

**Universidad Cardenal Herrera-CEU**

**Departamento de Ciencias Biomédicas**



**Selección de moléculas que inhiben la  
peroxidación lipídica mediante  
Topología Molecular**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**Carlos Casanova Sorní**

**Dirigida por:**

**Dr. Vicente Villar Amigó**

**Dr. Salvador Mérida Donoso**

**Valencia 2015**



## AGRADECIMIENTOS

En este momento de entregar el trabajo realizado, quiero dar las gracias a todas las personas que han contribuido a la realización del mismo. Sin ellas hubiera sido imposible. No querría olvidar a nadie así que pido disculpas de antemano si omito a alguien.

Gracias a mis directores de tesis, Vicente Villar y Salva Mérida.

Gracias Vicente por confiar tanto en mí y haberme acompañado día a día en esta aventura. Tu gran apoyo ha sido fundamental para lograr este objetivo. He aprendido mucho de ti en estos años y te considero un amigo. Mi mayor agradecimiento entre todos es para ti.

Gracias Salva por tu ayuda en numerosas ocasiones. Por las charlas y los consejos a lo largo de estos años, por tus horas de “bancada” en el laboratorio y tu espíritu científico que me ha obligado a mejorar.

Gracias también a Antonio Falco, por tu tiempo y colaboración desinteresada en el desarrollo informático. Gracias a tu buen humor, las dificultades han parecido menores. Nunca olvidaré el intenso día de Elche y las reuniones en tu despacho con Vicente.

A María Miranda e Inma Almansa, gracias a vosotras ha sido posible la realización de mi parte experimental en el laboratorio. Gracias por vuestra enseñanza, afecto y paciencia y por las dudas metodológicas que siempre me habéis resuelto.

A Tanya y Sole, sin vuestra ayuda hubiera ido al principio literalmente perdido en el laboratorio. Gracias por haberme hecho sentir tan a gusto durante este tiempo en el laboratorio. Gracias por vuestro tiempo y paciencia. También quiero agradecer al resto de compañeras del laboratorio que en uno u otro momento me han ayudado. Gracias María, Sara, Laura y Rosa.

Gracias también a Jorge Gálvez y Ramón García-Domenech. Os agradezco vuestros útiles consejos y aportaciones en el campo de la Topología Molecular.

Gracias a Miguel Ángel, Eva y Miguel por vuestras desinteresadas ayudas.

Marcelo, gracias por tu aportación en el procesamiento estadístico.

Mis agradecimientos también a Victoria y Carmen, que desde Secretaría me habéis ayudado siempre con la gestión formal de la tesis.

En el ámbito familiar, quiero dar las gracias primero a mis padres Vicente y Tita. Nunca os podré dar las suficientes gracias por todo lo que habéis hecho por mí. Gracias a vuestro apoyo durante toda mi vida he conseguido llegar hasta aquí. Y gracias también a ti, papá, por tu incondicional apoyo a pesar de haberte tenido que multiplicar en el trabajo para cubrir mis numerosas ausencias.

Gracias también a mis hermanos Lucía y Vicente y a toda mi familia. Me habéis escuchado y ayudado siempre.

Para terminar, quiero dar las gracias especialmente a mi mujer. María, sin tu amor y comprensión habría sido imposible realizar la tesis doctoral. Me has animado desde el principio a realizar este trabajo y me has acompañado maravillosamente durante el camino escuchando cada día mis dudas y preocupaciones así como los logros obtenidos. Es por esto, por lo que os la dedico a ti y a nuestros hijos Martina, Olivia y el esperado Carlos.

**GRACIAS**

---

I. INTRODUCCIÓN.....	11
1. TOPOLOGÍA MOLECULAR.....	13
1.1. Generalidades.....	13
1.2. Teoría de grafos.....	14
1.3. Matriz topológica.....	17
1.4. Índices topológicos.....	19
1.5. Aplicaciones.....	21
2. ANTIOXIDANTES.....	25
2.1. Agentes reductores y agentes oxidantes: reacciones <i>redox</i> .....	25
2.2. Estrés oxidativo.....	26
2.2.1. Radicales libres.....	26
2.2.2. Peroxidación lipídica.....	28
2.3. Defensas y tipos de antioxidantes.....	31
2.3.1 Antioxidantes enzimáticos.....	32
2.3.1.1. Superóxido dismutasa.....	32
2.3.1.2. Catalasa.....	32
2.3.1.3. Glutatión peroxidasa.....	32
2.3.1.4. Peroxiredoxina.....	32
2.3.1.5. Otras.....	33
2.3.2 Antioxidantes no enzimáticos.....	33
2.3.2.1. Vitamina E.....	33
2.3.2.2. Vitamina C.....	34
2.3.2.3. Glutatión.....	34
2.3.2.4. Carotenoides.....	35
2.3.2.5. Compuestos fenólicos.....	36
2.3.2.6. Otros antioxidantes.....	37
2.3.2.7. Antioxidantes sintéticos.....	38
2.4. Relevancia en terapéutica.....	38
2.4.1. Cáncer.....	38
2.4.2. Función cognitiva y demencia.....	39
2.4.3. Enfermedades cardiovasculares.....	39
2.5. Antioxidantes y QSAR.....	39
3. TRABAJO PRELIMINAR.....	41
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	49
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
1. SELECCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA-QUÍMICA.....	55
2. OBTENCIÓN DE LAS MOLÉCULAS. LIBRERÍAS MOLECULARES.....	55
2.1. Moléculas con actividad antioxidante.....	55
2.2. Moléculas sin actividad antioxidante.....	56

2.3. Moléculas para realizar la búsqueda guiada.....	56
3. ÍNDICES TOPOLÓGICOS.....	57
3.1. Obtención de los archivos .mol.....	57
3.2. PaDEL-Descriptor.....	58
3.3. Descripción de los índices topológicos.....	58
4. PROCESAMIENTO DE DATOS.....	60
4.1. Análisis lineal discriminante.....	61
4.1.1. Procedimiento en SPSS.....	62
4.1.2. Procedimiento en R 3.0.1.....	64
4.2. Redes Neuronales Artificiales.....	65
4.2.1. Procedimiento en SPSS.....	69
5. CRITERIO DE CLASIFICACIÓN.....	70
6. DISTRIBUCIÓN DE LAS MOLÉCULAS.....	70
7. BÚSQUEDA GUIADA.....	70
8. ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	71
8.1 Inhibición de la peroxidación lipídica.....	71
8.1.1. Tratamiento de los animales.....	71
8.1.1.1. Condiciones de estabulación.....	71
8.1.1.2. Manejo de los animales.....	71
8.1.2. Diseño experimental.....	72
8.1.3. Obtención de las muestras.....	72
8.1.4. Procedimientos analíticos.....	73
8.1.4.1. Determinación de proteínas.....	73
8.1.4.2. Determinación de malondialdehído (MDA).....	74
8.1.5. Exposición de los resultados.....	76
8.2 Estudio de la capacidad antioxidante.....	76
8.2.1. Fundamento.....	76
8.2.2. Procedimiento.....	76
8.2.3. Exposición de los resultados.....	77
9. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	77
 IV. RESULTADOS.....	 79
1. SELECCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS MOLÉCULAS.....	81
2. ANÁLISIS DISCRIMINANTE EN SPSS.....	81
2.1. Criterio de elección.....	81
2.2. Función discriminante.....	81
2.3. Clasificación de los grupos.....	85
3. ANÁLISIS DISCRIMINANTE EN R 3.0.1.....	87
3.1. Criterio de elección.....	87
3.2. Función discriminante.....	88
3.3. Clasificación de los grupos.....	89
4. REDES NEURONALES ARTIFICIALES EN SPSS.....	92
5. RESULTADOS GLOBALES.....	94
6. BÚSQUEDA GUIADA.....	94

7. ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	101
7.1. Inhibición de la peroxidación lipídica.....	101
7.1.1. Selección de las moléculas.....	101
7.1.2. Captopril.....	102
7.1.3. Nistatina.....	103
7.1.4. Atenolol.....	104
7.1.5. Simvastatina.....	105
7.1.6. Sertralina.....	106
7.1.7. Progesterona.....	107
7.1.8. 5-fluorouracilo (5-FU) .....	108
7.1.9. S-81.....	109
7.1.10. S-86.....	110
7.1.11. S-123.....	111
7.1.12. Ácido lipoico.....	112
7.2. Estudio de la capacidad antioxidante.....	113
V. DISCUSIÓN.....	115
1. CONSIDERACIONES FINALES ACERCA DE LOS ANTIOXIDANTES.....	117
2. OBTENCIÓN DE FICHEROS .MOL Y CÁLCULO DE ÍNDICES TOPOLÓGICOS.....	118
3. DISCRIMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	119
3.1. SPSS.....	119
3.2. R 3.0.1.....	121
3.3. Redes neuronales artificiales en SPSS.....	122
3.4. Comentarios finales.....	123
4. BÚSQUEDA GUIADA.....	128
5. ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	133
5.1. Inhibición de la peroxidación lipídica y estudio de la capacidad antioxidante.....	133
VI. CONCLUSIONES.....	143
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	147
VIII. ANEXOS.....	161
ANEXO 1: Equivalencias número Index Merck y nombre químico de las moléculas.	
ANEXO 2: Resultados obtenidos en SPSS del grupo de entrenamiento activos.	
ANEXO 3: Resultados obtenidos en SPSS del grupo de entrenamiento no activos.	
ANEXO 4: Resultados obtenidos en R del grupo de entrenamiento activos.	
ANEXO 5: Resultados obtenidos en R del grupo de entrenamiento no activos.	
ANEXO 6: Resultados de las redes neuronales en SPSS del grupo activos.	
ANEXO 7: Resultados de las redes neuronales en SPSS del grupo no activos.	
ANEXO 8: Estructuras químicas restantes de las moléculas clasificadas como antioxidantes por los tres modelos.	

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Tipos y número de índices topológicos.....	59
<b>Tabla 2:</b> Ficha técnica de la red neuronal artificial.....	69
<b>Tabla 3:</b> Preparación de las muestras.....	73
<b>Tabla 4:</b> Coeficientes de la función discriminante en SPSS.....	82
<b>Tabla 5:</b> Principales estadísticos en SPSS.....	82
<b>Tabla 6:</b> Ejemplo de resultados de coeficientes en SPSS.....	84
<b>Tabla 7:</b> Resultados del grupo de entrenamiento en SPSS.....	85
<b>Tabla 8:</b> Resultados de la validación cruzada del grupo de entrenamiento en SPSS.....	85
<b>Tabla 9:</b> Resultados del grupo test en SPSS.....	86
<b>Tabla 10:</b> Resultados de las moléculas del grupo test activos en SPSS.....	86
<b>Tabla 11:</b> Resultados de las moléculas del grupo test no activos en SPSS.....	87
<b>Tabla 12:</b> Descriptores utilizados en R 3.0.1.....	88
<b>Tabla 13:</b> Coeficientes de la función discriminante en R 3.0.1.....	89
<b>Tabla 14:</b> Principales estadísticos en R 3.0.1.....	89
<b>Tabla 15:</b> Resultados del grupo de entrenamiento en R 3.0.1.....	89
<b>Tabla 16:</b> Resultados de la validación cruzada grupo de entrenamiento en R 3.0.1.....	90
<b>Tabla 17:</b> Resultados del grupo test en 3.0.1.....	90
<b>Tabla 18:</b> Resultados de las moléculas del grupo test activos en 3.0.1.....	91
<b>Tabla 19:</b> Resultados de las moléculas del grupo test no activos en R 3.0.1.....	92
<b>Tabla 20:</b> Resumen de la distribución de los grupos en redes neuronales artificiales.....	93
<b>Tabla 21:</b> Resultados de las redes neuronales artificiales.....	93
<b>Tabla 22:</b> Resultados de los grupos en redes neuronales artificiales.....	94
<b>Tabla 23:</b> Resultados de la búsqueda guiada en los tres modelos.....	96
<b>Tabla 24:</b> Actividad farmacológica de los 43 principios activos clasificados como antioxidantes.....	99
<b>Tabla 25:</b> Resultados del estudio de la capacidad antioxidante.....	113



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representación del isopentano.....	15
<b>Figura 2:</b> Representación del ciclohexano.....	15
<b>Figura 3:</b> Matriz de adyacencia del isopentano y ciclohexano.....	18
<b>Figura 4:</b> Matriz de distancia del butano.....	18
<b>Figura 5:</b> Esquema de los mecanismos de la lipoperoxidación.....	29
<b>Figura 6:</b> Estructura química del MDA.....	30
<b>Figura 7:</b> Complejo 1:2 MDA:TBA.....	30
<b>Figura 8:</b> Estructura química del (+)- $\alpha$ -tocoferol.....	33
<b>Figura 9:</b> Estructura química del ácido ascórbico.....	34
<b>Figura 10:</b> Estructura química del glutatión.....	35
<b>Figura 11:</b> Estructura química del betacaroteno.....	35
<b>Figura 12:</b> Estructura química del ácido cafeico.....	36
<b>Figura 13:</b> Estructura química de la 2-fenilbenzopirona.....	36
<b>Figura 14:</b> Estructura química de la quercetina.....	37
<b>Figura 15:</b> Estructura química y fichero Molfile de la tiourea.....	57
<b>Figura 16:</b> Esquema tipo de las redes neuronales artificiales.....	66
<b>Figura 17:</b> Ejemplo de recta de regresión MDA: Área.....	75
<b>Figura 18:</b> Distribución de las moléculas del estudio.....	81
<b>Figura 19:</b> Gráfico de resultados del grupo de entrenamiento activos.....	83
<b>Figura 20:</b> Gráfico de resultados del grupo de entrenamiento no activos.....	83
<b>Figura 21:</b> Estructura química del captopril.....	102
<b>Figura 22:</b> Recta de regresión MDA: captopril.....	102
<b>Figura 23:</b> Estructura química de la nistatina.....	103
<b>Figura 24:</b> Recta de regresión MDA: nistatina.....	103
<b>Figura 25:</b> Estructura química del atenolol.....	104
<b>Figura 26:</b> Recta de regresión MDA: atenolol.....	104
<b>Figura 27:</b> Estructura química de la simvastatina.....	105
<b>Figura 28:</b> Recta de regresión MDA: simvastatina.....	105
<b>Figura 29:</b> Estructura química de la sertralina.....	106
<b>Figura 30:</b> Recta de regresión MDA: sertralina.....	106

<b>Figura 31:</b> Estructura química de la progesterona.....	107
<b>Figura 32:</b> Recta de regresión MDA: progesterona.....	107
<b>Figura 33:</b> Estructura química del 5-FU.....	108
<b>Figura 34:</b> Recta de regresión MDA: 5-FU.....	108
<b>Figura 35:</b> Estructura química del S-81.....	109
<b>Figura 36:</b> Recta de regresión MDA: S-81.....	109
<b>Figura 37:</b> Estructura química del S-86.....	110
<b>Figura 38:</b> Recta de regresión MDA: S-86.....	110
<b>Figura 39:</b> Estructura química del S-123.....	111
<b>Figura 40:</b> Recta de regresión MDA: S-123.....	111
<b>Figura 41:</b> Estructura química del ácido lipoico.....	112
<b>Figura 42:</b> Recta de regresión MDA: ácido lipoico.....	112
<b>Figura 43:</b> Estructura química de la doxiciclina.....	114

## **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. TOPOLOGÍA MOLECULAR

### 1.1. Generalidades

La topología es probablemente la más joven de las ramas clásicas de las matemáticas. En contraste con el álgebra, la geometría y la teoría de los números, cuyas genealogías datan de tiempos antiguos, la topología aparece en el siglo XVII, con el nombre de *analysis situs*, esto es, análisis de la posición.

En 1679, G. Leibniz (1646-1716) publica su famoso libro *Characteristica Geometrica*, en el cual (en términos modernos) intenta estudiar más las propiedades topológicas que las puramente métricas de las figuras. Insiste en que, aparte de la representación coordinada de figuras, “se necesita de otro análisis, puramente geométrico o lineal, que también defina la posición (*situs*), como el álgebra define la magnitud” (Macho, 2002).

Los matemáticos en el siglo XVIII muestran poco interés en topología, con la excepción de L. Euler (1707-1783) cuyo genio comprende todas las matemáticas y que inicia el estudio de la teoría de grafos, posteriormente desarrollada por en el siglo XIX por los matemáticos ingleses A. Cayley y J.J. Sylvester (Amigó *et al.*, 2007).

Los estudios SAR (Structure Activity Relationship) y QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) supusieron un importante avance en la caracterización de las moléculas. Hansch y sus colaboradores demostraron en 1963 que la actividad biológica de una molécula puede ser cuantitativamente relacionada con parámetros físico-químicos (p.e. descriptores moleculares), por lo que introdujo la idea de que la actividad podía ser descrita por más de un parámetro. Mediante este método puede obtenerse una función que relaciona la respuesta biológica con parámetros descriptores de la estructura de una serie de análogos en función de ciertos factores fisicoquímicos, definidos como parámetros de solubilidad, electrónicos y estéricos (Hansch *et al.*, 1963).

Uno de los métodos QSAR es la topología molecular, que caracteriza la estructura molecular a través de índices topológicos llamados índices de Conectividad que llevan información sobre el número de átomos, los enlaces, las insaturaciones, el ensamblaje topológico o conectividad de la molécula.

El origen de la topología molecular, también conocida como conectividad molecular, hay que buscarlo en los años 1970, cuando Kier y Hall y otros investigadores

comenzaron a utilizar 'índices' derivados de las propiedades de conectividad de las moléculas para estudiar algunas propiedades fisico-químicas (como el calor de formación y la temperatura de ebullición) de compuestos orgánicos.

De manera informal, la topología se ocupa de aquellas propiedades de las figuras que permanecen invariantes, cuando dichas figuras son plegadas, dilatadas, contraídas o deformadas, de modo que no aparezcan nuevos puntos, o se hagan coincidir puntos diferentes. La transformación permitida presupone, en otras palabras, que hay una correspondencia biunívoca entre los puntos de la figura original y los de la transformada, y que la deformación hace corresponder puntos próximos a puntos próximos. Esta última propiedad se llama continuidad, y lo que se requiere es que la transformación y su inversa sean ambas continuas: así, trabajamos con homeomorfismos.

El topólogo considera los mismos objetos que el geómetra, pero de modo distinto: no se fija en las distancias o los ángulos, ni siquiera de la alineación de los puntos. Para el topólogo un círculo es equivalente a una elipse; una bola no se distingue de un cubo: se dice que la bola y el cubo son objetos topológicamente equivalentes, porque se pasa de uno al otro mediante una transformación continua y reversible.

## **1.2. Teoría de grafos**

La teoría de grafos es una disciplina matemática a la que se le han encontrado múltiples aplicaciones interdisciplinarias y particularmente en áreas de la química como en química sintética, química de los organometálicos, química del petróleo, termoquímica, cinética química, mecánica estadística, equilibrios de fase, etc.

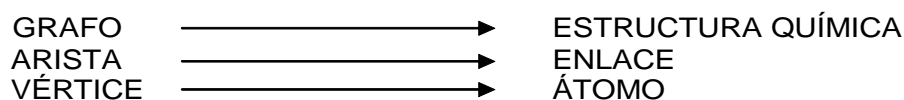
Concretamente, en la química estructural la teoría de grafos ha facilitado enormemente la comprensión del concepto de estructura química al representarla como un grafo.

Un grafo representa las interconexiones de los elementos dentro de un conjunto, y en el caso de una molécula las conexiones son los enlaces químicos entre sus átomos. La aplicación química de la teoría de grafos fue desarrollada por Randić (Randić, 1975) y Kier y Hall (Kier *et al.*, 1976; Kier *et al.*, 1986) en una serie de artículos

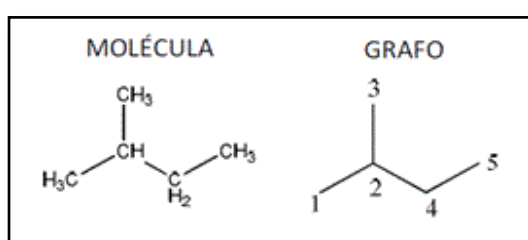
publicados en la década de los 70. Siguiendo a estos autores, esta visión parte del establecimiento de las equivalencias:

**MATEMÁTICA**

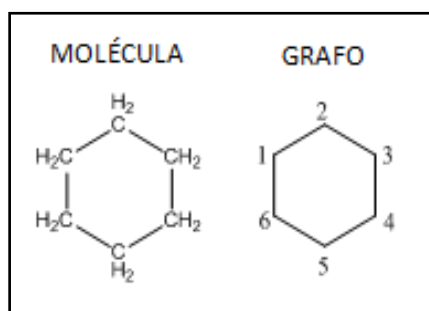
**QUÍMICA**



A continuación se representa la estructura química y el grafo de hidrógenos suprimidos del isopentano y ciclohexano (**figura 1 y figura 2**).



**Figura 1. Representación del isopentano.**



**Figura 2. Representación del ciclohexano.**

Desde este punto de vista, la cuestión fundamental es qué átomo está ligado a cualquier otro y cuál es el camino para ir de un átomo a otro dentro de la molécula, sin necesidad de estudiar aspectos tales como la morfología tridimensional del compuesto, la naturaleza y la longitud de los enlaces químicos que ligan los átomos o los ángulos entre dichos enlaces.

Un grafo  $G$  viene definido por una serie de elementos o términos que se especifican a continuación (Amigó *et al.*, 2009):

- Vértice o nodo: cada uno de los puntos que forman parte de un grafo, viene representado por  $v_i$ . La letra  $n$  se emplea para designar el número total de vértices que constituyen el grafo.

- Arista: cada una de las líneas que conecta dos vértices en un grafo. Una arista se designa haciendo referencia a los vértices que la limitan  $(v_i, v_j)$ , éstos vértices son llamados extremos. La letra  $m$  se emplea para designar el número total de aristas que aparecen en el grafo.

- Grafo de hidrógenos suprimidos: se trata de la representación del esqueleto carbonado de una molécula, sin representar los átomos de hidrógeno, los cuales se presuponen en función de la valencia del carbono.

- Grafo libre o de árbol: aquel que no contiene ninguna estructura cíclica en su representación, donde se cumple que  $m = n - 1$ .

- Circuito: Grafo que contiene una estructura cíclica.

- Subgrafo: es una porción de un grafo; entendiéndose por tal, cualquier parte de un grafo constituido por una o varias de sus aristas interconectadas. Los subgrafos se clasifican según su orden  $m$  y su tipo  $t$ . El orden de un subgrafo no es más que el número de aristas que contiene. A su vez, se clasifican en cuatro tipos: *path*, *cluster*, *path-cluster* y *chain*.

- Tipo *PATH* ( $t = p$ ), son aquellos subgrafos en los que los grados de sus vértices son menores o iguales a 2.

- Tipo *CLUSTER* ( $t = c$ ), constituido por aquellos subgrafos que tienen por lo menos algún vértice con grado 3 o 4, pero ninguno con grado 2.

- Tipo *PATH-CLUSTER* ( $t = pc$ ), son los subgrafos que incluyen vértices con grado 2, además de alguno con valores 3 o 4.

- Tipo *CHAIN* ( $t = ch$ ), formado por secuencias de enlaces conteniendo al menos un ciclo.

- Grado o valencia del vértice  $v_i$ : se define como el número de aristas del que  $v_i$  es extremo y se designa como  $\delta_i$ . La suma de las valencias de cada uno de los vértices de que está compuesto el grafo es igual al doble del número de aristas del grafo:  $\sum \delta_i = 2m$ .

- Arista secuencia en  $G$ : se define como un grupo de aristas conectadas en  $G$  y representadas por  $(v_i, v_j) (v_j, v_k) (v_k, v_l) \dots (v_{m-1}, v_m)$  donde cada arista termina en dos



vértices que son extremos de otras aristas en la secuencia, con la excepción de los vértices terminales.

- Longitud de una secuencia es el número de aristas que tiene.

La caracterización estructural contenida en el grafo molecular puede ser, a su vez, encapsulada de muy diversas maneras como, por ejemplo, mediante matrices, índices numéricos, polinomios, espectros, grupos u operadores (Macho, 2002).

Existen otras categorías de grafos, utilizadas en química, conocidos como *grafos de reacción*. Estos grafos se utilizan en cinética química y la síntesis de compuestos orgánicos asistida por ordenador (Temkin *et al.*, 1996).

### 1.3. Matriz topológica

Para cualquier tipo de grafo, es posible definir una matriz de adyacencia y una matriz de distancia. Ambas matrices son simétricas.

La matriz de adyacencia es quizá el instrumento algebraico más sencillo en nuestro contexto ya que únicamente da información sobre qué pares de nodos están unidos mediante aristas. Si la molécula en cuestión consta, pues, de  $N$  átomos, la matriz de adyacencia del grafo molecular  $G$ ,  $A = A(G)$ , es una matriz  $N \times N$  simétrica (Sylvester, 1878).

Para construir la matriz, en primer lugar se representa el grafo correspondiente a la molécula estudiada, suprimiendo los hidrógenos (grafo de hidrógenos suprimidos). A continuación, se numeran los vértices del grafo sin importar el orden en que se haga. Finalmente se construye la matriz topológica o adyacente  $A$ , cuyos elementos adquieren valores nulos o no en función de las conexiones existentes entre los distintos elementos del grafo.

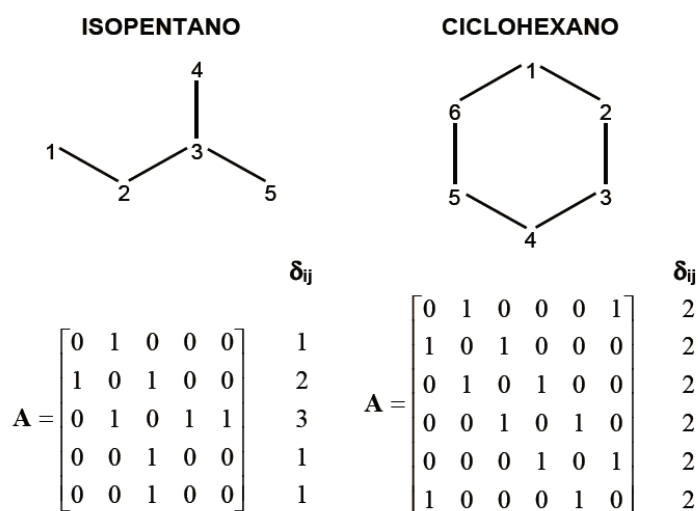
Esta matriz cuadrada de  $n$  filas por  $n$  columnas, siendo  $n$  el número de vértices del grafo, es simétrica.

El grado topológico o valencia de cada vértice,  $\delta_{ij}$ , es igual a la suma de los valores que hay en la fila o columna correspondientes a dicho vértice o lo que es lo mismo, el número de aristas que llegan a él, es decir:

$$\delta_{ij} = \sum_{j=1}^m a_{ij}$$

Como se aprecia, es un tipo de expresión matemática que relaciona la estructura mediante una descripción numérica. Su importancia en los estudios estructura-actividad radica en que a partir de ella se calculan la mayoría de los índices topológicos.

La **figura 3** ilustra la construcción de la matriz topológica de adyacencia para el isopentano y el ciclohexano, junto con los valores obtenidos para las valencias de los diferentes átomos.

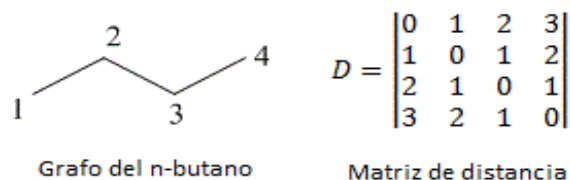


**Figura 3. Matriz de adyacencia del isopentano y ciclohexano.**

La matriz de distancia (fig. 4),  $D = D(G)$ , es una matriz  $N \times N$  simétrica cuyas componentes son las 'distancias topológicas'.

Así, pues,  $D$  proporciona una imagen cualitativa de las relaciones de proximidad o lejanía entre los átomos de la molécula.

A continuación se representa el grafo de hidrógenos suprimidos del butano y su matriz de distancia (**figura 4**).



**Figura 4. Matriz de distancia del butano.**

Otras matrices utilizadas en topología molecular incluyen la matriz de distancias recíprocas, la matriz *detour*, la matriz de resistencia, etc.

#### 1.4. Índices topológicos

Un índice topológico o descriptor molecular es el resultado final de un cálculo lógico y matemático que transforma la información química codificada en una simbólica representación de la molécula, en un número útil o en un resultado de algún experimento normalizado (Todeschini *et al.*, 2000).

Estos índices pueden usarse directamente o en combinación con otros como descriptores numéricos con el objetivo de obtener relaciones cuantitativas estructura-propiedad (QSPR) ó relaciones cuantitativas estructura actividad (QSAR) (García-Domenech *et al.*, 2007).

Por lo tanto, la finalidad de los índices topológicos es codificar información topológica sobre las moléculas de forma puramente numérica. Este formato facilita enormemente la búsqueda automatizada de moléculas con propiedades estructurales comunes y, por tanto, posibles candidatos a compartir propiedades químicas o farmacológicas deseadas. La relación entre grafos e índices topológicos no es unívoca, de manera que dado un índice topológico o un conjunto de ellos, en general no es posible identificar el grafo molecular correspondiente; esto es lo que se llama el *problema de degeneración*. Es esta degeneración, justamente, la que permite identificar grupos de moléculas con propiedades comunes mediante índices topológicos. El adjetivo 'topológico' hace referencia a que la información contenida en los índices es invariante respecto a propiedades 'no esenciales', como pueden ser la numeración de los nodos, las distancias reales entre átomos o todas aquellas distorsiones de la molécula que no modifiquen el grafo subyacente.

Para evitar el uso indiscriminado de este tipo de índice, Randić propuso una serie de atributos deseables para los índices topológicos (Randić, 1991);

1. Interpretación estructural directa. Índices basados en conceptos estructurales sencillos ayudan a interpretar propiedades en términos de estructura química.
2. Buena correlación con al menos una propiedad. Esto sugiere el aspecto estructural dominante en la propiedad.
3. Buena discriminación de isómeros. Necesario cuando la propiedad en estudio cambia con el isómero.

4. Localmente definidos. Es decir, que no se obtengan de forma global, sino localmente como en los índices de conectividad, en que se definen por la conectividad de cada átomo.

5. Generalizable a análogos superiores. Por ejemplo, los índices  $1\chi$ ,  $2\chi$ ,  $3\chi$ , ..., etc.

6. Linealmente independientes. Permite describir información estructural no contenida en otros índices.

7. Simplicidad. Facilita su interpretación.

8. Que no estén basados en propiedades físico-químicas.

9. Que no estén relacionados de manera trivial con otros índices.

10. Eficiencia de construcción. Facilita su cálculo.

11. Basados en conceptos estructurales familiares.

12. Mostrar una dependencia correcta con el tamaño. Las propiedades que dependen del tamaño y en general, la selectividad de los índices disminuye con el tamaño del grafo.

13. Tener cambios graduales con cambios graduales en la estructura.

El primer índice fue propuesto por Wiener en 1947 para la caracterización de moléculas con ramificaciones (Wiener, 1947). Otros muchos índices se han definido desde finales de los 40, entre los que destacan el de Hosoya (Hosoya, 1971), el de Randić, los índices de conectividad de Kier y Hall, el de Balaban (Devillers *et al.*, 1999). Posteriormente Kier y Hall modifican los índices de conectividad con el fin de introducir la contribución de los heteroátomos.

Cada autor introduce dentro de su modelo parámetros que considera importantes para tratar de explicar algunas de las características propias de las moléculas, lo cual ha conducido al desarrollo de índices muy elaborados que incluyen el análisis de la información tridimensional.

Como ejemplo se pueden citar el propuesto por Hahn-Rogers, como una nueva técnica para usar modelos receptores de superficies como descriptores para QSAR, y por medio de este modelo se pueden establecer también técnicas 3D-QSAR (Hahn *et al.*, 1995).

Pogliani usa una combinación lineal de índices de conectividad (LCCI) y una combinación lineal de índices ortogonales de conectividad (LCOCI), definidos a partir

de bases mínimas y extendidas de dichos índices, para relacionar la estructura con la solubilidad y puntos de ebullición de homólogos de la cafeína (Pogliani, 1995).

Actualmente, se utilizan miles de descriptores topológicos para estudiar propiedades y actividades en las moléculas. Los principales programas informáticos de cálculo de estos índices son Approbe, Codessa, ClujTopo, Dragon, Molgen, Molconn-Z, Tops-Mode (García-Domenech *et al.*, 2007). Más recientemente se dispone de PaDEL-Descriptor.

Siguiendo a Lowell Hall y Lemont Kier podemos clasificar los índices en:

1. Índices de Conectividad Molecular: codifican el tamaño, ramificaciones, insaturación, presencia de heteroátomos y ciclos en las moléculas objeto de estudio. Recogen información electrónica a través del recuento de electrones sigma, pi así como de pares libres de electrones.

2. Índices Kappa: representan atributos referentes a la forma de la molécula y se derivan del recuento de los diferentes enlaces sencillos, dobles y triples presentes en las moléculas.

3. Índices del estado topológico: recogen información del entorno de un átomo debido al resto de átomos presentes en la molécula y más o menos próximos a él. Se basa en cada una de las secuencias de átomos y enlaces que emanan del mismo.

4. Índices del estado electrotopológico: codifican la información referente tanto al entorno topológico de un átomo como a las interacciones electrónicas debidas a la presencia del resto de átomos de la molécula. Permiten caracterizar la polaridad presente en la molécula así como la capacidad de la misma de formar enlaces por puente de hidrógeno

5. Hay otros índices como los topológicos geométricos, de carga, basados en la teoría de la Información...

### **1.5. Aplicaciones**

La topología molecular sirve para encontrar relaciones cuantitativas entre una propiedad física, química o biológica y estructuras moleculares, basándose en la caracterización numérica de las mismas a través de unos índices o descriptores topológicos (Gálvez *et al.*, 1995). Una vez calculados estos descriptores topológicos

para los compuestos con la determinada actividad farmacológica se obtienen las funciones de predicción para cada uno de los compuestos activos, y las de clasificación que permiten discriminar entre compuestos activos e inactivos. A continuación se diseñan los modelos de actividad farmacológica, haciendo uso de las funciones seleccionadas, y se aplican a bases de datos moleculares para la selección de sustancias potencialmente activas. Los resultados obtenidos con las funciones de predicción informan que teóricamente presentan un buen perfil farmacológico, lo que nos induce a considerar a estas moléculas como posibles cabezas de serie para el diseño de nuevos fármacos.

Finalmente, se realizan los ensayos experimentales *in vivo* o *in vitro* encaminados a detectar la posible actividad de los compuestos seleccionados.

En los últimos años la Topología Molecular ha demostrado ser una poderosa herramienta para la generación *in silico* de nuevos fármacos. Un rasgo importante de la Topología Molecular es la posibilidad de descubrir o diseñar nuevos fármacos sin el conocimiento exacto del mecanismo de acción, a diferencia de otras técnicas (Gálvez *et al.*, 2012).

El diseño de fármacos y la predicción de nuevas propiedades biológicas o farmacológicas se han extendido en los últimos años a todos los ámbitos de la terapéutica. A continuación se citan algunos de estos estudios.

En el campo de la terapia antiinfecciosa se han realizado numerosos estudios con resultados interesantes:

Se ha realizado un análisis discriminante con el objetivo de encontrar nuevas moléculas con propiedades antimaláricas, y su posterior validación *in vitro* (Mahmoudi *et al.*, 2008).

Mediante análisis lineal discriminante se ha realizado una selección de compuestos para estudiar su actividad frente *Mycobacterium avium* (García-García *et al.*, 2004).

Se ha desarrollado un modelo topológico-matemático para la búsqueda de nuevos derivados bisfosfonatos activos frente a la hexokinasa de *Trypanosoma cruzi* con nuevas moléculas potencialmente activas propuestas (García-Domenech *et al.*, 2008).

Usando el análisis de regresión multilíneal, se ha propuesto un modelo topológico-matemático de predicción de la actividad anti-VIH-1 para un grupo de compuestos análogos al aciclovir y ganciclovir (García-Domenech *et al.*, 2010).

Otro estudio seleccionó nuevos potenciales agentes antibacterianos tras realizar un análisis lineal discriminante de la actividad antibacteriana en una amplia base de datos (De Gregorio-Alapont *et al.*, 2000).

Recientemente, nuestro grupo de investigación desarrolló un modelo topológico con el objetivo de obtener nuevos compuestos con potencial actividad acaricida (Mérida *et al.*, 2013).

A continuación se cita brevemente algunos estudios de diversos campos de la terapéutica.

Se ha realizado un análisis discriminante con el objetivo de encontrar nuevas moléculas con propiedades antihipoglucemiantes, y su posterior validación *in vitro* (Calabuig *et al.*, 2004).

Se ha estudiado el diseño de nuevos antihistamínicos demostrando la complejidad y las diferencias de los cuatro receptores de la histamina (Gálvez *et al.*, 2013).

Se han determinado nuevos compuestos con actividad broncodilatadora utilizando la teofilina como fármaco de referencia (Rios-Santamarina *et al.*, 2004).

Se ha aplicado también el análisis lineal discriminante en la predicción de nuevos compuestos con actividad anticonvulsivante (Bruno-Blanch *et al.*, 2003).

En el campo de la terapéutica analgésica el uso de la topología molecular ha alcanzado interesantes resultados (Gálvez *et al.*, 1994).

También se ha realizado una aproximación de los descriptores topológicos en relación a la actividad antioxidante de las moléculas (Velkov., 2009).

Se dispone de numerosos estudios en relación a diversas familias químicas y el cáncer en estudios QSAR. También existen revisiones de los distintos estudios (Malik *et al.*, 2007).





## 2. ANTIOXIDANTES

Es generalmente aceptado que inmediatamente después de los catastróficos acontecimientos que dieron lugar a la formación del planeta Tierra, aparecieron grandes cantidades de oxígeno molecular y con él, los radicales libres. Así como estas condiciones tan violentas pudieron ser fácilmente el impulso para la adaptación de los primeros organismos, sin la presencia de poderosos antioxidantes, la vida no habría podido seguir adelante (Gutteridge *et al.*, 2010).

Desde la Antigüedad, el ser humano ha hecho uso de los vegetales como remedios medicinales. Estos remedios se atribuyen particularmente a los efectos biológicos de sus metabolitos secundarios con actividad antioxidante, como son la vitamina C y E, los carotenoides y los compuestos fenólicos (Ndhlala *et al.*, 2010).

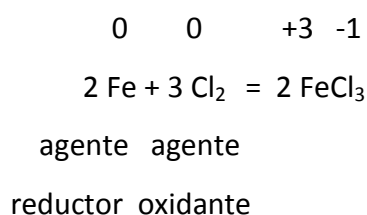
### 2.1. Agentes reductores y agentes oxidantes: reacciones *redox*

El término “oxidación” originalmente se refería a la combinación de una sustancia con el oxígeno. Esto provoca un aumento en el número de oxidación de un elemento de dicha sustancia. Las reacciones en las cuales las sustancias experimentan un cambio en el número de oxidación se conocen como reacciones de óxido-reducción o simplemente, reacciones *redox*.

Se define a los agentes oxidantes como las sustancias que experimentan disminución del número de oxidación (ganan electrones) y oxidan a otras sustancias. Los agentes oxidantes siempre se reducen.

Se define a los agentes reductores como las sustancias que experimentan aumento del número de oxidación (pierden electrones) y reducen a otras sustancias. Los agentes reductores siempre se oxidan (Whitten, 1992).

A continuación se expone un ejemplo de reacción *redox*, donde se aprecia el cambio en el número de oxidación de los átomos de hierro (Fe) y cloro (Cl).



## 2.2. Estrés oxidativo

La vida aerobia se caracteriza por una formación constante de prooxidantes balanceada por la desaparición de los mismos debida a los antioxidantes. Se define estrés oxidativo como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros (Sies, 1991).

También se puede definir como una alteración producida por un desequilibrio entre la generación de radicales libres y la defensa antioxidante, que puede conducir a un estado dañino para el organismo (Kehrer, 1993).

### 2.2.1. Radicales libres

Se denominan radicales libres a cualquier especie química de existencia independiente que posee uno o más electrones desapareados en sus orbitales atómicos externos. Esta configuración, electroquímicamente muy inestable, le confiere la propiedad de ser altamente reactiva y de corta vida (Halliwell, 1987).

Una vez formados, los radicales libres interactúan con otras moléculas a través de reacciones *redox* con el fin de lograr una configuración más estable. De esta forma, desestabilizan la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo producir reacciones en cadena.

La terminología empleada para designar estas especies químicas presenta cierta confusión. En el organismo y en condiciones normales, la mayoría de los radicales libres (RL) proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno, como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH\bullet$ ), el radical peroxilo ( $ROO\bullet$ ) y el radical alcoxilo ( $RO\bullet$ ). Por este motivo muchos autores los llaman “especies reactivas de oxígeno” (ROS). Estas dos denominaciones (RL y ROS), no son exactamente sinónimos, puesto que algunas ROS no son radicales, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ácido hipocloroso (HClO) o el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). Otros autores hablan de oxidantes. Por todas estas razones lo habitual es referirse indistintamente a los radicales libres, las ROS o los oxidantes.

Existen también las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que derivan del metabolismo del óxido nítrico. El óxido nítrico, debido al electrón desapareado que presenta en su orbital más externo es por sí mismo un radical, pero además, en su

metabolismo tienen lugar reacciones con el oxígeno molecular, ROS, metales de transición o tioles que darán lugar a la producción de RNS como el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), trióxido dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), o nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), destacando entre ellas el primero por su alta reactividad. Por lo tanto, también existe el concepto de estrés nitrosativo, que se produce cuando existe una producción excesiva o desregulada del óxido nítrico y las especies reactivas del nitrógeno que de él derivan (Hausladen *et al.*, 1999).

Otros RL descritos contienen carbono o fósforo como centro reactivo.

Los radicales libres, como se describe a continuación, intervienen tanto en situaciones fisiológicas como patológicas en el organismo vivo.

Se ha demostrado la función de los radicales libres en la defensa antimicrobiana y antitumoral, también como mensajeros e inductores genéticos (Satriano *et al.*, 1993; Zimmerman *et al.*, 2002). Pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas, (Fillebeen *et al.*, 2002; Minamiyama *et al.*, 2007) o, contribuir a la regulación de la extensión del proceso inflamatorio (Bourbon *et al.*, 2004). Además, se ha postulado que el balance oxidante-antioxidante puede intervenir en el proceso de la apoptosis (Svensk *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2007). El óxido nítrico interviene en la regulación de funciones en los sistemas inmunológico, cardiovascular y nervioso (Mayer *et al.*, 1997).

Los radicales libres pueden relacionarse, entre otros, con la hipertensión (Touyz, 2004), el cáncer (Dreher *et al.*, 1996; Valko *et al.*, 2006), la disfunción cardiovascular (Ramachandran *et al.*, 2003a), la inflamación (Telfer *et al.*, 2004), y enfermedades como la diabetes (Arnal *et al.*, 2010; Muriach *et al.*, 2006), el SIDA (Jareno *et al.*, 2002) etc. Estos radicales pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos, pudiendo conducir a alteraciones de macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas el DNA (provocando mutaciones), lípidos de membrana (provocando su peroxidación) o proteínas (alterando actividades enzimáticas) y pudiendo producir en último término apoptosis y muerte neuronal (Li *et al.*, 2002; Paravicini *et al.*, 2008).

Los RL y ROS proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas.

Dentro de las fuentes endógenas de producción de radicales libres podemos incluir las siguientes:

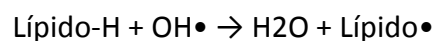
1. La cadena electrónica mitocondrial (Kas *et al.*, 1986).
2. Una excesiva actividad de la NADPH fagocitaria (Gabig *et al.*, 1979).
3. La activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios (Winyard, 1999).
4. La deslocalización de metales de transición ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$ ) de sus sitios de depósito (Halliwell *et al.*, 1986).
5. La hiperactividad de la xantina oxidasa (Chambers *et al.*, 1985).
6. La activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (Beckman *et al.*, 1990).
7. Menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes (Giugliano *et al.*, 1996)

Algunas de las fuentes exógenas de daño oxidativo son:

1. Radiaciones ionizantes (Fridovich, 1983).
2. Aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorias (Halliwell *et al.*, 1986).
3. Acción de xenobióticos y fármacos (Trush *et al.*, 1982).

