

INFORME ANUAL DE ACTIVIDADES PROFESOR VISITANTE 2021

Profesor Visitante: Melchor Martínez Herrera

Proyecto: Síntesis, Caracterización y Evaluación de Derivados del Fullerenos C_{60} como Inhibidores de la Agregación del Péptido β -amiloide.

Institución: Universidad Autónoma Metropolitana

Dependencia: Unidad Cuajimalpa (UAM-C),
Departamento de Ciencias Naturales

31 de octubre de 2021

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 4 |
| 2. Objetivos del proyecto..... | 4 |
| 3. Desarrollo del proyecto y resultados..... | 5 |
| 3.1 Síntesis y caracterización de multiaductos con sustituyente dietil malonato..... | 5 |
| 3.2 Inhibición de la formación de fibrillas del P β A42..... | 7 |
| 3.3 Biocompatibilidad de multiaductos del C ₆₀ | 7 |
| 3.4 Inhibición de la formación de agregados del P β A42 en cultivo celular y tinción por inmunofluorescencia..... | 8 |
| 3.5 Interacción molecular de los multiaductos del C ₆₀ con el P β A42..... | 9 |
| 3.6 Efecto antioxidante de multiaductos del C ₆₀ con sustituyentes disodio malonato..... | 13 |
| 3.7 Inhibición de la Acetilcolinesterasa (AChE) utilizando multiaductos del C ₆₀ con sustituyentes disodio malonato..... | 14 |
| 3.8 Síntesis, purificación y caracterización de derivados malonato..... | 14 |
| 3.9 Síntesis, purificación y caracterización de fullerenmalonoamidas con sustituyentes malono bis-dietil isoftalato amida..... | 18 |
| 3.10 Fortalecimiento de la docencia, investigación y de cuerpos académicos..... | 23 |
| 4. Metodología | 24 |
| 4.1 Síntesis y caracterización de multiaductos con sustituyente dietil malonato..... | 24 |
| 4.2 Inhibición de la formación de fibrillas del P β A42..... | 26 |
| 4.3 Biocompatibilidad de multiaductos del C ₆₀ | 26 |
| 4.4 Inhibición de la formación de agregados del P β A42 en cultivo celular y tinción por inmunofluorescencia..... | 26 |
| 4.5 Interacción molecular de los multiaductos del C ₆₀ con el P β A42..... | 27 |
| 4.6 Efecto antioxidante de multiaductos del C ₆₀ con sustituyentes disodio malonato..... | 27 |
| 4.7 Inhibición de la Acetilcolinesterasa (AChE) utilizando multiaductos del C ₆₀ con sustituyentes disodio malonato..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 4.8 Síntesis, purificación y caracterización de derivados malonato..... | 28 |
| 4.9 Síntesis, purificación y caracterización de fullerenmalonoamidas con sustituyentes malono bis-dietil isoftalato amida..... | 29 |
| 4.10 Caracterización de multiaductos del C ₆₀ y fullerenmalonoamidas..... | 35 |
| 5. Actividades Adicionales..... | 36 |
| 6. Referencias Bibliográficas..... | 37 |

1. Introducción

El proyecto aquí planteado responde a la necesidad de trabajar en la generación de conocimiento relativo a la síntesis y caracterización fullerenos funcionalizados con potenciales aplicaciones biomédicas. La versatilidad en las opciones de modificación exohedrales tridimensionales a partir de la multifuncionalidad de los fullerenos, ha permitido obtener derivados funcionalizados solubles en medio acuoso con potenciales aplicaciones en el emergente campo de la nanomedicina.^[1] Recientes investigaciones han mostrado que los fullerenos interaccionan fuertemente con biomoléculas de gran interés, como es el caso del péptido β -amiloide (P β A42).^[2] La formación de placas β -amiloide es de particular relevancia debido a la relación que tienen con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson o enfermedades relacionadas como la diabetes tipo II.^[3] La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma de demencia más común en adultos mayores, se caracteriza por la muerte neuronal en regiones específicas del cerebro, lo cual se ha asociado a la presencia de dos estructuras patológicas, las placas de β amiloide y las marañas neurofibrilares (MNF), constituidas por el péptido β amiloide (P β A42) y la proteína tau respectivamente.^[4] Actualmente no existen tratamientos preventivos o curativos eficaces que contrarresten esta enfermedad. Sin embargo, la inhibición o disociación de los agregados proteicos que conforman las placas de amiloide β y las MNF, podrían ser un blanco terapéutico atractivo en el tratamiento de esta enfermedad.

2. Objetivos del proyecto

Objetivo General

Sintetizar aductos del fullereno C_{60} (fullerenmalonatos de alquilo y de sodio) que pueden contener de uno a seis sustituyentes tipo malonato, evaluar su capacidad como inhibidores de la agregación del péptido β -amiloide (P β A42) y su biocompatibilidad con células de neuroblastoma humano.

Objetivos Particulares

De Investigación:

- Sintetizar y purificar fullerenmalonatos de alquilo que pueden contener de uno a seis sustituyentes del tipo $C_{60+n}(\text{COR})_{2n}$ ($n= 4-6$ y $R = -\text{OEt}$, o donde $n= 1-6$ y $R= -\text{NHC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{Et}$, $-\text{NHC}_6\text{H}_4(\text{CO}_2\text{Et})_2$); así como sus respectivas sales de sodio $C_{60+n}(\text{COR})_{2n}$ ($n= 4-6$ y $R = -\text{ONa}$, o donde $n= 1-6$ y $R= -\text{NHC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{Na}$, $-\text{NHC}_6\text{H}_4(\text{CO}_2\text{Na})_2$).
- Caracterizar por medio de técnicas espectroscópicas como UV-Vis, FTIR, RMN, y espectrometría de masas los nuevos fullerenmalonatos de alquilo y de sodio sintetizados (aductos del C_{60}).
- Evaluar a través de pruebas *in vitro* la capacidad de los aductos sintetizados como inhibidores de la agregación del (P β A42) y su biocompatibilidad con la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Institucional:

- Fortalecer la docencia e investigación.
- Fortalecer cuerpos académicos.

3. Desarrollo del proyecto y resultados

A continuación, se describen las actividades desarrolladas y productos obtenidos en el periodo del 02 de enero de 2021 al 30 de octubre de 2021 de acuerdo a los objetivos propuestos en el plan de trabajo.

De acuerdo al plan de trabajo establecido, durante este periodo se envió para su publicación el manuscrito “Multiadducts of C_{60} modulate amyloid β fibrillation with dual acetylcholinesterase inhibition and antioxidant properties: *in vitro* and *in silico* studies” en el cual se reporta la síntesis de una serie de multiaductos C_{60} con cuatro a seis sustituyentes dietil malonatos y sus correspondientes sales de sodio como isómeros individuales. Para evaluar su potencial se realizó la fibrilación del P β A42 *in vitro* y en *celulo*; demostramos que los multiaductos modulan la formación de fibrillas de P β A42 sin inducir toxicidad celular y que el número y la polaridad de los sustituyentes desempeñan un papel significativo en la eficacia de los aductos para modular la agregación de P β A42. El mecanismo molecular y modulación de la interacción fullereno-P β A42 se identificó a través de estudios *in silico*. Además, los derivados de fullereno exhibieron capacidad antioxidante y reducción de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las moléculas de multiaductos de C_{60} podrían ser muy prometedoras como punto de partida para el desarrollo de terapias para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer.

3.1 Síntesis y caracterización de multiaductos con sustituyente dietil malonato

Para la síntesis de los multiaductos (tetraducto $C_s-C_{64}(\text{COOEt})_8$, pentaducto $C_{2v}-C_{65}(\text{COOEt})_{10}$ y hexaducto $T_h-C_{66}(\text{COOEt})_{12}$), se siguió la metodología altamente regioselectiva propuesta por Hirsch y col., utilizando el 9,10-dimetil antraceno (DMA) como plantilla, el cual permite la síntesis directa y regioselectiva del $T_h-C_{66}(\text{COOEt})_{12}$ con una adición octahedral y como subproductos una considerable cantidad del tetraducto y pentaducto, con incompleta adición octahedral, evitando de esta manera la tediosa ciclopropanación sucesiva y purificación cromatográfica de los intermediarios.^[5,6] La Figura 3.1, muestra la estructura molecular de los multiaductos del C_{60} conteniendo de cuatro a seis sustituyentes dietil malonil y sus correspondientes sales de sodio, sintetizados y evaluados. Los símbolos C_s , C_{2v} y T_h corresponden a la simetría del grupo puntual de la molécula.

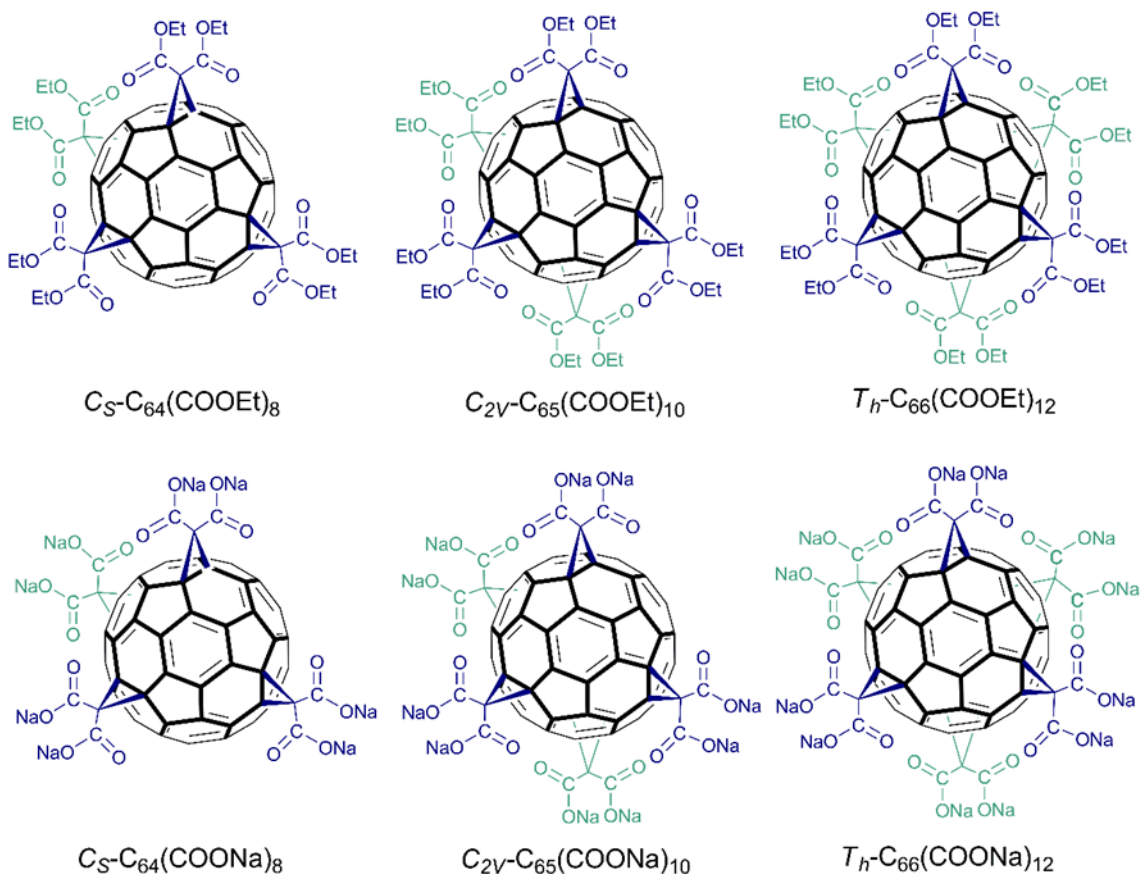


Figura 3.1. Estructura molecular de multiaductos del C_{60} .

Los multiaductos se caracterizaron por espectrometría de masas (ESI-TOF-MS), espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis) e infrarroja (IR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) 1H para el hexaducto $T_h-C_{66}(COOEt)_{12}$.

$T_h-C_{66}(COOEt)_{12}$: ESI-TOF-MS ($CH_3OH:H_2O$ 95:5 v/v) m/z 1669.353 (M^++1), calculado para $C_{102}H_{61}O_{24}$: 1669. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ 4.33 (q, $J = 7$ Hz, 24H; $-CH_2$), 1.37 (t, $J = 7$ Hz, 36H; $-CH_3$). UV-vis (CH_3CN) λ_{max}/nm 316 (sh), 333(sh), 383 (br), 411 (br), 435 (br), 450 (br). IR(KBr)/ cm^{-1} 2979, 2932, 2905, 2855, 1742, 1469, 1445, 1394, 1367, 1347, 1264, 1239, 1219, 1167, 1077, 1043, 1017, 906, 882, 858, 823, 762, 735, 715, 676, 662, 619, 531, 456. **$C_{2v}-C_{65}(COOEt)_{10}$:** ESI-TOF-MS ($CH_3CN:H_2O$ 80:20 v/v) m/z 1511.297 (M^++1), calculado para $C_{95}H_{51}O_{20}$ 1511. UV-vis (CH_3CN) λ_{max}/nm 364 (br), 396 (br), 444 (br), 504 (br), 543 (br), 554 (br), 591 (br). IR(KBr)/ cm^{-1} 2979, 2932, 2858, 1744, 1634, 1465, 1445, 1391, 1368, 1298, 1233, 1179, 1100, 1066, 1021, 858, 810, 756, 739, 706, 674, 542, 523. **$C_5-C_{64}(COOEt)_8$:** ESI-TOF-MS (m/z ; $CH_3CN:H_2O$ 80:20 v/v) 1353.240 (M^++1), calculado para $C_{88}H_{41}O_{16}$ 1353; UV-vis (CH_3CN) λ_{max}/nm 418 (br), 440 (br), 450(br), 480 (br), 526 (br), 553 (br). IR(KBr)/ cm^{-1} 2963, 2925, 2854, 1743, 1643, 1464, 1445, 1388, 1368, 1296, 1260, 1230, 1175, 1098, 1062, 1022, 858, 804, 729, 705, 663, 543, 529, 459. El espectro ESI-TOF-MS mostró el ion molecular idénticos a los calculados. El espectro de RMN de 1H de la muestra del hexaducto ($T_h-C_{66}(COOEt)_{12}$) mostró sólo un triplete para los

protones del metilo y un cuadruplete para los protones del metileno, indicando que la muestra está constituida por sólo un isómero individual. El espectro UV-Vis e IR mostró datos espectroscópicos idénticos a aquellos reportados.

Las correspondientes sales de sodio fueron identificadas por el desplazamiento de la frecuencia vibracional intensa y característica del carbonilo del grupo éster en el espectro IR, de $\nu = 1743\text{ cm}^{-1}$ a $\nu = 1620\text{ cm}^{-1}$, 1612 cm^{-1} y 1644 cm^{-1} para el tetra-, penta- y hexaaducto, respectivamente; debido al debilitamiento isomérico del doble enlace (C=O) en el grupo dicarboxilato. Además, las pruebas de solubilidad mostraron que las sales de sodio son solubles en medio acuoso a diferencia de los correspondientes derivados ésteres.

$T_h\text{-C}_{66}(\text{COONa})_{12}$: UV-Vis (CH_3OH) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 318; IR(KBr)/ cm^{-1} 2963, 2926, 2854, 1644, 1615, 1589, 1458, 1425, 1385, 1335, 1210, 1048, 976, 916, 872, 846, 800, 748, 705, 668, 649, 605, 563, 539, 510, 439. **$C_{2v}\text{-C}_{65}(\text{COONa})_{10}$:** UV-vis (CH_3OH) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 303, (sh), 351 (sh), 400 (br), 456 (br), 497 (br), 540 (br), 559 (br), 585 (br); IR(KBr)/ cm^{-1} 2962, 2925, 2855, 1779, 1612, 1406, 1382, 1335, 1211, 1105, 1054, 880, 842, 747, 704, 673, 546, 523. **$C_s\text{-C}_{64}(\text{COONa})_8$:** UV-vis (CH_3OH) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ 365 (br), 411(br), 458 (br), 483 (br), 529 (br), 558 (br), 594 (br), 619 (br); IR(KBr)/ cm^{-1} 2963, 2926, 2854, 1779, 1620, 1459, 1406, 1379, 1332, 1105, 1063, 880, 844, 727, 701, 671, 548.

