

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA**

**ANÁLISIS TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE LA INTERACCIÓN ENTRE
LA PROTEÍNA RICINA CON DERIVADOS DE
GRUPOS FLAVONOIDES Y PROANTOCIANIDINAS**

POR:

MC. MAYRA CRISTINA MARTÍNEZ CENICEROS

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

AGOSTO DE 2021

Chihuahua, Chih., a 25 de junio de 2021.

Oficio: 72/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P r e s e n t e:

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **"Análisis teórico-experimental de la interacción entre la proteína ricina con derivados de grupos flavonoides y proantocianidas"**, presentada por la **M.C. Mayra Cristina Martínez Ceniceros**, alumna del programa de Doctorado en Ciencias.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A t e n t a m e n t e
"Por la ciencia para bien del hombre"



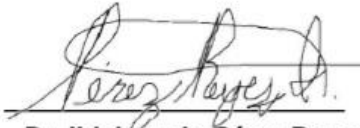
Dr. León Raúl Hernández Ochoa
Co-director de tesis



Dr. David Chávez Flores
Asesor de tesis



Dra. Fabiola Sandoval Salas
Asesora de tesis



Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



Dra. Hilda Amelia Piñón Castillo
Asesora de tesis



Dr. Gerardo Zaragoza Galán
Asesor de tesis



Dra. Luz María Rodríguez Valdéz
Directora de tesis



***El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por permitirme culminar satisfactoriamente una etapa más en mi formación profesional, guiándome con sabiduría y fortaleza para lograr mis objetivos.

Gracias a mi familia quienes me han apoyado, comprendido y alentado a perseguir mis sueños.

A mis padres, a quien debo mis principios, valores, perseverancia y el coraje necesario que me alienta a realizar investigación científica.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la FCQ-UACH por la beca y el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

Quiero agradecer a mi Directora de tesis la Dra. Luz María Rodríguez Valdez y a mi Co-Director el Dr. León Raúl Hernández Ochoa por compartir sus conocimientos, experiencia y profesionalismo que me han ayudado a formarme como investigadora y concluir este gran proyecto de investigación, gracias por brindarme la oportunidad de trabajar con ustedes.

Gracias a la Dra. Linda Landeros, Dra. Nora Sánchez, Dra. Isuí García, a Sol Hernández Muñoz y a M.C Daniel Estrada quienes estuvieron conmigo en estos cuatro años y me ofrecieron su ayuda y amistad.

Al Dr. David Chávez, Dr. Néstor Gutiérrez y a la Dra. Vicky Nevarez quienes siempre me auxiliaron en sus laboratorios y a mis revisores (Dra. Hilda Piñón, Dra. Fabiola Sandoval, Dr. David Chávez y Dr. Gerardo Zaragoza) por tomarse el tiempo y dedicación en la revisión de este trabajo, Así como también agradezco a mis compañeros de generación y profesores con quienes comparto grandes anécdotas.

MC. Mayra Cristina Martínez Cenicerós

“The only way to do great work is to love what you do” -Steve Jobs



ÍNDICE

RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 ASPECTOS GENERALES	2
2.2 RICINA	2
2.3 COMPUESTOS FENÓLICOS.....	4
2.3.1 FLAVONOIDES.....	4
2.3.1.1 Flavonoles y flavanoles	7
2.3.1.2 Proantocianidinas	8
2.4 INTERACCIÓN PROTEÍNA-POLIFENOL.....	9
2.5 FUNDAMENTO EXPERIMENTAL	10
2.5.1 ELECTROFORESIS.....	11
2.5.2 ESPECTROSCOPIA UV-VIS	11
2.5.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	12
2.6 QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	13
2.6.1 MECÁNICA CUÁNTICA.....	14
2.6.2 ECUACIÓN DE SCHRÖDINGER	15
2.6.3 TEORÍA FUNCIONAL DE LA DENSIDAD (DFT)	15
2.6.3.1 Funcionales	15
2.6.3.2 Conjuntos base.....	16
2.6.4 PROPIEDADES	16
2.6.4.1 Optimización de geometrías.....	16
2.6.4.2 Frecuencias Moleculares.....	17



2.6.4.3 Orbitales Moleculares de frontera e índices de reactividad química teórica	17
2.6.5 ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	19
2.6.6 DESCRIPTOR DE TRANSFERENCIA DE CARGA	19
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVO GENERAL	20
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	21
6.1.1 OBTENCIÓN DE LAS SEMILLAS DE HIGUERILLA	22
6.1.2 PREPARACIÓN DE MUESTRA	22
6.1.3 OBTENCIÓN DE PASTA DE HIGUERILLA	23
6.1.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	23
6.1.5 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	23
6.1.6 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RICINA	24
6.1.7 ANÁLISIS CUALITATIVO DE PROTEÍNAS	24
6.1.8 INTERACCIÓN RICINA-QUERCETINA.....	25
6.1.9 ELECTROFORESIS SDS-PAGE	25
6.1.10 ANÁLISIS POR UV-VIS.....	25
6.1.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
6.1.12 ANÁLISIS POR HPLC	26
6.2 METODOLOGÍA COMPUTACIONAL.....	26
6.2.1 EQUIPO DE CÓMPUTO	26
6.2.2 PROGRAMAS COMPUTACIONALES PARA CÁLCULOS TEÓRICOS.....	27
6.2.3 MOLÉCULAS PARA ANÁLISIS.....	27
6.2.4 ESTRATEGIA COMPUTACIONAL.....	28
6.2.5 CÁLCULOS DE DOCKING MOLECULAR.....	29



VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
7.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES	31
7.1.1 OBTENCIÓN DEL RESIDUO SÓLIDO, EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	31
7.1.2 ANÁLISIS CUALITATIVO DE PROTEÍNAS TOTALES	32
7.1.3 ANÁLISIS CUALITATIVO POR ELECTROFORESIS DE LA PROTEÍNA RICINA PURIFICADA	32
7.1.4 INTERACCIONES ENTRE LA PROTEÍNA RICINA Y QUERCETINA	33
7.1.5 ANÁLISIS DE INTERACCIONES POR ELECTROFORESIS.....	34
7.1.6 ANÁLISIS DE INTERACCIONES POR UV-VIS.....	35
7.1.7 ANÁLISIS DE INTERACCIONES POR HPLC	37
7.2 RESULTADOS TEÓRICOS.....	40
7.2.1 CÁLCULOS QUÍMICO-CUÁNTICOS	40
7.2.2 REACTIVIDAD QUÍMICA GLOBAL	43
7.2.3 POTENCIAL ELECTROSTÁTICO MOLECULAR (MEP).....	44
7.2.4 DENSIDAD ELECTRÓNICA DE LOS ORBITALES MOLECULARES DE FRONTERA (HOMO Y LUMO)	47
7.2.5 ANÁLISIS DE DOCKING MOLECULAR	49
7.2.6 AJUSTE Y ALINEACIÓN DESPUÉS DE LA INTERACCIÓN.....	54
7.2.7 TRANSFERENCIA DE CARGA (ΔN).....	57
VIII. CONCLUSIONES	60
IX.BIBLIOGRAFÍA	62
X.ANEXOS	71
ANEXO 1. CURVA DE CALIBRACIÓN BSA	71
ANEXO 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO SOBRENADANTE	72
ANEXO 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PRECIPITADO.....	74
ANEXO 4. MUESTRAS HPLC	76



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Descriptores de reactividad global y local derivados de los métodos de funcionales de la densidad (DFT).	18
TABLA 2. Parámetros geométricos para Q y EGCG calculados en fase solvente (agua) usando el modelo de solvatación IEFPCM, y los datos de difracción de rayos X reportados para los mismos compuestos	42
TABLA 3. Parámetros de reactividad química y energía electrónica total de quercetina (Q) y de epigallocatequina galato (EGCG), calculados con B3LYP/6-31G(d,p) en fase solvente. Todos los valores se muestran en eV.....	43
TABLA 4. Parámetros de reactividad química y energía electrónica total de procianidina B2 (PAB2) y de procianidina C1(PAC1) calculados con B3LYP/6-31+G(d,p) en fase solvente. Todos los valores se muestran en eV	43
TABLA 5. Análisis de la interacción molecular entre la proteína ricina (cadenas A y B) con la quercetina (Q) y epigallocatequina galato (EGCG).....	53
TABLA 6. Análisis de la interacción molecular entre la proteína ricina (cadenas A y B) con la procianidina B2 (PAB2) y procianidina C1 (PAC1).....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura de la ricina. La cadena A está a la derecha y la cadena B a la izquierda. La línea gruesa en la parte inferior representa el puente disulfuro que une ambas cadenas (Deus et al., 2011).....	3
FIGURA 2. Principales compuestos fenólicos sin los grupos hidroxilo constituyentes.....	5
FIGURA 3. Clasificación de flavonoides.....	6
FIGURA 4. Estructura principal del grupo flavonoide.....	6
FIGURA 5. Enlace de tipo A y B presente en la estructura de las proantocianidinas	8
FIGURA 6. Representación esquemática de la interacción y precipitación polifenol-proteína. La "respuesta astringente de polifenoles" según Jöbstl, O'Connell, Fairclough, y Williamson (2004)	10
FIGURA 7. Representación esquemática de los componentes del Espectrofotómetro	12
FIGURA 8. Componentes básicos de un instrumento analítico (Hernández y Pérez, 2002).	13
FIGURA 9. Esquema del acoplamiento molecular	19
FIGURA 10. Diagrama general de la parte experimental en este estudio.	21
FIGURA 11. Semillas de higuera fenotipo 2.	22
FIGURA 12. Cartucho metálico con semilla molida.	22
FIGURA 13 . Grupos flavonoides: A) quercetina, B) epigallocatequina galato,C) procianidina B2 y D) procianidina C1.	27
FIGURA 14. Estructura 3D de la proteína ricina extraída del Protein Data Bank (PDB:2AAI).	28
FIGURA 15. Diagrama general de la parte teórica en este estudio	30
FIGURA 16. Obtención del residuo sólido, extracción y cuantificación de proteínas totales	31

FIGURA 17. Calculo de PM de la proteína ricina y gel de electroforesis al 15%. Primer carril muestra marcador de peso molecular, carriles 1, 2, 3 muestran proteínas totales en el extracto de higuierilla. La banda entre 50 y 75 kDa muestran las bandas correspondientes a la proteína ricina.	32
FIGURA 18. Gel de electroforesis con una concentración de 15% de acrilamida, en los carriles se muestra primero el marcador seguido en rojo se muestran: 1) muestra eluida con buffer TRIS-HCl 10 mM, 2) muestra eluida con galactosa 0.28mM ,3) muestra eluida con galactosa 0.56mM.....	33
FIGURA 19. Concentraciones de la interacción entre la proteína ricina y quercetina.	34
FIGURA 20. Gel de electroforesis con una concentración de 15% de acrilamida, en los carriles se observa primero el marcador seguido por la proteína ricina purificada en rojo se muestran las ocho concentraciones: 1) 3.8 µg/mL , 2) 7.4 µg/mL,3) 10.71 µg/mL,4) 15.2 µg/mL,5) 40 µg/mL,6) 50 µg/mL,7)70 µg/mL,8)90 µg/mL	35
FIGURA 21. Absorbancias en el sobrenadante de la interacción proteína-quercetina a 370 nm, columnas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (Tukey; $\alpha = 0.05$).....	36
FIGURA 22. Absorbancias en el precipitado de la interacción proteína-quercetina a 370 nm, las columnas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (Tukey; $\alpha = 0.05$).....	36
FIGURA 23. Cromatogramas de los sobrenadantes de la interacción entre la proteína ricina con quercetina comparadas con el estándar de proteína purificada, a una longitud de onda de 277nm, tiempo recorrido al 5% para visualización, los picos aparecen en el mismo tiempo de retención en todas las concentraciones.	37
FIGURA 24. Cronogramas de los sobrenadantes de la interacción entre la proteína ricina con quercetina sin estándar comparadas entre sí a una longitud de onda de 277nm, tiempo recorrido de 5% para visualización,los picos aparecen en el mismo tiempo de retención en todas las concentraciones.	38

FIGURA 25. Comparación de los cromatogramas obtenidos para una concentración de 3.8 µg/mL. (línea en color negro) y ricina (línea en color azul), a una longitud de onda de 277 nm, el pico seleccionado se eligió para calcular el porcentaje de ricina existente.	39
FIGURA 26. Porcentaje obtenido al evaluar los cromatogramas seleccionados.....	39
FIGURA 27. Concentraciones filtradas después de 20 días de interacción	40
FIGURA 28. Geometrías optimizadas. A) quercetina y B) epigallocatequina galato, optimizadas con B3LYP/6-31G(d,p). C) procianidina B2 y D) procianidina C1, optimizadas con B3LYP/6-31+G(d,p).....	41
FIGURA 29. Mapeo del potencial electrostático molecular (MEP) de quercetina (Q), calculado con B3LYP/6-31G(d,p).....	45
FIGURA 30. Mapeo del potencial electrostático molecular (MEP) de epigallocatequina galato (EGCG), calculado con B3LYP/6-31G(d,p).	45
FIGURA 31. Mapeo del potencial electrostático molecular (MEP) de procianidina B2 (PAB2), calculado con B3LYP/6-31+G(d,p).	46
FIGURA 32. Mapeo del potencial electrostático molecular (MEP) de procianidina C1 (PAC1), calculado con B3LYP/6-31+G(d,p).....	46
FIGURA 33. Localización de los orbitales moleculares (A) HOMO y (B) LUMO de quercetina (Q), calculada con método B3LYP/ 6-31G(d,p).	47
FIGURA 34. Localización de los orbitales moleculares (A) HOMO y (B) LUMO de epigallocatequina galato (EGCG), calculado con metodología B3LYP/ 6-31G(d,p).	48
FIGURA 35. Localización de los orbitales moleculares (A) HOMO y (B) LUMO de procianidina B2 (PAB2), calculado con B3LYP/6-31+G(d,p).....	48
FIGURA 36. Localización de los orbitales moleculares (A) HOMO y (B) LUMO de procianidina C1 (PAC1), calculado con B3LYP/6-31+G(d,p).	49
FIGURA 37. Interacciones moleculares de A) quercetina (Q) y B) epigallocatequina galato (EGCG), ambos con el sitio activo de la cadena A de la proteína ricina.....	50

FIGURA 38. Interacciones moleculares de quercetina (Q) y epigallocatequina galato (EGCG) con los sitios activos de la cadena B de la proteína ricina. A) Q con B ₁ , B) Q con B ₂ , C) EGCG con B ₁ , Y D) EGCG con B ₂	50
FIGURA 39. Interacciones moleculares de C) procianidina B2 (PAB2) y D) procianidina C1(PAC1) ambos con el sitio activo de la cadena A de la proteína ricina.	51
FIGURA 40. Interacciones moleculares de proantocianidinas con los sitios activos de la cadena B de la proteína ricina. E) PAB2 con B ₁ , F) PAB2 con B ₂ , G) PAC1 con B ₁ y H) PAC1 con B ₂	52
FIGURA 41. Ajuste y alineación de los ligandos Q y EGCG antes (verde) y después (azul) de la interacción con las cadenas A y B de la proteína ricina, así como la diferencia de energía electrónica total.....	55
FIGURA 42. Ajuste y alineación de los ligandos PAB2 y PAC1 antes (verde) y después (azul) de la interacción con las cadenas A y B de la proteína ricina, así como la diferencia de energía electrónica total.....	56
FIGURA 43. Esquema de transferencia de carga (ΔN) entre la Quercetina y los sitios activos de A, B ₁ y B ₂ de la proteína ricina.....	58
FIGURA 44. Esquema de transferencia de carga (ΔN) entre la epigallocatequina galato y los sitios activos de A, B ₁ y B ₂ de la proteína ricina	58
FIGURA 45. Esquema de transferencia de carga (ΔN) entre la procianidina B2 y sitios activos de A, B ₁ y B ₂ de la proteína ricina.....	59
FIGURA 46. Esquema de transferencia de carga (ΔN) entre la y procianidina C1 y sitios activos de A, B ₁ y B ₂ de la proteína ricina.....	59



LISTA DE ABREVIATURAS

Θ	Ángulos
ΔN	Trasferencia de carga
ANOVA	Análisis de varianza
Å	Distancia
A	Sitio activo de la cadena A
B ₁	Sitio activo 1 de la cadena B
B ₂	Sitio activo 2 de la cadena B
°C	Grados centígrados
EA	Afinidad electrónica
EGCG	Epigallocatequina galato
G	Gramos
H	Hora
I	Potencial de ionización
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramos
L	Litros
M.p.m	Marcador de peso molecular
Min	Minutos
μ	Potencial químico
μ L	Microlitros
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
M	Molar
η	Dureza química
Nm	Nanómetros



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

P	Probabilidad
PM	Peso molecular
PAB2	Procianidina B2
PAC1	Procianidina C1
pH	Potencial hidrogeno
Q	Quercetina
%	Porcentaje
Rpm	Revoluciones por minuto
X	Electronegatividad
<i>et al.</i>	Y colaboradores por sus siglas en latín



RESUMEN

Debido a la gran demanda que existe actualmente por los biocombustibles, se ha optado por utilizar semillas alternativas al girasol, colza, soja y maíz. Una de esas alternativas es la semilla de higuera (*Ricinus communis*) que no compite con éstas en la industria alimentaria. Durante la extracción del aceite de higuera, se generan grandes cantidades de residuo sólido, el cual presenta un gran problema debido a su alta toxicidad. Estudios previos han confirmado la detoxificación de este residuo cuando se combina con compuestos polifenólicos. Sin embargo, tales estudios no mencionan las interacciones químicas involucradas en el proceso de detoxificación. En este sentido, tanto técnicas analíticas experimentales como la electroforesis, espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis), y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como estudios teóricos de acoplamiento molecular, son necesarios para predecir las interacciones y estabilidad de los complejos formados entre la proteína ricina y los compuestos derivados de grupos flavonoides como la quercetina, permitiendo el análisis del tipo de interacción, el sitio activo, las energías de enlace y las diferentes conformaciones en el proceso de detoxificación.

La presente tesis tiene como finalidad proveer los análisis necesarios para entender el tipo de interacciones moleculares generadas entre los compuestos fenólicos seleccionados con la proteína ricina, proporcionando información útil acerca de la interacción como posibles inhibidores de los sitios activos de esta proteína, utilizando cálculos de acoplamiento químico-cuántico y molecular, mapeos de potencial electrostático (MEP), Docking Molecular, ajuste y alineación antes y después de la interacción y parámetros de transferencia de carga de los grupos de flavonoides (quercetina, epigallocatequina galato, procianidina B2 y procianidina C1), así como análisis experimentales de la proteína ricina con el flavonol quercetina mediante electroforesis, UV-Vis y HPLC.

Palabras clave: *Ricina, quercetina, epigallocatequina galato, proantocianidinas, interacción, acoplamiento molecular.*



ABSTRACT

Due to the high demand for biofuels, it has been chosen to use alternative seeds to sunflower, rapeseed, soybean, and corn. One alternative is castor seed (*Ricinus communis*), which does not compete with these in the food industry. Large amounts of solid residue are generated during the extraction of castor oil, which presents a significant problem due to its high toxicity. Previous studies have confirmed the detoxification of this residue when it is combined with polyphenolic compounds. However, such studies do not mention the chemical interactions involved in the detoxification process. In this sense, both experimental, analytical techniques such as electrophoresis, ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), and high-performance liquid chromatography (HPLC), as well as theoretical molecular coupling studies, are necessary to predict interactions and stability of the complexes formed between the ricin protein and the compounds derived from flavonoid groups such as quercetin, allowing the analysis of the type of interaction, the active site, the binding energies and the different conformations in the detoxification process.

The purpose of this thesis is to provide the necessary analyzes to understand the type of molecular interactions generated between the selected phenolic compounds with the ricin protein, providing helpful information about the interaction as possible inhibitors of the active sites of this protein, using coupling calculations. Chemical-quantum and molecular, electrostatic potential mappings (MEP), Molecular Docking, adjustment, and alignment before and after the interaction and charge transfer parameters of the flavonoid groups (quercetin, epigallocatechin gallate, procyanidin B2, and procyanidin C1), as well as experimental analyzes of ricin protein with quercetin flavonol by electrophoresis, UV-Vis and HPLC.

Keywords: *Ricin, quercetin, epigallocatechin gallate, proanthocyanidins, interaction, Molecular Docking.*



I. INTRODUCCIÓN

La creciente importancia y el renovado interés por el eficiente manejo de recursos energéticos, ha desembocado en un crecimiento acelerado de la producción y utilización de biocombustibles (biodiesel) en muchas partes del mundo.

El Biodiesel, se obtiene a partir del procesamiento de aceites vegetales tanto usados y reciclados, como aceites obtenidos de semillas oleaginosas de cultivos energéticos como girasol, colza, soja y maíz; sin embargo, el uso de estas semillas puede competir con la industria alimentaria, es por esto que actualmente se utilizan semillas alternativas como las obtenidas de la planta de higuera (*Ricinus communis*). Esta planta también es llamada palma cristi, castor, higuera infernal, tártago, higuera y ricino. Es un arbusto silvestre que crece en la mayor parte de las regiones tropicales, sus semillas son venenosas, por lo cual no son consumidas directamente, sino que son prensadas y sometidas a extracción por solventes para obtener aceite y residuo sólido (Arango,1990).

El residuo sólido de ricino que queda después del proceso de extracción del aceite, representa aproximadamente la mitad del peso de la semilla (Robb, Laben, Walker y Herring,1974) y tiene un contenido total de proteínas de 34-36%. A pesar de su disponibilidad y alto contenido de proteínas, el residuo sólido no ha encontrado un lugar como suplemento de proteínas debido a su alta toxicidad, producida por una fitotóxina denominada ricina, la cual puede estar presente entre 1.5 y 2.4% del residuo sólido (Ambekar y Dole,1957;Voisin, Jansen y Gros,1982) , por lo cual es importante lograr su detoxificación no solo para evitar una intoxicación con esta proteína, sino también para utilizar el gran número de aminoácidos existentes en la torta de higuera y dar un valor agregado a este desecho en la industria agroalimentaria; ya que se sabe que existe un incremento significativo de la demanda global en productos de origen animal lo cual requiere de un suministro cada vez mayor de proteína en su dieta, siendo necesario revisar constantemente fuentes y sus alternativas para lograr solventar esta necesidad (FAO, 2002) .

II. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos generales

Debido al gran interés que se tiene en la detoxificación del residuo sólido generado en la extracción del aceite de higuierilla, estudios previos realizados en la Facultad de Ciencias Químicas por Amaya (2016) y Martínez (2014), lograron obtener una precipitación de la ricina con polifenoles obtenidos del orujo de uva y cáscara de nuez, logrando así la detoxificación del residuo sólido (torta) obtenido en la extracción de aceite. Lo cual fue comprobado al evaluar la toxicidad y alergenicidad en animales de experimentación (ratones). Los parámetros analizados durante el periodo de observación fueron: el aspecto físico, comportamiento y exámenes físicos; como resultado, los animales de experimentación no mostraron signos de afectación por las sustancias de prueba.

Existen antecedentes que demuestran una precipitación de la proteína ricina con polifenoles como Amaya (2016) y Martínez (2014), además Dyer *et al.* (2016) reportaron que existe la interacción de la proteína ricina con el flavonol epigallocatequina galato, sin embargo, aún no se ha reportado o identificado el grupo que puede interactuar selectivamente con los sitios activos de la proteína, así como el tipo de interacciones moleculares presentes.

2.2 Ricina

La ricina forma parte del grupo de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de tipo 2, que se caracterizan por presentar dos cadenas polipeptídicas: una capaz de inhibir la síntesis de proteínas y otra con propiedades de lectina, es decir, capaz de unirse a hidratos de carbono (Barbieri, Battelli y Stirpe, 1993; Girbes *et al.*, 1996; Van Damme *et al.*, 2001). La ricina es el principal representante de las RIPs de tipo 2 (Olsnes y Kozlov, 2001; Olsnes y Pihl, 1973) y está constituida por una cadena A de 267 aminoácidos y 30-32 kDa, unida por un puente disulfuro a una cadena B de 262 aminoácidos y 32-34 kDa (Figura 1). El puente disulfuro entre ambas cadenas se

establece mediante los restos de cisteína en la posición 259 de la RTA y 4 de la RTB (Rutenber *et al.*, 1991).

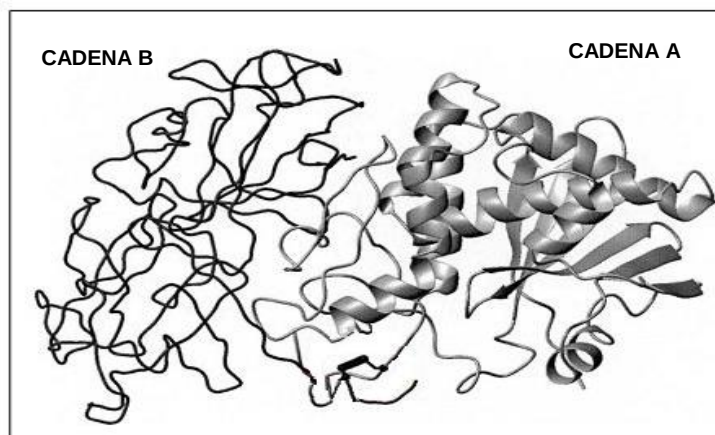


Figura 1. Estructura de la ricina. La cadena A está a la derecha y la cadena B a la izquierda. La línea gruesa en la parte inferior representa el puente disulfuro que une ambas cadenas (Deus *et al.*, 2011).

En el ser humano las moléculas de ricina entran en la célula uniéndose a la superficie celular por la cadena B, que ingresa por endocitosis en las vesículas de la membrana y se transporta al endosoma, algunas moléculas de ricina vuelven a la superficie celular por exocitosis o se degradan en los lisosomas, otras entran al complejo de Golgi y son transportadas hacia el retículo endoplásmico en el cual se separa la molécula en sus dos cadenas (A y B). La cadena A de la ricina es trasladada hacia el citosol, uniéndose a los ribosomas libres para realizar una acción enzimática en la cual se elimina una molécula de adenina del ácido nucleico ribosomal (rRNA), como consecuencia el ribosoma queda desactivado y se detiene la síntesis de proteínas. Una molécula de ricina puede eliminar tantos ribosomas hasta que logra matar a la célula (Stirpe y Battelli, 2006).