### **2.2.2. Peroxidación lipídica**

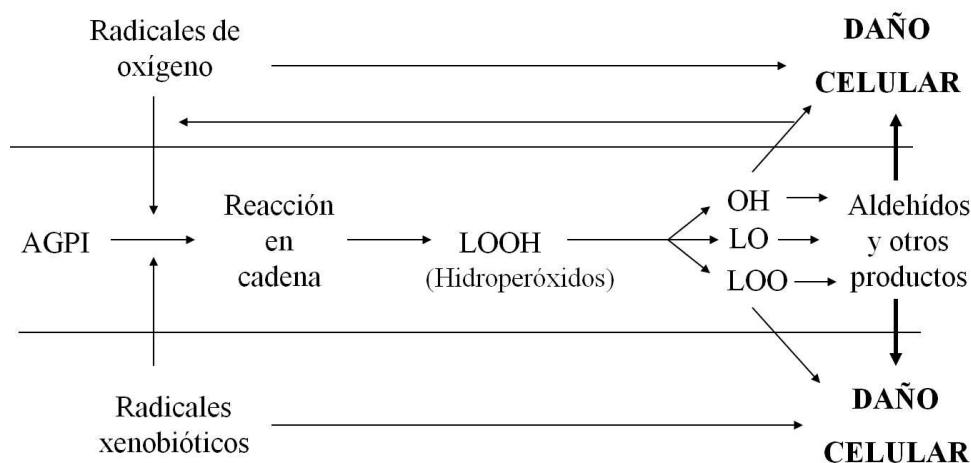
Se define como el deterioro oxidativo de grasas oxígeno dependiente, y sobre todo de los ácidos grasos poliinsaturados. Generalmente ocurre cuando el radical hidroxilo ( $\text{OH}\bullet$ ) es generado en la proximidad de las membranas y ataca a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, como el ácido araquidónico.



Existen tres etapas en la peroxidación lipídica: iniciación, propagación y terminación. Un  $\bullet\text{OH}$  puede convertir cientos de ácidos grasos de la membrana en lípidos hidroperoxidados, que son muy inestables y rápidamente se descomponen en otros productos, pudiéndose producir nuevos radicales libres que pueden a su vez

iniciar nuevas cadenas de peroxidación. Es precisamente en la propagación del daño oxidativo donde radica la mayor importancia de los RL.

En el siguiente esquema se aprecia el mecanismo de la peroxidación lipídica (figura 5).



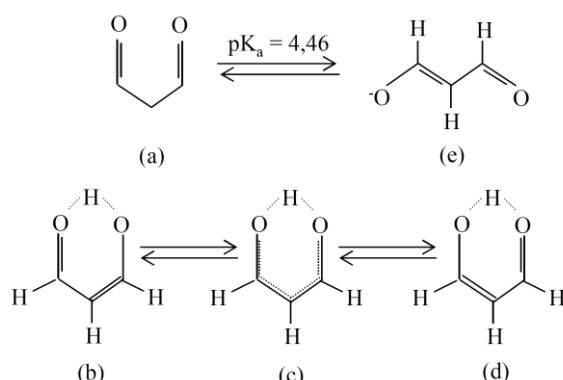
AGPI: Ácidos Grasos Poliinsaturados

**Figura 5. Esquema de los mecanismos de la lipoperoxidación (Janero, 1990).**

Entre los diferentes aldehídos que se producen en la peroxidación de lípidos, los más intensamente estudiados han sido el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos, en particular el 4-hidroxinonenal (HNE) y el 4-hidroxihexenal (Esterbauer *et al.*, 1991).

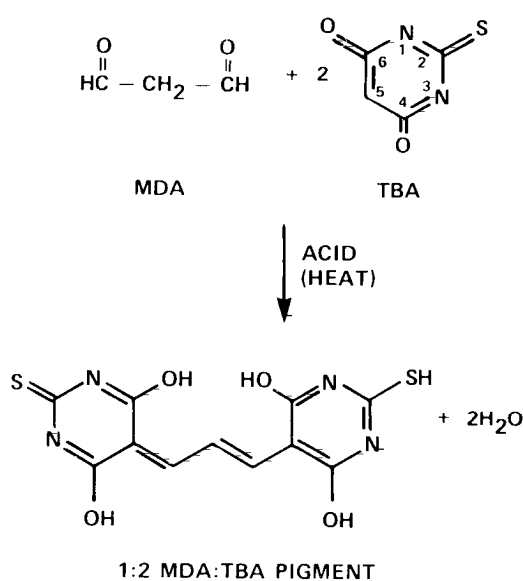
El MDA es una molécula volátil, de bajo peso molecular (PM = 72,07), con un grupo 1,3-dicarbonilo siendo moderadamente ácido. En solución y en fase gaseosa, el MDA está enteramente enolizado manteniéndose a través de un enlace de hidrógeno intramolecular un equilibrio entre dos formas asimétricas. Resulta de la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente del ácido araquidónico. Han sido varias las rutas propuestas para esta formación (Pryor *et al.*, 1975; Wilson, 1979), pero todas implican una primera ciclación del ácido graso poliinsaturado originario, que tras sucesivos intermediarios, se rompe para formar, entre otros productos de degradación, el MDA. Dado que este compuesto es un producto final común de la peroxidación lipídica independientemente del ácido graso poliinsaturado oxidado, su determinación ha sido aceptada ampliamente como

marcador de este proceso (Bosch-Morell *et al.*, 1998; Halliwell, 2000; Bunnag, 2006; Surekha *et al.*, 2007).



**Figura 6. Estructura química del MDA (Janero, 1990).**

Desde que el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos han sido implicadas causalmente en la patogénesis de algunas enfermedades humanas, la determinación de productos remanentes de la peroxidación de lípidos, como el MDA, en tejidos o fluidos humanos, ha recibido considerable atención. Hasta ahora se han utilizado mayoritariamente técnicas que se basan en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA). En la siguiente figura se observa la formación del complejo de dos moléculas de TBA con una molécula de MDA (**Figura 7**).



**Figura 7. Complejo 1:2 MDA:TBA**

La literatura señala a la determinación de MDA por HPLC como una de las más adecuadas para reflejar el índice de peroxidación lipídica de una muestra biológica, siendo ésta precisamente la utilizada en nuestro estudio.

### **2.3. Defensas y tipos de antioxidantes**

Dado que los RL se producen constantemente de forma inevitable en los procesos metabólicos, el organismo ha desarrollado un poderoso y complejo sistema de defensa para limitar la exposición a estos agentes (Yu, 1994).

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell *et al.*, 1986). También se han definido como sustancias que, a bajas concentraciones, previenen o retrasan la oxidación de moléculas fácilmente oxidables como lípidos, proteínas y ADN (Becker *et al.*, 2004).

Generalmente se clasifican como antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos.

Los antioxidantes no enzimáticos se han clasificado también como (Hurrell, 2003):

- Minerales: son los cofactores de las enzimas antioxidantes. Se incluye el selenio, cobre, hierro, zinc y manganeso.

- Vitaminas: necesarias para gran mayoría de funciones metabólicas. A destacar vitamina C, vitamina E y vitaminas del grupo B.

- Fitoquímicos: compuestos fenólicos que no son vitaminas ni minerales y que proporciona la naturaleza. Ejemplos de los mismos son los flavonoides, catequinas, carotenoides, terpenoides, etc.

Asimismo, se clasifica a los antioxidantes no enzimáticos como hidrosolubles (vitamina C y compuestos fenólicos) o liposolubles (vitamina E y carotenoides). También se pueden clasificar en base al mecanismo que utilizan para ejercer su acción protectora o en base al lugar donde ejercen la acción, ya sea intra o extracelularmente (Chihuailaf, 2002).

Un componente adicional en la defensa antioxidante son las proteínas de almacén y transporte de iones metálicos, cuya acción es secuestrar y limitar la exposición a los iones  $Fe^{3+}$  y  $Cu^{2+}$ , ya que su exceso promueve la generación de RL. Las

proteínas que desarrollan esta función son ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, metalotioneína, hemopexina y carnosina (Halliwell *et al.*, 1992; Morrisey *et al.*, 1998).

### **2.3.1. Antioxidantes enzimáticos**

Estas enzimas catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los RL. Posteriormente, los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos (Chaudière *et al.*, 1999).

#### **2.3.1.1. Superóxido dismutasa**

Es una metaloproteína presente en células aerobias y fluidos extracelulares. Su función es catalizar la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno. Presenta tres isoformas, según el metal que contenga.

#### **2.3.1.2. Catalasa**

Es una hemoproteína que contiene cuatro grupos *hem*. Se concentra principalmente en peroxisomas y mitocondrias para catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno, que procede de la dismutación del radical superóxido, en agua y oxígeno.

#### **2.3.1.3. Glutación peroxidasa**

Es una selenoproteína que, en las células animales, se ubica en la matriz mitocondrial y el citosol. En presencia de glutación, como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente. Existen cuatro isoformas que difieren tanto en su ubicación como en la especificidad de sustrato, tres de las cuales presentan estructura tetramérica.

#### **2.3.1.4. Peroxiredoxina**

Es una familia de enzima con seis isoformas muy abundante en las células de los mamíferos. Se ha demostrado que reduce hidroperóxidos y peroxinitritos mediante la



cesión de electrones procedentes de grupos tiol fisiológicos. Desempeñan múltiples funciones que ayudan a regular al balance oxidativo (Rhee *et al.*, 2011).

### 2.3.1.5 Otras

Existen otras enzimas que forman parte indirectamente de la defensa antioxidante, como la glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Ratnam *et al.*, 2006).

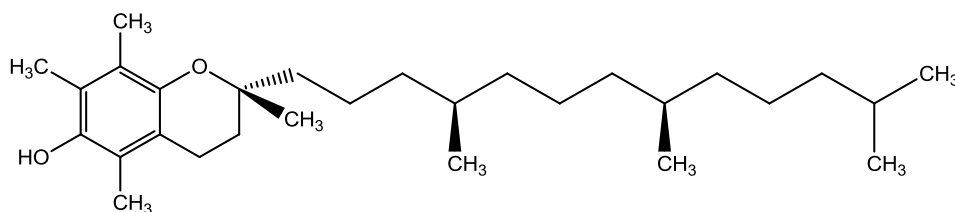
## 2.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

### 2.3.2.1. Vitamina E

La actividad propia de la vitamina E está asociada a ocho compuestos naturales presentes en las plantas, que se caracterizan por poseer un anillo cromano y una cadena lateral: en los tocoles, la cadena lateral es un fitol, y en los trienoles, la cadena lateral tiene, además, tres dobles enlaces en posición 3',7' y 11'. El *d*- $\alpha$ -tocoferol es la forma más activa.

Su principal acción antioxidante sería la de inhibir oxidaciones y mediadas por radicales libres, y muy particularmente las de ácidos grasos poliinsaturados por ser los elementos más susceptibles a la autooxidación. Puesto que ácidos grasos poliinsaturados forman parte importante de los fosfolípidos de membrana, su oxidación en cadena significa un grave deterioro en las funciones de la membrana. Resulta significativa la abundante presencia de  $\alpha$ -tocoferol en la membrana (Flórez, 2008, A).

Se considera que el  $\alpha$ -tocoferol es el antioxidante liposoluble más importante y constituye una primera línea de defensa de las membranas celulares frente al estrés oxidativo en las primeras etapas de ataque de los RL (Ndhlala *et al.*, 2010).



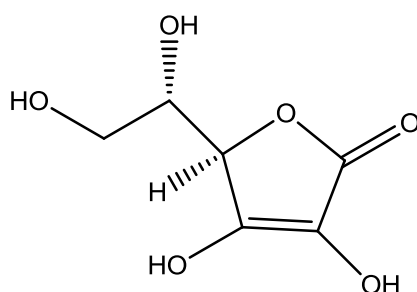
**Figura 8: Estructura química del (+)- $\alpha$ -tocoferol.**

Nota: las estructuras químicas se han dibujado mediante el uso del programa ChemDraw Ultra 12.0 (ChemDraw, 2010).

### 2.3.2.2. Vitamina C

La vitamina C ó ácido *L*-ascórbico es un azúcar ácido derivado del ácido gulónico, que se sintetiza a partir de la glucosa. Su principal característica es la de oxidarse en ácido deshidro-*L*-ascórbico para formar un sistema *redox*, que constituye la base de sus principales acciones fisiológicas.

Se encuentra abundantemente en frutas, verduras y órganos animales, como el hígado y el riñón.



**Figura 9: Estructura química del ácido ascórbico.**

Se comporta, entre otras funciones fisiológicas, como agente neutralizador de radicales libres (Flórez, 2008, B). Estos procesos transforman el ascorbato en deshidroascorbato. El retorno a su forma original requiere la acción enzimática por sustratos tiólicos (Powers *et al.*, 1999).

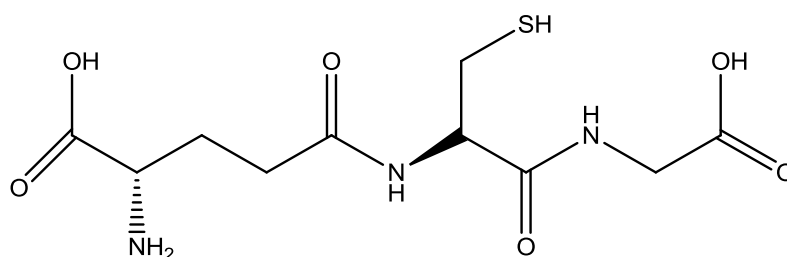
Asimismo, participa en el reciclaje de los radicales producidos por la oxidación de la vitamina E, convirtiendo el tocoferoxilo en vitamina E.

Se ha observado que la vitamina C puede actuar como pro-oxidante bajo determinadas circunstancias y producir daño celular (Baydar *et al.*, 2007).

### 2.3.2.3. Glutati3n

El glutati3n es un tripéptido (constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina) de interesantes propiedades biológicas debido a dos características estructurales: el enlace  $\gamma$ -glutamilo que lo protege de las peptidasas, y la presencia de un grupo tiol libre (-SH) que lo convierte en un compuesto muy reactivo con todo tipo de sustancias

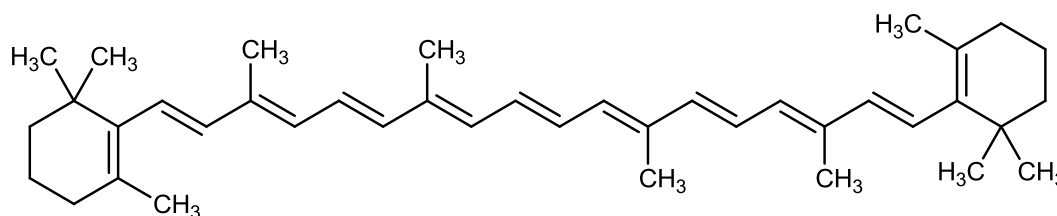
e incluso, consigo mismo (Meister *et al.*, 1983). Es el tior no proteico más abundante en prácticamente todas las células animales (Dringen, 2000) y su presencia se puede explicar por su función de protección frente a la toxicidad del oxígeno. Se considera estado del glutatión al equilibrio entre las distintas formas en las que este tripéptido se puede presentar (Kosower *et al.*, 1978). Podemos encontrarlo en forma de tior reducido (GSH), en forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos en su mayoría GS-S-proteína. Se denomina sistema glutatión, al conjunto formado por el glutatión y los enzimas relacionados con su metabolismo, que son además responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister *et al.*, 1983).



**Figura 10: Estructura química del glutatión.**

#### 2.3.2.4. Carotenoides

Son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma extensa en la naturaleza. Son compuestos lipófilos que se caracterizan por un extenso sistema de dobles enlaces conjugados responsable de sus propiedades antioxidantes. Protegen frente al oxígeno singlete por un mecanismo directo e inhiben también las reacciones de los RL (Sies *et al.*, 1995). El más abundante es el  $\beta$ -caroteno.

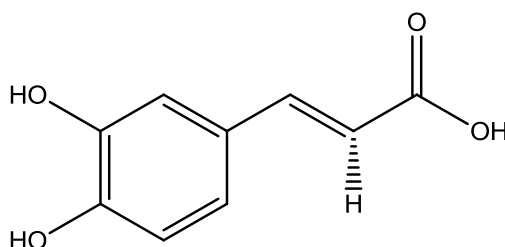


**Figura 11: Estructura química del betacaroteno.**

### 2.3.2.5. Compuestos fenólicos

La gran diversidad de los compuestos fenólicos presentes en la naturaleza están ampliamente representados en el reino vegetal. Todos ellos presentan en común un anillo bencénico que puede estar unido a grupos hidroxilos libres o combinados en forma de éster, éter, heterósidos, etc.

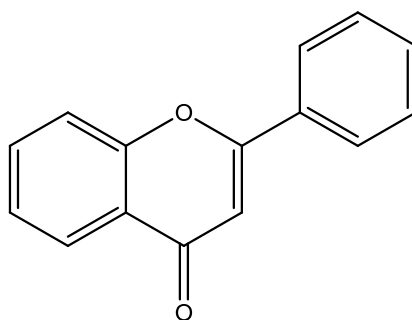
Las estructuras más sencillas corresponden a los fenoles simples (catecol, guaiacol, etc.) y a los ácidos fenoles. De estos últimos, destacan los derivados del ácido benzoico (ácido gálico, ácido vanilílico, ácido sirínico, etc.) y los derivados del ácido cinámico (ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido sinápico, etc.) (Villar del Fresno, 1999, A). En la siguiente figura se expone la estructura química del ácido cafeico (**figura 12**).



**Figura 12: Estructura química del ácido cafeico.**

Los polifenoles son compuestos fenólicos con al menos dos anillos bencénicos sustituidos por al menos un grupo hidroxilo en cada anillo.

De entre ellos, destaca la familia de los flavonoides. Estos compuestos, intervienen en los vegetales en la formación de pigmentos, en la protección frente a la radiación UV, en la defensa durante la interacción planta-patógeno y, posiblemente, modificando la acción de diversas hormonas vegetales. Son particularmente abundantes en las plantas vasculares como las presentes en las Familias *Asteraceae*, *Rutaceae*, *Fabaceae*, *Umbelliferae* y *Lamiaceae*, entre otras. En la siguiente figura (**figura 13**) se observa la 2-fenilbenzopirona, núcleo básico de los flavonoides.



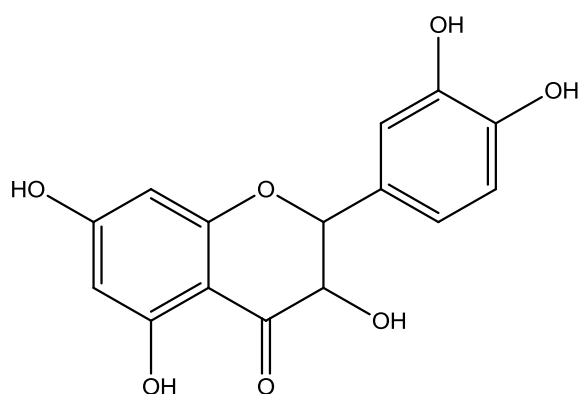
**Figura 13: Estructura química de la 2-fenilbenzopirona.**

Dependiendo del grado de oxidación del anillo piránico central se clasifican en flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, chalconas, auronas, catequinas, leucoantocianos y antocianos (Villar del Fresno, 1999, B).

Se ha sugerido que diversos compuestos, como los polifenoles, son procesados por el organismo como xenobióticos. Estos polifenoles estimulan las señales celulares de estrés resultando en un aumento de la expresión de genes citoprotectores en las células. El factor nuclear (erythroid-derived 2) like ó Nrf2, codificado por el gen NFE2L2, conduce finalmente a un aumento de enzimas con funciones antioxidantes y detoxificantes, como las glutatión peroxidasas y la tioredoxina reductasa-1 (Visioli *et al.*, 2009).

Finalmente, se ha estudiado la actividad de los polifenoles en la microflora intestinal bacteriana en dos sentidos. Por un lado, la microflora intestinal bacteriana modifica la estructura química, y por tanto, la biodisponibilidad y actividad de los polifenoles. Por otro lado, los polifenoles y sus metabolitos son capaces de modular dicha microflora (Rastmanesh, 2011).

En la siguiente figura se presenta a modo de ejemplo la estructura del flavonoide quercetina (**figura 14**).



**Figura 14: Estructura química de la quercetina.**

#### **2.3.2.6. Otros antioxidantes**

Otros compuestos en los que se ha estudiado y demostrado la capacidad antioxidante son, entre otros, el ácido úrico (Miller *et al.*, 1993), ergotioneína y ácido lipoico (Powers & Lennon, 1999; Mérida *et al.*, 2014), fibrinógeno (Olinescu *et al.*, 2001), glucosa (Yu, 1994), albúmina y bilirrubina.

Por otro lado, en la naturaleza existen miles de compuestos antioxidantes que responden a diversas estructuras químicas.

#### **2.3.2.7. Antioxidantes sintéticos**

Debido a los beneficios de los antioxidantes, es habitual suplementar los productos farmacéuticos y los alimentos con antioxidantes sintéticos, como el butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), *tert*-butilhidroxiquinona (TBHQ), etc. Sin embargo, los antioxidantes naturales parecen ser más efectivos debido a su acción sinérgica con otros antioxidantes como la vitamina C y E, carotenoides, terpenoides, etc (Podsdek, 2007; Serrano *et al.*, 2007). Además, la ingesta en la dieta de antioxidantes sintéticos podría provocar carcinogenicidad y genotoxicidad a altas concentraciones (Gutteridge *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2009).

#### **2.4. Relevancia en terapéutica**

El uso de antioxidantes se ha generalizado en la población de los países más desarrollados, si bien es cierto que los resultados, en muchas ocasiones no han sido clínicamente significativos.

##### **2.4.1. Cáncer**

En relación al cáncer, una profunda revisión de Dolora *et al.*, concluye que la mayoría de estudios finalizaron sin variaciones significativas en la mortalidad por cualquier causa. Concretamente, estudiaron aportes de betacaroteno, vitamina E, complejos polivitamínicos y minerales, y selenio. En general, el aporte extra de estos compuestos no evidenció efectos significativos, a excepción del selenio en individuos con valores bajos (Dolora *et al.*, 2012).

El aporte de betacaroteno, en muchas ocasiones debido a las dosis altas empleadas, se ha relacionado con aumento de la incidencia de cáncer de pulmón y de próstata (Albanes *et al.*, 1996; Virtamo *et al.*, 2000). Por el contrario, el aporte exógeno de selenio en individuos con bajas concentraciones fisiológicas, mostró un efecto beneficioso en la reducción de la incidencia del cáncer gastrointestinal y pulmonar (Duffield-Lillico *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 2011).

#### **2.4.2. Función cognitiva y demencia**

En relación al efecto de los antioxidantes en la función cognitiva y la demencia (incluida la enfermedad de Alzheimer), se han realizado múltiples revisiones. Crichton *et al.* seleccionaron en base a determinados criterios 21 estudios distintos para estudiar los efectos de la vitamina C, vitamina E, carotenoides y flavonoides con disparidad de resultados (Crichton *et al.*, 2013).

Se ha propuesto también el uso de antioxidantes como agentes neuroprotectores en base a dos mecanismos de acción. Por un lado, el mecanismo de acción antioxidante intrínseco de los mismos y por otro, al relativo al creciente interés de los últimos años de la posibilidad de ciertos antioxidantes (principalmente compuestos fenólicos) de estimular las señales celulares de estrés resultando en un aumento de la expresión de genes citoprotectores en las células factor nuclear (erythroid-derived 2) like ó Nrf2, codificado por el gen NFE2L2 (Kelsey *et al.*, 2010).

#### **2.4.3. Enfermedades cardiovasculares**

En relación al posible efecto beneficioso de los antioxidantes en las enfermedades cardiovasculares O'Mathúna, después de un extenso meta-análisis de estudios aleatorizados, no encontró evidencias que apoyaran el uso de suplementos de vitaminas o antioxidantes para la prevención primaria o secundaria de eventos cardiovasculares mayores (O'Mathúna, 2013).

En otro meta-análisis de 50 estudios randomizados se analizó la eficacia de los suplementos de vitaminas y antioxidantes en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Como conclusiones, no se observaron efectos beneficiosos en la reducción del riesgos de eventos cardiovasculares mayores en ninguno de los subgrupos del meta-análisis (tipo de prevención, tipo de vitaminas o antioxidantes, etc.) (Myung *et al.*, 2013).

#### **2.5. Antioxidantes y QSAR**

El estudio de la actividad antioxidante en los compuestos a través de las técnicas QSAR se viene desarrollando desde hace muchos años. Se han publicado multitud de estudios en relación a los distintos tipos de antioxidantes y cómo, las variaciones en la estructura molecular, pueden modificar la actividad antioxidante de las moléculas.

Existe, por tanto, una tendencia actual hacia el diseño de antioxidantes más potentes (Zhang *et al.*, 2006).

Diversos trabajos han estudiado las relaciones SAR y QSAR de los flavonoides, con objeto de dilucidar los mecanismos mediante los cuales ejercen sus efecto antioxidantes y diseñar nuevas y eficientes estructuras que puedan utilizarse como agentes terapéuticos (Amic *et al.*, 2007; Supratim *et al.*, 2007).

Otros autores han destacado en el estudio QSAR de los carotenoides distintos descriptores como los potenciales de ionización y las energías de los orbitales moleculares (Soffers *et al.*, 1999).

También se ha analizado mediante una combinación de técnicas quimio-informáticas la predicción en la inhibición de la peroxidación lipídica realizada por derivados del ácido cafeico y cinámico (Mitra *et al.*, 2012).

Se ha revisado los diversos estudios QSAR de diversos grupos de moléculas con capacidad de actuar frente a los RL, con el fin de entender los mecanismos que subyacen entre los RL y las moléculas antioxidantes, resaltando la importancia de la distribución electrónica molecular, la lipofilia, el tamaño y la orientación de los sustituyentes (Kontogiorgis *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2009).

Pérez-Garrido *et al.*, propusieron un modelo general de predicción de la capacidad de bloquear los radicales libres de compuestos fenólicos basada en el análisis del diseño topológico molecular de las sub-estructuras y las contribuciones de cada enlace. Obtuvieron una ecuación con diez parámetros y un porcentaje de acierto en la clasificación superior al 90% (Pérez-Garrido *et al.*, 2012).

Otro trabajo ha estudiado la capacidad predictiva de bloquear los radicales libres de varios tipos de familias de antioxidantes. El método utilizado ha sido la regresión lineal múltiple y el uso de redes neuronales artificiales (Fatemi *et al.*, 2013).



### 3. TRABAJO PRELIMINAR

Se desarrolló un modelo topológico-matemático para la búsqueda de potenciales compuestos antioxidantes activos a partir del estudio de la eficacia de ciertos antioxidantes en la inhibición de la peroxidación lipídica en homogenados de retina humana. Utilizando el análisis lineal discriminante se seleccionó una función para predecir la capacidad antioxidante en los compuestos de una librería molecular.

Se procedió a estudiar el posible efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica en homogenados de retina humana por parte de distintos antioxidantes naturales (vitamina C y E, glutatión, ácido lipoico) y dos antioxidantes artificiales ampliamente utilizados (ebselen y Trolox). Las concentraciones de antioxidantes utilizadas fueron aquellas que la literatura al respecto nos indicó para que todos los compuestos tuvieran un efecto inhibitorio dentro del mismo rango.

A partir de un estudio realizado en nuestro laboratorio con retina humana, en el cuál el tejido retiniano se extrajo por raspado con una espátula tras extirpar la córnea, el cristalino y el vítreo, y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Tras este procedimiento, se homogeneizó en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.0 en un homogenizador manual Potter-Elvehjem para evitar la contaminación mitocondrial de la fracción citosólica.

La capacidad de inhibir la peroxidación lipídica de los distintos compuestos antioxidantes se determinó por un procedimiento clásico. Se dispuso de un tubo de incubación en el que se añadió una cantidad determinada, y siempre la misma (150  $\mu\text{l}$ ), del homogenado fresco de retina humana preparado en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.0, al cual se añadió primeramente el compuesto antioxidante a estudiar, y seguidamente una mezcla de Adenosildifosfato (ADP) y  $\text{FeSO}_4$  (previamente acomplejados), siendo respectivamente 2 mM y 54  $\mu\text{M}$  las concentraciones de estos dos compuestos en el medio de incubación. El complejo  $\text{ADP-Fe}^{+2}$  es frecuentemente utilizado como inductor de peroxidación.

Se procesaron de igual manera tres tubos más:

-Tubo  $t_0$ : contiene únicamente homogenado de retina, y en el momento de comenzar la incubación se le añade la solución de trabajo de MDA para detener la reacción de peroxidación inducida por  $\text{ADP-Fe}^{+2}$  (que indica el nivel de peroxidación inicial).

-Tubo Blanco: contiene homogenado de retina pero ningún antioxidante ni ADP-Fe<sup>+2</sup> (nos indica la peroxidación espontánea a 37°C).

-Tubo Control: contiene homogenado de retina y ADP-Fe<sup>+2</sup> pero ningún antioxidante (nos indica el nivel de peroxidación lipídica máxima, luego se considera como el 100% de peroxidación).

La incubación se llevó a cabo, inmediatamente después de la adición del complejo ADP-Fe<sup>+2</sup>, a una temperatura de 37°C durante 30 minutos en continua y ligera agitación. Al final de la misma se extrajo una muestra alícuota (100µl) que se procesó según el procedimiento de determinación de MDA.

La capacidad de inhibir la peroxidación lipídica de cada uno de los compuestos antioxidantes nombrados se determinó comprobando el grado de inhibición en la producción de MDA considerando el tubo control como índice de peroxidación máxima (100 % de peroxidación).

El diseño de nuevos fármacos por Conectividad Molecular se realiza a través de las siguientes etapas:

- 1) Selección del grupo farmacológico a investigar.
- 2) Obtención de las funciones topológicas.
- 3) Obtención de las funciones discriminantes.
- 3) Selección de los compuestos con teórica actividad antioxidante.

Esta etapa consiste en la búsqueda de la relación estructura-actividad, es decir, el establecimiento de una correlación entre una propiedad ya sea física, química o biológica con los descriptores de la estructura molecular, en este caso, los descriptores son los índices topológicos (IT). Mediante correlación de valores experimentales de la propiedad y haciendo uso de paquetes estadísticos de correlación multilineal, se obtienen las funciones de regresión que describen una propiedad P(IT). Dichas funciones se conocen como funciones de conectividad, puesto que los índices topológicos utilizados, son derivados de la matriz de conectividad, es decir:

$$P(IT) = A_0 + \sum_{i=1}^m A_i(IT)_i$$

donde  $A_0$  y el conjunto de términos  $A_i$  representan los coeficientes de regresión de la ecuación obtenida e IT representa cada uno de los índices topológicos.

Las correspondientes ecuaciones de regresión se obtienen entre la propiedad a estudiar y los distintos índices de conectividad, y por cada ecuación de regresión se acompaña de una serie de parámetros estadísticos:

N = Número de moléculas empleadas en la regresión.

r = Coeficiente de correlación.

SE = Error estándar de la regresión.

Cp = Parámetro de Mallow.

F = Parámetro de Snedecor.

p = Significación estadística de la regresión.

Si se sustituyen los valores de los índices en la función de conectividad, para moléculas no utilizadas en la correlación, se puede predecir el valor teórico de la propiedad P para ese compuesto.

Primeramente se realizó un análisis lineal discriminante con el objetivo de obtener una ecuación de tipo lineal capaz de clasificar los compuestos por su actividad farmacológica, en nuestro caso actividad antioxidante.

Para ello se seleccionó un grupo amplio de compuestos y se distribuyó en dos subgrupos: uno con actividad antioxidante contrastada (el de los antioxidantes del estudio) al que llamamos en nuestro estudio “grupo de moléculas activas” y otro con el mismo u otro número de moléculas, para las que no se había descrito actividad antioxidante alguna, al que llamamos “grupo de moléculas inactivas”. Todas estas moléculas se obtuvieron de la base de datos del Index Merck<sup>®</sup>, que tiene más de trece mil moléculas en formato .mol.

El cálculo de los índices de conectividad se realizó mediante la utilización del programa Molconn-Z versión 3.0.

Hay varias opciones disponibles para la entrada de información de la estructura molecular en el programa Molconn-Z. Además de poseer formas flexibles de entrada de datos, el programa Molconn-Z también los posee para la salida de información.

El programa Molconn-Z está diseñado para realizar el cálculo de una amplia gama de índices topológicos de una estructura molecular. Estas variables de la

estructura molecular incluyen, entre otros, los índices de conectividad  $\chi_i$ ,  ${}^m\chi_t$  y  ${}^m\chi_t^v$ ; los índices de forma kappa,  ${}^m\kappa$  y  ${}^m\kappa_\alpha$ ; los índices de estado electrotopológico,  $T_i$ ; los índices de estado electrotopológico de hidrógeno, HES<sub>i</sub>; índices tipo de átomo de estado electrotopológico e índices tipo de enlace de estado electrotopológico, índices de equivalencia topológica e índice topológico total; alguna información de otros índices como los índices de Shannon y los de Bonchev-Trinajstić, conteniendo fragmentos de grafo, de átomos, de tipo de átomos, de tipo de enlace, etc.. Estos índices se han utilizado extensamente en análisis QSAR y otros tipos de relaciones entre la estructura de las moléculas y sus propiedades.

La selección de descriptores está basada en el parámetro F-Snedecor, y el criterio de clasificación es la distancia de Mahalanobis más corta. Esta distancia de Mahalanobis es el recorrido que hay desde cualquier valor considerado hasta el promedio de la ecuación de regresión.

La calidad de la Función Discriminante está evaluada por la función Lambda de Wilks o U-Estadística (una ANOVA de multivarianza) que comprueba la igualdad de los promedios de los grupos para las variables en la Función Discriminante.

Después de realizar los cálculos de los índices elegimos los que nos dieron mejores valores (en cuanto a la discriminación de grupos) y los copiamos para realizar otra operación de discriminación y así obtener las moléculas más convenientes.

Las funciones de conectividad se obtuvieron empleando un programa incluido en un paquete estadístico informático denominado BMDP (Biomedical Computer Program) creado bajo la dirección de W.J. Dixon de la Universidad de California en 1982.

Los resultados del estudio de la capacidad inhibitoria de distintos antioxidantes sobre la peroxidación lipídica inducida por ADP/Fe<sup>2+</sup> en homogenados de retina humana se exponen a continuación.

La siguiente tabla muestra las concentraciones de MDA (nmols/mg), el porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica, la desviación estándar (S.D) y el número de muestras en los homogenados de retina humana expuestos a diversos antioxidantes previa inducción de la peroxidación lipídica con ADP-Fe<sup>2+</sup>.

COMPUESTOS	MDA (nmols/mg)	% inhibición de la peroxidación lipídica	S.D.	n
“Blanco”	0,134	-	0,052	6
“Control”	0,255*	0 %	0,038	6
Vitamina E	0,038**,#	85,09 %	0,036	6
Vitamina C	0,054***,#	78,82 %	0,047	6
Trolox C	0,113#	55,68 %	0,053	6
Glutación	0,116##	54,50 %	0,072	6
Ácido lipoico	0,127##	50,19 %	0,073	6
Ebselen	0,142#	44,30 %	0,027	6

\* p<0,001, \*\* p<0,005, \*\*\* p<0,05 frente al tubo Blanco

# p<0,001, ## p<0,005 frente al tubo Control

Como se observa en la tabla la vitamina E ha dado los mejores resultados de inhibición de la peroxidación lipídica con casi un 85%, seguido de la vitamina C (79%) y el Trolox C (56%). Ebselen ha obtenido el menor porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica con un 44%.

La función discriminante obtenida para las moléculas con actividad antioxidante después de realizar el análisis lineal discriminante fue la siguiente:

$$DF = -0.894 - 2.521 * c35 + 1.488 * hes11 + 0.557 * nt33$$

VARIABLE	F VALUE	U-STATISTICS	F-STATISTICS	DEGREES of FREEDOM
Hes11	10.318	0.8317	10.318	51.0
c35	11.493	0.6763	11.967	50.0
nt33	8.042	0.5809	11.782	49.0

El significado de los índices que conforman la función es:

- **c35**: Átomo tipo contado para el radical CsNH<sub>2</sub>.

Átomo tipo para los Índices del Estado Electropotológico

Para el set de datos con una amplia variedad de átomos tipo, es útil tener un Índice del Estado Electropotológico para cada tipo de átomo tipo. El programa Molconn-Z calcula el Estado Electropotológico para cada átomo con hidrógenos añadidos y luego suma los valores para todos los átomos de un tipo concreto considerado.

- **Hes11**: Valor del índice para el estado electrotopológico de Hidrógeno del átomo 11.

El Estado Electrotopológico para átomos de Hidrógeno

Se utiliza I(H) para ser primariamente dependiente del átomo al que va enlazado y se ha utilizado la siguiente ecuación para determinar este Estado:

$$I(H) = (\delta_V - \delta) / \delta$$

- **nt33**: número total de *path de* pares de **ramificaciones adyacentes**

Nos da información de los vértices de valencia 3 unidos a vértices de valencia 3 y del ensamblaje topológico.

Mediante el análisis de regresión multilineal la función de conectividad que se obtuvo para las moléculas antioxidantes fue la siguiente:

$$F = 0.1311 - 0.0145 * s3$$

- **S3**: Es el índice del Estado Electrotopológico para el átomo tercero.

El Índice del Estado Electrotopológico es un valor numérico calculado para cada átomo en una molécula, y tiene información codificada con respecto a su ambiente circundante topológico de ese átomo concreto y las interacciones electrónicas debidas a los demás átomos de la molécula. La relación topológica está basada en el grafo de distancia a cada uno de los demás átomos. El aspecto electrónico está basado en un estado intrínseco además de en la perturbación debida a las diferencias del estado intrínseco entre los átomos de la molécula.

Los potenciales antioxidantes encontrados mediante las técnicas topológicas después de aplicar las Función Discriminante y sucesivas validaciones cruzadas, y con unas Distancias de Mahalanobis suficientemente pequeñas para resaltar son los siguientes:

1. Daunorubicina.
2. Ditazol.
3. Sertralina.
4. Oxprenolol.
5. Cefoperazona.
6. Ajmalina.
7. Borneol.
8. Hexoprenalina.
9. Simvastatina.
10. Sobrerol.

La metodología empleada fue descartada para el actual trabajo realizado debido a la no disponibilidad de la licencia del programa BMDP, la posibilidad de trabajar sin coste económico con homogenados de hígado y el deseo de introducir mejoras en el diseño del modelo (revisión de la bibliografía, selección de los grupos, etc.).





## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La hipótesis sobre la que se fundamentan los objetivos del presente estudio es la relación entre la estructura molecular, caracterizada a través de descriptores topológicos, y la actividad antioxidante de los compuestos.

Los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

- Obtener modelos matemáticos, basados en la obtención de los descriptores topológicos, a través de la Topología Molecular, que permitan predecir de forma general la actividad antioxidante de las moléculas, con el fin de relacionarla con la inhibición de la peroxidación lipídica. La técnica empleada es el análisis lineal discriminante.

- Validar estos modelos con la aplicación de otra herramienta estadística.

- Obtener, mediante el uso de los modelos, la teórica actividad antioxidante del conjunto de principios activos comercializados en España en enero de 2013.

- Validar estos resultados con ensayos experimentales relacionados con la inhibición de la peroxidación lipídica y la capacidad antioxidante de las moléculas.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. SELECCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA-QUÍMICA**

En primer lugar hemos elegido la actividad antioxidante debido al gran interés actual en combatir el estrés oxidativo, el cual está estrechamente relacionado con múltiples y diversas patologías, entre otras, las enfermedades degenerativas.

Por otro lado, es reconocible en el mundo más desarrollado económicamente el auge del consumo de antioxidantes para combatir el envejecimiento.

Estas razones, junto a la dilatada experiencia en el estudio de la peroxidación lipídica y el manejo de antioxidantes en el laboratorio del grupo de nuestro Departamento de Ciencias Biomédicas, así como la posibilidad de realizar los correspondientes ensayos experimentales, nos llevaron a seleccionar esta actividad antioxidante.

## **2. OBTENCIÓN DE LAS MOLÉCULAS. LIBRERÍAS MOLECULARES**

El presente estudio requiere el uso de un grupo de compuestos con actividad antioxidante contrastada y un grupo de compuestos sin dicha actividad antioxidante reconocida, con el fin de seleccionar a través del análisis lineal discriminante, aquellas características que permitan clasificar a los compuestos según presenten o no dicha actividad.

Posteriormente, se procede a realizar una búsqueda guiada, basada en nuestro modelo, de nuevas moléculas con esta actividad, en una librería o base de datos molecular.

En nuestro caso, hemos optado por realizar esta búsqueda en los principios activos comercializados en España en enero de 2013. Esto nos va a permitir encontrar una nueva actividad biológica de la principal o inicialmente descrita en algunas moléculas.

### **2.1. Moléculas con actividad antioxidante**

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de moléculas con reconocida actividad antioxidante. Para ello, se ha utilizado la herramienta en internet ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest), diccionario gratuito de entidades moleculares centrado en compuestos químicos “pequeños”. ChEBI forma parte de *The European Bioinformatics Institute (EBI)*, que depende de *The European Molecular Biology*

*Laboratory* (EMBL), una organización intergubernamental sin fines lucrativos fundada en 1980 con sede actual en *Wellcome Trust Genome Campus* en Hixton, Cambridge (Reino Unido).

ChEBI facilita una información completa de cada molécula mostrando ante una búsqueda los siguientes campos:

- Identificador ChEBI. Ontología ChEBI
- Nombre ChEBI (nombre recomendado para su uso en bases de datos biológicas).
- Estructura (representación gráfica), fichero MOL, texto SMILES asociado.
- Fórmula molecular, carga eléctrica, masa.
- Nombre IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) y Denominación Común Internacional (DCI). Número de Registro (CAS, Beilstein, Gmelin).
- Sinónimos y denominaciones comerciales.
- Enlaces a bases de datos, citas.

Esta herramienta dispone también de la posibilidad de agrupar conjuntos de moléculas según patrones de actividad. Por tanto, permite de una forma sencilla y eficaz acceder a un gran número de moléculas con la actividad deseada, en nuestro caso, actividad antioxidante. Se selecciona un número amplio de compuestos y se descarta compuestos muy similares estructuralmente, y otros compuestos que se utilizan como principios activos en la terapéutica, y se les haya descrito actividad antioxidante recientemente.

## **2.2. Moléculas sin actividad antioxidante**

Este grupo de compuestos se ha obtenido de la decimosegunda edición del Merck Index en CD-ROM. Nos facilita, al igual que ChEBI, los archivos en formato mol.

En el **anexo 1** se relaciona el número del Index Merck con el nombre de su estructura química.

## **2.3. Moléculas para realizar la búsqueda guiada**

El *Catálogo de Medicamentos 2013* del Consejo General de Colegios Farmacéuticos nos permite obtener el listado de principios activos comercializados en



enero de 2013 (aproximadamente 3000 principios activos). Esta elección obedece a varias razones. La primera, realizar una revisión de la potencial actividad antioxidante del conjunto de principios activos disponibles actualmente en España. La segunda, la disponibilidad y fácil accesibilidad debido a mi dedicación profesional actual, como cotitular de una oficina de farmacia comunitaria.

A partir de estos listados, es la herramienta en internet ChEBI la que nos facilitará los archivos en formato .mol mediante una descarga individualizada de cada molécula.

### 3. ÍNDICES TOPOLÓGICOS

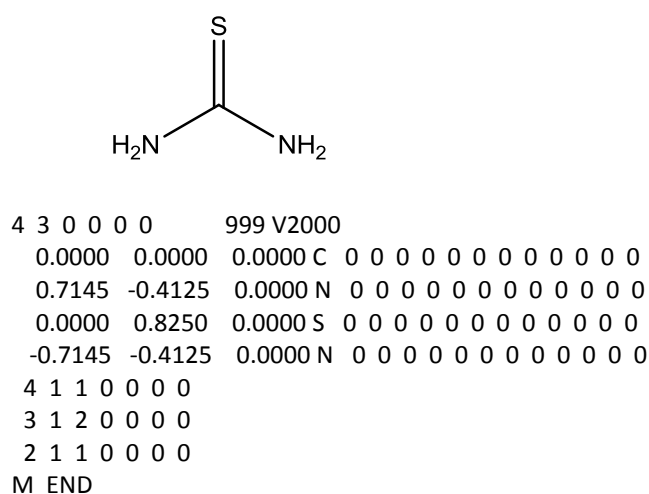
#### 3.1. OBTENCIÓN DE LOS ARCHIVOS .MOL

La obtención de los índices topológicos se realiza a partir de los ficheros o archivos.mol que nos proporciona la organización ChEBI de cada una de las moléculas de su base de datos.

Los archivos formato mol o MDL Molfile se utilizan para almacenar toda la información de la estructura molecular y ser utilizada en los sistemas software informáticos. Aparte de formato .mol, MDL Molfile también utiliza la extensión SDF.

