3. Reacciones relacionadas con la formación de AGEs, estudiadas en el presente trabajo.**

Reacción	Reactivos	Productos	Escenario molecular	Artículos
Formación de bases de Schiff	PE, acetaldehido	Base de Schiff de acetaldehido/PE	Superficie aminofosfolipídica	1, 2
	PE, glicina	Base de Schiff de glicina/PE	Medio acuoso	2
	PE, butilamina	Base de Schiff de butilamina/PE	Medio acuoso	2
Reordenamiento de Amadori	Base de Schiff de D-eritrosa/PE	Producto de Amadori de D-eritrosa/PE	Superficie aminofosfolipídica	3
	Base de Schiff de glicina/PE	Producto de Amadori de glicina/PE	Medio acuoso	3
	Base de Schiff de etilamina/PE	Producto de Amadori de etilamina/PE	Medio acuoso	3
Formación de carboximetil-PE	PE, glioxal	Carboximetil-PE	Superficie aminofosfolipídica	4
Descomposición de peróxido de hidrógeno	Peróxido de hidrógeno	Oxígeno y agua	Superficie aminofosfolipídica	5
Reacción de aminoguanidina con compuestos $\alpha$ -dicarbonilo	Aminoguanidina, metilglioxal	5-metil 3-amino-1,2,4-triazina	Medio acuoso	6
	Aminoguanidina, 2,3-dicarbonil-PE	Derivado de 1,2,4-triazina	Superficie aminofosfolipídica	6





## RESULTADOS

---

**Artículo 1.** Reactivity of a phospholipid monolayer model under periodic boundary conditions: a density functional theory study of the Schiff base formation between phosphatidylethanolamine and acetaldehyde.

**J. Phys Chem. B (2010) 114, 15879-15885.**



## RESULTADOS

---

**Artículo 2.** A comparative DFT Study of the Schiff base formation from Acetaldehyde and Butylamine, Glycine and Phosphatidylethanolamine.

**Theor. Chem. Acc. (2012) 131, 1263-1275.**



## RESULTADOS

---

**Artículo 3.** A DFT Study of the Amadori product rearrangement above a Phosphatidylethanolamine surface. Comparison to the reaction in an aqueous environment.

**J. Phys. Chem. C. (2013) 117, 8299-8309.**



## **RESULTADOS**

---

**Artículo 4.** DFT Study of the formation of an Advanced glycation end-product Carboxymethyl-Phosphatidylethanolamine from reaction between Glyoxal and Phosphatidylethanolamine.

**Artículo en preparación.**





## **RESULTADOS**

---

**Artículo 5.** DFT Study on Amino-Phospholipids Surface-Mediated Decomposition of Hydrogen Peroxide.

**J. Phys. Chem. C. (2011) 115, 22945-22953.**



## **RESULTADOS**

---

**Artículo 6.** DFT Study of the Mechanism of the Reaction of Aminoguanidine with Methylglyoxal. Comparison with aminoguanidine reaction above an aminophospholipid surface.

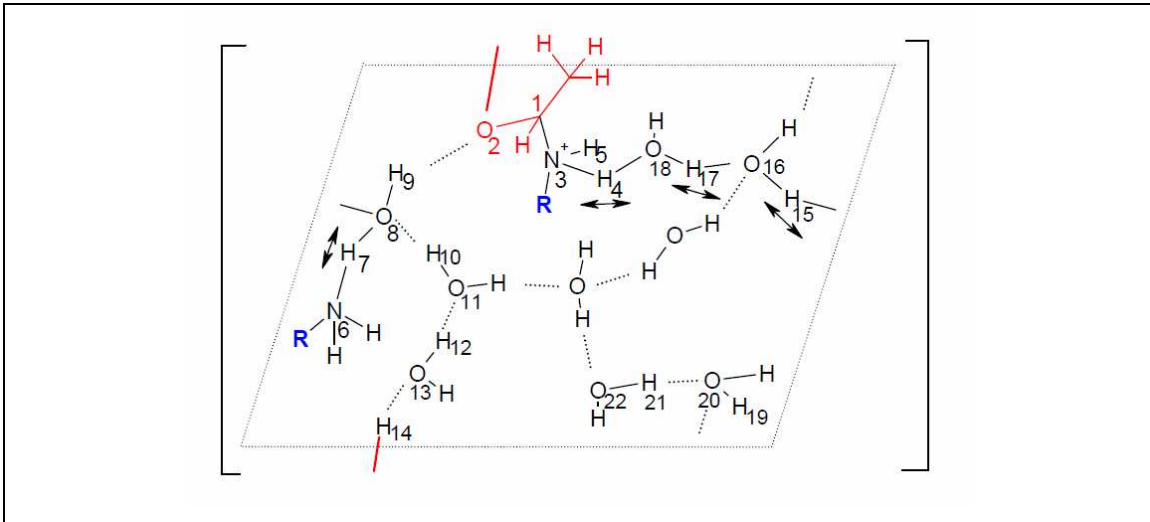
**J. Molec. Mod. (enviado)**



## 5.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente estudio se inicio con la obtención del modelo periódico de una superficie de fosfatidiletanolamina (Fig. 32) que permitió reproducir el microentorno de la superficie aminofosfolipídica de las membranas biológicas. El modelo obtenido permitió estudiar algunas reacciones sobre las membranas biológicas, relacionadas con la generación de AGEs, usando cálculos DFT. El número de partículas incluidas en estos cálculos incluyo solo un número limitado de átomos (tabla 2) con el fin de hacer viable la ejecución de estos cálculos teóricos. No obstante su tamaño, los modelos incluyeron moléculas de fosfatidiletanolamina, que conservaron la mayoría de sus grupos funcionales característicos. En el modelo de las dos cadenas de ácido graso hidrocarbonadas, una se ha eliminado y la otra se ha reducido a un solo grupo metilo. Este procedimiento de truncamiento de los fosfolípidos se justifica en el hecho de que en las reacciones estudiadas solo participa de modo directo el grupo amino de la cabeza polar del fosfolípido. La influencia de las cadenas hidrocarbonadas sobre las reacciones se podría considerar menor a la de los otros grupos funcionales considerados en el modelo.

Los sistemas modelados incluyeron también varias moléculas de agua en la superficie (tabla 2), moléculas que en el transcurso de las diferentes etapas de las reacciones estudiadas actúan no solo como solvente explícito, sino también como puente en la transferencia de protones mediante un mecanismo Grotthuss, en el que el movimiento de un protón involucra la formación y escisión de enlaces. Experimentalmente se ha determinado que la difusión de protones en las redes de moléculas de agua sobre las superficies de las capas fosfolipídicas es 20 veces más rápida que en la fase de agua libre como solvente, lo que se atribuye a la presencia de redes más compactas de enlaces de hidrógeno a lo largo de las cabezas polares fosfolipídicas, capaces de soportar un mecanismo Grotthuss rápido de formación y escisión de enlaces, permitiendo la difusión de los protones a lo largo de la interfase entre el solvente y la superficie fosfolipídica (Teissié et al. 1985, Nagle & Tristram-Nagle. 1983). Las condiciones de contorno periódicas permitieron modelar la superficie aminofosfolipídica, y dado que el movimiento de las partículas de cada celda es idéntico al de las adyacentes por la propiedad de invarianza traslacional del modelo periódico, en varias etapas de las reacciones estudiadas se pudo modelar la transferencia de protones entre dos celdas adyacentes (Fig. 33).