3.2 Inhibición de la formación de fibrillas del P β A42

Para determinar el efecto de los multiaductos de C_{60} sobre la agregación de P β A42, se realizó un ensayo de polimerización del P β A42. Se incubó específicamente monómeros del P β A42 sin pre-agregados en presencia o ausencia de los compuestos y se llevó a cabo un ensayo de fluorescencia de Tioflavina T (TfT). En la Figura 3.2A, el análisis muestra una menor formación de fibrillas de P β A42 en presencia de los seis multiaductos del C_{60} en comparación con el control durante 24 h, evaluados en tres experimentos independientes por triplicado. La muestra del tetraaducto $C_s\text{-C}_{64}(\text{COOEt})_8$ y su correspondiente sal de sodio $C_s\text{-C}_{64}(\text{COONa})_8$, así como aquella del hexaducto $T_h\text{-C}_{66}(\text{COOEt})_{12}$ mostraron la mayor inhibición de la agregación del P β A42 en un 87 %, 88 % y 85 %, respectivamente (Figura 3.2B).

3.3 Biocompatibilidad de multiaductos del C_{60}

Para evaluar el efecto citotóxico de la serie de multiaductos se usó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y empleando el ensayo MTT. Las células se incubaron durante 24 h en presencia de los compuestos a $13\text{ }\mu\text{M}$. La mayor viabilidad celular se encontró para los aductos con teniendo el sustituyente disodio malonato, $C_s\text{-C}_{64}(\text{COONa})_8$, $C_{2v}\text{-C}_{65}(\text{COONa})_{10}$, $T_h\text{-C}_{66}(\text{COONa})_{12}$ (Figura 3.3A). Las lecturas de absorbancia mostraron una toxicidad insignificante asociada a las sales de sodio a la concentración evaluada. Estos resultados indican que ésta modificación molecular reduce la agregación y a su vez aumenta la biocompatibilidad. La concentración citotóxica para reducir la viabilidad celular en un 50% (CC50) se realizó con la serie de multiaductos de C_{60} . Los valores de CC50 se encontraron en un intervalo de 35 a $45\text{ }\mu\text{M}$, estos datos indicaron que la concentración tóxica para estas moléculas es considerablemente más alta que la

concentración correspondiente para inhibir la formación de fibrillas del P β A42 (Figura 3.3B).

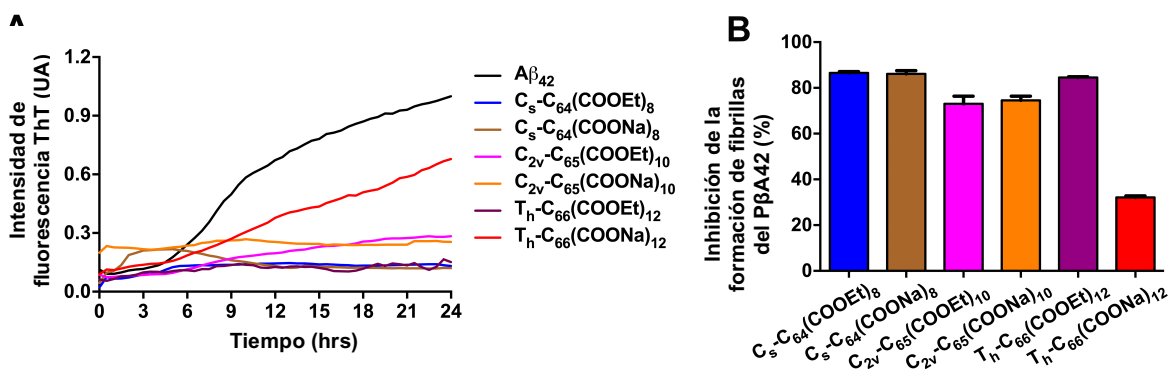


Figura 3.2. (A) Ensayo de polimerización del P β A42 se realizó (P β A42, línea negra) en presencia de la serie de multiaductos (líneas de colores), los cuales reducen significativamente la intensidad de la fluorescencia (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia; los valores se normalizaron a la señal de fluorescence del péptido a las 24 horas.

3.4 Inhibición de la formación de agregados del P β A42 en cultivo celular y tinción por inmunofluorescencia

Para evaluar la actividad del multiaducto líder sobre la agregación del P β A42 en cultivo celular, se llevó a cabo un ensayo de fibrilización de P β A42 en presencia o ausencia del C_s-C₆₄(COONa)₈. La sal del tetraaducto se seleccionó entre los otros ya que mostró la mayor inhibición de la agregación del P β A42 y la menor toxicidad. La mezcla de fibrilización de P β A42 se incubó en células SH-SY5Y cultivadas y se analizó mediante microscopía confocal. La inmunotinción panorámica (Figura 3.4.1A) mostró una alta agregación del P β A42, estos agregados se asociaron a las membranas celulares y se distribuyeron principalmente alrededor del soma celular. En aquellas células incubadas con mezcla de agregación del P β A42 y C_s-C₆₄(COONa)₈, los agregados de A β no fueron detectables (Figura 3.4.1B). Un aumento mayor de este fenómeno se muestra en los paneles C y D de la Figura 3.4.1. Estos datos demostraron la capacidad del tetraaducto para bloquear o retrasar la agregación del P β A42 en cultivo celular, y son consistentes con el resultado del ensayo TtT.

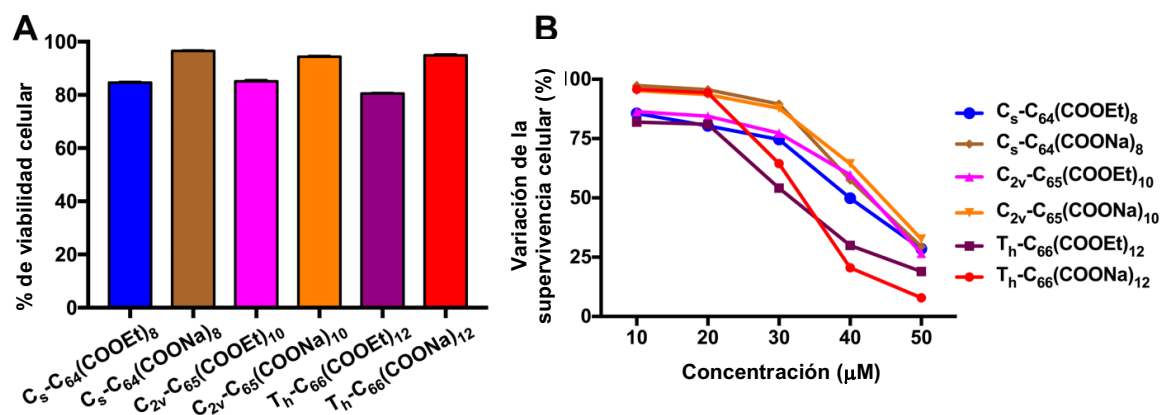


Figura 3.3. Línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y incubada individualmente con cada multiaducto (A). Concentración citotóxica para reducir la viabilidad celular (B). Ambos se evaluaron por el ensayo MTT.

3.5 Interacción molecular de los multiaductos del C_{60} con el PβA42

Para identificar los sitios de unión entre el PβA42 y los multiaductos del C_{60} , los cuales son responsables de la inhibición de la agregación del péptido se realizó un estudio por Docking Molecular. La Tabla 3.5.1 muestra los resultados para la energía de afinidad multiaducto-PβA42 obtenidos por Docking molecular. Como se puede observar en dicha Tabla, los multiaductos conteniendo de 4 a 6 sustituyentes dietil malonato muestran valores de energía de afinidad menos negativos que sus respectivas sales de sodio; lo cual significa que la interacción entre las sales de sodio y el PβA42 es más fuerte que aquella entre el péptido y los fullerenmalonato de etilo. Se puede observar también que la energía de afinidad más negativa es aquella entre el péptido y el C_{60} , indicando que la interacción entre el PβA42 y C_{60} es aún más fuerte que aquella de las sales de sodio estudiadas, sin embargo, los estudios de biocompatibilidad indican que el C_{60} es muy citotóxico.

La Figura 3.5.1 muestra la localización de los multiaductos, encontrados por Docking molecular. Como se puede observar, el fullereno C_{60} es el único ligando que se encuentra sobre una superficie distinta a aquella de los multiaductos e interacciona con 4 residuos hidrofóbicos como son: VAL12, GLY38, VAL39 y VAL40. Además, se encontró que el C_{60} interacciona con la parte aromática del residuo TYR10 (ver también Tabla 3.5.2). Por otra parte, se puede observar también en la Figura 3.5.1 que los fullerenmalonatos de etilo y de sodio se encuentran en el lado opuesto del C_{60} .

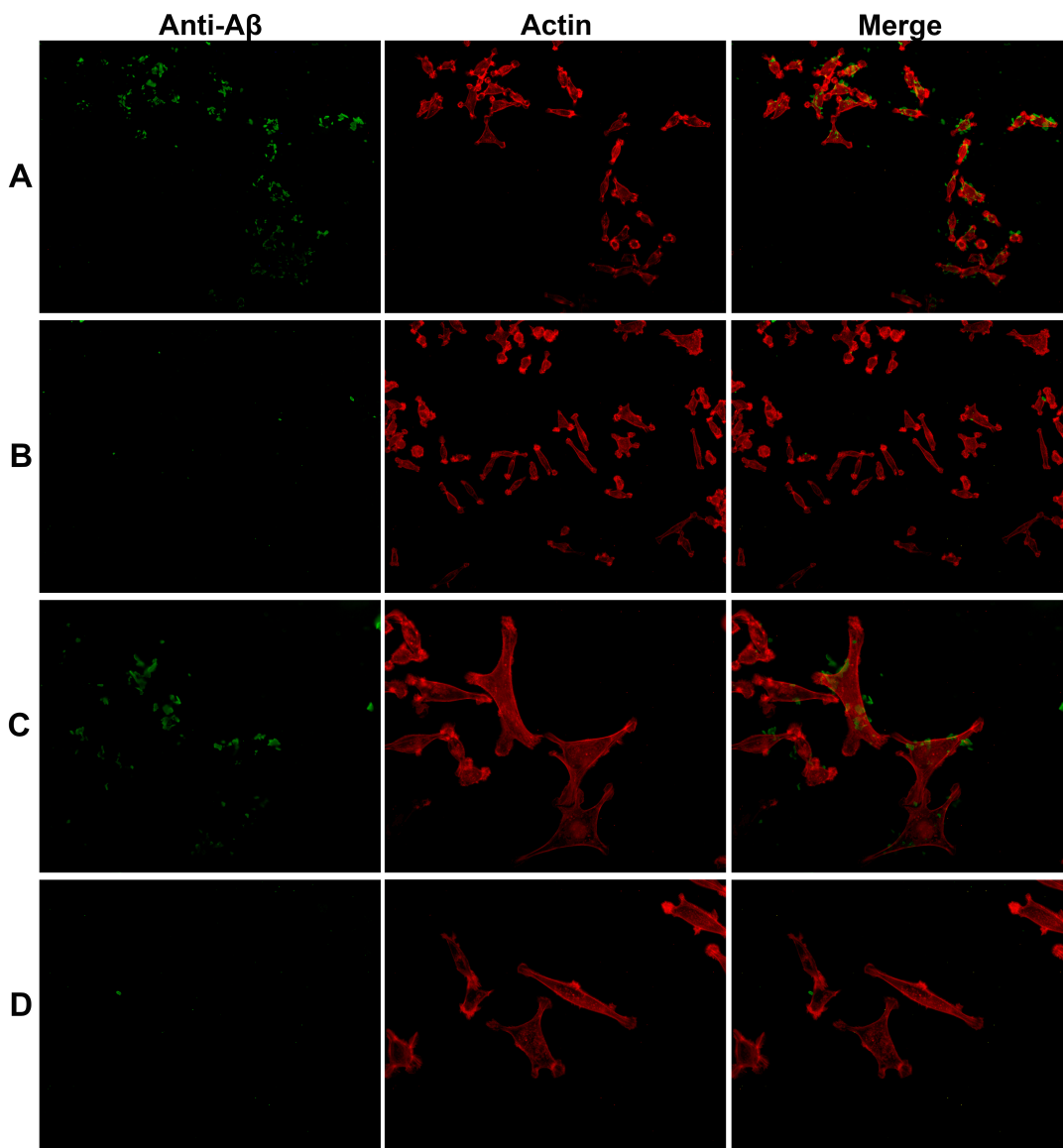


Figura 3.4.1 En presencia de la sal de sodio del tetraaducto el PβA42 no muestran agregación. Inmunofluorescencia de células SH-SY5Y incubadas con polímeros del PβA42 (A, bajo aumento y C, alto aumento) y con $C_s-C_{64}(COONa)_8$ (B, bajo aumento y D, alto aumento).

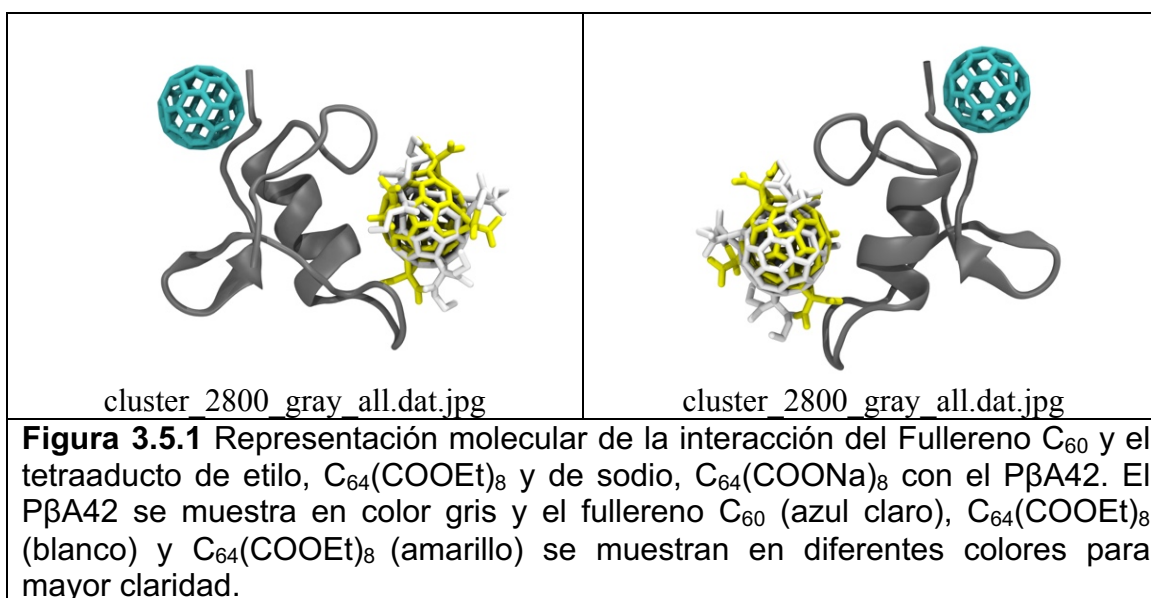
La Tabla 3.5.1 muestra los resultados para la energía de afinidad ligando-PβA42 obtenidos por Docking molecular. Como se puede observar en dicha Tabla, los multiaductos conteniendo de 4 a 6 sustituyentes dietil malonato muestran valores de energía de afinidad menos negativos que sus respectivas sales de sodio; lo cual significa que la interacción entre las sales de sodio y el PβA42 es más fuerte que aquella entre el péptido y los multiaductos éster. Se puede observar también que la energía de afinidad más negativa es aquella entre el péptido y el C_{60} , indicando que la interacción entre el PβA42 y C_{60} es aún más fuerte que aquella

de las sales de sodio estudiadas, sin embargo, los estudios de biocompatibilidad indican que el C_{60} es muy citotóxico.

La Figura 3.5.1 muestra la localización de los ligandos (C_{60} y multiaductos), encontrados por Docking molecular. Como se puede observar, el fullereno C_{60} es el único ligando que se encuentra sobre una superficie distinta a aquella de los otros ligandos e interactúa con 4 residuos hidrofóbicos como son: VAL12, GLY38, VAL39 y VAL40. Además, se encontró que el C_{60} interactúa con la parte aromática del residuo TYR10 (ver también Tabla 3.5.2). Por otra parte, se puede observar también en la Figura 3.5.1 que los multiaductos se encuentran en el lado opuesto del C_{60} .