Se guardan todos los archivos .mol de las moléculas seleccionadas para posteriormente ser procesadas informáticamente.

Como ejemplo, se presenta la estructura de la tiourea junto a su fichero Molfile (figura 15).



**Figura 15: Estructura química y fichero Molfile de la tiourea**

### 3.2. PaDEL-Descriptor

Para el cálculo de los índices topológicos se utiliza el programa PaDEL-Descriptor. PaDEL-Descriptor nos permite calcular actualmente 1875 índices, de los cuales 1444 son índices uni- y bidimensionales y 431 tridimensionales. Se calculan a partir de la CDK (Chemistry Development Kit), una librería científica que utiliza el lenguaje de programación Java.

PaDEL-Descriptor es un software de acceso libre y gratuito y forma parte del *Pharmaceutical Data Exploration Laboratory* (PaDEL). PaDEL fue iniciado en 2008 en el Departamento de Farmacia de la *National University of Singapore* (Yap CW, 2011).

### 3.3. Descripción de los índices topológicos

Se ha trabajado con un total de 657 índices topológicos uni- y bidimensionales disponibles clasificados en distintos grupos como aparece en la tabla 1.

- Los tipos de índice topológico Número de grupos acidícos, Número de átomos aromáticos, Número de enlaces aromáticos, Número y tipos de átomos, y Número y tipos de anillos, hacen referencia al recuento numérico de sus respectivos enunciados.

- Los descriptores Tipos de enlace permiten conocer de cada molécula el número total de enlaces y el número de enlaces simples, dobles, triples o cuádruples.

- Los descriptores Tipos de carbono proporcionan información de los enlaces de los átomos de carbono entre ellos.

- El Índice excéntrico de conectividad combina información de adyacencia y distancia entre los átomos de la molécula (Sharma V., 1997).

- Los Índices de estado electrotopológico facilitan información relacionada con el estado electrónico y topológico de cada átomo en la molécula. De ellos derivan los índices de estado electrotopológico por tipo de átomo. Se calculan sumando los valores de *E*-estado de todos los átomos del mismo tipo de átomo dentro de una molécula (Hall L.H., 1995).

- Los Índices topoquímicos ampliados del átomo (ETA, Extended Topochemical Atom) son un conjunto de descriptores heterogéneos que miden la electronegatividad, las insaturaciones, los electrones en resonancia, la electronegatividad relacionada con el peso molecular, etc.

- El Índice FMF (Fragment Molecular Connectivity Indices) cuantifica la complejidad de la molécula (Yang, 2010) relacionando el número de átomos sin incluir el hidrógeno, el número de enlaces y el número de heteroátomos. Asimismo, el índice fragC mide la complejidad por fragmentos en la molécula.

<b>TIPO DE ÍNDICE TOPOLÓGICO</b>	<b>NÚMERO</b>
Número de grupos acidícos	1
Número de átomos aromáticos	1
Número de enlaces aromáticos	1
Número y tipos de átomos	14
Tipos de enlace	10
Tipos de carbono	9
Índice excéntrico de conectividad (ECCEN)	1
Estado electrotopológico por tipo de átomo	488
Índices topoquímicos ampliados (ETA)	43
Índice FMF	1
Índice complejidad por fragmentos	1
Número de aceptores de enlaces de hidrógeno	4
Número de donantes de enlaces de hidrógeno	2
Índice ratio de hibridación	1
Índices de cadenas largas de átomos	3
Número Petitjean	1
Número y tipos de anillos	68
Índice regla del cinco	1
Índices Topológicos	4
Índices de Wiener	2
Índice Zagreb	1

**Tabla 1. Tipos y número de índices topológicos.**

- El Número de aceptores de enlaces de hidrógeno y el Número de donantes de enlaces de hidrógeno hacen referencia a la posibilidad de los átomos de aceptar o donar electrones y se calcula en base a distintos algoritmos de la CDK y de la definición de Lipinski (Lipinski C.A., 2000).

- El Índice ratio de hibridación representa la relación entre carbonos con orbitales híbridos  $sp^3$  frente a carbonos con orbitales híbridos  $sp^2$ .

- Los Índices de cadenas largas de átomos proporcionan información del número de átomos en distintos tipos de cadenas de átomos.

- El Número Petitjean es un descriptor de anisometría, entendida como la desviación de la molécula respecto a la forma esférica (Todeschini & Consonni, 2000).

- El Índice *regla del cinco* indica el número de fallos en la molécula según la regla del cinco de Lipinski, la cual predice cualitativamente si un compuesto es adecuado para realizar una actividad biológica y/o farmacológica en el ser humano, teniendo en cuenta el proceso de absorción, distribución, metabolismo y excreción de la molécula (Lipinski *et al.*, 2001).

- Los Índices topológicos presentan información de los radios, diámetros y cargas de las moléculas, así como de la forma molecular.

- Los Índices de Wiener indican el número de *camino*s y el número de polaridad de cada molécula.

- El Índice Zagreb representa la suma de cuadrados de los grados de átomos frente a todos los átomos pesados.

#### **4. PROCESAMIENTO DE DATOS**

Una vez obtenidos los distintos índices a través del programa PaDEL-Descriptor que describen la estructura de una molécula, el siguiente paso es establecer una relación entre éstos y la actividad o propiedad estudiada de las moléculas.

En nuestro trabajo, hemos estudiado esta relación a través del análisis lineal discriminante y el uso de redes neuronales.

Para realizar en análisis discriminante se ha trabajado con dos programas informáticos con el fin de conseguir unos resultados más completos. Estos son el programa estadístico IBM SPSS Statistics 19 y el programa libre y colaborativo R 3.0.1.

#### 4.1. Análisis lineal discriminante

El análisis lineal discriminante tiene sus orígenes en las formulaciones del cálculo de distancias entre grupos, primero por Karl Pearson (1920), quien propuso el término de “coeficiente de parecido racial” y más tarde por Mahalanobis (1930), cuyo nombre ha mantenido la medida de distancia entre grupos. A partir de estos trabajos, R.A. Fisher (1936) introduce el término discriminación y da forma a la idea de combinación lineal de variables independientes para la discriminación de grupos. Desde ese momento, esta técnica se aplica a múltiples ámbitos disciplinares (Torrado-Fonseca, 2013).

El análisis discriminante se puede considerar como un análisis de regresión donde la variable dependiente es categórica y tiene como categorías la etiqueta de cada uno de los grupos, y las variables independientes son continuas y determinan a qué grupos pertenecen los objetos. Se pretende encontrar relaciones lineales entre las variables continuas que mejor discriminen en los grupos dados a los objetos.

Es una técnica multivariante orientada fundamentalmente a lograr dos objetivos básicos:

a) explicar la influencia de un conjunto de variables cuantitativas sobre una variable cualitativa.

b) predecir la pertenencia de los sujetos u objetos a una de las categorías de la variable de agrupación a partir de los valores registrados en las variables predictivas. Se utiliza una ecuación denominada ‘función discriminante’ que expresa la combinación lineal de las variables predictivas (denominadas variables canónicas).

$$Y = a_0 + a_1 * X_1 + a_2 * X_2 + \dots + a_p * X_p$$

X = las variables independientes

a<sub>0</sub> = la constante

a<sub>p</sub> = los coeficientes de discriminación

Es necesario considerar una serie de restricciones o supuestos:

- Se tiene una variable categórica y el resto de variables son de intervalo o de razón y son independientes respecto de ella.

- Es necesario que existan al menos dos grupos, y para cada grupo se necesitan dos o más casos.

- El número de variables discriminantes debe ser menor que el número de objetos menos 2:  $x_1, \dots, x_p$ , donde  $p < (n - 2)$  y  $n$  es el número de objetos.

- Ninguna variable discriminante puede ser combinación lineal de otras variables discriminantes.

- El número máximo de funciones discriminantes es igual al mínimo entre el número de variables y el número de grupos menos 1 (con  $q$  grupos,  $(q - 1)$  funciones discriminantes).

- Las matrices de covarianzas dentro de cada grupo deben ser aproximadamente iguales.

- Las variables continuas deben seguir una distribución normal multivariante.

#### **4.1.1. Procedimiento en SPSS**

SPSS permite realizar análisis lineal discriminante a pesar de no cumplir alguna de los supuestos anteriormente citados.

Introducimos como variable de agrupación la variable dependiente, esto es, la actividad antioxidante. Esta variable sólo puede tomar valores enteros, de tal manera que indicamos el valor máximo y el valor mínimo. En nuestro caso introducimos la variable denominada "ANTIOX ACT" y definimos los rangos como mínimo, el 0 (sin actividad antioxidante reconocida), y como máximo, el 1 (actividad antioxidante reconocida).

Como variables independientes introducimos todas las variables que queremos utilizar para formular el modelo, en nuestro caso, los 657 índices topológicos.

Se selecciona en el visor de *probabilidades previas* la opción *calcular según tamaño de grupos* si los grupos no tienen el mismo número de casos.

También elegimos en el programa la opción *método de selección de variables por pasos*, que nos permite introducir en cada etapa la variable que mejor discrimina los grupos. De los distintos estadísticos que nos ofrece se elige la *Lambda ( $\lambda$ ) de Wilks*. Por defecto se calcula con un estadístico  $F$  de entrada de 3,84 y un  $F$  de salida de 2,71.

A partir de los datos, el programa calcula los siguientes descriptivos y estadísticos:

- Medias: muestra la media y desviación típica totales y las medias y desviaciones típicas de cada grupo para las variables independientes. Las medias deben ser diferentes y los valores de las desviaciones típicas pequeños.

- Correlación intra-grupos: permite reconocer variables que presenten un alto grado de correlación y por tanto, redundantes.

- *M de Box*: contrasta la igualdad de las matrices de covarianza de los grupos. Este test parte del supuesto de que las matrices de varianza-covarianza poblacionales correspondientes a cada grupo son iguales entre sí. El *output* ofrece su transformación en un estadístico F. La significación del test confirma que uno de los grupos es más variable que otro.

- Matriz de coeficientes estandarizados y matriz de estructuras, que representa las correlaciones entre las funciones discriminantes y las variables. Permiten estudiar qué variables son más influyentes en las funciones discriminantes.

- Coeficientes no tipificados: son los coeficientes utilizados para calcular las puntuaciones discriminantes y la ubicación de los centroides de los grupos.

- Coeficientes de clasificación de Fisher: obtienen una función de clasificación para cada grupo (0 y 1), y se asigna el caso al grupo para el que tiene una mayor puntuación discriminante.

Los estadísticos que permiten validar fundamentalmente la función lineal son:

- Autovalor: estima la variabilidad entre los dos grupos explicada en la función discriminante. Cuanto más alto es su valor, más eficaz será el análisis para clasificar a los sujetos. El valor mínimo es cero y no tiene un valor máximo.

- Correlación canónica: recoge la pertenencia de los sujetos a los grupos mediante un coeficiente que oscila entre 0 y 1. Interesa que presente un valor lo más próximo a 1.

-  $\lambda$  de Wilks: representa la diferencia entre los grupos. Los valores próximos a 1 indicarán similitudes entre los grupos. Si su valor es cercano a 0 deberá interpretarse que los grupos son diferentes y, por lo tanto, la función discriminante puede pronosticar adecuadamente a los casos.

- Chi-cuadrado: representa la significación estadística de la  $\lambda$  de Wilks.

El programa SPSS ofrece en el visor de resultados:

- Resultados para cada caso: muestra para cada caso el grupo real de pertenencia, el grupo pronosticado, las probabilidades posteriores y las puntuaciones discriminantes.

- Tabla de resumen: número de casos correcta e incorrectamente asignados a cada uno de los grupos, basándose en el análisis discriminante.

Para validar el modelo topológico realizaremos un estudio de estabilidad y una validación externa.

El estudio de estabilidad, también llamado de validación cruzada, consiste en eliminar un compuesto del conjunto con su correspondiente propiedad, y volver a correlacionar utilizando como grupo de entrenamiento el conjunto de  $N - 1$  compuestos y las mismas variables obtenidas con el conjunto inicial, prediciendo el valor de la propiedad del compuesto eliminado. El proceso se repite tantas veces como compuestos formen el grupo. El estudio de estabilidad de la función lineal discriminante se obtiene fácilmente activando la opción *Clasificación dejando uno fuera* mediante la cual se clasifica cada caso del análisis mediante la función derivada a partir de todos los casos, excepto el propio caso.

La validación externa se obtiene tras procesar la función lineal discriminante a un grupo de antioxidantes de reconocida actividad, que no hayan sido utilizados para la obtención de dicha función.

#### **4.1.2 Procedimiento en R 3.0.1**

R versión 3.0.1 es un proyecto colaborativo y gratuito que pertenece a *The R Foundation for Statistical Computing*.

R 3.0.1 es un software que requiere unas mínimas habilidades de programación y a través de comandos permite conocer al usuario exactamente cada paso del análisis.

Por otro lado, precisa del cumplimiento de las restricciones matemáticas expuestas anteriormente para poder realizar el análisis discriminante. Asimismo, requiere de una preparación de los datos exhaustiva. Esto supone, entre otras premisas, rechazar las variables colineales ya que no aportan información al modelo que se pretende crear.

Una vez importados los datos lo primero es analizar la igualdad de las medias de los grupos a través de un test de Wilks. Si el valor de  $Pr < 0,05$  habrá diferencias entre



las medias y el análisis discriminante es aplicable. De esta forma, la variable que mayor poder discriminante tiene es la que presenta menor  $P_r$  (probabilidad en el test de Wilks) o mayor valor de  $F$ .

R 3.0.1 nos facilita unos primeros resultados de clasificación del grupo de entrenamiento y una validación cruzada de este grupo *a posteriori*.

Una vez obtenido el modelo con los coeficientes de las funciones canónicas discriminantes, que en este caso, son tantos como variables se ha incluido en el análisis, se procede a validarlo con el grupo test de moléculas.

El modelo nos servirá para identificar moléculas antioxidantes en la búsqueda guiada.

#### **4.2. Redes Neuronales Artificiales**

Estas redes se utilizan para el tratamiento de la información cuya unidad de procesado se inspira en la neurona biológica. La Red Neuronal Artificial es un entramado de neuronas con una capacidad determinada de procesamiento, que debido a su alto grado de conexión le proporciona al sistema neuronal una altísima capacidad de procesamiento paralelo, por lo que las Redes Neuronales son capaces de resolver problemas que de otro modo serían difíciles de resolver.

La neurona artificial dispone de entradas y salidas de información. Las neuronas del cerebro humano tienen entradas preferentes de información según el tipo de estímulo al que responden, y esta preferencia se simula en las redes neuronales artificiales mediante los pesos. Esta ecuación encargada de tratar cada uno de estos pesos, multiplicados por el valor de la entrada de información, es la función de propagación, y define el estado interno de la neurona. En el presente estudio la función de propagación utilizada es una función de tipo sumador. El valor obtenido de la función de propagación se trata mediante la denominada función de activación, generando un valor de salida en la neurona. En este trabajo la función de activación utilizada es una función de tipo no lineal, la función tangencial.

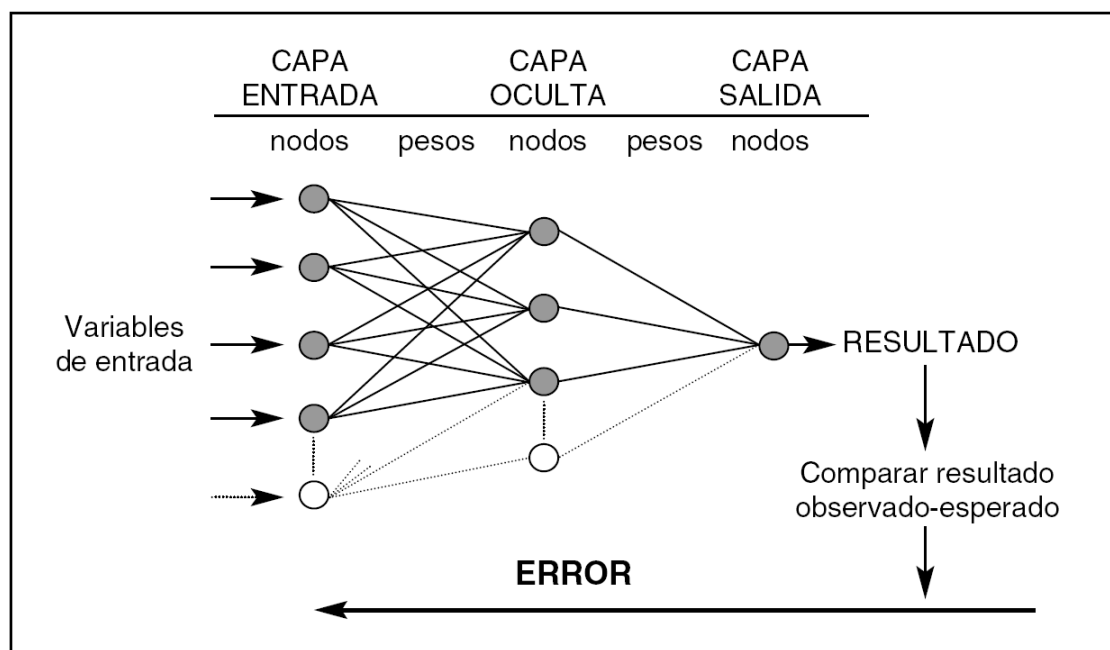
Frank Rosenblatt comenzó en 1957 el desarrollo del Perceptrón o Máquina de Aprendizaje, que es la red neuronal más antigua y capaz de entrenarse y reconocer una serie de patrones; y se diferencian de las computadoras en que el Perceptrón es

más flexible, ya que puede adaptarse a las situaciones no previstas por las instrucciones programadas (Rosenblatt, 1957).

Para establecer una analogía entre la actividad neuronal humana y las redes artificiales determinaremos que las señales que llegan a la sinapsis son las entradas, que son ponderadas, atenuadas o amplificadas, por un parámetro que denominamos peso. Estas entradas pueden excitar a la neurona por su peso positivo, o inhibirla por su peso negativo. La suma de las entradas ponderadas es el efecto; la neurona se activa si la suma es mayor que el umbral. Y las señales se ajustan por un mecanismo de aprendizaje.

La regla de propagación combina los valores de entrada a una neurona con los pesos de las conexiones que llegan a la misma. Y también se necesita una regla que combine las entradas con el estado actual de la neurona para producir un nuevo estado de activación. Esta función de activación puede ser de tipo escalón, lineal o de identidad, lineal mixta o sigmoidea.

A continuación se representa el esquema del mecanismo de trabajo de las redes neuronales artificiales (Trujillano *et al.*, 2005) (**figura 16**).



**Figura 16: Esquema tipo de las redes neuronales artificiales.**

La estructura de su organización consta de tres capas de elementos básicos y la llamaremos Unidad Umbral Lógica o TLU (Threshold Logic Unit), que son unidades binarias que suman los pesos de las señales de entrada y se excitan sólo si la suma de estos pesos sobrepasa los valores umbrales prescritos. La primera capa de entrada ó sensora ó S está compuesta por unidades sensoriales que, en nuestro caso, son los cientos de índices topológicos utilizados, que están conectados con una segunda capa de TLU compuesta de unidades de Asociación ó A, que es una capa llamada oculta, porque a diferencia de la tercera y última capa de Respuesta ó R, esta capa oculta recibe señales de entrada fijas; la capa de respuesta recibe intensidades o valores regulables y cambiantes conforme se va produciendo el entrenamiento de las redes. Las únicas salidas que vamos a dar son +1 y -1, es decir antioxidante o no antioxidante, en nuestro estudio. Para ello necesitamos un método de adiestramiento para adaptar los pesos de las entradas de A a las unidades R, para obtener la respuesta correcta en cada situación, después de haber aprendido a discriminar.

La señal de un nodo neuronal puede ser entrada de otro elemento de proceso o incluso ser conexión de sí mismo, es lo que se llama conexión autorrecurrente. Cuando la salida de las neuronas puede ser conectada como entradas de neuronas del mismo nivel o de niveles precedentes la red de propagación es hacia atrás o *feedback*; en cambio, si es hacia adelante la propagación es *feedforward*. Las del Perceptrón son de propagación *feedforward*, es decir, que no utiliza neuronas con conexiones autorrecurrentes o laterales. La única neurona de salida realiza la suma ponderada de las entradas, resta el umbral y envía el resultado a una función de activación de tipo escalón, y si pertenece al primer patrón se le da el valor de +1 y si no, de -1. Se representa en un mapa las regiones de decisión creadas con los valores de salida finales, en el espacio multidimensional de entradas. El Perceptrón o Máquina de Aprendizaje separa estas dos regiones con un hiperplano, cuya ecuación queda fijada con los pesos de las conexiones y el umbral de la función de activación; y estos valores de los pesos pueden adaptarse con diferentes algoritmos de entrenamiento. Es de tipo supervisado porque son resultados evaluados y con sucesivas modificaciones, y además el investigador determina *a priori* qué salidas se esperan de las entradas de entrenamiento. La regla de aprendizaje adapta los pesos de las conexiones de tal manera que el error entre la salida real y la deseada es el mínimo. Al presentar una

nueva muestra, o índices topológicos de una nueva molécula, la clasificará correctamente porque ha aprendido las características que tienen los antioxidantes. Dentro del aprendizaje supervisado de una red neuronal multicapa, que es lo que estamos estudiando, uno de los más utilizados es el algoritmo de retropropagación del error o *backpropagation*. Los errores que se dan en la propagación se transmiten hacia atrás partiendo de la capa de salida recibiendo el porcentaje de error aproximado a la participación de la neurona intermedia de la capa oculta. Los pesos de cada neurona se reajustan, con lo cual los errores van disminuyendo.

Los métodos QSAR se han desarrollado tradicionalmente utilizando métodos de regresión lineal. La gran ventaja de las redes neuronales es que son capaces de reconocer relaciones no lineales.

Se ha utilizado una red neuronal tipo Perceptrón Multicapa alimentada hacia adelante, es decir de propagación hacia adelante, *feedforward*. En nuestro estudio se utiliza un aprendizaje supervisado, ya que conocemos su salida y la regla de aprendizaje consiste en adaptar los pesos para conseguir que el error final sea mínimo. Esta fase de entrenamiento o aprendizaje se da por finalizada después de la realización de un determinado número de iteraciones, o cuando el error está por debajo de un límite prefijado.

El algoritmo de aprendizaje de retropropagación del error se realiza en dos pasos, uno hacia adelante y otro hacia atrás. El error de salida se propagará hacia atrás pasando a la capa o capas ocultas hasta llegar a la capa de entrada. Usando el algoritmo estándar de retropropagación del error se debe utilizar una función continua y diferenciable como es la función tangente hiperbólica que proporciona una salida entre -1 y +1. Los datos de entrada se normalizan para facilitar el aprendizaje de la red neuronal artificial.

Por otro lado, en teoría de la información, el error de entropía cruzada entre dos distribuciones de probabilidad mide la media de *bits* necesarios para identificar un evento de un conjunto de posibilidades, si un esquema de codificación está basado en una distribución de probabilidad dada  $q$ , más que en la verdadera distribución  $p$ .

#### 4.2.1. Procedimiento en SPSS

En nuestro estudio, introducimos la variable dependiente denominada “ANTIOX ACT” y definimos los rangos como el mínimo el -1 (sin actividad antioxidante reconocida), y como máximo el +1 (actividad antioxidante reconocida).

Como covariables independientes introducimos todos los descriptores que queremos utilizar, en nuestro caso los 657 índices topológicos.

El número de iteraciones que se realizan para el aprendizaje del modelo es el necesario hasta obtener un porcentaje de error global inferior al 5%.

Obtendremos el error de entropía cruzada de cada grupo entrenamiento o prueba, el porcentaje de aciertos, y la categoría junto a la pseudoprobabilidad pronosticada de la variable dependiente para cada caso.

Finalmente, introduciremos en el modelo los principios activos que hayan sido clasificados como antioxidantes en base al análisis discriminante de SPSS ó de R, o de ambos. Cada principio activo se introducirá en el modelo individualmente con el objetivo de no desvirtuar las propiedades aprendidas del mismo. La red neuronal artificial facilita la pseudoprobabilidad de pertenencia a cada grupo de cada principio activo.

A continuación se expone las principales características técnicas de la red neuronal artificial que hemos elegido.

<b>FICHA TÉCNICA DE LA RED NEURONAL ARTIFICIAL</b>		
Escala de covariables		Normalizada
Partición aleatorio de los casos		70% entrenamiento, 30% prueba
Arquitectura	Número mínimo de unidades de la capa oculta	1
	Número máximo de unidades de la capa oculta	50
Tipo de entrenamiento		Lote
Algoritmo de optimización		Gradiente conjugado escalado
Opciones de entrenamiento	Lambda inicial	0,0000005
	Sigma inicial	0,00005
	Centro de intervalo	0
	Desplazamiento de intervalo	±0,5
Número máximo de pasos sin una disminución del error		1

**Tabla 2. Ficha técnica de la red neuronal artificial**

## 5. CRITERIO DE CLASIFICACIÓN

A partir de los resultados obtenidos con la función discriminante se clasifica a las moléculas de acuerdo a su puntuación.

**SPSS:** Las moléculas que presenten valor superior a 0 en la función discriminante se clasifican como antioxidantes. En redes neuronales nos indica una probabilidad de pertenencia a cada grupo.

**R:** El programa nos clasifica como 0 a las moléculas no antioxidantes y como 1 a las antioxidantes. También nos indica una probabilidad en el análisis discriminante.

## 6. DISTRIBUCIÓN DE LAS MOLÉCULAS

Para hacer el análisis discriminante se elige un grupo lo más amplio posible de moléculas con actividad antioxidante contrastada. De este grupo, que llamamos grupo de activos, se utiliza aproximadamente el 70% como grupo de entrenamiento y el 30% restante como grupo test.

Se realiza lo mismo con un grupo de moléculas sin actividad antioxidante contrastada. A este grupo lo llamamos grupo de inactivos.

De esta forma, se trabaja repetidamente el grupo de entrenamiento para obtener la mejor función lineal discriminante posible. Posteriormente se procede a validar esta función lineal discriminante con el grupo test.

## 7. BÚSQUEDA GUIADA

A partir de la función discriminante obtenida mediante SPSS y R, se realiza una búsqueda de principios activos en el *Catálogo de Medicamentos 2013* del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

En todo caso, se eliminan inicialmente de la búsqueda los principios activos que cumplan alguno de los siguientes criterios:

- Principios activos que se utilizan en enfermedades graves o agudas, en las que pueda estar comprometida la vida del paciente. Por ejemplo, no se ha incluido a la adrenalina, dobutamina y similares utilizados en el manejo hemodinámico del shock u otras situaciones en las que la actividad antioxidante ha sido considerada como indiferente.

- Vitaminas, aminoácidos, azúcares. Muchos de los cuales son antioxidantes reconocidos.

- Alérgenos, antídotos, agentes quelantes del hierro, fármacos antihiperpotasémicos y antihiperfosfatémicos, desintoxicantes de citostáticos, agentes para diagnóstico, medios de contraste y radiofármacos para diagnóstico (grupo V. Varios).

Las moléculas que, en uno u otro modelo, se clasifiquen como antioxidantes, se seleccionarán para validarlas mediante el uso de redes neuronales en SPSS.

Finalmente, se procede a seleccionar un número de moléculas para estudiar su capacidad antioxidante en el laboratorio.

Las moléculas que presenten actividad antioxidante en dos de los tres modelos de clasificación, serán seleccionadas para validarlas experimentalmente en el laboratorio.

## **8. ESTUDIO EXPERIMENTAL**

### **8.1. Inhibición de la peroxidación lipídica**

#### **8.1.1. Tratamiento de los animales**

##### **8.1.1.1. Condiciones de estabulación**

Para este trabajo se han utilizado ratones macho C-57. Los animales utilizados se solicitaron teniendo un peso al inicio del experimento de unos 20-25 g. En todos los casos se dejaron aclimatar al menos una semana antes de iniciar los experimentos.

Durante la estabulación, los animales se mantuvieron en jaulas en condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas, de 08:00 a 20:00 y de 20:00 a 08:00. Durante su estabulación y hasta el inicio del experimento tuvieron libre acceso a agua y a una dieta estándar para pequeños animales de laboratorio, fabricada y distribuida por Letica (Hospitalet, Barcelona).

##### **8.1.1.2. Manejo de los animales**

La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo las normativas internacionales de la Comunidad Económica Europea ("Orden 86/609/CEE") y se tuvo la precaución de evitar cualquier estrés innecesario o infligir dolor a los mismos. Los

ensayos experimentales llevados a cabo fueron aprobados por el comité ético de la Universidad CEU Cardenal Herrera y el número de animales se redujo al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante la técnica más incruenta, rápida e indolora que, por otra parte, no influyera en las variables consideradas en cada experimento. Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de anestésico (ketamina 100 mg/kg peso + azepromazina 2,5 mg/kg peso).

### **8.1.2. Diseño experimental**

El objetivo es medir la inhibición de la peroxidación lipídica de varios principios activos mediante la reducción de la concentración de MDA en las muestras procesadas. Una vez sacrificados los animales, se disecciona y se extirpa el hígado. Posteriormente, se obtiene un homogenado de hígado. Se han utilizado alrededor de 25 ratones macho C-57 para el estudio.

### **8.1.3. Obtención de las muestras**

Se prepara una concentración inicial de 5 mM de cada uno de los principios activos disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), y a partir de aquí, concentraciones intermedias de 0,50, 100, 200, 400, 800 y 1000 microM de cada principio activo a analizar en DMSO.

Se ha empleado los siguientes reactivos:

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 mM (4,17 mg en 10 mL de PB)
- Ácido ascórbico 7,9 mM (13,91 mg en 10 mL de PB)

Las muestras de cada concentración se realizan por triplicado. A cada tubo se le añade por este orden:

- 268  $\mu\text{L}$  de homogenado de hígado (concentración proteica de 12 mg/ml).
- 3  $\mu\text{L}$  de muestra de principio activo.
- 19  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
- 10  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico.



De esta forma obtenemos las siguientes concentraciones finales.

Concentración final ( $\mu\text{m}$ )	Volumen DMSO ( $\mu\text{L}$ )	Volumen principio activo ( $\mu\text{L}$ )
0	500	0
0,5	495	5
1	490	10
2	480	20
4	460	40
8	420	80
10	400	100

**Tabla 3. Preparación de las muestras.**

Las muestras finales se incuban a 37°C durante dos horas con los viales abiertos. Posteriormente se congelan las muestras a -80°C hasta su análisis para la determinación de malondialdehído.

#### **8.1.4. Procedimientos analíticos**

A continuación se describe los distintos protocolos de estudio desarrollados en este trabajo de investigación.

##### **8.1.4.1. Determinación de proteínas**

Se realizó según el procedimiento descrito por Lowry (Lowry et al., 1951), con las modificaciones utilizadas habitualmente en nuestro laboratorio, y que a continuación se detallan.

Se emplearon las siguientes soluciones:

- Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4%, NaOH 0.8%
- Solución B:  $\text{CuSO}_4$  1.25 mM,  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$  1.42 mM.

Las soluciones A y B se conservan a 4°C hasta su utilización.

- Solución C: Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N.
- Solución D: Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/mL.

La solución D se conserva a -20°C hasta su utilización.

Se preparan tubos de ensayo con cantidades diferentes de la solución D (0, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{L}$ ) y con dos cantidades distintas de cada muestra (10 y 25  $\mu\text{L}$ ). Se añade agua bidestilada hasta 200  $\mu\text{L}$ . Se mezclan las soluciones A y B a partes iguales y a cada tubo de ensayo se le añade 1 mL de esta mezcla. Se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden 100  $\mu\text{L}$  de la solución C a cada uno de los tubos. Se agita bien y se espera durante 25 ó 30 minutos.

Se mide la absorbancia de cada una de las soluciones en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 696 nm. La absorbancia a 696 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Con los valores de absorbancia de los distintos estándares obtenemos la recta patrón y por intrapolación obtenemos las concentraciones de proteínas que queríamos conocer.

#### **8.1.4.2. Determinación de malondialdehído (MDA)**

Para la cuantificación del malondialdehído de las muestras de homogenado de hígado, se utiliza una modificación del método de Richard (Richard et al., 1992) hecha por nuestro grupo de investigación (Romero et al., 1998), en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en base a la reacción de dos moléculas de TBA con una de MDA. Se ha utilizado un equipo de HPLC (Waters) que consta de los siguientes componentes:

- Bomba cromatográfica: Waters 1525 binary HPLC Pump.
- Detector de fluorescencia Waters 2475 fluorescence.
- Inyector: Waters 717 plus Autosampler con loop de 50  $\mu\text{L}$ .
- Controlador Multiport modelo RS-232.
- Ordenador IBM Windows.
- Software: Breeze.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Kromasil C18 5  $\mu\text{m}$  de 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos S.L.). El flujo de la fase móvil es de 1 ml/min. La longitud de onda de excitación utilizada es de 532 nm y la de emisión 553 nm. El voltaje del detector de fluorescencia empleado es de 600 y la respuesta de 2 sg.

La fase móvil se prepara con tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol (580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, se filtra a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro y 47 mm de diámetro.

La solución madre de calibración se prepara diariamente. Dicha solución madre consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol absoluto.

La solución de trabajo consiste en una preparación de ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria.

En tubos eppendorf de 2 ml se pipetea 0.1 ml de la muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo. A continuación se mezclan bien y se mantienen 60 min en un baño de agua a 95°C. Pasado este tiempo se enfrían los tubos a 4°C durante 10 min con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugan 10 min a 12.000 rpm. Hasta su inyección en el equipo HPLC los tubos se mantienen a una temperatura constante de 4°C.

Puesto que el aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro cada muestra se neutraliza unos minutos antes de la inyección en el equipo de HPLC. Se añaden aproximadamente 0.1 ml de hidróxido potásico 0.7 M a 0.2 ml de la mezcla que acabamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después de neutralizar se centrifuga durante 1 min para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procede, previo filtrado con filtros de jeringa no-estériles (3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por Corning Laboratory Sciences Company), a inyectar en el equipo de HPLC.

En cada experimento se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 0,25; 0,5; 1 y 2 µM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

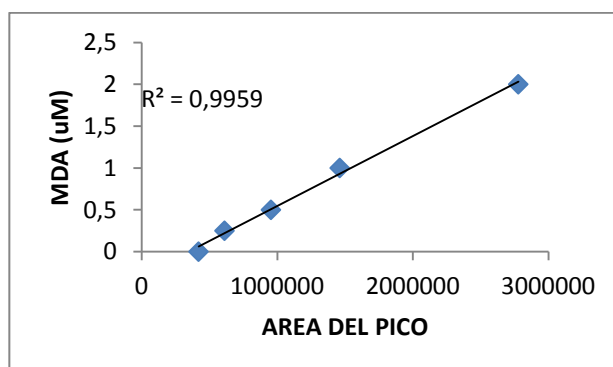


Figura 17: Ejemplo de recta de regresión MDA:Área.

### **8.1.5. Exposición de los resultados**

Los resultados obtenidos finalmente se exponen en una gráfica de regresión que refleja el porcentaje de disminución de la concentración de MDA respecto a la determinada inicialmente, frente a las distintas concentraciones experimentadas con cada principio activo.

## **8.2. Estudio de la capacidad antioxidante**

### **8.2.1. Fundamento**

La capacidad antioxidante total se mide mediante un kit comercial de ELISA (Antioxidant Assay kit, Cayman Chemical Company). El método se basa en la habilidad de los antioxidantes de la muestra para inhibir la oxidación de ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) a  $ABTS^+$  por la metmioglobina. La cantidad de  $ABTS^+$  producido puede ser estimado leyendo la absorbancia a 750nm y 405nm. Bajo las condiciones de la reacción, los antioxidantes de la muestra causan una supresión de la absorbancia a 740nm o 405nm proporcional a su concentración. La capacidad de los antioxidantes de la muestra para prevenir la oxidación de ABTS se compara con la del Trolox, un tocoferol hidrosoluble análogo, y es cuantificada en milimolar equivalentes de Trolox.

### **8.2.2. Procedimiento**

En primer lugar se reconstituyen los componentes del kit. Se diluyen 3 ml de la solución tampón 10X (5mM de fosfato potásico pH 7.4, 0.9% cloruro de sodio y glucosa 0,1%) con 27 ml de agua bidestilada ( $H_2O_{dd}$ ). Se reconstituye el cromógeno con 6 ml de  $H_2O_{2dd}$ . A continuación se añade 600 $\mu$ l de la solución buffer 1X al vial de la metmioglobina. Adicionar 1ml de  $H_2O_{dd}$  al vial del Trolox. Este será empleado para realizar la curva patrón. Diluir 10 $\mu$ l de peróxido de hidrógeno 9,82 M con 990  $\mu$ l de  $H_2O_{2dd}$ , seguidamente pipetear 20  $\mu$ l y diluirlos en 3.98 ml de  $H_2O_{dd}$  para conseguir una solución de trabajo de 441 $\mu$ M.

Se prepara los patrones de Trolox en el disolvente elegido para las muestras para obtener las concentraciones finales en mM (0, 0,045, 0,09, 0,135, 0,18, 0,225, 0,33).

A continuación se adiciona 10 µl de metmioglobina, 150 µl de cromógeno y 10 µl de los patrones y de las muestras. Por último se añade 40 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incuba en oscuridad y agitando durante 5 minutos. Pasado este tiempo se mide inmediatamente la absorbancia a 405 nm en el lector de placas, 2030 Multilabel reader VICTOR x3 (PerkinElmer).

### **8.2.3. Exposición de los resultados**

Se expresan los resultados del estudio de la capacidad antioxidante en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), esto es, mM de trolox equivalentes a 1 mM del compuesto.

## **9. PROGRAMAS INFORMÁTICOS**

A continuación enumero los programas informáticos utilizados durante el presente estudio y lo que han aportado:

- MOLCONN-Z: cálculo de los índices topológicos en el trabajo preliminar.
- BMDP: obtención de la función discriminante en el trabajo preliminar.
- INDEX MERCK CD-ROM: obtención de las moléculas no activas del grupo de entrenamiento y test.
- CHEMDRAW: validación de las moléculas y obtención de los nombres químicos de la selección de moléculas del Index Merck y dibujo de las estructuras químicas del estudio.
- PaDEL-Descriptor: cálculo de los índices topológicos del estudio.
- SPSS: obtención del análisis lineal discriminante y de la predicción con redes neuronales artificiales.
- R 3.0.1: obtención del análisis lineal discriminante.
- BREEZE: referente al HPLC en la determinación de MDA.

Además, se ha utilizado extensamente la página web ChEBI para obtener los ficheros .mol de cada una de las moléculas del estudio (grupo activos y *Catálogo de Medicamentos 2013*), excepto las obtenidas a través del Index Merck.

Asimismo, se ha utilizado ampliamente el portal de búsqueda de *PubMed* para la revisión bibliográfica. También se ha hecho uso de los recursos electrónicos *Ebsco Host*, *Scopus* y *Web of Science*.

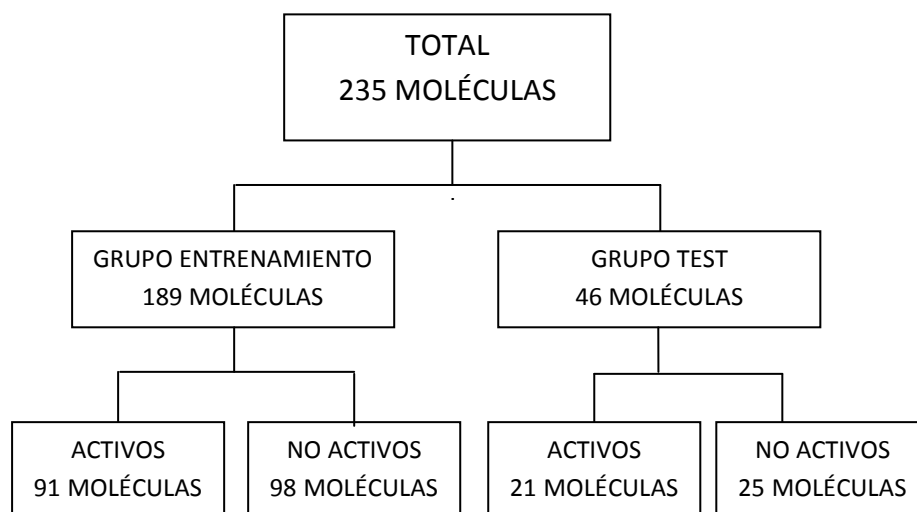
## **IV. RESULTADOS**





## 1. SELECCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS MOLÉCULAS

Una vez seleccionado las moléculas y los ficheros .mol de las moléculas en el estudio, éstas se han distribuido de acuerdo al siguiente esquema:



**Figura 18: Distribución de las moléculas del estudio.**

## 2. ANÁLISIS DISCRIMINANTE EN SPSS

### 2.1. Criterio de elección

El criterio para la selección de la mejor función discriminante se realizó en base a tres parámetros:

- Comparación de los valores de autovalor, correlación canónica,  $\lambda$  de Wilks y chi-cuadrado.
- Determinación del porcentaje de moléculas correctamente clasificadas en el grupo de entrenamiento (activos y no activos).
- Predicción de la clasificación de las moléculas del grupo test (activos y no activos).

El programa SPSS realiza múltiples correlaciones y se selecciona aquella que presenta la mejor relación entre los tres parámetros anteriormente citados.

### 2.2. Función discriminante

Se han utilizado la totalidad de índices topológicos obtenidos.

La mejor función discriminante se ha obtenido con los siguientes descriptores topológicos y coeficientes no tipificados expuestos en la siguiente tabla.

Variables independientes	Coefficientes no tipificados
C3SP2	0,196
nHBd	0,402
nHdsCH	0,136
nsCH3	0,115
nssSe	5,589
minHsOH	2,706
minHssNH	-2,891
mindS	5,784
ETA_Epsilon_3	-58,288
ETA_Psi_1	-10,584
nHBAcc	-0,202
topoShape	1,364
Constante	28,545

**Tabla 4: coeficientes de la función discriminante en SPSS**

Por tanto, el análisis lineal discriminante nos facilita la siguiente función discriminante:

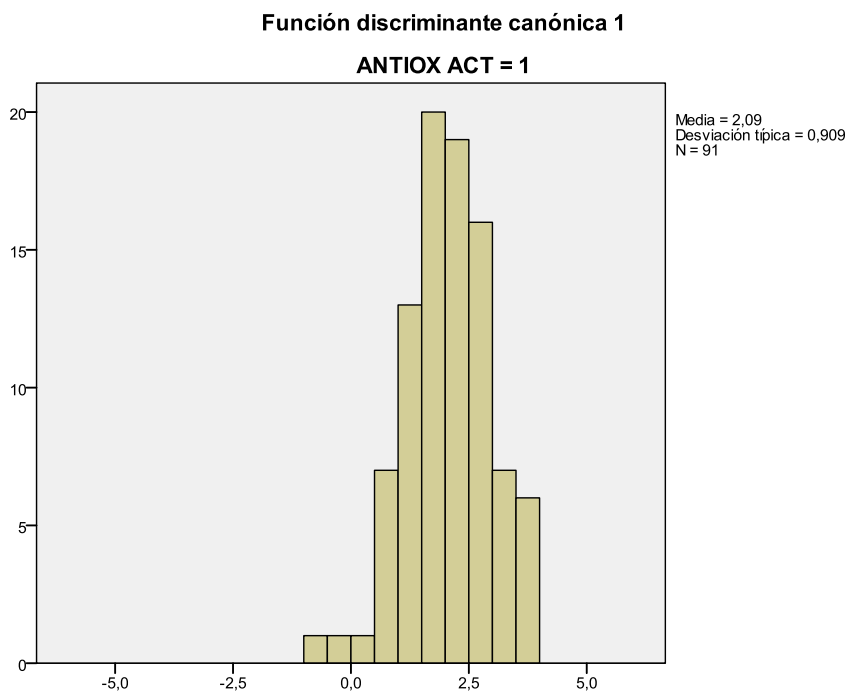
$$FD = 28,545 + 0,196C3SP2 + 0,402nHBd + 0,136nHdsCH + 0,115nsCH3 + 5,589nssSe + 2,706minHsOH - 2,891minHssNH + 5,784mindS - 58,288ETA\_EPSILON\_3 - 10,584ETA\_Psi\_1 - 0,202 nHBAcc + 1,364topoShape$$

A continuación se muestra los resultados de los principales estadísticos.