Los síntomas de intoxicación por ricina son dolor abdominal, diarrea a veces sanguinolenta y vómitos. Posteriormente se produce una severa deshidratación e

hipotensión, estos síntomas generalmente comienzan a las pocas horas de la ingestión.

La dosis letal de la ricina depende de la vía de exposición, 5 mg por kg de ricina vía intravenosa, 100 mg por vía oral o si se consumen de 5 a 20 semillas. Sin embargo, aunque se sabe que se puede impedir la absorción del tóxico por medio de un lavado gástrico en caso de ingesta, no existe un antídoto específico (Franz y Jaax,1997).

2.3 Compuestos fenólicos

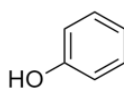
Los compuestos polifenólicos son los fitoquímicos más abundantes en frutas y verduras, actualmente se tienen identificadas 8000 estructuras fenólicas (Bravo,1998). Su interés principal radica en los beneficios que aportan a la salud como agentes reductores, más comúnmente denominados antioxidantes (Diplock,1998). Los compuestos polifenólicos se clasifican en subcategorías dependiendo de su esqueleto estructural, variando su naturaleza desde moléculas simples hasta compuestos de naturaleza polimérica. Se clasifican de acuerdo al número de átomos de carbono que presentan en su estructura (Rainey-Smith *et al.*, 2008, Figura 2).

2.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza, además proporcionan color y sabor a los alimentos. Los flavonoides se dividen en varias clases según su grado de oxidación en el heterociclo (Figura 3). La estructura del flavonoide consta de un esqueleto difenilpropano (C6-C3-C6) como se observa en la Figura 4, formado por dos anillos aromáticos (A y B) unidos a través de tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (C) (Rice-evans, Miller, Bolwell, Bramley y Pridham, 1995).

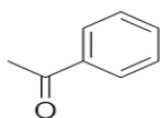
Fenoles simples

C_6



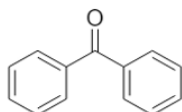
Acetofenonas

C_6-C_2



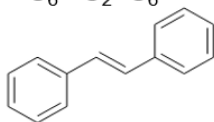
Benzofenonas

$C_6-C_1-C_6$



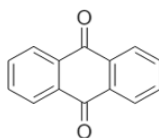
Estilbenos

$C_6-C_2-C_6$



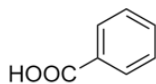
Androquinonas

$C_6-C_2-C_6$



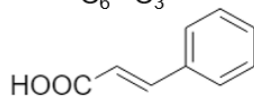
Ácidos fenólicos

C_6-C_1



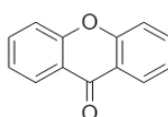
Ácidos hidroxicinámicos

C_6-C_3



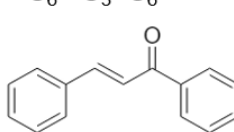
Xantonas

$C_6-C_1-C_6$



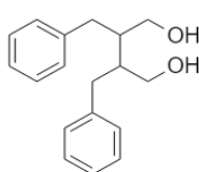
Chalconas

$C_6-C_3-C_6$



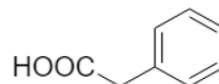
Lignanós

$C_6-C_3-C_3-C_6$



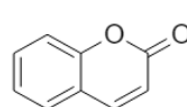
Ácido fenilacético

C_6-C_2



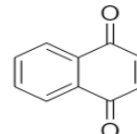
Cumarinas

C_6-C_3



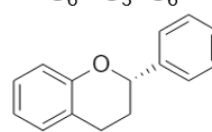
Naftoquinonas

C_6-C_4



Flavonoides

$C_6-C_3-C_6$



Taninos hidrolizables

$(C_6-C_1)_n$

Ligninas

$(C_6-C_3)_n$

Figura 2. Principales compuestos fenólicos sin los grupos hidroxilo constituyentes.

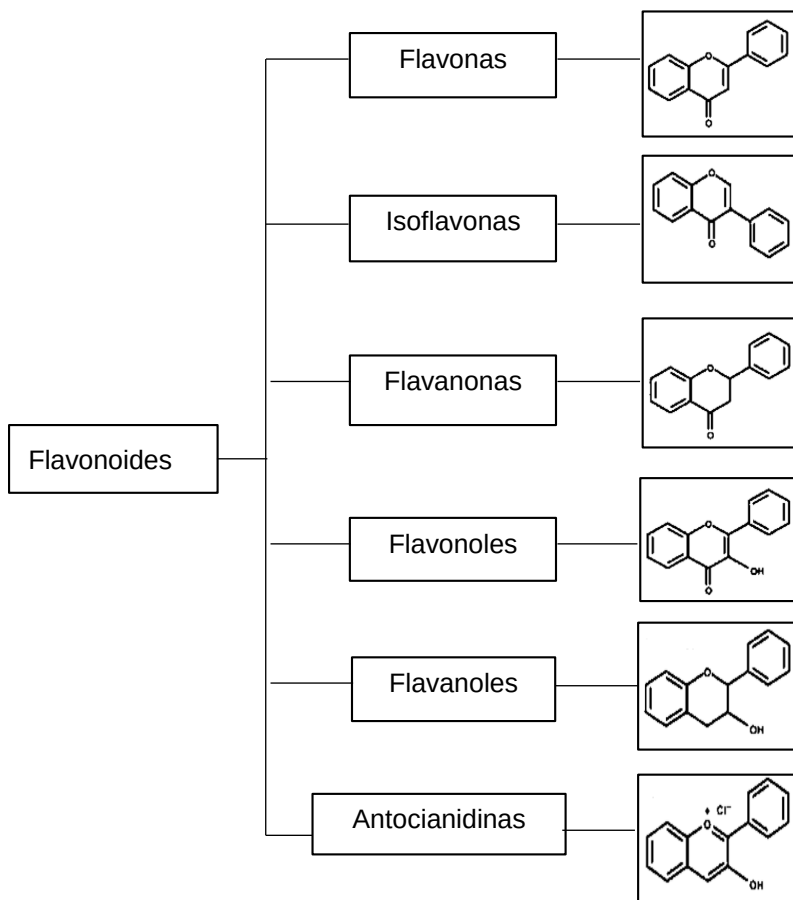


Figura 3. Clasificación de flavonoides.

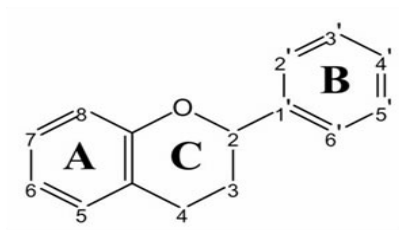


Figura 4. Estructura principal del grupo flavonoide.

2.3.1.1 Flavonoles y flavanoles

Los flavonoles son polifenoles que pertenecen a la clase de los flavonoides. Son moléculas incoloras que se acumulan principalmente en los tejidos externos y aéreos, como las hojas de frutas y vegetales, ya que su biosíntesis es estimulada por la luz. Químicamente, estas moléculas difieren de muchos otros flavonoides ya que tienen un doble enlace entre las posiciones 2 y 3 y un oxígeno (un grupo cetona) en la posición 4 del anillo C. Los flavonoles están representados principalmente por glucósidos de quercetina, kaempferol, isoramnetina y miricetina (Han, Shen, y Lou, 2007).

La quercetina es la principal representante de los flavonoles ya que además de ser un potente antioxidante, puede quelar los metales, eliminar radicales libres de oxígeno y prevenir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, además es un pigmento natural hidrosoluble que se encuentra presente generalmente como O-glicósidos en altas concentraciones en especial en la cebolla, manzana y la uva (Hollman *et al.*, 1997).

Los flavanoles también se llaman flavan-3-ols. Son flavonoides que utilizan el esqueleto 2-fenil-3,4-dihidro-2H-cromen-3-ol. Hay cinco moléculas básicas que forman los bloques de construcción para esta clase de flavonoides: catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina y galato de epigallocatequina (EGCG). Estos se llaman monómeros. Cuando dos de los cinco flavan-3-ols se juntan, se llaman dímeros; y cuando dos a cinco están vinculados, se llaman proantocianidinas (Ottaviani, Momma, Kuhnle, Keen y Schroeter, 2012).

La epigallocatequina galato (EGCG) es un flavanol que se encuentra principalmente en el té verde. El estudio principal de este flavanol se debe a que posee la capacidad de inhibir la acción de la proteína llamada Dyrk1A producida en exceso en el síndrome de Down desencadenando daños en la función cerebral (De la Torre-Robles *et al.*, 2014).

2.3.1.2 Proantocianidinas

Las proantocianidinas son estructuras compuestas por la unión de flavanoles, conocidos comúnmente como taninos condensados (Lea y Arnold, 1978).

Después de la lignina, representan la clase más abundante en la naturaleza (Gu *et al.*, 2004; Matthews *et al.*, 1997; Scalbert, Albrecht y Rabot, 2000). Existe una gran variedad de clases de proantocianidinas dependiendo de la unidad monomérica de la que esté compuesta, se diferencian estructuralmente de acuerdo al número de grupos hidroxilo, su posición en los anillos aromáticos y su configuración espacial en las unidades de flavanoles constituyentes, pueden presentar una estructura homogénea constituida únicamente por unidades de un flavanol o presentar una composición mixta con diferentes unidades monoméricas (Aron y Kennedy, 2008; Masiakowski y Wang, 2013).

Según el tipo de unión de las proantocianidinas pueden ser del tipo A y de tipo B, en los enlaces del tipo B las unidades de flavan-3-ol se encuentran unidas por el enlace carbono-carbono entre el carbono C4-C6 o C4-C8. Sin embargo, las proantocianidinas del tipo A presentan una unión adicional entre el carbono C2 y en el hidroxilo del carbono C7 (Huemmer y Schreier, 2008). Ver Figura 5.

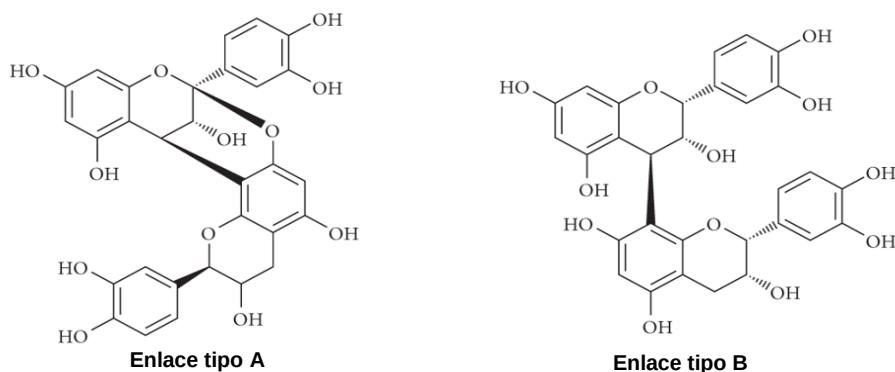


Figura 5. Enlace de tipo A y B presente en la estructura de las proantocianidinas.

Debido a la gran cantidad de grupos hidroxilos presentes en estos compuestos generan una amplia reactividad con otras moléculas, principalmente con las proteínas ya que se tiene una alta afinidad por ellas (Hagerman y Klucher, 1986; Santos-Buelga y Scalbert, 2000). La reactividad que se presenta esta dada por el grado de polimerización del compuesto, los enlaces interflavánicos y el patrón de hidroxilación (Lu y Foo, 2000).

2.4 Interacción proteína-polifenol

Actualmente se sabe que las proteínas pueden llegar a formar complejos con compuestos polifenólicos, que conducen a cambios en sus propiedades estructurales, funcionales y nutricionales. Teóricamente, las interacciones entre las proteínas y polifenoles se pueden dividir en tres etapas: (I) Moléculas de varios polifenoles pueden unirse con el péptido; (II) Si la cantidad de polifenol es lo suficientemente alta, dos moléculas de péptidos son capaces de formar recubrimientos de polifenoles que generan la precipitación; (III) Más polifenoles son añadidos y forman complejos largos. Se sabe que las agregaciones de polifenoles están involucradas en interacciones hidrofóbicas, por puentes de hidrógeno (Carvalho, Mateus, Plet, Pianet, Dufourc y De Freitas, 2006; Diniz *et al.*, 2008; Hagerman *et al.*, 1998; McManus *et al.*, 1985; Van-Buren y Robinson, 1969) fuerzas de Van der Waals y entrecruzamiento. Estas interacciones pueden ser afectadas por diversos parámetros como son la temperatura, el pH, el tipo de proteína, la concentración de proteína, así como la estructura de los compuestos polifenólicos (Hagerman y Klucher, 1986). Se han propuesto modelos para las interacciones proteína-polifenol como Jöbstl, O'Connell, Fairclough, y Williamson (2004), los cuales describen un modelo de tres etapas de unión de proteínas no específicas (Figura 6) que incluyen varios pasos: (1) se produce una unión inicial, saturando de polifenoles los sitios hidrófobos de la proteína, posteriormente ésta es enrollada aleatoriamente para inducir una compactación; (2) la dimerización y la agregación de polifenoles que cubren la proteína (estabilizada por enlaces intermoleculares entrelazados) conducen a la formación de un coloide meta-estable;

(3) se genera un gran complejo que conduce a una dispersión coloidal, seguida de una neblina de formación que finaliza en una precipitación (Charlton *et al.*, 2002; Jöbstl, O'Connell, Fairclough, y Williamson, 2004).

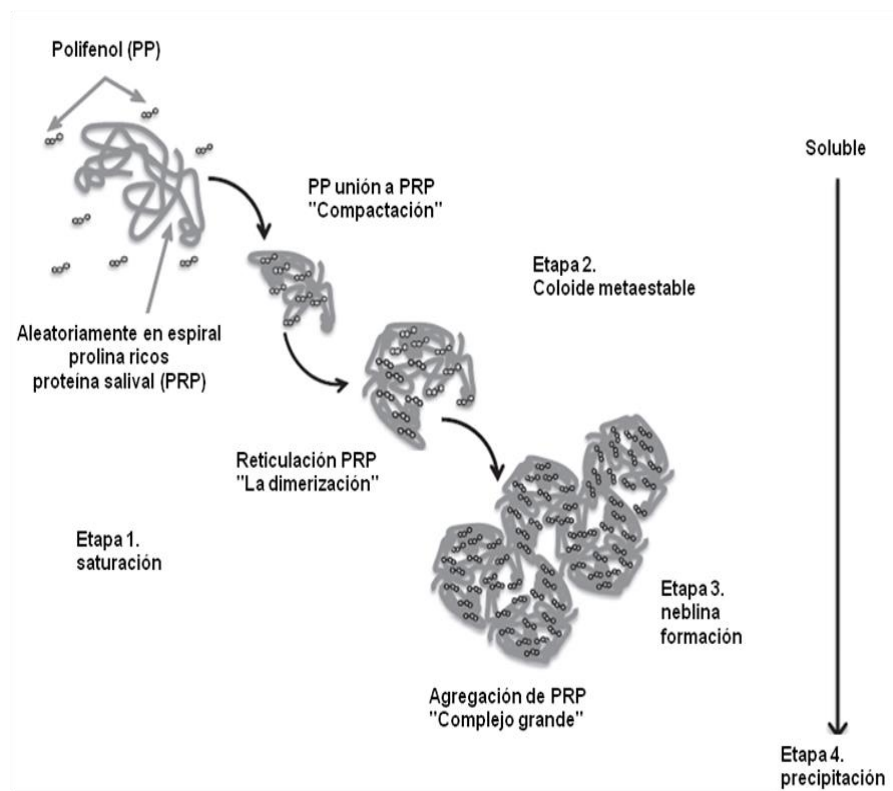


Figura 6. Representación esquemática de la interacción y precipitación polifenol-proteína. La "respuesta astringente de polifenoles" según Jöbstl, O'Connell, Fairclough, y Williamson (2004)

2.5 Fundamento experimental

Los métodos experimentales disponibles para detectar interacciones entre proteínas tienen distintos niveles de resolución y se clasifican en cuatro categorías: en la primera se comprenden el análisis atómico en donde la interacción es detectada por métodos muy sensibles que aportan información específica sobre los átomos y residuos que participan en la interacción, en el segundo nivel se agrupa a los métodos que detectan la interacción. La tercera categoría agrupa a los métodos de

detección por medio de técnicas de inmunoprecipitación o espectrometría de masas y en la cuarta categoría se comprenden bioensayos a escala celular. Una diferencia importante entre la segunda y tercera categoría con respecto a la primera, es que en estas dos se indica cual macromolécula está formando parte del complejo en un instante de tiempo, pero no revelan el detalle químico de la interacción presente en las proteínas (Marcotte, Xenarios y Eisenberg, 2001).

2.5.1 Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida ha sido la técnica de elección para el análisis de la composición proteica. Esta técnica es altamente útil para la separación de moléculas, en dependencia de su carga y bajo la acción de un campo electrónico, entre otros factores.

Laemmli (1970) utilizó SDS (Dodecil sulfato de sodio) para aumentar la resolución de los geles de poliacrilamida, así como el empleo de agentes reductores para determinar el peso molecular de proteínas, lo que se denominó como electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS o bien SDS-PAGE. La técnica se ha venido empleando desde su surgimiento hasta la actualidad.

2.5.2 Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia UV-Vis es uno de los métodos más utilizados en el análisis cualitativo y determinación de estructuras moleculares. La región espectral corresponde al ultravioleta y visible que va desde el UV lejano con una longitud de onda entre 10 y 200 nm (también denominada UV de vacío porque el oxígeno absorbe en esta región justo por debajo de 200 nm), el UV cercano se encuentra entre 200 y 400 nm, y el visible se encuentra entre 400 y 800 nm. La radiación ultravioleta y visible es absorbida por electrones de valencia de moléculas y átomos, las frecuencias de absorción de electrones que participan en enlaces dobles puede extenderse en la región visible, mostrando color en sustancias orgánicas (Malacara, 2004), los componentes del equipo UV-visible se basan solamente en una fuente de luz poli cromática (para el visible lámpara de tungsteno y para UV lámpara de

deuterio), un sistema óptico necesario para solucionar una determinada longitud de onda (colimador, monocromador, selector de longitud de onda, la cubeta (recipiente donde se coloca la muestra a medir, para el visible debe ser de vidrio o de plástico; para UV de cuarzo), un detector (Fototubo) y procesador y lector de la señal como se observa en la Figura 7.

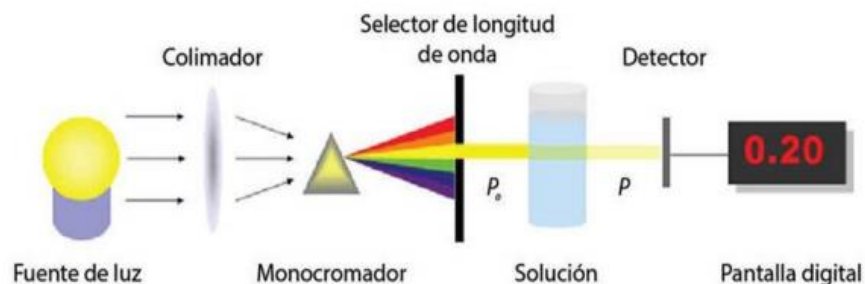


Figura 7. Representación esquemática de los componentes del Espectrofotómetro

2.5.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se caracteriza por la afinidad de diferentes analitos, que se separan de acuerdo al tiempo de elución y velocidad propia de cada analito (Robbins *et al.*, 2013). Esta cromatografía tiene como fase estacionaria un sólido o líquido inmisible y como fase móvil un líquido, es de suma importancia prestar atención al tipo de columna empleada en el análisis a la cantidad de muestra utilizada en dicha columna, el equipo básicamente cuenta con una bomba y mezclado de eluyentes, dispositivos de inyección, conducciones y conexiones, un detector, un registrador y una columna (Gismera, Quintana y Da Silva, 2009). Así puede considerarse al HPLC como un dispositivo que convierte una señal, que no puede ser detectable directamente por el ser humano, en un registro gráfico bidimensional que representan los resultados de la separación de una mezcla. En la Figura 8 Hernández y Pérez (2002) ejemplifican los componentes de este instrumento analítico. La técnica de HPLC es la más habitual para separar,

analizar y cuantificar proteínas y compuestos fenólicos como en el caso de Liyanaarachchi, Mahanama y Punyasiri (2018) al determinar aminoácidos presentes en arroz y Cabrera-Bañegil *et al.* (2017) quienes utilizaron esta técnica para determinar compuestos fenólicos en aceitunas.

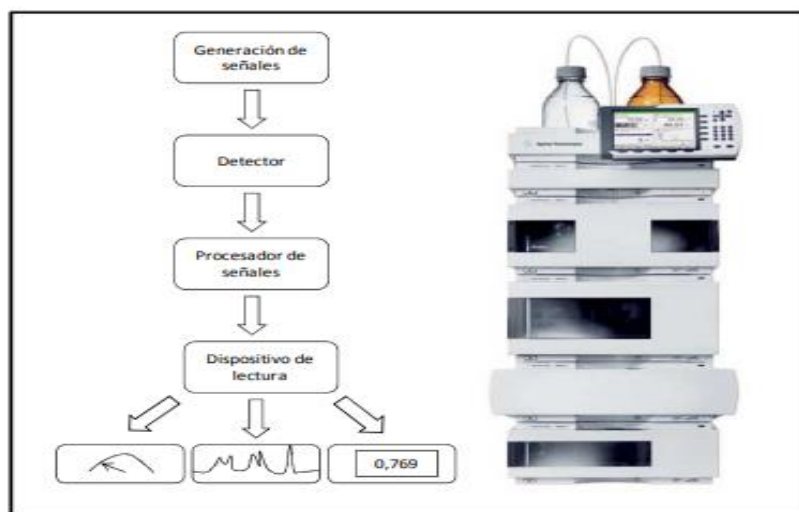


Figura 8. Componentes básicos de un instrumento analítico (Hernández y Pérez, 2002).

2.6 Química computacional

La química computacional es una disciplina que se orienta al desarrollo y al entendimiento de la química, se fundamenta en el aprovechamiento de métodos y técnicas computacionales.

La química computacional nace con la necesidad de comprender aspectos importantes que no se pueden resolver de forma práctica, como lo es conocer estados intermediarios en reacciones que se efectúan rápidamente, saber el comportamiento de un material a temperaturas muy altas que son muy difíciles de alcanzar en un laboratorio, o simplemente calcular las propiedades en sistemas de alto costo experimental, lo que la hace ser utilizada por estudiantes y profesionistas



en áreas afines, como método de estudio y aprendizaje (Cataldi, Donnamarian y Lage, 2009).

La relevancia de esta rama de la ciencia permite la posibilidad de probar suposiciones teóricas basadas en contextos realísticos, y brindar la posibilidad de simular completamente sistemas complejos existentes, haciéndola relevante en el proceso de casi toda la ciencia y disciplinas de la ingeniería (Riganelli, Memelli y Laganà, 2002).

Sin embargo, para poder aplicarla es necesario contar con conocimientos básicos de los fundamentos de los métodos teóricos, capacidad de análisis crítico de los resultados, habilidad en el manejo de software y acceso a recursos optimizados para el cálculo (Sax, 2008).

Los modelos y métodos computacionales desarrollados hasta el momento abarcan dos áreas: Mecánica molecular y Mecánica cuántica.

2.6.1 Mecánica Cuántica

La mecánica cuántica describe a las moléculas en términos de interacciones entre el núcleo y electrones, y la geometría molecular en términos de energía mínima en el arreglo de los núcleos, lo cual hace que la estructura de las moléculas y sus propiedades se comprendan mejor.

Se fundamenta en las bases teóricas a nivel electrónico en reacciones químicas, fuerzas intra o intermoleculares, puentes de hidrógeno, espectros rotacionales y vibracionales. Utilizando la ecuación cuántica del estado estacionario, la ecuación de Schrödinger.

Los métodos basados en la mecánica cuántica se conocen como métodos de estructura electrónica entre los que se encuentran los semiempíricos, *ab initio* y Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) (Parr, Szentpaly y Liu, 1999).



2.6.2 Ecuación de Schrödinger

Las formulaciones de la ecuación de Schrödinger son matemáticamente complejas, sin embargo, gracias a la gran disponibilidad computacional con computadoras de alta velocidad se ha hecho posible resolver de manera exitosa los problemas de interés teórico (Kryachko y Ludena, 1992).

2.6.3 Teoría funcional de la densidad (DFT)

Se fundamenta en una fórmula análoga a la ecuación de onda de Schrödinger independiente del tiempo.

La Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) ha experimentado una incrementada popularidad como una eficiente y versátil herramienta para obtener información precisa de sistemas moleculares de interés. Esta popularidad se debe principalmente a nuevas y más confiables aproximaciones para los términos de intercambio y correlación en la energía funcional, esto hace posible adquirir un nivel correlacionado para moléculas grandes (Bort, 2001).

Se basa en los teoremas de (Hohenberg y Kohn, 1964) los cuales afirman “La energía electrónica del estado basal puede ser determinada completamente, si se conoce la densidad electrónica $\rho(r)^n$ (Bort, 2001).

2.6.3.1 Funcionales

En términos matemáticos los funcionales de la densidad representan la función de otra función. Una función produce resultados de un conjunto de variables, en cambio un funcional produce resultados a partir de una función (Foresman y Frish, 1996) Los funcionales desarrollados en DFT constituyen una aproximación al potencial y energía de correlación-intercambio, ya que es la parte de la energía electrónica difícil de conocer (Geerlings, De Proft y Langenaeker, 2003). Los funcionales se agrupan en tres clases: funcionales de intercambio local y funcionales que solo involucran los valores de las densidades del spin electrón, el funcional gradiente-correctado que involucran los valores de la densidad de spin electrón y sus gradientes, y el más



popular propuesto por Lee, Yang y Parr (1988), una combinación de ambas formas conocido como funcional BLYP todos ellos tienen la particularidad de haber sido desarrollados empleando como modelo un sistema gaseoso (Bort, 2001).

2.6.3.2 Conjuntos base

Son un grupo de funciones de base que representan matemáticamente la forma de los orbitales atómicos y confina a los electrones a una región específica del espacio. Contienen la información de expresar en la computadora, el orden de la combinación lineal de orbitales atómicos (CLOA).

