



**Universitat**  
de les Illes Balears

# Estudio computacional mediante la teoría del funcional de la densidad de la capacidad de inhibición de productos de glicación avanzada de la piridoxamina

Antonia Cerrillo Moranta

## Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química  
de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

2015-2016

*Septiembre 2016*

*Tutor: Juan Frau Munar*

*Autor: Antonia Cerrillo Moranta*



La piridoxamina es uno de los vitámeros naturales de la vitamina B<sub>6</sub> capaz de inhibir la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) cuya acumulación está relacionada en la patogénesis de varias enfermedades como cataratas, aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas, como el alzhéimer y el párkinson. La posibilidad de tener estas enfermedades se incrementa si se padece diabetes mellitus. Existen diferentes vías de inhibición de la formación de AGEs, pero no se conoce con detalle la predominancia de estas vías en la piridoxamina. Una de estas vías es la eliminación de las especies radicalarias de oxígeno (ROS), que además incrementan el daño causado por los AGEs, y que en el caso de la piridoxamina se ha asociado con la reacción del radical con el hidrógeno del grupo fenólico.

El presente trabajo tiene como objetivo principal determinar computacionalmente mediante la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) la capacidad antioxidante de la piridoxamina en su forma mayoritaria a pH fisiológico, que presenta el grupo fenólico desprotonado, y analizar su relación con la capacidad de inhibición de los productos de glicación avanzada.

Se ha estudiado y analizado cuáles son las posiciones más reactivas de la piridoxamina, en dos disolventes de diferente polaridad (agua y etanoato de pentilo) frente a una serie de radicales libres, el metoxilo ( $\cdot\text{OCH}_3$ ) y el hidroperoxilo ( $\cdot\text{OOH}$ ). Para ello, se han caracterizado diferentes mecanismos de reacción asociados a la abstracción de hidrógenos de la piridoxamina (HAT), la formación de aductos piridoxamina-radical (RAF), la transferencia de un electrón (SET) y reacciones secuenciales protón – electrón (SPET y SEPT).

La metodología seguida ha consistido en determinar si los procesos anteriores son favorables termodinámicamente y en aquellas posiciones exergónicas calcular el estado de transición y la barrera energética con el objetivo de determinar el mecanismo cinético de actuación prioritario y, por tanto, las posiciones de la piridoxamina más efectivas para eliminar el radical del medio.

Los resultados obtenidos muestran que la capacidad inhibidora de la piridoxamina en su forma mayoritaria a pH fisiológico se debe, en ambos radicales, fundamentalmente a reacciones de formación de aductos. Las barreras energéticas son similares, e incluso algo menores, a las de la forma neutra de la piridoxamina, demostrando que la capacidad antioxidante de la piridoxamina no depende exclusivamente de su grupo fenólico.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Glicación no enzimática de las proteínas o glicación proteica.....	2
1.1.1. Mecanismo general de la glicación proteica .....	2
1.1.2. Especies reactivas .....	6
1.1.3. Productos de glicación avanzada (AGEs) .....	7
1.2. Patologías asociadas a la presencia de los AGEs .....	9
1.3. Inhibición de los AGEs.....	10
1.3.1. Reacción con compuestos carbonílicos altamente reactivos (RCS) .....	10
1.3.2. Reacción con especies reactivas de oxígeno (ROS). .....	12
1.3.3. Complejación de los metales de transición. ....	12
1.4. Piridoxamina como inhibidor .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	19
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	20
4.1. Reacción de la piridoxamina con el radical hidropéroxilo, $\cdot\text{OOH}$ . .....	23
4.2. Reacción de la piridoxamina con el radical metóxilo, $\cdot\text{OCH}_3$ .....	29
4.3. Efecto del disolvente.....	35
4.4. Discusión general de resultados.....	36
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	40
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	41



## 1. INTRODUCCIÓN

La glicación no enzimática de proteínas o reacción de Maillard es una reacción asociada a proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. La reacción se inicia con la condensación del grupo carbonilo de los azúcares reductores y el grupo amino libre de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, seguido del reordenamiento de Amadori. A continuación se llevan a cabo reacciones de deshidratación, oxidaciones y reordenamientos que conducen a la formación de productos finales de glicación avanzada o AGEs (*Advanced Glycation End products*).

La reacción de Maillard es ampliamente utilizada en la industria de alimentos para controlar la textura de los alimentos, sin embargo, actualmente se conoce que está involucrada en la patogénesis de varias enfermedades como cataratas, aterosclerosis, y enfermedades neurodegenerativas como el alzhéimer y el párkinson [Reddy, 2006], [Sayre, 2001] y [Forbes, 2004].

La diabetes mellitus es un desorden metabólico caracterizado por el aumento patológico de los niveles de glucosa en sangre, condición que recibe el nombre de hiperglucemia. La hiperglucemia tiene su origen en una deficiencia en la función de la insulina, hormona que regula la entrada del azúcar en células como los adipocitos o las células musculares, principales consumidoras de la glucosa en el organismo [Brownlee, 1988].

A pesar de la evidencia y el conocimiento del desarrollo de múltiples complicaciones asociadas a la diabetes, tales como la retinopatía, neuropatía, nefropatía diabética y enfermedades cardiovasculares, el conocimiento de los mecanismos subyacentes que contribuyen a la patología vascular diabética es limitado. Aunque un número de factores hemodinámicos y metabólicos influyen en la diabetes, una vía fundamental parece ser la formación y acumulación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs). El incremento de hiperglucemia, dislipidemia y el estrés oxidativo en los enfermos diabéticos dan lugar a la producción y acumulación de AGEs en el riñón, la retina, etc. [Brownlee, 2001], [Thomas, 2005] y [Forbes, 2004].

## **1.1. Glicación no enzimática de las proteínas o glicación proteica**

La glicación no enzimática de proteínas o glicación proteica es un proceso que ocurre en condiciones fisiológicas in vivo, y que afecta a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Desde principios del siglo XX hasta los años setenta, la glicación no enzimática de proteínas estaba ligada únicamente a la industria alimentaria.

La glicación no enzimática fue descrita por primera vez por Ling y Malting en 1908 [Ling y Malting 1908], como la responsable del cambio de color de los alimentos al cocinarlos. En 1912, Maillard apoyó esta hipótesis estudiando la reacción de distintos aminoácidos con la glucosa [Maillard, 1912].

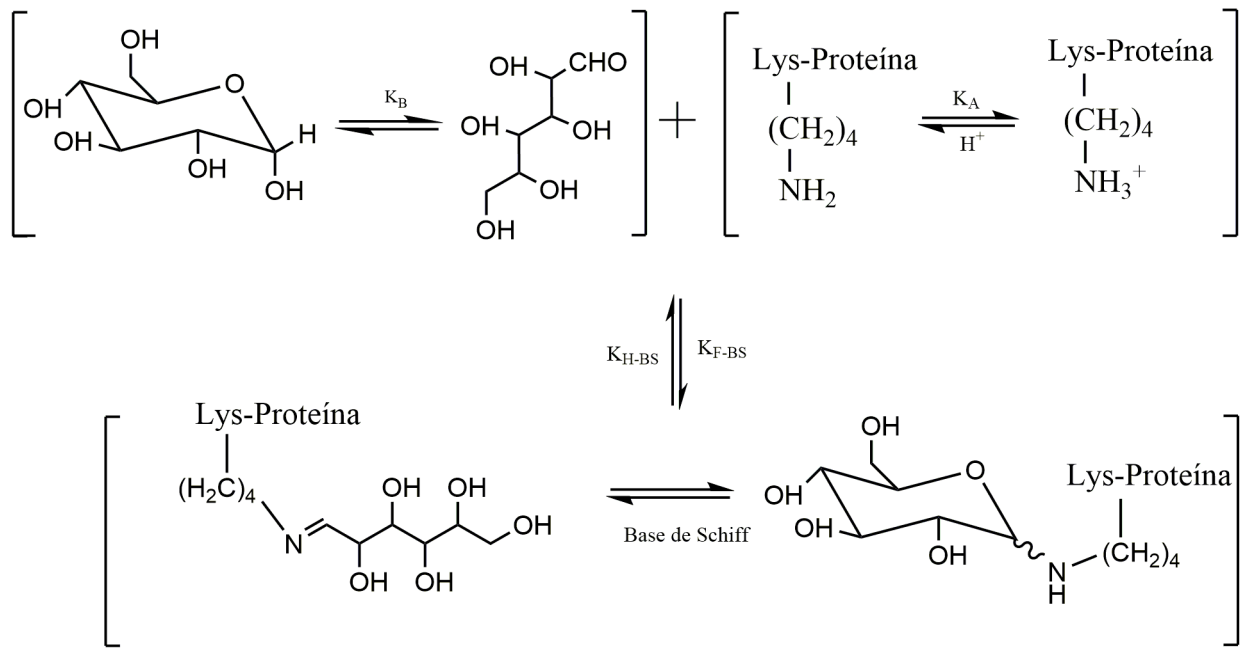
Posteriormente, en 1929, Amadori [Amadori, 1929] demostró que la incubación de la glucosa con aminas aromáticas producía un compuesto con una gran estabilidad nombrado como producto de Amadori (AP) por Kuhn y Weygand [Kuhn y Weygand, 1937] que se correspondía con la 1-amino-1-desoxi-2-cetosa.

Hodge describió en 1953 [Hodge, 1953] los pasos de la glicación no enzimática de proteínas o reacción de Maillard indicando que se inicia mediante la formación de una base de Schiff, cuya evolución genera el producto de Amadori (AP), el cual se degrada dando lugar a los productos finales de la reacción de Maillard.

Rahbar descubrió una variación inusual de la hemoglobina [Rahbar, 1968], conocida actualmente como la hemoglobina glicada (HbA1c), en la sangre de los individuos sanos y un aumento en su proporción en personas diabéticas. Koenig [Koenig, 1975] estudiando la reacción de Maillard in vivo demostró que la HbA1c era debido a la presencia de AP en los residuos lisínicos de la hemoglobina.

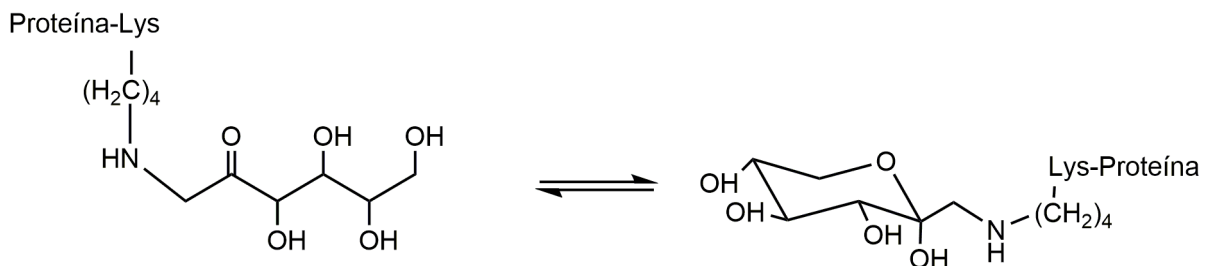
### **1.1.1. Mecanismo general de la glicación proteica**

La reacción de glicación proteica se inicia con un ataque nucleófilo del grupo  $\epsilon$ -amino de una lisina o el grupo N-terminal de la cadena polipeptídica sobre el grupo aldehído libre de la glucosa en la forma lineal, dando lugar a la formación de una base de Schiff reversible (imina) como puede verse en la figura 1.1. Se trata de una reacción que ocurre rápidamente, alcanzándose el equilibrio en unas horas [Brownlee, 1995] y [Nimbalkar, 2012].



**Figura 1.1.** Formación de la base de Schiff mediante la reacción de la forma lineal de la glucosa con la cadena lateral de un residuo de lisina. También se puede observar el equilibrio entre las formas cíclicas y lineal de la glucosa y de la base de Schiff formada [Lee, 1992].

Formada la base de Schiff, el grupo hidroxilo que se halla en el carbono adyacente a la imina posibilita el llamado reordenamiento de Amadori. Se trata de una reacción reversible pero no es tan rápida como la formación de la base de Schiff. La base de Schiff y el producto de Amadori reciben el nombre de productos de glicación temprana (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Formación del producto de Amadori (AP). El AP está en equilibrio con las distintas formas cíclicas furanosas y piranosas.



Los precursores de la glicación proteica, las bases de Schiff y los productos de Amadori pueden experimentar reacciones de oxidación, deshidratación y fragmentación, en ocasiones catalizadas por metales, produciendo diferentes compuestos carbonílicos y dicarbonílicos (RCS) y compuestos reactivos de oxígeno (ROS). Estos compuestos reaccionan también con los grupos amino de proteínas actuando como propagadores de la reacción.

Los productos de glicación temprana obtenidos por reacción con la glucosa o con los RCS y ROS pueden evolucionar hacia una tercera etapa. Así, por ejemplo, el producto de Amadori al contener aún un grupo carbonilo, puede evolucionar mediante un conjunto de reacciones que incluyen condensaciones y fragmentaciones oxidativas. Esta serie de reacciones dan como producto la generación de una familia heterogénea de compuestos conocidos como Productos de Glicación Avanzada (AGEs) [Brownlee, 1995]. Estos procesos son lentos e irreversibles a diferencia de las reacciones descritas anteriormente.

En la Figura 1.3 se representan todos los procesos descritos anteriormente.

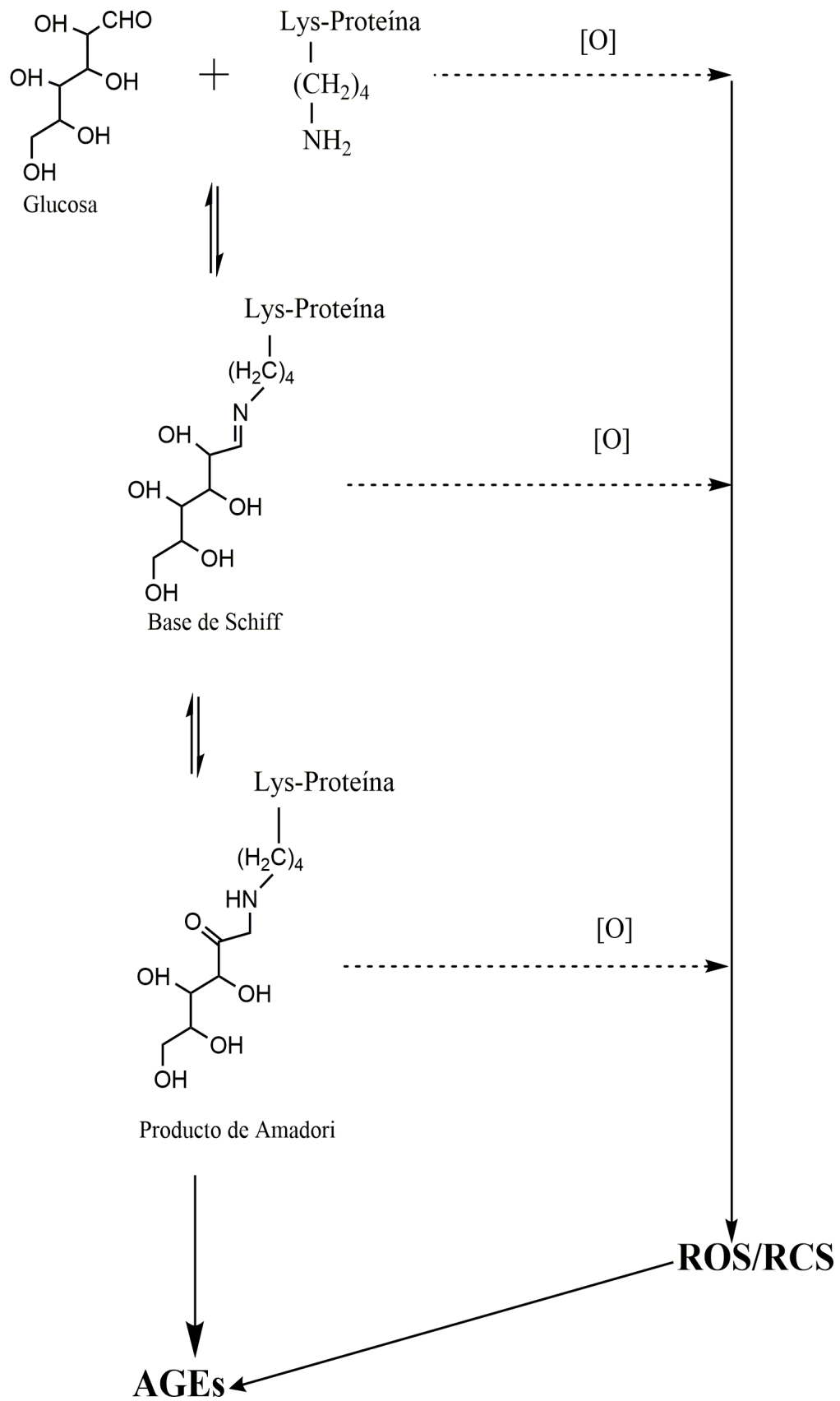


Figura 1.3. Esquema general de la glicación proteica.