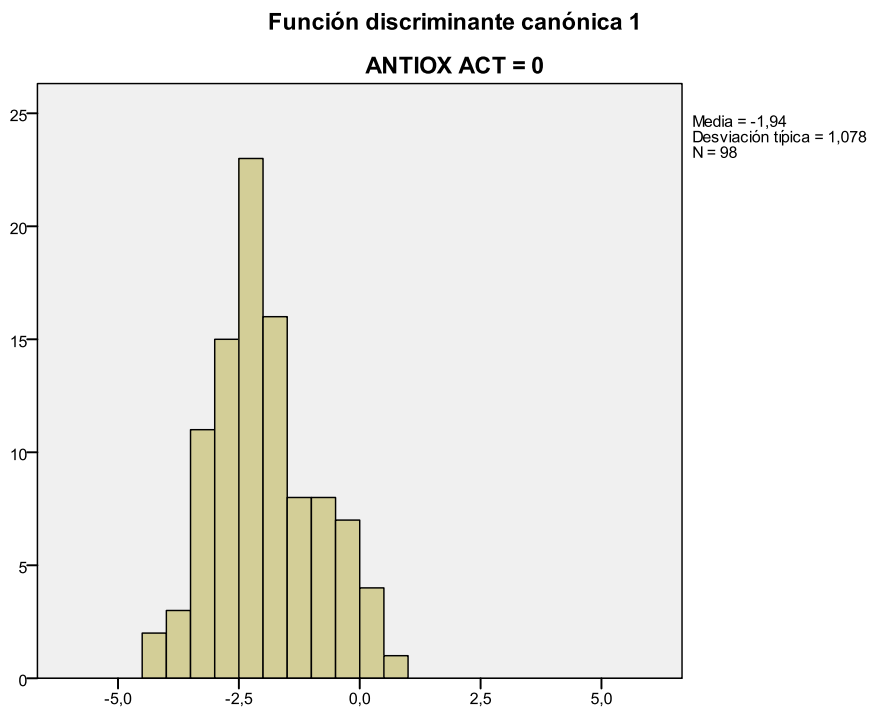
Autovalor	Correlación canónica	$\lambda$ de Wilks	Chi-cuadrado
<b>4,082</b>	<b>0,896</b>	<b>0,197</b>	<b>293,45</b>

**Tabla 5. Principales estadísticos en SPSS**

A continuación se puede observar gráficamente la distribución de los resultados del grupo de entrenamiento activos (**figura 19**) y no activos (**figura 20**) según los valores obtenidos en la función discriminante.



**Figura 19: Gráfico de resultados del grupo de entrenamiento activos.**



**Figura 20: Gráfico de resultados del grupo de entrenamiento no activos.**

La descripción de los índices que conforman la función discriminante es la siguiente:

- **C3SP2**: átomos de carbono con un doble enlace unidos a otros tres átomos de carbono.
- **nHBd**: recuento de E-estados para los átomos donantes de enlaces de hidrógeno.
- **nHdsCH**: recuento de E-estados de tipo de átomos =CH-.
- **nsCH3**: recuento de E-estados de tipo de átomos -CH3.
- **nssSe**: recuento de E-estados de tipo de átomo -Se -.
- **minHsOH**: mínimo E-estado de tipo de átomos -OH-.
- **MinHssNH**: mínimo E-estado de tipo de átomos -NH-.
- **MindS**: mínimo E-estado de tipo de átomo =S.
- **ETA\_Epsilon\_3**: medida de la electronegatividad de los átomos.
- **ETA\_Psi\_1**: medida de la predisposición a formar enlaces de hidrógeno de las moléculas y/o el área de superficie polar.
- **nHBacc**: recuento de átomos aceptores de enlaces de hidrógeno.
- **topoShape**: medida de la forma molecular.

En la siguiente tabla se expone como ejemplo los resultados de los diferentes coeficientes para cinco compuestos del grupo activo de entrenamiento.

	C3SP2	nHBd	nHdsCH	nsCH3	nssSe	minHsOH	minHssNH	mindS	ETA_Epsilon_3	ETA_Psi_1	nHBacc	topoShape
Alfamangostin	6	3	2	5	0	0,34	0	0	0,44	0,55	1	0,86
Alfatocopherol	4	1	0	8	0	0,36	0	0	0,44	0,65	0	0,90
Bellidin	2	4	0	0	0	0,57	0	0	0,44	0,47	1	1,00
Betacarotene	8	0	14	10	0	0,00	0	0	0,44	0,71	0	0,92
Caffeic acid	1	3	2	0	0	0,66	0	0	0,43	0,48	2	1,00

**Tabla 6. Ejemplo de resultados de coeficientes en SPSS**

### 2.3. Clasificación de los grupos

En las siguientes tablas se muestran los resultados del conjunto de las moléculas activas y no activas del grupo de entrenamiento y sus respectivas validaciones cruzadas según los criterios de clasificación elegidos.

<b>GRUPO ENTRENAMIENTO ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
ACTIVOS	86	94,5
NO ACTIVOS	5	5,5
TOTAL ACTIVOS	91	100
<b>GRUPO ENTRENAMIENTO NO ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
NO ACTIVOS	93	94,9
ACTIVOS	5	5,1
TOTAL NO ACTIVOS	98	100
<b>TOTAL GRUPO ENTRENAMIENTO</b>		<b>94,71</b>

**Tabla 7. Resultados del grupo de entrenamiento en SPSS.**

A continuación se muestra los resultados de la validación cruzada en el grupo de entrenamiento, donde cada caso se clasifica mediante las funciones derivadas a partir del resto de los casos.

<b>VALIDACIÓN CRUZADA GRUPO ENTRENAMIENTO ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
ACTIVOS	86	94,5
NO ACTIVOS	5	5,5
TOTAL ACTIVOS	91	100
<b>VALIDACIÓN CRUZADA GRUPO ENTRENAMIENTO NO ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
NO ACTIVOS	91	92,85
ACTIVOS	7	7,15
TOTAL NO ACTIVOS	98	100
<b>TOTAL ENTRENAMIENTO VALIDACIÓN CRUZADA</b>		<b>93,64</b>

**Tabla 8. Resultados de la validación cruzada del grupo de entrenamiento en SPSS.**

En los **anexos 2 y 3** se detalla los valores de la función discriminante de cada molécula en su grupo correspondiente. Se utiliza el nombre en inglés tal como figura en la base de datos ChEBI para el grupo de entrenamiento de activos y el número del Index Merck para el grupo de entrenamiento de no activos. De igual forma, se utilizan estas denominaciones en el resto del estudio.

En la siguiente tabla se exponen los resultados de las moléculas del grupo test.

<b>GRUPO TEST ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
ACTIVOS	20	95,24
NO ACTIVOS	1	4,76
TOTAL ACTIVOS	21	100
<b>GRUPO TEST NO ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
NO ACTIVOS	23	92
ACTIVOS	2	8
TOTAL NO ACTIVOS	25	100
<b>TOTAL GRUPO TEST</b>		<b>93,48</b>

**Tabla 9. Resultados del grupo test en SPSS.**

A continuación se detalla los valores de la función discriminante en el grupo test activos y no activos (**tabla 10 y 11**). También se clasifican cualitativamente según el criterio de clasificación (A= activo, N= no activo).

NÚMERO	MOLÉCULA	VALOR FD	CLASIFICACIÓN
1	AMBUROSIDEA	1,80	A
2	BAICALEIN	1,73	A
3	BIXIN	3,40	A
4	BUTEIN	2,55	A
5	CATIGUANINA	2,31	A
6	CROCETIN	3,17	A
7	ELLAGIC ACID	2,38	A
8	ESCULIN	2,01	A
9	HISPIDIN	2,11	A
10	ICARIIN	2,18	A
11	MIQUELIANIN	2,63	A
12	MYRICETIN	3,18	A
13	NARIRUTIN	1,87	A
14	PHLORIZIN	2,25	A
15	PINOCEMBRIN	0,57	A
16	QUERCETAGETIN	2,95	A
17	RHAMNETIN	1,97	A
18	SILIBININ	1,70	A
19	SPERMINE	-1,19	N
20	SWERTIANIN	1,96	A
21	ASCORBIC ACID	2,68	A

**Tabla 10. Resultados de las moléculas del grupo test activos en SPSS.**

NÚMERO	MOLÉCULA	VALOR FD	CLASIFICACIÓN
1	3605	-0,69	N
2	3614	-2,51	N
3	6802	-2,59	N
4	6807	-3,05	N
5	6810	-2,62	N
6	6826	-1,34	N
7	6841	1,12	A
8	7272	-2,21	N
9	7550	-2,64	N
10	7577	-0,96	N
11	7588	-3,50	N
12	7589	-3,51	N
13	4969	-3,02	N
14	5052	-1,43	N
15	5065	0,54	A
16	5118	-2,59	N
17	5140	-2,78	N
18	5464	-3,06	N
19	5526	-2,53	N
20	5580	-1,29	N
21	5611	-0,56	N
22	5617	-2,73	N
23	5647	-3,49	N
24	5028	-1,97	N
25	5116	-3,56	N

**Tabla 11. Resultados de las moléculas del grupo test no activos en SPSS.**

### **3. ANÁLISIS DISCRIMINANTE EN R 3.0.1**

#### **3.1. Criterio de elección**

Para poder cumplir las restricciones matemáticas sujetas al modelo del análisis discriminante se ha realizado una reducción del número de índices. Los criterios de eliminación utilizados son los siguientes:

- Descriptores que presentaban un valor Pr del test de Wilks superior a 0,05, es decir, descriptores de variables que no discriminan.
- Descriptores procedentes de variables colineales.
- Descriptores con todos sus valores iguales a cero.

Se ha obtenido, en base a estos criterios, 31 descriptores topológicos agrupados en 11 tipos de índices topológicos para realizar el análisis discriminante.

En la siguiente tabla se muestran los mismos y el grupo al que pertenecen.

<b>DESCRIPTORES EN R</b>	
<b>TIPO DE ÍNDICE TOPOLÓGICO</b>	<b>NOMBRE</b>
Número de grupos acidícos	nAcid
Tipos de enlace	nBondsD
Tipos de carbono	C1SP2, C2SP2, C3SP2, C1SP3, C3SP3, C4SP3
Estado electrotopológico por tipo de átomo	nHBd, nHBa, nHsOH, nHssNH, nsCH3, nssCH2, naaCH, ndssC, naasC, ndO, nsSH, nddssS, SssSe, hmin
Índice topoquímicos ampliados (ETA)	ETA_AlphaP, ETA_epsilon_3, ETA_Psi_1
Número de enlaces de hidrógeno aceptores	nHBacc
Número de enlaces de hidrógeno donantes	nHBDon
Índices de cadenas largas de átomos	nAtomLC
Índices Topológicos	topoShape
Índices de Wiener	WPATH
Índice Zagreb	Zagreb

**Tabla 12. Descriptores utilizados en R 3.0.1.**

### 3.2. Función discriminante

En la siguiente tabla se muestran los coeficientes de cada uno de los descriptores topológicos utilizados en la obtención de la función lineal discriminante en R.



ÍNDICE TOPOLÓGICO	COEFICIENTE	ÍNDICE TOPOLÓGICO	COEFICIENTE
nAcid	0,82	ndssC	-0,26
nBondsD	0,69	naasC	-0,04
C1SP2	0,14	ndO	0,13
C2SP2	$7,92 \times 10^{-3}$	nsSH	0,42
C3SP2	-0,022	nddssS	-0,90
C1SP3	-0,11	SssSe	$-3,40 \times 10^{-16}$
C3SP3	-0,49	hmin	$4,78 \times 10^{-13}$
C4SP3	-0,35	ETA_AlphaP	10,92
nHBd	0,34	ETA_epsilon_3	-87,90
nHBa	-0,44	ETA_Psi_1	-17,36
nHsOH	0,37	nHBacc	-0,28
nHssNH	-0,44	nHBDon	-0,13
nsCH3	0,13	nAtomLC	-0,02
nssCH2	-0,013	topoShape	2,52
naaCH	-0,16	WPATH	$6,23 \times 10^{-5}$
Zagreb	0,03		

**Tabla 13. Coeficientes de la función discriminante en R 3.0.1.**

A continuación se muestra los resultados de los principales estadísticos.

Pr en Test de Wilks (igualdad de medias)	Valor F
$< 2,2 \times 10^{-16}$	16,54

**Tabla 14. Principales estadísticos en R 3.0.1**

### 3.3. Clasificación de los grupos

En las siguientes tablas se muestra los resultados del conjunto de las moléculas activas y no activas del grupo de entrenamiento, de la validación cruzada del grupo de entrenamiento y del grupo test según los criterios de clasificación elegidos.

<b>GRUPO ENTRENAMIENTO ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
ACTIVOS	85	93,40
NO ACTIVOS	6	6,60
TOTAL ACTIVOS	91	100
<b>GRUPO ENTRENAMIENTO NO ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
NO ACTIVOS	97	99
ACTIVOS	1	1
TOTAL NO ACTIVOS	98	100
<b>TOTAL GRUPO ENTRENAMIENTO</b>		<b>96,30</b>

**Tabla 15: Resultados del grupo de entrenamiento en R 3.0.1.**

A continuación se muestra los resultados de la validación cruzada en el grupo de entrenamiento, donde cada caso se clasifica mediante las funciones derivadas a partir del resto de los casos.

<b>VALIDACIÓN CRUZADA GRUPO ENTRENAMIENTO ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
ACTIVOS	83	91,20
NO ACTIVOS	8	5,5
TOTAL ACTIVOS	91	100
<b>VALIDACIÓN CRUZADA GRUPO ENTRENAMIENTO NO ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
NO ACTIVOS	92	93,90
ACTIVOS	6	6,10
TOTAL NO ACTIVOS	98	100
<b>TOTAL ENTRENAMIENTO VALIDACIÓN CRUZADA</b>		<b>92,60</b>

Tabla 16: Resultados de la validación cruzada del grupo de entrenamiento en R 3.0.1.

En los **anexos 4 y 5** se detalla los valores en porcentaje de acierto de la validación cruzada o *a posteriori* de cada molécula en su grupo correspondiente.

<b>GRUPO TEST ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
ACTIVOS	19	90,50
NO ACTIVOS	2	9,50
TOTAL ACTIVOS	21	100
<b>GRUPO TEST NO ACTIVO</b>		
CLASIFICACIÓN	Nº MOLÉCULAS	ACIERTO (%)
NO ACTIVOS	23	92
ACTIVOS	2	8
TOTAL NO ACTIVOS	25	100
<b>TOTAL GRUPO TEST</b>		<b>91,31</b>

Tabla 17: Resultados del grupo test en 3.0.1.

A continuación se detalla los valores de la función discriminante en el grupo test activos y no activos (**tablas 18 y 19**).

---

NÚMERO	MOLÉCULA	CLASIFICACIÓN
1	AMBUROSIDEA	A
2	BAICALEIN	A
3	BIXIN	A
4	BUTEIN	A
5	CATIGUANINA	A
6	CROCETIN	A
7	ELLAGIC ACID	A
8	ESCULIN	A
9	HISPIDIN	A
10	ICARIIN	A
11	MIQUELIANIN	A
12	MYRICETIN	A
13	NARIRUTIN	A
14	PHLORIZIN	A
15	PINOCEMBRIN	N
16	QUERCETAGETIN	A
17	RHAMNETIN	A
18	SILIBININ	A
19	SPERMINE	N
20	SWERTIANIN	A
21	ASCORBIC ACID	A

**Tabla 18: Resultados de las moléculas del grupo test activos en 3.0.1.**

NÚMERO	MOLÉCULA	CLASIFICACIÓN
1	3605	N
2	3614	N
3	6802	N
4	6807	N
5	6810	N
6	6826	A
7	6841	N
8	7272	N
9	7550	N
10	7577	N
11	7588	N
12	7589	N
13	4969	N
14	5052	N
15	5065	N
16	5118	N
17	5140	N
18	5464	N
19	5526	N
20	5580	A
21	5611	N
22	5617	N
23	5647	N
24	5028	N
25	5116	N

**Tabla 19: Resultados de las moléculas del grupo test no activos en R 3.0.1.**

#### **4. REDES NEURONALES ARTIFICIALES EN SPSS**

Se ha realizado el estudio con los 657 índices topológicos obtenidos a través PaDEL-Descriptor.

Se ha utilizado para el aprendizaje de la red un grupo de 189 moléculas, de las cuales 91 son antioxidantes y 98 no lo son. A partir de aquí, y en base a la partición requerida (70/30) se han distribuido aleatoriamente de la siguiente forma:

	N	Porcentaje
Muestra Entrenamiento	132	69,8%
Prueba	57	30,2%
Válidos	189	100,0%
Excluidos	0	
Total	189	

**Tabla 20: Resumen de la distribución de los grupos en redes neuronales artificiales.**

En la siguiente tabla se observa el porcentaje de pronósticos incorrectos y el error de entropía cruzada de los grupos entrenamiento y prueba.

Entrenamiento	Error de entropía cruzada	17,389
	Porcentaje de pronósticos incorrectos	3,0%
	Regla de parada utilizada	1 pasos consecutivos sin disminución del error
	Tiempo de entrenamiento	00:00:01,154
Prueba	Error de entropía cruzada	10,442
	Porcentaje de pronósticos incorrectos	7,0%

Variable dependiente: ANTIOX ACT

**Tabla 21: Resultados de las redes neuronales artificiales.**

Finalmente, se muestra los porcentajes correctos desglosados por grupo de compuestos y la actividad antioxidante esperada.

Muestra	Observado	Pronosticado		
		0	1	Porcentaje correcto
Entrenamiento	0	68	0	100,0%
	1	4	60	93,8%
	Porcentaje global	54,5%	45,5%	97,0%
Test (prueba)	0	29	1	96,7%
	1	3	24	88,9%
	Porcentaje global	56,1%	43,9%	93,0%

Variable dependiente: ANTIOX ACT

**Tabla 22: Resultados de los grupos en redes neuronales artificiales.**

El resultado en conjunto de este modelo ha alcanzado un porcentaje de acierto de 95,79%.

El modelo obtenido definitivo contiene 10 capas ocultas. Se ha validado el modelo con un único aprendizaje al haber cumplido con el límite de error establecido.

En los **anexos 6 y 7** se puede observar los resultados de las redes neuronales en SPSS del grupo activos y no activos, respectivamente.

## 5. RESULTADOS GLOBALES

Los modelos desarrollados, con sus limitaciones, permiten obtener una primera aproximación a la potencial actividad antioxidante de las moléculas con un porcentaje global de acierto de 95,89%.

Asimismo, los resultados obtenidos en el grupo test presentan un porcentaje de acierto global de 93,03%.

## 6. BÚSQUEDA GUIADA

Una vez realizado el análisis lineal discriminante a través de SPSS y R, el siguiente paso es obtener los resultados de los descriptores seleccionados en los dos programas y calcular la puntuación de cada fármaco del *Catálogo de Medicamentos 2013* del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

Por lo tanto, en SPSS se ha utilizado la función discriminante con 12 índices topológicos, y en R, con 31 índices topológicos seleccionados.

Finalmente, introduciremos en el modelo de redes neuronales artificiales de SPSS los principios activos que hayan sido clasificados como antioxidantes en base al análisis discriminante de SPSS ó de R, o de ambos.

En la siguiente tabla (**tabla 23**) se expone el resultado de los tres modelos de discriminación realizados para los fármacos clasificados como antioxidantes en base al análisis discriminante de SPSS ó de R, o de ambos (VALOR FD: resultado de la función discriminante; PPROB (%): pseudoprobabilidad de acierto en porcentaje). Los principios activos se han introducido por orden de aparición en el Catálogo de Medicamentos 2013.

FÁRMACO	ANÁLISIS DISCRIMINANTE			REDES NEURONALES		TOTAL CLASIF. ACTIVOS
	SPSS		R	SPSS		
	VALOR FD	CLASIF.	CLASIF.	PPROB (%)	CLASIF.	
CARBENOXOLONA	-0,41	N	A	50,3	A	2
FIDAXOMICINA	2,23	A	A	90,3	A	3
MESALAZINA	1,82	A	A	95,5	A	3
NISTATINA	1,88	A	A	99,3	A	3
RIFAXIMINA	0,09	A	A	66,8	A	3
SILIBININA	1,70	A	A	97,2	A	3
TRIAMCINOLONA	0,26	A	N	51	A	2
AC. ACETILSALICÍLICO	1,70	A	A	84	A	3
ATENOLOL	0,07	A	N	52,1	A	2
CANDESARTAN	-0,06	N	A	92,8	A	2
CAPTOPRIL	0,59	A	A	87,3	A	3
CELIPROLOL	0,08	A	N	26,3	N	1
DIOSMINA	2,07	A	A	98	A	3
DOCONEXENTO	1,82	A	A	72,8	A	3
EPROSARTAN	0,06	A	A	12,6	N	2
ESCINA	0,48	A	A	99	A	3
FLUOCINOLONA	0,55	A	N	67,9	A	2
FLUVASTATINA	0,31	A	A	96,3	A	3
GEMFIBROZILO	1,10	A	A	66,6	A	3
ICOSAPENTO	1,62	A	A	99,6	A	3
IRBESARTAN	-2,65	N	A	77,7	A	2
ISOSORBIDA MONONITRATO	-0,14	N	A	98,6	A	2
ISOSORBIDA DINITRATO	1,21	A	A	98,4	A	3
LABETALOL	0,29	A	N	34,2	N	1
LOSARTAN	-0,69	N	A	56	A	2
NADOLOL	0,68	A	N	58,7	A	2
PITAVASTATINA	0,43	A	A	95,9	A	3
PRAVASTATINA	0,67	A	A	98,3	A	3
TELMISARTAN	-0,52	N	A	60,5	A	2
TROXERUTINA	1,51	A	N	99,5	A	2
VALSARTAN	-0,17	N	A	74,3	A	2



FÁRMACO	ANÁLISIS DISCRIMINANTE			REDES NEURONALES		TOTAL CLASIF. ACTIVOS
	SPSS		R	SPSS		
	VALOR FD	CLASIF.	CLASIF.	PPROB (%)	CLASIF.	
AC. AZELAICO	1,97	A	A	98,7	A	3
ACITRETINA	2,72	A	A	89,2	A	3
CICLOPIROX	0,22	A	N	15	N	1
CLORTETRACICLINA	1,04	A	N	71,3	A	2
DIFLORASONA	0,08	A	N	51,2	A	2
HIDROQUINONA	1,51	A	A	80,5	A	3
MEQUINOL	1,44	A	A	72,9	A	3
METRONIDAZOL	1,80	A	A	82,9	A	3
MUPIROCINA	0,26	A	A	95,6	A	3
NITROFURAL	-2,03	N	A	75,6	A	2
TRETINOINA	1,88	A	A	81,7	A	3
BAZEDOXIFENO	0,11	A	N	77,1	A	2
RALOXIFENO	0,09	A	N	4,1	N	1
RITODRINA	0,41	A	A	66,4	A	3
AC. CLAVULÁNICO	0,94	A	A	68,1	A	3
AMIKACINA	0,66	A	N	99,9	A	2
CEFIXIMA	-0,64	N	A	17,1	N	1
DOXICICLINA	0,73	A	N	98,4	A	2
ESTREPTOMICINA	1,37	A	N	95	A	2
ETAMBUTOL	1,00	A	N	17,1	N	1
FOSFOMICINA	1,78	A	A	61,1	A	3
GENTAMICINA	-0,23	N	A	85,5	A	2
MINOCICLINA	0,56	A	N	59,8	A	2
NITROFURANTOÍNA	-2,59	N	A	67,2	A	2
RIFABUTINA	0,10	A	N	49,8	N	1
RIFAMPICINA	0,57	A	A	71,6	A	3
TETRACICLINA	0,73	A	N	97	A	2
TIGECICLINA	0,35	A	N	54,5	A	2
TOBRAMICINA	1,36	A	N	97,6	A	2
ALOPURINOL	0,32	A	N	90,3	A	2

FÁRMACO	ANÁLISIS DISCRIMINANTE			REDES NEURONALES		TOTAL CLASIF. ACTIVOS
	SPSS		R	SPSS		
	VALOR FD	CLASIF.	CLASIF.	PPROB (%)	CLASIF.	
CAPSAICINA	0,08	A	N	30,8	N	1
DEXIBUPROFENO	0,58	A	N	75,4	A	2
DEXKETOPROFENO	0,49	A	N	50,8	A	2
DIACEREÍNA	1,04	A	A	83,4	A	3
IBUPROFENO	0,58	A	N	75,4	A	2
KETOPROFENO	0,49	A	N	50,8	A	2
NAPROXENO	0,94	A	A	75,5	A	3
ACAMPROSATO	0,38	A	A	89,7	A	3
AC. VALPROICO	1,39	A	A	96,7	A	3
BACLOFENO	1,12	A	A	80,8	A	3
CITICOLINA	0,04	A	A	96,6	A	3
FLUVOXAMINA	0,22	A	N	74,2	A	2
GABAPENTINA	0,92	A	A	65,3	A	3
OXITRIPTAN	1,71	A	A	88,2	A	3
PIRISUDANOL	0,86	A	N	76	A	2
VIGABATRINA	2,39	A	A	69,2	A	3
TINIDAZOL	-0,88	N	A	68,6	A	2
ACETILCISTEÍNA	0,73	A	A	93,9	A	3
AC. CROMOGLÍCICO	0,79	A	A	97,9	A	3
CARBOCISTEÍNA	2,29	A	A	98,7	A	3
FORMOTEROL	0,56	A	N	23	N	1
GUAIFENESINA	1,57	A	A	74,9	A	3
MONTELUKAST	-0,66	N	A	15,2	N	1
NEDOCROMILO	1,09	A	A	82	A	3
SALBUTAMOL	0,86	A	N	80,2	A	2
SOBREROL	0,72	A	A	82,9	A	3
TERBUTALINA	1,27	A	A	95,1	A	3
BROMFENACO	0,12	A	N	55,8	A	2
CARTEOLOL	0,01	A	N	23,9	N	1

**Tabla 23: Resultados de la búsqueda guiada en los tres modelos.**

En el **anexo 8** se representa la estructura química de los 43 compuestos clasificados como antioxidantes por los tres modelos utilizados (a excepción de las estructuras ya representadas a lo largo del trabajo).

En la siguiente tabla (**tabla 24**) se muestra las principales actividades farmacológicas de los principios activos que, en uno u otro modelo, se han clasificado como antioxidantes en relación a su clasificación anatómica.

<b>GRUPO A: TRACTO ALIMENTARIO Y METABOLISMO</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
CARBENOXOLONA	ANTIULCEROSO, ANTIINFLAMATORIO
FIDAXOMICINA	ANTIBACTERIANO MACRÓLIDO INTESTINAL
MESALAZINA	ANTIINFLAMATORIO INTESTINAL
NISTATINA	ANTIFUNGICO ANTI-CANDIDA
RIFAXIMINA	ANTIBACTERIANO INTESTINAL
SILIBININA	PROTECTOR HEPÁTICO
TRIAMCINOLONA	ANTIINFLAMATORIO CORTICOSTEROIDE
<b>GRUPO B: SANGRE Y ÓRGANOS HEMATOPOYÉTICOS</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	ANTIAGREGANTE PLAQUETARIO, AINE
<b>GRUPO C: APARATO CARDIOVASCULAR</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
ATENOLOL	ANTIHIPERTENSIVO, ANTIARRÍTMICO, ANTIANGINOSO
CANDESARTAN	ANTIHIPERTENSIVO
CAPTOPRIL	ANTIHIPERTENSIVO
CELIPROLOL	ANTIHIPERTENSIVO, ANTIANGINOSO
DIOSMINA	VASOPROTECTOR, ANTIVARICOSO
DOCONEXENTO	HIPOLIPEMIANTE
EPROSARTAN	ANTIHIPERTENSIVO
ESCINA	VASOPROTECTOR, ANTIVARICOSO
FLUOCINOLONA	ANTIINFLAMATORIO CORTICOSTEROIDE
FLUVASTATINA	HIPOLIPEMIANTE
GEMFIBROZIL	HIPOLIPEMIANTE
ICOSAPENTO	HIPOLIPEMIANTE
IRBESARTAN	ANTIHIPERTENSIVO
ISOSORBIDA DINITRATO	ANTIANGINOSO
ISOSORBIDA MONONITRATO	ANTIANGINOSO
LABETALOL	ANTIHIPERTENSIVO
LOSARTAN	ANTIHIPERTENSIVO
NADOLOL	ANTIHIPERTENSIVO, ANTIARRÍTMICO, ANTIANGINOSO
PITAVASTATINA	HIPOLIPEMIANTE
PRAVASTATINA	HIPOLIPEMIANTE
TELMISARTAN	ANTIHIPERTENSIVO
TROXERUTINA	VASOPROTECTOR, ANTIHEMORROIDAL
VALSARTAN	ANTIHIPERTENSIVO
<b>GRUPO D: TERAPIA DERMATOLÓGICA</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
ÁCIDO AZELAICO	ANTIACNEICO, DESPIGMENTADOR
ACITRETINA	ANTIPSORIÁSICO, QUERATOLÍTICO
CICLOPIROX	ANTIFÚNGICO

CLORTETRACICLINA	ANTIBACTERIANO TETRACICLINA
DIFLORASONA	ANTIINFLAMATORIO CORTICOSTEROIDE
HIDROQUINONA	DESPIGMENTADOR
MEQUINOL	DESPIGMENTADOR
METRONIDAZOL	ANTIBACTERIANO AZÓLICO
MUPIROCINA	ANTIBACTERIANO
NITROFURAL	ANTIBACTERIANO, ANTIPROTOZOARIO
TRETINOINA	ANTICANCEROSO
<b>GRUPO G: TERAPIA GENITOURINARIA (INCL.HORMONAS SEXUALES)</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
BAZEDOXIFENO	INHIBIDOR DE LA RESORCIÓN ÓSEA
RALOXIFENO	INHIBIDOR DE LA RESORCIÓN ÓSEA
RITODRINA	ANTIABORTIVO, BRONCODILATADOR
<b>GRUPO J: TERAPIA ANTIINFECCIOSA, USO SISTÉMICO</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
ÁCIDO CLAVULÁNICO	ANTIBACTERIANO INHIB. SÍNTESIS $\beta$ -LACTAMASAS
AMIKACINA	ANTIBACTERIANO AMINOGLUCÓSIDO
CEFIXIMA	ANTIBACTERIANO CEFALOSPORINA
DOXICICLINA	ANTIBACTERIANO TETRACICLINA
ESTREPTOMICINA	ANTIBACTERIANO AMINOGLUCÓSIDO
ETAMBUTOL	ANTITUBERCULOSO
FOSFOMICINA	ANTIBACTERIANO
GENTAMICINA	ANTIBACTERIANO AMINOGLUCÓSIDO
MINOCICLINA	ANTIBACTERIANO TETRACICLINA
NITROFURANTOINA	ANTIBACTERIANO USO UROLÓGICO
RIFABUTINA	ANTITUBERCULOSO
RIFAMPICINA	ANTITUBERCULOSO
TETRACICLINA	ANTIBACTERIANO TETRACICLINA
TIGECICLINA	ANTIBACTERIANO TETRACICLINA
TOBRAMICINA	ANTIBACTERIANO AMINOGLUCÓSIDO
<b>GRUPO M: SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
ALOPURINOL	ANTIGOTOSO
CAPSAICINA	ANALGESICO
DEXIBUPROFENO	AINE
DEXKETOPROFENO	AINE
DIACEREINA	ANTIRREUMÁTICO
IBUPROFENO	AINE
KETOPROFENO	AINE
NAPROXENO	AINE
<b>GRUPO N: SISTEMA NERVIOSO</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
ACAMPROSATO	ANTIALCOHOLISMO
ÁCIDO VALPROICO	ANTIAPILÉPTICO
BACLOFENO	RELAJANTE MUSCULAR
CITICOLINA	NOOTROPICO, VASODILATADOR CEREBRAL

FLUVOXAMINA	ANTIDEPRESIVO ISRS
GABAPENTINA	ANTIEPILÉPTICO
OXITRIPTAN	ANTIDEPRESIVO
PIRISUDANOL	VASODILATADOR CEREBRAL
VIGABATRINA	ANTIEPILÉPTICO
<b>GRUPO P: ANTIPARASITARIOS, INSECTICIDAS Y REPELENTES</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
TINIDAZOL	AMEBICIDA, TRICOMONICIDA
<b>GRUPO R: APARATO RESPIRATORIO</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
ACETILCISTEÍNA	MUCOLÍTICO
ÁCIDO CROMOGLÍCICO	ANTIASMÁTICO, ANTIALÉRGICO
CARBOCISTEÍNA	MUCOLÍTICO
FORMOTEROL	ANTIASMÁTICO, BRONCODILATADOR
GUAIFENESINA	EXPECTORANTE
MONTELUKAST	ANTIASMÁTICO, BRONCODILATADOR
NEDOCROMILO	ANTIALÉRGICO
SALBUTAMOL	ANTIASMÁTICO, BRONCODILATADOR
SOBREROL	EXPECTORANTE, MUCOLÍTICO
TERBUTALINA	ANTIASMÁTICO, BRONCODILATADOR
<b>GRUPO S: ÓRGANOS DE LOS SENTIDOS</b>	
PRINCIPIO ACTIVO	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA
BROMFENACO	AINE OFTÁLMICO
CARTEOLOL	ANTI GLAUCOMA

**Tabla 24. Actividad farmacológica de los 43 principios activos seleccionados.**

## **7. ESTUDIO EXPERIMENTAL**

### **7.1. Inhibición de la peroxidación lipídica**

#### **7.1.1. Selección de las moléculas**

Se han seleccionado 11 moléculas para realizar el estudio de medición de la inhibición de la peroxidación lipídica. Los criterios de elección se han basado en los resultados primordialmente y teniendo en cuenta la disponibilidad en el laboratorio de los mismos así como el coste económico. Asimismo, se ha ensayado también otros compuestos con líneas abiertas de investigación en nuestro Departamento.

### 7.1.2. Captopril

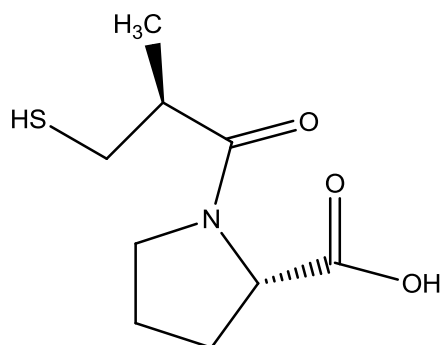


Figura 21: Estructura química del captopril.

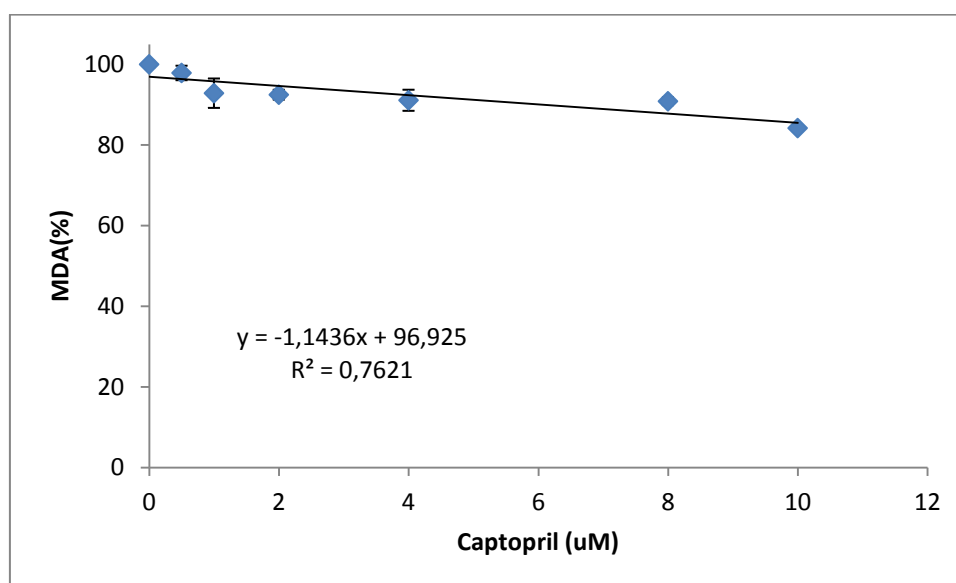


Figura 22: Recta de regresión MDA:captopril.

Se ha observado una disminución de un 15,81% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de captopril (10uM).

### 7.1.3. Nistatina

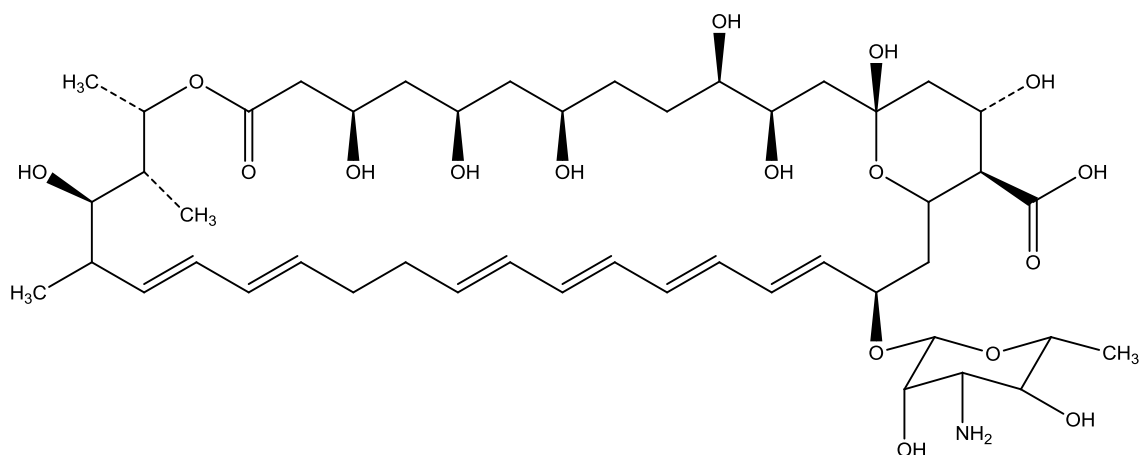


Figura 23: Estructura química de la nistatina.

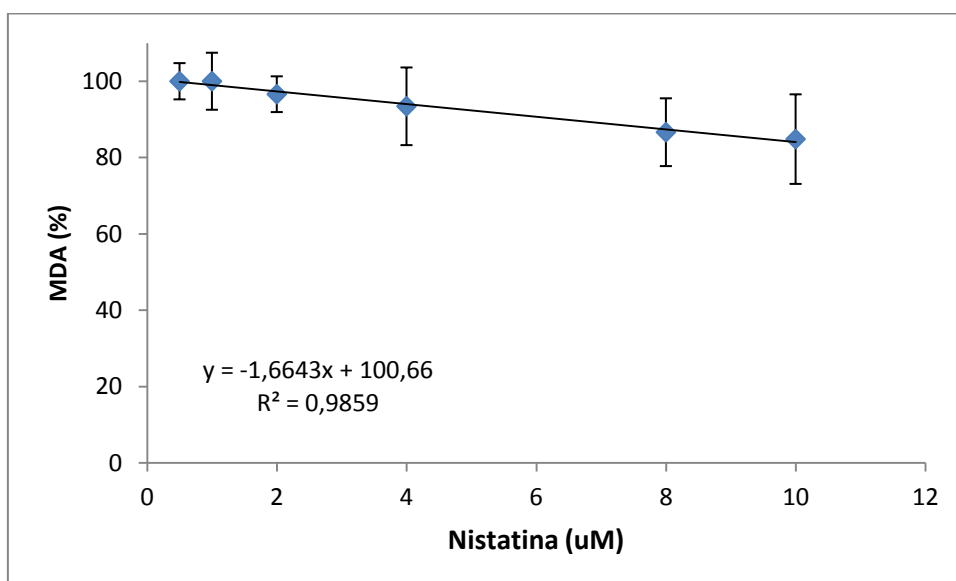


Figura 24: Recta de regresión MDA:nistatina.

Se ha observado una disminución de un 15,16% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de nistatina (10uM).

### 7.1.4. Atenolol

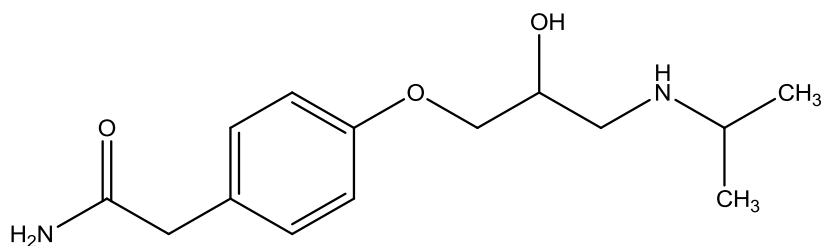


Figura 25: Estructura química del atenolol.

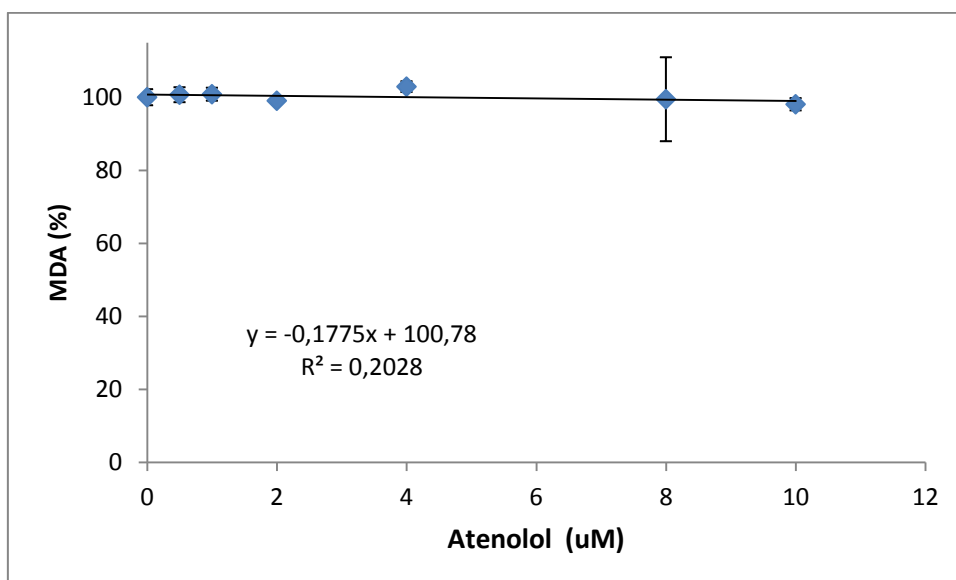


Figura 26: Recta de regresión MDA: atenolol.

Se ha observado una disminución de un 1,93% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de atenolol (10uM).



### 7.1.5. Simvastatina

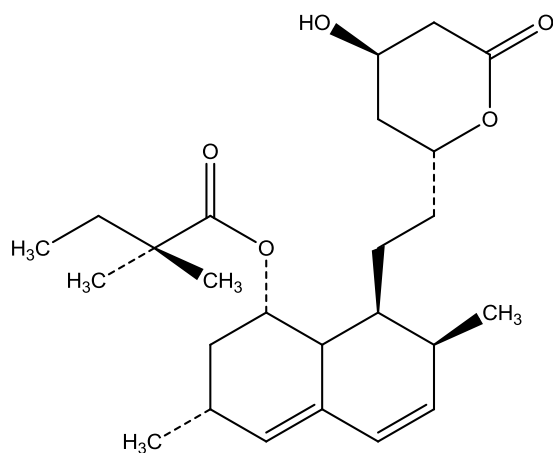


Figura 27: Estructura química de la simvastatina.

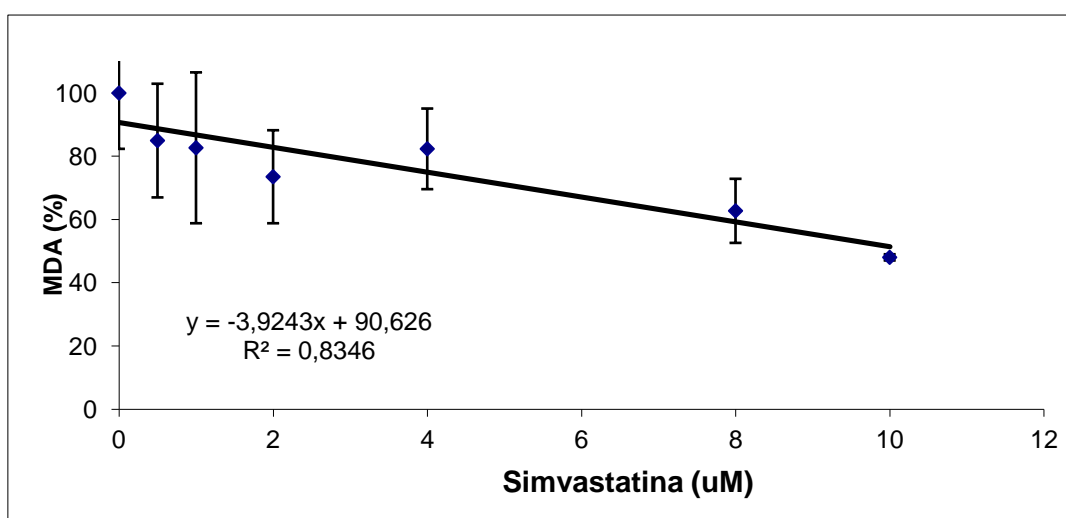


Figura 28: Recta de regresión MDA: simvastatina.