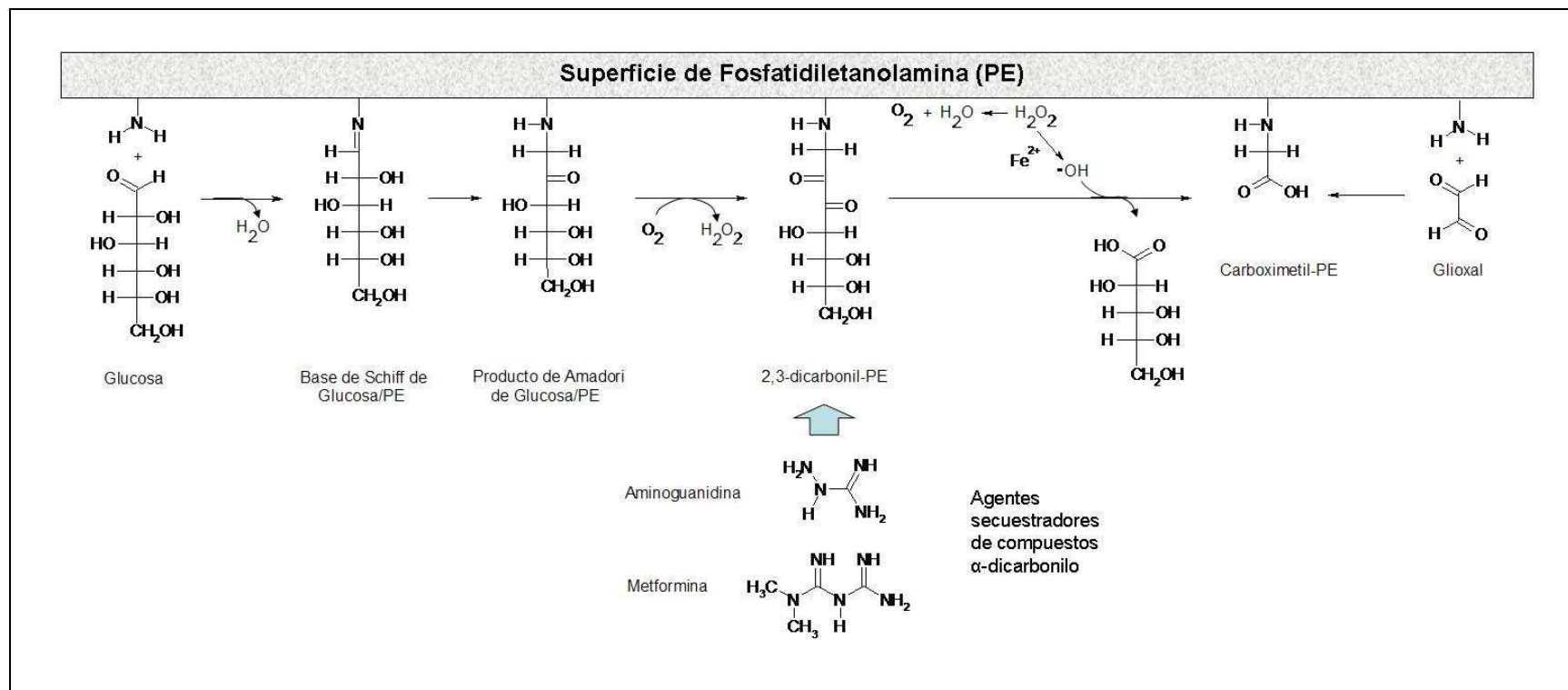
**Fig. 33. Esquema de un estado de transición en la que se produce una transferencia de protones.** Las flechas indican la dirección y los protones que participan en la transferencia

La glicación no enzimática por azúcares reductores está formada por una cascada de reacciones complejas que finalmente generan los productos de glicación avanzada (AGEs). Al comienzo de nuestro estudio se pretendía realizar ésta teniendo a la glucosa como agente reductor inicial, dado que sus altas concentraciones dentro y fuera de las células en condiciones patológicas favorecen la aparición de reacciones espontáneas y no enzimáticas con las moléculas que poseen grupos aminos libres, tales como proteínas, ácidos nucleicos, aminos bioactivos y aminofosfolípidos. Estas reacciones se inician con la formación reversible de bases de Schiff, que posteriormente pueden sufrir un reordenamiento intramolecular, dando lugar a un producto de Amadori. En algunas condiciones, estos productos de Amadori forman AGEs a través de un intermedio de dicarbonilo, que posteriormente pueden dar lugar a productos carboximetilados por la reacción de Fenton catalizada por  $\text{Fe}^{2+}$ . Los productos carboximetilados también pueden formarse de modo directo por reacción de los grupos aminos con el glioxal.

El conjunto de reacciones para la glicación no enzimática de la glucosa se presenta de modo resumido en la Fig. 34. Estas reacciones comprenden también las que son bloqueadas por agentes inhibidores de la generación de AGEs tales como la aminoguanidina y la metformina. Estas diferentes reacciones también se pueden producir con moléculas más pequeñas que la glucosa que conservan los grupos reactivos que participan en las reacciones, tal es el caso del acetaldehído en la formación de bases de Schiff o la D-eritrosa en la reacción de reordenamiento de

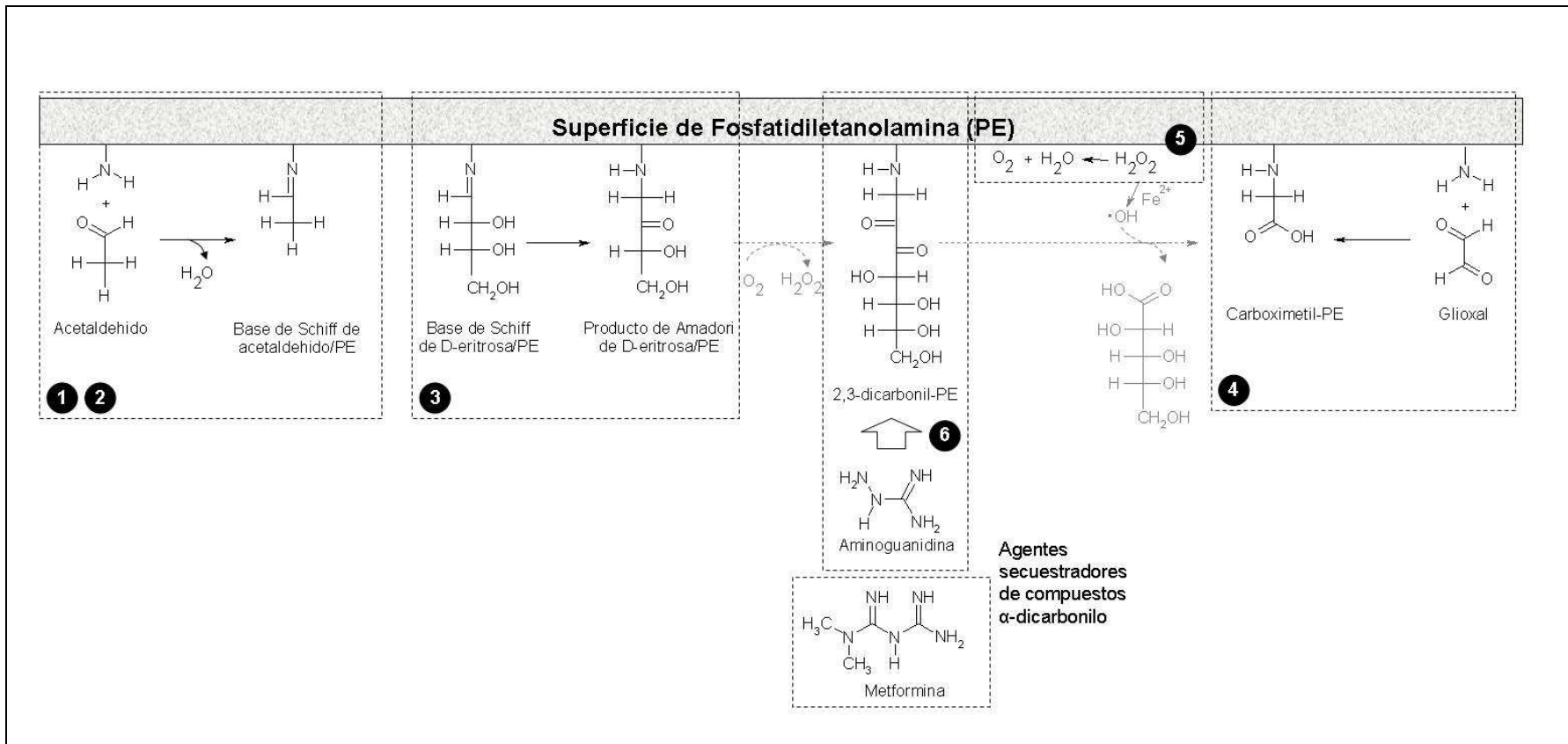
Amadori. Por ello las reacciones descritas para la glucosa en la Fig. 34, fueron estudiadas en el presente estudio reemplazando ésta y sus derivados por otras moléculas más pequeñas pero que mantuvieron en su estructura de modo básico los grupos reactivos (Fig. 35). Esto se realizó con el propósito de reducir en lo posible el tamaño de los sistemas moleculares a fin de minimizar los tiempos de cálculo. Los detalles sobre las reacciones estudiadas se presentan en los artículos de investigación, donde se presentan esquemas que muestran los átomos que participan directamente en los mecanismos de reacción propuestos, así como los procesos generales de estos. Los resultados obtenidos en los mecanismos de la reacción de formación de bases de Schiff y de reordenamiento de Amadori, teniendo como reactivos el acetaldehído y la base de Schiff de la D-eritrosa respectivamente, guardaron coherencia con los resultados experimentales obtenidos para el estudio de estas reacciones teniendo a la glucosa y sus derivados como reactivos de partida.