### 1.1.2. Especies reactivas

El mayor impacto patológico asociado a la glicación proteica se debe esencialmente a las reacciones colaterales de oxidación que se producen en el transcurso de la misma, generando compuestos reactivos de oxígeno (ROS) y compuestos carbonílicos altamente reactivos (RCS). Mientras la glucosa solo reacciona con los grupos N-terminal de las proteínas o los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina, tanto los ROS como RCS son capaces de atacar a las cadenas laterales de un gran número de amino ácidos como arginina y cisteína contribuyendo a la formación de nuevos AGEs e incrementando el daño estructural de la glicación proteica [Ledl, 1990], [Brinkmann, 1998], [Ulrich y Cerami, 2001], [Rahbar, 2002] y [Monnier, 2003].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) abarcan una amplia variedad de especies químicas incluyendo el radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ), el radical anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) y su forma no radicalaria, el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el radical alcóxido ( $\text{RO}\cdot$ ), el radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ).

Los ROS se generan constantemente como parte del metabolismo mitocondrial aeróbico y tienen un papel necesario en diversas reacciones bioquímicas. Sin embargo, cuando estas especies se producen en exceso en las células como consecuencia de los desórdenes metabólicos patológicos, generan estrés oxidativo, dañando algunas macromoléculas tales como proteínas, unido al desarrollo de diferentes complicaciones patológicas asociadas a la diabetes mellitus [Spiteller, 2006]. Algunos autores [West, 2000] y [Pennathur y Heinecke, 2004] han demostrado que en los pacientes diabéticos se debilitan las defensas antioxidantes del organismo y son más propensos al daño producido por los ROS.

Los compuestos carbonílicos altamente reactivos (RCS) incluyen reactivos de diferente naturaleza y de acuerdo con su estructura se suelen agrupar en tres grupos, 1)  $\alpha$ ,  $\beta$  -aldehídos insaturados como el 4-hidroxi-trans-2nonenal, 2) cetoaldehídos como el metilglioxal (MGO) y 3) dialdehídos tales como el glioxal (GO) y el malondialdehído (MDA) [Vistoli, 2013].

Hunt y colaboradores determinaron, en 1988, que la degradación de la glucosa mediante reacciones de oxidación, daba lugar a la desoxiglucosona (1-DG) y a algunas especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo [Hunt, 1988]. En 1999, Thornalley et al. determinaron que por diversas vías la glucosa también podía

producir los compuestos carbonílicos glioxal (GO), metilglioxal (MGO) y glicolaldehído (GLA) en condiciones fisiológicas. La reoxidación del GLA produce nuevamente GO y ROS como el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo [Thornalley, 1999]. Además, estos mismos autores demostraron que la degradación de la base de Schiff puede generar GO, MGO y 3-desoxiglucosona (3-DG) [Thornalley, 1999].

Por su parte, la degradación del compuesto de Amadori conduce a la formación de 3-desoxiglucosona (3-DG), que puede evolucionar para producir metilglioxal (MGO), hidroximetilfurfural (HMF) o desoxiglucosona (1-DG) y también puede dar lugar por reacciones retroaldólicas, nuevamente a MGO y gliceraldehído [Yaylayan y Huyghues-Despointes, 1994].

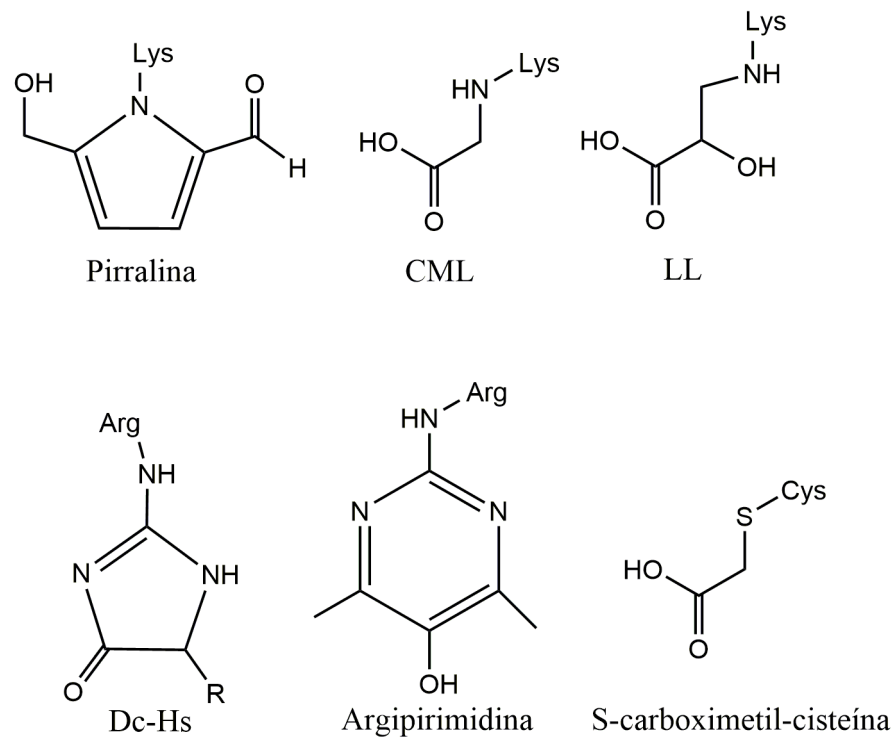
### **1.1.3. Productos de glicación avanzada (AGEs)**

Los AGEs son un amplio y heterogéneo grupo de compuestos que se caracterizan por su elevada estabilidad. Desde el descubrimiento del primer producto de la glicación proteica, la glicación de la hemoglobina en enfermos diabéticos, muchos otros AGEs han sido detectados. Algunos de ellos presentan propiedades fluorescentes, simplificando su identificación *in situ* o *in vivo* [Ahmed, 2005].

Los AGEs se pueden clasificar en dos tipos: no entrecruzados y entrecruzados. Los AGEs no entrecruzados se forman debido a la acción de la glucosa o un RCS sobre la cadena lateral de un residuo proteico, como lisinas, argininas o cisteínas. Se pueden observar algunos ejemplos en la Figura 1.4. El primer AGE aislado de este tipo fue la pirralina en 1980 por Nakayama et al. [Nakayama, 1980]. Posteriormente en 1986 Ahmed et al. aislaron también la N $\epsilon$ -carboximetil-lisina (CML), que es el AGE más frecuente *in vivo* [Ahmed, 1986] y [Reddy, 1995]. Además se trata del principal AGE formado sobre los extremos N-terminales proteicos [Cai, 1999]. También significativo es el ácido-láctico-3-lisina (LL) que se forma en lugar de la CML, a pH ligeramente ácido [Ahmed, 1988].

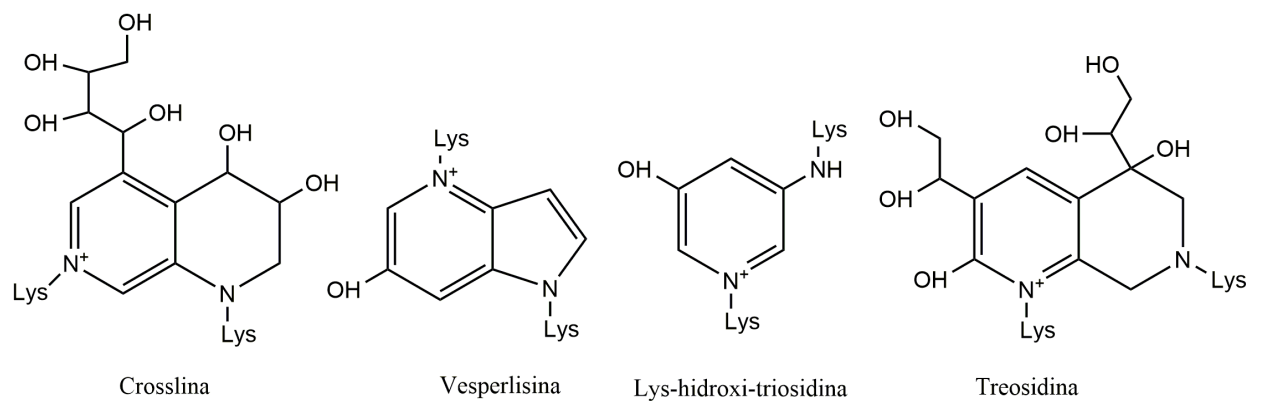
También se producen AGEs no entrecruzados por reacción sobre los grupos guanidinio de la arginina, como las imidazolininas (DC-Hs) [Thornalley, 2005] o la argipirimidina [Shipanova, 1997].

Los grupos tioles de la cisteína representan otro residuo diana en la acción de RCS tales como la S-carboximetil-cisteína (CMC) [Zeng y Davies, 2005].



**Figura 1.4.** AGEs no entrecruzados unidos a residuos lisina, arginina o cisteína.

Los AGEs entrecruzados se forman como resultado de la reacción de un segundo grupo nucleófilo proteico con un producto de Amadori. La gran diversidad de RCS y de cadenas laterales proteicas hace que exista un gran número de AGEs entrecruzados. En la Figura 1.5 se pueden observar algunos de ellos formados debido a la presencia de un segundo grupo lisina tales como la crosslina [Aoki, 2000], la vespelisina [Nakamura, 1997], la treosidina [Prabhakaram, 1997] y la Lys-hidroxi-triosidina [Tessier, 2003].



**Figura 1.5.** AGEs entrecruzados derivados de la lisina.

## 1.2. Patologías asociadas a la presencia de los AGEs

El gran interés científico por los productos finales de glicación avanzada es debido al reciente descubrimiento de estos compuestos en un gran número de trastornos degenerativos tales como patologías cardiovasculares, neurodegenerativas, o en enfermedades óseas [Schleicher, 1997] y [Shuvaev, 2001].

Varios mecanismos han sido descritos por el que los AGEs pueden causar daños [Delgado-Andrade, 2014]:

1. Modificaciones de las funciones de la proteína debido a alteraciones en su estructura y/o conformación.
2. Cambios en el tejido debido a entrecruzamientos inter e intramoleculares.
3. Promueven la formación de radicales libres.

La asociación entre la diabetes y los AGEs parece deberse a que la hiperglucemia aumenta el proceso de glicación. La hiperglucemia se ha relacionado con un aceleramiento del daño vascular asociado a la diabetes, que puede en algunos casos inducir otras complicaciones tales como la retinopatía, neuropatía, nefropatía y la enfermedad macrovascular [Paul, 1999] y [Friedman, 1999]. Aunque los mecanismos que conducen a estas complicaciones no han sido completamente determinados, una de las vías propuestas es la formación de los AGEs. La hiperglucemia incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno conduciendo a un estado de estrés oxidativo [Ceriello, 1999]. Según un estudio de Thomas y colaboradores los niveles elevados de CML están asociados con la presencia de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes [Thomas, 2005].

La implicación de los AGEs en las enfermedades cardiovasculares parece estar relacionada con el aumento de entrecruzamientos con el colágeno en los vasos sanguíneos debido a la glicación de aminoácidos libres [Luevano-Contreras y Chapman-Novakofski, 2010].

Además, el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas tales como alzhéimer y párkinson, también parecen estar relacionadas con la formación de AGEs. Estas enfermedades están caracterizadas por una progresiva pérdida de tejido nervioso y neuronas y la deposición de agregados proteicos en el cerebro [Li, 2012]. En un estudio con pacientes que presentaban

alzhéimer se encontraron niveles elevados de metilglioxal y glioxal en los fluidos cerebrospinales en comparación con humanos sanos [Kuhla, 2005].

Otro grupo importante de desórdenes en donde los AGEs juegan un papel importante es en los cartílagos y las patologías de los huesos. Diversos estudios sugieren que los AGEs afectan a la calidad de los huesos a través de la alteración ósea, contribuyendo al desarrollo de la osteoporosis [Hein, 2006] y [Delgado-Andrade, 2012].

### **1.3. Inhibición de los AGEs**

Dadas las implicaciones patológicas de la glicación proteica debido a la formación de AGEs y de los productos secundarios que se producen durante las mismas, es necesario encontrar inhibidores efectivos de los productos mencionados.

Debido a la heterogeneidad de los AGEs, se han utilizado muchas estrategias para inhibir sus efectos. La inhibición se presenta como una terapia para evitar o atenuar las complicaciones de la diabetes y otras patologías asociadas al envejecimiento (osteoporosis, osteoartritis, neuropatías) y a las enfermedades neurodegenerativas (alzhéimer y párkinson).

Como se ha comentado anteriormente, el mecanismo general de la glicación proteica se inicia por la reacción de la glucosa con las cadenas laterales de la lisina, y lleva a la formación de AGEs. Otras reacciones secundarias producen compuestos carbonílicos altamente reactivos, RCS y especies reactivas de oxígeno, ROS, durante la glicación proteica, que propagan el daño iniciado por la glucosa y aumenta el número y el tipo de AGEs producidos. Los principales mecanismos de inhibición de la formación de AGEs van encaminados a evitar estas reacciones y se detallan a continuación. En la Figura 1.6 se ilustra un esquema general de los mecanismos de inhibición.

#### **1.3.1. Reacción con compuestos carbonílicos altamente reactivos (RCS)**

Las reacciones colaterales durante la glicación proteica conducen a la producción de compuestos carbonílicos altamente reactivos. Algunas especies carbonílicas como el glioxal (GO), el metilglioxal (MGO) o el glicaldehído (GLA) derivan de la autoxidación de la glucosa, de las bases de Schiff o de los productos de Amadori. Tal y como se ha comentado

anteriormente, la acumulación de estas especies es perjudicial para las cadenas laterales de la proteína y están relacionados con muchas patologías, por tanto su inhibición es crucial para paliar sus efectos nocivos.