Existen las funciones de Slater (STO) y orbitales tipo Gaussianos (GTO) utilizadas comúnmente para cálculos de estructura electrónica.

Los orbitales de Slater son funciones analíticas de fácil manejo que se obtienen a partir del concepto de carga nuclear efectiva. Los cuales consisten en suponer que los electrones internos apantallan la carga del núcleo, de manera en que la interacción entre el electrón y el núcleo no interviene su carga real, sino en una carga nuclear efectiva, determinada a partir de una serie de relaciones empíricas, procedentes de cálculos variacionales. Sin embargo, los orbitales tipo gaussianos no se consideran realmente orbitales, sino simples funciones cartesianas, consideradas como la mejor opción que se tiene hasta el momento, si se considera la rapidez con la que resuelven integrales Mono electrónicas y bioelectrónicas con un bajo costo computacional, así como obtener una mejor representación lograda en la distribución electrónica y forma del orbital lo cual constituye a una mayor precisión en los resultados (Young, 2001)

2.6.4 Propiedades

2.6.4.1 Optimización de geometrías

La geometría del sistema molecular se debe realizar antes de cualquier cálculo computacional, debe especificarse la geometría que se requiere estudiar y optimizarla representando los mínimos en la superficie de energía potencial (Bertrán,

Branchandell, Moreno y Sodupe, 2000; Foresman y Frish, 1996). La geometría molecular esta optimizada cuando sus fuerzas sobre cada átomo son cero (Foresman y Frish, 1996). La optimización estará completa una vez que las fuerzas sean igual a cero dando como resultado parámetros optimizados, expresados en distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros (Lewin y Cramer, 2004). Una vez establecida la geometría molecular de mínima energía, el resto de propiedades electrónicas que se derivan se consideran confiables.

2.6.4.2 Frecuencias Moleculares

El cálculo de frecuencias moleculares sirve para verificar si los puntos localizados en la estructura molecular son mínimos verdaderos, lo cual se corrobora por la ausencia de frecuencias con valores negativos. Para realizar este cálculo es necesario que se lleve a cabo en una geometría optimizada. El resultado del cálculo de frecuencias permite construir, además, el espectro infrarrojo en un sistema molecular (Foresman y Frish 1996).

2.6.4.3 Orbitales Moleculares de frontera e índices de reactividad química teórica

Las propiedades químicas más importantes de las moléculas vienen determinadas por sus orbitales de frontera, particularmente por el HOMO (Orbital ocupado de más alta energía) y el LUMO (orbital vacío de más baja energía). El HOMO corresponde a un orbital lleno enlazante tipo π o con pares de electrones sin compartir, mientras que el LUMO corresponde a un orbital vacío antienlazante tipo π^* o σ^* (Chang y Collage, 2002). La teoría de orbitales moleculares se ha empleado para explicar reacciones químicas basadas en la transferencia de electrones, como las de oxidación-reducción las cuales se guían por las interacciones HOMO-LUMO, donde el electrón es transferido desde el HOMO de la molécula donadora al LUMO de la molécula aceptora (Chan y Collage, 2002).

Los conceptos de reactividad química teórica se han desarrollado bajo el marco conceptual de DFT, basados en la densidad electrónica de los sistemas. La reactividad química es determinada por la estructura de la molécula definiendo la

forma como los átomos se enlazan mutuamente. Existen diferentes propiedades que se pueden determinar por medio de cálculos de energía. En la Tabla 1 se presenta un resumen de las ecuaciones empleadas para cálculos de la reactividad local (Ramírez, 2017).

Tabla 1. Descriptores de reactividad global y local derivados de los métodos de funcionales de la densidad (DFT).

Definición	Ecuación	Descripción	Referencia
Potencial de ionización Mide la energía requerida para remover un electrón del átomo.	(1) $I = E(N - 1) - E(N)$	Donde $E(N-1)$ es la energía en el estado catiónico y $E(N)$ es la energía en el estado neutro.	Lewars (2003)
Afinidad electrónica Mide la energía liberada cuando un átomo en su estado neutro (menor energía) capta un electrón y forma un anión.	(2) $EA = E(N) - E(N + 1)$	Donde $E(N)$ es la energía en estado neutro y $E(N+1)$ es la energía en el estado aniónico.	Lewars (2003)
Electronegatividad Fuerza con la que los núcleos de los átomos atraen con Mayor intensidad a los electrones de valencia	(3) $\chi = \frac{(I + EA)}{2}$	χ es la electronegatividad. Se define por la suma de potencial de ionización y afinidad electrónica dividido entre dos.	Parr, Donnelly, Levy y Palke (1978)
Potencial químico Mide la tendencia del electrón a escapar del sistema en equilibrio.	(4) $\mu = -\chi = \frac{(I - EA)}{2}$	Se define como el inverso de la electronegatividad.	Parr, Donnelly, Levy y Palke (1978)
Dureza química Mide la resistencia de una molécula a la transferencia de carga intramolecular.	(5) $\eta = \frac{(I - EA)}{2}$	Diferencia del potencial de ionización y afinidad electrónica.	Parr y Pearson (1983)
Blandura Mide que tan propenso es un sistema a reaccionar.	(6) $S = \frac{1}{\eta}$	Es el recíproco de la dureza.	Parr y Yang (1989)
Funciones condensadas de Fukui Estas funciones miden el cambio del potencial químico de un sistema debido al cambio en el número de electrones en la molécula y por lo tanto determina la reactividad de cada átomo en la molécula.	Ataque nucleofílico (7) $f^{+1} = q(N + 1) - q(N)$ Ataque electrofílico (8) $f^{-1} = q(N) - q(N - 1)$ Ataque por radical (9) $f^0 = \frac{1}{2} [q(N + 1) - q(N - 1)]$	ρ densidad electrónica, N es el número de electrones en el punto r .	Parr, Donnelly, Levy, y Palke (1978); Parr y Pearson (1983)

2.6.5 Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular es un método que predice la conformación preferida de una molécula al estar unida a otra, con el objetivo de formar un complejo estable (Lengauer y Rarey, 1996). El acoplamiento molecular es utilizado para predecir la orientación del enlace de una molécula pequeña (ligando) con respecto a otra más grande (macromolécula), proporcionando una idea de cómo éstas moléculas podrían unirse potencialmente *in vivo* (Kitchen, Decornez, Furr y Bajorath, 2004). Ver Figura 9.

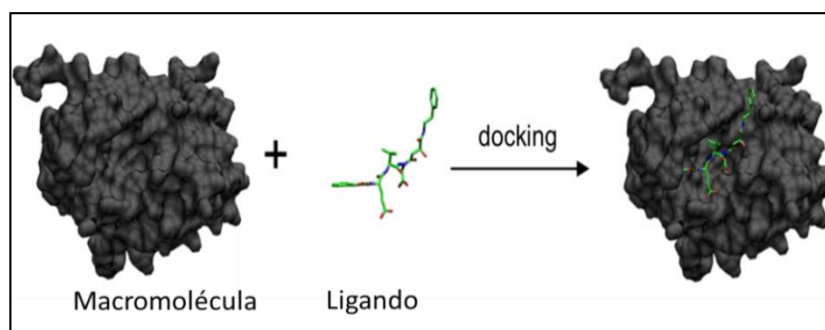


Figura 9. Esquema del acoplamiento molecular

2.6.6 Descriptor de transferencia de carga

La interacción entre los residuos del sitio activo de la macromolécula y el ligando pueden ser representados por el parámetro ΔN , que determina el número fraccional de electrones transferidos desde el sistema A al sistema B, y está dado por la siguiente ecuación (Parr y Pearson, 1983).

$$\Delta N = \frac{\mu_B \mu_A}{2(\eta_A + \eta_B)} \quad (10)$$

Donde A representa el ligando y B son los residuos de los receptores de la macromolécula. Mientras que μ_A , μ_B son el potencial químico y η_A , η_B la dureza química. Si $\Delta N < 0$, la carga fluiría del sistema A hacia el sistema B, en donde A actúa como un donante de electrones, y si $\Delta N > 0$, la carga fluiría de B hacia A, en donde A actúa como un aceptor de electrones (Landeros-Martinez, 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran cantidad de residuo sólido generado a partir de la extracción de aceite de higuera y el alto riesgo que este representa en su manipulación por la presencia de la proteína ricina, en este trabajo de investigación se planteó como objetivo principal, obtener resultados que pudieran confirmar la detoxificación de este residuo con compuestos fenólicos, la cual fue reportada en estudios previos, demostrando la utilidad de los análisis teórico-experimentales, en la explicación del fenómeno de precipitación generado por la interacción molecular de la proteína y el ligando, mismo que se relaciona con el proceso de detoxificación de la ricina.

IV. HIPÓTESIS

La interacción molecular entre la proteína ricina y los grupos funcionales presentes en derivados de flavonoles y proantocianidinas permite la precipitación de la proteína.

V. OBJETIVO GENERAL

Analizar de manera teórica la interacción entre la proteína ricina con derivados de grupos flavonoides, proantocianidinas y experimentalmente la interacción de la proteína ricina con el flavonol quercetina.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar cuantitativa y cualitativamente las proteínas totales extraídas del residuo sólido de higuera.
- Evaluar cuantitativa y cualitativamente la purificación de la proteína ricina.
- Analizar las interacciones proteína-quercetina por espectrofotometría UV-Visible, HPLC y electroforesis.
- Realizar cálculos químico-cuánticos de grupos flavonoides y proantocianidinas.
- Analizar teóricamente las interacciones moleculares mediante Química Computacional utilizando análisis de Docking Molecular.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Desarrollo experimental

La estrategia experimental se realizó en dos etapas, en la primera etapa se recolectaron las semillas de higuera, a las cuales se les extrajo el aceite por el método de Soxhlet, se obtuvo el residuo sólido y las proteínas totales de la pasta de higuera, se realizó la purificación de la proteína y cuantificación de proteína total y ricina, así como un análisis cualitativo mediante la técnica de electroforesis.

En la segunda etapa se analizaron las interacciones entre la proteína ricina y la quercetina por electroforesis, espectroscopia de UV-Vis y HPLC. Esta estrategia se muestra de manera general en la Figura 10.

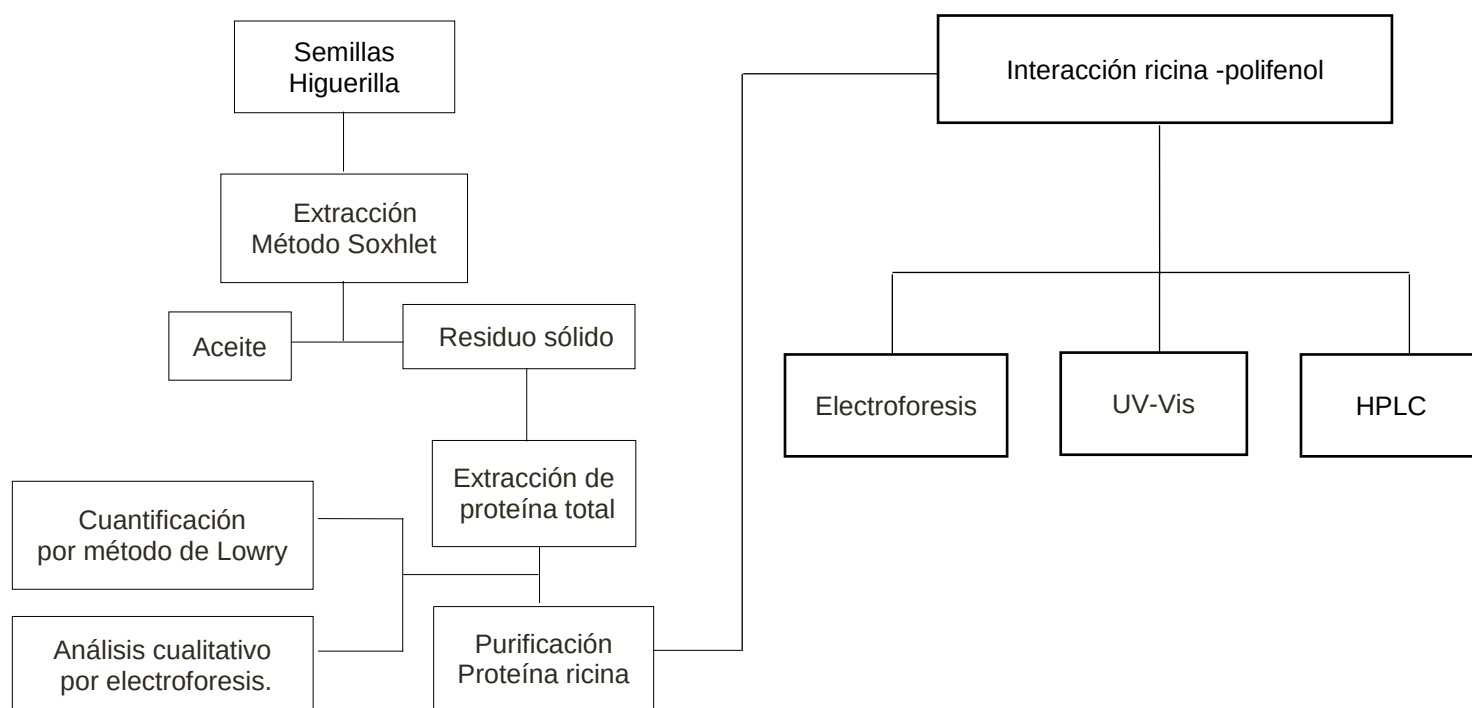


Figura 10. Diagrama general de la parte experimental en este estudio.

6.1.1 Obtención de las semillas de higuera

Como materia prima se utilizaron semillas del fenotipo 2 de higuera, fenotipo utilizado en trabajos previos de Amaya (2016) y Martínez (2014), *Ricinus communis* cultivadas en la zona de Xalapa, Veracruz, México (Figura 11).



Figura 11. Semillas de higuera fenotipo 2.

6.1.2 Preparación de muestra

Las cápsulas en donde se encuentran las semillas de higuera fueron recolectadas, se les eliminó el exocarpio, mesocarpio y endocarpio, dejando las semillas limpias, posteriormente se molieron en un mortero, la pasta obtenida se colocó en un cartucho metálico para la extracción de aceite, como se puede observar en la Figura 12.



Figura 12. Cartucho metálico con semilla molida.



6.1.3 Obtención de pasta de higuera

Para la obtención de la torta (residuo sólido) se pesaron 30 gramos de semilla y se colocaron en un mortero, se molieron hasta que se obtuvo una pasta, ésta se colocó en un cartucho metálico y posteriormente en un equipo de extracción tipo Soxhlet, durante 6 horas con solvente hexano, la cantidad de solvente utilizado fue de 300 mL. Transcurrido el tiempo, el solvente se transfirió a un matraz de bola de 500 mL para la evaporación de solvente en un rota vapor (DLAB Scientific Riverside, RE100-PRO), de esta manera se obtuvo la separación del aceite de ricino y el solvente utilizado, el aceite fue almacenado, la parte sólida o harina residual (torta) se dejó secar a temperatura ambiente en una campana de extracción durante 24 horas, transcurrido este tiempo se almacenó para su posterior uso.

6.1.4 Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas totales se realizó según la metodología descrita por Voisin, Jansen y Gros (1982), en donde se colocó el residuo sólido en un vaso de precipitado y se le añadió una solución de cloruro de sodio 0.14 M a un pH 4 modificado con ácido acético. Por cada 30 g de residuo sólido se añadieron 255 mL de solución de cloruro de sodio y se colocó en una parrilla de agitación durante 6 horas continuas. Transcurrido el tiempo se retiró de la agitación y se filtró la muestra en un embudo de vidrio con papel filtro Whatman No. 1. La fase líquida se colocó en varios viales para su congelación y posterior uso.

6.1.5 Cuantificación de las proteínas

Se realizó una cuantificación total de proteínas contenidas en la extracción de higuera y otra cuantificación de la proteína ricina, ambas fueron cuantificadas mediante el método de Lowry, el cual permitió conocer la concentración existente de la proteína. Se colocaron 0.05 mL de muestra en un tubo de ensayo, posteriormente se añadieron 0.95 mL de agua destilada y 5 mL de reactivo de Lowry. Siguiendo la metodología descrita por Amaya (2016), se dejó reposar por 15 min. Transcurrido el tiempo se añadieron a la mezcla 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu agitando

nuevamente y dejándose reposar en la oscuridad por 30 minutos. Las soluciones obtenidas se colocaron en celdas de plástico de 10 mm de espesor, posteriormente se llevaron a lectura al espectrofotómetro (Termo Th Corporation Helios gamma). Simultáneamente se realizó una curva de calibración de Seroalbumina Bovina utilizando con concentraciones de 0,0.2, 0.4, 0.6 y 0.8, las cuales se colocaron en celdas de plástico de 10 mm de espesor y se colocaron en el espectrómetro a una longitud de onda de 565 nm. Ver anexo 1.

6.1.6 Purificación de la proteína ricina

Una vez obtenida la proteína total, se procedió a la purificación de la proteína ricina siguiendo la metodología de Voisin, Jansen y Gros (1982), utilizando una solución de Sheparose 4B y una solución amortiguadora de TRIS-HCl 10 mM, pH 7.7 a una concentración 1:2 de solución amortiguadora, esta mezcla se colocó en una bureta hasta un volumen de 15mL para elaborar la columna cuidando que quedara compacta y sin aire. Finalizada la columna se añadió la solución de proteína total y se le adiciono una solución de galactosa a 0.28mM y otra a 0.56mM.

6.1.7 Análisis cualitativo de proteínas

En el análisis cualitativo se utilizó la metodología propuesta por Schägger y Von (1987), en donde se hace una separación de proteínas en electroforesis (gel desnaturalizante). Esta se llevo a cabo en una cámara de electroforesis vertical Mini-protean II (Biorad), se utilizó la solución de proteína total y la solución de proteína purificada a una concentración de 200 y 300 ppm respectivamente. La técnica de electroforesis se realizó utilizando diferentes concentraciones del gel separador, las cuales se variaron (10%, 12%, 15% y 16%) con el objetivo de tener una mejor resolución de las proteínas, la concentración del gel compactador permaneció constante a 5%. Las condiciones de voltaje iniciales fueron de 80 volts por 30 min, transcurrido el tiempo se aumentó a 100 volts por 3 h. Como segunda condición de corrida se inició con un voltaje de 60 volts por 30 min, transcurrido ese tiempo se aumentó el voltaje a 100 volts hasta que término el recorrido de la muestra

en un tiempo de 2 h. Posteriormente el gel de poliacrilamida fue teñido en una solución azul de Coomassie durante 1 día, y se reveló con una solución de ácido acético-metanol-agua (1:3:6 respectivamente) cambiando la solución por saturación en un tiempo aproximado de 3 h.

6.1.8 Interacción Ricina-Quercetina

Se realizó una solución madre de quercetina a una concentración de 100 µg/mL, de la cual se tomaron diferentes alícuotas de quercetina (2.7, 2.1, 1.5, 1.2, 0.46, 0.32, 0.22, 0.11 mL), y se mezclaron con la solución de ricina purificada, la cual se encontraba a una concentración de 4.2 µg/mL, se obtuvieron concentraciones de 90, 70, 50, 40, 15.2, 10.71, 7.4 y 3.8 µg/mL, y se dejaron reposar en un lugar oscuro con un periodo máximo de 24 h.

6.1.9 Electroforesis SDS-PAGE

Las ocho concentraciones entre la proteína ricina y quercetina se centrifugaron a 3087 xg por 15 min, separando el sobrenadante del precipitado. Los sobrenadantes obtenidos se analizaron por la técnica de electroforesis empleando alícuotas en proporción 1:1 de muestra y buffer de muestra, se colocaron 20 µL en cada pozo del gel de electroforesis.

Se utilizó el gel compactador al 5% de poliacrilamida y el gel separador al 15% de poliacrilamida con un voltaje inicial de 80 volts durante 30 min, seguido de un voltaje de 100 volts durante un tiempo de 2 h.

6.1.10 Análisis por UV-Vis

Se analizó el sobrenadante y el precipitado de las ocho concentraciones por medio del espectrómetro UV-Vis (Pekin Elmer) utilizando celdas plastificadas de 10 mm de espesor, a una longitud de onda de 370 nm., la absorbancia se midió por triplicado. Previamente se realizó una curva de calibración variando la concentración de quercetina.



6.1.11. Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre las medias de las interacciones se determinaron con un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la prueba de Tukey $\alpha < 0,05$ fue analizada utilizando el software Minitab 16. Este análisis se muestra en los anexos 2 y 3.

6.1.12 Análisis por HPLC

Se analizó el sobrenadante de las ocho concentraciones utilizando cromatografía líquida de alta resolución por medio de un HPLC (ThermoScientific Dionex UltiMate 3000) equipado con una columna AcclaimTM (5 μ m, 120Å, C-18, 4,6x150 mm), una bomba analítica cuaternaria Dionex (LPG-3400-D), un detector de matriz de diodos, un desgasificador de disolvente Dionex y el software Chromeleon CM-PCS-1. Se utilizó la metodología descrita por Braun, Taranchenko, Tikhomirov, Grechukhin y Rybal'chenko (2018), utilizando un caudal de fase móvil de 0.35 μ L/min con una temperatura de 70 °C. En A, la fase móvil fue 0.1% por volumen de HCOOH en agua, en la fase B fue 0,08% en volumen de HCOOH en una mezcla de 80:20, en volumen (acetonitrilo-agua). El programa de elución en gradiente fue el siguiente: 0-30 min: (96-50) % A; 30-32 min: (50-1) % A; 32-36 min: 1% A; 36-38 min: (1-96) % A; 38-46 min: 96% A. Los volúmenes de inyección para las ocho muestras fueron de 1 μ L a una longitud de onda de 277 nm. La proteína ricina purificada se utilizó como estándar.

6.2 Metodología computacional

6.2.1 Equipo de cómputo

El equipo utilizado para el desarrollo de cálculos teóricos fue el siguiente: una estación de trabajo Activatecool 490 Intel® Core™ 2 Duo CPU 2.8GHz, 3.00 GB de RAM y un clúster de alto rendimiento con 8 nodos de 16 núcleos con 16GB en RAM. Una maquina ACER Intel® Pentium® CPU N4200 @ 1.10GHz RAM 6.00 GB 64 bits y una DELL Intel® Core™ I7-4790 CPU @ 3.60GHZ RAM 12.0 GB 64 bits.

6.2.2 Programas computacionales para cálculos teóricos

Los programas empleados en el desarrollo de la parte teórica fueron: Gaussian 09 con interfaz gráfica Gauss View 5.0 y Autodock 4.2 con el Auto Dock Tools 1.4.5 (ADT).

6.2.3 Moléculas para análisis

Para llevar a cabo el estudio teórico se utilizaron las moléculas de tipo flavonoides: Quercetina (Q), Epigallocatequina Galato (EGCG) y Proantocianidinas (procianidina B2, procianidina C1), y su interacción con la proteína ricina (PDB:2AAI) procedente de la base de datos Protein Data Bank (PDB) obtenida a partir de difracción de rayos X, así como los aminoácidos que conforman el sitio activo de la proteína (Figuras 13 y 14).

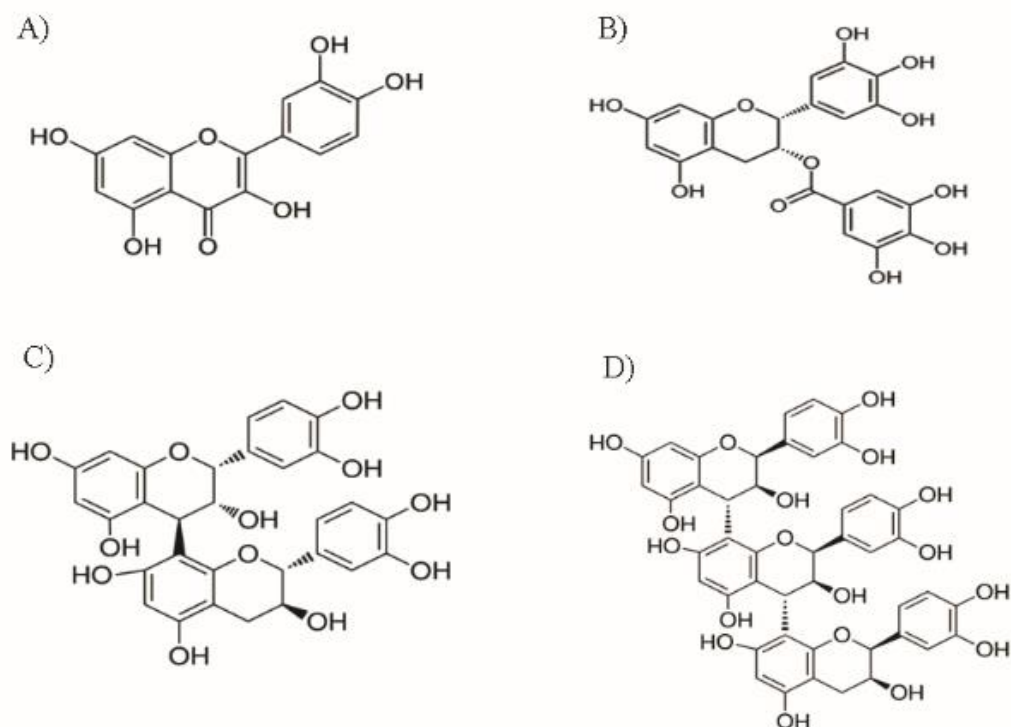


Figura 13 . Grupos flavonoides: A) quercetina, B) epigallocatequina galato, C) procianidina B2 y D) procianidina C1.

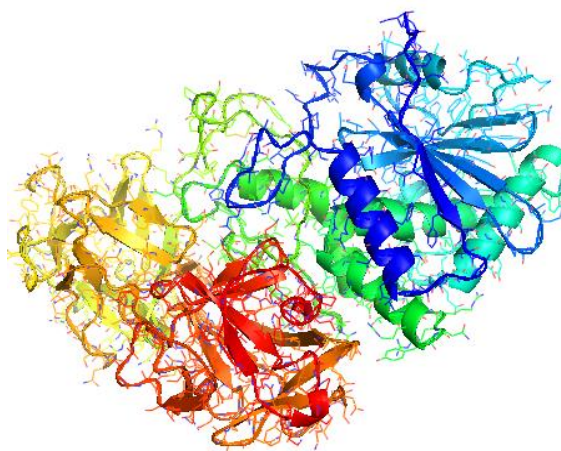


Figura 14. Estructura 3D de la proteína ricina extraída del Protein Data Bank (PDB:2AAI).