El estudio de la formación de carboximetil-PE se abordó considerando como reactivos de partida la forma monohidratada del glioxal y la PE (artículo 4). A lo largo de la reacción se observaron pasos análogos a las reacciones de formación de bases de Schiff y el reordenamiento de Amadori, siendo el paso de la formación del intermedio 1,2 enamina-diol el paso limitante de la reacción, con una barrera global de energía libre de  $15.41 \text{ kcal mol}^{-1}$ , y un cambio de energía libre entre los reactivos glioxal y PE y el producto final carboximetil-PE, de  $-31.05 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Este cambio de energía libre claramente exergónico señala la espontaneidad de la reacción en la dirección de formación del producto carboximetil-PE. Este cambio de energía libre no fue tan pronunciado en el caso del reordenamiento de Amadori donde se obtuvo un valor de  $-8.02 \text{ kcal mol}^{-1}$  y en el de la formación de bases de Schiff en el que tuvo un valor de  $-5.74 \text{ kcal mol}^{-1}$ .



**Fig. 34. Reacciones relacionadas con la formación de productos de glicación avanzada sobre la superficie de fosfatidiletanolamina.**





**Fig. 35. Reacciones sobre la superficie de fosfatidiletanolamina estudiadas en la presente tesis doctoral. Los números corresponden a los identificadores de los artículos de investigación, de la sección resultados de la presente memoria de tesis.**

El presente trabajo también incluyó la obtención de un mecanismo teórico para la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre la superficie aminofosfolipídica (artículo 5). Evidencias experimentales han demostrado una diferente susceptibilidad a los efectos del radical oxidrilo en proteínas, lípidos de membrana y moléculas de DNA, siendo menor en el caso de los lípidos de membrana (Stepniak et al. 2013). Esta diferente susceptibilidad puede atribuirse a la catálisis por las superficies fosfolipídicas de la reacción de descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , proceso que tendría como efecto indirecto reducir la formación de productos de glicación avanzada como la carboximetil-PE (Fig. 34). Trabajos experimentales han dado evidencias de la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , catalizada por vesículas de fosfolípidos (Yoshimoto et al. 2007). De acuerdo con el mecanismo obtenido, esta reacción sobre la superficie aminofosfolipídica se presenta en dos pasos. En un primer paso de la reacción se forma un intermedio trióxido de dihidrógeno a partir de dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en el segundo paso, este producto intermedio se escinde en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , siendo el primero el paso limitante de la reacción.

Los cálculos DFT realizados proporcionan una fuerte evidencia de que la disociación del peróxido de hidrógeno está catalizada por las superficies aminofosfolipídicas, en sus dos etapas. Este efecto catalítico se ha encontrado en todas las reacciones sobre la superficie aminofosfolipídica estudiadas, en donde la superficie, incluyendo las moléculas de agua de solvatación, pueden catalizar estas reacciones, ejerciendo básicamente tres funciones: (i) la acumulación de los reactivos como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la superficie, lo que resulta en un aumento de sus concentraciones locales, (ii) la polarización de los átomos implicados en la reacción como un resultado de una interacción con los grupos funcionales de los aminofosfolípidos cabeza polar, y (iii) actuando como donadores y aceptores de protones durante la reacción. Estos tres efectos pueden conducir a una formación acelerada de  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Este efecto catalítico puede explicar por lo tanto la atenuación observada en cuanto a los efectos del radical oxidrilo sobre los lípidos de membrana en comparación con otras biomoléculas, y con ello su efecto indirecto de reducir la formación de productos de glicación avanzada como la carboximetil-PE.

La aminoguanidina es una molécula que ha probado experimentalmente ser un inhibidor de la generación de AGEs, por la captura de compuestos carbonílicos ó 1,2-dicarbonilos (Saraiva et al. 2012, Reddy & Beyaz 2006, Thornalley 2003, Thornalley et al. 2000, Lo et al. 1994). En el presente trabajo se ha realizado un estudio teórico mediante cálculos de nivel DFT, del mecanismo de reacción del metilglioxal con la aminoguanidina

(artículo 6). Una vez determinado los pasos limitantes de la reacción nuestro propósito inicial fue evaluar estos pasos en el modelo de superficie de PE, teniendo como molécula reactiva el producto dicarbonilo de la autoxidación del compuesto de Amadori-PE, a fin de verificar si las barreras de energía eran semejantes a las de la reacción con metilglioxal.

El paso limitante de la reacción del metilglioxal con la aminoguanidina es la primera deshidratación, presentando la reacción una energía de activación de  $13.77 \text{ kcal mol}^{-1}$ . La variación de energía libre del proceso global es de  $-24.81 \text{ kcal mol}^{-1}$ . El hecho de que una deshidratación sea el paso limitante es coherente con lo que se ha mostrado en reacciones similares. Cuando este paso de deshidratación se estudio en el sistema de superficie de PE, para la reacción de 2,3-dicarbonilo-PE con la aminoguanidina, el valor de su barrera de energía libre fue  $9.32 \text{ kcal mol}^{-1}$  menor que en el de la reacción de metilglioxal con la aminoguanidina. Esta reducción al igual que en las reacciones estudiadas previamente, se atribuyó al efecto catalítico de las superficies de PE.



## **6. CONCLUSIONES**



1. Aminophospholipidic surface model obtained using periodic boundary conditions is useful as an approximation for the study of chemical reactivity that occurs in the surface of biological membranes, its boundary translation invariance is relevant to this study, allowing the equivalent transfer of protons between unit cell images.
2. In the reactions of Schiff base formation, carboxymethylphosphatidylethanolamine formation on phosphatidylethanolamine surface, and the reaction of aminoguanidine with methylglyoxal, dehydration steps are the limiting steps, which is consistent with the experimental evidence available for such reactions.
3. Aminophospholipidic surfaces, including their polar groups and water molecules in their immediate environment may have a catalytic effect on the reactions of Schiff base formation, Amadori rearrangement, carboxymethylphosphatidylethanolamine formation and  $H_2O_2$  decomposition, which are performed above it, and by extension in other reactions carried out in the vicinity.





## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Adelroth P, Brzezinski P. Surface-mediated proton-transfer reactions in membrane-bound proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004, 1655:102-15.
- Adrover M, Vilanova B, Muñoz F, Donoso J. Unexpected isomeric equilibrium in pyridoxamine Schiff bases. *Bioorg Chem.* 2009, 37:26-32.
- Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, Hager K, Fleischer G, Münch G. Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *J. Neurochem.* 2005, 92:255-63.
- Ahmed, N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005, 67:3-21.
- Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* 1997, 324:565-70.
- Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* 1986, 261:4889-94.
- Allen MP, Tildesley DJ. Computer simulation of liquids. Oxford Science Publications. Oxford, 1987.
- Amadori M. The product of the condensation of glucose and p-phenetidine. *Atti. Reale. Accad. Nazl. Lincei.* 1929, 9:68-73.
- Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J. Clin. Invest.* 1997, 99:424-32.
- Andzelm J, Govind N, Fitzgerald G, Maiti A. A DFT study of methanol conversion to hydrocarbons in a zeolite catalyst. *Int. J. Quant. Chem.* 2003, 91:467-73.
- Andzelm J, Kölmel C, Klamt A. Incorporation of Solvation Effects into Density Functional Calculations of Molecular Energies and Geometries. *J. Chem. Phys.* 1995, 103:9312-20.
- Antonenko YN, Kovbasnjuk ON, Yaguzhinsky LS. Evidence in favor of the existence of a kinetic barrier for proton transfer from a surface of bilayer phospholipids membrane to bulk phase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993, 1150:45-50.
- Antonenko YN, Pohl P. Microinjection in combination with microfluorimetry to study proton diffusion along phospholipid membranes. *Eur. Biophys. J.* 2008, 37:865-70.
- Babizhayev MA, Deyev AI, Yermakova VN, Brikman IV, Bours J. Lipid peroxidation and cataracts: N-acetylcarnosine as a therapeutic tool to manage age-related cataracts in human and in canine eyes. *Drugs. R. D.* 2004, 5:125-39.
- Bach D, Wachtel E, Miller IR. Kinetics of Schiff base formation between the cholesterol ozonolysis product 3-beta-hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al and phosphatidylethanolamine. *Chem. Phys. Lipids.* 2009, 157:51-5.
- Bao X-X, Chen Z-Q, Xie H-J. Density Functional Study on the Mechanism of Amadori Rearrangement Reaction. *Chinese J. Struct. Chem.* 2011, 30:827-32.

- Baoukina S, Marrink SJ, Tieleman P. Structure and Dynamics of Lipid Monolayers: Theory and Applications. En: Handbook Of Modern Biophysics. Biomembrane Frontiers, Nanostructures, Models, and the Design of Life, 2009, 2:75-95.
- Barone V, Cossi M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. J. Phys. Chem. A. 1998, 102:1995-2001.
- Bennun SV, Hoopes MI, Xing C, Faller R. Coarse-grained modeling of lipids. Chem. Phys. Lipids. 2009, 159:59-66.
- Berger O, Edholm O, Jähnig F. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. Biophys. J. 1997, 72:2002-13.
- Berkowitz ML. Detailed molecular dynamics simulations of model biological membranes containing cholesterol. Biochim. Biophys. Acta. 2009, 1788:86-96.
- Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. Cardiovasc. Res. 1998, 37:586-600.
- Boek ES, Padding JT, den Otter WK, Briels WJ. Mechanical properties of surfactant bilayer membranes from atomistic and coarse-grained molecular dynamics simulations. J. Phys. Chem. B. 2005, 109:19851-8.
- Bondar AN, Fischer S, Smith JC. Water pathways in the bacteriorhodopsin proton pump. J. Membr. Biol. 2011, 239:73-84.
- Bouchet AM, Frías MA, Lairion F, Martini F, Almaleck H, Gordillo G, Disalvo EA. Structural and dynamical surface properties of phosphatidylethanolamine containing membranes. Biochim. Biophys. Acta. 2009, 1788:918-25.
- Borisova NE, Reshetova MD, Ustynyuk YA. Metal-Free Methods in the Synthesis of Macrocyclic Schiff Bases. Chem. Rev. 2007, 107:46-79.
- Breitling-Utzmann CM, Unger A, Friedl DA, Lederer MO. Identification and quantification of phosphatidylethanolamine-derived glucosylamines and aminoketoses from human erythrocytes--influence of glycation products on lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 2001, 391:245-54.
- Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. Science, 1986, 232:1629-32.
- Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. Diabetes, 1985, 34:938-41.
- Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1993, 90:6434-8.
- Cameron NE, Gibson TM, Nangle MR, Cotter MA. Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. Ann. N Y. Acad. Sci. 2005, 1043:784-92.
- Carvalho VF, Florim LT, de O Barreto E, Torres RC, Batista MM, Amendoeira FC, Cordeiro RS, Martins MA, E Silva PM. Inhibition of advanced glycation end products by aminoguanidine restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats. Eur. J. Pharmacol. 2011, 669:143-8.

- Ceperley DM, Alder BJ. Ground state of the electron gas by a stochastic method. *Phys. Rev. Lett.* 1980, 45:566–9.
- Cevc G, Watts A, Marsh D. Titration of the phase transition of phosphatidylserine bilayer membranes. Effects of pH, surface electrostatics, ion binding, and head-group hydration. *Biochemistry*, 1981, 20:4955-65.
- Chandra KP, Shiwalkar A, Kotecha J, Thakkar P, Srivastava A, Chauthaiwale V, Sharma SK, Cross MR, Dutt C. Phase I clinical studies of the advanced glycation end-product (AGE)-breaker TRC4186: safety, tolerability and pharmacokinetics in healthy subjects. *Clin. Drug. Investig.* 2009, 29:559-75.
- Chen AS, Taguchi T, Aoyama S, Sugiura M, Haruna M, Wang MW, Miwa I. Antioxidant activity of a Schiff base of pyridoxal and aminoguanidine. *Free. Radic. Biol. Med.* 2003, 35:1392-403.
- Cherepanov DA, Feniouk BA, Junge W, Mulkidjanian AY. Low dielectric permittivity of water at the membrane interface: effect on the energy coupling mechanism in biological membranes. *Biophys. J.* 2003, 85:1307-16.
- Cherepanov DA, Junge W, Mulkidjanian AY. Proton transfer dynamics at the membrane/water interface: Dependence on the fixed and mobile pH buffers, on the size and form of membrane particles, and on the interfacial potential barrier. *Biophys. J.* 2004, 86:665-80.
- Córdova, T., Cabrera, G., Moreno, K. Parámetros moleculares y relación estructura-actividad hacia *Lehismania mexicana* de 3-carboetoxi-4-amino quinolinas. *Ciencia*, 2004, 12:298-308.
- Davidek T, Blank I. Elucidating the secrets of the Maillard reaction cascade - The role of Amadori compounds. *Chimia*, 2005, 59:862.
- de Grotthuss CJT. Sur la décomposition de l'eau et des corps qu'elle tient en dissolution à l'aide de l'électricité galvanique. *Ann. Chim.* 1806, 58:54-73.
- Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 1998, 44:1139-45.
- Delley B. Ground-state enthalpies: evaluation of electronic structure approaches with emphasis on the density functional method, *J. Phys. Chem. A.* 2006, 110:13632–39.
- Delley B. From molecules to solids with the DMol3 approach. *J. Chem. Phys.* 2000, 113: 7756–64.
- Delley B. *Modern Density Functional Theory: A Tool for Chemistry, Theoretical and Computational Chemistry Vol. 2*, Ed. Seminario JM, PolitzerP; Elsevier 1995.
- Delley B. An all electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules, *J. Chem. Phys.* 1990, 92:508–17.
- Di Naso FC, Forgiarini Junior LA, Forgiarini LF, Porawski M, Dias AS, Marroni NA. Aminoguanidine reduces oxidative stress and structural lung changes in experimental diabetes mellitus. *J. Bras. Pneumol.* 2010, 36:485-9.
- Doraiswamy PM, Finefrock AE. Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2004, 3:431-4.
- Dowhan W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 1997, 66:199-232.