Una estrategia posible consiste en evitar el avance de la reacción una vez formada la base de Schiff. Esto requiere el bloqueo de los compuestos carbonílicos altamente reactivos que se formaron durante las primeras etapas de la glicación. En este sentido se han ensayado derivados de la hidracina, que tienen mayor reactividad que los grupos amino frente a los compuestos carbonílicos. El primer inhibidor derivado de la hidracina fue la aminoguanidina y ha sido uno de los compuestos más estudiados de este tipo de inhibidores [Thornalley, 2003]. La aminoguanidina inhibe *in vitro* la formación de productos de glucosilación avanzada en el colágeno, y su administración a ratas diabéticas inhibe la acumulación de productos de glucosilación avanzada y el entrecruzamiento en el tejido conectivo de la pared arterial [Brownlee, 1988]. Más adelante se describieron nuevas moléculas capaces de bloquear la conversión de los productos de Amadori en AGEs, entre las cuales se encuentran las denominadas genéricamente amadorinas tales como la piridoxamina y la piridoxina [Khalifah, 1999].

Nuestro grupo de investigación ha estudiado desde el punto de vista teórico la reactividad de la piridoxamina frente a diferentes grupos carbonilos como acetaldehído, glicolaldehído, glioxal y metilglioxal [Ortega-Castro, 2010]. También ha sido estudiada desde el punto de vista experimental con productos de Amadori [Adrover, 2008], aldehídos, cetonas y  $\alpha$ -oxoaldehídos [Adrover, 2009].

Actualmente, un estudio realizado por Colzani y colaboradores ha determinado la capacidad de inhibición de aminoguanidina, hidralazina, piridoxamina y carnosina en función de diferentes RCS, 4-hidroxi-trans-2-nonenal, metilglioxal, glioxal y malondialdehído. Han concluido que la reactividad de los diferentes inhibidores depende del compuesto carbonílico. En concreto, la piridoxamina mostró una gran capacidad para inhibir el glioxal y el malondialdehído, en cambio la aminoguanidina y la hidralazina presentaron una mayor eficacia de inhibición con el metilglioxal y finalmente la carnosina mostró una mayor selectividad con el compuesto 4-hidroxi-trans-2-nonenal [Colzani, 2016].



### **1.3.2. Reacción con especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden causar daño oxidativo a las cadenas laterales de los aminoácidos de proteínas, incluyendo la oxidación de la cisteína a sulfonato, conversión de metionina a su sulfóxido, la hidroxilación de los aminoácidos aromáticos, así como la fragmentación del esqueleto proteico [Halliwell y Gutteridge, 1999] y [Riedle y Kerjaschki, 1997].

Así, la inhibición del exceso de ROS generados en los procesos derivados de la glicación proteica adquiere gran importancia en el tratamiento de las complicaciones asociadas a la diabetes mellitus o a enfermedades neurodegenerativas. Entre los compuestos considerados como buenos inhibidores de la glicación no enzimática mediante el mecanismo de eliminación de ROS destacan el Tocoferol [Li, 1996], cetoácidos [Varma, 1997] y flavonoides [Matsuda, 2003]. También se han sugerido algunos compuestos derivados de la vitamina B<sub>6</sub> como posibles inhibidores como PL-AG [Chen, 2003].

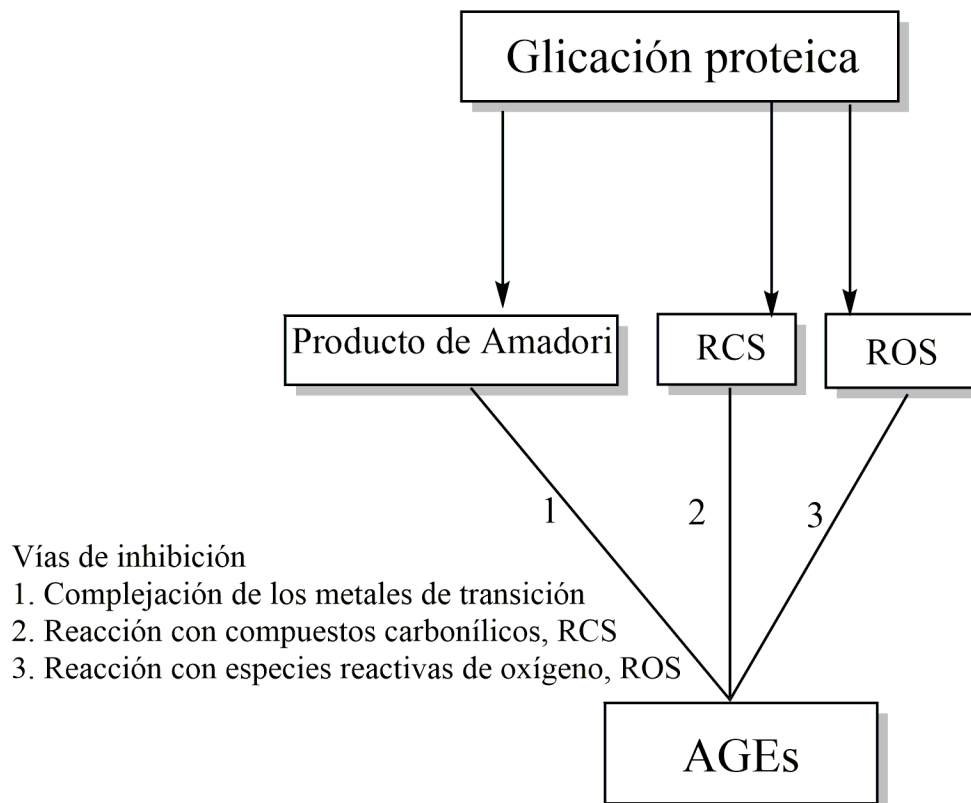
Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha estudiado teóricamente la capacidad del tautómero neutro de la piridoxamina y de la piridoxina para reaccionar con las especies radicalarias tales como  $\cdot\text{OOH}$ ,  $\cdot\text{OOCH}_3$ ,  $\cdot\text{OCH}_3$  [Caballero, 2013] y [Pascual, 2014] y experimentalmente frente al radical hidroxilo, el radical DPPH y el radical anión superóxido, junto con otros derivados como la 3-hidroxi-2-metilpiridina y el 2-cloro-3-hidroxi-2-metilpiridina [Llompart, 2016].

### **1.3.3. Complejación de los metales de transición**

La complejación de los metales que catalizan el paso del producto de Amadori a AGEs y otras reacciones secundarias reduce también los radicales libres derivados de la glicación [Thornalley, 1999] y [Cussimano, 2003].

Así, hemos estudiado la estabilidad de los complejos que se forman a partir de ciertos inhibidores tales como la aminoguanidina, la piridoxamina, la LR-74, compuestos de Amadori y el ácido ascórbico con los cationes metálicos  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  [Ortega-Castro, 2008], [Ortega-Castro, 2009] y [Ortega-Castro, 2012]. El estudio de estos inhibidores con el catión  $\text{Fe}^{3+}$  mostró que la estabilidad de los complejos que se forman decrece con la siguiente secuencia: piridoxamina, compuestos de Amadori, aminoguanidina, LR-74, y el ácido ascórbico [Ortega-Castro, 2012]. El estudio de las estructuras de los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  con

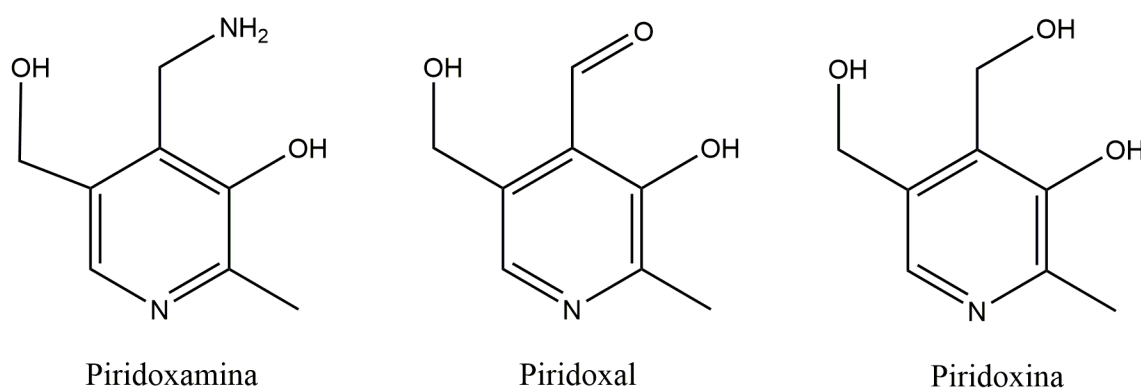
los ligandos aminoguanidina, piridoxamina, compuestos de Amadori y el ácido ascórbico fue consistente con el hecho de que la aminoguanidina inhibe la oxidación del ácido ascórbico pero es inactiva como inhibidor de las reacciones oxidativas post-Amadori mientras que la piridoxamina, que presenta una capacidad para complejar metales semejante a la aminoguanidina [Price, 2001], los inhibe a ambos [Ortega-Castro, 2009].



**Figura 1.6.** Esquema general de la inhibición de la formación de AGEs.

#### 1.4. Piridoxamina como inhibidor

La vitamina B<sub>6</sub> fue descubierta en 1934 por György [György, 1934]. En 1938 fue cristalizada y en 1939 sintetizada y caracterizada como 3-hidroxi-4,5-dihidroxi-2-metilpiridina o piridoxina (PN). Después fue descubierta por Snell la piridoxamina (PM) en 1942 y el piridoxal (PL). La piridoxamina, junto con el piridoxal y la piridoxina, es uno de los tres vitámeros naturales de la vitamina B<sub>6</sub> (Figura 1.7) junto con sus derivados fosforilados, piridoxina-5'-fosfato (PNP), piridoxal-5'-fosfato (PLP) y piridoxamina-5'-fosfato (PMP).



**Figura 1.7.** Vitámeros de la vitamina B<sub>6</sub>

La piridoxamina y el piridoxal catalizan *in vitro* las reacciones de transaminación enzimática entre grupos amino y  $\alpha$ -ceto ácidos [Snell, 1945]. La piridoxamina actúa como un intermedio en reacciones de transaminación enzimática donde actúa como coenzima [Metzler, 1954].

Basándose en que en estas reacciones la piridoxamina reacciona frente a grupos carbonilos, Booth et al. [Booth, 1996] supusieron que podía formar un aducto con el producto de Amadori, bloqueando de este modo su posterior reordenamiento para formar AGEs. La piridoxamina inhibe esta reacción y según un estudio con proteínas incubadas con glucosa es el más eficaz en comparación con otros vitámeros de la vitamina B<sub>6</sub> [Booth, 1996]. Se trata de la primera vez que la piridoxamina se consideró como un posible inhibidor del proceso de formación de AGEs.

La actividad inhibidora de la PM impulsó numerosos estudios sobre sus mecanismos, toxicidad y eficacia en animales y seres humanos con la finalidad de protección en la nefropatía diabética, neuropatía, retinopatía y enfermedades renales.

Booth et al. en 1997 y Khalifah et al. en 1999, determinaron que la piridoxamina inhibe considerablemente la formación del AGE CML a partir de las reacciones oxidativas del producto de Amadori [Booth, 1997] y [Khalifah, 1999]. Voziyan et al. [Voziyan, 2003] investigaron el mecanismo de acción de esta inhibición usando la enzima RNAsa unida al producto de Amadori preparada mediante concentraciones fisiológicas de glucosa. Determinaron que la capacidad de la piridoxamina de inhibir el paso del producto de Amadori a AGEs reside en su capacidad para complejar los metales que catalizan dicha reacción (principalmente  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ) a través del hidroxilo fenólico y del grupo aminometil. Además, tal y como se ha comentado en el apartado 1.3.3, nuestro grupo de investigación ha estudiado también la formación y estabilidad de complejos metálicos entre  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y la piridoxamina en comparación con una serie de inhibidores de la glicación proteica, como la aminoguanidina y el LR-74, mostrando que el complejo de piridoxamina con el catión  $\text{Fe}^{3+}$  era el que presentaba una mayor estabilidad en comparación con los otros inhibidores comentados [Ortega-Castro, 2012]. La estabilidad con los diferentes quelatos de  $\text{Cu}^{2+}$  fue consistente con el hecho de que la aminoguanidina, que es capaz de inhibir la oxidación del ácido ascórbico catalizada por metales, es completamente inactiva como inhibidor de las reacciones oxidativas post-Amadori, mientras que la piridoxamina los inhibe a ambos [Ortega-Castro, 2009].

Numerosos estudios realizados en diversos laboratorios han demostrado que la piridoxamina puede inhibir una variedad de especies carbonílicas muy reactivas derivadas de la autooxidación de azúcares y lípidos, de bases de Schiff y de productos de Amadori, como el glioxal, metilglioxal y glicolaldehído [Voziyan y Hudson, 2005] y la 3-desoxiglucosona (3-DG) [Chetyrkin, 2008]. Estudios teóricos y experimentales realizados por nuestro grupo de investigación [Adrover, 2009] y [Ortega-Castro, 2010] han permitido determinar la gran capacidad de la piridoxamina frente a otras especies para reaccionar con grupos carbonilos (acetaldehído, glicolaldehído y metilglioxal) con capacidad glicante. En el estudio teórico se observó que el mecanismo de reacción de la piridoxamina con los diferentes aldehídos, acetaldehído y glicolaldehído, involucraba dos etapas, la formación de la carbinolamina y su posterior deshidratación para obtener la imina final. La carbinolamina formada con la

piridoxamina y el glicolaldehído era más estable que la formada con el acetaldehído [Ortega-Castro, 2010].