6.2.4 Estrategia computacional

La estrategia computacional se realizó en dos etapas, en la primera se hicieron cálculos químico-cuánticos que proporcionaron la optimización y frecuencia de las moléculas analizadas (Q, EGCG y proantocianidinas). Para la validación se utilizó el método de estructura electrónica DFT, con los funcionales B3LYP, PBE1PBE, M06 y M06-2X, en combinación con el conjunto de bases 6-31G(d,p). Los cálculos fueron realizados en fase solvente empleando agua como solvente, para lo cual se utilizó un modelo de polarizado continuo (PCM) mediante el formalismo de ecuaciones integrales (IEFPCM). Las geometrías optimizadas se utilizaron para los cálculos analíticos de frecuencia y se compararon con datos experimentales de difracción de rayos X, esto fue realizado con la finalidad de validar las metodologías computacionales empleadas. Se seleccionó como mejor metodología B3LYP/6-31G(d,p) para Q y EGCG y para las prontocianidinas B3LYP/6-31+G(d,p), ya que fueron las que arrojaron mejores resultados.

Posteriormente, se calcularon las energías de las moléculas en sus formas neutra (EN), aniónica (EN+1) y catiónica (EN-1). Las energías obtenidas se utilizaron para el cálculo de parámetros de reactividad global tales como: potencial de ionización (I), afinidad electrónica (EA), electronegatividad (χ), dureza química (η) y potencial químico (μ). Estos parámetros de reactividad se aplicaron para la determinación de la

transferencia de carga (ΔN), que describe el número fraccional de electrones transferidos del sistema A (flavonoides) hacia el sistema B (cualquier aminoácido del sitio activo). A partir de la molécula neutra, se mapearon los orbitales moleculares de frontera HOMO (orbital molecular ocupado más alto) y LUMO (orbital molecular desocupado más bajo). El potencial electrostático molecular (MEP) se calculó utilizando la metodología B3LYP/6-31G(d,p) para Q y EGCG y B3LYP/6-31+G(d,p) para las proantocinidinas.

En la segunda etapa, las estructuras optimizadas de flavonoides se utilizaron como ligandos en el análisis de acoplamiento molecular. Se realizaron cálculos de Docking Molecular o acoplamiento molecular, entre cada ligando (Q, EGCG y proantocianidinas) y la macromolécula (proteína ricina), mostrando todas las posibles interacciones moleculares entre ambos sistemas. Esta estrategia se muestra en la Figura 15.

6.2.5 Cálculos de Docking Molecular

El acoplamiento molecular se realizó entre cada ligando y la macromolécula (proteína ricina), mostrando todas las posibles interacciones moleculares entre ambos sistemas. La macromolécula se definió como parte rígida, mientras que los ligandos fueron flexibles. Se eliminaron las moléculas de agua de la macromolécula y solo se conservaron los átomos de hidrógeno polares. Se diseñaron tres cajas para el Docking, una en la cadena A y dos en la cadena B (B_1 y B_2) de la proteína ricina; estas cajas se situaron en los sitios activos de las cadenas. Las condiciones fueron: en la cadena A se utilizó un tamaño de caja de $124 \times 122 \times 126$ Å, centrada en las coordenadas $x = 22.932$, $y = 64.561$, $z = 53.505$, con un espaciado de 0.169 Å. En la cadena B, en el sitio B_1 la caja fue de $34 \times 34 \times 22$ Å centrada en las coordenadas $x = 32.643$, $y = 42.605$, $z = 10.995$, con un espaciado de 0.506 Å; y en el sitio B_2 la caja fue de $22 \times 32 \times 28$ Å centrada en las coordenadas $x = -0.433$, $y = 34.935$, $z = 54.086$, con una cuadrícula de espaciado de 0.528 Å. Las conformaciones de acoplamiento se obtuvieron mediante un algoritmo genético en combinación con el algoritmo de Lamarck, seleccionando la energía de unión más baja de las diez conformaciones dadas.

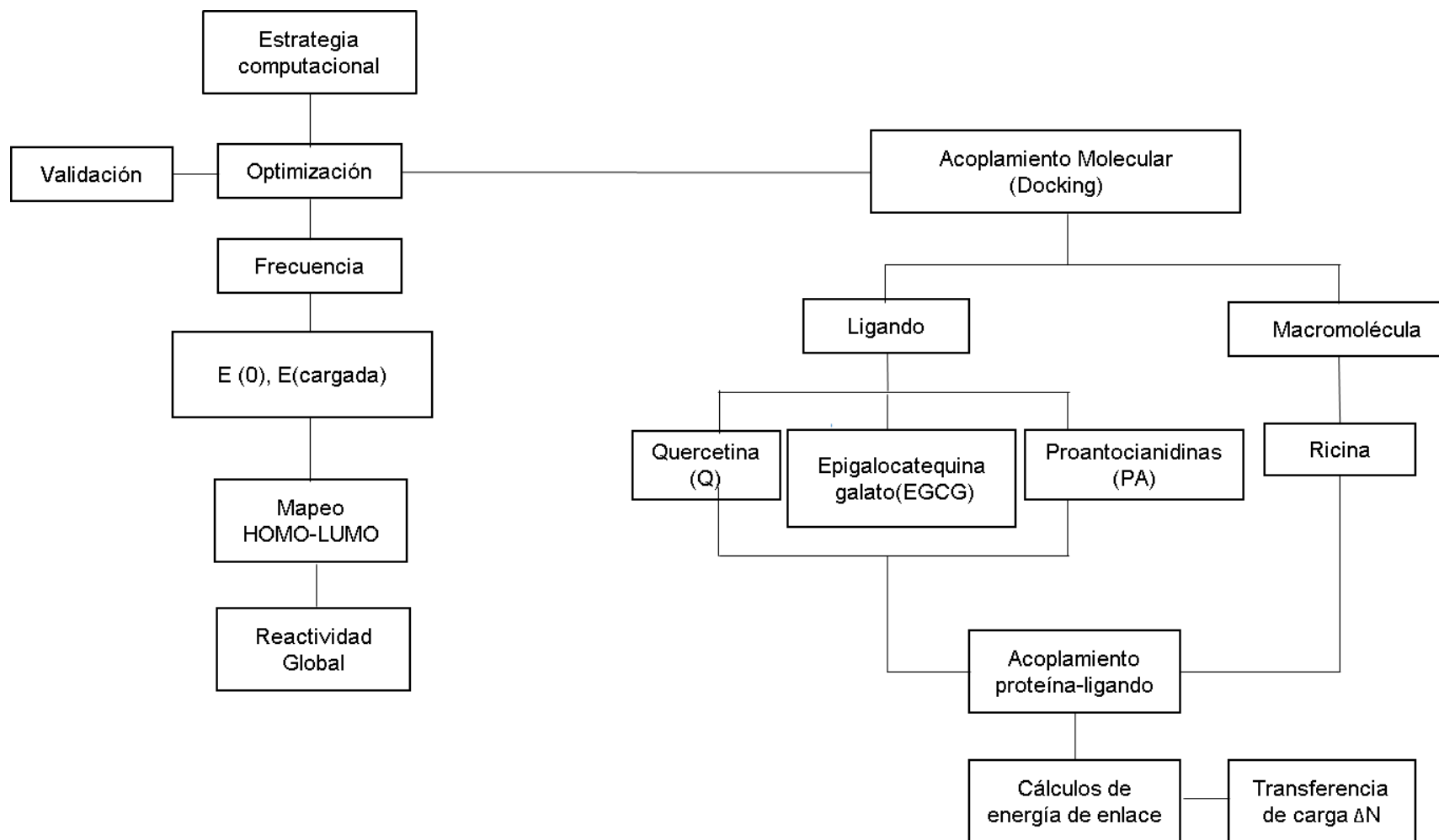


Figura 15. Diagrama general de la parte teórica en este estudio

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Resultados experimentales

7.1.1 Obtención del residuo sólido, extracción y cuantificación de proteínas totales

Las semillas de higuera fueron recolectadas en perote, Veracruz, México, se obtuvo un aproximado de 500g del fenotipo tipo 2. Las semillas se molieron obteniéndose la pasta de higuera, ésta fue desengrasada y secada para su posterior uso, el solvente fue recuperado por medio de un rota vapor, Se obtuvieron 250 mL de muestra filtrada, siguiendo la metodología descrita por Voisin, Jansen y Gros (1982) para la extracción de proteínas totales, como se observa en la Figura 16, esta solución fue etiquetada y congelada; por otra parte utilizando el método de Lowry, se obtuvieron 34.9 $\mu\text{g/mL}$ de proteína total, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gowda *et al.* (2009); Deus *et al.* (2011) y Ramos (2015), quienes mencionan que el residuo sólido obtenido (torta) en la extracción de aceite de higuera contiene entre 20-43% de proteína.

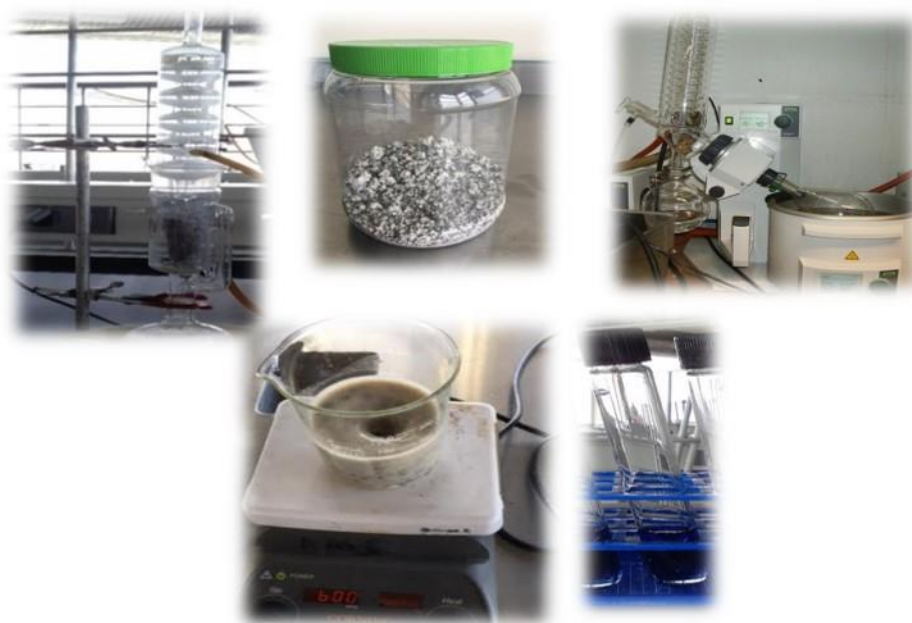


Figura 16. Obtención del residuo sólido, extracción y cuantificación de proteínas totales

7.1.2 Análisis cualitativo de proteínas totales

Las soluciones obtenidas en la extracción y purificación de la proteína se analizaron por triplicado mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 17). La primera línea corresponde al marcador de peso molecular, y las siguientes tres líneas corresponden al extracto de proteínas totales, la banda correspondiente a la proteína ricina se encontró entre **50 y 75 kDa**, midiendo la movilidad electroforética de la proteína en mm y sabiendo que la distancia es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular se realizó una recta patrón con las proteínas de peso molecular conocido para saber el peso molecular de la proteína ricina, el cual fue de **66 kDa**.

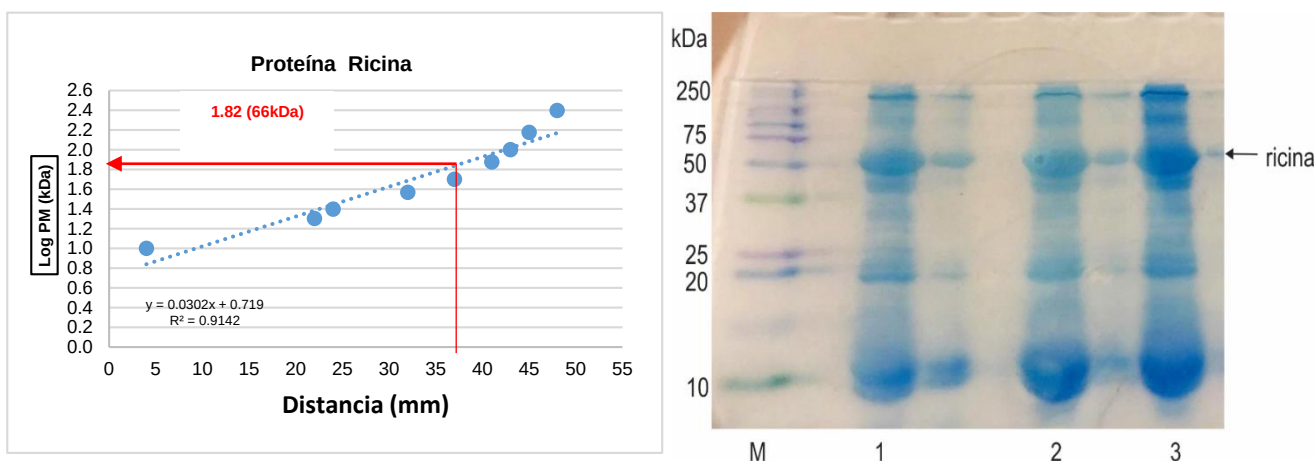


Figura 17. Cálculo de PM de la proteína ricina y gel de electroforesis al 15%. Primer carril muestra marcador de peso molecular, carriles 1, 2, 3 muestran proteínas totales en el extracto de higuera. La banda entre 50 y 75 kDa muestran las bandas correspondientes a la proteína ricina.

7.1.3 Análisis cualitativo por electroforesis de la proteína ricina purificada

La purificación de la proteína ricina dio como resultado una concentración de 4.2 $\mu\text{g/mL}$ de ricina por el método de Lowry, las soluciones de purificación obtenidas se colocaron en el gel de electroforesis el cual se diseñó según la metodología mencionada con anterioridad, se observan bandas entre **25 y 37 kDa** del marcador

seleccionado en las soluciones de proteína purificada, lo que indica que se tiene la misma solución de ricina purificada en los tres carriles del gel como se observa en la Figura 18, cabe mencionar que no salió completamente la solución del gel por lo cual se observan tres bandas más en la parte inferior al ser revelado el gel, sin embargo, la purificación de la proteína se corrobora en el segundo carril de la Figura 20 al colocar de nuevo la muestra purificada.

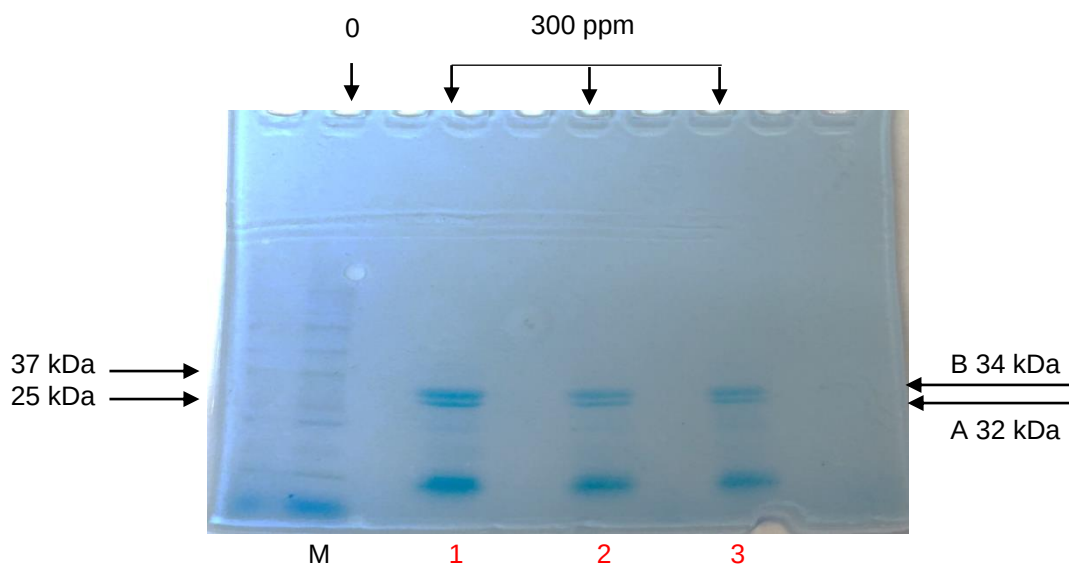


Figura 18. Gel de electroforesis con una concentración de 15% de acrilamida, en los carriles se muestra primero el marcador seguido en rojo se muestran: 1) muestra eluida con buffer TRIS-HCl 10 mM, 2) muestra eluida con galactosa 0.28mM ,3) muestra eluida con galactosa 0.56mM.

7.1.4 Interacciones entre la proteína ricina y quercetina

El análisis de las interacciones entre la proteína y la quercetina se realizaron empleando ocho concentraciones diferentes partiendo de una solución madre de quercetina con una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, las concentraciones empleadas fueron 90, 70, 50, 40, 15.2, 10.71 1,7.4,3.8 $\mu\text{g/mL}$

Los resultados muestran una precipitación de la proteína en todas las concentraciones (Figura 19). Sin embargo, en las concentraciones con 90, 70, 50, 40 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina se tiene una saturación de la proteína. Las concentraciones de

15.2, 10.71, 7.4, 3.8 $\mu\text{g/mL}$ muestran una precipitación a partir de 60 min, sin embargo, pasando las 24 h en las concentraciones más bajas la precipitación desaparece. Solamente en la concentración de 3.8 $\mu\text{g/mL}$ encontramos una neblina de formación como se menciona en las etapas de interacción proteína-polifenol (Figura 6). Estas soluciones fueron centrifugadas para separar el precipitado del sobrenadante y analizar individualmente.

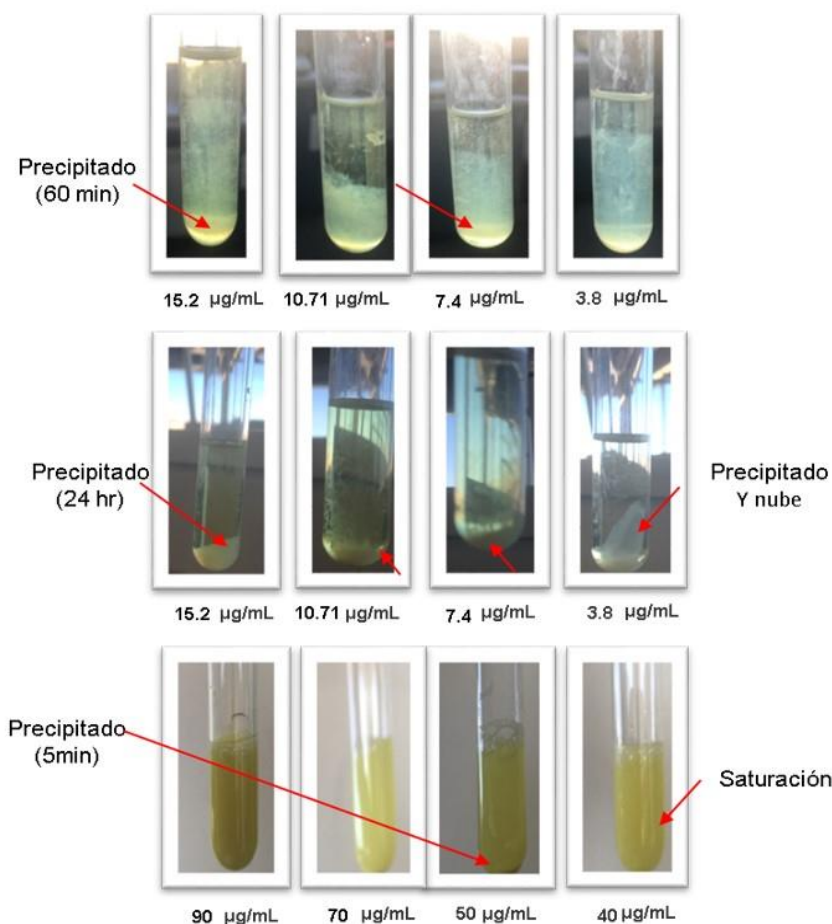


Figura 19. Concentraciones de la interacción entre la proteína ricina y quercetina.

7.1.5 Análisis de interacciones por electroforesis

Al analizar el sobrenadante de las ocho concentraciones se observaron bandas entre 25 y 35 kDa correspondientes a las cadenas A y B de la proteína (Figura 20). Sin embargo, se aprecia una disminución en la intensidad de las bandas a mayor

concentración de quercetina, lo que sugiere que la mayor parte de la proteína se queda en el precipitado el cual fue analizado posteriormente por UV-Vis.

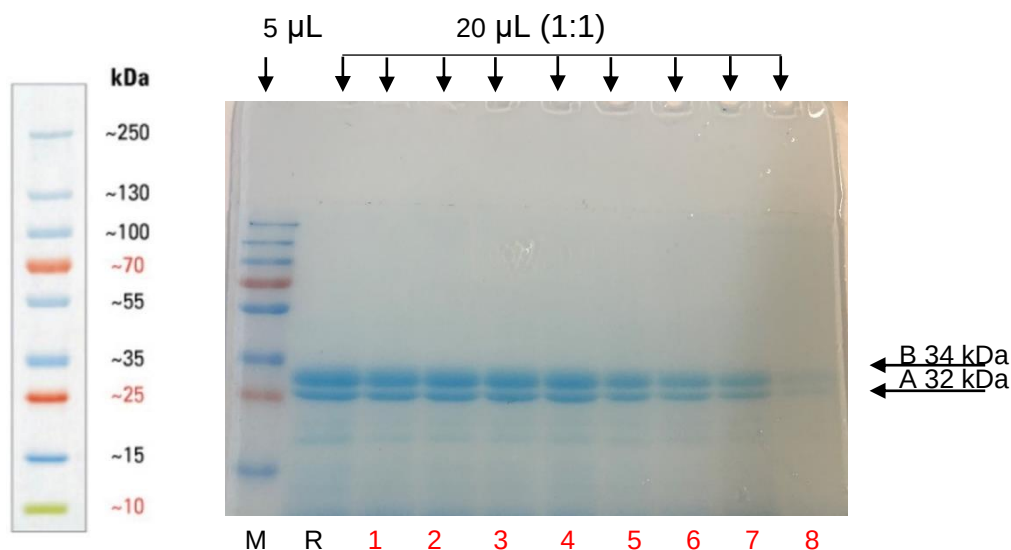


Figura 20. Gel de electroforesis con una concentración de 15% de acrilamida, en los carriles se observa primero el marcador seguido por la proteína ricina purificada en rojo se muestran las ocho concentraciones: 1) 3.8 µg/mL , 2) 7.4 µg/mL,3) 10.71 µg/mL,4) 15.2 µg/mL,5) 40 µg/mL,6) 50 µg/mL,7)70 µg/mL,8)90 µg/mL

7.1.6 Análisis de interacciones por UV-Vis

Se analizó de manera cuantitativa el sobrenadante y el precipitado de las ocho concentraciones, realizadas a una longitud de onda de 370 nm. Al analizar el sobrenadante, los resultados obtenidos muestran una disminución en la absorbancia obtenida conforme aumenta la concentración de quercetina en la muestra, lo que sugiere que a mayor concentración se tiene una menor cantidad de quercetina en el sobrenadante. Por otra parte, al analizar el precipitado se observa el caso contrario, a mayor concentración de quercetina se tiene una mayor absorbancia, lo que significa que al aumentar la concentración de quercetina en la muestra, ésta precipita junto con la proteína.

Los resultados estadísticos muestran una $p < 0.05$ para el ANOVA, lo que indica una diferencia significativa en algunas de las concentraciones de interacción, las Figuras

21 y 22 muestran los intervalos simultáneos de confianza de Tukey, y las concentraciones que no comparten una letra son significativamente diferentes, ver anexos II y III.

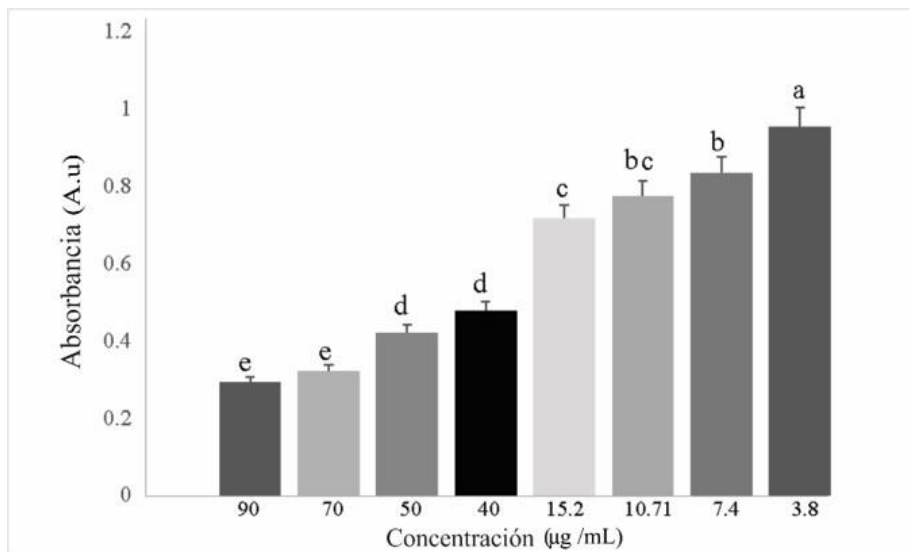


Figura 21. Absorbancias en el sobrenadante de la interacción proteína-quercetina a 370 nm, columnas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (Tukey; $\alpha = 0.05$).