- El Shazly AH, Mahmoud AM, Darwish NS. Potential prophylactic role of aminoguanidine in diabetic retinopathy and nephropathy in experimental animals. *Acta Pharm.* 2009, 59:67-73.
- Elder M, Hitchcock P, Mason R, Shipley GG. A refinement analysis of the crystallography of the phospholipid, 1,2-dilauroyl-DL-phosphatidylethanolamine, and some remarks on lipid-lipid and lipid-protein interactions. *Proc. R. Soc. Lond. A.* 1977, 354:157-70.
- Esteban-Martín S, Risselada HJ, Salgado J, Marrink SJ. Stability of asymmetric lipid bilayers assessed by molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131:15194-202.
- Eskin NAM, Shahidi F. Browning reaction in foods. In: *Biochemistry of Foods*. 3rd., Academic Press, 2013, p. 245-287.
- Falls LA, Furie B, Furie BC. Role of phosphatidylethanolamine in assembly and function of the factor IXa-factor VIIIa complex on membrane surfaces. *Biochemistry*, 2000, 39:13216-22.
- Feller SE, MacKerell JAD. An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J. Phys. Chem. B.* 2000, 104:7510-15.
- Feniouk BA, Cherepanov DA, Junge W, Mulikidjanian AY. Anisotropy of proton fluxes at the membrane/water interface and its role in ATP synthesis by *Rhodobacter capsulatus* chromatophores, *EBEC Short Reports*, 2002, 12:40.
- Fernandez MS, Fromherz P. Lipoid pH indicators as probes of electrical potential and polarity in micelles. *J. Phys. Chem.* 1977, 81:1755-61.
- Ferreira AE, Ponces Freire AM, Voit EO. A quantitative model of the generation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in the Maillard reaction between collagen and glucose. *Biochem. J.* 2003, 376:109-21.
- Fishkin NE, Sparrow JR, Allikmets R, Nakanishi K. Isolation and characterization of a retinal pigment epithelial cell fluorophore: an all-trans-retinal dimer conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005, 102:7091-6.
- Fort T, Alexander AE. Surface films of vinyl stearate, cetyl-vinyl ether, and their polymers, *J. Colloid Interface Sci.* 1959, 14:190-205.
- Foster AS, Trevethan T, Shluger AL. Structure and diffusion of intrinsic defects, adsorbed hydrogen, and water molecules at the surface of alkali-earth fluorides calculated using density functional theory. *Phys. Rev. B.* 2009, 80:115421.
- Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.* 1996, 271:9982-6.
- Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes*, 1994, 43:676-83.
- Garcia del Vado Ma, Echevarria G, Santos Blanco Jg, Garcia Blanco F. Schiff bases of poly-L-lysine and some compounds of the vitamin B-6 group. Influence of polypeptidic structure. *J. Mol. Catal. A. Chem.* 1997, 123:9-13.

- Garcia del Vado Ma, Rodriguez Cardona F, Echevarria G, Martinez Gonzalez C, Santos Blanco Jg, Garcia Blanco F. Determination of the rates of formation and hydrolysis of the Schiff bases formed by pyridoxal and poly-L-lysine. *J. Mol. Catal.* 1994, 87:361-70.
- Garcia del Vado MA, Garcia Blanco F Santos Blanco JG, Blázquez M, Sevilla JM, Dominguez M. Schiff bases of pyridoxal 5'-phosphate and polypeptides containing L-lysine: A kinetic study. *J. Mol. Catal.* 1991, 68:379-86.
- García-Sáez AJ, Schwille P. Surface analysis of membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010, 1798:766-76.
- Garczarek F, Wang J, El-Sayed MA, Gerwert K. The assignment of the different infrared continuum absorbance changes observed in the 3000-1800-cm(-1) region during the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.* 2004, 87:2676-82.
- Ge S-J, Lee T-C. Kinetic Significance of the Schiff Base Reversion in the Early-Stage Maillard Reaction of a Phenylalanine-Glucose Aqueous Model System. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45:1619-23
- Glomb MA, Monnier VM. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* 1995, 270:10017-26.
- Gogasyavuz D, Küçükkaya B, Ersoz HO, Yalçın AS, Emerk K, Akalin S. Effects of aminoguanidine on lipid and protein oxidation in diabetic rat kidneys. *Int. J. Exp. Diabetes Res.* 2002, 3:145-51.
- Gottschalk A. Some biochemically relevant properties of N-substituted fructosamines derived from amino-acids and N-arylglucosylamines. *Biochem. J.* 1952, 52:455-60.
- Grillo MA, Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids*, 2008, 35:29-36.
- Grillo ME, Andzelm JW, Govind N, Fitzgerald G, Stark KB. Computational material science with materials studio: Applications in catalysis, *Lect. Notes Phys.* 642, 2004, pp. 214-220.
- Grybos, R.; Benco, L.; Bucko, T.; Hafner, J. Molecular adsorption and metal-support interaction for transition-metal clusters in zeolites: NO adsorption on Pd<sub>n</sub> (N=1-6 in mordenite). *J. Chem. Phys.* 2009, 130:104503/1-20.
- Haile JM. Molecular dynamics simulation. Elementary methods. John Wiley & Sons, Inc, 1997.
- Hakizimana P, Masureel M, Gbaguidi B, Ruyschaert JM, Govaerts C. Interactions between phosphatidylethanolamine headgroup and LmrP, a multidrug transporter: a conserved mechanism for proton gradient sensing? *J. Biol. Chem.* 2008, 283:9369-76.
- Halgren TA, Lipscomb WN. The synchronous-transit method for determining reaction pathways and locating molecular transition states. *Chem. Phys. Lett.* 1977, 49:225-32.
- Hall NE, Smith BJ. High-Level ab Initio Molecular Orbital Calculations of Imine Formation. *J. Phys. Chem. A.* 1998, 102:4930-8.
- Hauser H, Pascher I, Pearson RH, Sundell S. Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta.* 1981, 650:21-51.

- Heberle J, Riesle J, Thiedemann G, Oesterhelt D, Dencher NA. Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. *Nature*, 1994, 370:379-82.
- Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P, Kumar S, Lam Y. Carnosine protects proteins against *in vitro* glycation and cross-linking. *Biochem. Soc. Trans.* 1994, 22:399S.
- Hodge JE, Rist CE. The Amadori rearrangement under new conditions and its significance for non-enzymatic reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 1953, 75:316-22.
- Hodge JE, Rist CE. N-Glycosyl derivatives of secondary amines. *J. Amer. Chem. Soc.* 1952, 74:1494-7.
- Hohenberg PC, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* 1964, 136:B864-B871.
- Hyvönen MT, Kovanen PT. Molecular dynamics simulation of sphingomyelin bilayer. *J. Phys. Chem. B.* 2003, 107:9102-08.
- Israelachvili JN. Theoretical considerations on the asymmetric distribution of charged phospholipid molecules on the inner and outer layers of curved bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973, 323:659-63.
- Jiang YY, Kong DX, Qin T, Li X, Caetano-Anollés G, Zhang HY. The impact of oxygen on metabolic evolution: a chemoinformatic investigation. *PLoS Comput. Biol.* 2012, 8:e1002426.
- Joshi D, Gupta R, Dubey A, Shiwalkar A, Pathak P, Gupta RC, Chauthaiwale V, Dutt C. TRC4186, a novel AGE-breaker, improves diabetic cardiomyopathy and nephropathy in Ob-ZSF1 model of type 2 diabetes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2009, 54:72-81.
- Kenney WC. Formation of Schiff base adduct between acetaldehyde and rat liver microsomal phosphatidylethanolamine. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1984, 8:551-5.
- Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG. Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 257:251-8.
- Klamt A, Schüürmann G. COSMO: A new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1993, 799-805.
- Knol JJ, Van Loon WAM, Linssen JPH, Ruck AL, Van Boekel M, Voragen AGJ. Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose-asparagine reaction system. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53:6133-9.
- Kohn W, Sham LJ. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*, 1965, 140:A1133-A1138.
- Krishnamurty S, Stefanov M, Mineva T, Bégu S, Devoisselle JM, Goursot A, Zhu R, Salahub DR. Density functional theory-based conformational analysis of a phospholipid molecule (dimyristoyl phosphatidylcholine). *J. Phys. Chem. B.* 2008, 112:13433-42.
- Kuhn R, Weygand F. Die Amadori-Umlagerung. *Ber. dtsh. Chem. Ges. A/B*, 1937, 70:769-72
- Kyrychenko A. A molecular dynamics model of rhodamine-labeled phospholipid incorporated into a lipid bilayer. *Chem. Phys. Letters.* 2010a, 485:95-9.
- Kyrychenko A, Wu F, Thummel RP, Waluk J, Ladokhin AS. Partitioning and localization of environment-sensitive 2-(2'-pyridyl)- and 2-(2'-pyrimidyl)-indoles in