Se ha observado una disminución de un 51,97% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de simvastatina (10uM).

## 7.1.6. Sertralina

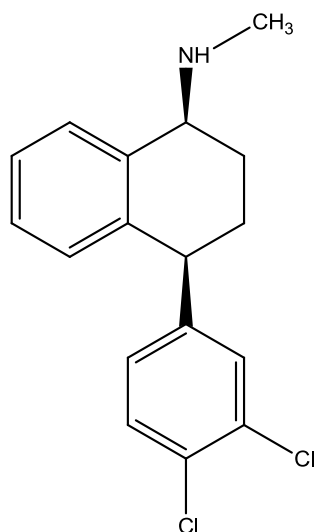


Figura 29: Estructura química de la sertralina.

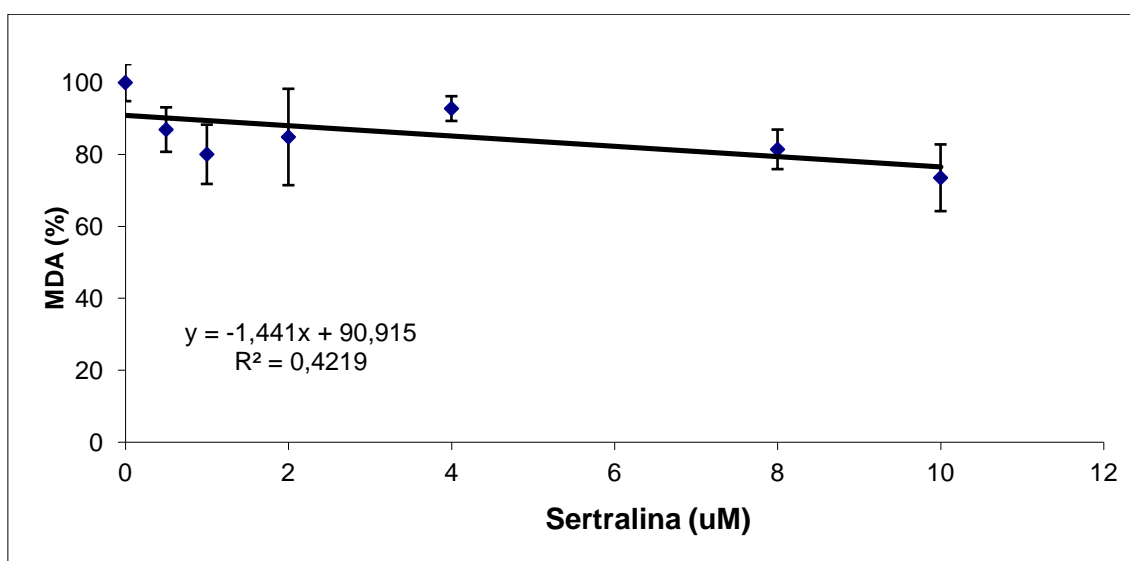


Figura 30: Recta de regresión MDA: sertralina.

Se ha observado una disminución de un 26,47% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de sertralina (10uM).

### 7.1.7. Progesterona

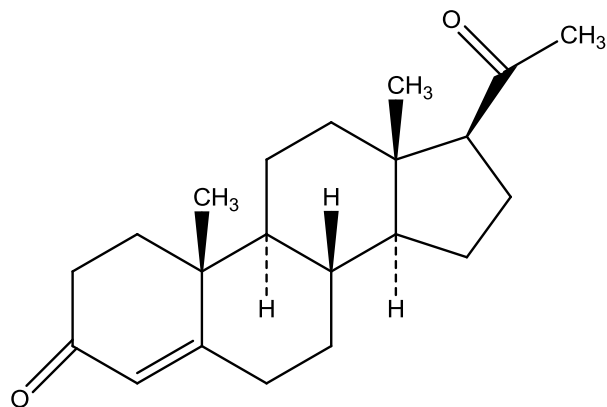


Figura 31: Estructura química de la progesterona.

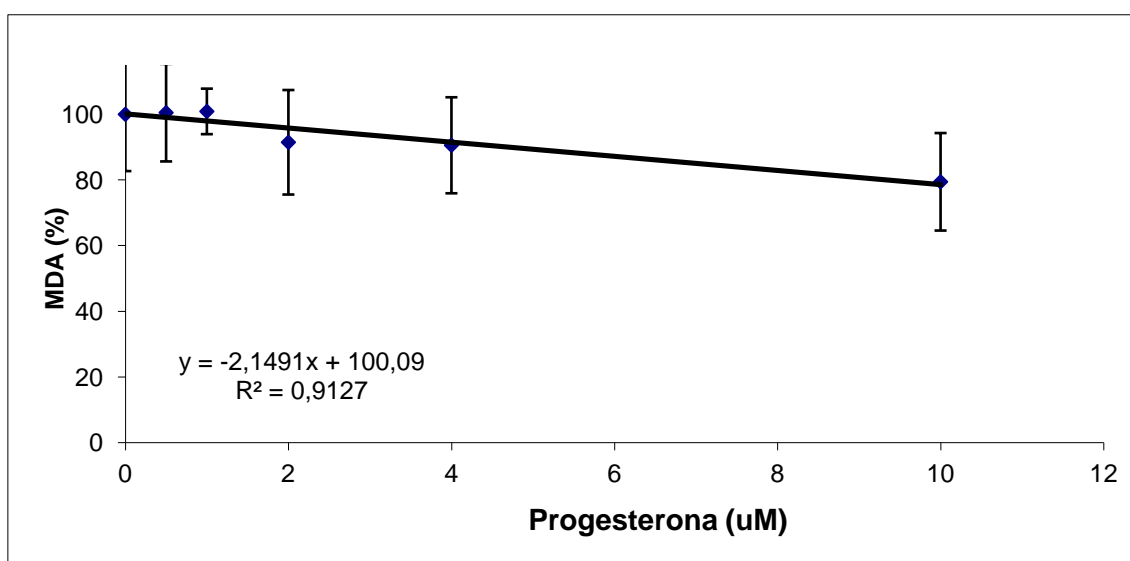


Figura 32: Recta de regresión MDA: progesterona.

Se ha observado una disminución de un 20,55% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de progesterona (10uM).

### 7.1.8. 5-fluorouracilo (5-FU)

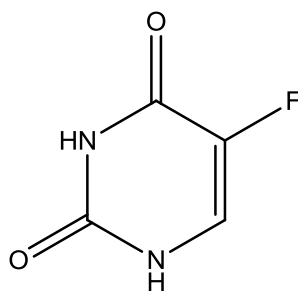


Figura 33: Estructura química del 5-FU.

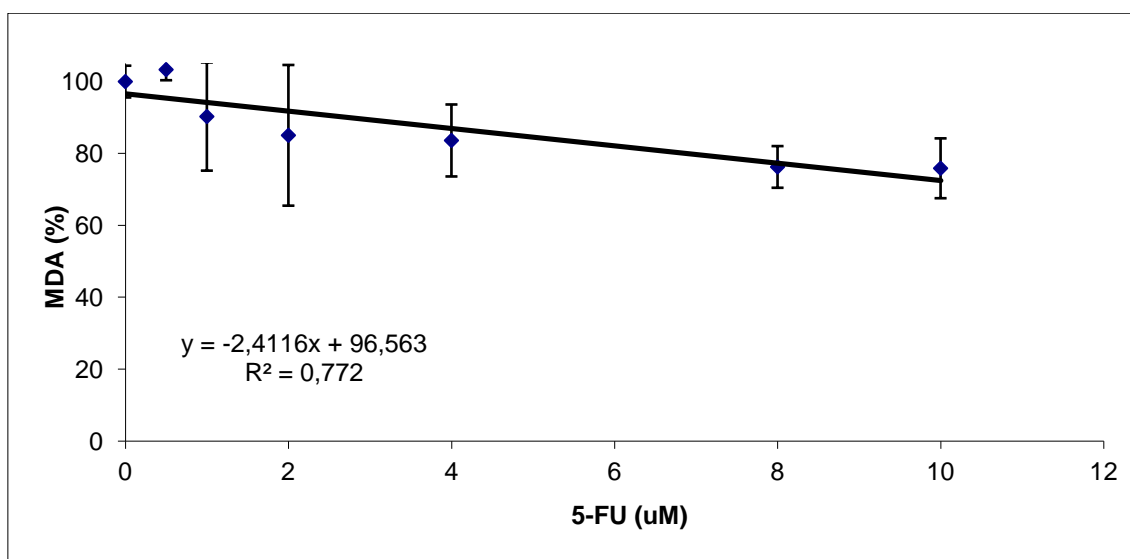


Figura 34: Recta de regresión MDA: 5-FU.

Se ha observado una disminución de un 24,11% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de 5-FU (10uM).

### 7.1.9. S-81 (6-(difluorofenilmetil)-3-(2,4,6-trifluorofenil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-Dione.

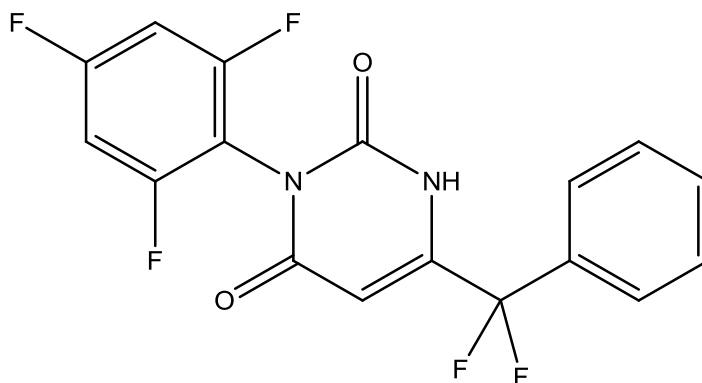


Figura 35: Estructura química del S-81.

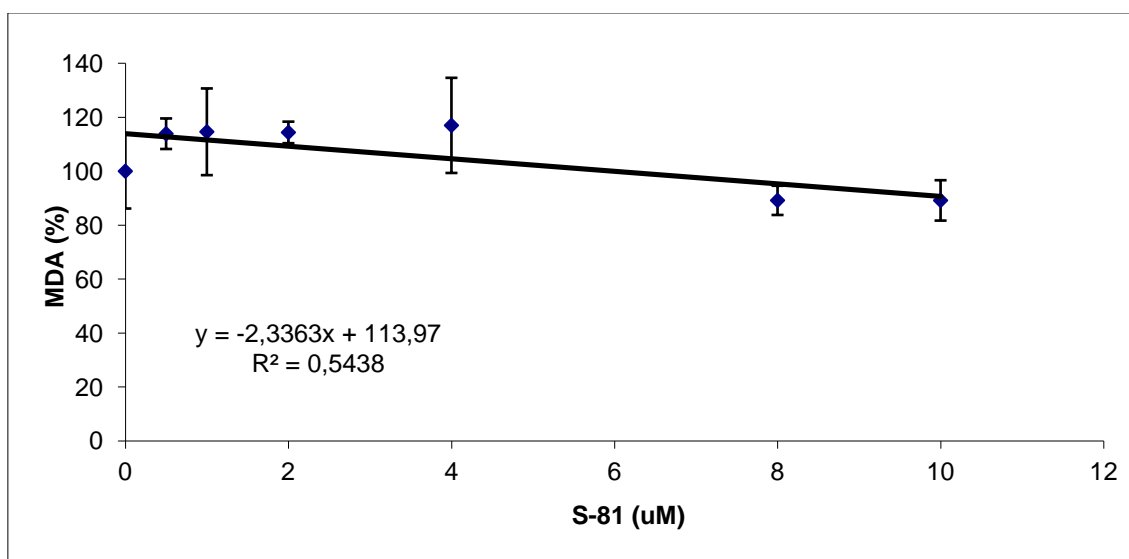
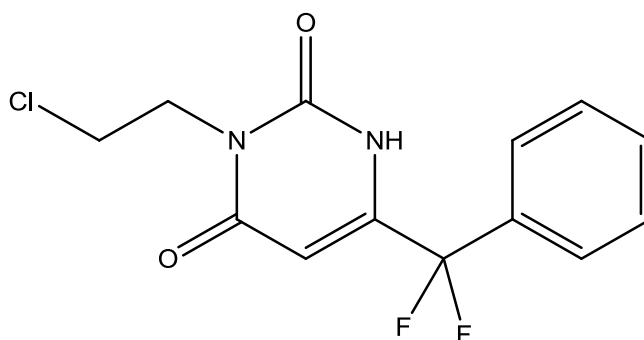
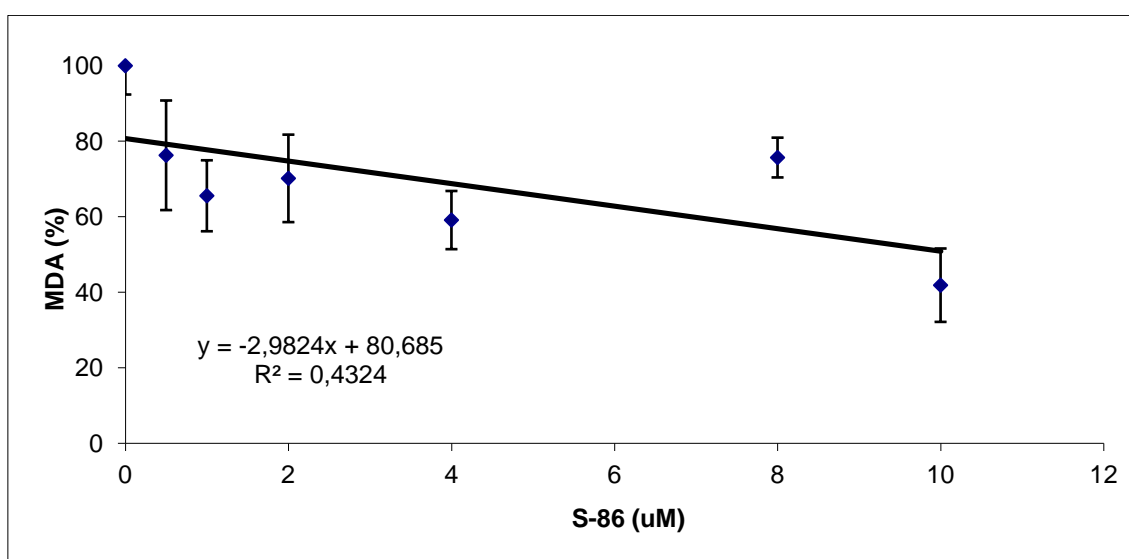


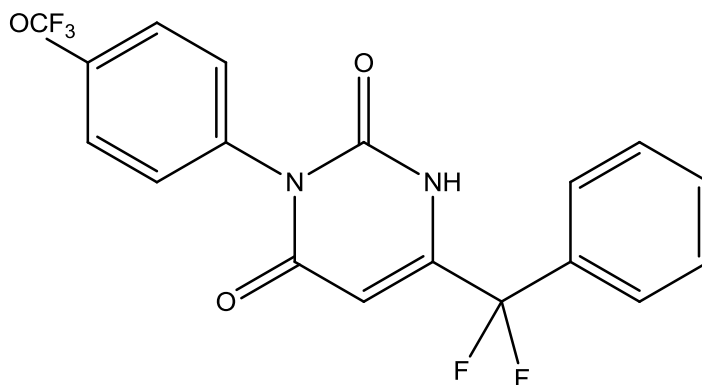
Figura 36: Recta de regresión MDA: S-81.

Se ha observado una disminución de un 10,83% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de S-81 (10uM).

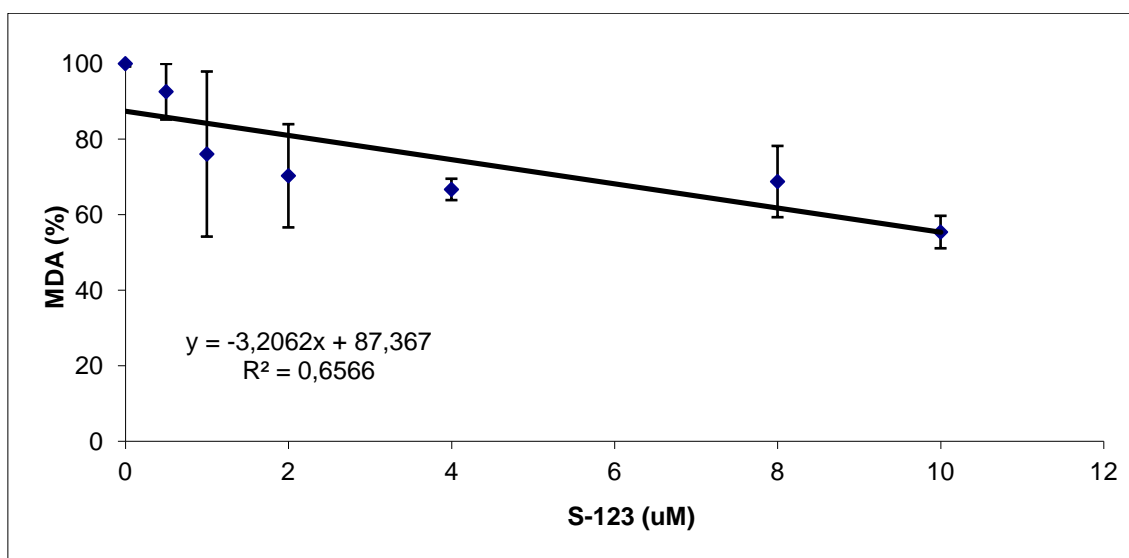
**7.1.10. S-86 (3-(2-cloroetil)-6-(difluorofenilmetil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-diona)****Figura 37: Estructura química del S-86.****Figura 38: Recta de regresión MDA: S-86.**

Se ha observado una disminución de un 58,12% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de S-86 (10uM).

**7.1.11. S-123 (6-(Difluorofenilmetil)-3-(4-trifluorometoxifenil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-diona**



**Figura 39: Estructura química del S-123.**



**Figura 40: Recta de regresión MDA: S-123.**

Se ha observado una disminución de un 44,61% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de S-123 (10uM).

### 7.1.12. Ácido lipoico

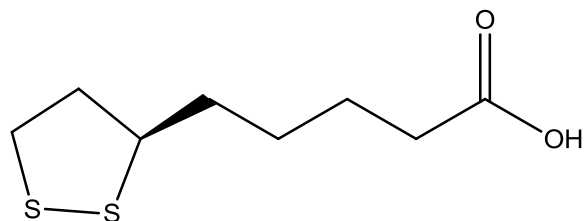


Figura 41: Estructura química del ácido lipoico.

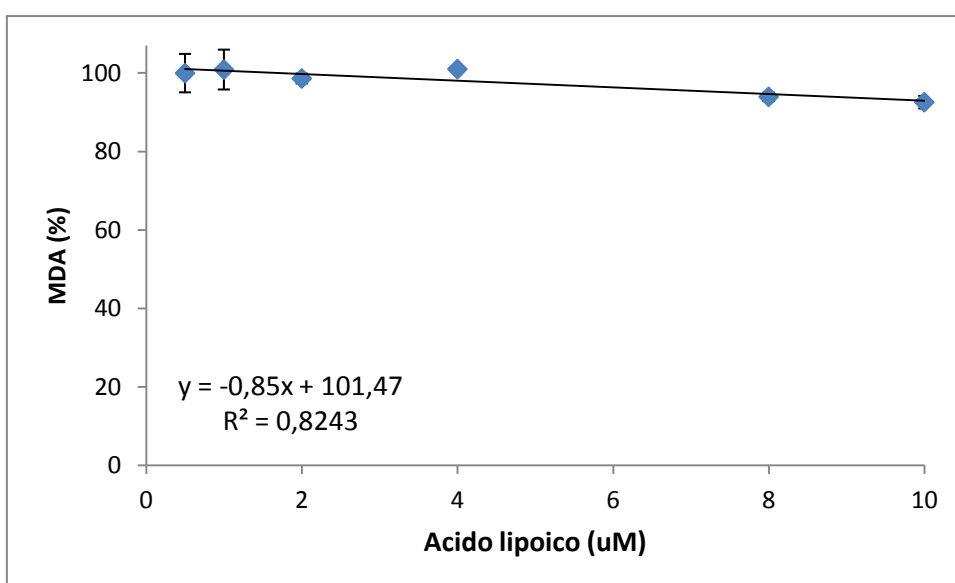


Figura 42: Recta de regresión MDA: ácido lipoico.

Se ha observado una disminución de un 7,4% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de ácido lipoico (10uM).



## 7.2. Estudio de la capacidad antioxidante

Se ha elegido, de los principios activos clasificados como antioxidantes por al menos dos de los tres modelos, 6 moléculas para realizar el estudio de la capacidad antioxidante. También se ha estudiado la capacidad antioxidante del 5-fluoruracilo y del ácido lipoico.

El disolvente elegido para preparar los patrones y las muestras ha sido el dimetilsulfóxido (DMSO) por motivos de solubilidad de los compuestos y de acuerdo con la normativa de uso del kit del fabricante.

Se ha calculado la capacidad antioxidante en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) para los 8 compuestos a una concentración situada dentro de los límites de la recta patrón del Trolox. Esta concentración ha sido de 0,31 mM.

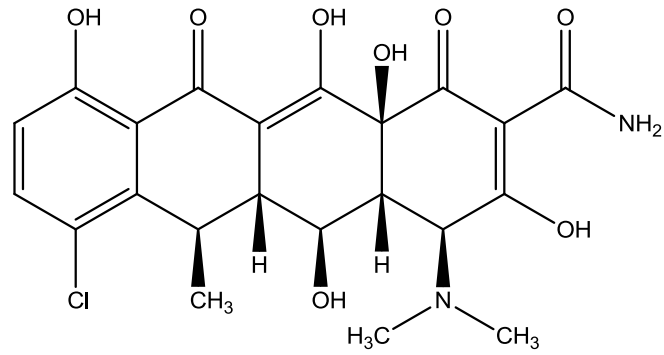
En la siguiente tabla se exponen los resultados (**tabla 25**).

Compuesto	TEAC (mM)*
Atenolol	0,10
Captopril	0,64
Hidroquinona	0,96
Doxiciclina	0,93
Nistatina	0,72
Ácido azelaico	0,51
5-Fluoruracilo	0,68
Ácido lipoico	0,32

\*TEAC (mM): mM de trolox equivalentes a 1 mM del compuesto

**Tabla 25. Resultados del estudio de la capacidad antioxidante**

A continuación se presenta la estructura química de la doxiciclina (**figura 43**). Las figuras de las estructuras químicas de la hidroquinona y el ácido azelaico se encuentran en el **anexo 8**.



**Figura 43: Estructura química de la doxiciclina.**

## **V. DISCUSIÓN**



## 1. CONSIDERACIONES FINALES ACERCA DE LOS ANTIOXIDANTES

Predecir la actividad antioxidante de las moléculas se ha convertido en los últimos años en un gran reto en el ámbito académico e industrial, una vez conocido el papel del estrés oxidativo en diversas patologías multifactoriales como el cáncer, la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades cardiovasculares, etc.

Sin embargo, este reto requiere conocer exactamente los aspectos físico-químicos que dirigen esta actividad. Desde un punto de vista químico, los antioxidantes son capaces de ceder electrones a especies reactivas como son los radicales libres, entre otras. No obstante, existen aún muchos interrogantes acerca de cómo ejercen su papel en el organismo. Diversos autores se preguntan cómo es posible predecir la actividad antioxidante en sistemas naturales multifásicos, si la mayoría de los estudios se realizan en soluciones artificiales homogéneas (Laguerre *et al.*, 2014).

Existe mucha información en relación a las biodisponibilidades de los distintos antioxidantes y qué factores están implicados en las mismas. La presencia de hidratos de carbono en la molécula, las reacciones de acilación y esterificación influyen significativamente en el proceso de absorción de los compuestos fenólicos (Scalbert *et al.*, 2000). Otro factor que influye en la biodisponibilidad es la presencia de alimentos (grasas, fibras) en el tracto gastrointestinal (Ratnam *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha propuesto que determinados antioxidantes como los flavonoides y otros compuestos fenólicos podrían ejercer su actividad preventiva en el tracto gastrointestinal sin necesidad de absorción (Halliwell, 2000).

Otro interrogante es conocer cuál es el destino final de los antioxidantes una vez han ejercido su acción. En este tipo de reacciones, si una molécula es reducida, otra tiene que ser oxidada (antioxidante). De distintos estudios (Jacob, 1995) con antioxidantes, se puede deducir que varias enzimas están implicadas en el destino de estos compuestos oxidados, llevando en muchos casos a la regeneración de los mismos. De esta forma, se podría deducir que a menudo los antioxidantes actúan de una forma sinérgica junto a otros (Ndhala *et al.*, 2010).

Por otro lado, la inmensa mayoría de publicaciones científicas se limita a determinar los efectos beneficiosos de los antioxidantes y sólo unas pocas determinan la toxicidad de los mismos (Bast *et al.*, 2002).

En cuanto a los diversos metaanálisis realizados para evaluar los beneficios de la suplementación con vitaminas y antioxidantes, muchos de sus autores reflexionan acerca del importante papel de los procesos oxidativos en el correcto funcionamiento celular y del estado inicial oxidativo de los individuos estudiados. Al administrar dosis altas de antioxidantes, en comparación con las de una adecuada ingesta dietética, se podría atenuar estos beneficiosos procesos oxidativos. Esto podría ser una explicación razonable del porqué estos meta-análisis en muchas ocasiones no presentan resultados a favor del uso de antioxidantes para prevenir diversas patologías (Farbstein *et al.*, 2010).

Finalmente, son necesarios más estudios para conocer en detalle de cada compuesto antioxidante la biodisponibilidad, absorción, farmacocinética y metabolismo. El futuro en la investigación debe explicar cómo las interacciones y sinergismos observados *in vitro* se trasladan al organismo (Ndhala *et al.*, 2010).

## **2. OBTENCIÓN DE LOS FICHEROS .MOL Y CÁLCULO DE ÍNDICES TOPOLÓGICOS**

La herramienta de internet ChEBI ó EMBL y el Index Merck han proporcionado satisfactoriamente los archivos en formato MDL Molfile de todas las moléculas del estudio. Estas son:

- 189 moléculas del grupo de entrenamiento.
- 46 moléculas del grupo test.
- Todas las incluidas en el *Catálogo de Medicamentos 2013* excepto las eliminadas inicialmente en base a los criterios previamente expuestos (aprox. 2500 moléculas).

El cálculo de los índices topológicos para todas las moléculas incluidas en el estudio, demuestra la robustez, fiabilidad y fácil manejo del programa abierto PaDEL-Descriptor. Esto es fundamental en un estudio como este, donde se ha trabajado con un gran número de datos.

### 3. DISCRIMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

#### 3.1. SPSS

Se han seleccionado 657 índices topológicos de 21 tipos distintos del programa PaDEL-Descriptor para obtener la función lineal discriminante.

Se han utilizado 91 moléculas con reconocida actividad antioxidante y 98 sin dicha actividad previamente reconocida (grupo de entrenamiento) para obtener, mediante numerosos entrenamientos, la función lineal discriminante.

Asimismo, se han utilizado 21 moléculas con reconocida actividad antioxidante y 25 sin dicha actividad previamente reconocida (grupo test) para validar la función lineal discriminante.

Como criterio de clasificación se han elegido como potenciales antioxidantes aquellas moléculas con valor de la función discriminante superior a cero.

La función discriminante resultante es:

$$FD = 28,545 + 0,196C3SP2 + 0,402nHBd + 0,136nHdsCH + 0,115nsCH3 + 5,589nssSe + 2,706minHsOH - 2,891minHssNH + 5,784mindS - 58,288ETA\_EPSILON\_3 - 10,584ETA\_Psi\_1 - 0,202 nHBacc + 1,364topoShape$$

Los parámetros estadísticos (Autovalor: 4,082, Correlación canónica: 0,896,  $\lambda$  de Wilks: 0,197 y Chi-cuadrado de  $\lambda$  de Wilks: 293,45), junto a la concordancia de las predicciones, permiten validar la función discriminante lineal.

La función discriminante obtenida permite, con 12 variables, realizar una correcta clasificación de los compuestos en el grupo de entrenamiento, con porcentajes de acierto del 94,5% en las moléculas del grupo de entrenamiento activo y del 94,9% en las moléculas del grupo de entrenamiento no activo. La validación cruzada global ha sido del 93,64%.

Al utilizar esta función en el grupo test, se ha obtenido un acierto del 95,24% en las moléculas del grupo test activo y de un 92% en el grupo test no activo.

El rango de puntuación ha oscilado entre 3,84 y -4,23, lo que indica el ajuste de la función, teniendo en cuenta la presencia de 12 variables y 189 moléculas utilizadas.

La función discriminante nos proporciona información topológica de gran utilidad al indicar qué descriptores contribuyen de forma positiva o negativa a la actividad antioxidante.

Se observa como los índices C3SP2, nHBd, nHdsCH, nsCH3, nssSe, minHsOH, mindS y toposhape contribuyen de forma positiva en las moléculas a presentar actividad antioxidante. Los siete primeros de estos índices son descriptores electrotopológicos y nos facilitan información del estado topológico y electrónico de cada átomo.

De igual forma, los índices minHssNH, ETA\_epsilon\_3, ETA\_Psi\_1 y nHBacc contribuyen de forma negativa en las moléculas a presentar actividad antioxidante.

Los índices C3SP2 y nHdsCH nos informan acerca de la presencia de dobles enlaces en el átomo de carbono, susceptibles por tanto de ceder electrones y comportarse como agentes reductores. Ejemplos de antioxidantes con varios enlaces dobles en su estructura química son los tocotrienoles y los carotenoides.

Los índices nHBd y nHBacc nos indican la presencia de átomos donantes de enlaces de hidrógeno y átomos aceptores de enlaces de hidrógeno, respectivamente. La presencia de estos átomos potencialmente donantes de enlaces de hidrógeno hace posible que la molécula pueda ceder electrones y comportarse como antioxidante. La presencia de átomos potencialmente aceptores de enlaces de hidrógeno hace posible que la molécula pueda captar electrones y comportarse como oxidante.

Los descriptores nsCH3, nssSe, minHsOH, mindS y minHssNH hacen referencia a átomos o grupos funcionales con un papel relevante, que intervienen en la posible actividad antioxidante.

El descriptor nsCH3 indica el recuento de E-estados de tipo de átomos  $-CH_3$ . El grupo metilo ( $-CH_3$ ) está muy presente en el conjunto de las moléculas y su coeficiente en la función indica un peso menos relevante, si bien determinados antioxidantes como los carotenoides presentan numerosos grupos metilo.

El descriptor nssSe indica el recuento de E-estados de tipo de átomo  $-Se-$ . El átomo de selenio contribuye favorablemente a disminuir el estrés oxidativo en nuestro organismo al formar parte de la enzima glutatión peroxidasa, la cual es una selenoproteína con uno o más residuos de selenocisteína. Ejemplos de antioxidantes con un átomo de selenio son el ebselen y el ácido metilselénico.

El descriptor minHsOH representa el mínimo E-estado de tipo de átomos  $-OH-$ . Para desarrollar su acción antioxidante, se cree que el grupo hidroxilo aporta un átomo



de hidrógeno a la molécula reducida. En los flavonoides, por ejemplo, estos grupos hidroxilo juegan un papel esencial en su actividad antioxidante.

El descriptor `minHssNH` representa el mínimo E-estado de tipo de átomos  $-NH-$ , el cuál en este estudio presenta una contribución negativa, posiblemente por el mayor número de compuestos no activos en el grupo de entrenamiento en nuestra selección inicial que presentan este grupo funcional  $-NH-$  frente al grupo de compuestos activos.

El descriptor `mindS` representa el mínimo E-estado de tipo de átomo  $=S$ . El átomo de azufre también puede contribuir a la acción antioxidante como en el caso de la tiourea.

El descriptor `ETA_Epsilon_3` es una medida general de la electronegatividad de la molécula. La electronegatividad, como medida de la capacidad de un átomo de atraer electrones, contribuye negativamente a la capacidad antioxidante, pues estos átomos se comportan como oxidantes (ganan electrones).

El descriptor `ETA_Psi_1` representa la relación entre la predisposición a formar enlaces de hidrógeno de la molécula y el área de la superficie polar. En la ecuación también contribuye negativamente a la actividad antioxidante.

Por último, el descriptor `topoShape` es una medida de la forma molecular.

### **3.2. R 3.0.1**

Se han depurado exhaustivamente el conjunto de índices topológicos del PaDEL-Descriptor con el fin de obtener en *R* una serie de variables que el programa aceptara como independientes. Finalmente, se ha elegido trabajar con 31 descriptores. Es de resaltar, que los índices o descriptores topológicos son como su nombre indica, descriptores. Esto implica que en muchos casos, como puede ser el número de átomos de carbono o de hidrógeno, o el número de enlaces puedan ser colineales en una misma molécula. Esto lleva a un manejo de información redundante. Por otro lado, muchos índices son transformaciones matemáticas simples o complejas de otros, si bien es cierto, que en determinadas situaciones pueden ser muy útiles para predecir mejor los comportamientos químicos o biológicos de las moléculas.

Al igual que en SPSS, se han utilizado 91 moléculas con reconocida actividad antioxidante y 98 sin dicha actividad previamente reconocida (grupo de entrenamiento) para obtener la función lineal discriminante.

Asimismo, se han utilizado 21 moléculas con reconocida actividad antioxidante y 25 sin dicha actividad previamente reconocida (grupo test) para validar la función lineal discriminante.

Como criterio de clasificación se ha elegido como potenciales antioxidantes aquellas moléculas con valor de la función discriminante superior a cero.

De los 31 coeficientes obtenidos, 14 de ellos contribuyen de forma positiva a la actividad antioxidante.

Los principales estadísticos obtenidos (Pr en test de Wilks  $< 2,2 \times 10^{-16}$  y el valor F de 16,54), junto a la concordancia de las predicciones, permiten validar la función discriminante lineal.

La función discriminante obtenida permite, con 31 variables, realizar una correcta clasificación de los compuestos en el grupo de entrenamiento, con porcentajes de acierto del 93,4% en las moléculas del grupo de entrenamiento activo y del 99% en las moléculas del grupo de entrenamiento no activo. La validación cruzada global ha sido del 92,60%.

Al utilizar esta función en el grupo test, se ha obtenido un acierto del 90,5% en las moléculas del grupo test activo y de un 92% en el grupo test no activo.

### **3.3. Redes neuronales artificiales en SPSS**

Se han seleccionado 657 índices topológicos de 21 tipos distintos del programa PaDEL-Descriptor para obtener la función lineal discriminante.

Se han utilizado 91 moléculas con reconocida actividad antioxidante y 98 sin dicha actividad previamente reconocida (grupo de entrenamiento) para obtener el modelo que nos permita introducir los principios activos clasificados como antioxidantes en el análisis lineal discriminante.

En este estudio, no se ha introducido el grupo test en la red neuronal con el fin de hacer comparable este modelo con los otros dos anteriores. En todo caso, la red aleatoriza los grupos con la partición deseada (en nuestro caso, 70% grupo de

entrenamiento y 30% grupo prueba), de tal forma que no es del todo comparable al no conocer la aleatorización de los grupos.

Se ha elegido un modelo de red adecuado en base a otros estudios previos, eligiendo el perceptrón multicapa, la escala de covariables normalizada y un número máximo de 50 unidades en la capa oculta.

Los resultados obtenidos han sido similares a los obtenidos con los otros dos modelos, con un porcentaje de acierto de 97% en el grupo de entrenamiento, y un 93% en el grupo prueba. Es de reseñar, como se puede observar en el anexo 5 y 6, que el resultado obtenido en el grupo de entrenamiento activo es de 92,3% mientras que en el grupo de entrenamiento no activo es de 98,97%, con tan sólo un dato inesperado.

Por lo tanto, el uso de redes neuronales enriquece los otros dos modelos y nos permite validar los resultados obtenidos previamente.

### **3.4 Comentarios finales**

El objetivo del estudio realizado es novedoso en cuanto a la obtención de una función discriminante general capaz de clasificar la potencial actividad antioxidante del conjunto de moléculas. Como se ha comentado anteriormente, la utilización de las técnicas QSAR en el estudio de la actividad antioxidante se ha dirigido a familias químicas específicas o bien, a la revisión de estos estudios. Recientemente se han realizado dos interesantes aproximaciones en las que mediante la selección de determinados descriptores topológicos se estudió la capacidad predictiva de bloquear los radicales libres en un grupo de varias familias estructurales de antioxidantes (Pérez-Garrido *et al.*, 2012; Fatemi *et al.*, 2013).

La selección de las moléculas antioxidantes en la base de datos ChEBI mediante la introducción del término de búsqueda “antioxidants” obtuvo 251 moléculas. Se eliminaron las moléculas con el mismo inicio de nombre, por ejemplo, se seleccionó un solo compuesto de la familia *quercetina* en lugar de cinco. También se eliminaron los fármacos que figuraban como antioxidantes para no corromper el modelo pues posteriormente iban a ser evaluados.

El uso del programa PaDEL-Descriptor ha sido de una inestimable ayuda, teniendo en cuenta su acceso libre y gratuito. Frente a los casi 5000 índices del programa *Dragon*, PaDEL-Descriptor ha satisfecho con creces las necesidades del presente estudio. Quiero resaltar en este momento también la gratuidad del programa estadístico R 3.0.1 y su gran ayuda en nuestro cometido.

La utilización conjunta del análisis discriminante en dos modelos (SPSS y R) obedece a varios motivos. El primero y más importante, ha sido la dificultad de obtener una correcta función discriminante en nuestro programa estadístico disponible (SPSS), como comento en el siguiente párrafo. El modelo complementario con el programa estadístico R 3.0.1 nos ha permitido reforzar el modelo basado en el análisis discriminante. Se ha conseguido validar los nuevos procesos de discriminación propuestos con el empleo de una red neuronal artificial, en comparación con otro como el análisis discriminante, ampliamente utilizado en análisis QSAR y con resultados satisfactorios. Además, si los resultados son aceptables por los tres métodos, dispondríamos de un triple criterio de discriminación de la actividad antioxidante buscada, con lo que el posterior proceso de selección de estructuras con teórica actividad antioxidante sería mucho más restrictivo y con mayores garantías de éxito.

Fijando la atención en la dificultad en SPSS de encontrar una correcta función discriminante cabe señalar que la mayoría de pruebas realizadas con distintos número de moléculas antioxidantes y no antioxidantes presentaban como resultados funciones discriminantes con un número de variables excesivo (en algunos casos superiores a 20 descriptores topológicos) (García-Domenech *et al.*, 1998). Además, muchos de los descriptores carecían de relevancia en nuestro conjunto de moléculas. De los 657 índices utilizados, cientos de ellos presentaban valores en un número muy escaso de moléculas o incluso presentaban valor cero en el conjunto de las moléculas. El programa estadístico, en muchas ocasiones, incluía estos descriptores residuales en la función discriminante, lo que obligaba a reformular continuamente la función o eliminar descriptores. En otras ocasiones, en las que se redujo el número de índices topológicos a menos de cien, se obtenían valores positivos para todas las moléculas, con la consiguiente nula capacidad discriminante (posiblemente por un incorrecto

equilibrio en la selección de los índices) ó bien, presentaba de nuevo un número de índices excesivamente elevado.

Por otro lado, nuestro universo de moléculas cuenta con un alto grado de heterogeneidad desde el punto de vista de las estructuras químicas, como queda reflejado en el apartado “tipos de antioxidantes” de la introducción. Muchas de las moléculas conocidas a nivel general o académico (trolox, glutatión, ebselen, etc.) disponen de grupos químicos muy concretos, y estos están muy relacionados con su actividad antioxidante (Wu *et al.*, 1990; Douglas, 1987; Schewe, 1995). Por ejemplo, el átomo de azufre se ha presentado en el grupo de estudio con tres tipos de enlaces distintos (-S-, =S, -SH). La ecuación, en muchos casos ha superado esta barrera, como en el caso, por ejemplo del glutatión. Este, a pesar de presentar un grupo -SH (y no figurar en la función discriminante un descriptor electrotopológico basado en el grupo -SH) ha presentado un valor 1,39 en la función. Otro ejemplo es el ácido dihidrolipoico con dos grupos -SH en su estructura y un valor de 1,14 en la función. En cuanto al número de variables o descriptores puede parecer excesivo, pero el objetivo de desarrollar una ecuación general que prediga la actividad antioxidante, ha requerido la introducción de determinados descriptores que se relacionan directamente con grupos funcionales químicos en las moléculas. Como se ha comentado, no se han incluido dos descriptores electrotopológicos relacionados con el azufre (-S, -SH) y un descriptor relacionado con el selenio (=Se).

En cuanto al signo positivo o negativo de los distintos descriptores, la interpretación del signo negativo del descriptor minHssNH ha sido compleja. Una posible explicación podría ser la incorrecta aleatorización de las moléculas en ambos grupos, activos y no activos. Volviendo la vista atrás, se aprecia una presencia claramente superior de grupos -NH en el grupo de entrenamiento no activos. Sin embargo, en pocos antioxidantes de los seleccionados en el grupo de entrenamiento activos se encontraba un grupo -NH. La media de los valores en los grupos difería significativamente pero el mayor número de valores en el grupo de no activos puede haber incidido en el signo. Esto nos ha llevado a decidir finalmente la inclusión del 5-fluorouracilo (5-FU), que presenta dos grupos -NH- en su estructura química, y otros derivados de uracilo fluorados (con un único grupo -NH- en su estructura química) en

nuestro estudio experimental. Inicialmente, se estudió la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica (determinación de MDA) del 5-FU. En vista al resultado observado (disminución de un 24,11% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de (10uM)), se decidió incluir otros derivados de uracilo fluorados (S-81, S-86 y S-123) con un solo grupo -NH. De hecho, los resultados han sido de un 10,83%, 58,12% y 44,61%, respectivamente.

Otro aspecto interesante, ha sido el valor numérico de los descriptores en la función. La presencia de una constante de 28,545 y de dos índices topoquímicos ETA\_Epsilon\_3 y ETA\_Psi\_1 con valores -58,288 y -10,584, respectivamente, la interpretamos como un ajuste compensatorio en la función. De igual forma valoramos la presencia del descriptor topoShape (forma topológica). De hecho, es llamativo, en una ecuación con 12 variables, la presencia de todos los valores en un rango comprendido entre 3,84 y -4,23. Este rango de puntuación tan estrecho ha sido el que finalmente nos ha llevado a clasificar como antioxidantes a todas las moléculas con valores superiores a cero en la función, en consonancia con la experiencia previa del grupo de trabajo de no descartar valores cercanos al límite establecido, si se disponían de factores positivos para justificar su inclusión.

En cuanto a R 3.0.1, utilizado después de SPSS, ha puesto de manifiesto la importancia en la depuración de datos y en la selección inicial de los descriptores antes de empezar su uso. Muchos estudios, de hecho, se centran en un número reducido de descriptores desde el inicio (García-Domenech *et al.*, 2010; Mérida *et al.*, 2013). Como se ha comentado anteriormente, muchos descriptores son funciones lineales de otros tantos, llevando a la redundancia. La selección de índices se realizó en base a los resultados obtenidos en SPSS y la inclusión de los descriptores electrotopológicos que representaran correctamente los grupos químicos relacionados con la actividad antioxidante.

A diferencia de SPSS, R es un programa exigente y sensible, que no permite valores perdidos (procedentes de los resultados de PaDEL-Descriptor en un archivo de salida de datos tipo Excel) siendo por tanto mucho más restrictivo. R 3.0.1, como programa estadístico utilizado fundamentalmente por estadísticos (teóricos y aplicados), requiere de unos mínimos conocimientos de programación que han sido

adquiridos a lo largo del presente estudio. Por ejemplo, la introducción de comandos requiere de unas nociones básicas de un léxico de programación similar al empleado por Java. Como ventaja, ofrece una mayor transparencia en los resultados, muy superior a SPSS. La herramienta está testada y ampliamente reconocida por la comunidad científica.

Por otro lado, R 3.0.1 también ha mostrado un coeficiente negativo para el descriptor minHssNH.