Tabla 3.5.1 Energía de afinidad por Docking molecular entre el P β A42 y cada multiaducto del C_{60} . El valor entre paréntesis corresponde al número de miembros encontrados en el cúmulo mas poblado.

| Ligando | Energía de afinidad (kcal/mol) |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| C_{60} (100) | -9.6 +/- 0.0 |
| $C_{64}(\text{COOEt})_8$ (36) | -5.1 +/- 0.1 |
| $C_{65}(\text{COOEt})_{10}$ (64) | -4.8 +/- 0.1 |
| $C_{66}(\text{COOEt})_{12}$ (35) | -4.1 +/- 0.1 |
| $C_{64}(\text{COONa})_8$ (100) | -8.2 +/- 0.0 |
| $C_{65}(\text{COONa})_{10}$ (100) | -7.4 +/- 0.0 |
| $C_{66}(\text{COONa})_{12}$ (57) | -6.2 +/- 0.0 |



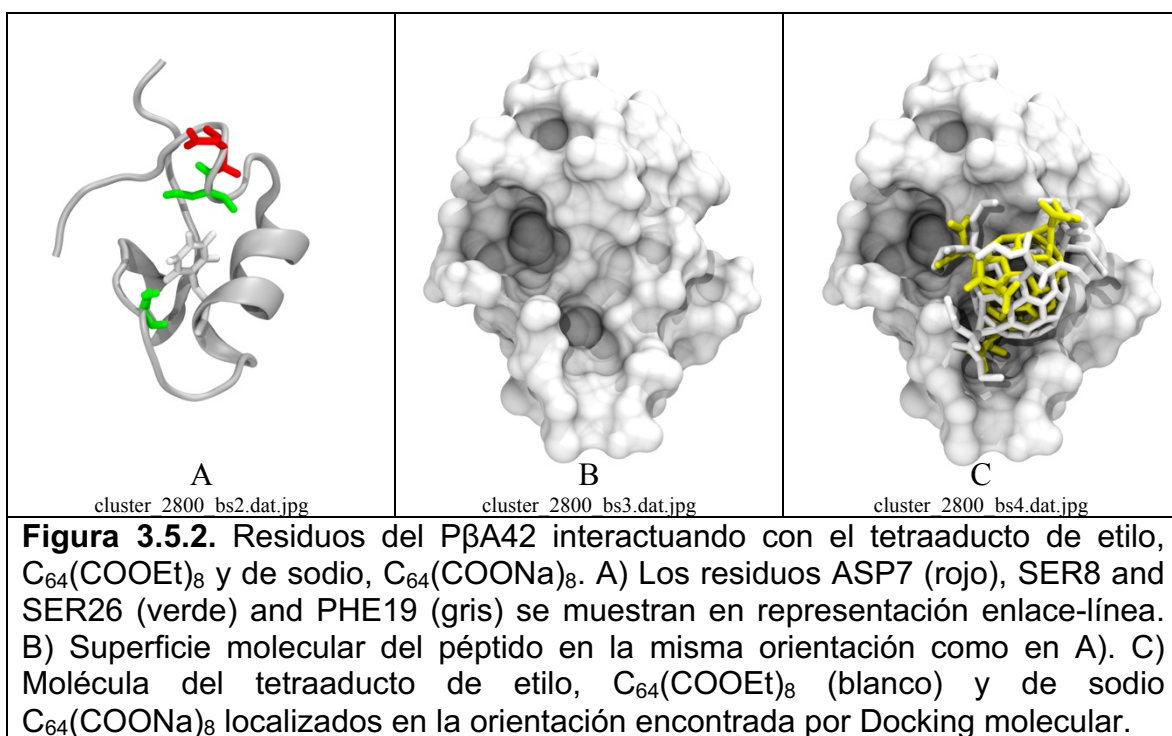
La Tabla 3.5.2 muestra también que estos ligandos se pueden agrupar en 2 grupos con respecto a su interacción con los residuos del P β A42. El grupo uno conformado por los multiaductos conteniendo 4 y 5 sustituyentes y el grupo dos conformado por aquellos con 6 sustituyentes. Además, ambos grupos de

multiaductos comparten interacción con los residuos ASP7, SER8, PHE19 and SER26.

Tabla 3.5.2. Residuos del P β A42 que interaccionan a una distancia de 5 Å con cualquiera de los átomos del C₆₀ y los multiaductos.

| C ₆₀ | C ₆₄ (COOEt) ₈ | C ₆₅ (COOEt) ₁₀ | C ₆₆ (COOEt) ₁₂ | C ₆₄ (COONa) ₈ | C ₆₅ (COONa) ₁₀ | C ₆₆ (COONa) ₁₂ |
|-----------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| TYR10 | | | ASP1 | | | ASP1 |
| GLU11 | | | ALA2 | | | ALA2 |
| VAL12 | | | GLU3 | | | GLU3 |
| GLN15 | | | PHE4 | | | PHE4 |
| GLY38 | | | ARG5 | ARG5 | ARG5 | ARG5 |
| VAL39 | | | HIS6 | | | |
| VAL40 | ASP7 | ASP7 | ASP7 | ASP7 | ASP7 | ASP7 |
| | SER8 | SER8 | SER8 | SER8 | SER8 | SER8 |
| | GLY9 | | | | | |
| | HIS14 | HIS14 | | HIS14 | HIS14 | |
| | VAL18 | VAL18 | | VAL18 | VAL18 | |
| | PHE19 | PHE19 | PHE19 | PHE19 | PHE19 | PHE19 |
| | GLU22 | GLU22 | | GLU22 | GLU22 | |
| | | ASP23 | | ASP23 | ASP23 | |
| | VAL24 | VAL24 | | VAL24 | VAL24 | |
| | GLY25 | GLY25 | | GLY25 | GLY25 | |
| | SER26 | SER26 | SER26 | SER26 | SER26 | SER26 |
| | | ASN27 | LYS28 | ASN27 | ASN27 | |
| | LYS28 | LYS28 | | | LYS28 | LYS28 |
| | | | GLY29 | | | GLY29 |
| | | | ALA30 | | | |

Las interacciones con SER8 y SER26 se pueden explicar a partir de la formación de enlaces de hidrógeno entre los ligandos y los residuos de serina. Para el caso de PHE19, como sabemos es un residuo hidrofóbico, por lo cual puede estabilizar la superficie no polar de los ligandos. La ausencia de la superficie no polar puede explicar porqué los aductos con 6 sustituyentes tienen la energía de afinidad menos negativa y en consecuencia la interacción más débil con el P β A42. La Figura 3.5.2 muestra que los residuos ASP7, SER8, PHE19 y SER26, se encuentran localizados en la misma cara del péptido, proporcionando a los ligandos un sitio de enlace con residuos polares e hidrofóbicos que permiten estabilizar e inhibir la agregación del P β A42.



3.6 Efecto antioxidante de multiaductos del C_{60} con sustituyentes disodio malonato

Para evaluar la capacidad de los multiaductos como captadores de radicales libres se realizó el ensayo del radical libre 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH). Para ello, se evaluaron las respectivas sales de sodio, mostrando todos los compuestos una inhibición antioxidante de 65,8%, 63,6% y 66,1% para tetra, penta y hexaaducto, respectivamente; a una relación molar 1:1 DPPH/multiaducto (Figura 3.6).

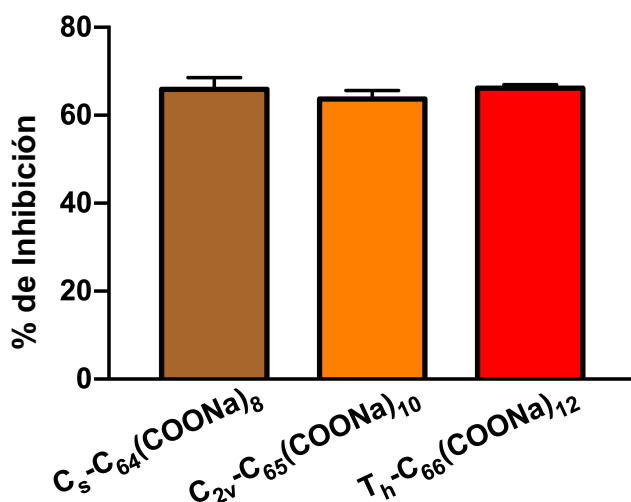


Figura 3.6. Porcentaje de inhibición de radicales libres de $C_{66}(\text{COONa})_{12}$, $C_{65}(\text{COONa})_{10}$ and $C_{64}(\text{COONa})_8$ utilizando el ensayo DPPH.

3.7 Inhibición de la Acetilcolinesterasa (AChE) utilizando multiaductos del C₆₀ con sustituyentes disodio malonato

Para determinar la inhibición de la AChE se utilizó el ensayo de Ellman. Se encontró que las sales de sodio inhiben la colinesterasa de manera dependiente de la concentración (8 a 25 μM), con una inhibición del 57% al 90%; sin embargo, se encontró que la inhibición disminuye cuando el ensayo se realizó a una concentración de 40 μM (Figura 3.7). De acuerdo con nuestros resultados, las sales de sodio de los multiaductos del C₆₀ demostraron su capacidad para inhibir la AChE y se propone la ocurrencia de una presunta inhibición competitiva a través de la unión directa de sitios activos catalíticos y la interacción de sitios aniónicos periféricos, al bloquear la entrada de la cavidad de la AChE a través del apilamiento π - π e interacción de van der Waals con los residuos aromáticos clave; sin embargo, es necesario estudiar el mecanismo de inhibición específico de estas moléculas.

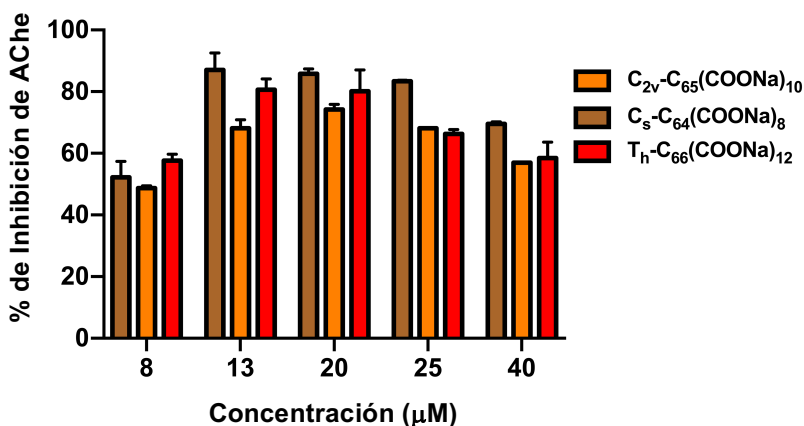


Figura 3.7. Inhibición enzimática de AChE a diferentes concentraciones de $\text{T}_h\text{-C}_{66}(\text{COONa})_{12}$, $\text{C}_{2v}\text{-C}_{65}(\text{COONa})_{10}$ y $\text{C}_s\text{-C}_{64}(\text{COONa})_8$, evaluadas mediante el ensayo de Ellman.

3.8 Síntesis, purificación y caracterización de derivados malonato.

Por otra parte, de acuerdo al plan de trabajo establecido, en este periodo se realizó la síntesis y purificación de nuevos derivados malonato simétricos, los cuales no se encuentran disponibles comercialmente. La síntesis de estos derivados malonato está justificada basados en los resultados obtenidos previamente con aductos del C₆₀ conteniendo de 1 a 6 sustituyentes dietil malonato, así como sus respectivas sales de sodio del tipo $(\text{C}_{6n}(\text{COR})_{2n})$ ($\text{R} = -\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{ONa}$ y $n = 1\text{-}6$). Se encontró en estudio previos que aductos del C₆₀ muestran una mayor capacidad inhibitoria de la agregación del P β A42 cuando existe un equilibrio entre la parte hidrofóbica y el número de sustituyentes presentes en el fullereno; es decir la capacidad de inhibición depende del número de sustituyentes y la disponibilidad de una superficie hidrofóbica en el C₆₀.

Basados en estas evidencias y con la finalidad de potenciar las propiedades inhibitorias de la agregación del P β A42, se propuso sintetizar derivados malonatos, los cuales contienen terminales dietil benzoato (malono dietilbenzoato amida, MDEBZA) y dietil isoftalato (malono bis-dietilisofalato amida, MBDEIFA). Estos sustituyentes malonato contienen 1 anillo aromático y varios átomos de oxígeno y nitrógeno en su estructura, lo cual ayudará a mejorar la interacción con los residuos del P β A42 a través de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, respectivamente.

Malono bis-dietilisofalato amida, MBDEIFA

El derivado malono bis-dietilisofalato amida, (MBDEIFA), se sintetizó a partir de la esterificación del ácido 5-aminoisoftálico (5AIPA) con etanol (EtOH), utilizando SOCl₂ y posterior reacción libre de disolvente del 5-aminoisofalato de dietilo (DEAIF) con dimetil malonato. una vez que el sustituyente MBDEIFA se purificó a través de lavados y centrifugación con etanol y acetato de etilo, la muestra se llevó a sequedad total y se cuantificó su rendimiento. Partiendo de 4 gr de DEAIF y 1.1 g (0.96 mL) de dimetil malonato (DMM) se obtuvieron 3.02 gr de MBDEIFA, representando un rendimiento del 66.3%. Las muestras del DEAIF y del MBDEIFA se caracterizaron mediante espectroscopía de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H). La Figura 3.8.1 muestra los espectros de infrarrojo superpuestos del compuesto A5AIF (color negro) y DEAIF (color rojo). Como se puede observar, el espectro resultante de la síntesis del compuesto DEAIF muestra una banda en 1699 cm⁻¹ característico de un carbonilo tipo éster, formado por la esterificación del A5AIF con EtOH; así como la banda presente en 1136 cm⁻¹ correspondiente a la unión C-O del éster formado. Se observa también la desaparición de la banda en 933 cm⁻¹ correspondiente al enlace O-H del ácido carboxílico. La Figura 3.8.2 muestra los espectros de IR superpuestos del DEAIF (color negro) y del MBDEIFA (color rojo), confirmando la unión del DEAIF al DMM mediante dos enlaces amida, en 1682 cm⁻¹; así como el desdoblamiento de la banda del grupo carbonilo del éster presente en el sustituyente MBDEIFA en 1710 cm⁻¹ y 1731 cm⁻¹. La Figura 3.8.3 muestra el espectro de RMN ¹H (Mezcla (CD₃)₂SO:CDCl₃), indicando con distinto color la señal correspondiente a cada tipo de hidrógeno. Las señal en 10.45 ppm (singulete), 8.45 ppm (singulete), 8.20 ppm (singulete), 4.38-4.15 ppm (cuadriplete), 3.53 ppm (singulete) y 1.45-1.23 ppm (tripleto) corresponden a los 2 hidrógenos (verde brillante) unidos a los nitrógeno del enlace amida, a los 4 hidrógenos (color rojo) unidos al anillo aromático, a los otros 2 hidrógeno (azul) unidos al anillo aromático, a los 8 hidrógenos (magenta) unidos al carbono intermedio del grupo etilo, a los 2 hidrógenos (verde opaco) unidos al carbono intermedio del malonato y a los 12 hidrógeno (naranja) del carbono terminal del grupo etilo, respectivamente. Las señales observadas en 3.3 ppm y 2.51 ppm corresponden a trazas de agua y señales residuales del DMSO deuterado, respectivamente.