- lipid membranes: a joint refinement using fluorescence measurements and molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B.* 2010b, 114:13574-84.
- Lederer MO, Baumann M. Formation of a phospholipid-linked pyrrolecarbaldehyde from model reactions of D-glucose and 3-deoxyglucosone with phosphatidyl ethanolamine. *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8:115-21.
- Lelkes PI, Miller IR. Perturbations of membrane structure by optical probes: I. Location and structural sensitivity of merocyanine 540 bound to phospholipid membranes. *J. Membr. Biol.* 1980, 52:1-15.
- Levi V, Villamil Giraldo AM, Castello PR, Rossi JP, González Flecha FL. Effects of phosphatidylethanolamine glycation on lipid-protein interactions and membrane protein thermal stability. *Biochem. J.* 2008, 416:145-52.
- Li Y, Cohenford MA, Dutta U, Dain JA. *In vitro* nonenzymatic glycation of guanosine 5'-triphosphate by dihydroxyacetone phosphate. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 392:1189-96.
- Lieb EH. A Lower Bound for Coulomb Energies. *Phys. Lett.* 1979, 70 A:444-6.
- Lieb EH Oxford S. An Improved Lower Bound on the Indirect Coulomb Energy, *Int. J. Quant. Chem.* 1981, 19:427-39.
- Lo TW, Selwood T, Thornalley PJ. The reaction of methylglyoxal with aminoguanidine under physiological conditions and prevention of methylglyoxal binding to plasma proteins. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 48:1865-70.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. *Molecular Cell Biology - 5th edition.* WH Freeman & Co, 2004, pp 45.
- Luthra M, Balasubramanian D. Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins. *J. Biol. Chem.* 1993, 268:18119-27.
- Maillard LC. Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. *Compt. Rend.* 1912, 154:66-8.
- Makov G, Payne MC. Periodic boundary conditions in ab initio calculations. *Phys. Rev. B.* 1995, 51:4014-22.
- Martins SIFS, Van Boekel MAJS. Kinetics of the glucose/glycine Maillard reaction pathways: Influences of pH and reactant initial concentrations. *Food Chemistry*, 2005, 92:437-48.
- Mateo MC, Bustamante JB, Cantalapiedra MA. Serum, zinc, copper and insulin in diabetes mellitus. *Biomedicine*, 1978, 29:56-8.
- McIntosh TJ. Hydration properties of lamellar and non-lamellar phases of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Chem. Phys. Lipids.* 1996, 81:117-31.
- McIver JW, Komornicki A. Structure of transition states in organic reactions: general theory and an application to the cyclobutene-butadiene isomerization using a semiempirical molecular orbital method. *J. Am. Chem. Soc.* 1972, 94:2625-33.
- Méndez JD. [Advanced glycosylation end products and chronic complications of diabetes mellitus]. *Gac. Med. Mex.* 2003, 139:49-55.
- Micheel F, Schleppinghoff B. Zur Kenntnis der Amadori-Umlagerung. *Chem. Ber.* 1956, 89:1702-23.

- Minyaev RM. Reaction path as a gradient line on a potential energy surface. *Int. J. Quantum Chem.* 1994, 49:105–27.
- Mitts E, Hixon RM. The reaction of glucose with some amines. *J. Am. Chem. Soc.* 1944, 66:483–6.
- Miyata T, van Ypersele de Strihou C. Angiotensin II receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors: implication of radical scavenging and transition metal chelation in inhibition of advanced glycation end product formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003, 419:50-4.
- Miyazawa T, Ibusuki D, Yamashita S, Nakagawa K. Analysis of amadori-glycated phosphatidylethanolamine in the plasma of healthy subjects and diabetic patients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008, 1126:291-4.
- Miyazawa T, Oak JH, Nakagawa K. Tandem mass spectrometry analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in human plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, 1043:280-3.
- Möhwald H. Phospholipid Monolayers. En: *Structure and Dynamics of Membranes - From Cells to Vesicles*, Handbook of Biological Physics, 1995, 1:163-87.
- Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003, 419:1-15.
- Monnier VM. Toward a Maillard reaction theory of aging. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989, 304:1-22.
- Mulkidjanian AY, Heberle J, Cherepanov DA. Protons and interfaces: implications for biological energy conversion. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006, 1757:913-30.
- Murzyn K, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M. Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. *Biophys. J.* 2005, 88:1091-103.
- Nachliel E, Gutman M, Kiryati S, Dencher NA. Protonation dynamics of the extracellular and cytoplasmic surface of bacteriorhodopsin in the purple membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1996, 93:10747-52.
- Nagai R, Shirakawa JI, Ohno RI, Moroishi N, Nagai M. Inhibition of AGEs formation by natural products. *Amino Acids*, 2013. [Epub ahead of print]
- Nagai R, Murray DB, Metz TO, Baynes JW. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. *Diabetes*, 2012, 61:549-59.
- Nagai R, Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Araki T, Horiuchi S. Hydroxyl radical mediates N epsilon-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 234:167-72.
- Nagashima T, Oikawa S, Hirayama Y, Tokita Y, Sekikawa A, Ishigaki Y, Yamada R, Miyazawa T. Increase of serum phosphatidylcholine hydroperoxide dependent on glycemic control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2002, 56:19-25.
- Nagle JF, Tristram-Nagle S. Hydrogen Bonded Chain Mechanisms for Proton Conduction and Proton Pumping. *J. Membrane Biol.* 1983, 74:1-14.

- Namiki M, Hayashi T. A New Mechanism of the Maillard Reaction Involving Sugar Fragmentation and Free Radical Formation. ACS Symp. Ser. 1983, 215:21-46.
- Natan A, Zidon Y, Shapira Y, Kronik L. Cooperative effects and dipole formation at semiconductor and self-assembled-monolayer interfaces. Phys. Rev. B. 2006, 73:193310.
- Notman R, Noro MG, Anwar J. Interaction of oleic acid with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers simulated by molecular dynamics. J. Phys. Chem. B. 2007, 111:12748-55.
- Oak JH, Nakagawa K, Miyazawa T. UV analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in foods and biological samples. J. Lipid. Res. 2002, 43:523-9.
- Oak J, Nakagawa K, Miyazawa T. Synthetically prepared Amadori-glycated phosphatidylethanolamine can trigger lipid peroxidation via free radical reactions. FEBS Lett. 2000, 481:26-30.
- Ortega-Castro J, Adrover M, Frau J, Salvà A, Donoso J, Muñoz F. DFT studies on Schiff base formation of vitamin B6 analogues. Reaction between a pyridoxamine-analogue and carbonyl compounds. J. Phys. Chem. A. 2010a, 114:4634-40.
- Ortega-Castro J, Hernández-Haro N, Dove MT, Hernández-Laguna A, Sainz-Díaz CI. Density functional theory and Monte Carlo study of octahedral cation ordering of Al/Fe/Mg cations in dioctahedral 2:1 phyllosilicates. American Mineralogist, 2010b, 95:209-20.
- Ortega-Castro J, Hernández-Haro N, Timón V, Sainz-Díaz CI, Hernández-Laguna A. High-pressure behavior of 2M1 muscovite. American Mineralogist, 2010c, 95:249-59.
- Ortega-Castro J, Hernández-Haro N, Hernández-Laguna A, Sainz-Díaz CI. DFT calculation of crystallographic properties of dioctahedral 2:1 phyllosilicates. Clay Minerals. 2008, 43:351-61.
- Ortega-Castro, J. Investigación mecano-cuántica del orden/desorden catiónico y propiedades elásticas de filosilicatos 2:1 dioctaédricos. Tesis doctoral, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Granada, 2007, pp 24-25.
- Palm D, Simon H. H. Zum mechanismus der Amadori-umlagerung. Z. Naturforsch. 1963, 18:419-77.
- Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. Biochim. Biophys. Acta. 2008, 1777:1249-62.
- Pamplona R, Requena JR, Portero-Otín M, Prat J, Thorpe SR, Bellmunt MJ. Carboxymethylated phosphatidylethanolamine in mitochondrial membranes of mammals--evidence for intracellular lipid glycooxidation. Eur. J. Biochem. 1998, 255:685-9
- Pamplona R, Bellmunt MJ, Portero M, Riba D, Prat J. Chromatographic evidence for Amadori product formation in rat liver aminophospholipids. Life Sci. 1995, 57:873-9.
- Parr RG, Yang W. Density-Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford Univ. Press, New York, 1989.
- Payne MC, Teter MP, Allan DC, Arias TA, Joannopoulos JD. Iterative minimization techniques for ab initio total-energy calculations: molecular dynamics and conjugate gradients. Rev. Mod. Phys. 1992, 64:1045-97.