En cuanto al uso de redes neuronales artificiales, ha sido un empeño de nuestro grupo de trabajo validar el análisis discriminante con otra herramienta estadística. El objetivo ha sido aproximarnos al uso de esta herramienta poco conocida en profundidad y en muchos campos de la investigación poco utilizada, como es el caso de la Topología Molecular. Sin embargo, esta herramienta se ha utilizado extensamente en otros ámbitos como por ejemplo en ingeniería de procesos, de software, robótica, estudios socioeconómicos, etc. Las características de la red neuronal (partición de los grupos, números de capas ocultas, número de aprendizajes, etc.), que el usuario puede realizar según su criterio, han sido elegidas lo más adecuadamente posible en base a los estudios disponibles en Topología Molecular previamente revisados (Murcia-Soler *et al.*, 2004; Murcia-Soler *et al.*, 2003 A; Murcia-Soler *et al.*, 2003 B; Aoyama *et al.*, 1990; Salt *et al.*, 1992). A diferencia del análisis discriminante, las redes neuronales artificiales permiten establecer relaciones no lineales pero el mecanismo utilizado es complejo y poco transparente en cuanto al mecanismo interno de cálculo. Se ha trabajado con los 657 descriptores iniciales y no hemos presentado los pesos sinápticos de las variables porque no aportan información relevante al modelo. Al igual que el análisis discriminante en SPSS, las redes neuronales han dado pesos sinápticos cercanos al 100% a variables con muy pocos valores en el conjunto de moléculas. Por ejemplo, el descriptor nP (número de átomos de fósforo en la molécula) sólo presenta dos valores distintos a cero en el conjunto de las 189 moléculas del grupo de entrenamiento. Como ventaja, pueden obtener funciones no lineales a diferencia de los modelos clásicos obtenidos mediante análisis lineal discriminante.

El resultado global obtenido con los tres modelos realizados ha sido de un 95,89% en cuanto a porcentaje de acierto de la actividad antioxidante. El modelo, con sus limitaciones, permite obtener una primera aproximación a la potencial actividad antioxidante de las moléculas. Si bien, cualquiera de los tres modelos empleados ha superado con creces el 94% de acierto global (análisis lineal discriminante SPSS: 94,71%, análisis lineal discriminante R: 96,30%, redes neuronales artificiales SPSS: 97%).

Asimismo, los resultados obtenidos en el grupo test (análisis lineal discriminante SPSS: 93,48%, análisis lineal discriminante R: 92,60%, redes neuronales artificiales SPSS: 93%) presentan un porcentaje de acierto global de 93,03%.

El modelo combinado obtenido, junto a posibles futuras optimizaciones, puede considerarse un adecuado e interesante punto de partida para su aplicación a grandes bases de datos moleculares y la posterior selección de nuevos compuestos capaces de inhibir la peroxidación lipídica. Por lo tanto, puede ser una herramienta válida para el grupo de investigación de nuestro Departamento (Mérida *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2007; Almansa *et al.*, 2013; Mérida *et al.*, 2013; Miranda *et al.*, 2010; Bosch-Morell *et al.*, 1996).

#### **4. BÚSQUEDA GUIADA**

Con las dos funciones discriminantes calculadas se ha obtenido la clasificación de la teórica actividad antioxidante del conjunto de principios activos seleccionados inicialmente del *Catálogo de Medicamentos 2013*.

Se ha pretendido estudiar el máximo número de principios activos posible, introduciendo el grupo J (Terapia Antiinfecciosa, uso sistémico) y el grupo N (Sistema Nervioso) junto al resto de grupos terapéuticos. No se ha estudiado el grupo L (Terapia Antineoplásica y Agentes Inmunomoduladores), el grupo V (Varios) y los compuestos fisiológicos como aminoácidos, vitaminas, etc.

Un total de 90 principios activos han sido clasificados como antioxidantes en uno de los dos modelos (SPSS y R) de análisis discriminante.



El análisis mediante SPSS ha presentado 77 resultados positivos mientras que el análisis en R ha presentado 57 resultados positivos. En 43 principios activos han coincidido ambos modelos en la clasificación como activos.

Al validar estos 90 principios activos en el modelo obtenido con las redes neuronales artificiales se han obtenido 79 resultados positivos.

Finalmente, los tres modelos utilizados han coincidido en la clasificación de antioxidantes en 43 principios activos. Este dato subraya la fiabilidad conjunta de los modelos desarrollados al ser validados también como antioxidantes en las redes neuronales. Asimismo, otros 36 principios activos han sido clasificados como antioxidantes en dos modelos.

Por grupos terapéuticos, 23 fármacos pertenecen al grupo C (Aparato Cardiovascular), 15 fármacos están incluidos en el grupo J (Terapia Antiinfecciosa, uso sistémico), 11 pertenecen al grupo D (Terapia Dermatológica), 10 fármacos pertenecen al grupo R (Aparato Respiratorio), 9 fármacos pertenecen al grupo N (Sistema Nervioso), 8 fármacos están incluidos en el grupo M (Sistema Musculoesquelético), 7 están incluidos en el grupo A (Tracto Alimentario y Metabolismo), 3 fármacos son del grupo G (Terapia Genitourinaria), 2 fármacos pertenecen al grupo S (Órganos de los Sentidos), 1 fármaco pertenece al grupo B (Sangre y Órganos Hematopoyéticos) y otro fármaco pertenece al grupo P (Antiparasitarios, Insecticidas y Repelentes).

Centrando la atención en el grupo C (Aparato Cardiovascular), se observan varias familias químicas de compuestos con resultados positivos en el presente trabajo. Estos son  $\beta$ -bloqueantes, antagonistas de angiotensina II, estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y ácidos grasos poliinsaturados.

El uso de terapia antihipertensiva e hipolipemiente, incluyendo varias líneas de tratamiento, se ha relacionado con la reducción del estrés oxidativo. Al disminuir la tensión arterial, la terapia antihipertensiva disminuye el estrés oxidativo asociado a esta patología (Khanna *et al.*, 2008). De igual forma sucede en patologías cardiovasculares en presencia de tratamiento hipolipemiente (Puttananjaiiah M.K. *et al.*, 2011). Nuestro modelo pretende clasificar en base a su estructura química a las moléculas como potenciales antioxidantes o no. Este mecanismo directo antioxidante se uniría al derivado de su mecanismo de acción farmacológica.

A continuación, paso a comentar los resultados obtenidos expresando los mismos de acuerdo a la siguiente forma: análisis lineal discriminante en SPSS (valor de la función discriminante, clasificación), análisis lineal discriminante en R (clasificación) y redes neuronales artificiales (pseudoprobabilidad de presentar actividad antioxidante, clasificación). (A = activo, N = no activo).

Ejemplo: Atenolol (análisis lineal discriminante en SPSS (0,07, A), análisis lineal discriminante en R (N) y redes neuronales artificiales (52,1, A).

Los  $\beta$ -bloqueantes atenolol (0,07, A; N; 52,1, A), celiprolol (0,08, A; N; 26,3, N), nadolol (0,68, A; N; 58,7, A) y carteolol (0,01, A; N; 23,9, N), junto al resto de fármacos del grupo, han sido estudiados en relación a sus propiedades antioxidantes (Gomes *et al.*, 2006).

Candesartán (-0,06, N; A; 92,8, A), eprosartán (0,06, A; A; 12,6, N), irbesartán (-2,65, N; A; 77,7, A), losartán (-0,69, N; A; 56, A), telmisartán (-0,52, N; A; 60,5, A) y valsartán (-0,17, N; A; 74,3, A) son antagonistas de angiotensina II. Hay numerosos artículos que comentan sus propiedades antioxidantes (Ivanov *et al.*, 2014). En el caso de candesartán, se ha sugerido también un mecanismo directo antioxidante independiente de la inhibición del receptor de angiotensina I, mediante la reducción de la expresión de TNF (factor de necrosis tumoral) (Chen *et al.*, 2008).

Las estatinas ha sido un grupo farmacológico con resultados positivos en nuestro modelo en el caso de fluvastatina (0,31, A; A; 96,3, A), pitavastatina (0,43, A; A; 95,9, A) y pravastatina (0,67, A; A; 98,3, A). Se ha estudiado ampliamente el efecto antioxidante de las estatinas por vías independientes a la reducción del colesterol total. Las estatinas presentan actividad antioxidante *in vitro* frente a los radicales hidroxilo y peroxilo. Simvastatina presentó el mejor resultado antioxidante frente a los radicales hidroxilo (Franzoni *et al.*, 2003). Otros autores han estudiado la actividad antioxidante del grupo con diversos mecanismos de acción como la reducción en la circulación de las LDL oxidadas, reducción del daño endotelial mediante la promoción de la síntesis de óxido nítrico, antagonismo de los efectos pro-oxidantes de la angiotensina II y la endotelina-1 (Davignon *et al.*, 2004; Beltowski, 2005).

También se ha estudiado la inhibición de la peroxidación lipídica y el bloqueo de radicales hidroxilo en varias estatinas. Simvastatina y lovastatina mostraron los

mejores resultados en ambos casos. Se ha destacado el papel preventivo de las estatinas en la reducción del estrés oxidativo asociado a la enfermedad cardiovascular. En el caso de simvastatina se obtuvo un descenso de la peroxidación lipídica del 38% (Puttananjaiah M.K. *et al.*, 2011).

En otro estudio se midió el nivel plasmático de MDA en ratas tras la administración de simvastatina a distintas dosis durante 10 días. El tratamiento a altas dosis (50 mg/Kg/día) obtuvo un descenso del 63% en los niveles plasmáticos de MDA (Lovric *et al.*, 2008).

Se ha estudiado el potencial antioxidante en el grupo de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA). En un trabajo *in vitro*, captopril (0,59, A; A; 87,3, A) obtuvo los mejores resultados del grupo de IECA en el ensayo químico (Benzie E.F., 1998). Este dato está en concordancia con nuestro modelo. Por otro lado, captopril y enalapril aumentaron las defensas antioxidantes en tejidos de ratones, incrementando las defensas tanto enzimáticas como no enzimáticas (De Cavanagh *et al.*, 1997).

El mecanismo de acción de los ácidos grasos omega-3 docosahexaenoico (1,82, A; A; 72,8, A) e icosapentaenoico (1,62, A; A; 99,6, A) es muy diverso, cuya base principal es una reducción de la proporción omega-6 ; omega-3 en el organismo. Esto se traduce en una reducción de la síntesis de triglicéridos en el hígado, aumento de la beta-oxidación en los peroxisomas hepáticos, reducción de la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub>, reducción de la síntesis endógena de agentes quimiotácticos, estabilización de las placas ateroscleróticas, etc. Se ha demostrado el efecto antioxidante tras la administración de estos ácidos grasos en numerosos estudios (Kesavulu *et al.*, 2002; Arnal *et al.*, 2010)).

En el grupo terapéutico D han sido clasificados como antioxidantes 11 principios activos.

El ácido azelaico (1,97, A; A; 98,7, A) presenta la capacidad de inhibir la hidroxilación de compuestos aromáticos y la peroxidación del ácido araquidónico debida al radical hidroxilo (Passi *et al.*, 1991). Se ha realizado un estudio con ratones alimentados con una dieta rica en grasas en los que la administración intragástrica

posterior de ácido azelaico recuperó los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos y marcadores hepáticos, renales y de peroxidación lipídica a valores cercanos a la normalidad (Muthulakshmi *et al.*, 2013).

Respecto a la hidroquinona (1,51, A; A; 80,5, A), diversos estudios ponen de manifiesto su actividad antioxidante (Bang *et al.*, 2008). Un estudio realizado con diversos compuestos fenólicos con el ensayo ABTS de estudio de la capacidad antioxidante puso de manifiesto la indicación de este ensayo para detectar compuestos antioxidantes pero los autores concluyen que el ensayo no permite inferir relaciones de estructura-actividad entre los distintos compuestos (Nenadis *et al.*, 2004). Otro estudio midió la actividad antioxidante de los agentes despigmentantes hidroquinona y su derivado arbutina mediante el ensayo ABTS y ORAC (oxygen radical absorbance capacity) con resultados positivos (Takebayashi *et al.*, 2010). En otro trabajo utilizando el ensayo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), los autores concluyeron que la hidroquinona no reacciona bien con el ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) (Arts *et al.*, 2003).

Además, es de destacar que un total de 23 principios activos son antiinfecciosos distribuidos en tres grupos terapéuticos (A, D y J).

Se ha sugerido en numerosas ocasiones la actividad antioxidante de doxiciclina. Un estudio demostró el papel protector de doxiciclina frente a convulsiones inducidas por pilocarpina en ratas. Este estudio puso de manifiesto una reducción en los aminoácidos excitatorios glutamato y aspartato y una reducción en el aminoácido inhibidor GABA. Asimismo, se evidenció una disminución de la peroxidación lipídica y un aumento de la actividad antioxidante (Nogueira *et al.*, 2011). Otro estudio demuestra el papel protector de doxiciclina en diabetes provocada por estreptozotocina en ratas (Atalay *et al.*, 2011).

Como ejemplo, también se ha sugerido la actividad antioxidante de rifampicina (0,57, A; A, 71,6, A), tetraciclina (0,73, A; N; 97, A) y minociclina (0,56, A; N; 59,8, A) (Wasil *et al.*, 1988; Kraus *et al.*, 2005).

## 5. ESTUDIO EXPERIMENTAL

### 5.1. Inhibición de la peroxidación lipídica y estudio de la capacidad antioxidante

La actividad real de inhibición de la peroxidación lipídica de cualquier xenobiótico está sujeta a su farmacocinética. Es decir, el xenobiótico debe presentar una correcta liberación, absorción y distribución con el fin de acceder correctamente a la biofase.

Por otro lado, el estudio de la capacidad antioxidante total se refiere a la actividad antioxidante intrínseca de cada molécula, y en nuestro caso se ha elegido entre varios ensayos posibles el Antioxidant Assay kit, de Cayman Chemical Company. El método se basa en la habilidad de los antioxidantes de la muestra para inhibir la oxidación de ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) a ABTS<sup>+</sup> por la metmioglobina (Koracevic *et al.*, 2001; Rice-Evans *et al.*, 1994). En todo caso, este método, como otros, presenta sus limitaciones en cuánto a la reactividad de los antioxidantes frente a los reactivos utilizados (Miller *et al.*, 1997).

A continuación, se comentan brevemente las principales características de cada principio activo con el objetivo de evaluar su hipotética actividad antioxidante a través de la inhibición de la peroxidación lipídica y su actividad antioxidante *per se*.

**Captopril** (0,59, A; A; 87,3, A) es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA). Se utiliza en el tratamiento de la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca, la nefropatía diabética y el post-infarto de miocardio. Además del mecanismo de acción principal, comparte otros mecanismos reforzadores como reducir la hipertrofia ventricular, efecto antiarrítmico, disminución de la agregación plaquetaria, actividad antiaterogénica, entre otras. Presenta una unión a proteínas plasmáticas del 25-30% y una gran distribución tisular. Se metaboliza parcialmente en el hígado, formándose metabolitos inactivos. Se elimina en un 95% en orina, 40-50% como captopril inalterado.

Se ha observado una disminución de un 15,81% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de captopril (10uM).

A la concentración analizada (0,31 mM) en el estudio de la capacidad antioxidante 1 mM de captopril equivalen a la actividad antioxidante de 0,64 mM de Trolox.

Estos resultados demuestran la actividad antioxidante intrínseca de captopril, el único inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) clasificado como antioxidante por nuestros modelos y está en concordancia con los estudios comentados en la discusión de la búsqueda guiada.

En cuanto a **nistatina** (1,88, A; A; 99,3, A) la búsqueda bibliográfica en bases de datos electrónicas de “nystatin” y los términos “antioxidant”, “antioxidant activity”, “lipid peroxidation”, “TEAC” o “ABTS” no ha ofrecido resultados relevantes. Nistatina parece presentar actividad antioxidante, si bien es cierto que se requieren dosis más altas de las utilizadas normalmente en terapéutica para obtener concentraciones plasmáticas eficaces. Se ha propuesto la posibilidad de utilizar formulaciones lipídicas de nistatina para el manejo de las infecciones fúngicas invasoras (Hossain, 2000).

Nistatina (es un fungicida que pertenece al grupo de los macrólidos poliénicos, que se aísla de cultivos de *Streptomyces noursei*. Actúa alterando la permeabilidad de las membranas del hongo, al formar canales iónicos con los mismos. Presenta un amplio espectro antifúngico, incluyendo levaduras (*Candida spp*) y dermatofitos. Se utiliza en la profilaxis y tratamiento de la candidiasis orofaríngea y candidiasis intestinal. Presenta una baja biodisponibilidad sistémica.

Se ha observado una disminución de un 15,16% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de nistatina (10uM).

A la concentración analizada (0,31 mM) en el estudio de la capacidad antioxidante 1 mM de nistatina equivalen a la actividad antioxidante de 0,72 mM de Trolox.

**Atenolol** (0,07, A; N; 52,1, A) es un  $\beta$ -bloqueante cardiosselectivo ampliamente utilizado en terapéutica con actividad antihipertensiva, antianginosa, antiarrítmico tipo II. Ejerce estas acciones a través de múltiples mecanismos mediados por su acción  $\beta$ -bloqueante. El grado de unión a proteínas plasmáticas es del 3-5% y penetra

escasamente en los tejidos debido a su baja liposolubilidad. Presenta escaso o nulo metabolismo hepático y se elimina por orina en un 80%.

Se ha observado una disminución de un 1,93% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de atenolol (10uM).

A la concentración analizada (0,31 mM) en el estudio de la capacidad antioxidante 1 mM de atenolol equivalen a la actividad antioxidante de 0,1 mM de Trolox.

En ambos ensayos experimentales atenolol presenta una baja actividad antioxidante. Además, su clasificación como antioxidante (0,07, A; N; 52,1, A) es muy ajustada.

**Simvastatina** (-0,31, N; N; -, -) ha sido seleccionado para el estudio experimental por disponibilidad y por presentar un resultado positivo como potencial antioxidante en el trabajo preliminar.

Simvastatina es un hipolipemiante que actúa inhibiendo la síntesis de colesterol al bloquear el enzima hidroximetilglutarilCoA-reductasa (HMG-CoA), implicada en la síntesis del ácido mevalónico, precursor del colesterol. Reduce marcadamente los niveles de colesterol total (30-35%), de LDL (40%) y de triglicéridos (18%). También aumenta de un 5-20% los niveles de HDL. Simvastatina es un profármaco que se metaboliza en el hígado a su derivado ácido beta hidroxilado. Presenta una elevada unión a proteínas plasmáticas (>95%) y fundamentalmente se elimina por heces.

Se ha observado una disminución de un 51,97% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de simvastatina (10uM).

Los resultados obtenidos son similares a los descritos por la literatura científica, tal como aparece en la discusión de la búsqueda guiada.

El **ácido azelaico** (1,97, A; A; 98,7, A) o ácido nonanodioico es un ácido dicarboxílico saturado de cadena lineal. Se encuentra en la naturaleza en el trigo, el centeno y la cebada. En la piel es producido por el hongo *Malassezia furfur* (*Pityrosporum ovale*) bajo determinadas circunstancias (Mendez-Tovar, 2010). Se

utiliza en forma tópica como queratolítico y en el tratamiento del acné, melasma y melanoma maligno.

A la concentración analizada (0,31 mM) en el estudio de la capacidad antioxidante 1 mM de ácido azelaico equivalen a la actividad antioxidante de 0,51 mM de Trolox.

La búsqueda bibliográfica en bases de datos electrónicas de “azelaic acid” y los términos “TEAC” o “ABTS” no ha ofrecido resultados.

La **hidroquinona** (1,51, A; A; 80,5, A) o 1,4-dihidroxibenceno se utiliza en trastornos dermatológicos como el melasma y lentigo solares. Origina despigmentación reversible de la piel al inhibir la oxidación enzimática de la tirosina y otros procesos enzimáticos en los melanocitos. Por vía sistémica resulta tóxica con efectos adversos similares a los provocados por el fenol. Por vía tópica se utiliza en concentraciones que oscilan entre el 2 y el 4%.

A la concentración analizada (0,31 mM) en el estudio de la capacidad antioxidante 1 mM de hidroquinona equivalen a la actividad antioxidante de 0,96 mM de Trolox.

Este resultado demuestra la capacidad antioxidante de hidroquinona, sugerida también por los estudios comentados en la discusión de la búsqueda guiada.

**Doxiciclina** (0,73, A; N; 98,4, A) es un antibiótico bacteriostático del grupo de las tetraciclinas que actúa interfiriendo la síntesis proteica bacteriana. Presenta un amplio espectro antibacteriano. Presenta una biodisponibilidad oral del 93%, se distribuye prácticamente por todos los tejidos, se metaboliza una pequeña fracción en el hígado y se elimina en heces (50 a 80%) y orina (30%).

A la concentración analizada (0,31 mM) en el estudio de la capacidad antioxidante 1 mM de doxiciclina equivalen a la actividad antioxidante de 0,93 mM de Trolox.

La búsqueda bibliográfica en bases de datos electrónicas de “doxycycline” y los términos “TEAC” o “ABTS” no ha ofrecido resultados.



**Sertralina** (-2,56, N; N; -, -) ha sido seleccionado para el estudio experimental por disponibilidad y por presentar un resultado positivo como potencial antioxidante en el trabajo preliminar.

Se ha estudiado en varias ocasiones la influencia de los ISRS (inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, entre ellos la sertralina) en el estrés oxidativo. Diversos estudios apuntan a una reducción en los niveles de MDA al estudiar la peroxidación lipídica en estos compuestos. En el caso particular de sertralina se observó una disminución en los niveles cerebrales de MDA en torno a un 30 y un 40% (Abdel *et al.*, 2011). Dos estudios reflejaron resultados similares al anteriormente citado durante tres meses de tratamiento con sertralina (Bilici *et al.*, 2001; Khanzode *et al.*, 2003). Otro estudio en ratas puso de manifiesto un aumento en los valores de MDA en plasma y tejido cerebral tras el tratamiento agudo con sertralina, mientras que no se observaron diferencias significativas en la administración crónica (Battal *et al.*, 2014).

Sertralina es un antidepresivo inhibidor de la recaptación de serotonina por parte de la membrana presináptica neural. Se utiliza tanto en el manejo farmacológico de la depresión como en trastornos obsesivos compulsivos y en estrés postraumático. Presenta una amplia absorción y una unión a proteínas plasmáticas del 98%. Se metaboliza extensamente en el hígado y se excreta con las heces y orina en igual proporción.

Se ha observado una disminución de un 26,47% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de sertralina (10uM).

En la literatura científica existen diferencias en relación a la actividad de la sertralina en la disminución de los niveles de MDA.

**Progesterona** (-2,74, N; N; -, -) se ha incluido en el estudio por presentar actualmente una línea de investigación abierta en nuestro Departamento en relación a su papel neuroprotector en la retinosis pigmentaria (Allen *et al.*, 2014). Además, diversos estudios confirman la reducción de la peroxidación lipídica en el trauma cerebral tratado con progesterona (Bayir *et al.*, 2004; Roof *et al.*, 1997)

Progesterona es un progestágeno natural producido por el cuerpo lúteo y la placenta a partir del tercer mes gestacional. Presenta actividad antiestrogénica, antiandrogénica y antigonadotrófica. Se utiliza en distintas indicaciones como suplementación, en prevención de aborto espontáneo, en trasplante de óvulos y en infertilidad femenina.

Se ha observado una disminución de un 20,55% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de progesterona (10uM).

En relación a la línea de investigación abierta en nuestro Departamento, se ha decidido incluir en el estudio experimental cuatro derivados de uracilo con el fin de valorar su capacidad antioxidante. Es de destacar los resultados negativos en los tres modelos de estas cuatro moléculas. Una posible explicación sea la contribución negativa en ambas funciones discriminantes del descriptor electrotopológico  $\text{minHssNH}$ . El 5-FU, por ejemplo, presenta dos grupos  $\text{-NH-}$  en su estructura. Por otra parte, otros derivados de uracilo como el propiltiouracilo (presente en nuestro grupo de entrenamiento activos) han demostrado presentar cierta capacidad antioxidante (Wiktorska *et al.*, 2005).

Los análogos fluorados en posición C-5 y C-6 presentan propiedades muy interesantes como fármacos y agroquímicos (Fustero *et al.*, 2006). Los análogos de uracilo fluorados en C-5 presentan actividad antineoplásica (5-fluorouracilo y su familia) (Rooney *et al.*, 1985). En tanto que los análogos fluorados en posición C-6 presentan actividad herbicida, insecticida y acaricida (Yagi *et al.*, 2000; Grossman *et al.*, 2010; Fustero *et al.*, 2008; Mérida *et al.*, 2013).

Como se ha comentado en la introducción, el cáncer es *per se* una enfermedad inductora de estrés oxidativo. Esta se debe fundamentalmente a las alteraciones metabólicas de las células neoplásicas, la infiltración tumoral por células inflamatorias, la malnutrición y los tratamientos oncológicos específicos. En principio, los efectos tóxicos del estrés oxidativo sobre las células normales podrían contrarrestarse con el uso de antioxidantes; sin embargo, estos podrían anular los efectos nocivos del estrés oxidativo sobre las células neoplásicas e impedir la apoptosis. Así pues, hoy por hoy no existe suficiente evidencia científica que apoye el uso de antioxidantes en pacientes

con cáncer (Viñas *et al.*, 2012). De hecho, algunos estudios ponen en entredicho los teóricos beneficios de los antioxidantes para prevenir el cáncer, sugiriendo incluso, que podrían presentar efectos adversos (Bjelakovic *et al.*, 2004; Bjelakovic *et al.*, 2007; Papaioannou *et al.*, 2011).

En concreto, un estudio publicado en 2014 demostró que la combinación de antioxidantes y 5-FU resultó perjudicial para los pacientes con cáncer de colon. La activación de la vía de c-Src, un proto-oncogen que pertenece a la familia de tirosina quinasas no receptoras, se ha observado en aproximadamente el 50% de los tumores de colon, hígado, pulmón, mama y páncreas. En todos ellos, la activación de c-Src conduce a la promoción de la supervivencia, la angiogénesis, la proliferación y la invasión de las vías, y en última instancia el crecimiento aberrante de tumores en los cánceres. El estudio citado puso de manifiesto que 5-FU induce la generación de especies reactivas de oxígeno a través de la activación de Scr, lo que conlleva la apoptosis de las células cancerígenas. Sin embargo, la administración de antioxidantes bloqueó la activación de Scr, disminuyendo la apoptosis de las células cancerígenas (Fu *et al.*, 2014).

**5-fluoruracilo** o 5-FU (-1,79, N; N; -, -) o es un antineoplásico antimetabolito de la base pirimidínica uridina. Actúa como falso sustrato en el proceso de síntesis de los constituyentes esenciales de los ácidos nucleicos, provocando la síntesis de un ADN anómalo. Está indicado en una gran variedad de tumores. Se utiliza por vía oral o IV. Se absorbe a nivel intestinal de forma errática y se distribuye rápidamente por el organismo. Se metaboliza en hígado dando lugar a su metabolito activo siendo eliminado por varios mecanismos.

Se ha observado una disminución de un 24,11% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de 5-FU (10uM).

A la concentración analizada (0,31 mM) en el estudio de la capacidad antioxidante 1 mM de 5-FU equivalen a la actividad antioxidante de 0,68 mM de Trolox.

**S-81** (-2,40, N; N; -, -). Se ha observado una disminución de un 10,83% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de S-81 (10uM).

**S-86** (-2,61, N; N; -, -). Se ha observado una disminución de un 58,12% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de S-86 (10uM).

**S-123** (-2,72, N; N; -, -). Se ha observado una disminución de un 44,61% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de S-123 (10uM).

Los valores de disminución en el porcentaje de la concentración de MDA de estos derivados de uracilo son muy significativos. Varios estudios han centrado su atención en la actividad antioxidante de diversos derivados de uracilo (Akhatova *et al.*, 2011; Spanou *et al.*, 2011).

El **ácido lipoico** (0,18, A; A; -, -) se ha incluido en el estudio experimental como referencia o patrón del resto de compuestos. Además, el grupo de investigación del Departamento presenta una elevada experiencia en el estudio de la actividad antioxidante del mismo (Miranda *et al.*, 2010; Johnsen-Soriano *et al.*, 2008). Es un antioxidante contrastado (Powers *et al.*, 1999; Mérida *et al.*, 2014) con varios mecanismos descritos como el bloqueo de radicales libres y el reciclaje de otros antioxidantes a su forma inicial antioxidante, como la vitamina C, E y el glutatión (Akpınar *et al.*, 2007).

Un estudio ha demostrado el papel protector del ácido R/S- $\alpha$ -lipoico en ratas en el desarrollo de estrés oxidativo y en la aparición de cambios metabólicos inducidos por una dieta rica en fructosa (Castro *et al.*, 2013).

Un trabajo describe un análisis biológico para medir la capacidad antioxidante de varios compuestos, entre ellos el ácido lipoico, utilizando la respuesta de *Saccharomyces cerevisiae* al detenimiento de su crecimiento inducido por compuestos oxidantes. Los resultados del ácido lipoico fueron negativos para el bloqueo de estos

oxidantes pero indujeron una respuesta intracelular positiva frente a los oxidantes. Los autores sugieren la posibilidad de que se deba al ciclo de su estructura con dos átomos de azufre unidos y la falta de un grupo tiol libre (que presenta su forma reducida, el ácido dihidrolipoico), que desempeñaría la actividad antioxidante. Por otro lado, sugieren también la posibilidad de que el sistema *redox* ácido lipoico/ácido dihidrolipoico se hubiera utilizado para regenerar el resto de antioxidantes (Wu *et al.*, 2011).

Otro estudio también comenta la superior actividad antioxidante del ácido dihidrolipoico frente al ácido lipoico por la presencia del grupo –SH libre (Zhao *et al.*, 2011).

El ácido lipoico es un compuesto organosulfurado que deriva del ácido octanoico. Contiene dos átomos de azufre unidos mediante un puente disulfuro. El enantiómero R-(+)-ácido lipoico es un cofactor esencial de cuatro complejos enzimáticos mitocondriales. Se utiliza clásicamente como antioxidante en suplementos nutricionales.

Se ha observado una disminución de un 7,4% en el porcentaje de la concentración MDA en la muestra de mayor concentración de ácido lipoico (10uM).

A la concentración analizada (0,31 mM) en el estudio de la capacidad antioxidante 1 mM de ácido lipoico equivalen a la actividad antioxidante de 0,32 mM de Trolox.

En ambos estudios el ácido lipoico no ha presentado una actividad antioxidante muy significativa, quizá debido a su mecanismo de acción fundamentalmente biológico (Packer *et al.*, 1995).



## **VI. CONCLUSIONES**





Las conclusiones del presente trabajo han sido las siguientes:

- El uso de los descriptores topológicos utilizados de las moléculas y el tratamiento estadístico basado en el análisis lineal discriminante, tanto en SPSS como en R, han demostrado ser una herramienta eficiente para la clasificación de compuestos con potencial actividad antioxidante.

- El uso de redes neuronales artificiales en SPSS para la validación de los modelos basados en el análisis lineal discriminante ha sido satisfactorio.

- La combinación de los distintos modelos ha puesto de manifiesto la posible actividad antioxidante *per se* de numerosos principios activos incluidos en el *Catálogo de Medicamentos 2013*, algunas reflejadas en la literatura científica.

- Los resultados experimentales de los compuestos seleccionados, tras realizar la búsqueda en el *Catálogo de Medicamentos 2013*, del estudio de la inhibición de la peroxidación lipídica manifiestan una reducción significativa de la peroxidación lipídica (>15%) a una concentración de 10 uM en nistatina y captopril, a diferencia del atenolol (<2%). Los otros compuestos estudiados también a una concentración de 10 uM han reducido en un grado variable la peroxidación lipídica (S-86: 58%, simvastatina: 52%, S-123: 45%, sertralina: 26%, 5-FU: 24%, progesterona: 21%, S-81: 11% y ácido lipoico: 7%).

- Los resultados experimentales de los compuestos seleccionados, tras realizar la búsqueda en el *Catálogo de Medicamentos 2013*, del estudio de la capacidad antioxidante expresados en TEAC reflejan una actividad antioxidante muy similar al trolox en hidroquinona (0,96) y doxiciclina (0,93), algo menor en nistatina (0,72), captopril (0,64) y ácido azelaico (0,51), y claramente inferior en el caso del atenolol (0,1). 5-FU (0,68) y el ácido lipoico (0,32) también han presentado una moderada actividad antioxidante respecto al trolox.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abdel O.M., Morsy S.M.Y. and Sleem A.A. (2011) The effect of different antidepressant drugs on oxidative stress after lipopolysaccharide administration in mice. *EXCLI J* 10:290-302.
- Akpınar D., Yargıoğlu P., Derin N., Alicigüzel Y, Sahin M. and Agar A. (2007) The effect of lipoid acid on lipid peroxidation and visual evoked potentials (VEPs) in rats exposed to chronic restraint stress. *Int J Neurosci* 117(12):1691-706.
- Akhatova G.R., Safarova I.V. and Gerchikov A.Y. (2011) Antioxidant activity of uracil derivatives. *Kinetics and Catalysis* 52(1):1-5.
- Albanes D., Heinonen O.P., Taylor P.R., Virtamo J., Edwards B.K., Rautalahti M., Hartman A.M., Palmgren J., Freedman L.S., Haapakoski J., Barrett M.J., Pietinen P., Malila N., Tala E., Liippo K., Salomaa E.R., Tangrea J.A., Teppo L., Askin F.B., Taskinen E., Erozan Y., Greenwald P. and Huttunen J.K. (1996) Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst* 88(21):1560–1570.
- Allen R.S. and Stein D.G. (2014) Progesterone as a potential neuroprotective treatment in the retina. *Expert Review of Ophthalmology*, 9(5):375-385.
- Almansa I., Barcia J. M., López-Pedrajas R., Muriach M., Miranda M., and Romero, F. J. (2013). Naltrexone Reverses Ethanol-Induced Rat Hippocampal and Serum Oxidative Damage. *Oxidative medicine and cellular longevity* Volume 2013 ID 296898.
- Amic D., Davidovic-Amic D., Beslo D., Rastija V., Lucic B. and Trinajstić N. (2007) SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Curr Med Chem* 14(7):827-845.
- Amigó J.M., Falcó A., Gálvez J. y Villar V. (2007). *Bol Soc Esp Mat Apl* 39:137-151.
- Amigó J.M., Galvez J., and Villar V.M. (2009) A review on molecular topology: applying graph theory to drug discovery and design. *Naturwissenschaften* 96:749-61.
- Aoyama T., Suzuki Y. and Ichikawa, H. (1990) Neural networks applied to pharmaceutical problems. III. Neural networks applied to quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis. *Journal of medicinal chemistry* 33(9):2583-2590.
- Arnal E., Miranda M., Barcia J., Bosch-Morell F. y Romero F.J. (2010) Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. *Neuroscience* 166:271-278.
- Arts M., Dallinga J., Voss H.P., Haenen G. and Bast A. (2003) A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry* 80(3):409-14.
- Atalay M., Bilginoglu A., Kokkola T., Oksala N. and Turan B. (2011) Treatments with sodium selenate or doxycycline offset diabetes-induced perturbations of thioredoxin-1 levels and antioxidant capacity. *Mol Cell Biochem* 351(1-2):125-31.
- Bang S.H., Han S.J. and Kim D.H. (2008) Hydrolysis of arbutin to hydroquinone by human skin bacteria and its effect on antioxidant activity. *J Cosmet Dermatol* 7(3):189-93.
- Battal D., Yalin S., Eker E.D., Aktas A., Shain N.O., Cebo M. and Berköz M (2014) Possible role of selective serotonin reuptake inhibitor sertraline on oxidative stress responses. *Eur Rev Med Phar Sci* 18:477-484.
- Baydar N.G., Ozcan G. and Yasar S. (2007) Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food control* 18: 1131-1136.
- Bayir H., Marion D.W., Puccio A.M., Wisniewski S.R., Janesko K.L., Clark R.S. and Kochanek P.M. (2004) Marked gender effect on lipid peroxidation after severe traumatic brain injury in adult patients. *Journal of neurotrauma* 21(1):1-8.
- Bast A. and Haenen G.R.M.M. (2002) The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 11:251-258.
- Becker E.M., Nissen L.R. and Skibsted L.H. (2004) Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol* 219: 561-571.

- Beckman D.A. and Brent R.L. (1990) Teratogenesis: alcohol, angiotensin-converting-enzyme inhibitors, and cocaine. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2:236-245.
- Beltowski J. (2005) Statins and modulation of oxidative stress. *Toxicol Mech Methods* 15(2):61-92.
- Benzie I.F. (1998) Antioxidant power of angiotensin-converting enzyme inhibitors in vitro. *Br J Clin Pharmacol* 45(2):168-169.
- Bilici M., Efe H., Köro Lu M.A., Uydu H.A., Bekaro Lu M. and Deger O. (2001) Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressants treatments. *J Affect Disord* 64:43-51.
- Bishop CM. (1995) Neuronal networks for pattern recognition. *Oxford University Press*.
- Bjelakovic G., Nikolova D., Simonetti R.G. and Glud C. (2004) Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 364:1219-1228.
- Bjelakovic G., Nikolova D., Glud LL., Simonetti R.G. and Glud C. (2007) Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 297:842-857.
- Bosch-Morell F, Sanz A, Díaz-Llopis M. and Romero FJ. (1996) Lipid peroxidation products in human subretinal fluid. *Free Radic Biol Med* 20(7):899-903.
- Bourbon A., Vionnet M., Leprince P., Vaissier E., Copeland J., McDonagh P., Debre P. and Gandjbakhch I. (2004) The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 26:932-938.
- Bruno-Blanch L., Gálvez J. and García-Domenech R. (2003) Topological virtual screening: a way to find new anticonvulsant drugs from chemical diversity. *Bioorg Med Chem Lett* 13(16):2749-54.
- Bunnag S.C. (2006) Implications of microcirculation-research based information on prevention and treatment of diabetes mellitus type 2: a perspective. *Clin Hemorheol Microcirc* 34:43-50.
- Calabuig C., Antón-Fos G.M., Gálvez J. and García-Domenech R. (2004) New hypoglycaemic agents selected by molecular topology. *Int J Pharm* 278(1):111-8.
- Castro M.C., Massa M.L., Schinella G., Gagliardino J.J. and Francini F. (2013) Lipoic acid prevents liver metabolic changes induced by administration of a fructose-rich diet. *Biochim Biophys Acta* 1830(1):2226-32.
- Catálogo de Medicamentos (2013) Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.
- Chambers D.E., Parks D.A., Patterson G., Roy R., McCord J.M., Yoshida S., Parmley L.F. and Downey J.M. (1985) Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 17:145-152.
- Chaudière J. and Ferrari-Iliou R. (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 37:949-962.
- Chen S, Ge Y., Si J., Rifai A., Dworkin L.D and Gong R. (2008) Candesartan suppresses chronic renal inflammation by a novel antioxidant action independent of AT1R blockade. *Kidney International* 74:1128-1138.
- Chem Draw, version Ultra 12.0 (2010). Cambridge soft.
- Chihuailaf R.H., Contreras P.A. and Wittwer F.G. (2002) Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México* 33(3): 265-283.
- Crichton G.E., Bryan J. and Murphy K.J. (2013) Dietary Antioxidants, Cognitive Function and Dementia - A Systematic Review. *Plant Foods Hum Nutr* 68:279-292.
- Davignon J. Jacob R.F. and Mason R.P. (2004) The antioxidants effects of statins. *Coron Artery Dis* 15(5):251-8.
- De Cavanagh E.M., Fraga C.G., Ferder L. and Inserra F. (1997) Enalapril and captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues. *Am J Physiol* 272 (2):514-8.

- De Gregorio-Alapont C., García-Domenech R., Gálvez J., Ros M.J., Wolski S. and García MD. (2000) Molecular topology: a useful tool for the search of new antibacterials. *Bioorg Med Chem Lett* 10(17):2033-6.
- Devillers J. and Balaban A.T. (1999) Topological Indices and Related Descriptors in QSAR and QSPR. *Gordon and Breach Science Publishers: Singapore* 59-165.
- Dolora P., Bigagli E. and Collins A. (2012) Antioxidant vitamins and mineral supplementation, life span expansion and cancer incidence: a critical review. *Eur J Nutr* 51:769-781.
- Dringen R. (2000) Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4903.
- Douglas K.T. (1987). Mechanism of Action of Glutathione-Dependent Enzymes. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 59:103-167.
- Dreher D. and Junod A.F. (1996) Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of cancer* 32(1):30-38.
- Duffield-Lillico A.J., Reid M.E., Turnbull B.W., Combs G.F. Jr., Slate E.H., Fischbach L.A., Marshall J.R. and Clark L.C. (2002) Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(7):630-639.
- Esterbauer H., Schaur R.J. and Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81-128.
- Farbstein D., Kozak-Blickstein A. And Levy A.P. (2010) Antioxidant Vitamins and Their Use in Preventing Cardiovascular Disease. *Molecules* 15:8098-8110.
- Fatemi M.H. and Rostami E.G. (2013) Prediction of the Radical Scavenging Activities of Some Antioxidant from Their Molecular Structure. *Ind Eng Chem Res* 52(28):9525-9531.
- Fillebeen C. and Pantopoulos K. (2002) Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep* 7:15-22.
- Flórez J. (2008) Hormonas, metabolismo, vitaminas, en *Farmacología humana* (Flórez J., Armijo J.A., Mediavilla A. ed) pp 1117, Elsevier Masson, Barcelona.
- Flórez J. (2008) Hormonas, metabolismo, vitaminas, en *Farmacología humana* (Flórez J., Armijo J.A., Mediavilla A. ed) pp 1119, Elsevier Masson, Barcelona.
- Franzoni F., Quiñones-Galvan A., Regoli F., Ferrannini E. and Galetta F. (2003) A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. *Int J Cardiol* 90(2-3):317-21.
- Fridovich I. (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:239-257.
- Fritz H., Kennedy D., Fergusson D., Fernandes R., Cooley K., Seely A., Sagar S., Wong R. and Seely D. (2011) Selenium and lung cancer: a systematic review and meta analysis. *PLoS One* 6(11):e26259.
- Fu Y., Yang G., Zhu F., Peng C., Li W., Li H. and Dong Z. (2014). Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. *Cell death & disease* 5(1):e983.
- Fustero S., Catalan S., Flores S., Jimenez D., del Pozo C., Luis Aceña J., and Mérida S. (2006) First fluorous synthesis of fluorinated uracils. *QSAR & Combinatorial Science* 25(8-9):753-760.
- Fustero S., Sanz-Cervera J.F., Mérida S., Román R., Villanova S. and Ramírez de Arellano C. (2008). An efficient synthesis of uracil derivatives from 2-alkyl- $\Delta^2$ -oxazolines and nitriles. *Journal of Fluorine Chemistry* 129(9):836-847.
- Gabig T.G. and Babior B.M. (1979) The O<sub>2</sub>(-) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem* 254:9070-9074.