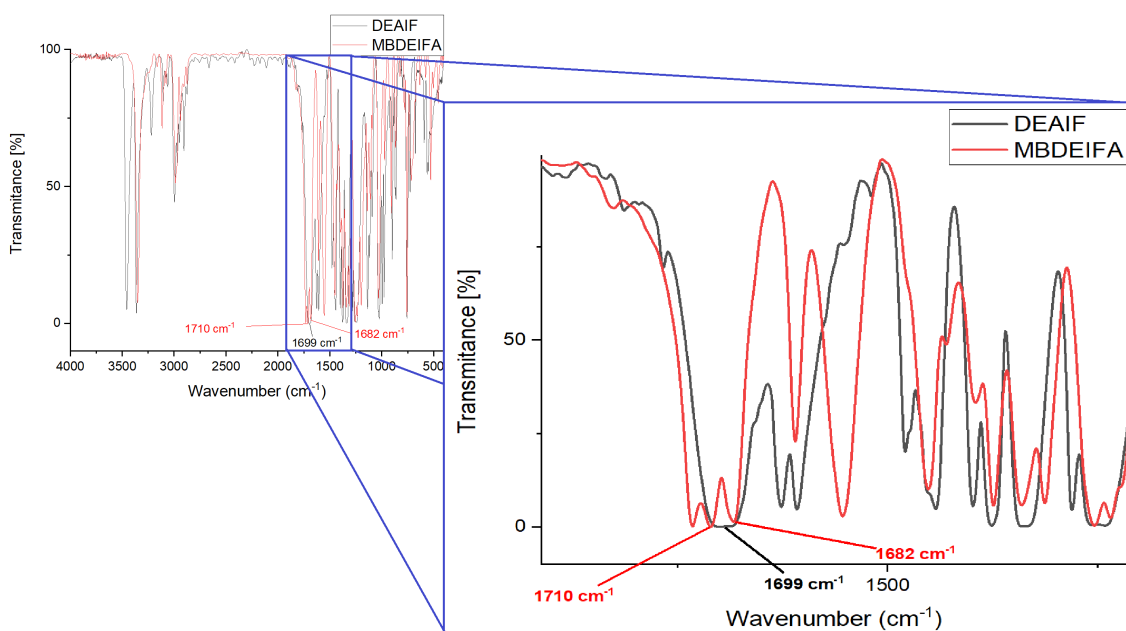


Figura. 3.8.1 Espectros de Infrarojo superpuestos del A5AIF y el DEAIF

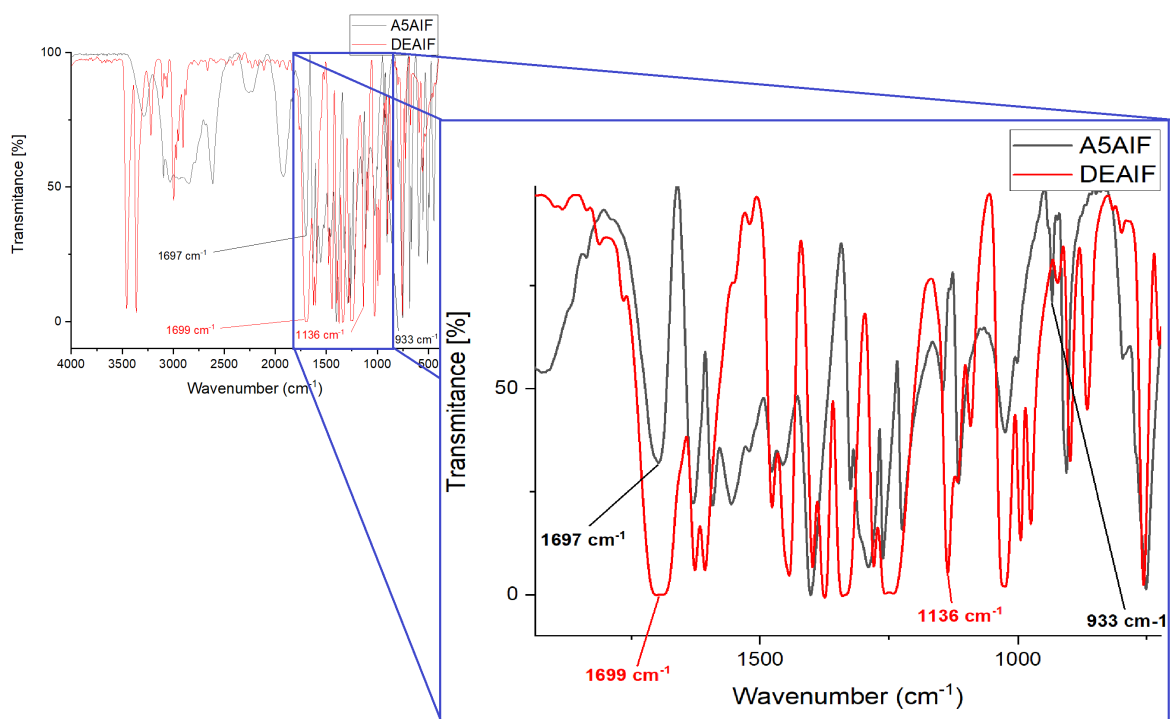


Figura. 3.8.2. Espectros de Infrarojo superpuestos del DEAIF y el derivado malonato, MBDEIFA.

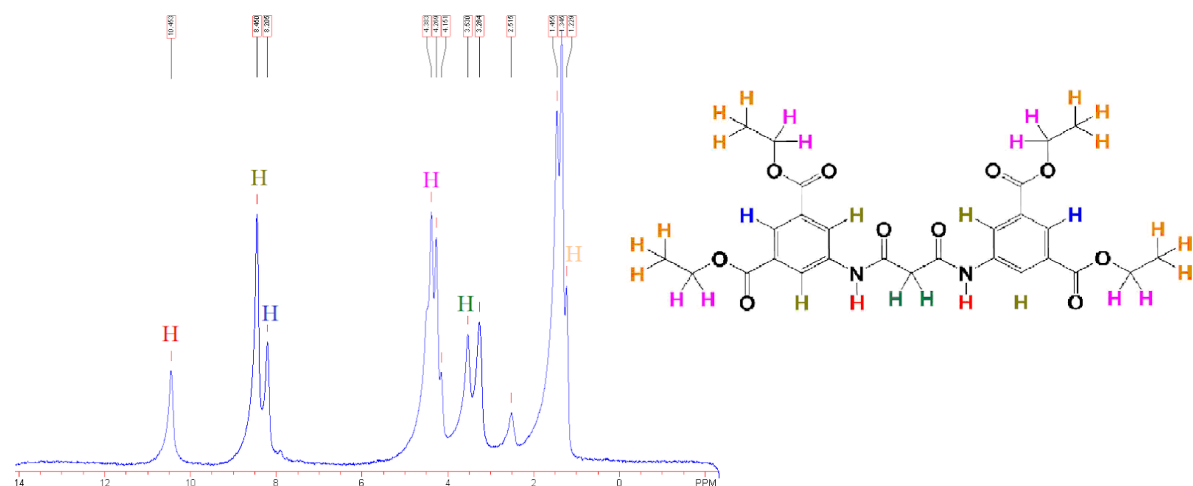


Figura. 3.8.3. Espectro de RMN ^1H del derivado malono bis-dietilisofalato

Malono dietilbenzoato amida, MDEBZA

El compuesto MDEBZA se sintetizó haciendo reaccionar dimetil malonato (DMM) y benzocaína (BZC) a alta temperatura sin el uso de disolvente como medio de reacción. Para ello, en un matraz de bola, se mezcló 5g de benzocaína (3.02 mmol, 2.1 eq) y 1.7337 mL de dimetil malonato (0.151 mmol, 1 eq) y la mezcla de reacción se mantuvo en reflujo a 180 °C durante 5 horas (a esta temperatura la mezcla se encuentra en fase líquida). La muestra del MBDEIFA se purificó a través de lavados y centrifugación con etanol, posteriormente se llevó a sequedad total y se cuantificó su rendimiento. La Figura 3.8.4 muestra el espectro de infrarrojo del derivado malonato MDEBZA.

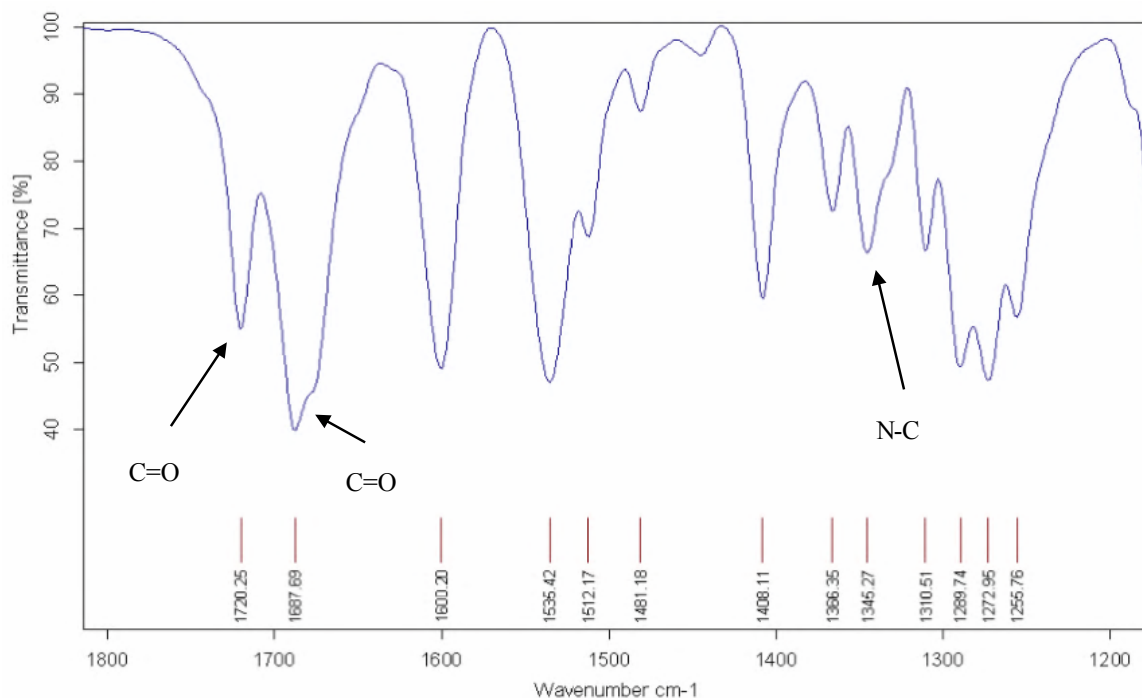


Figura 3.8.4. Espectro de infrarrojo (1800-1200 cm^{-1}) del derivado malonato MDEBZA. La figura señala las frecuencias correspondientes al doble enlace del carbonilo del grupo éster y el grupo amida y el enlace sencillo C-N de la amida con el anillo aromático.

Como se puede observar, espectro IR del MDEBZA presenta las bandas características de dicha muestra como son una banda en 1720 cm^{-1} , que correspondiente al carbonilo del éster, una banda en 1667 cm^{-1} el cual corresponde al carbonilo de una amida y en 1345 cm^{-1} una banda que corresponde a la frecuencia de vibración del enlace sencillo nitrógeno-carbono aromático. Además, el espectro demuestra la ausencia de bandas del carbonilo del dimetil malonato y del grupo amina correspondiente a la benzocaína.

3.9 Síntesis, purificación y caracterización de fullerenmalonoamidas con sustituyentes malono bis-dietil isoftalato amida.

Hexaaducto con sustituyentes MBDEIFA en posición octahedral (HAMBDEIFA).

Una vez que se obtuvo el derivado MBDEIFA se procedió a sintetizar el fullerenmalonato conteniendo 6 sustituyentes MBDEIFA (hexaaducto, HAMBDEIFA). Para ello se utilizó una metodología regioselectiva que permite la síntesis directa del hexaaducto con una adición de los sustituyentes MBDEIFA en posición octahedral. Partiendo de 0.086 gr de C_{60} y 1.4 g de MBDEIFA se obtuvo 184 mg del HAMBDEIFA, representando un rendimiento del 42.6 %. Para verificar la presencia del hexaaducto en la fracción obtenida por cromatografía en columna flash, se realizó la caracterización mediante espectroscopía IR y RMN ^1H . Los productos de la hexaadición al fullereno C_{60} se caracterizan por su coloración amarilla. La Figura 3.9.1 muestra los espectros superpuestos del hexaaducto HAMBDEIFA (color rojo) y el derivado malonato, MBDEIFA (color negro).

Como se puede observar, el espectro del HAMBDEIFA muestra 2 bandas en 1690 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} correspondientes a los carbonilos presentes en los enlaces amida y éster, respectivamente, ligeramente desplazados debido a la unión del malonato al fullereno C_{60} . Esto concuerda con el espectro del sustituyente MBDEIFA, cuyas bandas para estos mismos carbonilos están presentes en 1682 cm^{-1} y 1710 cm^{-1} , respectivamente. Por otra parte, la Figura 3.9.2 muestra el espectro de RMN de ^1H en DMSO deuterado. Como se puede observar, aún después de 1024 scans no fue posible el desdoblamiento de las señales correspondientes a los tripletes y cuádrupletes; sin embargo, el espectro muestra que la adición del sustituyente MBDEIFA ocurrió en posición octahedral, debido a que únicamente se observa el conjunto de señales mostradas en el espectro de RMN de ^1H del malonato, MBDEIFA.

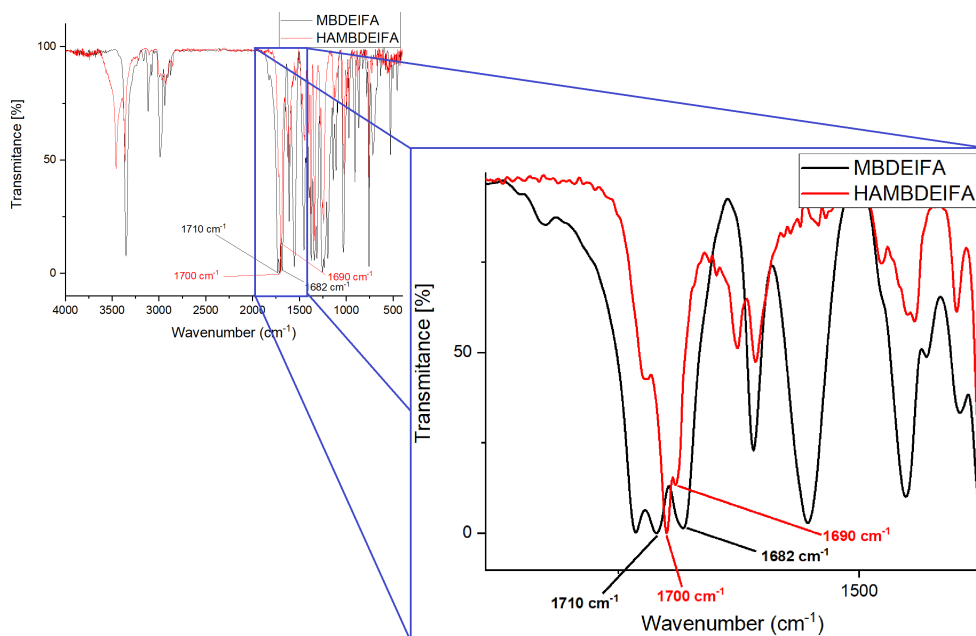


Figura 3.9.1. Espectros de IR superpuestos del hexaaducto HAMBDEIFA y el malonato MBDEIFA.

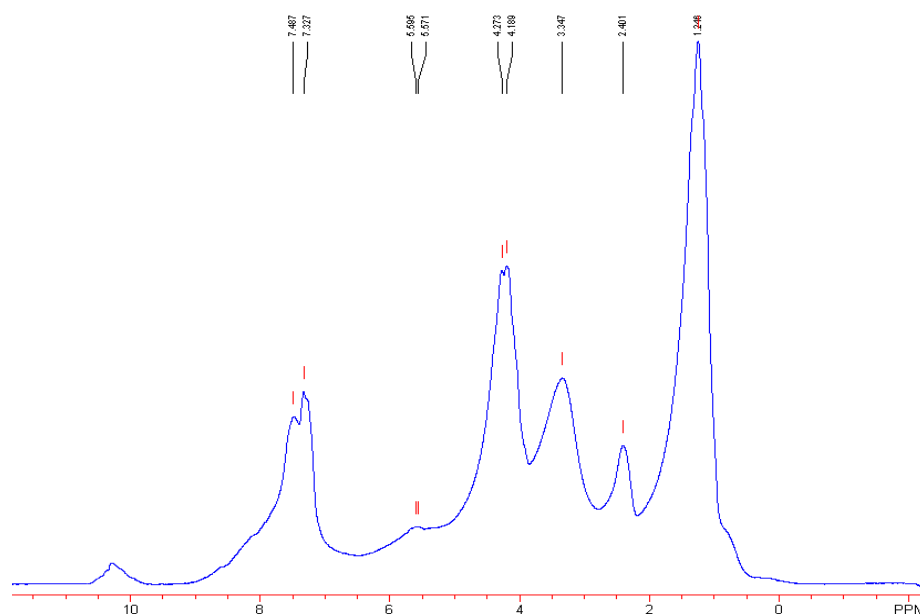


Figura 3.9.2. Espectro de RMN ^1H del hexaaducto, HAMBDEIFA.