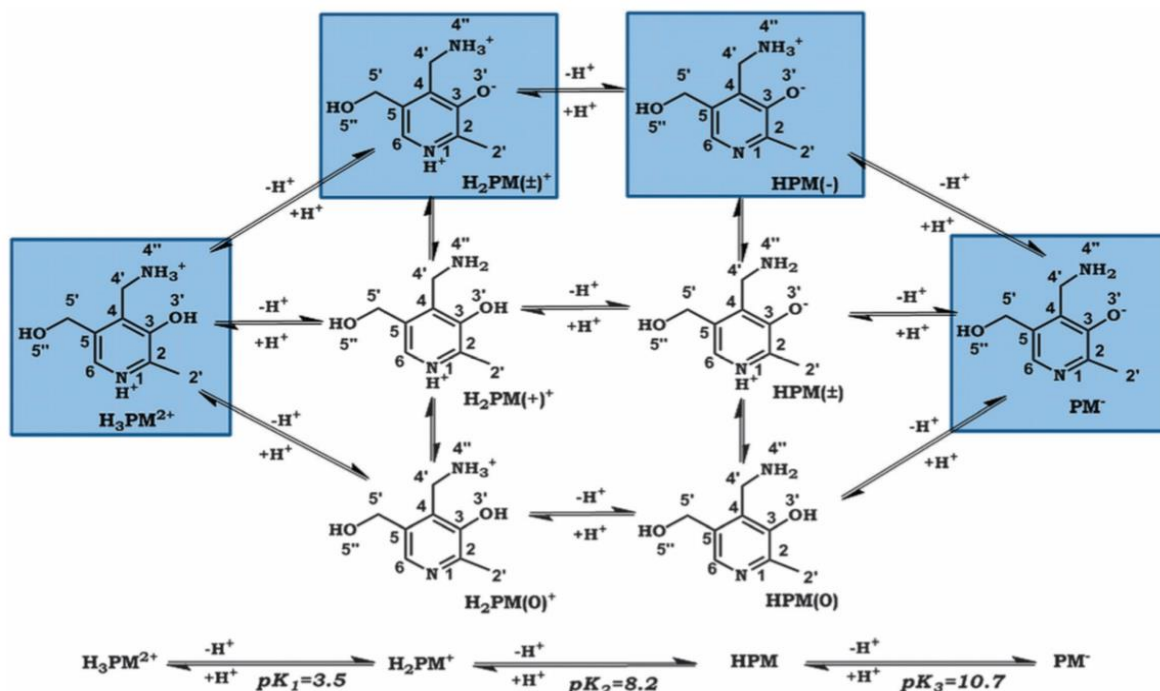
Considerando únicamente la capacidad de eliminación de especies reactivas de oxígeno por reacción directa, la piridoxamina se ha demostrado que posee una buena capacidad para reaccionar con el radical hidroxilo [Voziyan, 2005]. La similar eficacia obtenida con la 3-hidroxi piridina permitió concluir que dicha capacidad era debida a un proceso de abstracción del hidrógeno del grupo fenol. Sin embargo, otros autores [Chetyrkin, 2008] han indicado que la capacidad antioxidante de la piridoxamina es significativamente superior a la del 3-hidroxi piridina, aminoguanidina o 4-aminometilpiridina cuestionando la hipótesis anterior. Además, tal y como se ha comentado anteriormente en el apartado 1.3.2, en nuestro grupo de investigación se han estudiado las propiedades de la piridoxamina neutra y la piridoxina como inhibidor de radicales libres tales como  $\cdot\text{OOH}$ ,  $\cdot\text{OOCH}_3$ ,  $\cdot\text{OCH}_3$ . Tanto la piridoxamina neutra como la piridoxina mostraron una gran capacidad antioxidante para estos tres radicales libres, presentando una mayor reactividad con el alcóxido que con los peróxidos. En ambos compuestos el mecanismo prioritario de reacción es el de abstracción del hidrógeno del grupo fenol y del hidrógeno del carbono enlazado al grupo amina y al alcohol respectivamente [Caballero, 2013] y [Pascual, 2014].

Desde el punto de vista farmacológico ya desde sus inicios la piridoxamina se mostró por poseer una excelente capacidad para el tratamiento de complicaciones asociadas a la diabetes mellitus. Un estudio realizado en 2002 por Degenhardt y colaboradores demostró que la piridoxamina era significativamente más eficaz en retardar el desarrollo de la enfermedad renal en animales diabéticos que la aminoguanidina [Degenhardt, 2002]. Estudios realizados con ratas Zucker con hiperlipidemia y diabetes mostraron una disminución significativa de los niveles de AGEs formados en el colágeno por tratamiento con piridoxamina, además de un efecto renoprotector [Iacovella, 2003] y [Alderson, 2003]. Actualmente, la compañía farmacéutica NephroGenex comercializa la piridoxamina patentada bajo el nombre de piridorina, para el tratamiento de nefropatía diabética [Swaminathan, 2008].

Estos estudios han permitido determinar que, en efecto, la piridoxamina presenta gran capacidad para proteger las proteínas del estrés carbonílico y evitar la formación de AGEs. Sin embargo, muchas incógnitas quedan por resolver: qué mecanismo de eliminación de ROS prevalece en la piridoxamina, qué efecto tiene la polaridad del medio, sobre qué radicales actúa mayoritariamente. La capacidad antioxidante puede determinarse experimentalmente

mediante ensayos como CBA (*Crocin Bleaching Assay*), ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) o la actividad frente al radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) entre otros [Alam, 2013]. La aplicación de los métodos teóricos puede ayudar a responder a las preguntas anteriores y complementar los resultados experimentales que en general informan solo de la capacidad antioxidante global o bien se centran en radicales no presentes en el organismo.

La piridoxamina tiene tres grupos ionizables que en disolución implican cuatro formas iónicas:  $\text{H}_3\text{PM}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{PM}^+$ ,  $\text{HPM}$  y  $\text{PM}^-$  tal y como puede observarse en la Figura 1.8. El  $\text{H}_2\text{PM}^+$  y  $\text{HPM}$  presentan diferentes formas tautoméricas. En condiciones fisiológicas,  $\text{H}_2\text{PM}^+$  es la forma iónica predominante y presenta dos equilibrios tautoméricos. El tautómero  $\text{H}_2\text{PM}(\pm)^+$ , con el grupo amina y el grupo piridinio protonados y el grupo fenol desprotonado, es el mayoritario. Ante este esquema, se plantean una serie de cuestiones: ¿presenta esta especie una capacidad antioxidante elevada aun sin poseer el grupo fenólico protonado?, en caso afirmativo cuál será el mecanismo de actuación.



**Figura 1.8.** Equilibrio ácido-base de la piridoxamina. Los estados  $\text{H}_3\text{PM}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{PM}^+$ ,  $\text{HPM}$ ,  $\text{PM}^-$  hacen referencia a las formas iónicas de la piridoxamina. Los cuadros azules hacen referencia al tautómero principal para cada forma iónica [Adrover, 2012].

## 2. OBJETIVOS

La capacidad antioxidante y por tanto de eliminación de especies reactivas de oxígeno en muchos compuestos se ha asociado al grupo fenólico. Sin embargo, la forma mayoritaria de la piridoxamina a pH fisiológico ( $\text{H}_2\text{PM}(\pm)^+$ ) con el grupo fenólico desprotonado y los grupos amina y piridinio protonados parece seguir manteniendo su actividad.

El presente trabajo tiene como objetivo principal determinar computacionalmente mediante la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) la capacidad antioxidante del tautómero ( $\text{H}_2\text{PM}(\pm)^+$ ) de la piridoxamina frente a una serie de radicales libres, el radical metoxilo ( $\cdot\text{OCH}_3$ ) y el hidropéroxilo ( $\cdot\text{OOH}$ ) y dos disolventes de diferente polaridad, el agua y el etanoato de pentilo. Para conseguir este objetivo, se estudiarán diferentes mecanismos de reacción asociados a la abstracción de los hidrógenos de la piridoxamina (HAT), la formación de aductos piridoxamina-radical (RAF), la transferencia de un electrón (SET) y posteriores reacciones secuenciales de protones y electrones (SPET y SEPT). Así, se determinará termodinámica y cinéticamente el mecanismo de actuación prioritario y cuáles son las posiciones más reactivas de la piridoxamina.

Los resultados obtenidos se compararán con los obtenidos, utilizando los mismos funcionales, bases y radicales, con la forma iónica de la piridoxamina que presenta el grupo fenol protonado.

### 3. METODOLOGÍA

El paquete de programas Gaussian09 [Frisch, 2009] se ha utilizado para todos los cálculos a partir de la Teoría del Funcional de Densidad (DFT) y empleando el funcional M05-2X con un conjunto de bases 6-311+G(d,p).

La teoría del funcional de densidad (DFT) es una de las herramientas más utilizadas en la química teórica y computacional. El funcional M05-2X ha mostrado una muy buena adecuación para la realización de cálculos termodinámicos y cinéticos, proporcionando buenos resultados en la variación de energía libre de Gibbs de reacción, según demostraron sus desarrolladores [Zhao y Truhlar, 2005] y [Zhao, 2006].

En todos los cálculos se ha utilizado el modelo continuo de solvatación SMD (*Solvation Model Density*) basado en la interacción entre la densidad de carga mecano cuántica y un continuo [Marenich, 2009] que simula el efecto del disolvente. Se ha efectuado el estudio con dos disolventes de diferente polaridad (agua y etanoato de pentilo).

Se han llevado a cabo cálculos no restringidos (*unrestricted*) para sistemas de capa abierta. Para cada estructura se han calculado las frecuencias vibracionales, pudiéndose determinar en cada caso si las estructuras halladas corresponden a mínimos o a estados de transición (TS). Para que una estructura sea un mínimo energético no debe presentar ninguna frecuencia imaginaria en los cálculos vibracionales mientras que los estados de transición presentan la primera frecuencia de vibración imaginaria. En los estados de transición además se ha comprobado que la frecuencia imaginaria correspondiese al movimiento esperado a lo largo de la coordenada de reacción mediante cálculos IRC (*Intrinsic Reaction Coordinate*) [Ochterski, 1999].

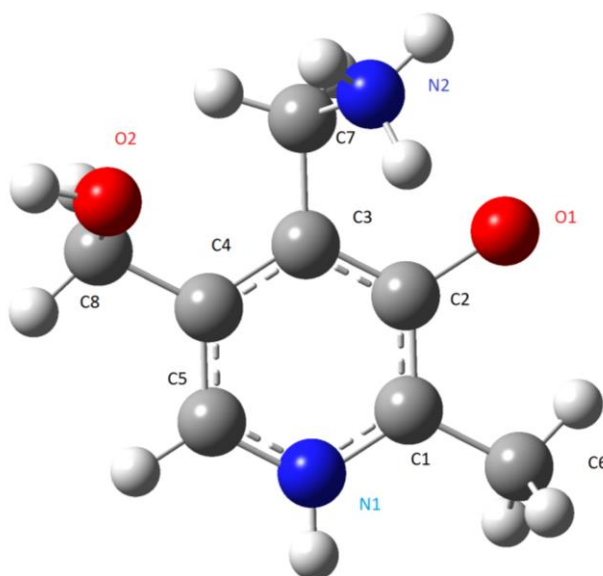
En todos los cálculos se han optimizado las estructuras y se han determinado los valores de energía libre de reacción ( $\Delta G_r$ ) a 298,15 K y las frecuencias correspondientes. Se han determinado los estados de transición (TS) únicamente para aquellas reacciones cuya energía libre de reacción es negativa o con valores positivos menores que 2 kcal/mol. A partir de las energías de dichos estados de transición se han determinado las barreras de activación correspondientes,  $\Delta G^\ddagger$ , así como parámetros geométricos para las estructuras de los TS.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos antioxidantes dependen de la naturaleza del compuesto pero también dependen de la estructura y de la reactividad del radical. Galano y colaboradores determinaron que para poder determinar la capacidad antioxidante de una molécula y establecer comparaciones, es recomendable el uso de radicales no excesivamente reactivos y presentes en los sistemas biológicos [Galano, 2012]. Así, en el presente trabajo se ha estudiado la reacción de la piridoxamina (PM) con dos radicales libres, el hidroperoxilo ( $\cdot\text{OOH}$ ) y el metoxilo ( $\cdot\text{OCH}_3$ ).

La forma iónica estudiada en este trabajo es la  $\text{H}_2\text{PM} (\pm)^+$  de la piridoxamina, no obstante se abreviará como  $\text{PM}^+$ . La numeración de la piridoxamina se muestra en la Figura 4.1.



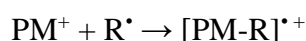
**Figura 4.1.** Estructura y numeración de la piridoxamina.

Se han estudiado cinco de los mecanismos de reacción entre la piridoxamina y los radicales comentados anteriormente, comunes a todas las reacciones de radicales libres.

- **HAT: *hydrogen atom transfer***. Corresponde a la abstracción de un átomo de hidrógeno, por parte del radical, dejando la molécula de la piridoxamina en forma radicalaria,  $PM^+(-H)^\bullet$  y neutralizando el radical libre inicial. Se ha considerado la posibilidad de que el mecanismo HAT tenga lugar en cualquiera de las posiciones hidrogenadas de la piridoxamina: C5, C6, C7, C8, N1, N2, O2. De forma general se puede escribir como:

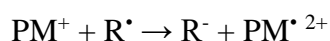


- **RAF: *radical adduct formation***. El radical se enlaza a un átomo de la molécula de piridoxamina. Este mecanismo tendrá lugar en cualquiera de los átomos del anillo aromático, C1, C2, C3, C4 y C5. Se puede escribir la reacción de forma general como:



- **SET: *single electron transfer***. Corresponde a la transferencia de un electrón de la molécula de piridoxamina al radical,  $R^\bullet$ , quedando el radical neutralizado como anión y la molécula en forma radicalaria y catiónica. El mecanismo de transferencia del electrón, no puede ser determinado para posiciones concretas, sino de forma general para la molécula de piridoxamina, ya que no es posible determinar de forma precisa el átomo del cual se extrae el electrón.

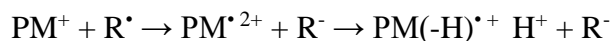
La reacción se puede escribir de forma general como:



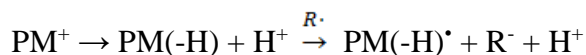
Si esta reacción da un  $\Delta Gr$  negativo se puede producir a continuación la reacción SEPT.

- **SEPT: *sequential electron proton transfer***. Este mecanismo involucra una transferencia electrónica primero y una desprotonación posterior pero en un orden

diferente que SPET (ver mecanismo siguiente). La piridoxamina reacciona con el radical y posteriormente se produce la desprotonación. Este mecanismo se ha considerado que tenga lugar en el C5, C6, C7, C8, N2, O2.



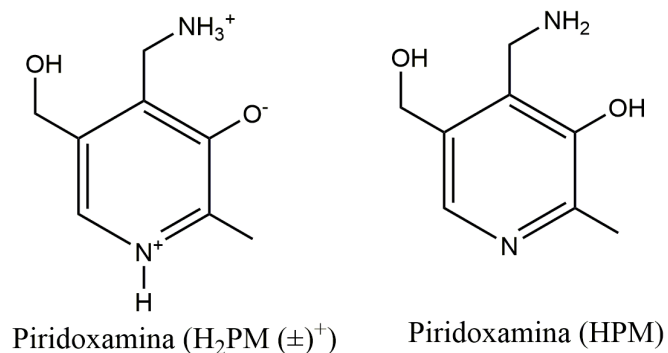
- **SPET: *sequential proton electron transfer*.** Consiste en la desprotonación de la piridoxamina reaccionando posteriormente con el radical libre, quedando la piridoxamina, el radical neutralizado, como anión, y el protón. Este mecanismo se ha considerado que tenga lugar en el C5, C6, C7, C8, N2, O2. La reacción se puede escribir de forma general como:



La reactividad relativa de cada una de las posiciones de la molécula para cada mecanismo de reacción y con cada radical se ha determinado mediante el cálculo de los valores de energía libre de reacción de todas las vías,  $\Delta G_r$ , y de activación  $\Delta G^\ddagger$ .

La aplicación de esta metodología conduce a un total de 50 reacciones, 14 de abstracción de hidrógeno, HAT, 10 de adición del radical, RAF, 2 de abstracción de un radical SET y 24 de transferencias secuenciales protón-electrón, SPET y SEPT.