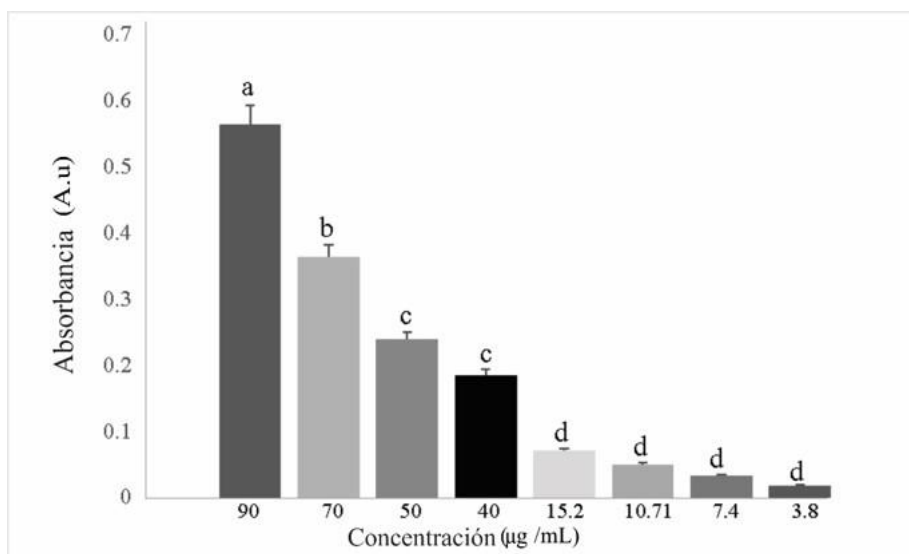


Figura 22. Absorbancias en el precipitado de la interacción proteína-quercetina a 370 nm, las columnas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (Tukey; $\alpha = 0.05$)

7.1.7 Análisis de interacciones por HPLC

Se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución, las concentraciones empleadas para la interacción de la proteína ricina con la quercetina, la solución de ricina purificada se utilizó como estándar. Todos los cromatogramas obtenidos se muestran en el anexo 4.

Los cromatogramas en las Figuras 23 y 24 muestran una disminución de los picos de la proteína ricina conforme aumenta la concentración de quercetina, hasta llegar a desaparecer totalmente algunos de ellos, lo que sugiere que parte de los aminoácidos de la proteína están reaccionando con la quercetina quedándose en el precipitado de la solución.

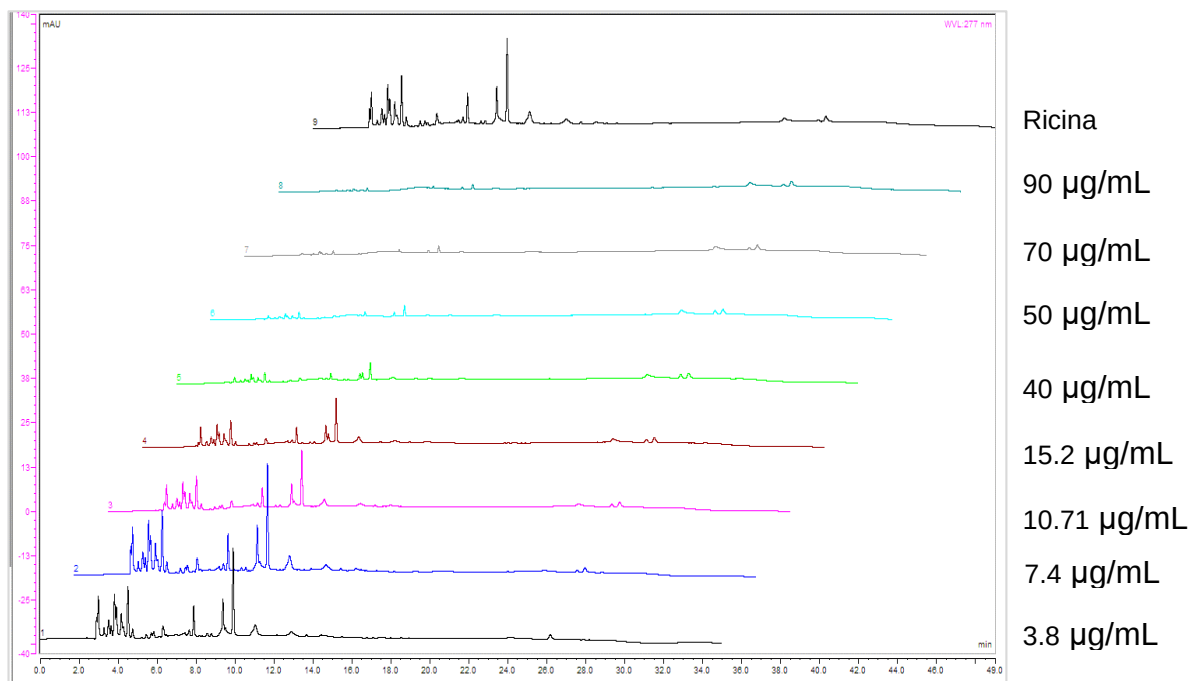


Figura 23. Cromatogramas de los sobrenadantes de la interacción entre la proteína ricina con quercetina comparadas con el estándar de proteína purificada, a una longitud de onda de 277nm, tiempo recorrido al 5% para visualización, los picos aparecen en el mismo tiempo de retención en todas las concentraciones.

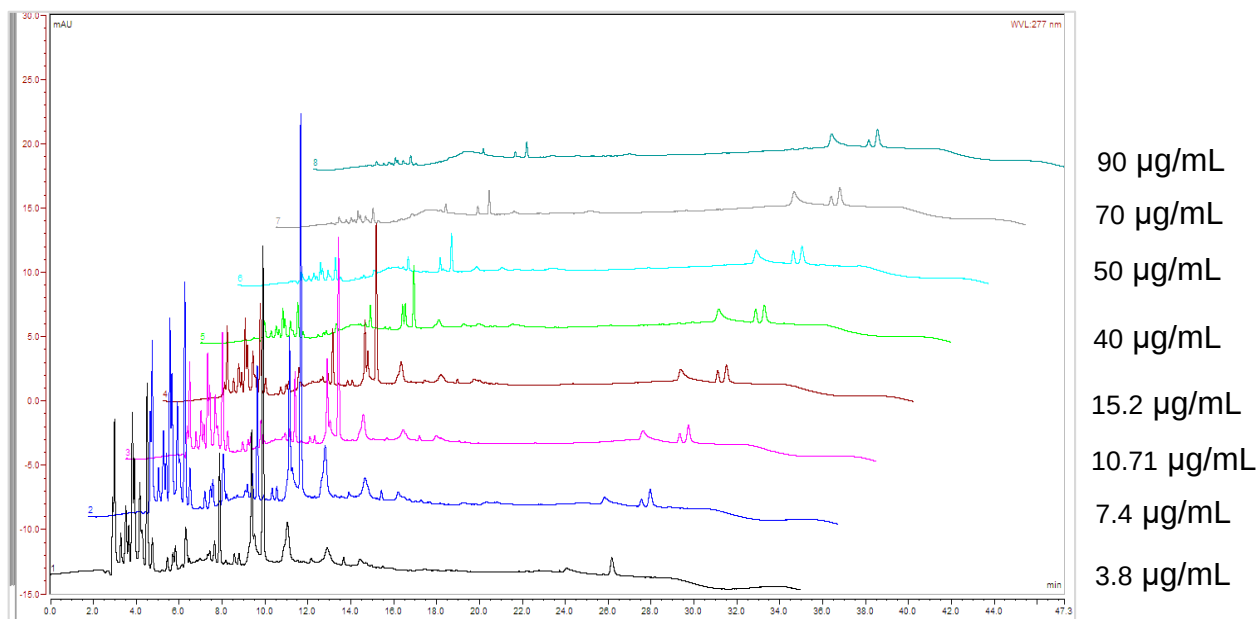


Figura 24. Cronogramas de los sobrenadantes de la interacción entre la proteína ricina con quercetina sin estándar comparadas entre sí a una longitud de onda de 277nm, tiempo recorrido de 5% para visualización, los picos aparecen en el mismo tiempo de retención en todas las concentraciones.

Se seleccionaron cuatro cromatogramas (concentraciones 3.8, 10.71, 40 y 90 µg/mL) en los cuales se midió el área de un pico en específico, comparándose con el estándar (ricina purificada), los resultados muestran porcentajes de 71.95%, 59.28%, 10.49% y 4.16% respectivamente, sugiriendo que a mayor concentración de quercetina se tiene una menor cantidad de ricina (Figuras 25 y 26).

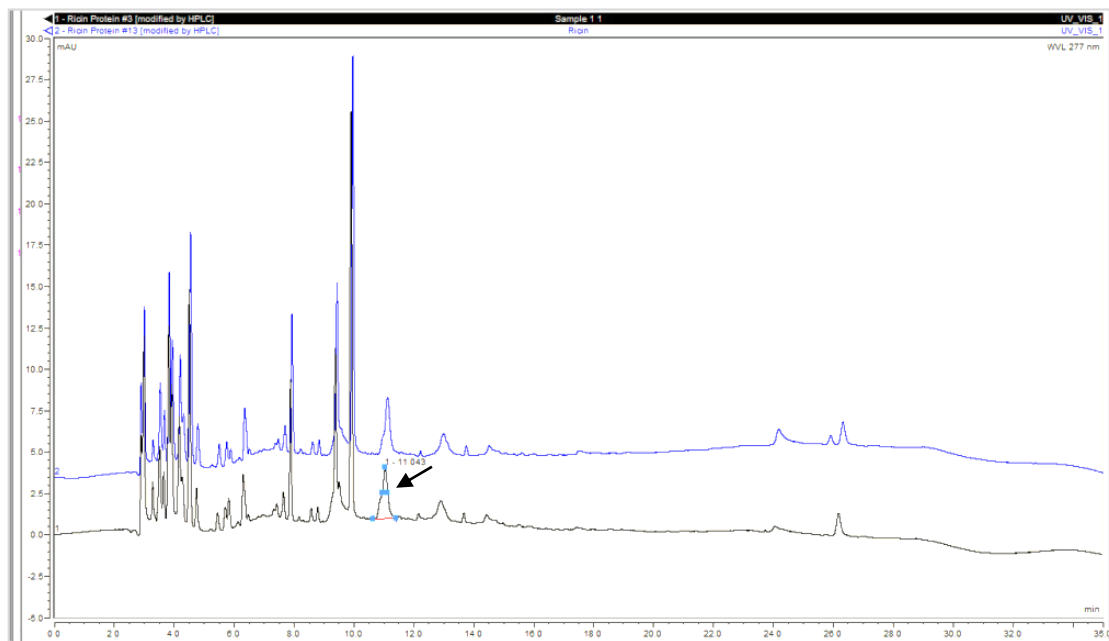


Figura 25. Comparación de los cromatogramas obtenidos para una concentración de 3.8 $\mu\text{g/mL}$. (línea en color negro) y ricina (línea en color azul), a una longitud de onda de 277 nm, el pico seleccionado se eligió para calcular el porcentaje de ricina existente.

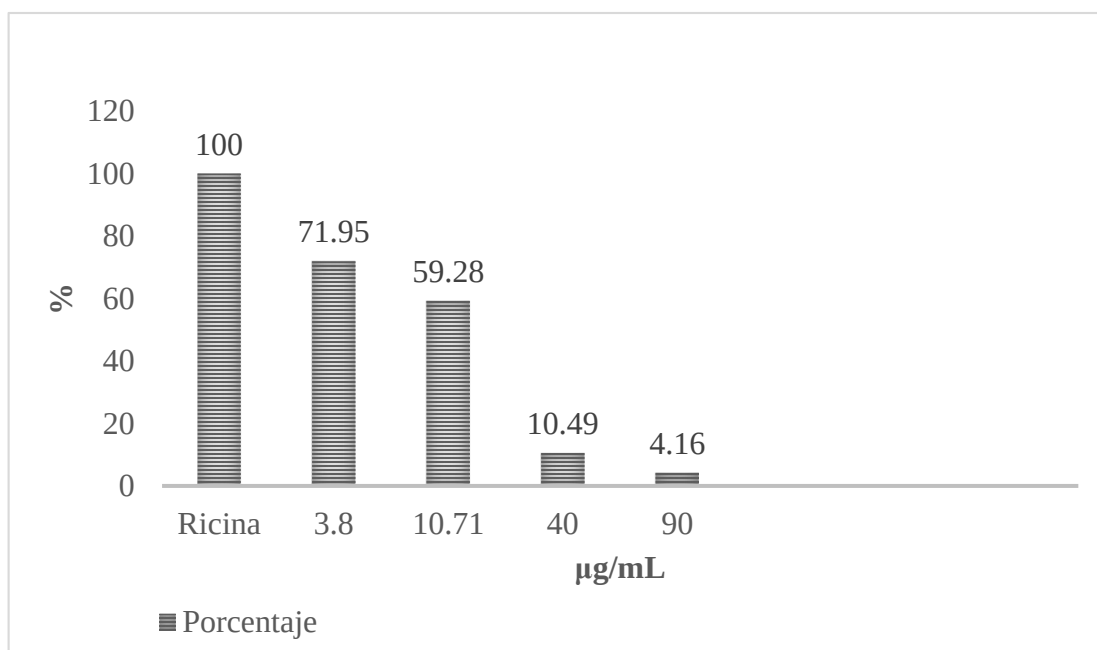


Figura 26. Porcentaje obtenido al evaluar los cromatogramas seleccionados.

Transcurridos 20 días después de la interacción, se observó en algunas de las muestras filtradas como sigue reaccionando la proteína ricina con la quercetina ya que muestran turbidez en 15.2 $\mu\text{g/mL}$ y 40 $\mu\text{g/mL}$ y precipitación en 50 $\mu\text{g/mL}$ lo cual no se presentaba antes de ese tiempo (Figura 27).

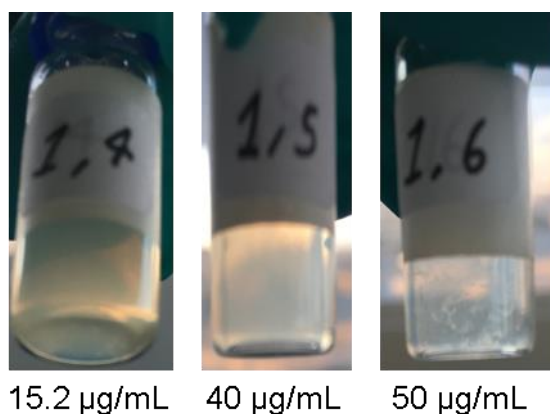


Figura 27. Concentraciones filtradas después de 20 días de interacción

7.2 Resultados teóricos

7.2.1 Cálculos químico-cuánticos

Los parámetros geométricos obtenidos se muestran en la Tabla 2. Estos parámetros se calcularon utilizando diferentes metodologías: PBE1PBE/6-31G(d,p), M06/6-31G(d,p), M06-2X/6-31G(d,p) y B3LYP/6-31G(d,p). Las longitudes de enlace y los ángulos de enlace de las moléculas Q y EGCG (calculados en la fase solvente) se compararon con los valores de difracción de rayos X. El análisis de correlación mostró que la mejor metodología empleada para analizar la estructura molecular de Q y EGCG fue B3LYP/6-31G(d,p), con una correlación de 0.94 para longitudes de enlace y 0.82 para ángulos de enlace para Q, y correlaciones de 0.95 y 0.93 para longitudes de enlace y ángulos de enlace en EGCG. La ausencia de frecuencias imaginarias confirmó los mínimos globales en la superficie de energía potencial. Sin embargo, en el caso de las proantocianidinas debido al tipo de estructuras, se añadió

al conjunto base una función difusa, incrementando así el tamaño en los orbitales atómicos. Las moléculas optimizadas se muestran en la Figura 28.

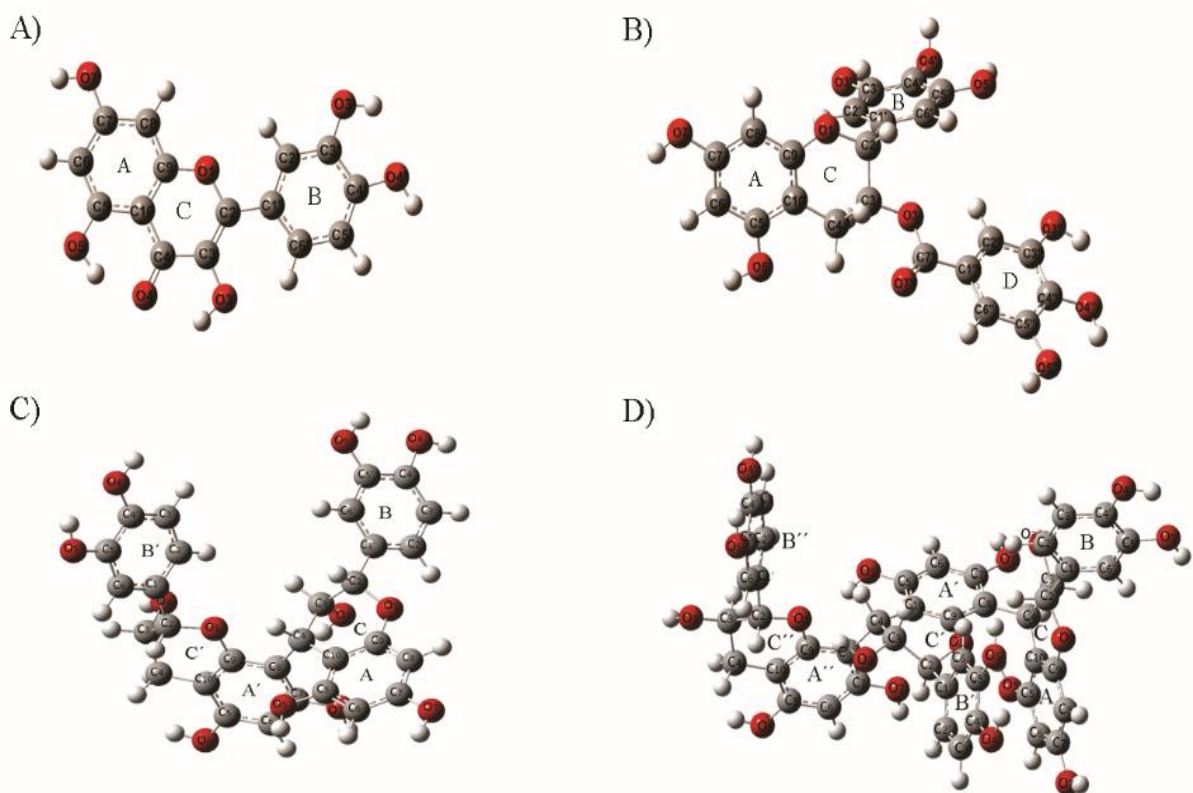


Figura 28. Geometrías optimizadas. A) quercetina y B) epigallocatequina galato, optimizadas con B3LYP/6-31G(d,p). C) procianidina B2 y D) procianidina C1, optimizadas con B3LYP/6-31+G(d,p).

Tabla 2. Parámetros geométricos para Q y EGCG calculados en fase solvente (agua) usando el modelo de solvatación IEFPCM, y los datos de difracción de rayos X reportados para los mismos compuestos

Modelo	Distancias (Å)	DFT / 6-31G(d,p)				Exp (a,b)	Ángulos (°)	DFT / 6-31G(d,p)				Exp (a,b)
		B3LYP	PBE1PBE	M06	M06-2X			B3LYP	PBE1PBE	M06	M06-2X	
Q	O1-C2	1.375	1.365	1.367	1.365	1.371	C2-O1-C9	122.8	122.9	122.83	122.5	121.7
	O1-C9	1.360	1.351	1.351	1.352	1.368	O1-C2-C3	119.0	120.0	119.25	120.0	120.1
	C2-C3	1.372	1.368	1.366	1.361	1.362	O1-C2-C11	112.3	112.3	112.55	112.2	111.5
	C2-C11	1.465	1.460	1.459	1.468	1.469	C3-C2-C11	128.6	128.3	128.19	127.8	128.4
	C3-O3	1.358	1.348	1.349	1.353	1.358	C2-C3-O3	123.7	124.1	123.70	123.5	121.1
	C3-C4	1.449	1.445	1.446	1.453	1.431	C2-C3-C4	121.4	121.1	121.46	121.1	121.2
	C4-O4	1.265	1.260	1.256	1.250	1.269	O3-C3-C4	114.9	114.8	114.83	115.4	117.6
	C4-C10	1.432	1.427	1.429	1.435	1.423	C3-C4-O4	118.7	118.6	118.62	119.0	120.6
	Coefficiente de correlación (r)	0.944	0.921	0.930	0.946		Coefficiente de correlación (r)	0.812	0.779	0.805	0.809	
EGCG	O1-C2	1.440	1.426	1.423	1.424	1.460	C2-O1-C9	113.6	114.3	114.2	114.6	114.0
	O1-C9	1.374	1.364	1.365	1.368	1.390	C3-C2-C11	114.6	114.3	113.2	112.4	112.4
	O2-C3	1.440	1.428	1.425	1.428	1.440	O1-C2-C3	109.3	109.2	109.5	110.5	109.0
	O3-C5	1.366	1.356	1.355	1.358	1.380	O1-C2-C11	106.2	104.5	102.4	105.3	105.0
	O4-C7	1.366	1.356	1.355	1.358	1.370	O2-C3-C2	107.1	114.9	114.4	112.2	113.3
	O5-C14	1.394	1.384	1.383	1.385	1.380	O2-C3-C4	111.4	110.7	111.2	112.2	111.3
	O6-C13	1.361	1.351	1.351	1.355	1.390	C2-C3-C4	111.4	111.4	111.1	109.5	111.8
	C2-C11	1.523	1.515	1.512	1.517	1.530	C3-C4-C10	108.5	109.0	108.5	109.7	108.7
	Coefficiente de correlación (r)	0.955	0.944	0.94	0.946		Coefficiente de correlación (r)	0.939	0.801	0.873	0.918	

(a) Quercetin (Q): Jin, G.Z. *et al.*, Acta Crystallographica (1990). C 46, 310–313. (1984). (b) Epigallocatechin gallate (EGCG): Spek *et al.*, Acta Crystallographica (1984). C40, 2068–2071

7.2.2 Reactividad química global

Las geometrías optimizadas obtenidas se utilizaron para cálculos de reactividad química global. Se calculó el potencial de ionización (I), la afinidad electrónica (A), el potencial químico (μ), la electronegatividad (χ) y la dureza química (η). Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 3 y 4. Se observa que la molécula Q presenta una mayor capacidad a formar aniones debido al valor de electronegatividad (χ) registrado, lo cual representa una mayor tendencia a atraer electrones. En cuanto a la dureza química (η), Q muestra un valor menor en comparación con EGCG y las proantocianidinas; este parámetro es indicativo de la buena interacción de esta molécula con el entorno circundante. Los valores del potencial químico y dureza fueron utilizados en el cálculo del número fraccionario de electrones transferidos (ΔN).

Tabla 3. Parámetros de reactividad química y energía electrónica total de quercetina (Q) y de epigallocatequina galato (EGCG), calculados con B3LYP/6-31G(d,p) en fase solvente. Todos los valores se muestran en eV.

Componente	Energía electrónica	I	A	μ	χ	η
Q	(E_N)	-30047.53				
	(E_{N-1})	-30042.05	5.48	2.01	-3.75	3.75
	(E_{N+1})	-30049.54				
EGCG	(E_N)	-45625.14				
	(E_{N-1})	-45619.33	5.81	1.23	-3.52	3.52
	(E_{N+1})	-45626.37				

Tabla 4. Parámetros de reactividad química y energía electrónica total de procianidina B2 (PAB2) y de procianidina C1(PAC1) calculados con B3LYP/6-31+G(d,p) en fase solvente. Todos los valores se muestran en eV

Componente	Energía electrónica	I	A	μ	χ	η
PAB2	(E_N)	-2061.67				
	(E_{N-1})	-2061.45	0.214	0.028	-0.121	0.121
	(E_{N+1})	-2061.69				
PAC1	(E_N)	-3091.68				
	(E_{N-1})	-3091.90	0.218	0.030	-0.124	0.124
	(E_{N+1})	-3091.93				

7.2.3 Potencial Electrostático Molecular (MEP)

El potencial electrostático molecular (MEP) se calculó para mostrar la densidad de electrones en las superficies que rodean las moléculas Q, la EGCG y las PAs, y las ubicaciones de los sitios para ataques nucleofílicos y ataques electrofílicos. El rojo indica regiones negativas que promueven el ataque electrofílico y el azul indica las partes positivas que muestran sitios favorables para el ataque nucleofílico.

La Figura 29 muestra el mapa MEP de quercetina con tres posibles sitios de ataque localizados en átomos de O4 (-0.655 e), O5 (-0.590 e) y O13 (-0.586 e), mientras que los posibles sitios de ataque nucleofílico, se localizan en los átomos de hidrógeno, principalmente H7 (0.353 e) y H14 (0.357 e). En la Figura 30 se muestra el mapa MEP de EGCG con cinco posibles sitios de ataque electrofílico localizados en los átomos O7'' (-0.531 e), O3'' (-0.585 e), O7 (-0.560 e), O3' (-0.582 e), y O1 (-0.570 e), y el posible ataque nucleofílico localizado en los átomos de hidrógeno H3'' (0.356 e), H4'' (0.360 e), H5'' (0.346 e), H5 (0.351 e), H6 (0.342 e), H7 (0.345 e), H3' (0.340 e) y H4' (0.359 e).

En el caso de la procianidina PAB2 (Ver Figura 31), se observa principalmente el ataque electrofílico en los oxígenos O1 (-0.033 e), O5' (-0.017 e) en el anillo B' y O5' (-0.029 e) en el anillo B y el ataque nucleofílico en los hidrógenos H4 (0.029 e) y H6 (0.064 e). El mapeo de la procianidina C1 (Figura 32) muestra el posible ataque electrofílico en los oxígenos O7 (-0.007 e) y O4 (-0.023 e), mientras que el principal ataque nucleofílico se localiza en el átomo de H5 (0.027). Los valores se muestran en unidades de carga eléctrica.