- Perdew JP, Burke K, Ernzerhof M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* 1996, 77:3865-8.
- Perdew JP, Chevary JA, Vosko SH, Jackson KA, Pederson MR, Singh DJ, Fiolhais C. Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Phys. Rev. B. Condens. Matter*, 1992, 46:6671-87.
- Perrin CL. Are Short, Low-Barrier Hydrogen Bonds Unusually Strong?. *Acc. Chem. Res.* 2010, 43:1550-7.
- Perry AF. Low Barrier Hydrogen Bonds. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier Inc, 2004, pp 594-598.
- Peyroux J, Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol. Biol. (Paris)*. 2006, 54:405-19.
- Phelps G, Chapman I, Hall P, Braund W, Mackinnon M. Prevalence of genetic haemochromatosis among diabetic patients. *Lancet*, 1989, 2:233-4.
- Piacenza M, D'Agostino S, Fabiano E, Della Sala F. Ab initio depolarization in self-assembled molecular monolayers: Beyond conventional density-functional theory. *Phys. Rev. B.* 2009, 80:153101.
- Picard S, Parthasarathy S, Fruebis J, Witztum JL. Aminoguanidine inhibits oxidative modification of low density lipoprotein protein and the subsequent increase in uptake by macrophage scavenger receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1992, 89:6876-80.
- Pogodin S, Baulin VA. Coarse-grained models of phospholipid membranes within the single chain mean field theory. *Soft Matter*, 2010, 6:2216-26.
- Prakash P, Sankararamakrishnan R. Force field dependence of phospholipid headgroup and acyl chain properties: comparative molecular dynamics simulations of DMPC bilayers. *J. Comput. Chem.* 2010, 31:266-77.
- Praprotnik M, Matysiak S, Delle Site L, Kremer K, Clementi C. Adaptive resolution simulation of liquid water. *J. Phys. Condens. Matter*, 2007, 19:2201.
- Prats M, Tocanne JF, Teissie J. Lateral proton conduction at a lipid/water interface. Effect of lipid nature and ionic content of the aqueous phase. *Eur. J. Biochem.* 1987, 162:379-85.
- Rahbar S, Figarola JL. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003, 419:63-79.
- Rahbar S, Figarola JL. Inhibitors and Breakers of Advanced Glycation Endproducts (AGEs): A Review. *Immunol. Endocr. Metabol. Agents Med. Chem.* 2002, 2:135-61.
- Rahbar S, Yerneni KK, Scott S, Gonzales N, Lalezari I. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts (part II). *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 2000, 3:360-6.
- Rahbar S, Kumar Yerneni K, Scott S, Gonzales N, Lalezari I. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 262:651-6.
- Ralph EK, Lange Y, Redfield AG. Kinetics of proton exchange of phosphatidylethanolamine in phospholipid vesicles. *Biophys. J.* 1985, 48:1053-7.
- Ravandi A, Kuksis A, Marai L, Myher JJ, Steiner G, Lewis G, Kamido H. Isolation and identification of glycated aminophospholipids from red cells and plasma of diabetic blood. *FEBS Lett.* 1996, 381:77-81.

- Reddy VP, Beyaz A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug. Discov. Today*. 2006, 11:646-54.
- Reddy VP, Obrenovich ME, Atwood CS, Perry G, Smith MA. Involvement of Maillard reactions in Alzheimer disease. *Neurotox. Res*. 2002, 4:191-209.
- Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry*, 1995, 34:10872-8.
- Reid E, Fortenbaugh R. 1,2-Diketones from 1, 3-Dibromoketones. Contribution III to the Oxidation of Tetrionic Acids. *J. Organ. Chem*. 1951, 16:1566-71.
- Requena JR, Ahmed MU, Fountain CW, Degenhardt TP, Reddy S, Perez C, Lyons TJ, Jenkins AJ, Baynes JW, Thorpe SR. Carboxymethylethanolamine, a biomarker of phospholipid modification during the maillard reaction *in vivo*. *J. Biol. Chem*. 1997, 272:17473-9.
- Riccardi D, König P, Prat-Resina X, Yu H, Elstner M, Frauenheim T, Cui Q. "Proton holes" in long-range proton transfer reactions in solution and enzymes: A theoretical analysis. *J. Am. Chem. Soc*. 2006, 128:16302-11.
- Riesle J, Oesterhelt D, Dencher NA, Heberle J. D38 is an essential part of the proton translocation pathway in bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 1996, 35:6635-43.
- Róg T, Murzyn K, Gurbiel R, Takaoka Y, Kusumi A, Pasenkiewicz-Gierula M. Effects of phospholipid unsaturation on the bilayer nonpolar region: a molecular simulation study. *J. Lipid Res*. 2004, 45:326-36.
- Róg T, Murzyn K, Pasenkiewicz-Gierula M. Molecular dynamics simulations of charged and neutral lipid bilayers: treatment of electrostatic interactions. *Acta Biochim. Pol*. 2003, 50:789-98.
- Rosen L, Woods JW, Pigman W. Amadori-Umlagerung in Pyridin. *Chem. Ber*. 1957, 90:1038.
- Rosenberg S, Silver SM, Sayer JM, Jencks WP. Evidence for two concurrent mechanisms and a kinetically significant proton transfer process in acid-catalyzed O-methyloxime formation. *J. Am. Chem. Soc*. 1974, 96:7986-98.
- Rossi JP. La combinación de los azúcares con las biomoléculas o como alimentarse en forma saludable. Artículos de discusión, Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, 2005, 16 pp.
- Salvà A, Donoso J, Frau J, Muñoz F. DFT Studies on Schiff Base Formation of Vitamin B6 Analogues. *J. Phys. Chem. A*. 2003, 107:9409-14.
- Salvà A, Donoso J, Frau J, Muñoz F. Theoretical studies on transamination of vitamin b6 analogues. *Int. J. Quant. Chem*. 2002, 89:48-56.
- Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. Reactions of aminoguanidine with  $\alpha$ -dicarbonyl compounds studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. J. Mass. Spectrom. (Chichester, Eng)*. 2012, 18:385-97.
- Schalkwijk CG, Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids*, 2012, 42:1193-204.

- Schmaderer C, Xing CJ, Anderson G, Hermans R, Lutz J, Heemann U, Baumann M. AGE formation blockade with aminoguanidine does not ameliorate chronic allograft nephropathy. *Life Sci.* 2011, 89:349-54.
- Scott HL Jr. A theoretical model for lipid monolayer phase transitions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975, 406:329-46.
- Sell DR, Biemel KM, Reihl O, Lederer MO, Strauch CM, Monnier VM. Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix. Relationship with diabetes. *J. Biol. Chem.* 2005, 280:12310-5.
- Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2010, 65:963-75.
- Shaik SS, Schlegel HB, Wolfe S. *Theoretical aspects of physical organic chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1992.
- Shipar MAH. Computational studies on glyceraldehyde and glycine Maillard reaction. *J. Mol. Struc-Theochem.* 2004, 710:45–50.
- Shoji N, Nakagawa K, Asai A, Fujita I, Hashiura A, Nakajima Y, Oikawa S, Miyazawa T. LC-MS/MS analysis of carboxymethylated and carboxyethylated phosphatidylethanolamines in human erythrocytes and blood plasma. *J. Lipid Res.* 2010, 51:2445-53.
- Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 1972, 175:720-31.
- Siu SW, Vácha R, Jungwirth P, Böckmann RA. Biomolecular simulations of membranes: physical properties from different force fields. *J. Chem. Phys.* 2008, 128:125103.
- Snyder JA, Madura JD. Interaction of the phospholipid head group with representative quartz and aluminosilicate structures: an ab initio study. *J. Phys. Chem. B.* 2008, 112:7095-103.
- Solana F. Estudio de la estructura y reactividad de superficies y nanopartículas de carburos de metales de transición. Tesis Doctoral Química teórica y computacional, Universitat de Barcelona, 2008, pp 36-45.
- Stepniak J, Lewiński A, Karbownik-Lewińska M. Membrane lipids and nuclear DNA are differently susceptible to Fenton reaction substrates in porcine thyroid. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27:71-8.
- Sugimori K, Kawabe H, Nagao H, Nishikawa K. Ab initio and DFT study of <sup>31</sup>P-NMR chemical shifts of sphingomyelin and dihydrosphingomyelin lipid molecule. *Int. J. Quant. Chem.* 2009, 109:3685-93.
- Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R. Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes*, 2007, 56:1825-33.
- Suits F, Pitman MC, Feller SE. Molecular dynamics investigation of the structural properties of phosphatidylethanolamine lipid bilayers. *J. Chem. Phys.* 2005, 122:244714.
- Sum AK, Faller R, de Pablo JJ. Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides. *Biophys. J.* 2003, 85:2830-44.