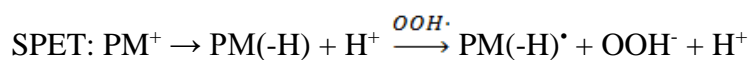
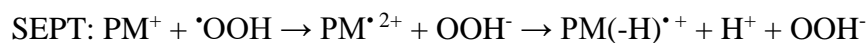
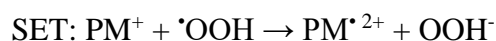
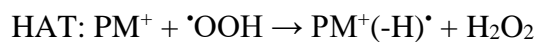
En los siguientes apartados se presentarán los resultados obtenidos para la piridoxamina en su forma iónica  $\text{H}_2\text{PM} (\pm)^+$  para cada radical. Los valores obtenidos se compararan con los obtenidos para la piridoxamina en su forma iónica HPM utilizando la misma metodología y radicales [Caballero, 2013]. En la Figura 4.2 están representadas la forma tautomérica de la piridoxamina  $\text{H}_2\text{PM} (\pm)^+$  y HPM.



**Figura 4.2.** Estructura de la piridoxamina

#### 4.1. Reacción de la piridoxamina con el radical hidroperoxilo, $\cdot\text{OOH}$

Los mecanismos de abstracción de hidrógeno, HAT, formación de un aducto, RAF, abstracción de un electrón, SET y transferencia secuencial de protones y electrones, SPET y SEPT, de la piridoxamina con el radical hidroperoxilo, son los siguientes:



Los resultados obtenidos para la reacción de la piridoxamina con el radical  $\cdot\text{OOH}$  para los tres primeros mecanismos se muestran en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Energía libre de Gibbs de la reacción a 298,15K ( $\Delta G_r$ ) y barrera de activación ( $\Delta G^\ddagger$ ) con el radical hidroperoxilo. La segunda y tercera columnas corresponden a los resultados obtenidos en este trabajo para la piridoxamina  $H_2PM (\pm)^+$ . En la cuarta y quinta columna se muestran los resultados de la piridoxamina HPM [Caballero, 2013].

<b>HAT <math>\cdot OOH</math></b>				
	<b><math>H_2PM (\pm)^+</math></b>		<b>HPM</b>	
<b>Posición</b>	<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>
<b>C5</b>	30,39	-	17,72	-
<b>C6</b>	-4,67	16,29	-3,40	16,23
<b>C7</b>	-2,50	19,37	-10,35	12,98
<b>C8</b>	-4,90	17,67	-4,25	20,67
<b>N1</b>	-3,61	18,88 <sup>(1)</sup>	-	-
<b>N2</b>	10,53	-	9,82	-
<b>O1</b>	-	-	-0,84	12,00
<b>O2</b>	16,82	-	21,19	-

(1) El valor calculado presenta la distancia N1-H fija.

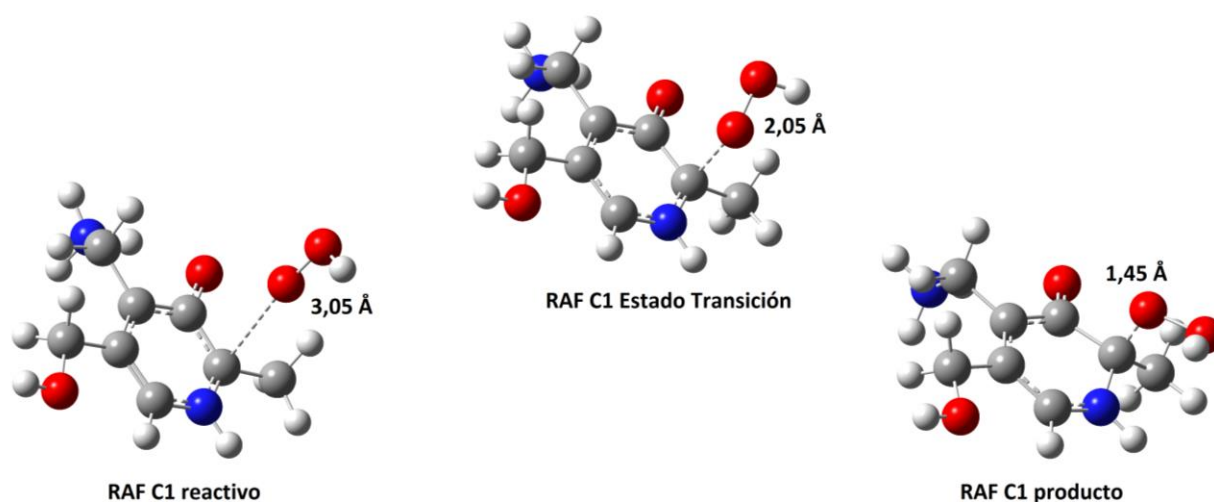
<b>RAF <math>\cdot OOH</math></b>				
	<b><math>H_2PM (\pm)^+</math></b>		<b>HPM</b>	
<b>Posición</b>	<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>
<b>C1</b>	-7,13	9,51	7,12	-
<b>C2</b>	17,68	-	8,38	-
<b>C3</b>	-3,18	10,10	9,49	-
<b>C4</b>	20,26	-	14,00	-
<b>C5</b>	-6,04	12,62	4,95	-

<b>SET <math>\cdot OOH</math></b>	
<b><math>H_2PM (\pm)^+</math></b>	<b>HPM</b>
<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>
27,45	36,00

A partir de la tabla 4.1 para el mecanismo de reacción HAT se observan valores negativos de  $\Delta G_r$  en la abstracción del hidrógeno de las posiciones C6 (-4,67 kcal/mol), C7 (-2,50 kcal/mol), C8 (-4,90 kcal/mol) y N1 (-3,61 kcal/mol). Se puede observar que los valores obtenidos para las dos formas tautoméricas de la piridoxamina para la reacción del tipo HAT son muy similares. Las barreras de activación en todos los casos son similares y oscilan entre 16 y 20 kcal/mol. La excepción es la menor barrera de activación correspondiente a la abstracción del hidrógeno fenólico y del hidrógeno C7 en el tautómero HPM y que las convierte en dos de los mecanismos prioritarios de este tautómero [Caballero, 2013].

Sin embargo, para la reacción del tipo RAF los valores difieren significativamente ya que en el caso de la forma iónica  $H_2PM (\pm)^+$  las posiciones C1, C3 y C5 son termodinámicamente favorables con incrementos de energías libres de reacción entre las -3 y -7 kcal/mol mientras que en la forma HPM todos los incrementos energéticos eran positivos. El valor obtenido más desfavorable de energía libre de Gibbs corresponde al C4 con un valor de 20,26 kcal/mol que coincide con la posición más desfavorable de la piridoxamina en su forma iónica HPM con un valor de 14,00 kcal/mol. Los valores obtenidos termodinámicamente más favorables corresponden a la reacción con los carbonos C1 y C5. Los motivos podrían ser que se tratan de átomos adyacentes al nitrógeno piridínico y además presentan un impedimento estérico menor. Las barreras de estos procesos se encuentran en torno a las 10 kcal/mol.

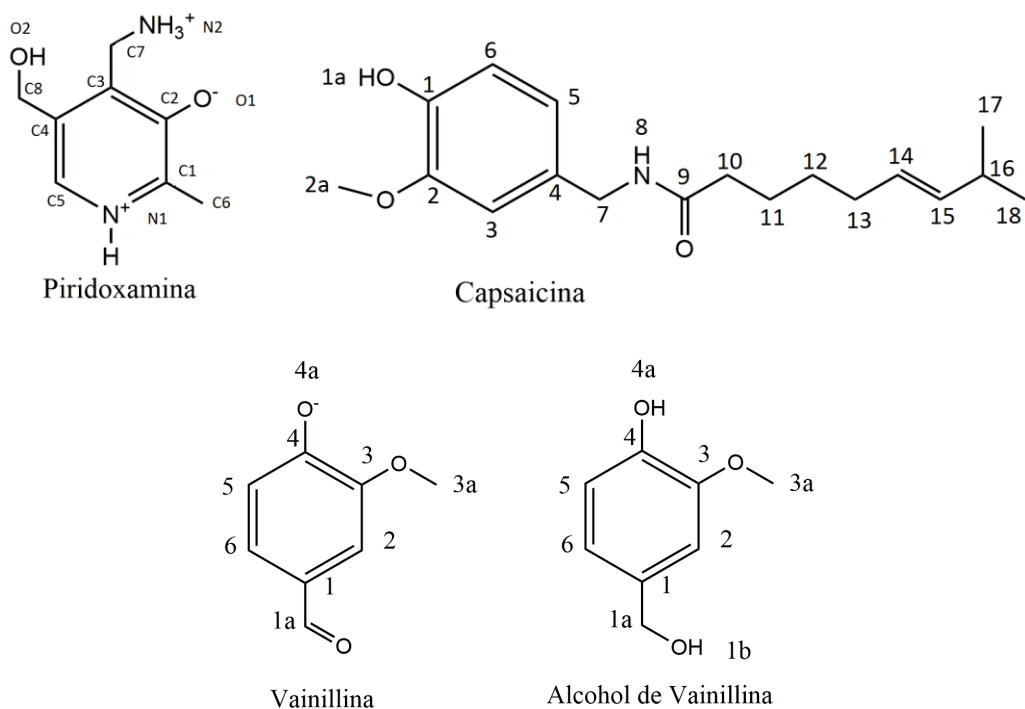
Comparando los valores obtenidos en las reacciones del tipo HAT y RAF para la piridoxamina en el estado iónico  $H_2PM (\pm)^+$  se observa que los valores más bajos de  $\Delta G_r$  corresponden a la reacción de formación de un aducto, RAF. El menor valor obtenido es para el C1 con un valor de -7,13 kcal/mol seguido del C5 (-6,04 kcal/mol). Además, el C1 presenta la menor barrera cinética (9,51 kcal/mol). En la Figura 4.3 se muestran las estructuras del reactivo, estado de transición y producto del C1, que corresponden al proceso más favorable cinética y termodinámicamente de todos los obtenidos con el radical hidropéroxilo.



**Figura 4.3.** Estructura optimizada para los reactivos, productos y estado de transición para la reacción de formación de un aducto (RAF) en el carbono C1 de la piridoxamina con el radical hidroperoxilo.

Finalmente para la reacción del tipo SET en ambos casos se ha obtenido un valor de energía libre positiva. La reacción SET coincide con el primer paso de la reacción con SEPT. Al dar la reacción SET un valor de  $\Delta Gr$  positivo, ya no se ha calculado el segundo paso de SEPT.

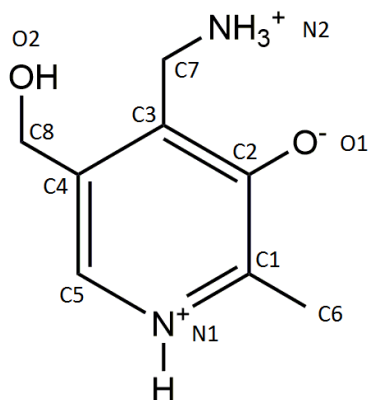
Estos valores obtenidos se pueden comparar con datos de otros antioxidantes obtenidos con la misma metodología (M05-2X/6-311+G(d,p)/SMD) y utilizando el mismo radical. Para la reacción de abstracción de un hidrógeno, el átomo C7 de la capsaicina (Figura 4.4) es similar al átomo C7 de la piridoxamina, para el cual se obtiene un valor de -4,35 kcal/mol en comparación con el de la piridoxamina (-2,50 kcal/mol) [Galano, 2012]. Además, Galano y colaboradores estudiaron diversos derivados del guayacol [Galano 2012A]. Entre ellos, la abstracción del carbono 1a del alcohol de vainillina (-4,81 kcal/mol) es similar al C8 de la piridoxamina (-4,90 kcal/mol) y la formación del aducto en el C4 de la vainillina desprotonada (12,80 kcal/mol) es similar al C2 de la piridoxamina (17,68 kcal/mol).



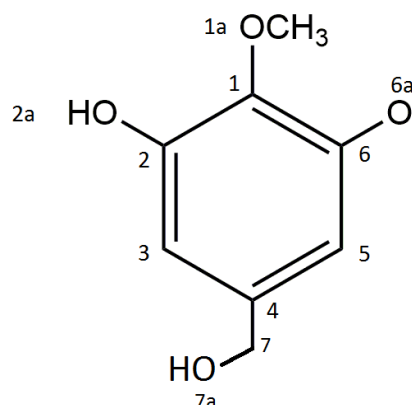
**Figura 4.4.** Estructura de la piridoxamina, capsaicina y derivados del guacayol.

Villuendas-Rey y colaboradores [Villuendas-Rey, 2015] estudiaron la capacidad antioxidante del 3,5-dihidroxi-4-metoxibenzil alcohol (DHMBA) en su forma desprotonada (Figura 4.5) utilizando una combinación de funcional y bases similar a la usada en este trabajo (M06-2X/6-311+G (d,p)/SMD). Estudiaron las reacciones del tipo HAT, RAF y SET con el radical  $\cdot\text{OOH}$ . Para la reacción HAT, el átomo C7 del DHMBA presenta un valor de  $\Delta\text{Gr}$  de -3,11 kcal/mol, y es similar al átomo C8 de la piridoxamina, para el cual se tiene un valor de -4,90 kcal/mol. Otro átomo, el oxígeno correspondiente al 7a del DHMBA (13,11 kcal/mol) se puede considerar semejante al oxígeno 2 de la piridoxamina (16,82 kcal/mol). En ambos casos comentados anteriormente, se tratan de valores concordantes. Para la reacción RAF, el átomo C4 del DHMBA (16,24 kcal/mol) es semejante al C4 de la piridoxamina (20,26 kcal/mol). El átomo C6 (14,01 kcal/mol) del DHMBA es similar al C2 de la piridoxamina (17,68 kcal/mol). En ambos casos se trata de valores concordantes, y en efecto, termodinámicamente desfavorables.





Piridoxamina



DHMBA

**Figura 4.5.** Estructura de la piridoxamina y el 3,5-dihidroxi-4-metoxibenzil alcohol (DHMBA) en su forma desprotonada.

El mecanismo SPET es básicamente una reacción del tipo HAT pero partiendo del nitrógeno del anillo desprotonado, por este motivo en la tabla 4.2 están recogidos los valores obtenidos en la reacción SPET en comparación con la reacción HAT.

**Tabla 4.2.** Energía libre de Gibbs de la reacción a 298,15K ( $\Delta Gr$ ) y barrera de activación ( $\Delta G^\ddagger$ ) para la reacción SPET y HAT entre la forma tautomérica de la piridoxamina  $H_2PM(\pm)^+$  y el radical  $\bullet OOH$ .

Posición	SPET $\bullet OOH$		HAT $\bullet OOH$	
	$H_2PM(\pm)^+$		$H_2PM(\pm)^+$	
	$\Delta Gr$ (kcal/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta Gr$ (kcal/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)
C5	19,93	-	30,39	-
C6	-5,91	14,54 <sup>(1)</sup>	-4,67	16,29
C7	-6,23	35,70	-2,50	19,37
C8	-6,02	8,30 <sup>(1)</sup>	-4,90	17,67
N2	1,47 <sup>(1)</sup>	3,64 <sup>(1)</sup>	10,53	-
O2	17,46	-	16,82	-

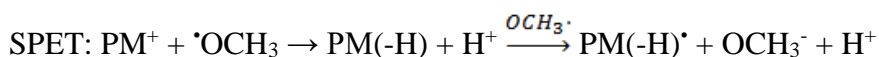
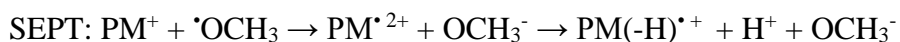
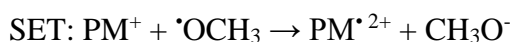
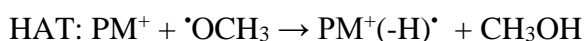
(1) Distancia restringida entre el hidrógeno transferido y el oxígeno del radical.