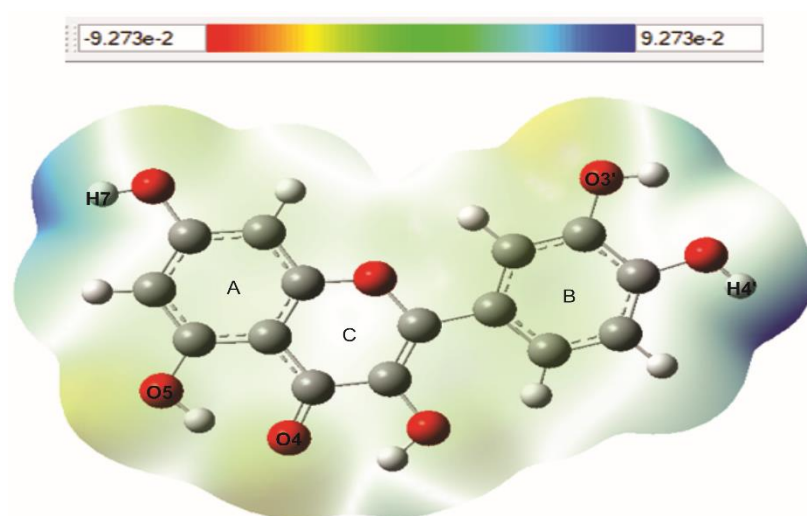


Figura 29. Mapeo del potencial electrostático molecular (MEP) de quercetina (Q), calculado con B3LYP/6-31G(d,p).

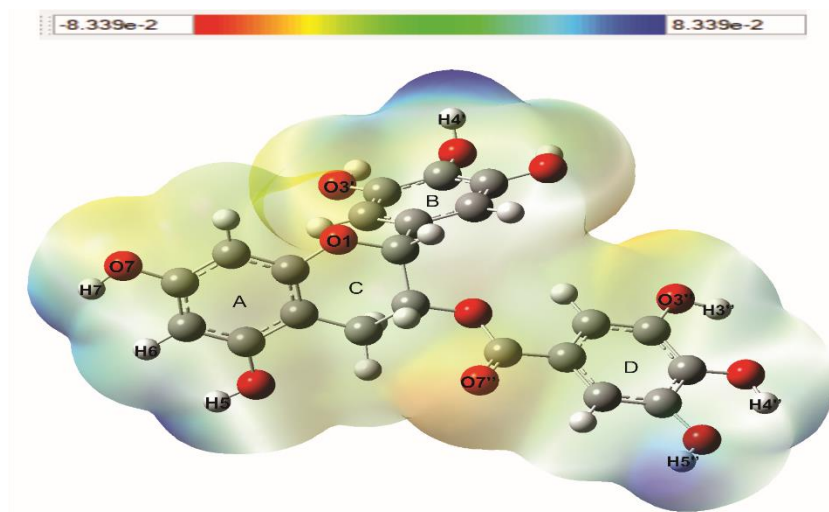


Figura 30. Mapeo del potencial electrostático molecular (MEP) de epigallocatequina galato (EGCG), calculado con B3LYP/6-31G(d,p).

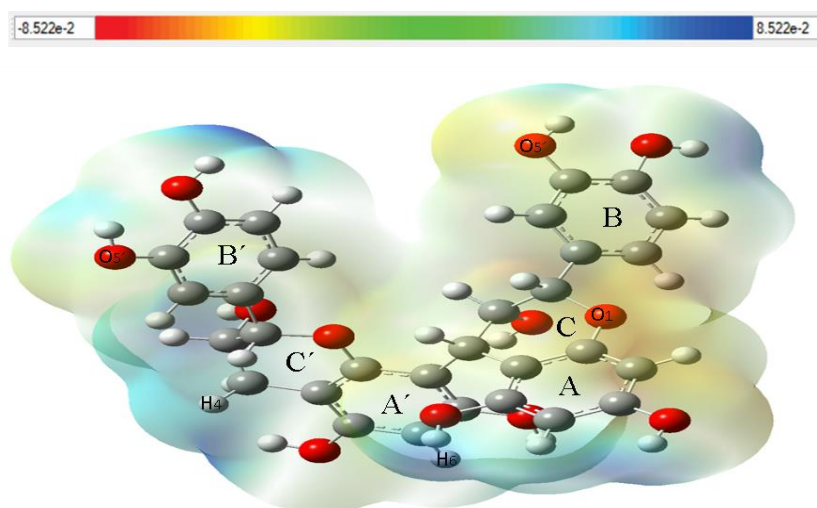


Figura 31. Mapeo del potencial electrostático molecular (MEP) de procianidina B2 (PAB2), calculado con B3LYP/6-31+G(d,p).

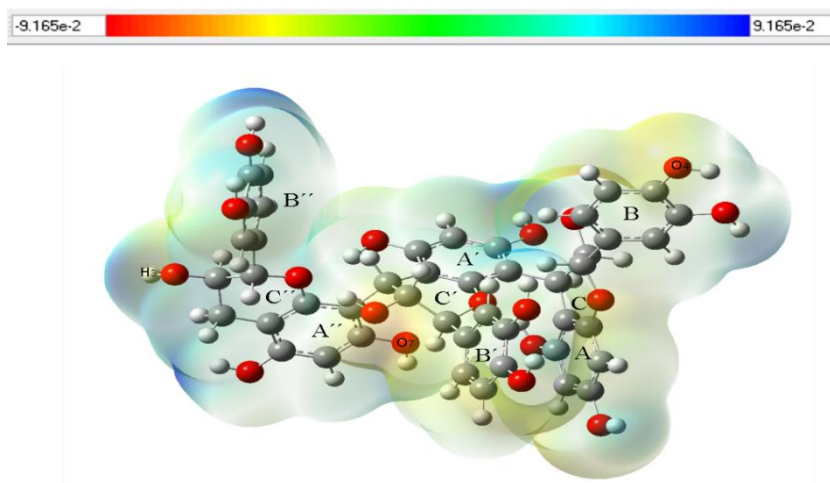


Figura 32. Mapeo del potencial electrostático molecular (MEP) de procianidina C1 (PAC1), calculado con B3LYP/6-31+G(d,p).

7.2.4 Densidad electrónica de los orbitales moleculares de frontera (HOMO y LUMO)

La densidad de electrones de los orbitales moleculares de frontera se obtuvo realizando cálculos de energía en las moléculas Q, EGCG y PAS en estado neutro. Se puede observar que, para Q, tanto el orbital HOMO (donante) como el orbital LUMO (aceptor) se distribuyen por toda la estructura de la molécula (Figura 33). Lo que indica una susceptibilidad a los ataques electrofílicos y las posibles interacciones de la quercetina (Q) con el sitio activo de la proteína ricina.

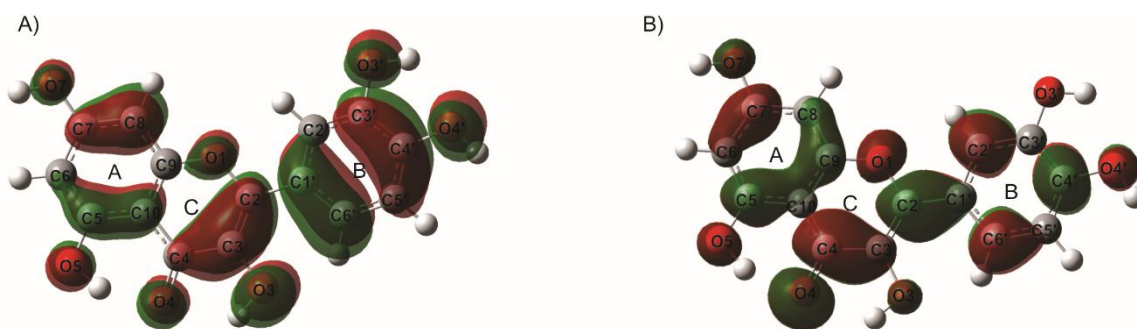


Figura 33. Localización de los orbitales moleculares (A) HOMO y (B) LUMO de quercetina (Q), calculada con método B3LYP/ 6-31G(d,p).

En la epigallocatequina (EGCG) (Ver Figura 34), se puede observar que el orbital HOMO se distribuye principalmente en los anillos A y C de la estructura, haciendo a esta zona más susceptible a un ataque electrofílico, sin embargo, el orbital LUMO se distribuye únicamente en el anillo D lo que lo hace más susceptible a un ataque nucleofílico

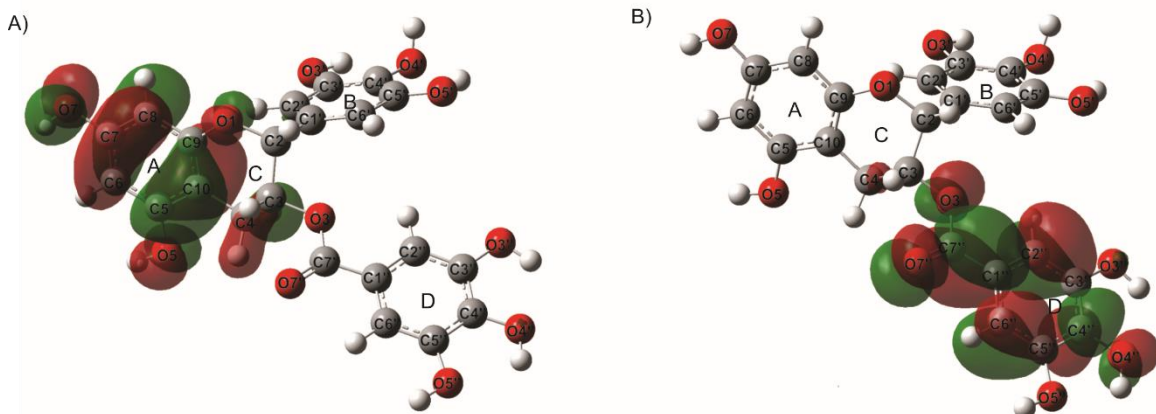


Figura 34. Localización de los orbitales moleculares (A) HOMO y (B) LUMO de epigallocatequina galato (EGCG), calculado con metodología B3LYP/ 6-31G(d,p).

En la procianidina B2 (PAB2), se puede observar que el orbital HOMO se distribuye en los anillos A, C, B y A' de la estructura, mismos que actuarán como donadores de electrones al ser más susceptibles a un ataque electrofílico. Por otro lado, los anillos B y B' parecen ser los más susceptibles a un ataque nucleofílico, según indica la localización de los orbitales moleculares de frontera (Figura 35).

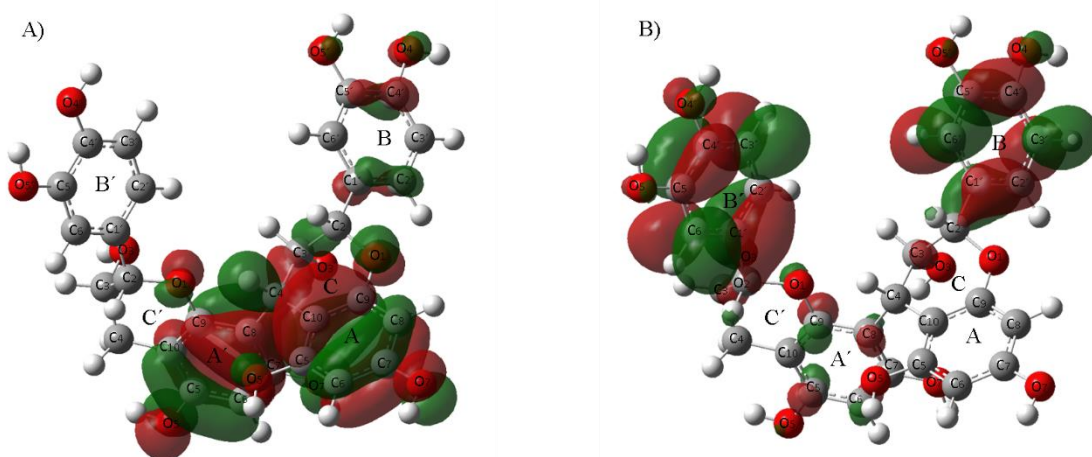


Figura 35. Localización de los orbitales moleculares (A) HOMO y (B) LUMO de procianidina B2 (PAB2), calculado con B3LYP/6-31+G(d,p).

En la procianidina C1 (PAC1), se puede observar que los anillos A, C y A' serán más susceptibles a un ataque electrofílico debido a la localización del orbital HOMO, sin embargo, los anillos B, A', B', C' y A'' parecen ser los más susceptibles a un ataque nucleofílico (Figura 36).

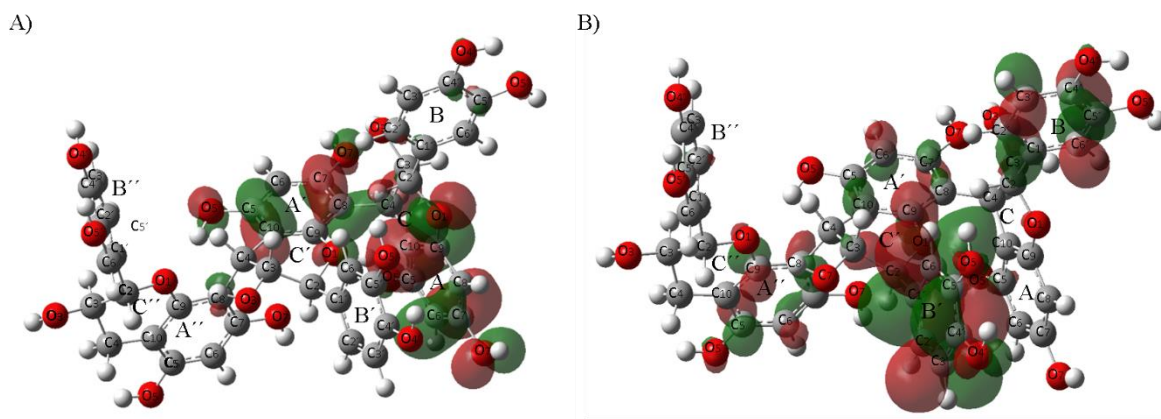


Figura 36. Localización de los orbitales moleculares (A) HOMO y (B) LUMO de procianidina C1 (PAC1), calculado con B3LYP/6-31+G(d,p).

7.2.5 Análisis de Docking Molecular

El análisis de acoplamiento molecular se realizó entre la proteína ricina y los compuestos fenólicos Q, EGCG y proantocianidinas. La proteína ricina presenta dos cadenas, A y B, estas cadenas tienen diferentes sitios activos, un sitio para la cadena A y dos sitios activos para la cadena B, distinguidos como sitio 1 (B₁) y sitio 2 (B₂).

Los resultados muestran interacciones importantes entre el sitio activo de la cadena A y los ligandos Q y EGCG. El resultado obtenido para Q con el sitio activo de la cadena A mostró cuatro puentes de hidrógeno y una interacción $\pi - \pi$ entre TYR 80 y C7 del anillo A, mientras que los resultados para EGCG con el sitio activo en cadena A muestran seis puentes de hidrógeno (Figura 37).

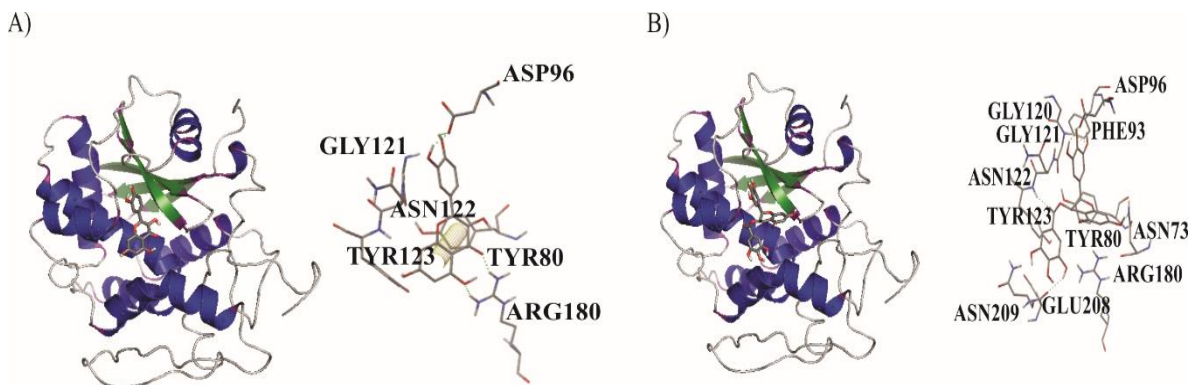


Figura 37. Interacciones moleculares de A) quercetina (Q) y B) epigallocatequina galato (EGCG), ambos con el sitio activo de la cadena A de la proteína ricina.

Por otro lado, la Figura 38 muestra las interacciones entre los sitios activos de la cadena B (B_1 y B_2) y los ligandos Q y EGCG. Los ligandos están unidos por sitios poco profundos en la cadena B, donde se encontraron cinco enlaces de hidrógeno en Q al interactuar con la cadena B_1 y B_2 , y solo dos interacciones π catión entre LYS 40 con C1' y C3' en B_1 . En cambio, en las interacciones de la EGCG con la cadena B, se observaron siete puentes de hidrogeno en B_1 y dos en B_2 .

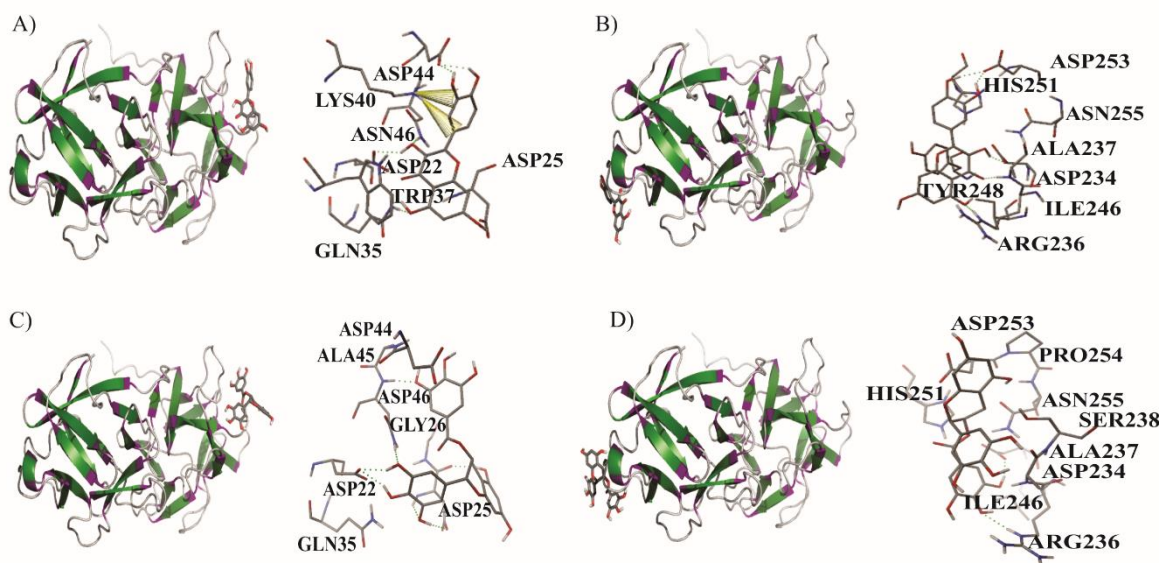


Figura 38. Interacciones moleculares de quercetina (Q) y epigallocatequina galato (EGCG) con los sitios activos de la cadena B de la proteína ricina. A) Q con B_1 , B) Q con B_2 , C) EGCG con B_1 , y D) EGCG con B_2 .

En el análisis realizado con las proantocianidinas, los resultados obtenidos para PAB2 con el sitio activo de la cadena A mostraron seis enlaces por puente de hidrógeno, mientras que en los resultados obtenidos para la PAC1 con la cadena A se mostraron cuatro puentes de hidrógeno (Figura 39).

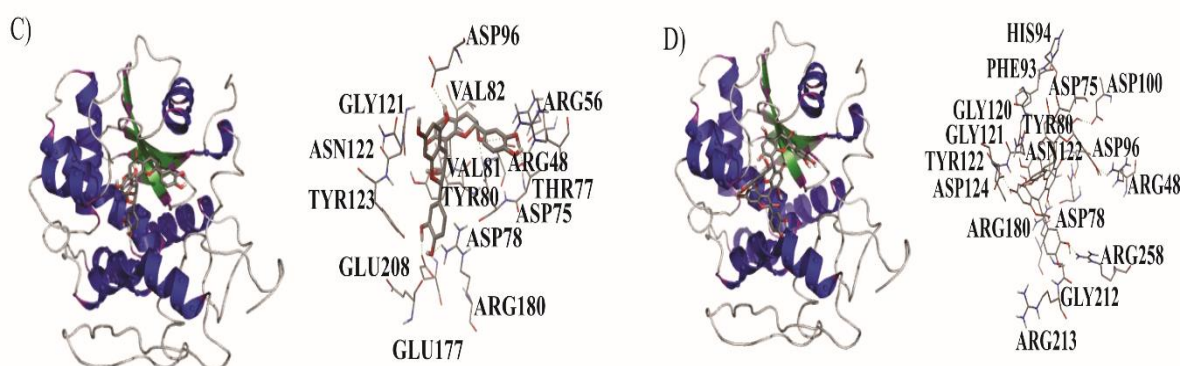


Figura 39. Interacciones moleculares de C) procianidina B2 (PAB2) y D) procianidina C1(PAC1) ambos con el sitio activo de la cadena A de la proteína ricina.

En las interacciones entre los sitios activos de la cadena B (B_1 y B_2) y los ligandos PAB2 y PAC1 se encontraron las siguientes interacciones: dos enlaces por puentes de hidrógeno en PAB2 con interacciones B_1 y B_2 , y una interacción π -catión entre LYS 40 con C1 en el sitio B_1 . En las interacciones de PAC1 con la cadena B se observaron tres puentes de hidrógeno en B_1 y B_2 (Figura 40).

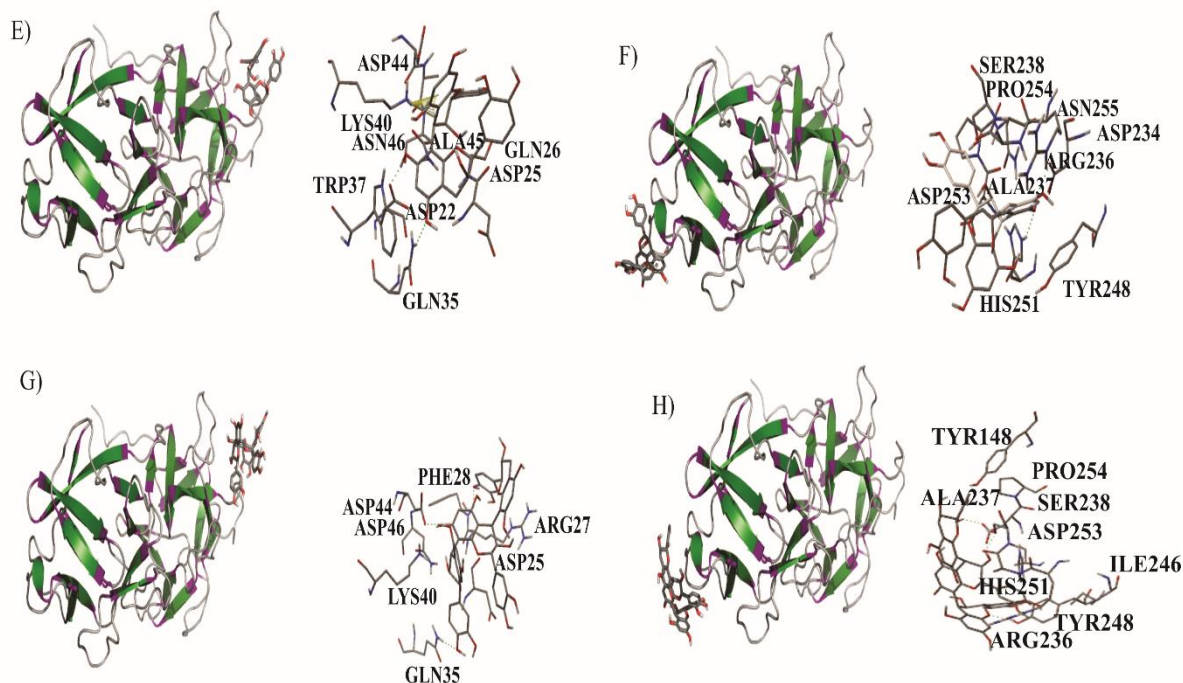


Figura 40. Interacciones moleculares de proantocianidinas con los sitios activos de la cadena B de la proteína ricina. E) PAB2 con B₁, F) PAB2 con B₂, G) PAC1 con B₁ y H) PAC1 con B₂.

Las energías de enlace obtenidas para la cadena A fueron las siguientes: -6,30kcal/mol para Q, -7,43kcal/mol para EGCG, -7.87kcal/mol para PAB2 y -6.61kcal/mol para PAC1. En el caso de la cadena B, la energía más estable se encontró en el sitio B₁ para las cuatro moléculas, estos resultados se muestran en forma de resumen en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Análisis de la interacción molecular entre la proteína ricina (cadenas A y B) con la quercetina (Q) y epigallocatequina galato (EGCG).

Ligando/ cadena	Energía de enlace (kcal/mol)	*Aminoácidos en el sitio activo	Puentes de hidrógeno	Interacción π
Q/A	-6.30	TYR123, ASN122, GLY121, TYR80, ASP96, ARG180	4	1
Q/B ₁	-5.28	GLN35, ASP22, ASP25, ASN46, LYS40, TRP37, ASP44	5	2 π -cation
Q/B ₂	-5.16	HIS251, ASP253, ASN255, ALA237, ASP234, ILE246, ARG236, TYR248	5	-
EGCG/ A	-7.43	PHE93, ASN78, GLY120, GLY121, ASN122, TYR80, ARG180, TYR123, GLU208, ASN209, ASP96	6	-
EGCG/ B ₁	-5.47	ASP44, ALA45, ASN46, GLY26, ASP25, ASP22, GLN35	7	-
EGCG/ B ₂	-3.91	HIS251, ASP253, PRO254, ASN255, SER238, ALA237, ASP234, ILE246, A RG236	2	-

* Los aminoácidos del sitio activo que se muestran en rojo coinciden con los aminoácidos reportados por la bibliografía de Katzin, Collins y Robertus (1991); Rutenber *et al.* (1991).

Tabla 6. Análisis de la interacción molecular entre la proteína ricina (cadenas A y B) con la procianidina B2 (PAB2) y procianidina C1 (PAC1).