Sal del Hexaaducto con sustituyentes malono bis-disodioisofthalato amida (HAMBDAIFA) y su correspondiente ácido (HAMBDAIFA).

La sal del hexaaducto (HAMBDAIFA) se obtuvo a partir de hidrólisis básica del respectivo éster (HAMBDEIFA), utilizando un exceso de solución metanólica de

NaOH 1 M. Por su parte, el hexaaducto ácido (HAMBDAIFA) se obtuvo a partir de hidrólisis ácida de la respectiva sal (HAMBDNaIFA) utilizando H_2SO_4 1 M. Las muestras de la sal del hexaaducto y de su ácido correspondientes, se caracterizaron por espectroscopía de IR (Figura 3.9.3 y 3.9.4).

La Figura 3.9.3 muestra los espectros superpuestos de la sal del hexaaducto, HAMBDNaIFA (color rojo) y del hexaaducto éster (HAMBDEIFA). Como se puede observar, el espectro muestra la desaparición la banda en 1710 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster y la aparición de una banda ancha en 1562 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de un carboxilato formado por la hidrólisis del grupo éster; lo cual confirma la completa conversión del éster a su sal correspondiente. Una característica adicional de la formación de la sal del hexaaducto es su completa solubilidad en medio acuoso a diferencia del hexaaducto éster. La Figura 3.9.4 muestra los espectros de IR superpuestos del hexaaducto ácido, HAMBDAIFA (color rojo) y del hexaaducto sal correspondiente, HAMBDNaIFA, (color negro). El espectro del hexaaducto ácido muestra una señal ancha en 1645 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de un ácido carboxílico y la desaparición de la banda en 1562 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del carboxilato, confirmando con ello la conversión de la sal del hexaaducto a su ácido correspondiente. El hexaaducto ácido mostró también solubilidad en medio acuoso aunque en menor proporción que aquella de la sal del hexaaducto.

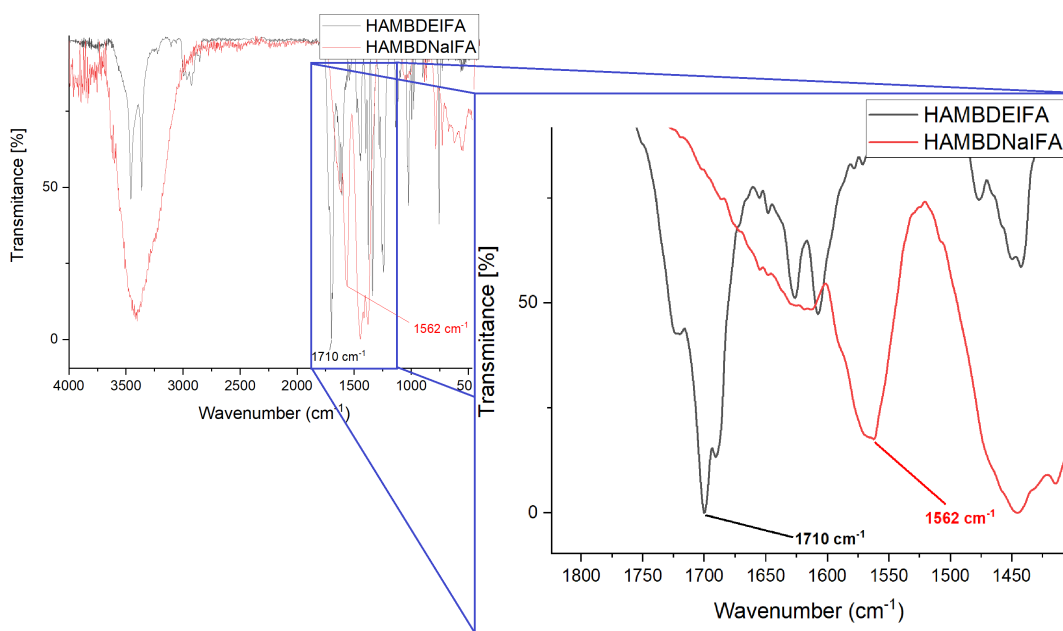


Figura 3.9.3 Espectros de IR superpuestos de la sal del hexaaducto, HAMBDNaIFA (color rojo) y del hexaaducto éster, HAMBDEIFA (color negro).

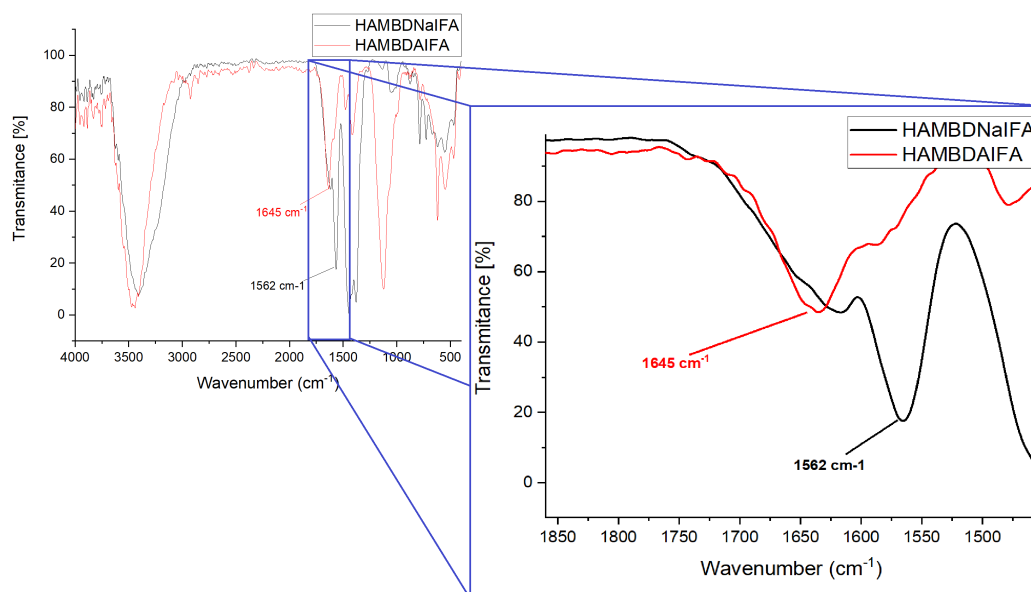


Figura 3.9.4 Espectros de IR superpuestos del hexaaducto ácido, HAMBDAIFA (color rojo) y de la sal del hexaaducto, HAMBDNaIFA (color negro).

Hexaaducto con sustituyentes MDEBZA en posición octahedral (HAMDEBZA)

Para la síntesis del hexaaducto conteniendo 6 sustituyentes MBDEIFA también se utilizó la metodología regioselectiva para la síntesis directa del hexaaducto con una adición de los sustituyentes MDEBZA en posición octahedral.

En la Figura 3.9.5 se presentan los resultados de la cromatografía en capa fina que se realizó de la mezcla de reacción (síntesis de HAMDEBZA).

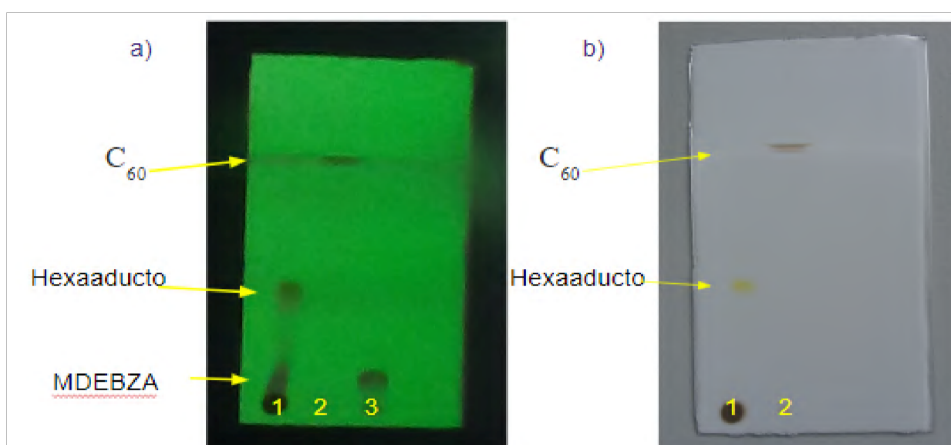


Figura 3.9.5. Placas de cromatografía en capa fina mostrando los productos de reacción de la síntesis de hexaaducto así como las correspondientes referencias de materia prima. a) Placa en luz UV, b) Placa en luz visible se señala la banda de C_{60} y del hexaaducto.

Como se puede observar, la Figura 3.9.5b (Luz visible) muestra la presencia de una fracción color amarillo la cual es característica para hexaaductos del fullereno C_{60} . Por otra parte, la Figura 3.9.5a (luz UV, 254 nm) muestra la presencia del hexaaducto, del C_{60} , y del MDEBZA sin reaccionar.

La Figura 3.9.6 muestra los espectros superpuestos del hexaaducto (espectro color rojo) y del MDEBZA (espectro color morado). Como se puede observar el espectro del HAMDEBZA muestra las señales del carbonilo del éster en 1686 cm^{-1} , el carbonilo de la amida en 1637 cm^{-1} y enlace nitrógeno carbono-aromático en 1341 cm^{-1} , las cuales se desplazan hacia frecuencias menores debido al debilitamiento de las frecuencias de vibración de los grupos funcionales cuando se une el MDEBZA al C_{60} . Por otra parte, el espectro IR del C_{60} muestra cuatro bandas características localizadas en $528, 577, 1183$ y 1429 cm^{-1} , las cuales no se pueden diferenciar en el espectro debido a que se empalman con las señales del MDEBZA.

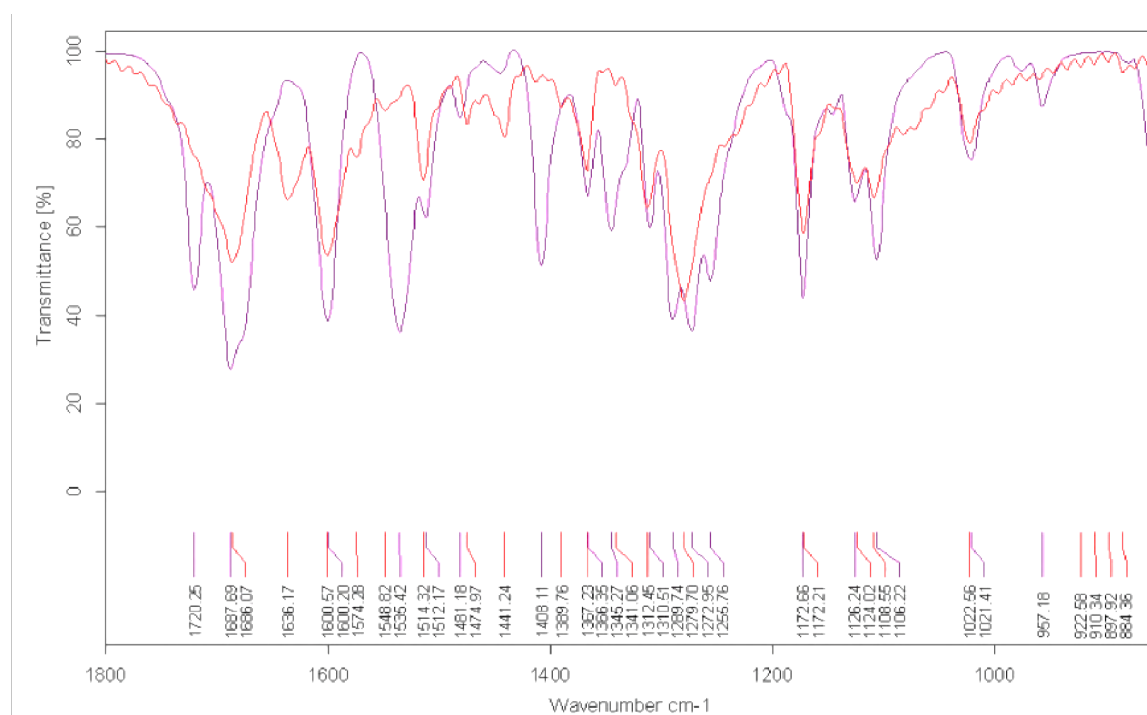


Figura 3.9.6. Espectro de infrarrojo ($1800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$) del HAMDEBZA (rojo) y del malonato, MDEBZA (morado).

Sal del Hexaaducto con sustituyentes malono disodiobenzoato amida (HAMDNaBZA)

Para comprobar la conversión exitosa del hexaaducto (HAMDEBZA) a la correspondiente sal de sodio (HAMDNaBZA), la muestra se caracterizó por espectroscopia IR. Como se puede observar en la Figura 3.9.7, la señal que indica la formación de la sal de sodio es el desplazamiento de la frecuencia del carbonilo del éster de 1686 cm^{-1} a 1631 cm^{-1} , debido al debilitamiento del doble enlace del

carbonilo en el carboxilato. Por otra parte, dada la amplitud de la banda del carbonilo del carboxilato no es posible observar claramente la banda correspondiente al carbonilo de la amida; observándose únicamente como una extensión de la banda del carbonilo de la amida.

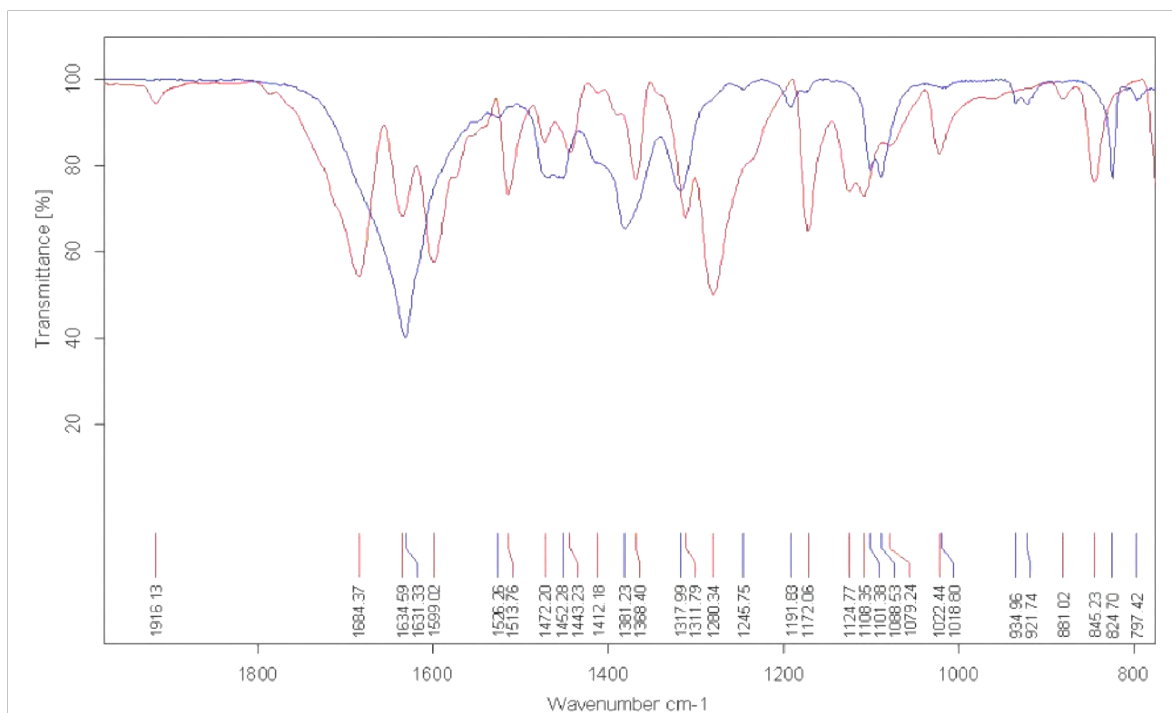


Figura 3.9.7. Espectro infrarrojo ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$) de la sal, HAMDNaBZA (azul) y del hexaaducto éster con sustituyentes en posición octahedral, HAMDEBZA (morado).

Finalmente, es importante mencionar qué el desarrollo del proyecto cumple en su mayoría con los plazos establecidos en el programa de trabajo, de acuerdo a los objetivos establecidos y los resultados alcanzados hasta el momento.