La posición N2 presenta un valor positivo próximo a cero de  $\Delta G_r$  (1,47 kcal/mol), por lo que también se ha determinado para esta vía de reacción la correspondiente barrera de activación.

Los valores de la tabla 4.2 para los dos tipos de reacciones son muy similares para cada átomo. Esto es debido a que la reacción SPET es básicamente una reacción HAT en la estructura con el nitrógeno piridínico desprotonado. Los valores obtenidos de la reacción SPET son ligeramente más favorables termodinámicamente que con HAT. Por ejemplo el C7 presenta un valor de -6,23 kcal/mol en la reacción SPET mientras que con HAT un valor de -2,50 kcal/mol. A pesar que las barreras de activación de los procesos SPET son orientativas, la tendencia es que en general son algo inferiores a las correspondientes del proceso HAT.

#### 4.2. Reacción de la piridoxamina con el radical metoxilo, $\cdot\text{OCH}_3$

Los mecanismos de abstracción de hidrógeno, HAT, formación de un aducto, RAF, abstracción de un electrón, SET, transferencia secuencial de protón-electrón, SPET y SEPT, de la piridoxamina con el radical metoxilo son los siguientes:



Los resultados obtenidos para la reacción de la piridoxamina con el radical  $\cdot\text{OCH}_3$  en los distintos mecanismos se muestran en la tabla 4.3.

**Tabla 4.3.** Energía libre de Gibbs de la reacción a 298,15K ( $\Delta G_r$ ) y barrera de activación ( $\Delta G^\ddagger$ ) con el radical metoxilo. La segunda y tercera columnas corresponden a los resultados obtenidos en este trabajo para la piridoxamina  $H_2PM (\pm)^+$ . En la cuarta y quinta columna se muestran los resultados de la piridoxamina HPM [Caballero, 2013].

<b>HAT <math>\cdot OCH_3</math></b>				
	<b><math>H_2PM (\pm)^+</math></b>		<b>HPM</b>	
<b>Posición</b>	<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>
<b>C5</b>	15,25	-	-2,04	9,70
<b>C6</b>	-21,20	9,86	-20,50	6,44
<b>C7</b>	-39,67	ND	-28,39	7,35
<b>C8</b>	-23,85	ND	-26,65	28,71
<b>N1</b>	-27,02 <sup>(1)</sup>	ND	-	-
<b>N2</b>	-18,75 <sup>(1)</sup>	ND	-9,19	26,38
<b>O1</b>	-	-	-17,72	5,79 <sup>(3)</sup>
<b>O2</b>	-6,38 <sup>(2)</sup>	3,82 <sup>(2)</sup>	5,74	-

(1) Valores calculados con la distancia N-H fija

(2) Valor calculado con PM3

(3) Valor obtenido con el modelo continuo de solvatación CPCM

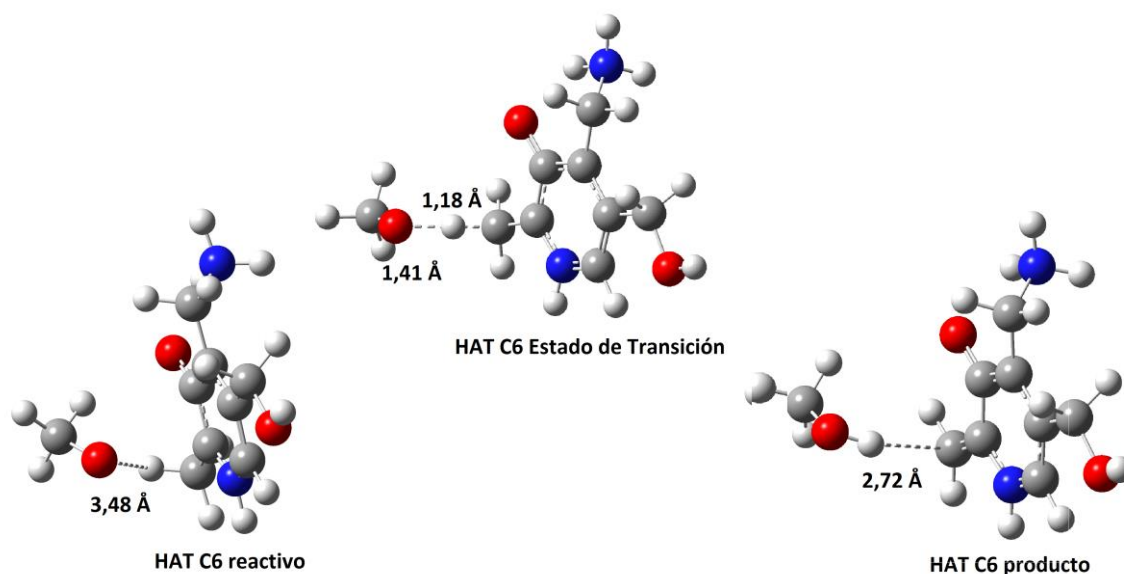
ND. No determinado

<b>RAF <math>\cdot OCH_3</math></b>				
	<b><math>H_2PM (\pm)^+</math></b>		<b>HPM</b>	
<b>Posición</b>	<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>
<b>C1</b>	-20,36	4,75	-4,71	12,43
<b>C2</b>	5,48	-	-2,90	12,10
<b>C3</b>	-12,15	5,10	2,11	9,13
<b>C4</b>	6,45	-	1,00	10,30
<b>C5</b>	-20,68	5,45	-6,83	9,80

<b>SET <math>\cdot OCH_3</math></b>	
<b><math>H_2PM (\pm)^+</math></b>	<b>HPM</b>
<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G_r</math> (kcal/mol)</b>
21,95	30,30

A partir de la tabla 4.3 se puede observar que tanto el mecanismo HAT como el RAF presentan algunas vías termodinámicamente favorables, contribuyendo en principio ambos a la eliminación del radical metoxilo por parte de la piridoxamina.

En la reacción HAT para la forma iónica  $H_2PM (\pm)^+$  todas las posiciones son termodinámicamente favorables menos en el C5, con  $\Delta Gr$  comprendidos aproximadamente entre -6 kcal/mol para el O2 y -40 kcal/mol para el C7. En la Figura 4.6 se muestran las estructuras del reactivo, estado de transición y producto en el C6.



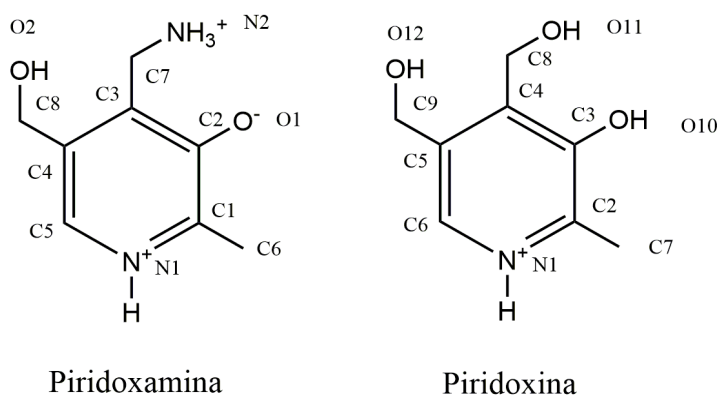
**Figura 4.6.** Estructuras optimizadas para los reactivos, productos y estado de transición para la reacción de abstracción de un hidrógeno en el carbono C6 de la piridoxamina.

Los valores obtenidos para las dos formas iónicas de la piridoxamina para la reacción del tipo HAT son muy similares. La diferencia fundamental se centra en la posiciones C5 y O2 que invierten su tendencia termodinámica. El resto de valores son muy similares. La eliminación del hidrógeno del C7 por parte del radical metoxilo es la reacción de tipo HAT termodinámicamente más favorable con ambas formas iónicas.

La estabilidad termodinámica de los aductos RAF obtenidos con la forma iónica  $(H_2PM (\pm))^+$  es mayor a la de los aductos de la forma HPM con los valores más estables próximos a los -20 kcal/mol y además con valores de las barreras de activación del orden de 5-6 kcal/mol, la mitad de las obtenidas con la forma HPM. Finalmente, para la reacción del

tipo SET en ambos casos se ha obtenido un valor de energía libre positiva igual que para el radical  $\cdot\text{OOH}$ .

Los resultados se pueden comparar también con los obtenidos con la piridoxina, un vitámero de la vitamina B<sub>6</sub>, en solución acuosa tanto en su forma protonada como desprotonada con el radical metoxilo [Pascual, 2014]. En la Figura 4.7 se muestran las estructuras y numeración de la piridoxamina y la piridoxina.



**Figura 4.7.** Estructura de la piridoxamina y piridoxina

En la tabla 4.4 se muestran los valores de  $\Delta\text{Gr}$  de la reacción HAT y RAF para el radical metoxilo de la piridoxamina en la forma iónica  $\text{H}_2\text{PM}(\pm)^+$  y la piridoxina en su forma protonada. Los valores obtenidos corresponden al mismo funcional y bases (M05-2X/6-311+G (d,p)).

**Tabla 4.4.** Energía libre de Gibbs de la reacción a 298,15K ( $\Delta Gr$ ) para los mecanismos HAT, RAF y SET de la piridoxamina  $H_2PM(\pm)^+$  y la piridoxina [Pascual, 2014] con el radical metoxilo.

<b>HAT <math>\cdot OCH_3</math></b>			
<b>Posición</b>			
<b>Piridoxina (PN)</b>	<b>Piridoxamina (PM)</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (PN) (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (PM) (kcal/mol)</b>
<b>C6</b>	<b>C5</b>	17,33	15,25
<b>C7</b>	<b>C6</b>	-17,01	-21,20
<b>C8</b>	<b>C7</b>	-25,15	-39,67
<b>C9</b>	<b>C8</b>	-20,82	-23,85
<b>N1</b>	<b>N1</b>	-1,93	-27,02 <sup>(1)</sup>
<b>O10</b>	<b>O1</b>	-12,26	-
<b>O11</b>	<b>N2</b>	-2,25	-18,75 <sup>(1)</sup>
<b>O12</b>	<b>O2</b>	30,73	-6,38 <sup>(2)</sup>
<b>RAF <math>\cdot OCH_3</math></b>			
<b>Posición</b>			
<b>Piridoxina (PN)</b>	<b>Piridoxamina (PM)</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (PN) (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (PM) (kcal/mol)</b>
<b>C2</b>	<b>C1</b>	-4,60	-20,36
<b>C3</b>	<b>C2</b>	-3,84	5,48
<b>C4</b>	<b>C3</b>	-5,19	-12,15
<b>C5</b>	<b>C4</b>	-4,79	6,45
<b>C6</b>	<b>C5</b>	-8,45	-20,68
<b>SET <math>\cdot OCH_3</math></b>			
<b><math>\Delta Gr</math> (PN) (kcal/mol)</b>		<b><math>\Delta Gr</math> (PM) (kcal/mol)</b>	
27,89		27,45	

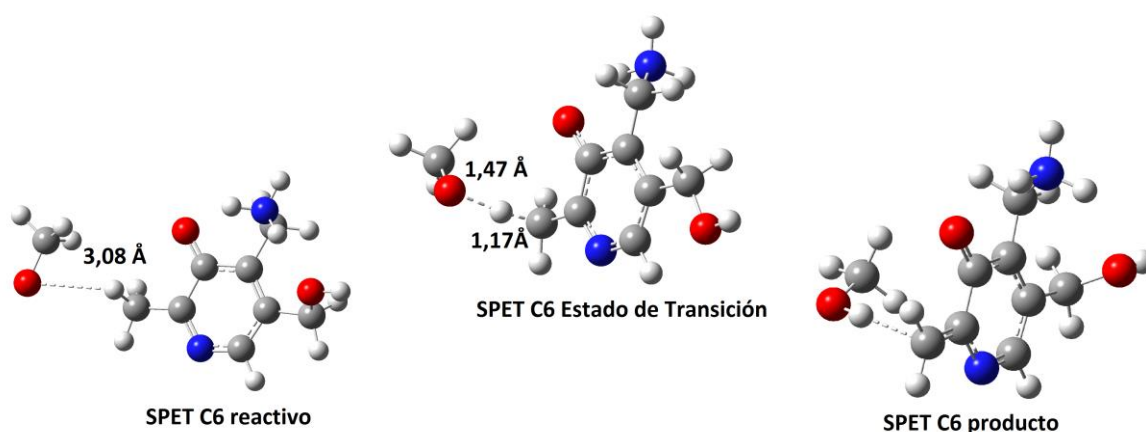
(1) Valores calculados con la distancia N-H fija.

(2) Valor calculado con PM3.

Aunque las estructuras no sean exactamente iguales, la reactividad en las mismas condiciones es similar para el radical metoxilo. En ambos sistemas el átomo de hidrógeno se abstrae fácilmente en la misma posición, C8 para la piridoxina y C7 para la piridoxamina. Una diferencia significativa se da en la reacción HAT del oxígeno, O12 para la piridoxina y O2 para piridoxamina. Este oxígeno en la piridoxina es termodinámicamente desfavorable con un valor de 30,73 kcal/mol mientras que en la piridoxamina presenta un valor favorable de -6,38 kcal/mol.

En la reacción de formación de un aducto (RAF) con la piridoxina todas las posiciones son termodinámicamente favorables. No obstante, con la piridoxamina para esta reacción hay dos átomos que presentan energías termodinámicamente desfavorables, el C2 y el C4. En las posiciones termodinámicamente favorables, la reacción es más exérgica con la piridoxamina que con la piridoxina.

Los valores de las energías libres de Gibbs de las reacciones correspondientes al mecanismo SPET con el radical  $\cdot\text{OCH}_3$  están en la tabla 4.5 junto con los obtenidos con la reacción HAT. Tanto la reacción del tipo SPET como la del tipo HAT son reacciones muy favorables en casi cualquier posición de la piridoxamina. En ambas reacciones la reacción del radical en el C7 es la que presenta un valor más favorable de  $\Delta G_r$ , para la reacción SPET se ha obtenido un valor de -25,42 kcal/mol y para HAT un valor de -39,67 kcal/mol. En la Figura 4.8 se muestran las estructuras del reactivo, estado de transición y producto para la reacción del tipo SPET en el carbono C6 de la piridoxamina.



**Figura 4.8.** Estructura optimizada para los reactivos, productos y estado de transición para la reacción del tipo SPET en el carbono C6 entre la piridoxamina y el radical  $\cdot\text{OCH}_3$ .

**Tabla 4.5.** Energía libre de Gibbs de la reacción a 298,15K ( $\Delta G_r$ ) y barrera de activación ( $\Delta G^\ddagger$ ) para la reacción SPET y HAT en la piridoxamina  $H_2PM(\pm)^+$  con el radical metoxilo.