- Svelle S, Tuma C, Rozanska X, Kerber T, Sanes J. Quantum Chemical Modeling of Zeolite-Catalyzed Methylation Reactions: Toward Chemical Accuracy for Barriers. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131:816-25.
- Tébar FJ, Escobar F. *La diabetes mellitus en la práctica clínica*. Madrid: Panamericana; 2009.
- Teissié J, Prats M, Soucaille P, Tocanne JF. Evidence for conduction of protons along the interface between water and a polar lipid monolayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1985, 82:3217-21.
- Tejero I, Gonzalez-Lafont A, Lluch JM, Eriksson LA. Photo-oxidation of lipids by singlet oxygen: a theoretical study. *Chem. Phys. Lett.* 2004, 398:336-42.
- Thomas MC, Baynes JW, Thorpe SR, Cooper ME. The role of AGEs and AGE inhibitors in diabetic cardiovascular disease. *Curr. Drug Targets.* 2005, 6:453-74.
- Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003, 419:31-40.
- Thornalley PJ, Yurek-George A, Argirov OK. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the alpha-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 2000, 60:55-65.
- Tidwell TT. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff bases, and a century of beta-lactam synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008, 47:1016-20.
- Tobias DJ. Electrostatics calculations: recent methodological advances and applications to membranes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001, 11:253-61.
- Tomasi J, Persico M. Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent. *Chem.Rev.* 1994, 94:2027-94.
- Tsai CJ, Jordan KD. Use of an Eigenmode Method to Locate the Stationary Points on the Potential Energy Surfaces of Selected Argon and Water Clusters. *J. Phys. Chem.* 1993, 97:11227-37.
- Utzmann CM, Lederer MO. Independent synthesis of aminophospholipid-linked maillard products. *Carbohydr. Res.* 2000, 325:157-68.
- Vaiss VS, Berg RA, Ferreira AR, Borges Jr I, Leitao AA. Theoretical Study of the Reaction between HF Molecules and Hydroxyl Layers of Mg(OH)<sub>2</sub>. *J. Phys. Chem. A.* 2009, 113:6494-9.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2008, 9:112-24.
- Vasan S, Zhang X, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, Wagle D, Shih D, Terlecky I, Bucala R, Cerami A, Egan J, Ulrich P. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. *Nature*, 1996, 382:275-8.
- Vázquez MA, Donoso J, Muñoz F, García Blanco F, Garcia del Vado MA, Echevarría G. Formation of Schiff bases of 5'-deoxyripyridoxal and hexylamine in aqueous and non-aqueous media. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1991a, 1143-7
- Vazquez MA, Muñoz F, Donoso J, García Blanco F. Band-shape analysis and resolution of electronic spectra of pyridoxal 5'-phosphate with amino acids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1991b, 275-81

- Vázquez MA, Muñoz F, Donoso J, García Blanco F. Influence of the side chain on the stability of Schiff bases formed between pyridoxal 5'phosphate and amino acids. *Int. J. Chem. Kin.* 1990a, 22:905-14
- Vázquez MA, Muñoz F, Donoso J, García Blanco F, Garcia del Vado MA, Echevarría G. Schiff bases of 5'-deoxypyridoxal with n-hexylamine in water-dioxane mixtures: influence of polarity of the medium on the catalysis of formation. *J. Mol. Catal.* 1990b, 59:137-45
- Vazquez MA, Donoso J, Munoz F. Kinetic and Thermodynamic Parameters for Schiff-Base Formation between 5'-Deoxypyridoxal and Hexylamine, *Helv. Chim Acta*, 1990c, 73:1991-8
- Vázquez MA, Echevarría G, Muñoz F, Donoso J, García Blanco F. Kinetic study of the Schiff-base formation between glycine and pyridoxal 5'-phosphate (PLP), pyridoxal (PL) and 5'deoxypyridoxal (DPL). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1989, 1617-22.
- Vener MV, Rozanska X, Sauer J. Protonation of water clusters in the cavities of acidic zeolites: (H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-H-chabazite, n = 1–4. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009, 11:1702-12.
- Vogel V, Möbius D. Hydrated polar groups in lipid monolayers: Effective local dipole moments and dielectric properties, *Thin Solid Films*, 1988a, 159:73–81.
- Vosko SH, Wilk L, Nusair M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Can. J. Phys.* 1980, 58:1200–11.
- Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell Mol. Life Sci.* 2005, 62:1671-81.
- Wachtel E, Bach D, Epanand RF, Tishbee A, Epanand RM. A product of ozonolysis of cholesterol alters the biophysical properties of phosphatidylethanolamine membranes. *Biochemistry*, 2006, 45:1345-51.
- Warshel A, Papazyan A. Energy considerations show that low-barrier hydrogen bonds do not offer a catalytic advantage over ordinary hydrogen bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1996, 93:13665-70.
- Webster J, Urban C, Berbaum K, Loske C, Alpar A, Gärtner U, de Arriba SG, Arendt T, Münch G. The carbonyl scavengers aminoguanidine and tenilsetam protect against the neurotoxic effects of methylglyoxal. *Neurotox. Res.* 2005, 7:95-101.
- Wells-Knecht MC, Thorpe SR, Baynes JW. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry*, 1995, 34:15134-41.
- Weygand F. Über N-Glykoside, II. *Mitteil.: Amadori-Umlagerungen.* *Chem. Ber.* 1940; 73:1259–78.
- Wolffenbuttel BH, Boulanger CM, Crijns FR, Huijberts MS, Poitevin P, Swennen GN, Vasan S, Egan JJ, Ulrich P, Cerami A, Lévy BI. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998, 95:4630-4.
- Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem. J.* 1987, 245:243-50.
- Wrodnigg TM, Kartusch C, Illaszewicz C. The Amadori rearrangement as key reaction for the synthesis of neoglycoconjugates. *Carbohydr. Res.* 2008, 343:2057-66.



Wrodnigg TM, Eder B. The Amadori and Heyns Rearrangements: Landmarks in the History of Carbohydrate Chemistry or Unrecognized Synthetic Opportunities? *T. Curr. Chem.* 2001, 215:115-52.

Wu B, Ye Q, Li Y, Li C, Yu X, Zhou S, Wang X. *In vivo* replacement of phosphatidylethanolamine by phosphatidylcholine affects biological function of *E. coli*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2010, 50:1494-502.

Yoshimoto M, Miyazaki Y, Umemoto A, Walde P, Kuboi R, Nakao K. Phosphatidylcholine vesicle-mediated decomposition of hydrogen peroxide. *Langmuir*, 2007, 23:9416-22.

Youdim MB, Grünblatt E, Mandel S. The pivotal role of iron in NF-kappa B activation and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. Prospects for neuroprotection in Parkinson's disease with iron chelators. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999, 890:7-25.

Zhang Y, Wang X, Xiang Z, Li H, Qiu J, Sun Q, Wan T, Li N, Cao X, Wang J. Promotion of cellular migration and apoptosis resistance by a mouse eye-specific phosphatidylethanolamine-binding protein. *Int. J. Mol. Med.* 2007, 19:55-63.