3.10 Fortalecimiento de la docencia, investigación y de cuerpos académicos

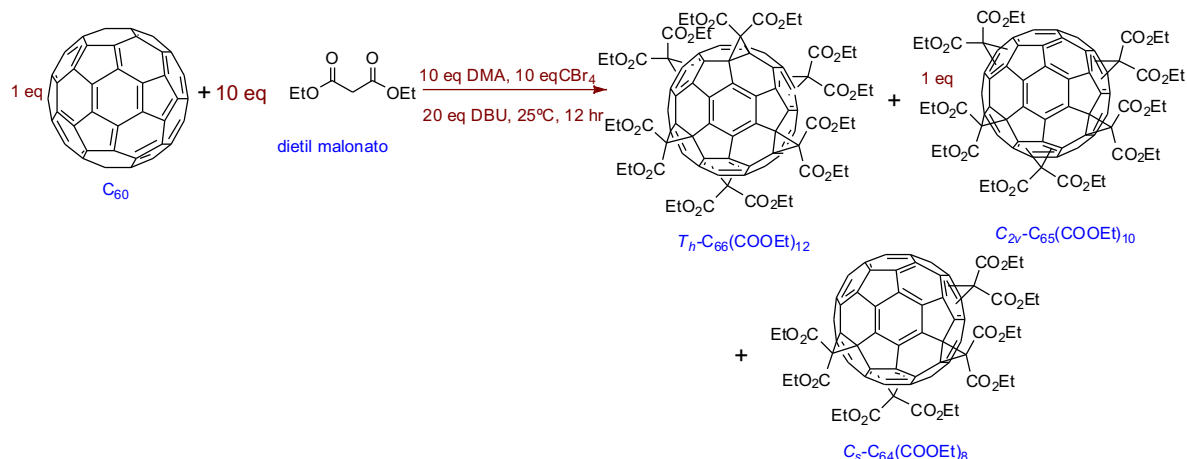
En lo que respecta a los objetivos institucionales como son el fortalecimiento de la docencia e investigación y de cuerpos académicos, durante este periodo (enero-octubre de 2021) se han impartido 5 UEAs en la Licenciatura en Biología Molecular (Trimestres 20-O, 21-I y 21-P). Las UEAs impartidas en los diferentes trimestres que abarca este periodo son: Temas Selectos en Química I y II (Química Inorgánica), Cálculo Diferencial (dos trimestres), Nanociencia y Técnicas de Caracterización Molecular I. Para el trimestre 21-O se tienen programado la impartición de las UEAs Temas Selectos en Química I y II (Química Inorgánica) e Introducción a la Termodinámica. Cabe mencionar que durante este periodo también participé en la Convocatoria SNI 2021 para el reingreso al Sistema Nacional de Investigadores. Con respecto a la formación de recursos humanos, durante este periodo no ha sido posible la incorporación de alumnos de la Licenciatura en Biología Molecular o externos para realizar su proyecto terminal o

tesis de Licenciatura o Posgrado debido principalmente a la pandemia por el Covid-19 que vivimos, lo cual ha impedido realizar el trabajo experimental en los laboratorios de la UAM-Cuajimalpa. Con el cambio de las condiciones en el semáforo de riesgo a partir del trimestre 21-O se incorporará al menos un alumno de la Licenciatura en Biología Molecular para realizar su proyecto terminal. De la misma manera, durante este periodo se fortaleció la colaboración científica entre el cuerpo académico de Fisicoquímica y Diseño Molecular de la UAM-Cuajimalpa y los cuerpos académicos de Ingeniería Biomédica e Ingeniería Química, Medio Ambiente y Materiales de la Universidad de Guanajuato, campus León. Durante la ejecución de este proyecto se trabajó en colaboración con la Dra. Perla Yolanda López Camacho y el Dr. Gerardo Pérez Hernández integrantes del Cuerpo Académico de Fisicoquímica y Diseño Molecular de la UAM-Cuajimalpa; quienes participan en la evaluación de los multiaductos como inhibidores de la agregación del péptido β amiloide (P β A42) y en el estudio de la interacción del P β A42 con los aductos del C₆₀ con sustituyente malono bis-dietilsoftalato amida y malono dietilbenzoato amida, por Docking Molecular, respectivamente. De la misma manera, también se trabajó en colaboración con el Dr. Gustavo Basurto Islas y la Dra. Susana Figueroa Gerstenmaier integrantes del Cuerpo Académico de Ingeniería Biomédica e Ingeniería Química, Medio Ambiente y Materiales de la Universidad de Guanajuato Campus León, quienes participaron en la evaluación de la biocompatibilidad y en el estudio teórico de la inhibición de la agregación del P β A42 con los multiaductos del C₆₀ con 4 a 6 sustituyentes dietil- y disodio malonato.

4. Metodología

4.1 Síntesis y purificación de multiaductos con sustituyentes dietil- y disodio malonato

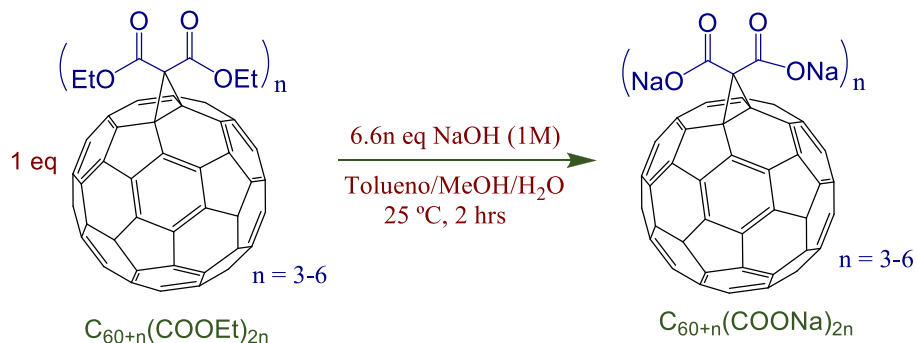
Para la síntesis del tetraducto C_s-C₆₄(COOEt)₈, pentaducto C_{2v}-C₆₅(COOEt)₁₀ y hexaducto T_h-C₆₆(COOEt)₁₂, 1 equivalente del C₆₀, se hizo reaccionar primeramente con 10 equivalentes de DMA en tolueno y a temperatura ambiente durante 2 horas, adicionando posteriormente a la mezcla de reacción 10 equivalentes de dietil malonato y de CBr₄; así como 20 equivalentes de DBU, deteniendo finalmente la reacción después de 12 horas de agitación (Esquema 4.1). La mezcla cruda de reacción se purificó por columna cromatográfica, utilizando primeramente tolueno puro para separar el C₆₀ residual. Posteriormente se adicionó una mezcla tolueno-acetato de etilo (95:5), lo cual permitió separar una segunda fracción constituida principalmente del isómero de tetraducto C_s-C₆₄(COOEt)₈, seguida inmediatamente de una tercera fracción compuesta principalmente por el isómero del pentaducto C_{2v}-C₆₅(COOEt)₁₀, y finalmente una cuarta fracción conteniendo el producto de la hexadición octahedral, el isómero T_h-C₆₆(COOEt)₁₂. Las tres fracciones se purificaron nuevamente a través de cromatografía en columna (fase móvil tolueno-acetato de etilo 95:5), permitiendo eliminar las trazas de aductos no deseados.



Esquema 4.1.1. Síntesis del tetraducto $C_s-C_{64}(COOEt)_8$, pentaducto $C_{2v}-C_{65}(COOEt)_{10}$ y hexaducto $T_h-C_{66}(COOEt)_{12}$, con un patrón de adición octahedral usando dimetilantraceno como plantilla.

Sales de aductos del C_{60} conteniendo de 4 a 6 sustituyentes disodio malonato.

Los multiaductos de sodio $C_s-C_{64}(COOEt)_8$, $C_{2v}-C_{65}(COOEt)_{10}$ y $T_h-C_{66}(COOEt)_{12}$ se obtuvieron por hidrólisis de los respectivos fullerenmalonatos de etilo, siguiendo el procedimiento propuesto por Guldi y col.^[7] Para ello se hizo reaccionar 3.3 moles de una solución de hidróxido de sodio en metanol (1 M) por cada mol de éster; 100 mol de agua por cada mol de aducto de fullereno y una relación volumétrica THF-metanol de 24:1 (Esquema 4.1.2). Para ello, el multiaducto éster se disolvió en tolueno y se adicionó el metanol y el agua, manteniendo la mezcla de reacción en agitación 1 hora antes de adicionar el NaOH (solución de NaOH en metanol 1 M). Después de 10 minutos, la sal de sodio comienza a precipitar y una vez que la solución queda transparente, se adiciona agua a la mezcla de reacción para formar dos fases. El tolueno se separó de la fase acuosa utilizando un embudo de separación y realizando varios lavados con tolueno para eliminar cualquier traza de fullerenmalonato de etilo sin reaccionar. Finalmente, la fase acuosa conteniendo la sal de fullereno se evaporó utilizando un rotavapor.



Esquema 4.1.2. Propuesta para la síntesis de las sales de sodio a partir de los ésteres correspondientes.

4.2 Inhibición de la formación de fibrillas del P β A42

El indicador de la actividad inhibitoria de la formación de polímeros del péptido β -amiloide (P β A42), fue la disminución de la frecuencia relativa con respecto al control sin compuesto, y fue obtenida por el análisis fluorométrico de tioflavina T (TfT) en un lector de placa. La TfT tiene afinidad por las hojas- β plegadas presentes en los polímeros de P β A42, lo que nos indica que a mayor fluorescencia habrá mayor formación de polímeros. Para la determinación de la capacidad inhibitoria, se prepararon soluciones stock de los multiaductos en acetonitrilo; mientras que para las sales de sodio fueron soluciones acuosas, todas ellas a una concentración final de 260 μ M. Posteriormente los multiaductos se mezclaron individualmente con el P β A42 a una concentración final de 13 μ M diluido en 200 μ L de buffer de polimerización con TfT 10 μ M. La mezcla se agregó a un pozo de una placa negra de 96 pozos y se incubó por 24 horas a 37 °C en el lector de placas y se tomaron las lecturas de fluorescencia relativa de TfT cada 60 minutos, a una excitación y emisión de 450 nm y 490 nm, respectivamente.

4.3 Biocompatibilidad de los multiaductos del C₆₀

Cada uno de los multiaductos, se incubó con células SH-SY5Y en cultivo y mediante el ensayo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol se cuantificó la supervivencia celular posterior a la incubación. El procedimiento que se siguió fue el siguiente: se agregaron 2 μ L de los multiaductos (260 μ M) en 98 μ L de medio DMEM/F12 suplementado. El medio conteniendo los aductos se agregó directamente a 10,000 células en cultivo y se incubaron por 24 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Se colocaron dos controles, un primer control para evaluar la posible toxicidad del vehículo de los multiaductos (acetonitrilo o agua), el cual consistió de 2 μ L del disolvente en 98 μ L de medio DMEM/F12 suplementado. El segundo control fue el indicador de muerte celular actinomicina (15.5 μ M) para efectos comparativos. Al término de las 24 horas de incubación se retiraron los tratamientos y se agregaron 10 μ L de MTT a 120 μ M en 90 μ L de medio DMEM/F12 suplementado y se incubaron por 3 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Finalmente se retiró el medio con MTT para después agregar 100 μ L de DMSO al 100% e inmediatamente se tomó la lectura de absorbancia a 495 nm en un lector de micro placas iMark Biorad (168-1130). Todos los tratamientos y controles se realizaron por triplicado.

4.4 Inhibición de la formación de agregados del P β A42 en cultivo celular y tinción por inmunofluorescencia

Las células SH-SY5Y expuestas a oligómeros del P β A42, sal de sodio del tetraadducto, C_s-C₆₄(COONa)₈ y controles sin la sal de sodio se analizaron por inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti P β A42, tinción del citoesqueleto y del núcleo. Los controles y las muestras tratadas con C_s-C₆₄(COONa)₈ se incubaron durante 14 horas a 37 °C en los tubos de la microcentrífuga a una concentración final del péptido 100 μ M y del C_s-C₆₄(COONa)₈ a 30 μ M. A continuación, las mezclas se incubaron durante 3 horas en la placa de cultivo

respectiva con las células cultivadas en portaobjetos de vidrio (previamente se cultivaron 6000 células en placa de 24 pocillos durante 24 h). Para la inmunofluorescencia, las células tratadas se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 15 min y se permeabilizaron en Triton X-100-PBS (PBSt) al 0,1% durante 10 min, seguido de 1 hora de incubación en una solución que contenía gelatina al 0,5% y FBS al 1,5% en PBS para bloquear la tinción inespecífica. Un anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -amiloide primario a una dilución de 1:2000 en PBS se incubó durante la noche a 4 °C. Se incubó un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón unido a isoTiocianato de fluoresceína (FITC) a una dilución 1:200 en PBS durante 1 h para detectar el anticuerpo primario. Se utilizó el marcador fluorescente Hoechst-33258 para contrateñir los núcleos al final del procedimiento. Se analizó la actina filamentosa (F-actina) empleando tinción con rodamina-faloidina. Las células de los portaobjetos se lavaron finalmente con PBS y se montaron con un medio Vectashield. Se obtuvieron imágenes representativas de las células mediante microscopía confocal.

4.5 Interacción molecular de los multiaductos del C₆₀ with P β A42

Para comprender las interacciones moleculares entre el P β A42 y los multiaductos de C₆₀, se realizaron cálculos por Docking molecular. Todas las simulaciones independientes constituidas por el P β A42 y el multiaducto respectivo se ejecutaron y analizaron calculando la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas (RMSD) y solo se describe el conglomerado más poblado (la configuración que aparece con mayor frecuencia) para cada multiaducto. Este grupo se calculó mediante el acoplamiento molecular del centro de cada uno y el multiaducto. Se realizaron 100 ensayos independientes utilizando Autodock Vina.^[8] Cada corrida fue agrupada por RMSD y la más poblada se usó para el análisis. Con fines comparativos, también se estudió la interacción molecular entre el P β A42 y C₆₀.

4.6 Efecto antioxidante de multiaductos del C₆₀ con sustituyentes disodio malonato

Se empleó el ensayo DPPH para evaluar la actividad antioxidante de las sales de sodio de los multiaductos (C_s-C₆₄(COONa)₈, C_{2v}-C₆₅(COONa)₁₀ y T_h-C₆₆(COONa)₁₂) en función de la atenuación de la absorbancia. Los multiaductos éster no se evaluaron porque el disolvente que los contiene interfiere con los reactivos del ensayo DPPH. La variación de la inhibición del radical libre DPPH⁺ se detecta a una longitud de onda de 517 nm para la absorción de radicales, y cuando está presente una molécula antioxidante, su absorción disminuye. Se preparó una solución metanólica del radical DPPH⁺ a 200 μ M y soluciones acuosas de la sal de sodio respectiva a 100 μ M. En una microplaca de 96 pocillos, se depositaron 65 μ L de solución DPPH⁺ y 130 μ L de soluciones acuosas de la sal de sodio en cada pocillo por triplicado, se evaluó a una relación molar de 1:1 DPPH⁺/ derivados de fullereno, seguido de la lectura de la absorbancia a 520 nm en un lector de placas cada 3 min durante una hora. Se empleó como blanco una mezcla de 65 μ L de

solución de DPPH⁺ y 130 µl de agua, utilizada como disolvente en ausencia de la muestra de sal sódica. El porcentaje de inhibición se calculó usando la ecuación 1.

$$\% \text{ De inhibición} = [(A - A_1) / A] \times 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde A = absorbancia del blanco y A₁ = absorbancia de la muestra

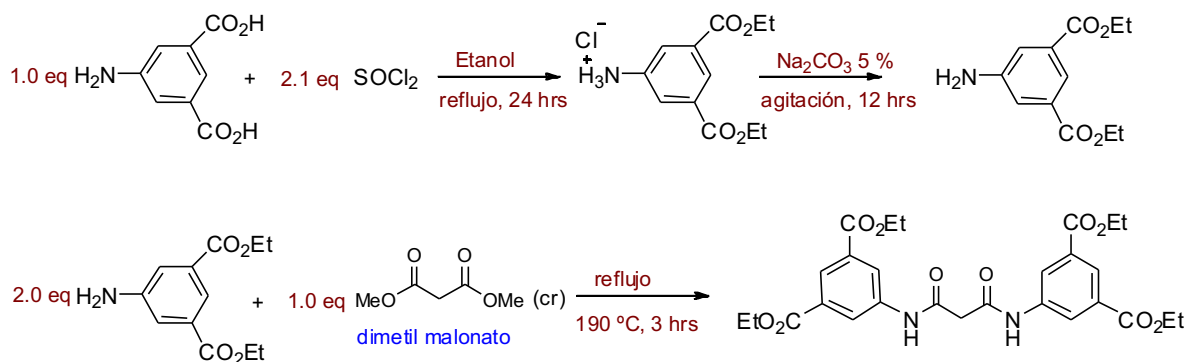
4.7 Inhibición de la Acetilcolinesterasa (AChE) utilizando multiaductos del C₆₀ con sustituyentes disodio malonato

El potencial inhibidor de los multiaductos de sal de sodio sobre la AChE se determinó espectroscópicamente empleando el ensayo de Ellman, basado en la formación y cuantificación a 412 nm de ácido 2-nitro-tiobenzoico (TNB), formado como resultado de la reacción del tiol (tiocolina) y DTNB y mediada por colinesterasa. La solución de AChE se preparó disolviendo la enzima en tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,4) para obtener concentraciones finales de 2 U/ml. Se utilizaron concentraciones de soluciones de multiaductos (sal de sodio) de 8 a 40 µM para inhibir la actividad de AChE. La solución del ensayo consistió en un tampón de fosfato 100 µM (pH 8,0), solución de AChE y cada compuesto evaluado individualmente; se preincubó a 25 ° C durante 30 minutos, seguido de la adición de yoduro de acetiltiocolina 10 mM, una solución de DTNB 10 µM y una incubación posterior a 37 ° C durante 30 min. Cada concentración se analizó por triplicado. Se realizó un blanco que contenía todos los componentes excepto AChE para tener en cuenta la reacción no enzimática como control para normalizar los datos. El porcentaje de inhibición se calculó usando la ecuación 1.