Posición	SPET $\cdot OCH_3$		HAT $\cdot OCH_3$	
	$\Delta G_r$ (kcal/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta G_r$ (kcal/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)
C5	-3,39	8,80 <sup>(1)</sup>	15,25	-
C6	-23,47	4,27	-21,20	9,86
C7	-25,42	ND	-39,67	ND
C8	-24,91	ND	-23,85	ND
N2	-17,32	ND	-18,75 <sup>(1)</sup>	ND
O2	-3,10	ND	-6,38 <sup>(2)</sup>	3,82 <sup>(2)</sup>

(1) Valores calculados con la distancia N-H fija.

(2) Valor calculado con PM3.

### 4.3. Efecto del disolvente

En el presente trabajo también se calcularon los valores de  $\Delta G_r$  utilizando como disolvente etanoato de pentilo con los diferentes mecanismos de reacción, HAT, RAF, SET, SPET y SEPT y con el radical hidropéroxilo  $\cdot OOH$  y el radical metoxilo  $\cdot OCH_3$ .

En la mayoría de los casos, al utilizar etanoato de pentilo en lugar de agua los valores de  $\Delta G_r$  son termodinámicamente menos favorables sobre todo en las reacciones de formación de aductos, RAF, que son las que generalmente eran más favorables utilizando como disolvente agua. Este comportamiento puede observarse en la tabla 4.6 tomando como ejemplo la reacción del tipo RAF con el radical  $\cdot OOH$ . El hecho de que el medio presente un papel importante en la actividad antioxidante de la piridoxamina coincide con otros compuestos como la piridoxina [Pascual, 2014], los derivados del guacayol [Galano, 2012A], el 3,5-dihidroxi-4-metoxibenzil alcohol [Villuendas-Rey, 2015], la N-acetiltransferasa y la 6-hidroxi melatonina [Álvarez-Diduk, 2015].



**Tabla 4.6.** Energía libre de Gibbs de la reacción HAT con el radical hidroperoxilo a 298,15K ( $\Delta Gr$ ) en medios de diferente polaridad.

<b>RAF <math>\cdot</math>OOH</b>		
	<b>Etanoato de pentilo</b>	<b>Agua</b>
<b>Posición</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (kcal/mol)</b>
<b>C1</b>	-7,87	-7,13
<b>C2</b>	23,75	17,68
<b>C3</b>	-0,42	-3,18
<b>C4</b>	29,79	20,26
<b>C5</b>	-5,70	-6,04

#### 4.4. Discusión general de resultados

En la tabla 4.7 se muestra la recopilación de todos los resultados obtenidos para los mecanismos de reacción, HAT, RAF, SET y SPET, y para los dos radicales estudiados, el radical hidroperoxilo  $\cdot$ OOH y el radical metoxilo  $\cdot$ OCH<sub>3</sub> en disolución acuosa.

**Tabla 4.7.** Valores de energía libre de Gibbs para todas las vías de reacción consideradas entre la piridoxamina, H<sub>2</sub>PM (±)<sup>+</sup>, y los radicales hidroperoxilo y metoxilo: abstracción de un átomo de hidrógeno (HAT), formación de un aducto radicalario (RAF), transferencia secuencial de electrones y protones (SPET) y abstracción de un electrón (SET). Se muestran también los valores de las barreras de activación,  $\Delta G^\ddagger$ , para aquellas reacciones cuya energía libre de Gibbs es negativa o inferior a 2 kcal/mol.

<b>HAT</b>				
	<b>•OOH</b>		<b>•OCH<sub>3</sub></b>	
<b>Posición</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>
<b>C5</b>	30,39	-	15,25	-
<b>C6</b>	-4,67	16,29	-21,20	9,86
<b>C7</b>	-2,50	19,37	-39,67	ND
<b>C8</b>	-4,90	17,67	-23,85	ND
<b>N1</b>	-3,61	18,88 <sup>(2)</sup>	-27,02 <sup>(2)</sup>	ND
<b>N2</b>	10,53	-	-18,75 <sup>(2)</sup>	ND
<b>O2</b>	16,82	-	-6,38 <sup>(1)</sup>	3,82 <sup>(1)</sup>
<b>RAF</b>				
	<b>•OOH</b>		<b>•OCH<sub>3</sub></b>	
<b>Posición</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>
<b>C1</b>	-7,13	9,51	-20,36	4,75
<b>C2</b>	17,68	-	5,48	-
<b>C3</b>	-3,18	10,10	-12,15	5,10
<b>C4</b>	20,26	-	6,45	-
<b>C5</b>	-6,04	12,62	-20,68	5,45
<b>SPET</b>				
	<b>•OOH</b>		<b>•OCH<sub>3</sub></b>	
<b>Posición</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta Gr</math> (kcal/mol)</b>	<b><math>\Delta G^\ddagger</math> (kcal/mol)</b>
<b>C5</b>	19,93	-	-3,39	8,80 <sup>(2)</sup>
<b>C6</b>	-5,91	14,54 <sup>(2)</sup>	-23,47	4,27
<b>C7</b>	-6,23	35,70	-25,42	ND
<b>C8</b>	-6,02	8,30 <sup>(2)</sup>	-24,91	ND
<b>N2</b>	1,47 <sup>(2)</sup>	3,64 <sup>(2)</sup>	-17,32	ND
<b>O2</b>	17,46	-	-3,10	ND
<b>SET</b>				
	<b>•OOH</b>		<b>•OCH<sub>3</sub></b>	
	<b><math>\Delta Gr</math> (kcal/mol)</b>		<b><math>\Delta Gr</math> (kcal/mol)</b>	
	27,45		21,95	

(1) Valor calculado con PM3.

(2) Valores calculados con una distancia fija.

ND. No determinado

Tal y como puede observarse en la anterior tabla, en las tres reacciones, HAT, RAF y SPET los valores son termodinámicamente más favorables con el radical  $\cdot\text{OCH}_3$  que con el radical  $\cdot\text{OOH}$ . Así, por ejemplo en la reacción de abstracción de un átomo de hidrógeno (HAT) las energías libres de reacción de la piridoxamina con el radical hidroperoxilo,  $\cdot\text{OOH}$ , están comprendidas entre -4,90 kcal/mol para la abstracción en C8 y 30,39 kcal/mol para la abstracción en C5. En el caso del radical metoxilo  $\cdot\text{OCH}_3$ , los valores oscilan entre -39,67 kcal/mol para el C7 y 15,25 para el C5, por lo tanto presentan valores mucho más favorables.

En el mecanismo de abstracción de un hidrógeno, las posiciones termodinámicamente favorables son coincidentes para ambos radicales excepto las posiciones N2 y O2 que muestran un carácter exergónico únicamente con el radical metoxilo. El análisis de las barreras de activación es más complejo debido a la dificultad en la optimización de algunos de los estados de transición de las reacciones con el radical metoxilo. Sin embargo, se aprecia que algunas de las barreras pueden ser inferiores a los 16-20 kcal/mol que es el rango en el que se encuentran con el radical hidroperoxilo.

En la reacción de formación de aductos, RAF, se mantiene la tendencia de los átomos que presentan valores termodinámicamente favorables, que son el C1, C3 y C5 para ambos radicales. En los dos casos la estabilización en las posiciones C1 y C5, las adyacentes al nitrógeno piridínico, es ligeramente superior a la C3. No obstante, en el caso del radical metoxilo los valores son mucho más favorables y además las barreras de activación presentan valores más pequeños, en torno a las 5 kcal/mol.

El mecanismo SET es termodinámicamente desfavorable al igual que en las restantes formas tautoméricas de la piridoxamina y derivados como la piridoxina [Caballero, 2013] y [Pascual, 2014].

Estos resultados permiten establecer que las reacciones que permiten la eliminación de radicales son más favorables termodinámicamente y más rápidas cinéticamente con el radical  $\cdot\text{OCH}_3$  que con el  $\cdot\text{OOH}$ . Esta tendencia termodinámica coincide con los obtenidos por Caballero [Caballero, 2013] para la forma HPM de la piridoxamina.

Un análisis conjunto de los diferentes mecanismos de reacción muestra que para el radical hidroperoxilo las reacciones de formación de un aducto (RAF) en las posiciones C1 y C5 y la reacción secuencial de protón y electrón (SPET) en la posición C8 son las que se muestran cinética y termodinámicamente más favorecidas. También es destacable la contribución de la formación del aducto en el C3. Para el radical metoxilo nuevamente el

mecanismo RAF en las posiciones C1 y C5 es prioritario, con una participación también significativa del C3. También es destacable por su valor de exergonicidad y de energía de activación los mecanismos secuenciales de transferencia de protón y electrón (SPET) en las posiciones C6 y C8.

Considerando que para que se den lugar las reacciones del tipo SPET necesitan una previa desprotonación de la molécula, se puede generalizar que la formación de un aducto radicalario (RAF) constituye el mecanismo de reacción preferente para la eliminación de radicales libres de la forma tautómera mayoritaria a pH fisiológico de la piridoxamina en los dos radicales estudiados. El mecanismo RAF no es único de la piridoxamina, aquellos compuestos sin grupos fenol presentan la formación de un aducto en un carbono aromático como vía prioritaria de eliminación de radicales. Sin embargo, las barreras de activación obtenidas para la piridoxamina son significativamente inferiores a las 16,10 kcal/mol de la melatonina [Galano, 2011] y las 19,50 kcal/mol de la edavorona [Pérez-González, 2012] con el radical hidroperoxilo.

Estos resultados son sustancialmente diferentes a los obtenidos para la forma HPM de la piridoxamina en la que el mecanismo prioritario es la abstracción de un protón para cualquiera de los radicales considerados [Caballero, 2013]. Además, las barreras energéticas de los procesos más favorables son inferiores en la  $H_2PM (\pm)^+$  para los dos reactivos. Para el radical hidroperoxilo, 9,51 kcal/mol (RAF-C1) para la forma  $H_2PM (\pm)^+$  frente a las 12,98 kcal/mol (HAT-C7) y 12,00 kcal/mol (HAT-O1) de la forma HPM; mientras que para el radical metoxilo, 4,27 kcal/mol (SPET-C6) y 4,75 kcal/mol (RAF-C1) para la forma  $H_2PM (\pm)^+$  frente a las 5,79 kcal/mol (HAT-O1), 6,44 kcal/mol (HAT-C6), 7,35 kcal/mol (HAT-C7) y 9,13 kcal/mol (RAF-C3) de la forma HPM. Por tanto, la capacidad antioxidante y por tanto de eliminación de especies radicalarias de oxígeno de la forma tautómera  $H_2PM (\pm)^+$  es incluso superior a la de la forma neutra, a pesar de que no posee un grupo fenol protonado y que no puede actuar por eliminación del hidrógeno de dicho grupo.

## 5. CONCLUSIONES

La principal conclusión de este trabajo es que la forma iónica de la piridoxamina,  $H_2PM(\pm)^+$ , predominante a pH fisiológico y con el grupo fenol desprotonado, presenta una elevada capacidad antioxidante, similar e incluso superior a la de la forma neutra. En general, presenta una mayor reactividad frente al radical metoxilo que frente al radical hidroperoxilo.

Los mecanismos de reacción más favorecidos y las posiciones prioritarias de reacción con la forma iónica estudiada de la piridoxamina son las reacciones de formación de un aducto (RAF) para los dos radicales, metoxilo ( $\cdot OCH_3$ ) y el hidroperoxilo ( $\cdot OOH$ ), en las posiciones C1 y C5. La reacción secuencial de protones y electrones (SPET) tiene cierta importancia con el radical metoxilo en cualquiera de las posiciones estudiadas, fundamentalmente en posición C6. No obstante este tipo de reacción necesita una previa desprotonación del nitrógeno piridínico de la piridoxamina dificultando ligeramente esta reacción.

Estos mecanismos de reacción y las posiciones predominantes difieren de las obtenidas con la piridoxamina en su forma neutra (HPM) que reacciona mayoritariamente por abstracción del hidrógeno (HAT) del grupo fenol.

Por tanto, la piridoxamina presenta una gran capacidad antioxidante eliminando o inhibiendo la formación de AGEs a través de la eliminación de radicales libres mediante un mecanismo u otro dependiendo de su forma tautomérica.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

[Adrover, 2008] M. Adrover, B. Vilanova, J. Frau, F. Muñoz, J. Donoso, The pyridoxamine action on Amadori compounds: a reexamination of its scavenging capacity and chelating effect. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 5557.

[Adrover, 2009] M. Adrover, B. Vilanova, F. Muñoz, J. Donoso, A comparative study of the chemical reactivity of pyridoxamine, Ac-Phe-Lys and Ac-Cys with various Glycating carbonyl compounds. *Amino Acids.* **2009**, 36, 437.

[Adrover, 2012] M. Adrover, C. Caldés, B. Vilanova, J. Frau, J. Donoso, F. Muñoz, Towards a detailed description of pyridoxamine tautomeric species. *New J. Chem.* **2012**, 36, 1751.

[Ahmed, 1986] M.U. Ahmed, S.R. Thorpe, J.W. Baynes. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol Chem.* **1986**, 261, 4889.

[Ahmed, 1988] M. U. Ahmed, J. A. Dunn, M. D. Walla, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, Oxidative degradation of glucose adducts to protein. Formation of 3- (N-lysino) lactic acid from model compounds and glycated proteins. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 8816.

[Ahmed, 2005] N. Ahmed, Advanced glycation endproducts role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2005**, 67, 3.

[Alam, 2013] N. Alam, N. Jahan, Rafiquzzaman, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* **2013**, 21, 143.

[Alderson, 2003] N.L. Alderson, M.E. Chachich, N.N. Youssef, R.J. Beatie, M. Nachtigal, S.R. Thorpe SR, The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int.* **2003**, 63, 2123.

[**Álvarez-Diduk, 2015**] R.Álvarez-Diduk, A. Galano, D. Xian, R.J. Reiter, N-Acetylserotonin and 6 hydroxymelatonin against Oxidative Stress: Implications for the Overall Protection Exerted by Melatonin. *J. Phys. Chem. B.* **2015**, 119, 8535.

[**Amadori, 1929**] M. Amadori. The product of the condensation of glucose and phenetidine. *Atti. Reale Accad. Nazl. Lincei.* **1929**, 9, 68.

[**Aoki, 2000**] S. Aoki, G. Hasegawa, H. Shigeta, H. Obayashi, M. Fujii, G. Kimura, A. Moriwaki, N. Nakamura, K. Ienaga, K. Nakamura, M. Kondo, Crossline levels in serum and erythrocyte membrane proteins from patients with diabetic nephropathy. *Diab. Res. Clin. Pract.* **2000**, 48, 119.

[**Booth, 1996**] A. A. Booth, R. G. Khalifah, B. G. Hudson, Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation endproducts: comparison with aminoguanidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 220, 113.

[**Booth, 1997**] A. A. Booth, R. G. Khalifah, P. Todd, B.G. Hudson, In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). Novel inhibition of post-Amadori glycation pathways. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 5430.

[**Brinkmann, 1998**] E. Brinkmann, T. P. Degenhardt, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 18714.

[**Brownlee, 1988**] M. Brownlee, A. Cerami, H. Vlassara, Advanced glycosylation endproducts in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *NEJM.* **1988**, 318, 1315.