- Gálvez J., García-Domenech R., De Julián-Ortiz V. and Soler R. (1994) Topological approach to analgesia. *J Chem Inf Comput Sci* 34(5):1198-203.
- Galvez J., Garcia-Domenech R., De Julian-Ortiz J.V. and Soler R. (1995) Topological Approach to Drug Design. *J Chem Inf Comput Sci* 35:272-284.
- Gálvez J., Gálvez-Llompарт M. and García-Domenech R. (2012) Molecular Topology as a novel approach for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 7(2):133-53.
- Gálvez J., Gálvez-Llompарт M., Zanni R. and Garcia-Domenech R. (2013) Advances in the molecular modeling and quantitative structure-activity relationship-based design for antihistamines. *Expert Opin Drug Discov* 8(3):305-17.
- Garcia-Domenech R and Julian-Ortiz J.V. (1998) Antimicrobial activity characterization in a heterogeneous group of compounds. *J Chem Inf Comput Sci* 38:445-449.
- García-Domenech R., Gálvez J., De Julián-Ortiz J.V. and Pogliani L. (2008) Some New Trends In Chemical Graph Theory. *Chem Rev* 108:1127-1169.
- García Domenech R., Espinoza N., Galarza R.F., Moreno-Padilla M.J., Rojas-Ruiz B., Roldan-Arroyo L.L., Sánchez-Lavado M.I. y Gálvez J. (2008) Aplicación de la topología molecular en la predicción de la inhibición de *Trypanosoma cruzi* Hexokinasa y un grupo de derivados bifosfonatos. *Ars Pharm* 49(3):199-209.
- García-Doménech R., Montealegre M.C, Nagham E.G., Sandoval N., Santana M. y Gálvez J. (2010) Aplicación de la topología molecular para la predicción de la actividad anti-VIH-1 de un grupo de compuestos análogos del aciclovir y ganciclovir. *An R Acad Nad Farm* 76(1):45-57.
- García-García A., Gálvez J., De Julián-Ortiz J.V., García-Domenech R., Muñoz C., Guna R. and Borrás R. (2004) New agents active against Mycobacterium avium complex selected by molecular topology: a virtual screening method. *J Antimicrob Chemother* 53(1):65-73.
- Giugliano D., Ceriello A. and Paolisso G. (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267.
- Gomes A., Costa D., Lima J.L. and Fernandes E. (2006) Antioxidant activity of beta-blockers: an effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species?. *Bioorg Med Chem*: 14(13):4568-77.
- Grossmann K., Christiansen N., Looser R. and Ehrhardt T. (2000) *Weed Sci.* 58:1-9.
- Gupta A., Tripathi A.K., Tripathi R.L., Madhu S.V. and Banerjee B.D. (2007) Advanced glycosylated end products-mediated activation of polymorphonuclear neutrophils in diabetes mellitus and associated oxidative stress. *Indian J Biochem Biophys* 44:373-378.
- Gutteridge J.M. and Halliwell B. (2010) Antioxidants: Molecules, medicines and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 393: 561-564.
- Hahn M. and Rogers D.J (1995) Receptor surface models. 2. Application to quantitative structure-activity relationships studies. *Med Chem* 38:2091-2102.
- Hall L. H. and Kier L. B. (1995) Electrotopological state indices for atom types: A novel combination of electronic, topological, and valence state information. *J Chem Inf Comput Sci* 35: 1039-1045.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M. (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246: 501-514.
- Halliwell B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1: 358-364.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. and Cross C.E. (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?. *J Lab Clin Med* 119:598-620.
- Halliwell B. (2000) Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants, in *Antioxidants in Diabetes Management* (Packer L., Rosen, P., Tritschler, H.J., King, G.L. and Azzi A., ed) pp 33-52, Marcel Dekker, New York.
- Halliwell B. (2000) The antioxidant paradox. *Lancet* 355:1179-1180.



- Hansch C., Muir R., Fujita T., Maloney P., Geiger F. and Streich M. (1963) The correlation of biological activity of plant growth regulators and chloromycetin derivatives with Hammett constants and partition coefficients. *J Am Chem Soc* 85:2817-2824.
- Hausladen A. and Stamler J.S. (1999) Nitrosative stress. *Methods Enzymol* 300:389-395.
- Hosoya H. (1971) Topological index. A newly proposed quantity characterizing the topological nature of structural isomers of saturated hydrocarbons. *Bull Chem Soc Jpn* 44:2332-39.
- Hossain M.A. (2000) New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. *Expert Opin Investig Drugs* 9(8):1797-813.
- Hurrell R. (2003) Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J Nutr* 133(9):2973-2977.
- IBM Corp. Released (2010). IBM SPSS Statistics for Windows, versión 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Ivanov M., Mihailovic-Stanojevic N., Grujic J., Jovovic D., Markovic-Lipkovski J. Cirovic S. and Miloradovic Z. Losartan improved Antioxidant Defense, Renal Function and Structure of Postischemic Hypertensive Kidney. *Plos one* 9(5):e96353.
- Jacob R.A. (1995) The integrated antioxidant system. *Nutr. Res* 15: 755-766.
- Jareno E.J., Roma J., Romero B., Marin N., Muriach M., Johnsen S., Bosch-Morell F., Marselou L. and Romero F.J. (2002) Serum malondialdehyde correlates with therapeutic efficiency of high activity antiretroviral therapies (HAART) in HIV-1 infected children. *Free Radic Res* 36:341-344.
- Johnsen-Soriano S., Garcia-Pous M., Arnal E., Sancho-Tello M., Garcia-Delpech S., Miranda M., and Romero F.J. (2008) Early lipoic acid intake protects retina of diabetic mice. *Free radical research* 42(7):613-617.
- Kas J. and Blattna J. (1986) Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol Med (Praha)* 32:81-92.
- Kehrer J.P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23: 21-48.
- Kelsie N.A., Wilkins H.M. and Linseman D.A. (2010) Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents. *Molecules* 15:7792-7814.
- Kesavulu M.M., Kameswararao B., Apparao Ch., Kumar E.G. and Harinarayan C.V. (2002) Effect of omega-3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 28(1):20-6.
- Khanna H.F., Sinha M.K., Khanna S. and Tandon R. (2008) Oxidative stress in hypertension: association with antihypertensive treatment. *Indian J Physiol Pharmacol* 52(3):283-7.
- Khanzode S.D., Dakhale G.N., Khanzode S.S., Saoji A. and Palasodkar R. (2003) Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Rep* 8:365-370.
- Kier L.B. and Hall L.H. (1976) Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research. *Academic Press: New York*.
- Kier L.B. and Hall L.H. (1986) Molecular Connectivity in Structure Activity Analysis. *John Wiley Publ.: London*.
- Kontogiorgis A.C., Pontiki A.E. and Hadjipavlou-Litina D. (2005) A review on Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs) of Natural and Synthetic Antioxidants Compounds. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 5(6):563-574.
- Koracevic D., Koracevic G. and Djordjevic V. (2001) Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 54:356-61.
- Kosower N.S. and Kosower E.M. (1978) The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54:109-160.
- Kraus R.L., Pasieczny R., Lariosa-Willingham K., Turner M.S., Jiang A. and Trauger J. W. (2005). Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *Journal of neurochemistry* 94(3):819-827.

- Laguerre M., Lecomte J. and Villeneuve P. (2014) The physico-chemical basis of fenolic antioxidant activity. *Lipid Technology* 26 (3):59-62.
- Li Z.G., Zhang W., Grunberger G. and Sima A.A. (2002) Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res* 946:221-231.
- Lipinski C.A. (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44:235-249.
- Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W. and Feeney P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 46(1-3):3-26.
- Lovric J., Mesic M., Macan M., Koprivanac M., Kelava M. and Bradamante V. (2008) Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Periodicum Biologorum* 110(1):63-67.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Macho Stadler M. (2002) ¿Qué es la Topología?. *Revista Sigma País Vasco* Nº 20.
- Mahmoudi N., Garcia-Domenech R., Galvez J, Fharati K., Franetich J.F., Sauerwein R., Hannoun L., Derouin F., Danis M. and Mazier D. (2008) New active drugs against liver stages of Plasmodium predicted by molecular topology. *Antimicrob Agents Chemother* 52(4):1215-1220.
- Malik A., Singh H., Andrabi M, Husain S.A. and Ahmad S. (2007) Databases and QSAR for cancer research. *Cancer Inform* 15(2):99-111.
- Mayer B. and Hemmens B. (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22:477-481.
- Meister A. and Anderson M.E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-760.
- Mendez-Tovar L. (2010) Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor. *Clin Dermatol* 4;28(2):185-9.
- Merck Index (2000): CD-ROM Windows, versión 12.3.
- Mérida S., Fustero S., M Villar V., Gálvez M., Román R. and M Amigó J. (2013). Efficacy and Activity Prediction by Molecular Topology of New Drugs Against the Tetranychus urticae Plague. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 16(6):473-483.
- Mérida S., Sancho-Tello M., Muriach M., Miranda M., Navea A. and Bosch-Morell, F. (2013). Lipoic acid lessens Th1-mediated inflammation in lipopolysaccharide-induced uveitis reducing selectively Th1 lymphocytes-related cytokines release. *Free radical research* 47(8):593-601.
- Mérida S., Sancho-Tello, M., Navea, A., Almansa, I., Muriach, M., & Bosch-Morell, F. (2014). An Anti-Interleukin-2 Receptor Drug Attenuates T-Helper 1 Lymphocytes-Mediated Inflammation in an Acute Model of Endotoxin-Induced Uveitis. *PLoS one*, 9(3), e90216.
- Miller J.K., Brzezinska-Slebodzinska E. And madsen F.C. (1993) Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci* 76:2812-2823.
- Miller N.J. and Rice-Evans C. (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS•+ radical cation assay. *Free Rad Res* 26:195-99.
- Minamiyama Y., Takemura S., Tsukioka T., Shinkawa H., Kobayashi F., Nishikawa Y., Kodai S., Mizuguchi S., Suehiro S. and Okada S. (2007) Effect of AOB, a fermented-grain food supplement, on oxidative stress in type 2 diabetic rats. *Biofactors* 30:91-104.
- Miranda M., Bosch-Morell F., Johnsen-Soriano S., Barcia J., Almansa I., Asensio S. and Romero F. J. (2007). Oxidative stress in rat retina and hippocampus after chronic MDMA ('ecstasy') administration. *Neurochemical research* 32(7):1156-1162.
- Miranda M., Arnal E., Ahuja S., Alvarez-Nölting R., López-Pedrajas R., Ekström P. and Romero F. J. (2010). Antioxidants rescue photoreceptors in *rd1* mice: Relationship with thiol metabolism. *Free Radical Biology and Medicine* 48(2):216-222.

- Mitra I., Saha A. and Roy K. (2012) In silico development, validation and comparison of predictive QSAR models for lipid peroxidation inhibitory activity of cinnamic acid and caffeic acid derivatives using multiple chemometric and chemoinformatics tools. *J Mol Model* 18(8):3951-3967.
- Morrisey P.A. and O'Brien N.M. (1998) Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J* 8:463-472.
- Murcia-Soler M., Pérez-Giménez F., García-March F.J., Salabert-Salvador M.T., Díaz-Villanueva W., Castro-Bleda M.J. and Villanueva-Pareja A. (2004) Artificial neural networks and linear discriminant analysis: a valuable combination in the selection of new antibacterial compounds. *Journal of chemical information and computer sciences* 44(3):1031-1041.
- Murcia-Soler M., Pérez-Giménez F., García-March F.J., Salabert-Salvador M.T., Díaz-Villanueva W. and Castro-Bleda, M. J. (2003) Drugs and nondrugs: an effective discrimination with topological methods and artificial neural networks. *Journal of chemical information and computer sciences* 43(5):1688-1702.
- Murcia-Soler M., Pérez-Giménez F., García-March F.J., Salabert-Salvador M.T., Díaz-Villanueva W. and Medina-Casamayor P. (2003) Discrimination and selection of new potential antibacterial compounds using simple topological descriptors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 21(5):375-390.
- Muriach M., Bosch-Morell F., Alexander G., Blomhoff R., Barcia J., Arnal E., Almansa I., Romero F.J. and Miranda M. (2006) Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med* 41:979-984.
- Muthulakshmi S. and Saravanan R. (2013) Protective effects of azelaic acid against high-fat diet-induced oxidative stress in liver, kidney and heart of C57BL/6J mice. *Moll Cell Biochem* 377(1-2):23-33.
- Muyng S.K., Ju W., Cho B., Oh S.W., Park S.M., Koo B.K. and Park B.J. (2013) Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ* 346, pp. f10.
- Ndhala A.R., Moyo M. and Van Staden J. (2010) Natural antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules. *Molecules* 15: 6905-6930.
- Nenadis N., Wang L.F., Tsimidou M. and Zhang H.Y. (2004) Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS(•+) assay. *J Agric Food Chem* 52(15):4669-74.
- Nogueira C., Damasceno F.M., De Aquino-Neto M.R., De Andrade G.M., Fontenele J.B., De Medeiros T.A and Viana G.S. (2011) Doxycycline protects against pilocarpine-induced convulsions in rats, through its antioxidant effect and modulation of brain amino acids. *Pharmacol Biochem Behav* 98(4):525-32.
- Olinescu R.M. and Kummerow F.A. (2001) Fibrinogen is an efficient antioxidant. *J Nutr Biochem* 12:162-169.
- O'Mathúna D.P. (2013) Large systematic Review of Vitamin and Antioxidant Supplements Finds No Impact on Risk of cardiovascular Disease. *Integra Med Alert* 16(3):41-44.
- Packer L., Witt E.H. and Tritschler H.J (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad Bio and Med* 19(2):227-50.
- Papaioannou D., Cooper K.L., Carroll C., Hind D., Squires H. and Tappenden P. (2011) Antioxidants in the chemoprevention of colorectal cancer and colorectal adenomas in the general population: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis* 13: 1085-1099.
- Paravicini T.M. and Touyz R.M. (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31 Suppl 2:S170-180.

- Passi S., Picardo M., Zompetta C., De Luca C., Breathnach A.S. and Navarro-Porro M. (1991) The oxyradical-scavenging activity of azelaic acid in biological systems. *Free Radic Res Commum* 15(1):17-28.
- Pérez-Garrido A., Helguera A.M., Ruiz J.M. and Rentero P.Z. (2012) Topological sub-estructural molecular design approach: radical scavenging activity. *Eur J Med Chem* 49:86-94.
- Podsedeck A. (2007) Natural antioxidants and antioxidant activity of *Brassica* vegetables: A review. *LWT-Food Sci. Technol.* 131:3208-3211.
- Pogliani L.J (1995) Molecular Modeling by Linear Combinations of Connectivity Indexes. *Phys Chem.* 99:925-937.
- Powers S.K. and Lennon S.L (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58:1025-1033.
- Prasad K.N., Yang B., Yang S., Chen Y., Zhao M., Ashraf M. and Jiang Y. (2009) Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.). *Food Chem* 116:1-7.
- Pryor W.A. and Stanley J.P. (1975) Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* 40:3615-3617.
- Puttananjaiah M.K., Dhale M.A., Gaonkar V. and Keni S. (2011) Statins: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors demonstrate anti-atherosclerotic character due to their antioxidant capacity. *Appl Biochem Biotechnol* 163(2):215-222.
- Ramachandran V., Watts L.T., Maffi S.K., Chen J., Schenker S. and Henderson G. (2003b) Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *J Neurosci Res* 74:577-588.
- Randic M (1975). On characterization of molecular branching. *Am Chem Soc* 69:17-20.
- Randic M. (1991) Generalized Molecular Descriptors. *J Math Chem* 7:155-168.
- Rastmanesh R. (2011) High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. *Chem Biol Interact* 189:1-8.
- Ratnam D.V., Ankola D.D., Bhardwaj V., Sahana D.K. and Kumar M.N.V.R. (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* 113:189-207.
- Rhee S.G. and Woo H.A. (2011) Multiple functions of peroxiredoxins: Peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and protein chaperones. *Antioxid Redox Signal* 15:781-794.
- Rice-Evans C. and Miller N. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods enzymol* 234(24):279-93.
- Richard M.J., Guiraud P., Meo J. and Favier A. (1992) High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 577:9-18.
- Rios-Santamarina I., García-Domenech R., Gálvez J., Morcillo Esteban J., Santamaría P. and Cortijo J. Getting new bronchodilator compounds from molecular topology. *Eur J Pharm Sci* 22(4):271-7.
- Romero M.J., Bosch-Morell F., Romero B., Rodrigo J.M., Serra M.A. y Romero F.J. (1998) Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 25:993-997.
- Roof R.L., Hoffman S.W. and Stein D.G. (1997) Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Molecular and chemical neuropathology* 31(1):1-11.
- Rooney M., Kish J., Jacobs J., Kinzie J., Weaver A., Crissman J. and Al-Sarraf M. (1985) Improved complete response rate and survival in advanced head and neck cancer after

- three-course induction therapy with 120-hour 5-FU infusion and cisplatin. *Cancer* 55(5):1123-1128.
- Rosenblatt F. (1958) The Perceptron: A probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychological Review* 65:386-408.
- Roy K. and Mitra I. (2009) Advances in quantitative structure-activity relationships models of antioxidants. *Exp Opin on Drug Dis* 4(11):1157-1175.
- Rumelhart D., Hinton G. and Williams R. (1986) Learning representations by back-propagating errors. *Nature* 323:533-536.
- Salt D.W., Yildiz N., Livingstone D.J. and Tinsley C.J. (1992) The use of artificial neural networks in QSAR. *Pesticide science* 36(2):161-170.
- Satriano J.A., Shuldiner M., Hora K., Xing Y., Shan Z. and Schlondorff D. (1993) Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest* 92:1564-1571.
- Scalbert A. and Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130:2073-2085.
- Schewe T. (1995). Molecular actions of ebselen—an antiinflammatory antioxidant. *General Pharmacology: The Vascular System* 26(6):1153-1169.
- Serrano J., Goñi I., Saura-Calixto F. (2007) Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res. Int* 40:15-21.
- Sharma V., Goswami R. and Madann A.K. (1997) Eccentric Connectivity Index: A Novel Highly Discriminating Topological Descriptor for Structure-Property and Structure-Activity Studies. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 37:273-282.
- Sies H. (1991) *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Academic Press., London.
- Soffers A., Van Haandel M., Boersma M., Tyrakowska B., Laane C. and Rietjens I. (1999) Antioxidants activities of carotenoids: Quantitative relationships between theoretical calculations and experimental literature data. *Free Radical Research* 30(3):233-240.
- Spanou C., Tzioumaki N., Manta S., Margaris P., Kouretaas D., Komiotis D. and Kalliopi Liadaki K. (2011) Unsaturated Keto and Exomethylene Pyranonucleoside Analogues of Thymine and Uracil Exhibit Potent Antioxidant Properties. *Pharmacology & Pharmacy* 2:122-126.
- Supratim R., Chandana S. and Kunal R. (2007) QSAR modeling of antiradical and antioxidant activities of flavonoids using electrotopological state (E-State) atom parameters. *Central European Journal of Chemistry* 5(4):1094-1113.
- Surekha R.H., Srikanth B.B., Jharna P., Ramachandra R.V., Dayasagar R.V. and Jyothy A. (2007) Oxidative stress and total antioxidant status in myocardial infarction. *Singapore Med J* 48:137-142.
- Svensk A.M., Soini Y., Paakko P., Hiravikoski P. and Kinnula V.L. (2004) Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol* 122:395-404.
- Sylvester J.J. On an application of the new atomic theory to the graphical representation of the invariants and covariants of binary quantics, — with three appendices (1878) *Am J Math* 1:64-90.
- Takebayashi J., Ishii R., Chen J., Matsumoto T., Ishimi Y. and Tai A. (2010) Reassessment of antioxidant activity of arbutin: Multifaced evaluation using five antioxidant assay systems. *Free Rad Res* 44(4):473-8.
- Telfer J.F. and Brock J.H. (2004) Proinflammatory cytokines increase iron uptake into human monocytes and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit* 10:BR91-95.

- Temkin O.N., Zeigarnik A.V., and Bonchev D. (1996) *Chemical Reaction Network*; CRC Press: Boca Raton.
- Todeschini R. and Consonni V (2000) Introduction in *Handbook of Molecular Descriptors* pp XI, Wiley-VCH, Weinheim.
- Todeschini R., Consonni V (2000) S, in *Handbook of Molecular Descriptors* (Todeschini R., Consonni V ed) pp 390-391, ed Wiley-VCH, Weinheim.
- Torrado-Fonseca, M. y Berlanga-Silvente, V. (2013) Análisis Discriminante mediante SPSS. [En línea] REIRE, Revista d'Innovació i Recerca en Educació, 6 (2), 150-166.
- Touyz R.M. (2004) Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44:248-252.
- Trujillano J., Badia M., March J., Rodríguez A., Serviá L. y Sorribas A. (2005) Redes neuronales artificiales en Medicina Intensiva. Ejemplo de aplicación con las variables del MPM II. *Med Intensiva* 29:13-20.
- Trush M.A., Mimnaugh E.G. and Gram T.E. (1982) Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* 31:3335-3346.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M.M. and Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160(1):1-40.
- Velkov Z. (2009) Quantum-chemical Approach to the Modeling of Antioxidant Activity (Theoretical descriptors of antioxidants) *Scientific Research Journal of South-West University*, 2(1):41-45.
- Villar del Fresno A.M. (1999) Ácidos fenólicos y fenoles sencillos. Cumarinas y lignanos, en *Farmacognosia General* (Villar del Fresno A.M. ed) pp 191-197, Editorial Síntesis S.A, Madrid.
- Villar del Fresno A.M. (1999) Flavonoides, en *Farmacognosia General* (Villar del Fresno A.M. ed) pp 209-211, Editorial Síntesis S.A, Madrid.
- Viñas G., Puig T. y Porta R. (2012) Estrés oxidativo en pacientes con cáncer: dos caras de una misma moneda. *Medicina Clínica*, 139(4):171-175.
- Virtamo J., Edwards B.K., Virtanen M., Taylor P.R., Malila N., Albanes D., Huttunen J.K., Hartman A.M., Hietanen P., Maënpä H., Koss L., Nordling S. and Heinonen O.P. (2000) Effects of supplemental alpha-tocopherol and beta-carotene on urinary tract cancer: incidence and mortality in a controlled trial (Finland). *Cancer Causes Control* 11(10):933-939.
- Visioli F., Wolfram R., Richard D., Abdullah M.I. and Crea R. (2009) Olive phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *J Agric Food Chem* 57:1793-1796.
- Wasil M., Halliwell B. and Moorhouse C.P. (1988). Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline?. *Biochemical pharmacology* 37(4):775-778.
- Wiktorska J.A., Lewinski A. and Sewerynek E. (2005) Effects of different antioxidants on lipid peroxidation in brain homogenates, induced by L-thyroxine administration in rats. *Neuro endocrinology letters* 26:704-708.
- Wiener H. (1947) Correlation of heats of isomerization and differences in heats of vaporization of isomers among the paraffin hydrocarbons. *J Am Chem Soc* 69:2636-38.
- Whitten K.W., Gailey K.D. and Davis R.E. (1992) Reacciones químicas: un estudio sistemático, en *Química General* (Whitten K.W., Gailey K.D. and Davis R.E. ed) pp 238, McGraw\_Hill Interamericana de México, S.A.
- Wilson R. (1979) Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo?, in *Oxygen free radicals* (65 C. F. S. ed) pp 19-35, Excerpta Medica, Amsterdam.

- Winyard PG M.C., Winrow VR, Zaidi M, Blake D. (1999) Free radical pathways in the inflammatory response, in *Free radical damage and its control* (Rice-Evans CA. B., RH. ed) pp 361-383, Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Wu T.W., Hashimoto N., Wu J., Carey D., Li R.K., Mickle D.A. and Weisel R.D. (1990). The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. *Biochemistry and Cell Biology* 68(10):1189-1194.
- Wu M.J., O'Doherty P.J., Fernandez H.R., Lyons V., Rogers P.J., Dawes I.W. and Higgins V.J. (2011) An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 11(4):379-87.
- Yagi K., Akimoto K., Mimori N., Miyake T., Kudo M., Arai K. and Ishii, S. (2000) Synthesis and insecticidal/acaricidal activity of novel 3-(2, 4, 6-trisubstituted phenyl) uracil derivatives. *Pest Manag. Sci.* 56:65-73.
- Yang Y., Chen H., Nilsson I., Muresan S. and Engkvist O. (2010) Investigation of the Relationship between Topology and Selectivity for Druglike Molecules. *J. Med. Chem* 53: 7709-7714.
- Yap CW (2011) PaDEL-Descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. *Journal of Computational Chemistry*. 32 (7): 1466-1474.
- Yu B.P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.
- Zhang H.Y., Yang D.P. and Tang G.Y. (2006) Multipotent antioxidants: from screening to design. *Drug Disc Tod* 11(15-16):749-754.
- Zhao F. and Liu Z.Q. (2011) Comparison of antioxidant effectiveness of lipoic acid and dihydrolipoic acid. *J Biochem Mol Toxicol* 25(4):216-23.
- Zimmerman M.C., Lazartigues E., Lang J.A., Sinnayah P., Ahmad I.M., Spitz D.R. and Davisson R.L. (2002) Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91:1038-1045.





## **VIII. ANEXOS**



**Anexo 1. Equivalencias número Index Merck y nombre químico de las moléculas.**

<b>NÚMERO</b>	<b>NOMBRE QUÍMICO</b>
6	(S)-3-(1H-indol-3-yl)-2-(methylamino)propanoic acid
21	2-((4-((4-aminophenyl)sulfonyl)phenyl)amino)acetic acid
28	1,2-dihydroacenaphthylene
50	N-(5-sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamide
73	N-((5-amino-2-((4-aminophenyl)sulfonyl)phenyl)sulfonyl)acetamide
1181	benzyl 2-hydroxybenzoate
1226	*
1502	3-(2-(dimethylamino)ethyl)-1H-indol-5-ol
1910	1-(10-(3-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)propyl)-10H-phenothiazin-2-yl)propan-1-one
1920	methyl 4-methyl-3-(2-(propylamino)propanamido)thiophene-2-carboxylate
2579	(1R,2S,7S,8S)-8-isopropyl-1,3-dimethyltricyclo[4.4.0.0 <sup>2,7</sup> ]dec-3-ene
2624	3-(1-(furan-2-yl)-3-oxobutyl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one
2630	2H-chromen-2-one
2844	**
3059	dibenzyl phosphorochloridate
3095	A name could not be generated for this structure.
3259	5,5-dimethyl-3-oxocyclohex-1-en-1-yl dimethylcarbamate
3260	5,5-dimethylloxazolidine-2,4-dione
3267	2-((3-butylisoquinolin-1-yl)oxy)-N,N-dimethylethanamine
3272	2-(2-(dimethylamino)ethoxy)ethyl 10H-phenothiazine-10-carboxylate
3279	N,N-dimethyl-4-(phenyldiazenyl)aniline
3285	7,12-dimethyltetraphene
3364	N,N-dimethyl-2,2-diphenylacetamide
3550	1-(2-((4-chlorobenzyl)oxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl)-1H-imidazole
3560	O-ethyl S,S-diphenyl phosphorodithioate
3597	1-(2-ethoxyethyl)-2-(4-methyl-1,4-diazepan-1-yl)-1H-benzo[d]imidazole
3605	1-(((S)-2-(((S)-1-ethoxy-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl)amino)propanoyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid
3614	6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methanobenzo[e][1,3,2]dioxathiepine 3-oxide
4144	4-(2-(3,5-diethoxyphenoxy)ethyl)morpholine
4969	4-chloro-N-(2-methylindolin-1-yl)-3-sulfamoylbenzamide
4971	9-(3-(isopropylamino)propyl)-9H-fluorene-9-carboxamide
4996	5-(1-(1H-indol-3-yl)ethyl)-2-(methylamino)oxazol-4(5H)-one
4999	2-(4-(1-oxoisindolin-2-yl)phenyl)propanoic acid
5009	cyclohexane-1,2,3,4,5,6-hexayl hexanicotinate
5028	3-(3-amino-2,4,6-triiodo-N-phenylbenzamido)propanoic acid
5052	5-chloro-7-iodoquinolin-8-ol
5063	5,7-diiodoquinolin-8-ol
5065	(S)-2-amino-3-(4-hydroxy-3-iodophenyl)propanoic acid
5116	indoline-2,3-dione
5118	N-isopropylpyrimidin-2-amine
5140	8,9,12,12a-tetrahydro-1H-pyrano[4',3':4,5]azepino[3,2,1-hi]indol-3(11H)-one
5201	6-(dimethylamino)-5-methyl-4,4-diphenylhexan-3-one
5213	3,5,5-trimethylcyclohex-2-enone

5219	N,N-dimethyl-2-(10H-phenothiazin-10-yl)propan-1-amine
5221	4-amino-N,N-diisopropyl-N-methyl-4-oxo-3,3-diphenylbutan-1-aminium
5223	4-(2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclopent-1-en-1-yl)butan-2-one
5241	isoquinoline
5338	2,6-dimethylpyrimidin-4-amine
5343	N-ethyl-2-(2-hydroxy-2,2-diphenylacetoxy)-N,N-dimethylethanaminium
5355	N-(4-ethoxyphenyl)-2-hydroxypropanamide
5464	4-methylquinoline
5526	(1R,2S,4R,5S)-1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane
5580	2-(6-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-1-methylpiperidin-2-yl)-1-phenylethanone
5611	7-chloro-5-(2-chlorophenyl)-3-hydroxy-1-methyl-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-one
5617	2-chloro-11-(4-methylpiperazin-1-yl)dibenzo[b,f][1,4]oxazepine
5647	(5S,10bR,12S)-12-methyl-2,3,4,4a,5,6-hexahydro-1H-5,10b-propano-1,7-phenanthroline
5908	2-methyl-2-propylpropane-1,3-diyl dicarbamate
6188	2-(m-tolylcarbamoil)benzoic acid
6218	(E)-6-(2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)vinyl)-4-methoxy-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one
6231	7-chloro-2-methyl-4-oxo-3-(o-tolyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinazoline-6-sulfonamide
6254	10-chloro-11b-(2-chlorophenyl)-3-methyl-2,3,7,11b-tetrahydrobenzo[f]oxazolo[3,2-d][1,4]diazepin-6(5H)-one
6265	bis(4-(dimethylamino)phenyl)methanone
6798	(13S,17S)-17-ethynyl-13,17-dimethyl-6,7,8,13,14,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3(2H)-one
6802	2,2'-(piperidine-2,6-diyl)bis(1-phenylethanone)
6804	6-(dimethylamino)-4,4-diphenylhexan-3-one
6807	3-(pyrrolidin-2-yl)pyridine
6810	4,4-diphenyl-6-(piperidin-1-yl)hexan-3-one
6814	(13S,17R)-17-hydroxy-13-methyl-17-vinyl-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3(2H)-one
6819	N1,N1-diethylpentane-1,4-diamine
6826	(4S,7S)-4-(furan-3-yl)-5-hydroxy-1,7-dimethyldecahydroquinolizin-5-ium
6829	8-(hydroxymethyl)-6,11-dimethylloxazolo[5,4,3-ij]pyrido[3,2-g]quinoline-4,10(2H,11H)-dione
6841	perfluorocyclobutane
6845	octan-2-ylhydrazine
7031	***
7034	(13S,17S)-4,17-dihydroxy-13-methyl-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3(2H)-one
7047	6,7-bis(2-(diethylamino)ethoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one
7058	1-(3-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)propyl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-one
7064	2-(2-(diethylamino)ethoxy)ethyl 2-ethyl-2-phenylbutanoate
7069	methyl (5-(phenylsulfinyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate
7071	(Z)-1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethanone O-(2,4-dichlorobenzyl) oxime
7072	5,6-dimethyl-2,3-dihydro-1,4-dithiine 1,1,4,4-tetraoxide
7084	2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid
7092	2,3,5-trichloro-N-(3,5-dichloro-2-hydroxyphenyl)-6-hydroxybenzamide
7272	5-ethyl-5-(pentan-2-yl)pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione
7550	picene
7577	1-((6-hydrazinylpyridazin-3-yl)(methyl)amino)propan-2-ol
7588	6-(2-(4-methoxyphenyl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-5-methyl-4,5-dihydropyridazin-3(2H)-one
7589	1-(1-(4,4-bis(4-fluorophenyl)butyl)piperidin-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-one
7966	N,N-dimethyl-3-(10H-phenothiazin-10-yl)propan-1-amine

7970	N,N-dimethyl-1-(10H-phenothiazin-10-yl)propan-2-amine
7987	N-(3,4-dichlorophenyl)propionamide
8001	isopropyl phenylcarbamate
8005	oxetan-2-one
8014	1-(10-(3-(dimethylamino)propyl)-10H-phenothiazin-2-yl)propan-1-one
8015	propiophenone
8016	3-(piperidin-1-yl)-1-(4-propoxyphenyl)propan-1-one
8022	2-isopropoxyphenyl methylcarbamate
8024	4-(dimethylamino)-3-methyl-1,2-diphenylbutan-2-yl propionate
8160	****
8173	(3-(di(pyridin-2-yl)methylene)cyclopenta-1,4-dien-1-yl)di(pyridin-2-yl)methanol
8194	2-(pyrrolidin-1-yl)-1-(p-tolyl)pentan-1-one
8196	1-(4-(4-chlorophenyl)-3-phenylbut-2-en-1-yl)pyrrolidine
8451	7,8-dihydroindolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-b]quinazolin-5(13H)-one
8482	2-hydroxy-N-phenylbenzamide
8487	N'-(2-hydroxybenzylidene)isonicotinohydrazide
8494	2-(2-(diethylamino)ethoxy)-N-phenylbenzamide
8505	(Z)-5-(2,3-dimethyltricyclo[2.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]heptan-3-yl)-2-methylpent-2-en-1-ol
8875	5-((E)-2-bromovinyl)-1-((2R,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione
9125	4-amino-N-(3,4-dimethylisoxazol-5-yl)benzenesulfonamide
9197	*****
9206	5-allyl-5-(sec-butyl)pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione
9219	(4R,7S)-2-(4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)hexahydro-1H-4,7-methanoisoindole-1,3(2H)-dione
9231	*****
9243	4,4'-methylenebis(1,2,4-thiadiazinane 1,1-dioxide)
9637	2,5,7-trimethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-ol
9657	N-(2-chloro-4-methylphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol-2-amine
9669	4-methylbenzene-1,2-dithiol
9784	5-chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-2-(methylthio)-1H-benzo[d]imidazole
9811	10-(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)-2-(trifluoromethyl)-10H-phenothiazine
10324	6-(5-chloropyridin-2-yl)-7-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-5-yl 4-methylpiperazine-1-carboxylate
10389	2-(5-((1H-1,2,4-triazol-1-yl)methyl)-1H-indol-3-yl)-N,N-dimethylethanamine
10409	4-methyl-5-phenyl-4,5-dihydrooxazol-2-amine
10423	2-((2-ethoxyphenoxy)(phenyl)methyl)morpholine

\* (10S,11S,13S,16S)-9-fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-3H-cyclopenta[a]phenanthren-3-one

\*\* (3bS,5aS,6R)-6-acetyl-10-chloro-6-hydroxy-3b,5a-dimethyl-3,3a,3b,3c,4,5,5a,6,7,8,8a,8b-dodecahydrocyclopenta[a]cyclopropa[g]phenanthren-2(2aH)-one

\*\*\* 4-((1R,3S,5S,10R,13R,14S,17R)-3-(((2R,3R,4R,5R,6S)-3,5-dihydroxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-1,5,11,14-tetrahydroxy-10-(hydroxymethyl)-13-methylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)furan-2(5H)-one

\*\*\*\* N-((5R,6S,Z)-2-(butan-2-ylidene)-10-hydroxy-5,11-dimethyl-3,7,12-trioxo-9-(pyridin-3-ylmethyl)-1,4-dioxo-8-azacyclododecan-6-yl)-3-hydroxypicolinamide

\*\*\*\*\* (3S,Z)-5-((E)-2-((7aR)-1-((5R)-5-hydroxy-6-methylheptan-2-yl)-7a-methylhexahydro-1H-inden-4(2H)-ylidene)ethylidene)-4-methylenecyclohexane-1,3-diol

\*\*\*\*\* (3S,6aR,8aR,14bR)-4,4,6a,8a,11,11,12b,14b-octamethyl-1,2,3,4,4a,5,6,6a,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14,14a,14b-icosahydropicen-3-ol

**Anexo 2. Resultados obtenidos en SPSS del grupo de entrenamiento activos.**

NÚMERO	MOLÉCULA	VALOR FD	CLASIFICACIÓN
1	1,3,5-TRIHIDROXI-2-(2',2'-DIMETIL-4'-ISOPROPIENIL)CICLOPENTANILXANTHONA	0,98	A
2	1,7-BIS-(4-HIDROXIPIENIL)-2,4,6-HEPTATRIENONA	1,63	A
3	3'(3,4-DIHIDROXIPIENIL)PROPANOICA ACIDA	2,31	A
4	3'(3-METIL-2-BUTENIL)4'-O-β-D-GLUCOPIRANOSIL-4,2'-DIHIDROXIQUALCONA	2,26	A
5	3,4-DIHIDROXI-5-PRENYLCINNAMICA ACIDA	2,47	A
6	3,4-DIHIDROXI MANDELICA ACIDA	2,56	A
7	3-TERT-BUTIL-4-HIDROXI ANISOLA	0,98	A
8	4',5,7-TRIHIDROXI-3'-METOXIFLAVONA	2,02	A
9	6-PROPILO-2-TIOURACILO	1,39	A
10	7-FLOROECKOLA	3,45	A
11	α-MANGOSTINA	2,26	A
12	(+)-α-TOCOPHEROLA	0,50	A
13	L, L-TRANSTERINOICA ACIDA	1,88	A
14	ARJUNOLICA ACIDA	-0,29	N
15	ASPALATINA	3,23	A
16	ASTAXANTINA	3,39	A
17	BELIDINA	2,38	A
18	BETACAROTENO	1,48	A
19	CAFEICA ACIDA	2,63	A
20	CARLINOSE	3,14	A
21	CARNOSINA	0,03	A
22	COUMESTROL	1,17	A
23	CROCIN-1	3,84	A
24	CYANIDINA CATION	2,47	A
25	D-ALLOPIRANOSE	2,22	A
26	DAVIDIGENINA	1,55	A
27	DIANDRAFLAVONA	1,88	A
28	DIHIDROLIPOICA ACIDA	1,14	A
29	DIOSMETINA	1,78	A
30	EBSELENA	1,52	A
31	(-)-EPICATECHINA	2,20	A
32	(-)-EPIGALLOCATECHINA	2,82	A
33	ERGOTIONEINA	-0,99	N
34	ERITRITOLA	3,32	A
35	ESULETINA	1,67	A
36	FERULICA ACIDA	2,15	A
37	FISETINA	1,95	A
38	GALLICA ACIDA	2,79	A
39	GARCINIIAXANTHONA F	1,08	A
40	GLUTATIONE	1,39	A

NÚMERO	MOLÉCULA	VALOR FD	CLASIFICACIÓN
41	HYDROXYTYROSOL	1,99	A
42	HYPOLAETIN	3,00	A
43	ISOFERULIC ACID	1,83	A
44	ISOSCUTELLAREIN GLYCOSIDE	2,82	A
45	KAEMPFEROL 3-O- $\alpha$ -L-[6'''-p-coumaroyl- $\beta$ -D-GLUCOPYRANOSYL-(1->2)-RHAMNOPYRANOSIDE]	1,82	A
46	LACTOBIONIC ACID	2,99	A
47	LUCIDUMOSIDE C	1,72	A
48	LYCOPENE	2,30	A
49	MADECASSOSIDE	0,79	A
50	MANGIFERIN	2,76	A
51	MANNIFLAVANONE	3,52	A
52	METHYLSELENIC ACID	3,68	A
53	METHYL VANILLATE	1,42	A
54	MORIN	2,58	A
55	MYRICITRIN-5-METHYL ETHER	2,64	A
56	N-ACETILCISTEINATE	-1,73	N
57	N-ACETYLLCISTEINE	0,73	A
58	N-ACETYLNEURAMINIC ACID	1,08	A
59	NORDIHYDROGUAIARETIC ACID	1,98	A
60	NORWOGONIN	1,44	A
61	ORIENTIN	2,73	A
62	ORYZAFURAN	2,39	A
63	PINOBANKSIN	0,78	A
64	PROANTHOCYANIDIN A2	3,16	A
65	PROCYANIDINB2	3,71	A
66	PTEROSTILBENE	1,01	A
67	PUTRESCINE	-0,55	N
68	QUADRANGULARINA	2,38	A
69	QUERCETIN	2,58	A
70	ROBUSTAFLAVONE	2,72	A
71	ROSMARINIC ACID	2,66	A
72	RUTIN	2,48	A
73	SAPPANCHALCONE	2,28	A
74	SELENONEINE	-2,87	N
75	SINAPINE	1,77	A
76	SOPHORAFLAVANONE G	2,29	A
77	TAMARIXETIN	1,97	A
78	TAURINE	2,92	A
79	TERNSTROSIDE A	1,98	A
80	THIOPROLINE	0,51	A



---

NÚMERO	MOLÉCULA	VALOR FD	CLASIFICACIÓN
81	THIOUREA	3,81	A
82	TRANS-2-COUMARIC ACID	1,44	A
83	TRANSASTRINGIN	2,67	A
84	TRANSPICEID	2,11	A
85	TROLOX	1,57	A
86	UBIQUINONE 9	1,79	A
87	VACCIHEIN A	2,27	A
88	VANILLIN	1,81	A
89	Y-TOCOTRIENOL	1,39	A
90	ZEAXHANTIN	3,27	A
91	ZINGERONE	1,25	A

**Anexo 3. Resultados obtenidos en SPSS del grupo de entrenamiento no activos**

NÚMERO	MOLÉCULA	VALOR DF	CLASIFICACIÓN
1	6	-0,09	N
2	21	-0,72	N
3	28	-3,55	N
4	50	-2,72	N
5	73	-3,02	N
6	1181	0,36	A
7	1226	-0,24	N
8	1502	0,62	A
9	1910	-1,18	N
10	1920	-1,74	N
11	2579	-2,88	N
12	2624	-0,29	N
13	2630	-1,51	N
14	2844	-1,98	N
15	3059	-2,24	N
16	3095	-1,78	N
17	3259	-1,43	N
18	3260	-2,98	N
19	3267	-2,06	N
20	3272	-2,92	N
21	3279	-2,89	N
22	3285	-2,25	N
23	3364	-2,14	N
24	3550	-2,38	N
25	3560	-3,13	N
26	3597	-3,07	N
27	4144	-1,45	N
28	4971	-1,82	N
29	4996	-2,85	N
30	4999	-0,10	N
31	5009	-4,23	N
32	5063	-3,15	N
33	5201	-2,02	N
34	5213	-2,37	N
35	5219	-3,08	N
36	5221	-1,63	N
37	5223	-1,80	N
38	5241	-3,18	N
39	5338	-2,16	N
40	5343	-0,85	N

---

NÚMERO	MOLÉCULA	VALOR DF	CLASIFICACIÓN
41	5355	-0,26	N
42	5908	-0,08	N
43	6188	-0,67	N
44	6218	-1,46	N
45	6231	-2,29	N
46	6254	-3,20	N
47	6265	-1,92	N
48	6798	-2,02	N
49	6804	-2,12	N
50	6814	-2,12	N
51	6819	-1,50	N
52	6829	0,13	A
53	6845	-1,85	N
54	7031	-0,52	N
55	7034	-1,22	N
56	7047	-1,16	N
57	7058	-4,16	N
58	7064	-1,69	N
59	7069	-3,96	N
60	7071	-2,16	N
61	7072	-1,67	N
62	7084	-0,07	N
63	7092	-0,62	N
64	7966	-3,47	N
65	7970	-3,08	N
66	7987	-2,56	N
67	8001	-2,72	N
68	8005	-0,99	N
69	8014	-2,90	N
70	8015	-1,83	N
71	8016	-2,06	N
72	8022	-2,23	N
73	8024	-2,16	N
74	8160	-1,56	N
75	8173	-1,92	N
76	8194	-2,42	N
77	8196	-2,69	N
78	8451	-2,66	N
79	8482	-1,32	N
80	8487	-1,38	N

NÚMERO	MOLÉCULA	VALOR DF	CLASIFICACIÓN
81	8494	-3,15	N
82	8505	-0,59	N
83	8875	-0,82	N
84	9125	-2,12	N
85	9197	0,16	A
86	9206	-2,57	N
87	9219	-3,61	N
88	9231	-1,52	N
89	9243	-2,57	N
90	9637	0,31	A
91	9657	-2,64	N
92	9669	-2,69	N
93	9784	-2,32	N
94	9811	-2,24	N
95	10324	-3,37	N
96	10389	-2,21	N
97	10409	-2,09	N
98	10423	-2,49	N

#### Anexo 4. Resultados obtenidos en R del grupo de entrenamiento activos

NÚMERO	MOLÉCULA	PROBABILIDAD (%)	CLASIFICACIÓN
1	1,3,5-TRIHIDROXI-2-(2',2'-DIMETIL-4'-ISOPROPENIL)CICLOPENTANILXANTHONE	92,89	A
2	1,7-BIS-(4-HIDROXIFENIL)-2,4,6-HEPTATRIENONE	89,2	A
3	3'(3,4-DIHIDROXIFENIL)PROPANOICACID	99,99	A
4	3'(3-METIL-2-BUTENIL)4'-O-β-D-GLUCOPYRANOSYL-4,2'-DIHIDROXYCHALCONE	99,82	A
5	3,4-DIHIDROXI-5-PRENYLCINNAMIC ACID	99,99	A
6	3,4-DIHIDROXIMANDELIC ACID	99,99	A
7	3-TERT-BUTYL-4-HIDROXYANISOLE	80,48	A
8	4',5,7-TRIHIDROXI-3'-METHOXYFLAVONE	99,48	A
9	6-PROPYL-2-THIOURACIL	0	N
10	7-PHLOROECKOL	99,99	A
11	α-MANGOSTIN	99,99	A
12	(+)-α-TOCOPHEROL	0,04	N
13	L, L-TRANSRETINOIC ACID	99,93	A
14	ARJUNOLIC ACID	99,9	A
15	ASPALATHIN	99,99	A
16	ASTAXANTHIN	99,99	A
17	BELLIDIN	0,06	N
18	BETACAROTENE	76,14	A
19	CAFFEIC ACID	99,99	A
20	CARLINSIDE	99,99	A
21	CARNOSINE	98,19	A
22	COUMESTROL	97,32	A
23	CROCIN-1	99,83	A
24	CYANIDIN CATION	99,99	A
25	D-ALLOPYRANOSE	97,67	A
26	DAVIDIGENIN	99,55	A
27	DIANDRAFLAVONE	99,98	A
28	DIHIDROLIPOIC ACID	99,99	A
29	DIOSMETIN	98,81	A
30	EBSELEN	99,98	A
31	(-)-EPICATECHIN	95,46	A
32	(-)-EPIGALLOCATECHIN	99,98	A
33	ERGOPTHIONEINE	98,67	A
34	ERYTHRITOL	99,98	A
35	ESCULETIN	95,91	A
36	FERULIC ACID	99,07	A
37	FISSETIN	98,08	A
38	GALLIC ACID	99,99	A
39	GARCINIAXANTHONE F	99,89	A
40	GLUTATHIONE	99,99	A