Ligandos/ cadena	Energía de enlace (kcal/mol)	*Aminoácidos en el sitio activo	Puentes de hidrógeno	Interacción π
PAB2/A	-7.87	ARG48,THR77, ASN78 ,ARG56,A SP75, ARG180 ,VAL82,VAL81, TY R80 , GLU177 ,GLY121,ASN122, G LU208 , TYR123	6	-
PAB2/B ₁	-3.93	LYS40, ASN46 ,ASP25, ASP22 ,ASP 44,ALA45,GLY26, GLY35 , TRP37	2	π -cation
PAB2/B ₂	-3.84	SER238,PRO254, ASN255 ,ALA237, ASP234 ,ARG236, TYR248 ,HIS251, ASP253	2	-
PAC1/ A	-6.61	ASP100,ASP75,ARG48,HIS94,PH E93,ASP96, TYR80 , ARG180 ,ARG2 58,GLY120,GLY121,ASN122, TYR1 23 ,GLY212,ARG213,ASP124	4	-
PAC1/ B ₁	-2.57	ASP44,LYS40, ASN46 ,PHE28,ASP 25,ARG27, GLY35	3	-
PAC1/ B ₂	-1.87	HIS251,ASP253,PRO254,TYR148, TYR248 ,ALA237,SER238,ARG236, ILE246	3	-

* Los aminoácidos del sitio activo que se muestran en rojo coinciden con los aminoácidos reportados por la bibliografía de Katzin, Collins y Robertus (1991); Rutenber *et al.* (1991).

7.2.6 Ajuste y alineación después de la interacción

El ajuste y alineación se determinó con las geometrías de Q, EGCG, PAB2 y PAC1 antes (en verde) y después (en azul) de las interacciones en los sitios activos de las cadenas A y B. Las diferencias de energía entre ambas geometrías permiten conocer la viabilidad de la interacción con el sitio activo de la proteína.

Los resultados obtenidos no mostraron una diferencia considerable en la energía reportada para la quercetina (Q) antes y después de la interacción, reportando valores en un rango de -0.036 a -0.042 kcal/mol en ambas cadenas. Para la molécula de EGCG se obtuvieron valores de -0.11kcal/mol para la cadena A, -0.12 kcal/mol para B₁ y -0.25 kcal/mol para el sitio B₂, lo cual significa que EGCG

requiere más energía para interactuar con los sitios activos de ambas cadenas, debido a la gran cantidad de ángulos de rotación presentes en la estructura. Como se observa, la interacción en el sitio activo B₂ registra una mayor demanda de energía para la molécula de EGCG. En el caso de las proantocianidinas, la deformación es mayor que la obtenida para la EGCG, ya que la PAB2 contiene un mayor número de ángulos de rotación, registrando valores de -11.04 kcal/mol en la interacción con la cadena A, -11.06 kcal/mol y -10.96 kcal/mol con las cadenas B₁ y B₂ respectivamente. En el caso de la PAC1, existe un mayor número de anillos aromáticos que influye también en su alineación con el sitio activo de la proteína, dicha molécula registró valores de -15.94 kcal/mol en la cadena A, -15.93 kcal/mol en cadena B₁ y -15.96 kcal/mol para la cadena B₂. Las Figuras 41 y 42 muestran las geometrías superpuestas de cada molécula, antes y después de la interacción dentro del sitio activo.

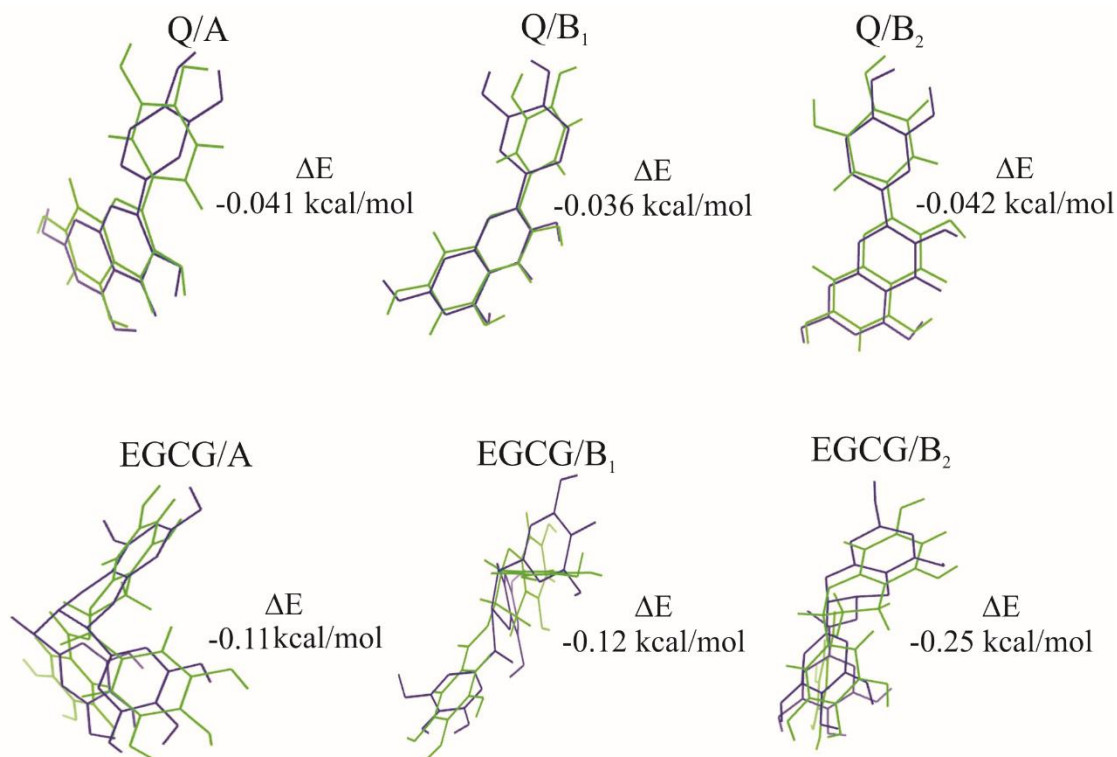


Figura 41. Ajuste y alineación de los ligandos Q y EGCG antes (verde) y después (azul) de la interacción con las cadenas A y B de la proteína ricina, así como la diferencia de energía electrónica total.

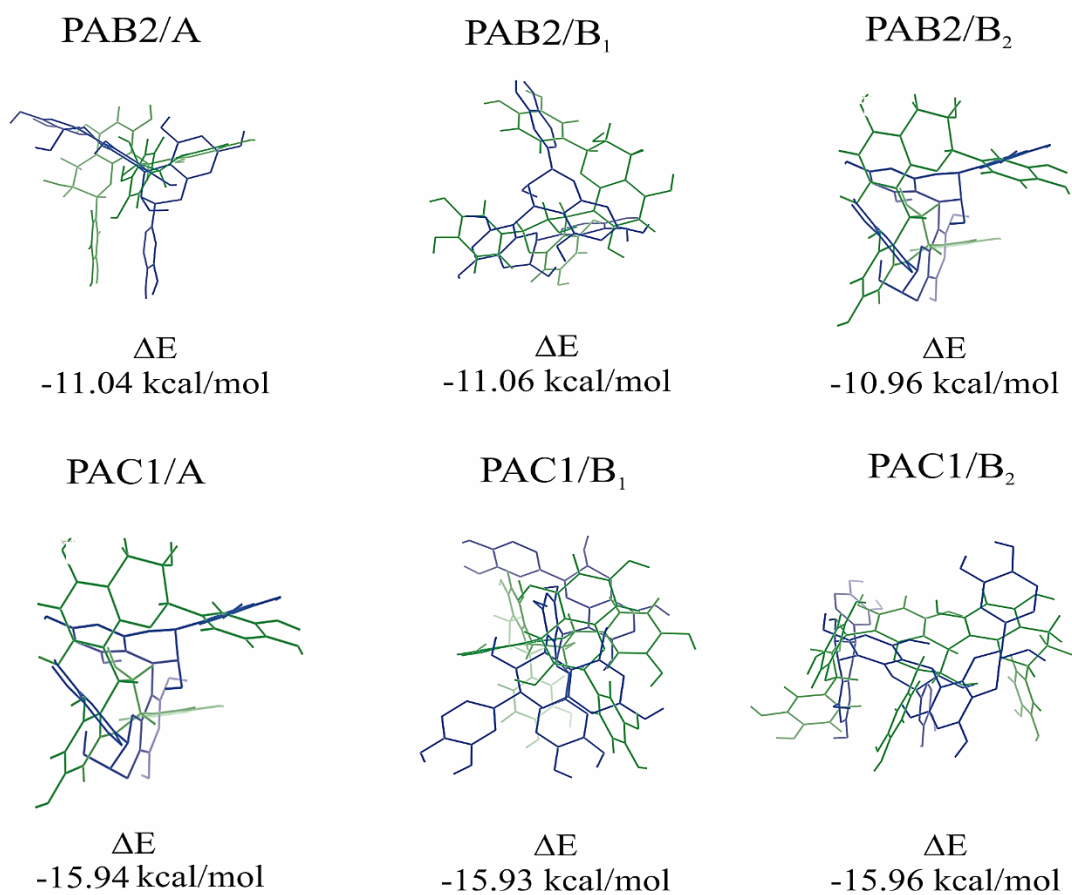


Figura 42. Ajuste y alineación de los ligandos PAB2 y PAC1 antes (verde) y después (azul) de la interacción con las cadenas A y B de la proteína ricina, así como la diferencia de energía electrónica total.

7.2.7 Transferencia de carga (ΔN)

Los parámetros de reactividad química, conocidos como dureza química (η) y potencial químico (μ), fueron utilizados para la determinación de la transferencia de carga (ΔN). Este parámetro describe el número fraccionario de electrones transferidos desde el sistema A hacia el sistema B. En este caso, los polifenoles Q, EGCG y las proantocianidinas, PAB2 y PAC1, fueron seleccionados como el sistema A, mientras que los aminoácidos en el sitio activo fueron seleccionados como el sistema B. Si los valores de ΔN son positivos, indican que el sistema es un donante de electrones. Por el contrario, si los valores de ΔN son negativos, el sistema es un aceptor de electrones.

Para la interacción entre Q y los sitios activos A, B₁ y B₂, los valores obtenidos de ΔN dieron como resultado solo valores negativos, lo que indica que la transferencia de carga fluye de la quercetina a los aminoácidos del sitio activo de la ricina, por lo que se puede establecer que Q actúa como donador de electrones. En el caso de EGCG, el parámetro ΔN mostró algunos valores positivos, por lo que en estos aminoácidos actúa como un aceptor de electrones, sin embargo, con los aminoácidos del sitio activo restantes mostró valores negativos de ΔN , por lo que se puede decir que EGCG actúa como donador de electrones. Estos resultados se muestran en la Figuras 43 y 44.

Por otro lado, el análisis realizado con la PAB2 arrojó los siguientes resultados: en el sitio activo de A y B₁ todos los valores son positivos lo que significa que la procianidina B2 (PAB2) actúa como aceptor de electrones con todos los aminoácidos. Sin embargo, se muestran valores negativos con el sitio activo de la cadena B₂, indicando a PAB2 como donadora de electrones. Caso contrario se presentó con la molécula PAC1, la cual muestra una combinación de valores positivos y negativos con los sitios activos de la cadena A y B₁ observándose un comportamiento tanto donador como aceptor de electrones, en el caso del sitio activo de B₂, la procianidina C1 (PAC1) muestra una tendencia a ser donador de electrones, al registrar solo dos valores positivos con ASP253 y ALA 237 (Figuras 45 y 46).

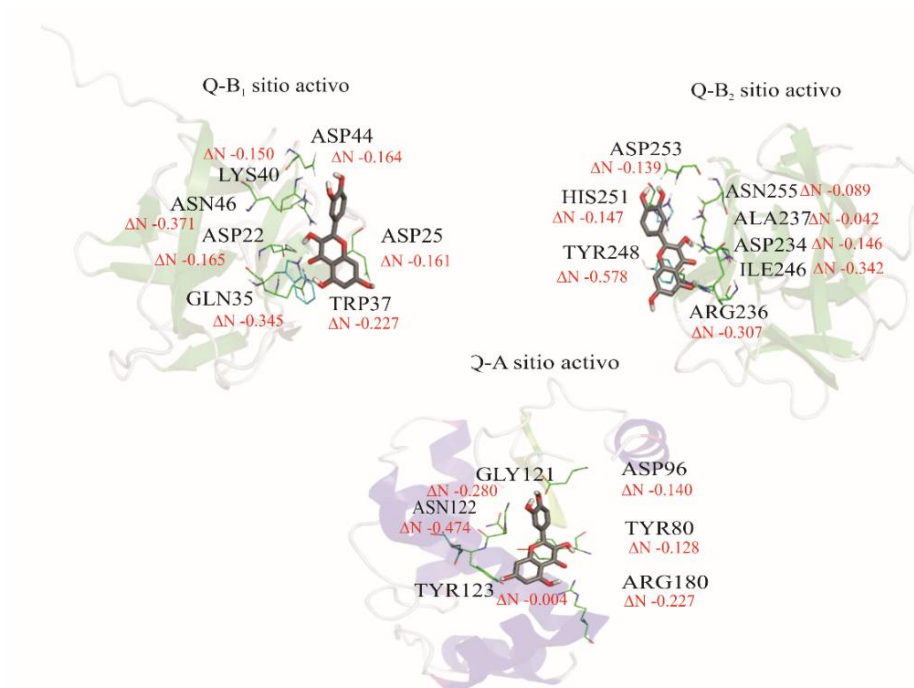


Figura 43. Esquema de transferencia de carga (ΔN) entre la Quercetina y los sitios activos de A, B₁ y B₂ de la proteína ricina.

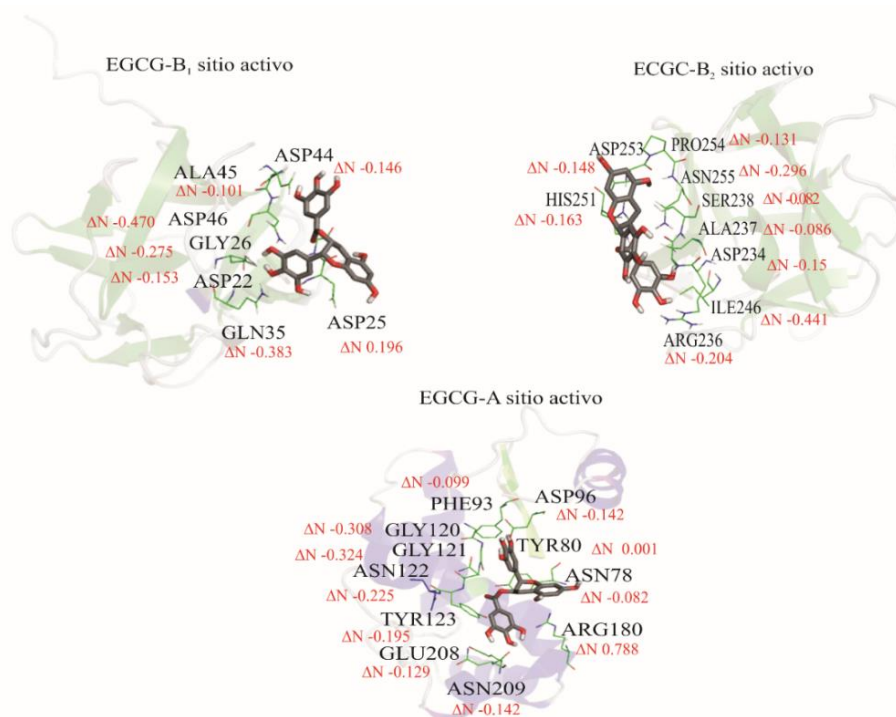


Figura 44. Esquema de transferencia de carga (ΔN) entre la epigallocatequina galato y los sitios activos de A, B₁ y B₂ de la proteína ricina.

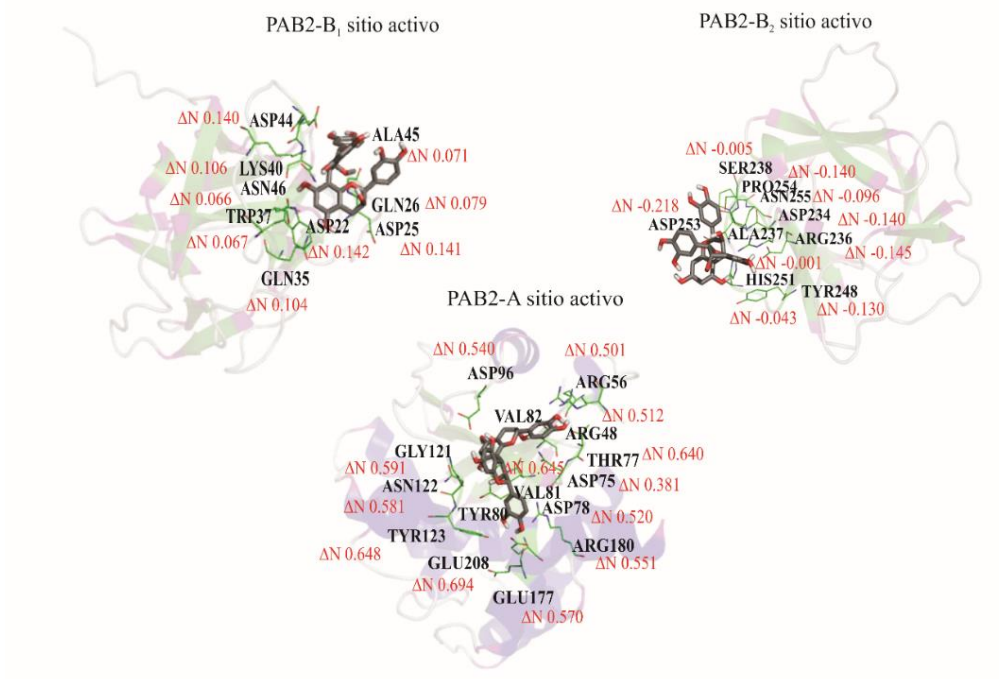


Figura 45. Esquema de transferencia de carga (ΔN) entre la procianidina B2 y sitios activos de A, B₁ y B₂ de la proteína ricina.

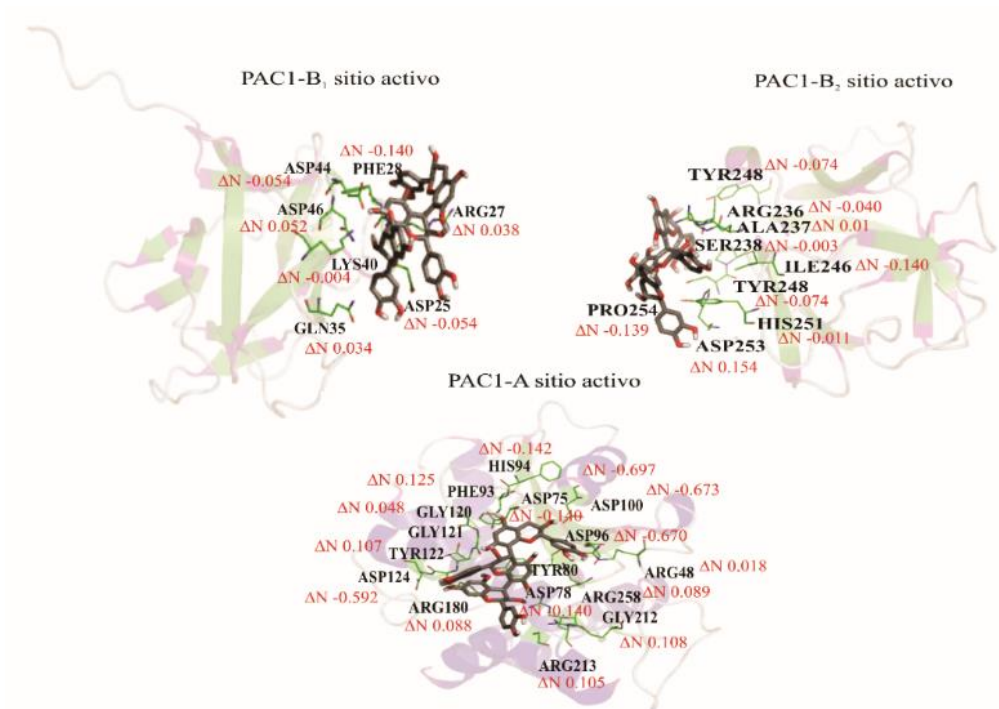


Figura 46. Esquema de transferencia de carga (ΔN) entre la y procianidina C1 y sitios activos de A, B₁ y B₂ de la proteína ricina.

VIII. CONCLUSIONES

Se obtuvo la purificación de la proteína ricina con sus dos subunidades.

Las interacciones realizadas con quercetina mostraron precipitación en todas las concentraciones analizadas mostrando que a partir de 40 $\mu\text{g/mL}$, las soluciones empezaron a presentar saturación.

Las soluciones con menor concentración volvieron a homogenizarse trascurridas 24 horas, a excepción de las muestras saturadas. Por lo cual se sugiere realizar análisis posteriores en las soluciones a bajas concentraciones, para confirmar que sucede con la proteína ricina y su interacción con quercetina.

La curva de absorbancia del sobrenadante por UV-Vis, después de la interacción de la proteína, mostró una disminución al aumentar la concentración de la quercetina, mientras que el precipitado mostró un incremento al aumentar dicha concentración.

Al analizar estadísticamente los resultados del UV-Vis, se observó una diferencia significativa en el análisis de varianza (ANOVA), confirmando con la prueba de Tukey, que existe una diferencia significativa en algunas muestras.

Se observó en el análisis de electroforesis líneas más tenues conforme aumenta la concentración de quercetina, lo que sugiere que la mayor parte de la proteína se queda en el precipitado. Los resultados en las cromatografías de HPLC mostraron una disminución considerable de los picos de la proteína conforme aumenta la concentración.

Después de veinte días las soluciones filtradas y utilizadas en el análisis de HPLC presentaron turbidez y precipitación por lo que se sugiere en trabajos futuros de interacción entre proteínas y compuestos fenólicos realizar análisis variando los tiempos de interacción.

Los cálculos químico-cuánticos mostraron coincidencia en los posibles ataques nucleofílicos y electrofílicos con respecto a los resultados de acoplamiento molecular.

El ajuste y alineación antes y después de la interacción indicó una significativa deformación de las estructuras de las proantocianidinas.

Se observó que el número de grupos -OH no influye por si solo en la afinidad con el sitio activo de la proteína ricina, esto depende también de los ángulos de rotación que tenga el compuesto fenólico, así como el número de anillos presentes. Por otra parte se puede concluir que el comportamiento de los compuestos fenólicos en la transferencia de carga puede ser tanto de aceptor como de donador de electrones, en los tres sitios activos de la proteína ricina, sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos con el acoplamiento molecular, la procianidina B2 y EGCG son los compuestos fenólicos más viables para lograr una interacción favorable que pudiera conducir a una inhibición del sitio activo de la cadena A, en cambio en la cadena B la EGCG es el compuesto fenólico más factible para lograr una interacción que favorezca la inhibición en el sitio activo B₁ y la Q para la inhibición correspondiente al sitio activo B₂.



IX.BIBLIOGRAFÍA

Amaya, N., 2016. *Estudio de la interacción y precipitación de ricina con proantocianidinas obtenidas por extracción con ultrasonido a partir del orujo de uva*. Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua.

Ambekar, V. R., & Dole, K. K. (1957). Detoxication of castor cake. *Indian Journal of Dairy Science*, 10, 107-122.

Arango MAP (1990). *La higuera como alternativa de sombrío de zonas bajas*. Tesis(Licenciatura). Tecnología agropecuaria. Armenia,Universidad del Quindío, Colombia. 71 p

Aron, P. M., & Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular nutrition & food research*, 52(1), 79-104.

Barbieri, L., Battelli, M. G., & Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1154(3-4), 237-282.

Bertrán, J., Branchandell, V., Moreno, M., & Sodupe, M. (2000). Química Cuántica: Fundamentos y Aplicaciones Computacionales. *Síntesis*.

Bort, J. A. (2001). *Química teórica y computacional* (Vol. 2). Publicacions de la Universitat Jaume I.

Braun, A. V., Taranchenko, V. F., Tikhomirov, L. A., Grechukhin, A. P., & Rybal'chenko, I. V. (2018). Detection of Ricin in Plant Extracts and Soil Using Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 73(8), 786-795.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.

Cabrera-Bañegil, M., Schaide, T., Manzano, R., Delgado-Adámez, J., Durán-Merás, I., & Martín-Vertedor, D. (2017). Optimization and validation of a rapid liquid



chromatography method for determination of the main polyphenolic compounds in table olives and in olive paste. *Food chemistry*, 233, 164-173.

Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., & De Freitas, V. (2006). Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8936-8944.

Cataldi, Z., Donnamaría, M. C., & Lage, F. J. (2009). Didáctica de la química y TICs: Laboratorios virtuales, modelos y simulaciones como agentes de motivación y de cambio conceptual. In *IV Congreso de Tecnología en Educación y Educación en Tecnología*.

Chang, R., Collage, W 2002. *Química*. 7th ed. México: McGraw-Hill.

Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J., Haslam, E., Davies, A. P., & Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(6), 1593-1601.

De la Torre-Robles, A., Rivas, A., Lorenzo-Tovar, M. L., Monteagudo, C., Mariscal-Arcas, M., & Olea-Serrano, F. (2014). Estimation of the intake of phenol compounds from virgin olive oil of a population from southern Spain. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(9), 1460-1469.

Deus-de-Oliveira, N., Felix, S. P., Carrielo-Gama, C., Fernandes, K. V., DaMatta, R. A., & Machado, O. L. (2011). Identification of critical amino acids in the IgE epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and the application of glutamic acid as an IgE blocker. *PLoS One*, 6(6), e21455.

Diniz, A., Escuder-Gilabert, L., Lopes, N. P., Villanueva-Camañas, R. M., Sagrado, S., & Medina-Hernández, M. J. (2008). Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(2), 625-632.



Diplock, A. (1998). Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59.