[**Brownlee, 1995**] M. Brownlee, Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med.* **1995**, 46, 223.

[**Brownlee, 2001**] M. Brownlee, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* **2001**, 414, 813.

[**Caballero, 2013**] M.C. Caballero, Estudio teórico de las propiedades de la piridoxamina en la inhibición de AGEs por eliminación de radicales libres. *Trabajo final de Máster*, Universidad de las Islas Baleares, **2013**.

[**Cai, 1999**] J. Cai, H.E. Hurst. Identification and quantification of N- (carboxymethyl)valine adduct in hemoglobin by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 537.

[**Ceriello, 1999**] A. Ceriello, Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes. Nutr. Metab.* **1999**, 12, 42.

[**Chen, 2003**] A.S. Chen, T. Taguchi, S. Aoyama, M. Sugiura, M. Haruna, M-W. Wang, I. Miwa, Antioxidant activity of a Schiff base of pyridoxal and aminoguanidine. *Free. Radic. Biol. Med.* **2003**, 35, 1392.

[**Chetyrkin, 2008**] S. Chetyrkin, W. Zhang, B. G. Hudson, A. S. Serianni, P. V. Voziyan, Pyridoxamine protects protein from functional damage by 3-deoxyglucosone: Mechanism of action for pyridoxamine. *Biochemistry.* **2008**, 47, 997.

[**Cohen, 1940**] P.P. Cohen, Transamination with purified enzyme preparations (transaminase). *J. Biol. Chem.* **1940**, 136, 565.

[**Colzani, 2016**] M. Colzani, D. De Maddis, G. Casali, M. Carini, G. Vistoli, G. Aldini, Reactivity, selectivity and reaction mechanisms of Aminoguanidine, Hydralazine, Pyridoxamine, and Carnosine as sequestering agents of reactive carbonyl species: a comparative study. *Chem. Med. Chem.* **2016**, 11, 1.

[**Cussimano, 2003**] B.L. Cussimano, A.A. Booth, P. Tood, B.G. Hudson, R.G. Khalifah, Unusual susceptibility of heme proteins to damage by glucose during non-enzymatic glycation. *Biophys. Chem.* **2003**, 105, 743.



[**Degenhardt, 2002**] T. P. Degenhardt, N. L. Alderson, D.D. Arrington, R.J. Beattie, J.M. Basgen, M.W. Steffes, Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int.* **2002**, 61, 939.

[**Delgado-Andrade, 2012**] C. Delgado-Andrade, F. Tessier, C. Niquet-Leridon, I. Seiquer, M.P. Navarro, Study of the urinary and faecal excretion of N-carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino Acids.* **2012**, 42, 595.

[**Delgado-Andrade, 2014**] C. Delgado-Andrade, Maillard reaction products: some considerations on their health effects. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2014**, 52, 53.

[**Forbes, 2004**] J.M. Forbes, L.T. Yee, V. Thallas, M. Lassila, R. Candido, K.A. Jandeleit-Dahm, M.C. Thomas, W.C. Burns, E.K. Deemer, S.M. Thorpe, S.M. Cooper, T.J. Allen, Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes.* **2004**, 53, 1813.

[**Friedman, 1999**] E. A. Friedman, Advanced glycosylated end-products and hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care.* **1999**, 22 (Suppl 2), B65.

[**Frisch, 2009**] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, Jr. J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N.J. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox. Gaussian, Inc., Wallingford CT. **2009**.

[Galano, 2011] A. Galano, On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 7147.

[Galano, 2012] A. Galano, A. Martínez, Capsaicin, a Tasty Free Radical Scavenger: Mechanism of Action and Kinetics. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116, 1200.

[Galano, 2012A] A. Galano, Influence of the environment on the protective effects of guaiacol derivatives against oxidative stress: Mechanisms, kinetics and relative antioxidant activity. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116, 7129.

[György, 1934] P. György, Vitamin B<sub>2</sub> and the pellagra-like dermatitis in rats. *Nature.* **1934**, 133, 498.

[Halliwell y Gutteridge, 1999] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. (1999): *Free radicals in biology and medicine*, 3rd Ed. Oxford University Press, London.

[Hein, 2006] G. Hein, Glycation endproducts in osteoporosis. Is there a pathophysiologic importance? *Clin. Chim. Acta.* **2006**, 371, 32

[Hodge, 1953] J. E. Hodge. Dehydrated foods: chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1953**, 1, 928.

[Hunt, 1988] J.V. Hunt, R.T. Dean, S.P. Wolff, Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem. J.* **1988**, 256, 205.

[Iacovella, 2003] G. Iacovella, N.L. Alderson, M. Chachich, S.R. Thorpe, J.W. Baynes, Pyridoxamine decreases levels of reactive alpha-dicarbonyls in plasma of ZDF diabetic rats. *Diabetes.* **2003**, 52, 187.

[Khalifah, 1999] R. G. Khalifah, J. W. Baynes, B.G. Hudson, Amadorins: novel postAmadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 257, 251.

[Koenig, 1975] R.J. Koenig, A. Cerami, Synthesis of haemoglobin A1c in normal and diabetic mice: potential model of basement membrane thickening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 3687.

[Kuhla, 2005] B. Kuhla, H. J. Luth, D. Haferburg, K. Boeck, T. Arendt, G. Munch, Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxifications in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, 1043, 211.

[Kuhn y Weygand, 1937] R. Kuhn, F. Weygand. The Amadori rearrangement. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1937**, 70B, 769.

[Ledl, 1990] F. Ledl, E. Schleicher, New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 565.

[Lee, 1992] A.T. Lee, A. Cerami, Role of glycation in aging. *Ann. NY Acad. Sci.* **1992**, 663, 6370.

[Li, 1996] D. Li, S. Devaraj, C. Fuller, R. Bucala, I. Jialal, Effect of  $\alpha$ -tocopherol on LDL oxidation and glycation: in vitro and in vivo studies. *J. Lipid. Res.* **1996**, 37, 1978.

[Li, 2012] J. Li, D. Liu, L. Sun, Y. Lu, Z. Zhang, Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanism and perspective. *J. Neurol. Sci.* **2012**, 317, 1.

[Ling y Malting 1908] A.R. Ling, J.J. Malting. *J. Inst. Brew.* **1908**, 14, 494.

[Llompert, 2016] C. Llompert, Determinació de l'activitat antioxidant de composts anàlegs a la 3-hidroxipiridina. *Trabajo final de Grado*, Universidad de las Islas Baleares, **2016**.

[Luevano-contreras, Chapman-Novakofski 2010] C. Luevano-Contreras, K. Chapman-Novakofski, Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients.* **2010**, 2, 1247.

[**Maillard, 1912**] L.C. Maillard. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines per voie methodique. *C.R. Acad. Sci. Ser. 2.* **1912**, 154, 66.

[**Marenich, 2009**] A. V. Marenich, C. J. Cramer, and D. G. Truhlar, Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, 113, 6378.

[**Matsuda, 2003**] H. Matsuda, T. Wang, H. Managi, M. Yoshikawa, Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 5317.

[**Metzler, 1954**] D.E. Metzler, M. Ikawa E.E. Snell, A general mechanism for vitamin B6-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 648.

[**Miyata, 2002**] T. Miyata, Alterations of non-enzymatic biochemistry in uremia, diabetes and atherosclerosis. *Bull Mem Acad R Med Belg.* **2002**, 157, 189.

[**Monnier, 2003**] V. M. Monnier, Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 419, 1.

[**Nakamura, 1997**] K. Nakamura, Y. Nakazawa, K. Ienaga, Acid-stable fluorescent advanced glycation end products: vesperlysines A, B, and C are formed as crosslinked products in the Maillard reaction between lysine or proteins with glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 232, 227.

[**Nimbalkar, 2012**] V.V. Nimbalkar, R.V. Mandlik, S.R. Naik, A. Maseeh, Non enzymatic glycosylation: A biochemical link between chronic hyperglycemia and pathophysiologic processes associated with diabetic complications and aging related debilities. *Biomed. Aging. Pathol.* **2012**, 2, 133.

[**Ochterski, 1999**] J. Ochterski, Vibrational Analysis in Gaussian, **1999**.

[Ortega-Castro, 2008] J. Ortega-Castro, M. Adrover, J. Frau, J. Donoso, F. Muñoz, Chelating power of LR-74, a new AGE-inhibitor. *Chem. Phys. Letters*. **2008**, 465, 120.

[Ortega-Castro, 2009] J. Ortega-Castro, M. Adrover, J. Frau, J. Donoso, F. Muñoz, Cu<sup>2+</sup> complexes of some AGE inhibitors. *Chem. Phys. Letters*. **2009**, 475, 277.

[Ortega-Castro, 2010] J. Ortega-Castro, M. Adrover, J. Frau, A. Salvà, J. Donoso, F. Muñoz, DFT Studies on Schiff Base Formation of Vitamin B6 Analogues. Reaction between a Pyridoxamine-Analogue and Carbonyl Compounds. *J. Phys. Chem. A*. **2010**, 114, 4634.

[Ortega-Castro, 2012] J. Ortega-Castro, J. Frau, R. Casasnovas, D. Fernández, J. Donoso, F. Muñoz, High- and low-spin Fe(III) complexes of various AGE inhibitors. *J. Phys. Chem. A*. **2012**, 116, 1897.

[Pascual, 2014] M. Pascual, DFT study of the free radical scavenging activity of Pyridoxine for the AGEs inhibition. *Trabajo final de Máster*, Universidad de las Islas Baleares, **2014**.

[Paul, 1999] R.G. Paul, A.J. Bailey, The effect of advanced glycated end-product formation upon cell-matrix interaction. *Int J Biochem Cell Biol*. **1999**, 31, 653.

[Pennathur y Heinecke, 2004] S. Pennathur, J.W. Heinecke, Mechanisms of oxidative stress in diabetes: implications for the pathogenesis of vascular disease and antioxidant therapy. *Front Biosci*. **2004**, 9, 565.

[Pérez-González, 2012] A. Pérez-González, A. Galano, On the OH and OOH Scavenging Activity of 3-Methyl-1-pyridin-2-yl-5-pyrazolone: Comparisons with its Parent Compound, Edaravone. *Int. J. Quant. Chem*. **2012**, 112, 3441.

[Prabhakaram, 1997] M. Prabhakaram, Q. Cheng, M. S. Feather, B. J. Ortweh, Structural elucidation of a novel lysine-lysine crosslink generated in a glycation reaction with L-threose. *Amino Acids*. **1997**, 12, 225.

[Price, 2001] D. L. Price, P. M. Rhett, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 48967.

[Rahbar, 1968] S. Rahbar, An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta.* **1968**, 22, 296.

[Rahbar, 2002] S. Rahbar, J. L. Figarola, Inhibitors and breakers of advanced glycation endproducts (AGEs): a review. *Curr. Med. Chem. Immun. Endocrinol. Metab. Agents.* **2002**, 2, 135.

[Reddy, 1995] S. Reddy, J. Bichler, K.J. Wells-Knecht, S.R. Thorpe, J.W. Baynes, N epsilon-(carboxymethyl) lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry.* **1995**, 34, 10872.

[Reddy, 2006] V.P. Reddy, A. Beyaz, Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug discovery today.* **2006**, 11, 646.

[Riedle y Kerjaschki, 1997] B. Riedle, D. Kerjaschki, Reactive oxygen species cause direct damage of Engelbreth-Holm-Swarm matrix. *Am. J. Pathol.* **1997**, 151, 215.

[Sayre, 2001] L.M. Sayre, M.A. Smith, G. Perry, Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 721.

[Schleicher, 1997] E. D. Schleicher, E. Wagner, A.G. Nerlich, Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon) - (carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 457.

[Shipanova, 1997] I. N. Shipanova, M. A. Glomb, R. H. Nagaraj, Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 344, 29.

[Shuvaev, 2001] V.V. Shuvaev, I. Laffont, J.M. Serot, J. Fujii, N. Taniguchi, G. Siest, Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. **2001**, 22, 397.

[Snell, 1945] E.E. Snell, The vitamin B6 group. The reversible interconversion of pyridoxal and pyridoxamine by transamination reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, 67, 194.

[Spiteller, 2006] G. Spiteller, Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, 41, 362.

[Swaminathan, 2008] S. Swaminathan, S. Shah, Novel approaches targeted toward oxidative stress for the treatment of chronic kidney disease, *Current opinion in nephrology and hypertension*. **2008**, 17, 143.

[Tessier, 2003] F. J. Tessier, V. M. Monnier, L. S. Sayre, J. A. Kornfield, Triosidines: novel Maillard reaction products and cross-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues. *Biochem. J.* **2003**, 369, 705.

[Thomas, 2005] M.C. Thomas, J.W. Baynes, S.R. Thorpe, M.E. Cooper. The Role of AGEs and AGE Inhibitors in Diabetic Cardiovascular Disease. *Current Drug Targets*. **2005**, 6, 453.

[Thornalley, 1999] P. J. Thornalley, A. Langborg, H. S. Minhas, Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* **1999**, 344, 109.

[Thornalley, 2003] P.J. Thornalley, Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 419, 31.

[Thornalley, 2005] P. J. Thornalley, Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2005**, 1043, 111.

[Ulrich y Cerami, 2001] P. Ulrich, A. Cerami, Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent. Prog. Horm. Res.* **2001**, 56, 1.

[Varma, 1997] S.D. Varma, P.S. Devamanoharan, A.H. Ali, Formation of advanced glycation end products (AGE) in diabetes: prevention by pyruvate and  $\alpha$ -keto glutarate. *Mol. Cell. Biochem.* **1997**, 171, 23.

[Villuendas-Rey, 2015] Y. Villuendas-Rey, J.R. Alvarez-Idaboy, A. Galano, Assessing the protective activity of a recently discovered phenolic compound against oxidative stress using Computational Chemistry. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, 55, 2552.

[Vistoli, 2013] G. Vistoli, D. De Maddis, A. Cipak, N. Zarkovic, M. Carini, G. Aldini, Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Biol. Med.* **2013**, 47, 3.

[Voziyan, 2003] P. A. Voziyan, R. G. Khalifah, C. Thibaudeau, A. Yildiz, J. Jacob, A. S. Serianni, B. G. Hudson, Modification of proteins in vivo by physiological levels of glucose. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 46616.

[Voziyan y Hudson, 2005] P. A. Voziyan, B. G. Hudson, Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, 62, 1671.

[West, 2000] I.C. West, Radicales y estrés oxidativo en diabetes. *Diabet Med.* **2000**, 17, 171.

[Yaylayan y Huyghues-Despointes, 1994] V.A. Yaylayan, A. Huyghues-Despointes, Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1994**, 34, 321.

[Zeng y Davies, 2005] J. Zeng, M. J. Davies. Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl)cysteine of reaction of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides and proteins. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18, 1232.



**[Zhao y Truhlar, 2005]** Y. Zhao, D.G. Truhlar, Design of density functionals that are broadly accurate for thermochemistry, thermochemical kinetics, and nonbonded interactions. *J. Phys. Chem. A.* **2005**, 109 (25), 5656.

**[Zhao, 2006]** Y. Zhao, E. Nathan, E. Schultz, D. G. Truhlar, Design of Density Functionals by Combining the Method of Constraint Satisfaction with Parametrization for Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent interactions. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, 2, 364.