NÚMERO	MOLÉCULA	PROBABILIDAD (%)	CLASIFICACIÓN
41	HYDROXYTYROSOL	98,92	A
42	HYPOLAETIN	99,99	A
43	ISOFERULIC ACID	96,72	A
44	ISOSCUTELLAREIN GLYCOSIDE	0,09	N
45	KAEMPFEROL 3-O- $\alpha$ -L-[6''-p-coumaroyl- $\beta$ -D-GLUCOPYRANOSYL-(1- $\rightarrow$ 2)-RHAMNOPYRANOSIDE]	99,99	A
46	LACTOBIONIC ACID	47,35	N
47	LUCIDUMOSIDE C	99,99	A
48	LYCOPENE	99,99	A
49	MADECASSOSIDE	99,99	A
50	MANGIFERIN	77,91	A
51	MANNIFLAVANONE	99,9	A
52	METHYLSELENIC ACID	99,96	A
53	METHYL VANILLATE	80,56	A
54	MORIN	99,76	A
55	MYRICITRIN-5-METHYL ETHER	99,97	A
56	N-ACETILCISTEINATE	91,8	A
57	N-ACETYLLCISTEINE	87,3	A
58	N-ACETYLNEURAMINIC ACID	99,99	A
59	NORDIHYDROGUAIARETIC ACID	99,89	A
60	NORWOGONIN	65,76	A
61	ORIENTIN	99,99	A
62	ORYZAFURAN	100	A
63	PINOBANKSIN	41,62	N
64	PROANTHOCYANIDIN A2	0	N
65	PROCYANIDINB2	98,92	A
66	PTEROSTILBENE	99,9	A
67	PUTRESCINE	53	A
68	QUADRANGULARINA	99,99	A
69	QUERCETIN	99,99	A
70	ROBUSTAFLAVONE	99,76	A
71	ROSMARINIC ACID	99,69	A
72	RUTIN	0	N
73	SAPPANCHALCONE	99,78	A
74	SELENONEINE	99,96	A
75	SINAPINE	99,99	A
76	SOPHORAFLAVANONE G	99,99	A
77	TAMARIXETIN	97,63	A
78	TAURINE	99,98	A
79	TERNSTROSIDE A	99,41	A
80	THIOPROLINE	94,75	A

NÚMERO	MOLÉCULA	PROBABILIDAD (%)	CLASIFICACIÓN
81	THIOUREA	99,57	A
82	TRANS-2-COUMARIC ACID	99,13	A
83	TRANSASTRINGIN	99,96	A
84	TRANSPICEID	99,6	A
85	TROLOX	99,87	A
86	UBIQUINONE 9	99,99	A
87	VACCIHEIN A	99,74	A
88	VANILLIN	99,07	A
89	Y-TOCOTRIENOL	91,95	A
90	ZEAXHANTIN	99,99	A
91	ZINGERONE	92,69	A

**Anexo 5. Resultados obtenidos en R del grupo de entrenamiento no activos**

NÚMERO	MOLÉCULA	PROBABILIDAD (%)	CLASIFICACIÓN
1	6	95,68	N
2	21	99,54	N
3	28	99,99	N
4	50	99,7	N
5	73	99,99	N
6	1181	95,68	N
7	1226	93,52	N
8	1502	60,74	N
9	1910	99,99	N
10	1920	99,8	N
11	2579	99,99	N
12	2624	99,59	N
13	2630	82,21	N
14	2844	99,99	N
15	3059	99,97	N
16	3095	99,98	N
17	3259	93,32	N
18	3260	99,75	N
19	3267	97,6	N
20	3272	99,99	N
21	3279	99,8	N
22	3285	99,99	N
23	3364	99,95	N
24	3550	99,94	N
25	3560	99,99	N
26	3597	99,99	N
27	4144	99,08	N
28	4971	99,96	N
29	4996	99,84	N
30	4999	98,19	N
31	5009	99,99	N
32	5063	99,99	N
33	5201	99,96	N
34	5213	99,95	N
35	5219	99,84	N
36	5221	97,33	N
37	5223	99,39	N
38	5241	99,99	N
39	5338	98,47	N
40	5343	99,11	N



---

NÚMERO	MOLÉCULA	PROBABILIDAD (%)	CLASIFICACIÓN
41	5355	67,41	N
42	5908	79,78	N
43	6188	92,8	N
44	6218	88,32	N
45	6231	99,99	N
46	6254	99,98	N
47	6265	98,46	N
48	6798	98,39	N
49	6804	99,9	N
50	6814	99,97	N
51	6819	99,15	N
52	6829	96,4	N
53	6845	74,73	N
54	7031	76,73	N
55	7034	99,67	N
56	7047	99,31	N
57	7058	99,99	N
58	7064	99,9	N
59	7069	99,96	N
60	7071	99,88	N
61	7072	97,85	N
62	7084	12,02	A
63	7092	75	N
64	7966	99,99	N
65	7970	99,98	N
66	7987	94,8	N
67	8001	98,77	N
68	8005	29,2	A
69	8014	99,98	N
70	8015	97,29	N
71	8016	98,84	N
72	8022	75,49	N
73	8024	99,99	N
74	8160	99,9	N
75	8173	71,29	N
76	8194	99,88	N
77	8196	99,99	N
78	8451	99,99	N
79	8482	99,83	N
80	8487	91,89	N

NÚMERO	MOLÉCULA	PROBABILIDAD (%)	CLASIFICACIÓN
81	8494	99,99	N
82	8505	99,97	N
83	8875	27,39	A
84	9125	98,07	N
85	9197	44,87	A
86	9206	99,76	N
87	9219	99,99	N
88	9231	79,26	N
89	9243	99,99	N
90	9637	39,24	A
91	9657	99,97	N
92	9669	12,83	A
93	9784	99,58	N
94	9811	99,87	N
95	10324	99,98	N
96	10389	99,96	N
97	10409	99,89	N
98	10423	99,96	N

**Anexo 6. Resultados de las redes neuronales en SPSS del grupo activo**

NÚMERO	MOLÉCULA	CLASIFICACIÓN	PROBABILIDAD (%)
1	1,3,5-TRIHIDROXI-2-(2',2'-DIMETIL-4'-ISOPROPENIL)CICLOPENTANILXANTHONE	A	0,92
2	1,7-BIS-(4-HIDROXIFENIL)-2,4,6-HEPTATRIENONE	A	0,61
3	3'(3,4-DIHIDROXIFENIL)PROPANOICACID	A	0,96
4	3'(3-METIL-2-BUTENIL)4'-O-β-D-GLUCOPYRANOSYL-4,2'-DIHIDROXICHALCONE	A	1
5	3,4-DIHIDROXI-5-PRENYLCINNAMIC ACID	A	0,99
6	3,4-DIHIDROXIMANDELIC ACID	A	0,99
7	3-TERT-BUTYL-4-HIDROXIANISOLE	A	0,54
8	4',5,7-TRIHIDROXI-3'-METHOXYFLAVONE	A	0,98
9	6-PROPYL-2-THIOURACIL	N	0,04
10	7-PHLOROECKOL	A	1
11	α-MANGOSTIN	A	1
12	(+)-α-TOCOPHEROL	N	0,25
13	L, L-TRANSTERINOIC ACID	A	0,99
14	ARJUNOLIC ACID	A	0,92
15	ASPALATHIN	A	0,98
16	ASTAXANTHIN	A	1
17	BELLIDIN	N	0,36
18	BETACAROTENE	A	0,55
19	CAFFEIC ACID	A	1
20	CARLINSIDE	A	0,99
21	CARNOSINE	A	0,97
22	COUMESTROL	A	0,79
23	CROCIN-1	A	1
24	CYANIDIN CATION	A	0,84
25	D-ALLOPYRANOSE	A	0,98
26	DAVIDIGENIN	N	0,01
27	DIANDRAFLAVONE	A	0,99
28	DIHIDROLIPOIC ACID	A	1
29	DIOSMETIN	A	0,93
30	EBSELEN	A	0,98
31	(-)-EPICATECHIN	A	0,81
32	(-)-EPIGALLOCATECHIN	A	0,96
33	ERGOTHIONEINE	A	0,98
34	ERYTHRITOL	A	0,93
35	ESCULETIN	A	0,83
36	FERULIC ACID	A	0,85
37	FISETIN	A	0,85
38	GALLIC ACID	A	1
39	GARCINIAXANTHONE F	A	0,95
40	GLUTATHIONE	A	1

NÚMERO	MOLÉCULA	CLASIFICACIÓN	PROBABILIDAD (%)
41	HYDROXYTYROSOL	A	1
42	HYPOLAETIN	A	1
43	ISOFERULIC ACID	A	0,86
44	ISOSCUTELLAREIN GLYCOSIDE	A	0,99
45	KAEMPFEROL 3-O- $\alpha$ -L-[6'''-p-coumaroyl- $\beta$ -D-GLUCOPYRANOSYL-(1->2)-RHAMNOPYRANOSIDE]	A	0,95
46	LACTOBIONIC ACID	A	0,99
47	LUCIDUMOSIDE C	A	1
48	LYCOPENE	A	1
49	MADECASSOSIDE	A	0,89
50	MANGIFERIN	A	0,50
51	MANNIFLAVANONE	A	1
52	METHYLSELENIC ACID	A	1
53	METHYL VANILLATE	A	0,93
54	MORIN	A	0,92
55	MYRICITRIN-5-METHYL ETHER	A	0,99
56	N-ACETILCISTEINATE	A	0,79
57	N-ACETYLLCISTEINE	A	0,93
58	N-ACETYLNEURAMINIC ACID	A	1
59	NORDIHYDROGUAIARETIC ACID	A	0,96
60	NORWOGONIN	A	0,89
61	ORIENTIN	A	1
62	ORYZAFURAN	A	1
63	PINOBANKSIN	A	0,82
64	PROANTHOCYANIDIN A2	A	0,73
65	PROCYANIDINB2	A	0,91
66	PTEROSTILBENE	A	1
67	PUTRESCINE	A	0,80
68	QUADRANGULARINA	A	1
69	QUERCETIN	A	1
70	ROBUSTAFLAVONE	A	1
71	ROSMARINIC ACID	A	0,97
72	RUTIN	N	0,45
73	SAPPANCHALCONE	A	0,98
74	SELENONEINE	A	1
75	SINAPINE	A	1
76	SOPHORAFLAVANONE G	A	0,97
77	TAMARIXETIN	A	0,99
78	TAURINE	A	0,68
79	TERNSTROSIDE A	A	0,99
80	THIOPROLINE	N	0,42

NÚMERO	MOLÉCULA	CLASIFICACIÓN	PROBABILIDAD (%)
81	THIOUREA	A	0,99
82	TRANS-2-COUMARIC ACID	A	0,82
83	TRANSASTRINGIN	A	1
84	TRANSPICEID	A	1
85	TROLOX	A	0,92
86	UBIQUINONE 9	A	0,96
87	VACCIHEIN A	A	0,99
88	VANILLIN	A	0,59
89	Y-TOCOTRIENOL	A	0,79
90	ZEAXHANTIN	A	0,96
91	ZINGERONE	N	0,46

**Anexo 7. Resultados de las redes neuronales en SPSS del grupo no activo**

NÚMERO	MOLÉCULA	CLASIFICACIÓN	PROBABILIDAD (%)
1	6	N	0,91
2	21	N	0,93
3	28	N	1,00
4	50	N	1
5	73	N	0,98
6	1181	N	0,94
7	1226	N	0,89
8	1502	N	0,95
9	1910	N	0,99
10	1920	N	1
11	2579	N	1
12	2624	N	0,89
13	2630	N	0,81
14	2844	N	1,00
15	3059	N	0,97
16	3095	N	1
17	3259	N	0,88
18	3260	N	0,99
19	3267	N	1
20	3272	N	0,98
21	3279	N	0,99
22	3285	N	0,87
23	3364	N	1
24	3550	N	1,00
25	3560	N	0,98
26	3597	N	1,00
27	4144	N	0,97
28	4971	N	1
29	4996	N	0,99
30	4999	N	0,98
31	5009	N	0,99
32	5063	N	0,93
33	5201	N	0,98
34	5213	N	0,90
35	5219	N	0,98
36	5221	N	0,93
37	5223	N	0,80
38	5241	N	1
39	5338	N	0,97
40	5343	N	1

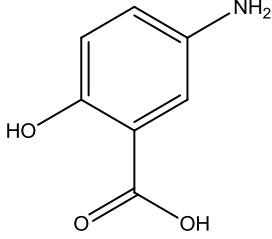
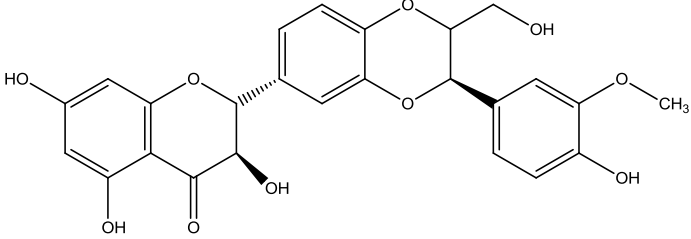
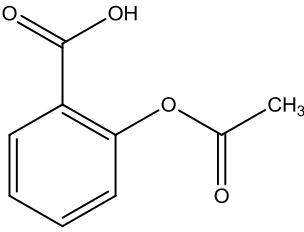
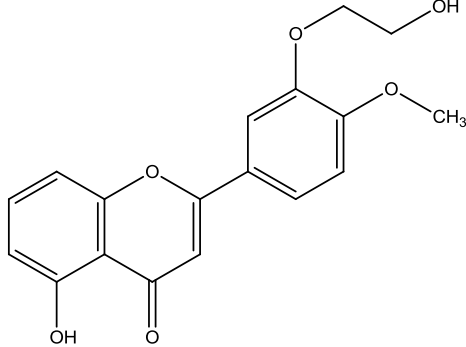
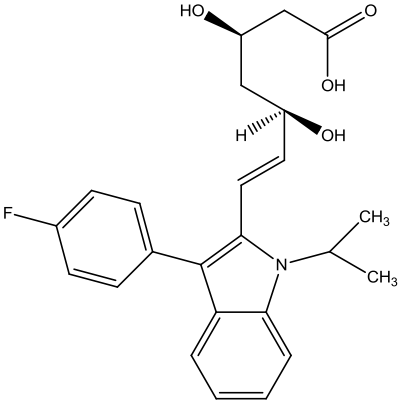
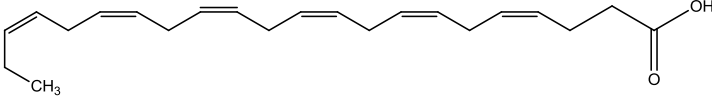
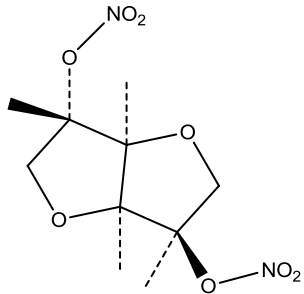
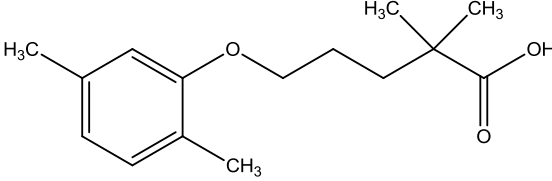
---

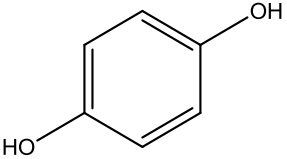
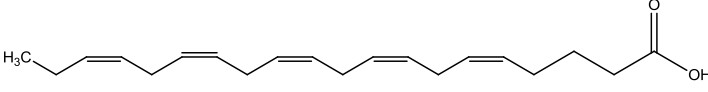
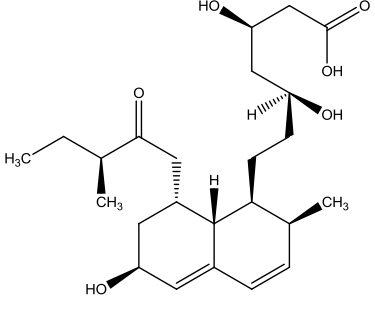
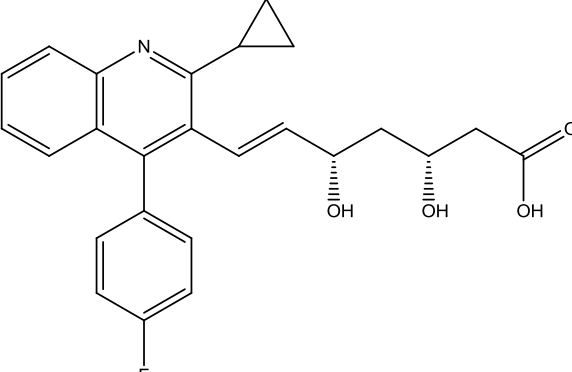
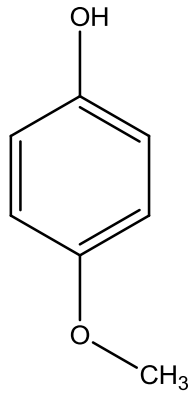
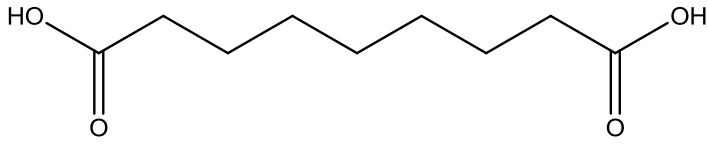
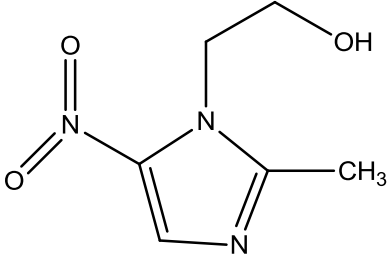
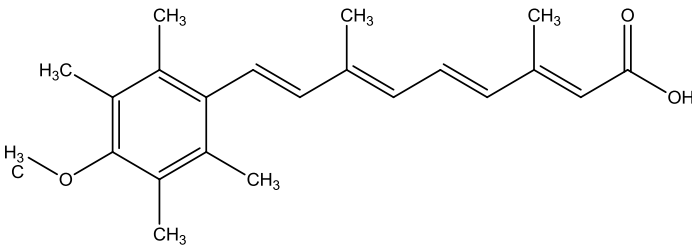
NÚMERO	MOLÉCULA	CLASIFICACIÓN	PROBABILIDAD (%)
41	5355	N	0,826
42	5908	N	1
43	6188	N	1
44	6218	N	0,95
45	6231	N	0,98
46	6254	N	1,00
47	6265	N	0,91
48	6798	N	1
49	6804	N	1
50	6814	N	0,97
51	6819	N	0,89
52	6829	N	1
53	6845	N	1
54	7031	N	0,52
55	7034	N	0,90
56	7047	N	0,98
57	7058	N	1,00
58	7064	N	0,99
59	7069	N	1
60	7071	N	1,00
61	7072	N	0,98
62	7084	N	1
63	7092	N	1
64	7966	N	0,99
65	7970	N	0,98
66	7987	N	0,99
67	8001	N	1
68	8005	N	0,93
69	8014	N	1
70	8015	N	1
71	8016	N	1
72	8022	N	0,91
73	8024	N	0,98
74	8160	N	0,96
75	8173	N	1
76	8194	N	1
77	8196	N	1,00
78	8451	N	0,97
79	8482	N	0,93
80	8487	N	0,96

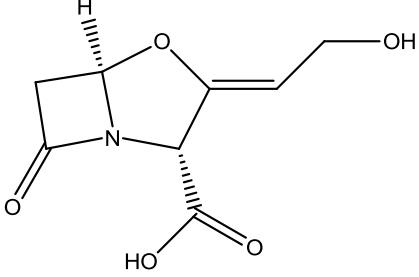
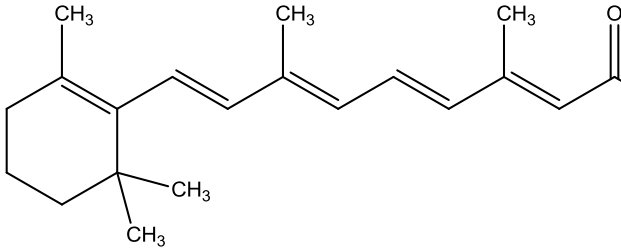
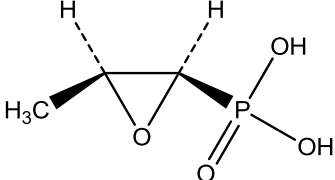
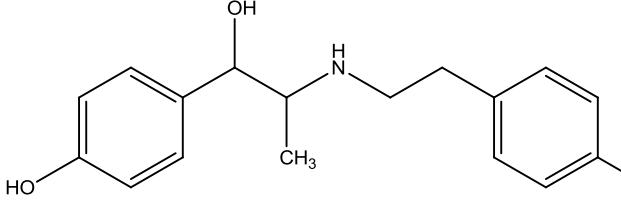
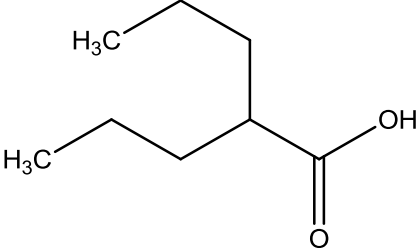
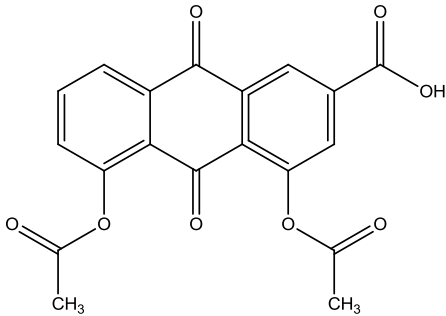
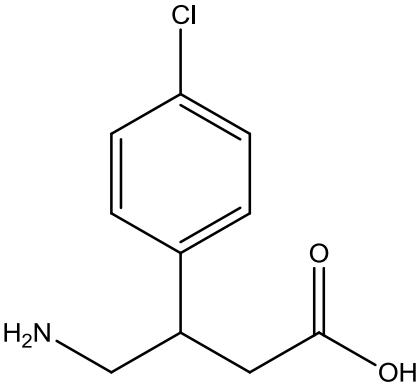
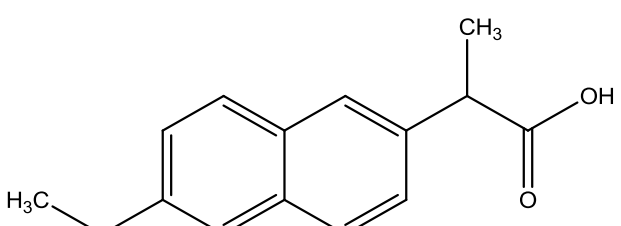
NÚMERO	MOLÉCULA	CLASIFICACIÓN	PROBABILIDAD (%)
81	8494	N	0,99
82	8505	N	0,96
83	8875	N	0,96
84	9125	N	0,98
85	9197	N	0,75
86	9206	N	0,98
87	9219	N	1
88	9231	N	0,87
89	9243	N	1
90	9637	N	0,85
91	9657	N	1
92	9669	A	0,40
93	9784	N	0,99
94	9811	N	1
95	10324	N	1
96	10389	N	0,99
97	10409	N	0,98
98	10423	N	0,98

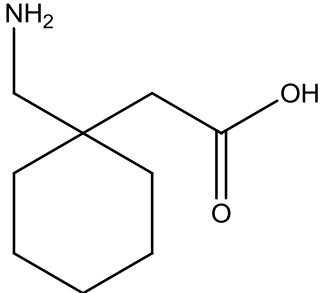
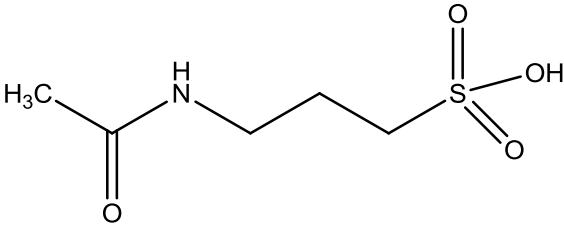
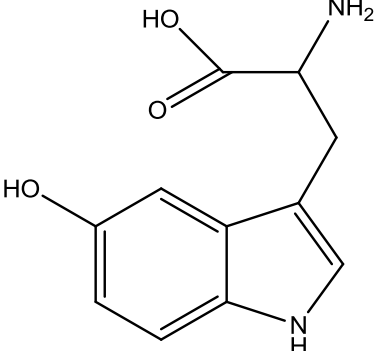
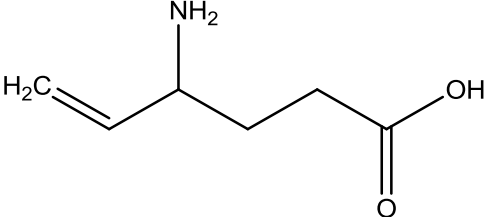
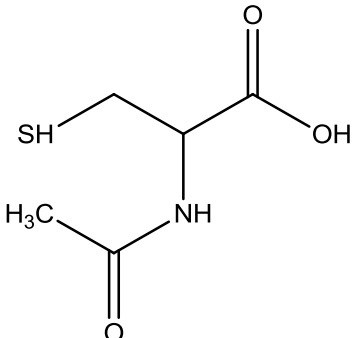
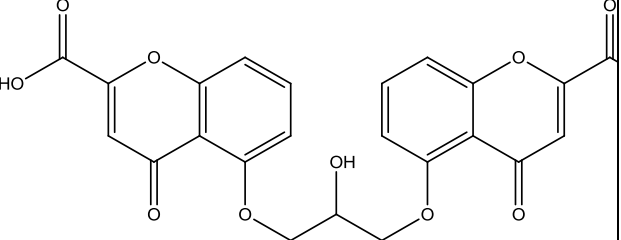
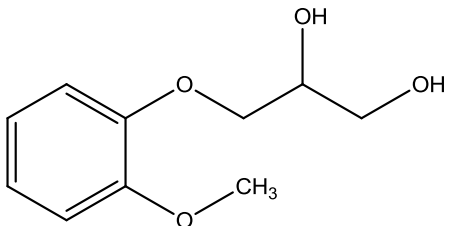
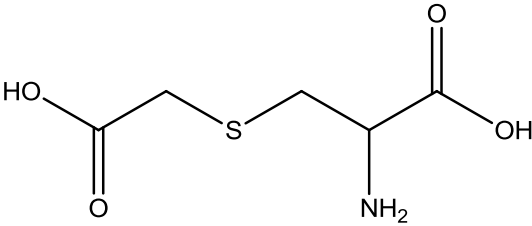


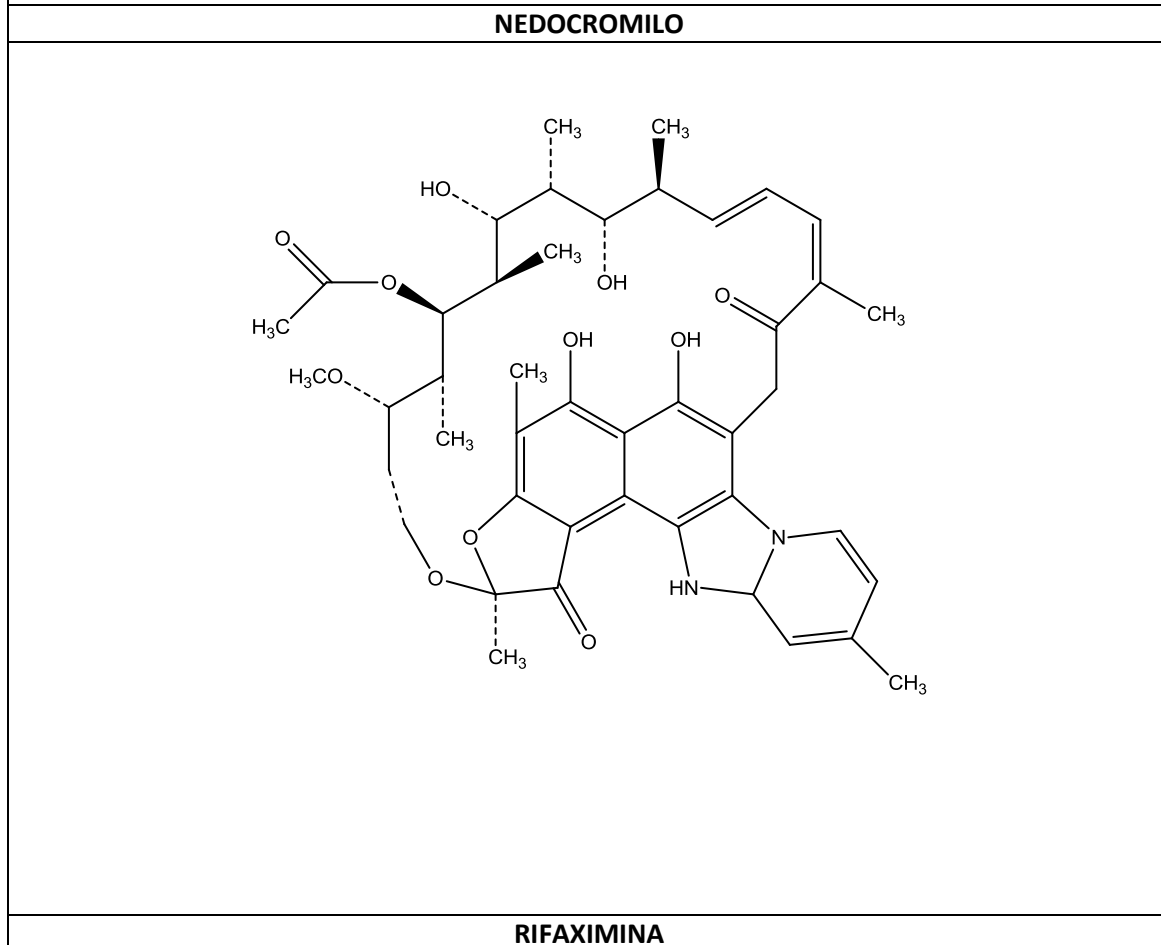
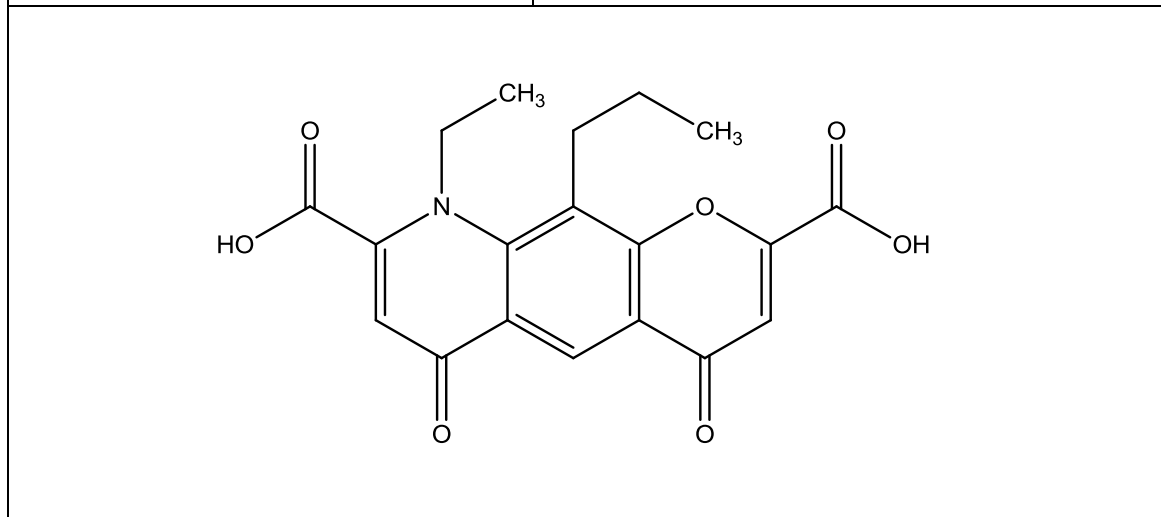
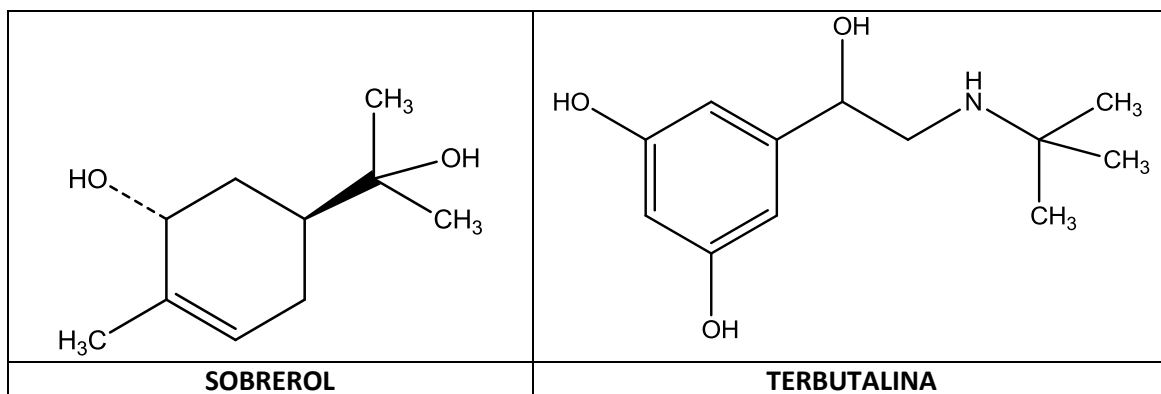
**Anexo 8. Estructuras químicas restantes de las moléculas clasificadas como antioxidantes por los tres modelos**

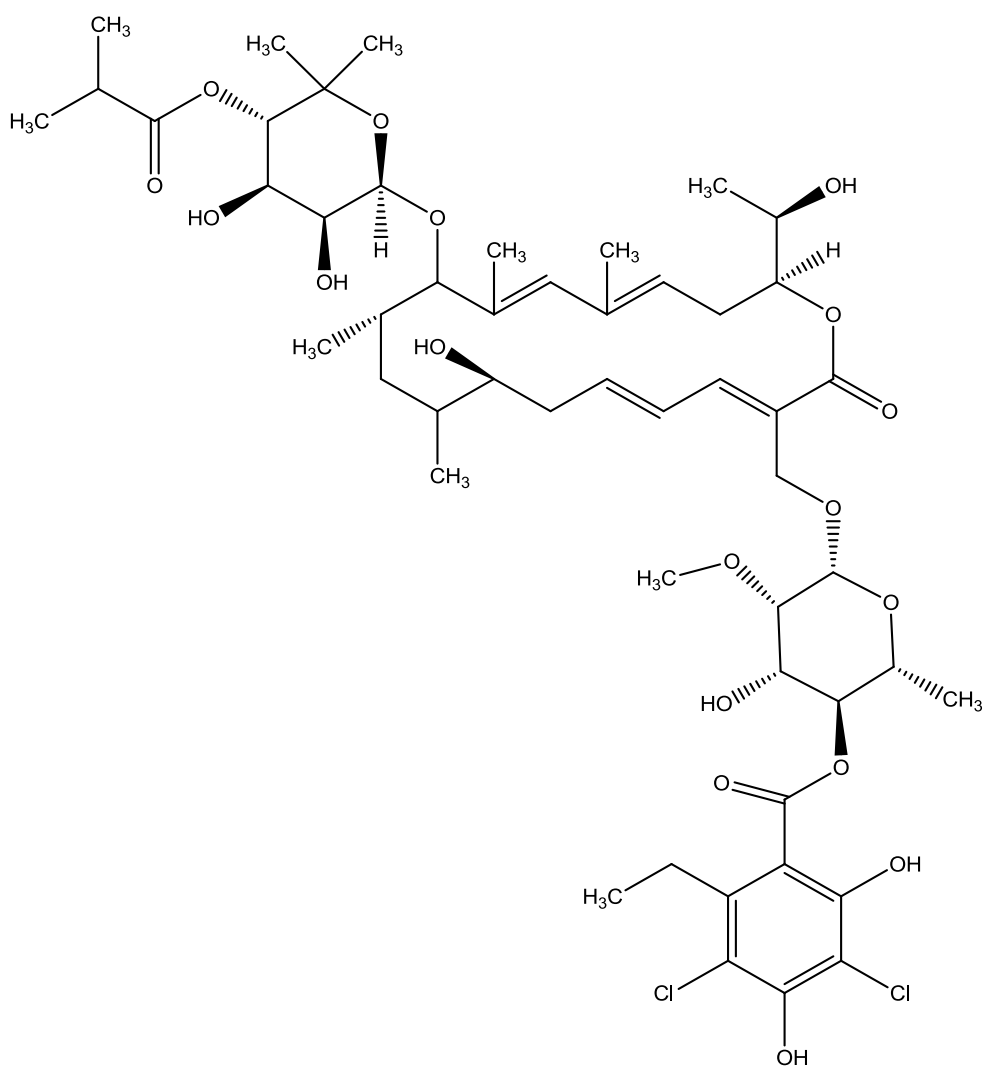
	
<p><b>MESALAZINA</b></p>	<p><b>SILIBININA</b></p>
	
<p><b>ÁCIDO ACETILSALICÍLICO</b></p>	<p><b>DIOSMINA</b></p>
	
<p><b>FLUVASTATINA</b></p>	<p><b>DOCONEXENTO</b></p>
	
<p><b>ISOSORBIDA DINITRATO</b></p>	<p><b>GEMFIBROZILO</b></p>

	
<p><b>HIDROQUINONA</b></p>	<p><b>ICOSAPENTO</b></p>
	
<p><b>PRAVASTATINA</b></p>	<p><b>PITAVASTATINA</b></p>
	
<p><b>MEQUINOL</b></p>	<p><b>ÁCIDO AZELAICO</b></p>
	
<p><b>METRONIDAZOL</b></p>	<p><b>ACITRETINA</b></p>

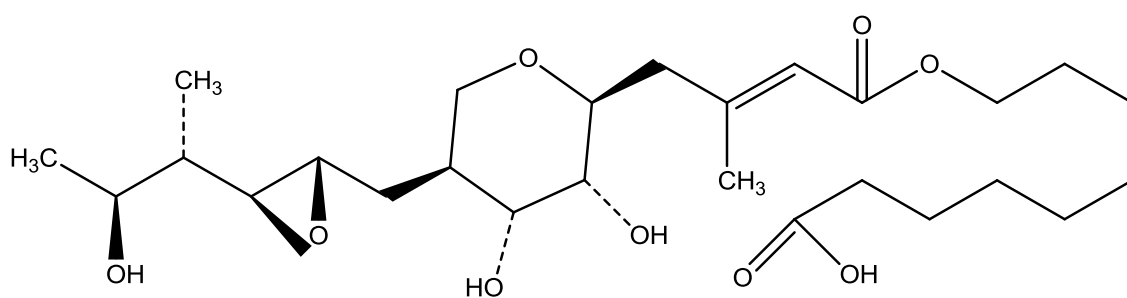
	
<p><b>ÁCIDO CLAVULÁNICO</b></p>	<p><b>TRETINOINA</b></p>
	
<p><b>FOSFOMICINA</b></p>	<p><b>RITODRINA</b></p>
	
<p><b>ÁCIDO VALPROICO</b></p>	<p><b>DIACEREÍNA</b></p>
	
<p><b>BACLOFENO</b></p>	<p><b>NAPROXENO</b></p>

	
<b>GABAPENTINA</b>	<b>ACAMPROSATO</b>
	
<b>OXITRIPTAN</b>	<b>VIGABATRINA</b>
	
<b>ACETILCISTEÍNA</b>	<b>ÁCIDO CROMOGLÍCIDICO</b>
	
<b>GUAIFENESINA</b>	<b>CARBOCISTEÍNA</b>

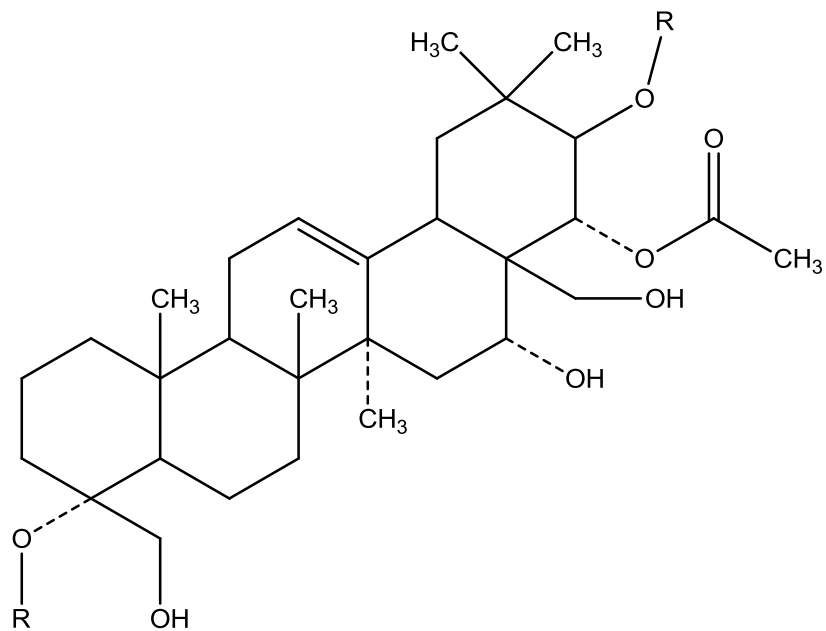




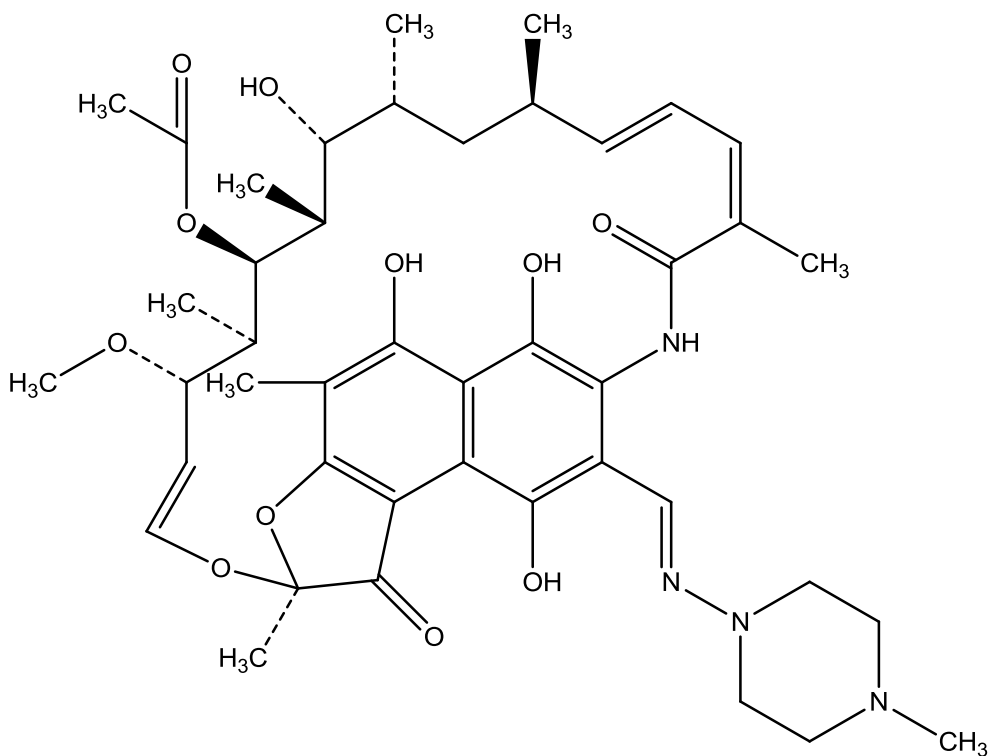
**FIDAXOMICINA**



**MUPIROCINA**



**ESCINA**



**RIFAMPICINA**