4.8 Síntesis, purificación y caracterización de derivados malonato.

Malono bis-dietilisofthalato amida, MBDEIFA

Para obtener el derivado malono bis-dietilisofthalato amida (MBDEIFA), primeramente, se llevó a cabo la esterificación del ácido 5-aminoisoftálico (5AIPA) utilizando SOCl₂ y etanol (Esquema 4.8.1). Para ello, en un matríz balón de 250 ml conteniendo 5 gr del 5AIPA se adicionó 60 ml de etanol (37.65 eq) y la mezcla se mantuvo en agitación a 0   C en un baño de agua con hielo. A continuación, el SOCl₂ (2.1 eq) solubilizado en 5 mL de etanol, se adicionó gota a gota (reacción muy exotérmica) con ayuda de un embudo de adición. Después de 5 minutos de terminar la adición, el matraz se retira del baño de hielo para alcanzar la temperatura ambiente y posteriormente la mezcla de reacción se mantuvo en agitación y reflujo (80   C) durante 24 horas.

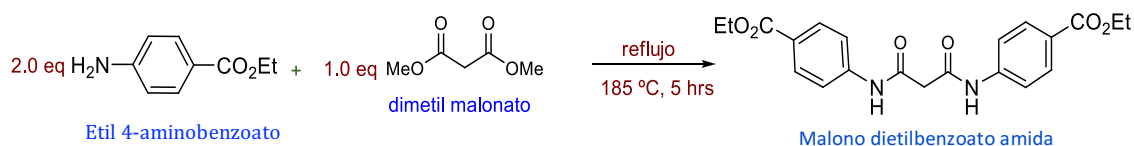


Esquema 4.8.1. Síntesis del derivado malono bis-dietilisofталato amida, MBDEIFA.

Posteriormente el disolvente se evaporó a presión reducida con ayuda de un rotavapor y se adicionaron 70 mL de una solución al 5% de Na_2CO_3 al sólido resultante con el fin de retirar los iones cloruro y desprotonar la amina en la posición 5. A continuación, se determinó el pH de la mezcla de reacción para verificar que éste fuera neutro y se procedió a realizar lavados consecutivos con 50 mL de CHCl_3 en un embudo de extracción, para separar la fase orgánica (contiene el aminoisofталato de etilo) de la fase acuosa. Este procedimiento se repitió 3 veces más usando 50 mL de CHCl_3 . Finalmente, el CHCl_3 se eliminó con ayuda de un rotavapor y la muestra resultante se mantuvo a 65°C en una estufa para su sequedad total. A continuación, el aminoisofталato se hizo reaccionar con dimetil malonato (DMM) sin disolvente, a 185°C en reflujo durante 5 horas (Esquema 4.8.1). Una vez finalizada la reacción, la mezcla se lavó 3 veces con etanol y se centrifugó a 13000 rpm para eliminar el DMM y el 5AIPA sin reaccionar. Adicionalmente, la muestra conteniendo el derivado MBDEIFA se lavó 4 veces con acetato de etilo y se centrifugó a 13000 rpm. Finalmente, el precipitado se secó en una estufa a 80°C durante 24 hrs.

Malono dietilbenzoato amida, MDEBZA

El compuesto MDEBZA se sintetizó haciendo reaccionar dimetil malonato (DMM) y benzocaína (BZC) a alta temperatura sin el uso de disolvente como medio de reacción. Para ello, en un matraz de bola, se mezcló 5g de benzocaína (3.02 mmol, 2.1 eq) y 1.7337 mL de dimetil malonato (0.151 mmol, 1 eq) y la mezcla de reacción se mantuvo en reflujo a 180°C durante 5 horas (a esta temperatura la mezcla se encuentra en fase líquida). Un indicador de que la reacción concluyó es la ausencia de humo blanco debido a la generación de metanol como subproducto (Esquema 4.8.2). Una vez finalizada la reacción y que se alcanza la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se encuentra en fase sólida.

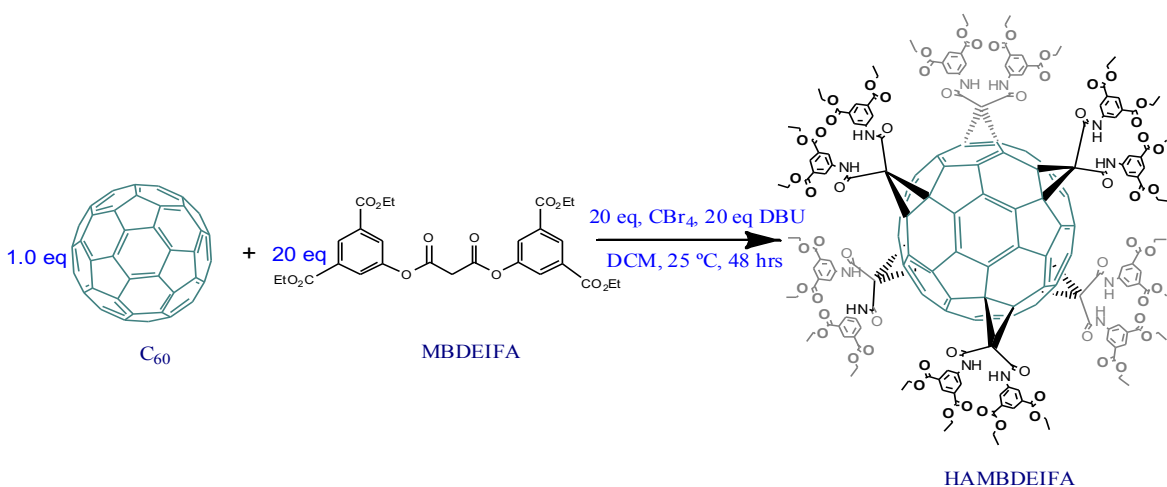


Esquema 4.8.2. Síntesis del derivado malono bis-etilbenzoato amida y del malono bis-dietilisofthalato

4.9 Síntesis y purificación de fullerenmalonoamidas con sustituyentes malono bis-dietil isofthalato amida.

Hexaaducto con sustituyentes MBDEIFA en posición octaedral (HAMBDEIFA).

Una vez caracterizado el sustituyente malono bis-dietilisofthalatoamida (MBDEIFA), se procedió a realizar la síntesis del aducto del C_{60} , conteniendo 6 sustituyentes MBDEIFA en posición octaedral (Esquema 4.9.1). Para ello, se siguió una metodología modificada propuesta por Sun y col.^[9] la cual permite la síntesis directa y regioselectiva del hexaaducto con una adición octahedral (sin el uso de dimetil antraceno como plantilla), evitando de esta manera la tediosa ciclopropanación sucesiva y purificación cromatográfica de los intermediarios. Para lograr la síntesis del hexaaducto se probaron diferentes condiciones de reacción, las cuales se muestran en la Tabla 4.9.1.



Esquema 4.9.1. Síntesis del hexaaducto HAMBDEIFA a partir del C_{60} y del derivado MBDEIFA

Para efectuar la reacción, en un matríz balón conteniendo 60 ml de DCM se adicionó el fullereno C_{60} y se sonicó durante 10 min para favorecer su solubilidad. Posteriormente con ayuda de un embudo de adición se añadió el compuesto MBDEIFA y el tetrabromuro de carbono (CBr_4), permaneciendo en agitación durante 20 minutos antes de la adición gota a gota (1 gota cada 36 segundos) de la base 1,8 Diazabicycloundec-7-eno (DBU) solubilizado en 5 mL de DCM. La

mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y se monitorio el avance de la reacción por cromatografía en placa fina deteniendo finalmente la reacción después de 48 horas.

Tabla 4.9.1 Condiciones de reacción utilizadas para la síntesis del hexaaducto, HAMBDEIFA.

| Reactivo | Rx1(Eq) | Rx2 (Eq) |
|------------------|---------|----------|
| MBDEIFA | 10 | 20 |
| C ₆₀ | 1 | 1 |
| CBr ₄ | 10 | 20 |
| DBU | 10 | 20 |
| DCM | 41568 | 41568 |

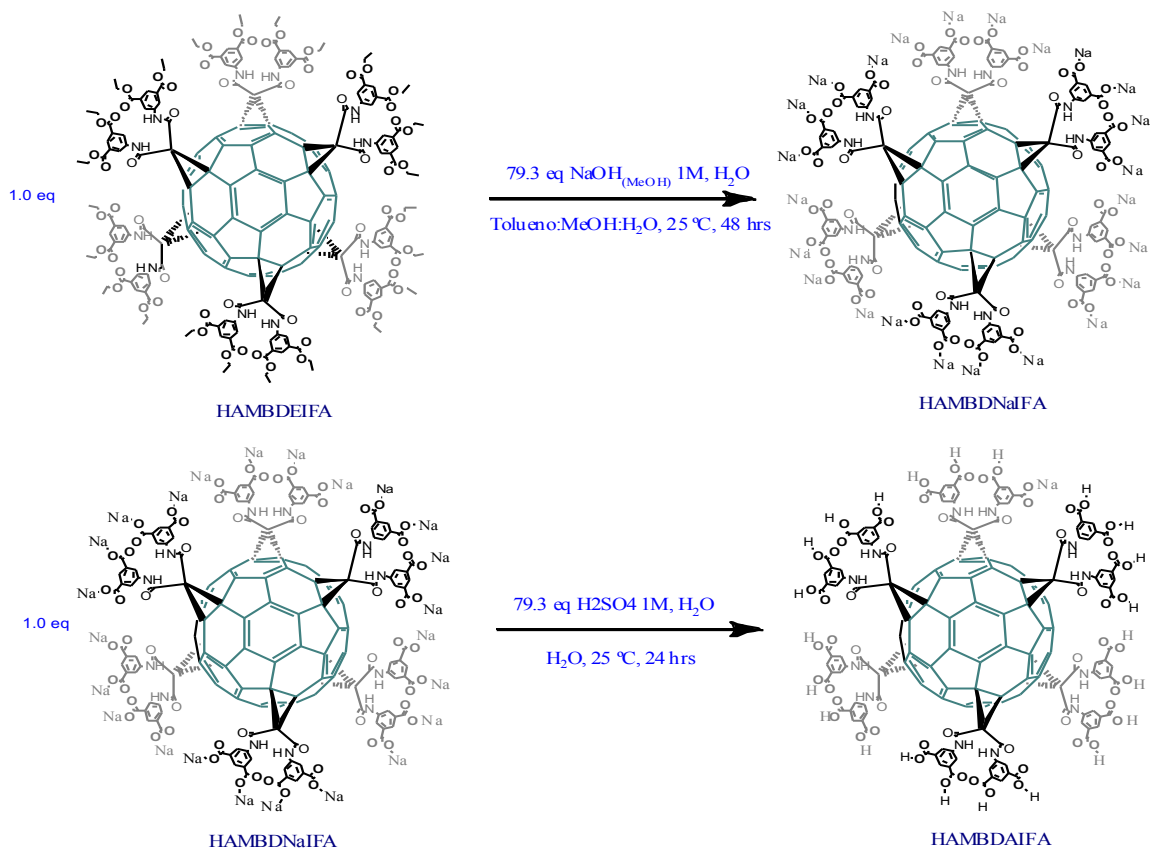
Se encontró que las mejores condiciones para la síntesis del hexaaducto fueron aquellas de la reacción 2; por lo cual para obtener una cantidad macroscópica de esta muestra se realizó nuevamente la reacción a gran escala partiendo en este caso de 0.086 gr de C₆₀. Una vez finalizada la reacción, se evaporó el disolvente bajo presión reducida utilizando un rotavapor y la muestra del hexaaducto se aisló y purificó por cromatografía en columna flash. Para ello, se utilizó sílica gel (135 gr) como fase estacionaria y 250 mL de una mezcla Tolueno:Acetonitrilo (90:10) como fase móvil. Una vez que se aisló y purificó el hexaaducto, la fracción colectada se evaporó con ayuda de un rotavapor. La muestra resultante se solubilizó en DCM y se colocó en un vial permitiendo una lenta evaporación del disolvente y formación de una muestra sólida. La muestra del HAMBDEIFA se analizó mediante espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) para confirmar la hexaadición en posición octaedral.

Sal del Hexaaducto con sustituyentes malono bis-disodioisofalato amida (HAMBDNaIFA) y su correspondiente ácido (HAMBDAIFA).

Una vez aislado y purificado el hexaaducto con sustituyentes MBDEIFA, se procedió a sintetizar su sal de sodio correspondiente, siguiendo la metodología modificada propuesta por Guldí y col.^[7] La sal de sodio del hexaaducto (HAMBDNaIFA) se obtuvo por hidrólisis básica del respectivo éster (HAMBDEIFA), siguiendo las proporciones mostradas en la reacción 1 de la Tabla 4.9.2. Para ello, se utilizó 3.3 moles de una solución de NaOH (1M) en MeOH por cada éster del hexaaducto; 100 moles de agua por cada mol del hexaaducto y una relación volumétrica Tolueno:MeOH 24:1 (Esquema 4.9.2). Primeramente, en un matraz balón se disolvió el hexaaducto HAMBDEIFA en tolueno, posteriormente se adicionó el MeOH y el agua H₂O, manteniendo la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora antes de adicionar la solución metanólica de NaOH 1M. Después de 30 minutos de agitación, la sal de sodio comenzó a precipitar y una vez que la solución queda transparente (aproximadamente 5 horas) se adicionó agua para formar 2 fases.

Tabla 4.9.2 Condiciones de reacción utilizadas en la síntesis del HAMBDEIFA y HAMBDAIFA.

| Reactivo | Rx1 | Rx2 |
|-----------------------------------|--|---|
| HAMBDEIFA | 1 Eq | - |
| HAMBDNaIFA | - | 1 Eq |
| NaOH 1M (Solución metanólica) | 79.2 Eq (3.3 Eq por cada éster en el aducto) | - |
| H ₂ SO ₄ 1M | - | 79.2 (3.3 Eq por cada sodio en en aducto) |
| Tolueno:MeOH | (24:1 v/v) | - |
| H ₂ O | 100:1 mol de hexaaducto | 117388 Eq |



Esquema 4.9.2. Síntesis del hexaaducto sal HAMBNaIFA y ácido HAMBDAIFA a partir del éster HAMBDEIFA y de la sal HAMBDNaIFA, respectivamente.