Dyer, P. D. R., Kotha, A. K., Gollings, A. S., Shorter, S. A., Shepherd, T. R., Pettit, M. W., Alexander, B. D., Getti, G. T. M., El-Daher, S., & Baillie, L. (2016). An in vitro evaluation of epigallocatechin gallate (eGCG) as a biocompatible inhibitor of ricin toxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(7), 1541–1550.

FAO. (2002). El Estado Mundial de la Agricultura y la alimentación 2002. La agricultura y los bienes públicos mundiales, diez años después de la cumbre para la tierra. (Issue ISSN 0025-1371).

Foresman, J., & Frish, E. (1996). Exploring chemistry. *Gaussian Inc., Pittsburg, USA*.

Franz, D. R., & Jaax, N. K. (1997). Ricin Toxin (From Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare, P 631-642, 1997, Frederick R. Sidell, MD, Ernest T. Takafuji, MD, eds, *et al.*, See NCJ-190599).

Geerlings, P., De Proft, F., & Langenaeker, W. (2003). Conceptual density functional theory. *Chemical reviews*, 103(5), 1793-1874.

Girbes, T., Ferreras, J. M., Iglesias, R., Citores, L., De Torre, C., Carbajales, M. L., Jimenez, P., De Benito, F. M., & Munoz, R. (1996). Recent advances in the uses and applications of ribosome-inactivating proteins from plants. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 42(4), 461.

Gismera, G., Quintana, C., & Da Silva, P. (2009). Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución. *Universidad Autónoma de Madrid*, 17-21.

Gowda, N. K. S., Pal, D. T., Bellur, S. R., Bharadwaj, U., Sridhar, M., Satyanarayana, M. L., Prasad, C. S., Ramachandra, K. S., & Sampath, K. T. (2009). Evaluation of castor (*Ricinus communis*) seed cake in the total mixed ration for sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(2), 216–220.

Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D.,



- Gebhardt, S., & Prior, R. L. (2004). Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 613–617.
- Hagerman, A. E., & Klucher, K. M. (1986). Tannin-protein interactions. *Progress in clinical and biological research*, 213, 67-76.
- Hagerman, Ann E, Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1887–1892.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950–988.
- Hernández, L. H., & Pérez, C. G. (2002). *Introducción al análisis instrumental*. Grupo Planeta (GBS).
- Hohenberg, P., & Kohn, W. (1964). Density functional theory (DFT). *Phys. Rev*, 136, B864.
- Hollman, P. C. H., Van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., vd Gaag, M. S., Mengelers, M. J. B., De Vries, J. H. M., & Katan, M. B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, 418(1–2), 152–156.
- Hüemmer, W., & Schreier, P. (2008). Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(12), 1381–1398.
- Jin, G. Z., Yamagata, Y., & Tomita, K. (1990). Structure of quercetin dihydrate. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 46(2), 310-313.
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, J. P. A., & Williamson, M. P. (2004). Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules*, 5(3), 942–949.



Katzin, B. J., Collins, E. J., & Robertus, J. D. (1991). Structure of ricin A-chain at 2.5 Å. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 10(3), 251–259.

Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(11), 935–949.

Kryachko, E. S., & Ludena, E. V. (1992). Formulation of N-and v-representable density functional theory. V. Exchange-only self-consistent field. *International Journal of Quantum Chemistry*, 43(6), 769–782.

Landeros-Martinez, L.-L., 2017. *Modelado Molecular de la funcionalización de nanodiamantes con Tamoxifeno dirigido a receptores del cáncer mamario*. Doctorado. Centro de investigación de materiales avanzados, S.C.

Lea, A. G. H., & Arnold, G. M. (1978). The phenolics of ciders: bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(5), 478–483.

Lee, C., Yang, W., & Parr, R. G. (1988). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical review B*, 37(2), 785.

Lengauer, T., & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular Docking. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(3), 402–406.

Lewars, E. (2003). Computational chemistry. *Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*, 318.

Lewin, J. L., & Cramer, C. J. (2004). Rapid Quantum Mechanical Models for the Computational Estimation of C– H Bond Dissociation Energies as a Measure of Metabolic Stability. *Molecular Pharmaceutics*, 1(2), 128–135.

Liyanaarachchi, G. V. V., Mahanama, K. R. R., Somasiri, H. P. P. S., & Punyasiri, P. A. N. (2018). Development and validation of a method for direct, underivatized analysis of free amino acids in rice using liquid chromatography–tandem mass



spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1568, 131-139

Lu, Y., & Foo, L. Y. (2000). Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 55(3), 263–267.

Malacara, D. (2004). *Optica Básica*, 484–488 Fondo de Cultura Económica. México, DF.

Marcotte, E. M., Xenarios, I., & Eisenberg, D. (2001). Mining literature for protein–protein interactions. *Bioinformatics*, 17(4), 359–363.

Martínez, M., 2014. *Extracción de aceite de higuera para su valorización y detoxificación del residuo sólido para su posible aplicación en la industria agroalimentaria*. Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua.

Masiakowski, P., & Wang, S. (2013). Integration of software tools in patent analysis. *World Patent Information*, 35(2), 97–104.

Matthews, S., Mila, I., Scalbert, A., Pollet, B., Lapierre, C., Hervé du Penhoat, C. L. M., Rolando, C., & Donnelly, D. M. X. (1997). Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1195–1201.

McManus, J. P., Davis, K. G., Beart, J. E., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1985). Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (9), 1429-1438.

Minitab, I. N. C. (2010). Minitab 16 statistical software. URL:[Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc.(www.minitab.com).

Olsnes, S., & Kozlov, J. V. (2001). Ricin. *Toxicon*, 39(11), 1723–1728.

Olsnes, S., & Pihl, A. (1973). Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry*, 12(16), 3121–3126.



- Ottaviani, J. I., Momma, T. Y., Kuhnle, G. K., Keen, C. L., & Schroeter, H. (2012). Structurally related (-)-epicatechin metabolites in humans: assessment using de novo chemically synthesized authentic standards. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(8), 1403–1412.
- Parr, R G, & Yang, W. (1989). Density functional theory of atoms and molecules Oxford Univ. Press, New York.
- Parr, Robert G, Donnelly, R. A., Levy, M., & Palke, W. E. (1978). Electronegativity: the density functional viewpoint. *The Journal of Chemical Physics*, 68(8), 3801–3807.
- Parr, Robert G, & Pearson, R. G. (1983). Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. *Journal of the American Chemical Society*, 105(26), 7512–7516.
- Parr, Robert G, Szentpaly, L. v, & Liu, S. (1999). Electrophilicity index. *Journal of the American Chemical Society*, 121(9), 1922–1924.
- Rainey-Smith, S., Schroetke, L.-W., Bahia, P., Fahmi, A., Skilton, R., Spencer, J. P. E., Rice-Evans, C., Rattray, M., & Williams, R. J. (2008). Neuroprotective effects of hesperetin in mouse primary neurones are independent of CREB activation. *Neuroscience Letters*, 438(1), 29–33.
- Ramírez, A., 2017. *Estudio teórico-experimental de funcionalización de nanotubos de carbono con moléculas biológicas por método de amidación utilizando diferentes activadores*. Doctorado. Centro de investigación de materiales avanzados, S.C.
- Ramos, E., 2015. *Obtención de un insecticida biológico a partir de la Higuera (Ricinus communis)*. Licenciatura. Universidad Técnica de Machala.
- Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375–383.
- Riganelli, A., Memelli, M., & Laganà, A. (2002). A molecular dynamics study of the

benzene... ar 2 complexes. *International Conference on Computational Science*, 926–931.

Robb, J. G., Laben, R. C., Walker Jr, H. G., & Herring, V. (1974). Castor meal in dairy rations. *Journal of Dairy Science*, 57(4), 443–450.

Robbins, R. J., Leonczak, J., Li, J., Johnson, J. C., Collins, T., Kwik-Urbe, C., & Schmitz, H. H. (2013). Flavanol and procyanidin content (by Degree of Polymerization 1–10) of chocolate, cocoa liquors, cocoa powders, and cocoa extracts: first action 2012.24. *Journal of AOAC International*, 96(4), 705–711.

Rutenber, E., Katzin, B. J., Ernst, S., Collins, E. J., Mlsna, D., Ready, M. P., & Robertus, J. D. (1991). Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 10(3), 240–250.

Santos-Buelga, C., & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds–nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1094–1117.

Sax, A. F. (2008). Computational Chemistry techniques: covering orders of magnitude in space, time, and accuracy. *Monatshefte Für Chemie-Chemical Monthly*, 139(4), 299–308.

Scalbert, A., Mila, I., Albrecht, A.-M., & Rabot, S. (2000). Proanthocyanidins and human health: systemic effects and local effects in the gut. *Biofactors*, 13(1–4), 115–120.

Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379.

Spek, A. L., Kojic-Prodic, B., & Labadie, R. P. (1984). Structure of (-)-epicatechin:(2R, 3R)-2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-3, 4-dihydro-2H-1-benzopyran-3, 5, 7-triol, C₁₅H₁₄O₆. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 40(12), 2068-2071.



Stirpe, F., & Battelli, M. G. (2006). Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(16), 1850–1866.

Van Buren, J. P., & Robinson, W. B. (1969). Formation of complexes between protein and tannic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(4), 772–777.

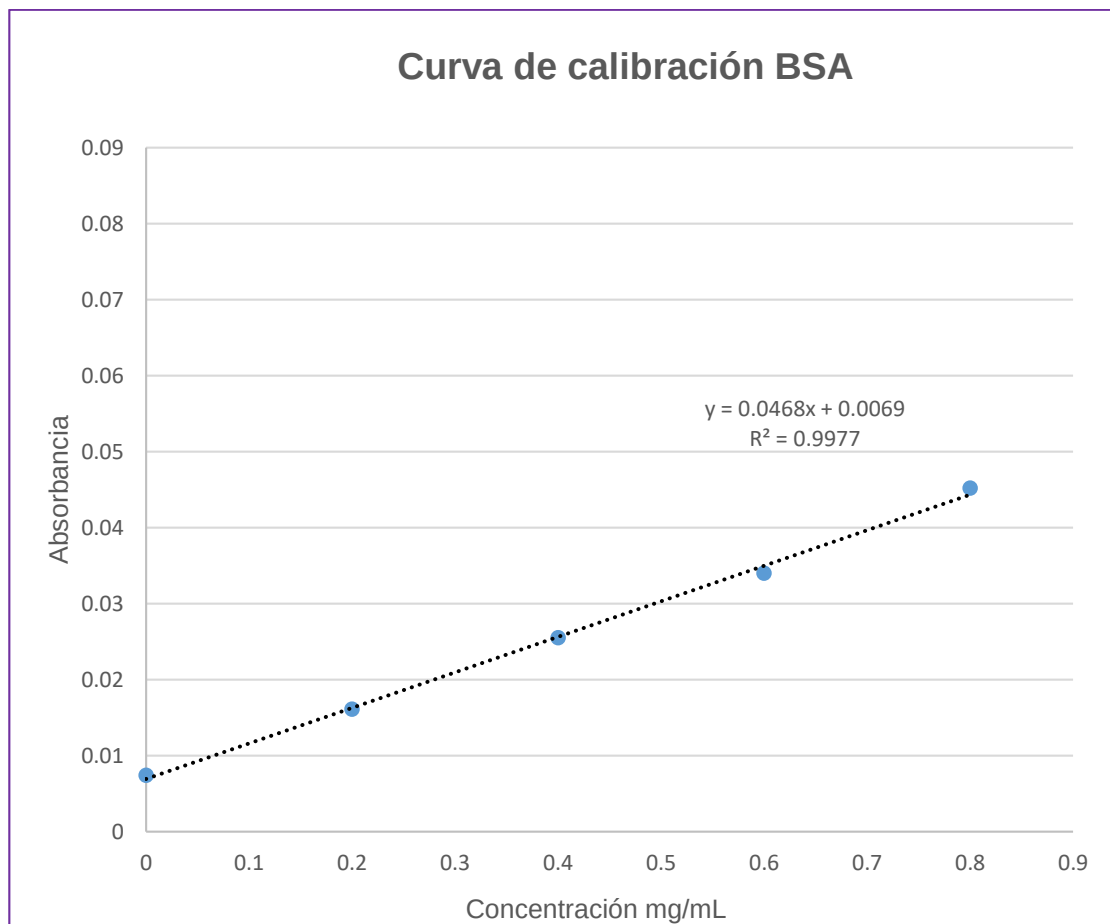
Van Damme, E. J. M., Hao, Q., Chen, Y., Barre, A., Vandenbussche, F., Desmyter, S., Rougé, P., & Peumans, W. J. (2001). Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 20(5), 395–465.

Voisin, G., Jansen, F., & Gros, P. (1982). U.S. Patent No. 4,340,535. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Young, D. C. (2001). A practical guide for applying techniques to real-world problems. *Computational Chemistry*, New York, 9, 390.

X.ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración BSA



Anexo 2. Análisis estadístico sobrenadante

Análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey $\alpha < 0,05$

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Concentración	8 3.8, 7.4, 10.7, 15.2, 40.0, 50.0, 70.0, 90.0

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	7	1.33726	0.191038	357.83	0.000
Error	16	0.00854	0.000534		
Total	23	1.34581			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0231057	99.37%	99.09%	98.57%

Medias

Concentración	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
3.8	3	0.95600	0.01217	(0.92772, 0.98428)
7.4	3	0.8360	0.0596	(0.8077, 0.8643)
10.7	3	0.77600	0.01572	(0.74772, 0.80428)
15.2	3	0.71700	0.00520	(0.68872, 0.74528)
40.0	3	0.47800	0.01212	(0.44972, 0.50628)
50.0	3	0.42200	0.00866	(0.39372, 0.45028)
70.0	3	0.32100	0.00529	(0.29272, 0.34928)
90.0	3	0.29300	0.00721	(0.26472, 0.32128)

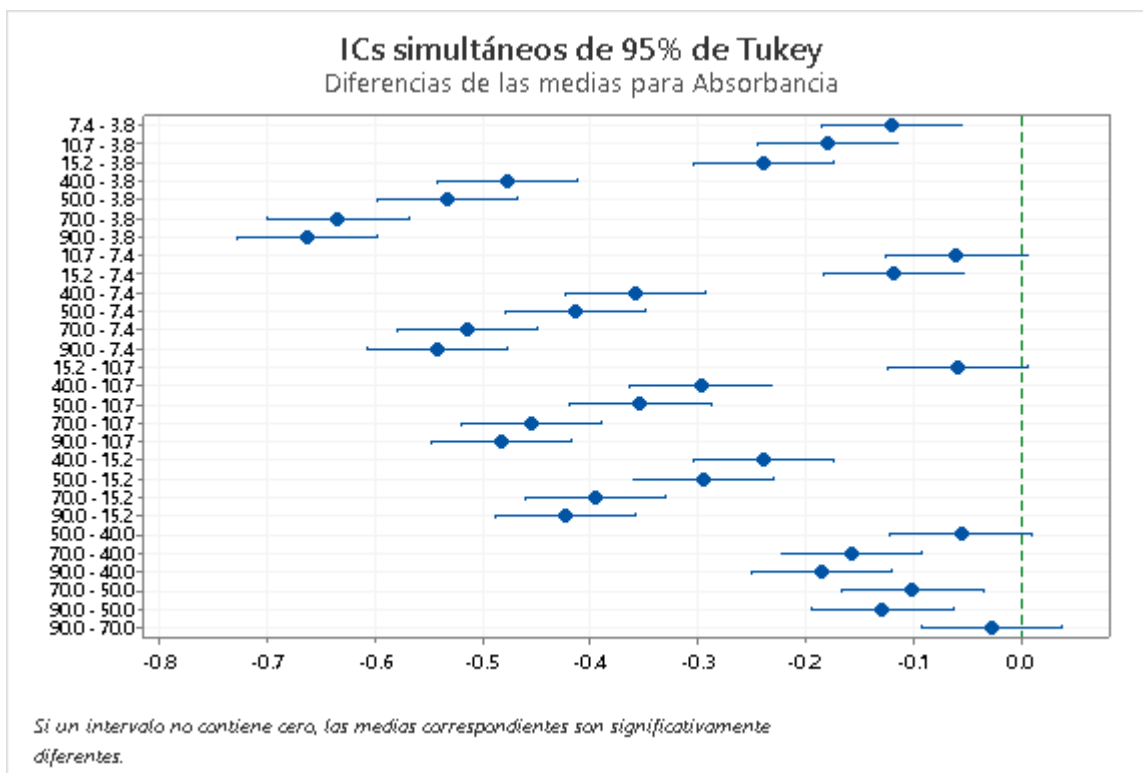
Desv.Est. agrupada = 0.0231057

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Concentración	N	Media	Agrupación
3.8	3	0.95600	A
7.4	3	0.8360	B
10.7	3	0.77600	B C
15.2	3	0.71700	C
40.0	3	0.47800	D
50.0	3	0.42200	D
70.0	3	0.32100	E
90.0	3	0.29300	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



Anexo 3. Análisis estadístico precipitado

Análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey $\alpha < 0.05$

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Concentración	8 3.8, 7.4, 10.7, 15.2, 40.0, 50.0, 70.0, 90.0

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	7	0.78395	0.111993	154.21	0.000
Error	16	0.01162	0.000726		
Total	23	0.79557			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0269490	98.54%	97.90%	96.71%

Medias

Concentración	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
3.8	3	0.01800	0.00265	(-0.01498, 0.05098)
7.4	3	0.03300	0.01044	(0.00002, 0.06598)
10.7	3	0.0500	0.0346	(0.0170, 0.0830)
15.2	3	0.07100	0.00200	(0.03802, 0.10398)
40.0	3	0.18500	0.01345	(0.15202, 0.21798)
50.0	3	0.23900	0.01212	(0.20602, 0.27198)
70.0	3	0.3640	0.0190	(0.3310, 0.3970)
90.0	3	0.5650	0.0617	(0.5320, 0.5980)

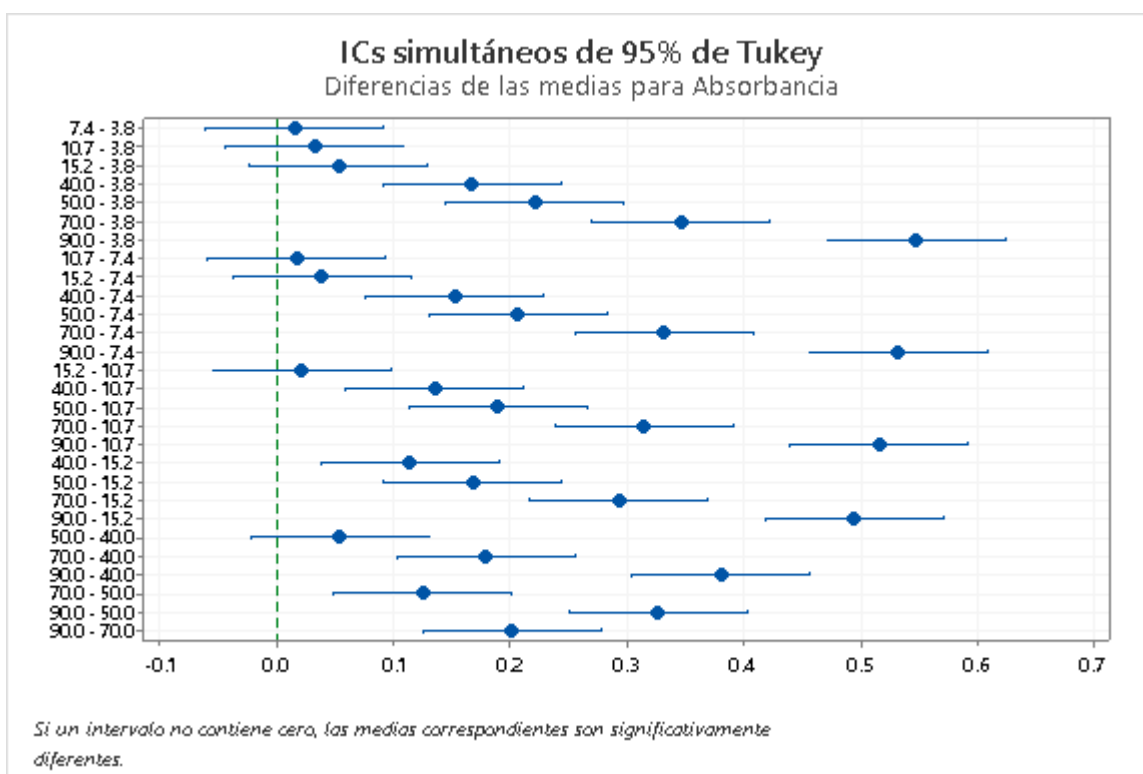
Desv.Est. agrupada = 0.0269490

Comparaciones en parejas de Tukey

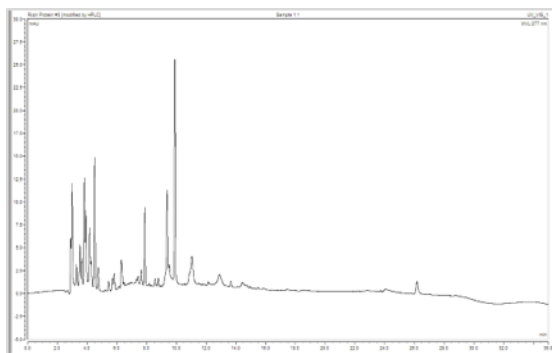
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Concentración	N	Media	Agrupación
90.0	3	0.5650	A
70.0	3	0.3640	B
50.0	3	0.23900	C
40.0	3	0.18500	C
15.2	3	0.07100	D
10.7	3	0.0500	D
7.4	3	0.03300	D
3.8	3	0.01800	D

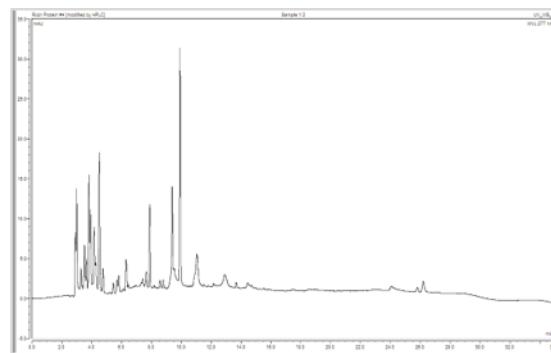
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



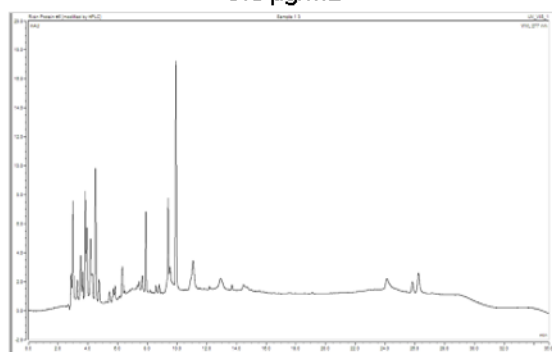
Anexo 4. Muestras HPLC



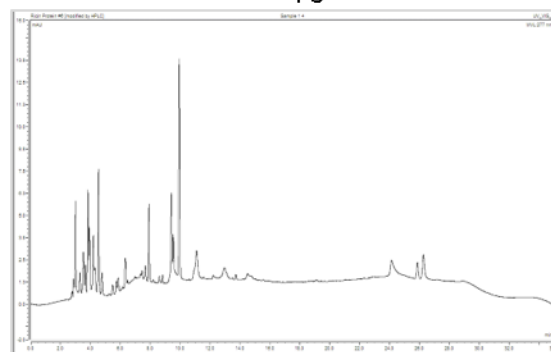
3.8 µg/mL



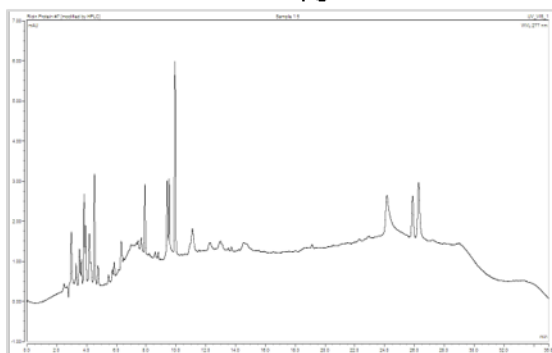
7.4 µg/mL



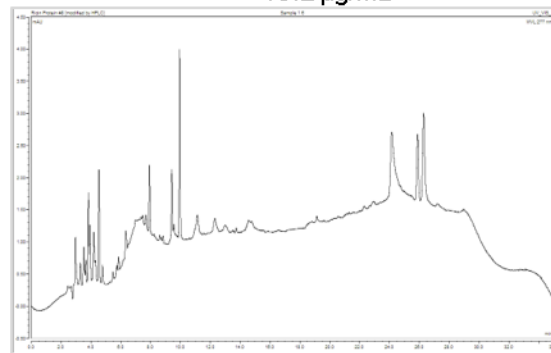
10.71 µg/mL



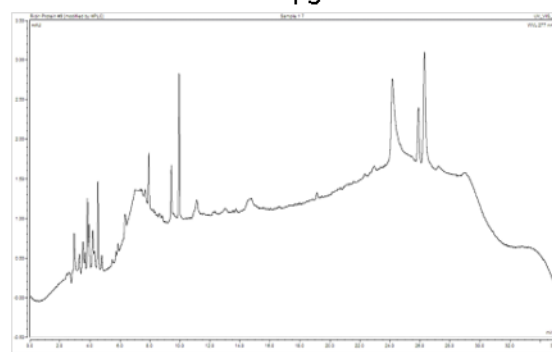
15.2 µg/mL



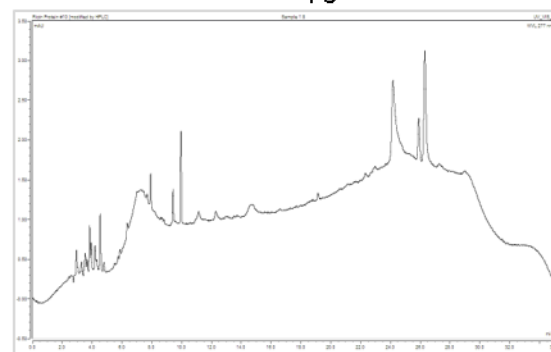
40 µg/mL



50 µg/mL



70 µg/mL



90 µg/mL