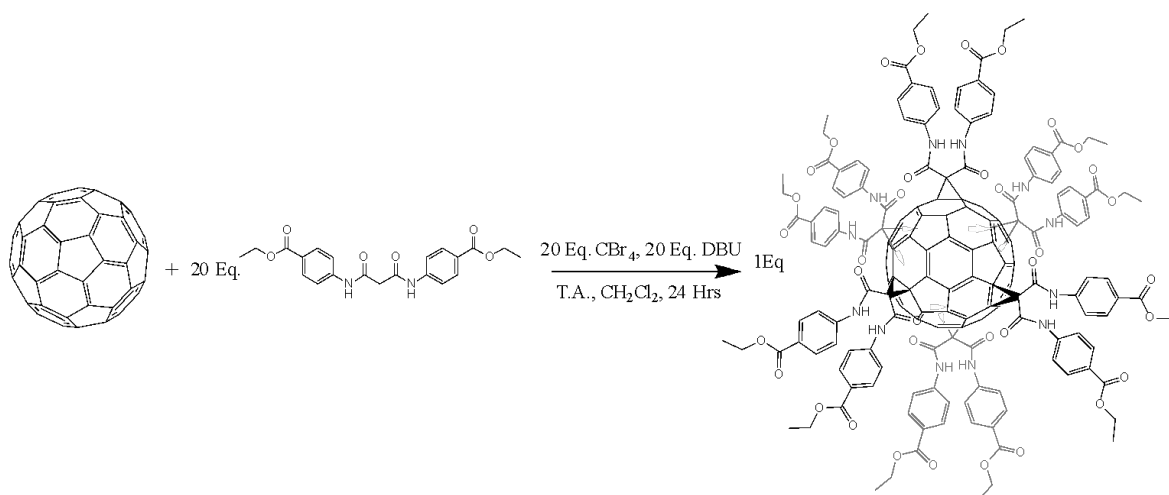
La fase orgánica se separó de la fase acuosa usando un embudo de separación, repitiendo el procedimiento de lavado con tolueno para eliminar cualquier traza del éster (HAMBDEIFA) sin reaccionar. Finalmente, la fase acuosa conteniendo la sal de fullereno se evaporó utilizando un rotavapor y se secó en una estufa a 85 °C

durante 24 hrs.

Una vez formada la sal del hexaaducto (HAMBDNaIFA), se procedió a realizar su transformación al ácido correspondiente (HAMBDAIFA), esto en presencia de H_2SO_4 (Esquema 4.9.2); siguiendo las condiciones de la reacción 2 mostradas en la Tabla 4.9.2. Para ello, la sal del hexaaducto se solubilizó en 40 mL de agua y posteriormente se adicionó la solución de H_2SO_4 1M, manteniendo la agitación constante y a temperatura ambiente durante 24 horas. El avance de la reacción se monitoreó por espectroscopía de infrarrojo. Una vez finalizada la reacción, el hexaaducto ácido (HAMBDAIFA) se extrajo por medio de lavados con etanol y centrifugación para eliminar las sales de Na_2SO_4 formadas y el NaOH en exceso, los cuales son insolubles en este disolvente. A continuación, una parte del producto en su forma ácida se solubilizó en agua y se le adicionó una cantidad equimolar de una solución acuosa de NaOH 1M para convertir el ácido a su correspondiente sal de sodio (HAMBDNaIFA). Finalmente, las muestras del hexaaducto ácido, HAMBDAIFA y del hexaaducto sal HAMBDNaIFA, se secaron con ayuda de un rotavapor, se solubilizaron en metanol y se adicionaron a un vial para la lenta evaporación del disolvente.

Hexaaducto con sustituyentes MDEBZA en posición octahedral (HAMDEBZA)

El HAMDEBZA se sintetizó a partir de la ciclopropanación del C_{60} a temperatura ambiente, siguiendo un procedimiento modificado descrito por Sun y colaboradores, el cual permitió la síntesis directa y regioselectiva del hexaaducto con una adición octahedral sin la necesidad de utilizar dimetil antraceno como plantilla.^[9] Para la síntesis de aductos del C_{60} conteniendo 6 sustituyentes malono dietilbenzoato amida (HAMDEBZA) se probaron diferentes condiciones, variando los equivalentes de MDEBZA, CBr_4 y 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU); así como el disolvente utilizado. Se encontró que las mejores condiciones para la obtención del HAMDEBZA como producto principal corresponde a una relación de 1 eq de C_{60} , 20 eq de MDEBZA, 20 eq de CBr_4 y 20 eq de DBU, utilizando como medio de reacción diclorometano (Esquema 4.9.3). Es importante mencionar que cuando la reacción se realizó utilizando los mismos equivalentes de los reactivos y utilizando una mezcla tolueno/acetona como medio de reacción, no fue posible la obtención del hexaaducto (HADEBZA).

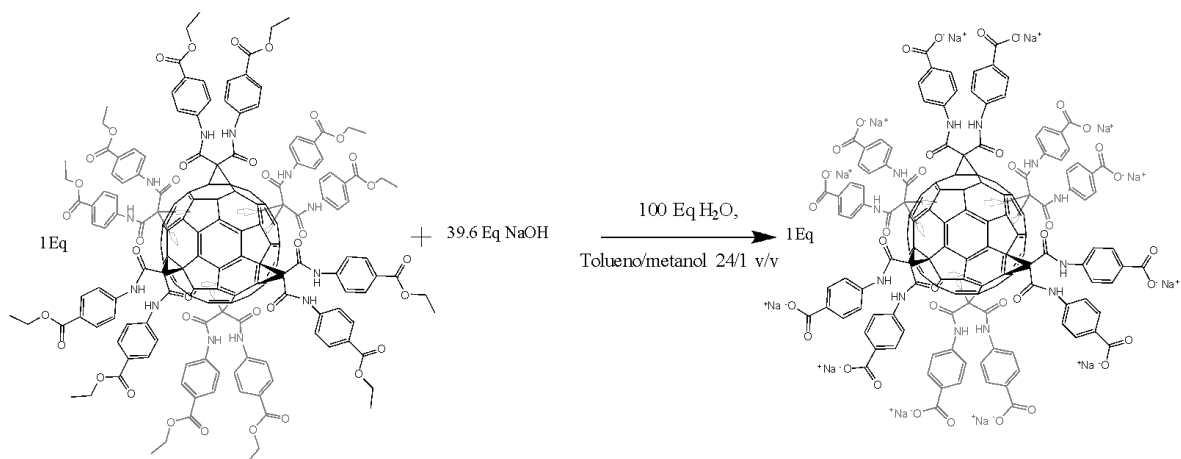


Esquema 4.9.3. Síntesis del hexaaducto HAMDEBZA a partir del C₆₀ y del derivado MDEBZA.

En un matraz de balón conteniendo 40 ml de diclorometano se adiciona 20 mg de fullereno C₆₀ (0.027mmol, 1 eq), 220 mg de MDEBZA (0.55 mmol, 20 eq), y 184 mg de CBr₄ (0.55 mmol, 20 eq). Después de 15 minutos de agitación se agregó lentamente (aproximadamente 1 gota cada 20 segundos) 83 µL de DBU (0.55 mmol, 20 eq.) diluidos en 5 ml de diclorometano y se mantuvo en agitación durante 24 horas. El avance de la reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina, utilizando como fase móvil una mezcla de tolueno-acetonitrilo (90:10 v/v), mostrando la presencia del Hexaaducto conteniendo 6 sustituyentes MDEBZA (fracción color amarilla) como producto principal después de 24 horas de reacción. Con la finalidad de aislar y purificar la fracción del hexaaducto a partir de la mezcla de reacción, se probaron diferentes mezclas de disolventes como fase móvil utilizando cromatografía en capa fina y se encontró que una mezcla tolueno/acetonitrilo (90/10 v/v) permite la separación del Hexaaducto (fracción amarilla). El aislamiento y purificación del HAMDEBZA se realizó por cromatografía en columna sobre sílica gel, utilizando aproximadamente 54 gr de sílica y 400 mL de de la fase mencionada. Una vez que se aisló, la fracción colectada del HAMDEBZA se evaporó con ayuda de una rotavapor y la muestra sólida resultante se secó en una estufa a 65 °C durante 24 horas.

Sal del Hexaaducto con sustituyentes malono disodiobenzoato amida (HAMDNABZA)

La sal de sodio del hexaaducto (HAMDNABZA) se obtuvo por hidrólisis básica del respectivo éster (HAMDEBZA) siguiendo un procedimiento modificado propuesto por Guldi y col.^[7] Para ello se utilizó 3.3 moles de una solución de hidróxido de sodio en metanol (1 M) por cada grupo éster del hexaaducto; 100 moles de agua por cada mol del hexaaducto y una relación volumétrica tolueno:metanol de 24:1 (Esquema 4.9.4).



Esquema 4.9.4. Síntesis del hexaaducto sal HAMDNaBZA a partir del éster HAMDEBZA.

Para este procedimiento se adicionó en un matraz balón 12 mg del hexaaducto (0.027 mmol), 10 mL de tolueno, 0.58 mL de metanol y 15.8 μ L de agua, manteniendo la mezcla en agitación durante 1 hora antes de adicionar 0.174 mL de la solución metanólica de NaOH 1M. Después de 30 minutos de agitación, la sal de sodio comenzó a precipitar y una vez que la solución queda transparente (aproximadamente 2 horas), se adicionó agua para formar dos fases. La fase acuosa la cual contiene la sal de sodio se separó de la fase orgánica utilizando un embudo de separación, repitiendo el procedimiento de lavado con tolueno para eliminar cualquier traza del éster (HAMDEBZA) sin reaccionar. Posteriormente, se concentró la fase acuosa con un rotavapor y se adicionó 89 μ L de H₂SO₄ 1 M para transformar la sal del hexaaducto en su ácido correspondiente permitiendo con ello eliminar el NaOH en exceso dada la diferente solubilidad del hexaaducto ácido y el NaOH en medio acuoso. Finalmente, el producto en su forma ácida se solubilizó en una mezcla acetonitrilo:agua (4:1) y se le adicionó una cantidad equimolar de una solución acuosa de NaOH 1M para convertir el ácido a su correspondiente sal de sodio (HAMDNaBZA). Finalmente, el HAMDNaBZA se concentró en un rotavapor y se secó en una estufa a 80 °C durante 3 horas.

4.10 Caracterización de multiaductos del C₆₀ y fullerenmalonoamidas.

Espectroscopía IR: Para la medición del espectro de infrarrojo de los aductos, aproximadamente 0.5 mg de muestra se mezclaron con bromuro de potasio (KBr) y la mezcla resultante se compactó en forma de pastilla. Todos los espectros de infrarrojo se grabaron a temperatura ambiente, en un equipo Bruker Tensor, con una resolución de 2 cm⁻¹ y 64 *scans* para las muestras de los multiaductos y 128 *scans* para las muestras de fullerenmalonoamidas.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H. Con esta técnica fue posible caracterizar las muestras del derivado malonato con sustituyente dietil isoftalato (malono bis-dietilisoftalato amida, MBDEIFA) y el hexaaducto con 6 sustituyentes dietil malonato y MBDEIFA en posición octahedral, HAMBDEIFA. Debido a la gran cantidad de muestra requerida no fue posible caracterizar las muestras por RMN de ¹³C. Para efectuar los experimentos,

aproximadamente 30 mg de la muestra del malonato se disolvieron en una mezcla de dimetil sulfóxido y cloroformo deuterado (1:3 v/v), requiriendo 64 scans para obtener el espectro. Para el caso de hexaducto, HAMBDEIFA, aproximadamente 20 mg de la muestra se disolvió en dimetil sulfóxido deuterado, realizando 1024 scans para obtener el espectro.

5. Actividades Adicionales

Como Profesor Visitante en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa se realizaron las siguientes actividades adicionales:

- Participación como responsable del Laboratorio de Química y Farmacología del Departamento de Ciencias Naturales.
- Participación como Jurado evaluador en el examen Doctoral y disertación pública del trabajo de Doctorado de la alumna Gelen Gómez Jaimes intitulado "Diseño, síntesis y caracterización de bloques de construcción dinucleares y trinucleares de organoestraño (IV) y de ácido carboxílico para la posible generación de para la formación de macrociclos, cajas y polímeros de coordinación. Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería. En proceso.
- Participación en el Curso-Taller "Violencia Simbólica" Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Ciudad de México. Octubre de 2021.
- Participación en el Curso-Taller "Lenguaje incluyente y no sexista" Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Ciudad de México. Septiembre de 2021.
- Participación en el Curso-Taller "Atención a la violencia de género y modelos de buen trato en el aula" Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Ciudad de México. Septiembre de 2021.
- Participación como revisor y evaluador de trabajos del 4º Simposio de las Licenciaturas de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería 2021, en la Licenciatura en Biología Molecular. Septiembre de 2021.
- Participación como Jurado evaluador en el examen predoctoral de la alumna Gelen Gómez Jaimes con la Tesis doctoral "Diseño, síntesis y caracterización de bloques de construcción para la formación de nuevas estructuras". Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería. Abril 08 de 2021.
- Participación en el proyecto "Estudio de nanomateriales como parte de una propuesta para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer" presentado por el Dr. Gustavo Basurto Islas (responsable técnico) de la Universidad de Guanajuato, para su evaluación en la convocatoria CONACYT denominada "Apoyos para la adquisición y Mantenimiento de infraestructura en instituciones y laboratorios de investigación especializada".
- Participación en el proyecto "Evaluación *in silico* de fullerenos funcionalizados como inhibidores duales de la acetilcolinesterasa y la autoagregación del péptido β -amiloide" presentado por la Dr. Susana Gerstenmaier (responsable técnico) de la Universidad de Guanajuato, para

su evaluación dentro de la Convocatoria institucional de Investigación Científica 2021 de la Universidad de Guanajuato.

6. Referencias Bibliográficas

- [1] a) Castro, E.; García, A. H.; Zavala, G.; Echegoyen, L. Fullerene in biology and medicine. *J. Mat. Chem. B* **2017**, 5, 6523-6535. b) Anilkumar, P.; Lu, F.; Cao, L.; Luo, P. G.; Liu, J. H.; Sahu, S.; Tackett, K. N.; Wang, Y.; Sun, y. P. *Current medicinal chemistry*. **2011**, 18, 2045-2059.
- [2] a) Andrikopoulos, N.; Li, Y.; Cechetto, L.; Nandakumar, A.; Da Ros, T.; Davis, T. P.; Velonia, K.; Ke, P. Ch. *Nanoscale*, **2020**, 12, 14422-14440. b) Huy, P. D. Q.; Li, M. S.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16, 20030-20040. c) Li, C. X.; Mezzenga, R. *Nanoscale*, **2013**, 5, 6207-6218. d) Ishida, Y.; Fujii, T.; Oka, K.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. An Asian Journal* **2011**, 6, 2312-2315.
- [3] a) Siddiqi, K. S.; Husen, A.; Sohrab, S. S.; Yassin, M. O. *Nanoscale Research Letters* **2018**, 13, 231. b) Cunha, S.; Amural, m. H.; Lobo, J. M. S.; Silva, A. C.; *Current Medicinal Chemistry* **2016**, 23, 3618-3631. c) Gilmore, J. L.; Yi, X.; Quan, L.; Kabahov, A. V. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **2008**, 3, 83-94.
- [4] a) Murphy, M. Paul, and Harry LeVine. *Journal of Alzheimer's Disease* **2010**, 19, 311-323. b) Lee, Virginia M. Y., Michel Goedert, and John Q. Trojanowski. *Annual review of neuroscience* **2001**, 24, 1121-1159.
- [5] Camps X, Hirsch A () Efficient cyclopropanation of C60 starting from malonates. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1997**, 1595-1596.
- [6] Hirsch A, Lamparth I, Groesser T, Karfunkel H. R. Regiochemistry of Multiple Additions to the Fullerene Core: Synthesis of a Th-Symmetric Hexakis adduct of C60 with Bis(ethoxycarbonyl)methylene. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, 9385-9386.
- [7] Guldi DM, Hungerbuehler H, Asmus K-D. Unusual redox behavior of a water soluble malonic acid derivative of C₆₀: evidence for possible cluster formation. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, 99, 13487-13493.
- [8] Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 455-461.
- [9] Li, H.; Kitoygorodskiy, A.; Meziari, M. J.; Torres-Castillo, M.; Sun, Y. P. *Org. Letter*, **2006**, 8, 5641-5643.