

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



## DISEÑO Y SÍNTESIS DE INHIBIDORES DE MONOAMINO OXIDASAS COMO AGENTES CONTRA ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Memoria para optar al título de Químico

**ALFREDO EXEQUIEL DÍAZ SEGUEL**

Director de memoria: Dr. Gerald Zapata Torres  
Departamento de Química Inorgánica y Analítica  
Profesor Patrocinante: Dr. Gerald Zapata Torres

Santiago – CHILE

2019

*A mis padres Telma y Fernando  
A mi compañera Victoria  
A mis abuelos Gabriela y Arnoldo*

*“Los científicos no dependen de las ideas de un solo hombre, sino de la sabiduría combinada de miles de hombres, todos pensando sobre el mismo problema y cada uno de ellos haciendo su pequeña aportación a añadir a la gran estructura de conocimiento que se va construyendo poco a poco”*

Ernest Rutherford

*“Si quieres tener buenas ideas, tienes que tener muchas ideas. La mayoría de ellas serán erróneas, y sólo tienes que aprender cuáles desechar”*

Linus Pauling

Memoria de título *in memoriam* al profesor Vicente Castro Castillo, Vicho...

## Agradecimientos

Fueron muchos años en la Universidad de Chile, llenos de acontecimientos, tropiezos y alegrías que marcaron esta etapa de mi vida, con momentos que pusieron a prueba el carácter y que muchas veces sembraron la duda, pero que al final de este camino lograron responder la mayoría de las interrogantes que me habían generado, dejando enseñanzas más allá de lo científico. Sin duda, fueron muchas las personas que me ayudaron a enfrentar este capítulo con muchas aristas en mi historia, a las cuales quiero agradecer su aporte.

Quisiera agradecer en especial al Dr. Gerald Zapata, quien desde el primer momento que llegué a la Unidad de Gráfica Molecular me demostró toda su calidad como científico y docente, pero por sobre todo la calidad humana, poniendo siempre a disposición sus conocimientos, consejos y tiempo; motivándome y apoyándome para terminar este trabajo como lo hace un verdadero amigo, gracias por confiar en mí. Agradecer también al Dr. Pablo Jaque, por su energía, alegría y motivación al aparecer cada día en la UGM con nuevas ideas y desafíos para esta tesis y para el grupo en general, por los momentos y conversaciones compartidos junto a todo el equipo. A quienes también aportaron con ideas cuando fue necesario como la Dra. Angélica Fierro, en conjunto con el Dr. Bruce Cassels por su ayuda con sus conocimientos y reactivos. Al Dr. Jorge Saavedra por su buena voluntad siempre, sus correcciones y ayuda en la parte experimental. Agradecer también al Dr. Luis Vilches por su disposición cada vez que requerí de su tiempo y por formar parte de mi comisión.

Agradezco al Dr. Vicente Castro Castillo, por haber sido parte importante de este trabajo, por todo lo que me pudo enseñar de síntesis orgánica experimental y búsqueda de información relacionada, incluso por haberme dado mi propio espacio en su laboratorio. Gracias por su disposición para explicar las cosas de la manera más simple posible y los esquemas que dejaban claro lo que había que hacer. Por enseñarme a mirar la Química Orgánica desde un punto de vista diferente al que tuve durante toda mi carrera, cambiando mi apreciación hacia ella. Parte de su legado y recuerdo irá siempre conmigo donde sea que tenga que aplicar mis conocimientos.

Importante agradecer por supuesto a los compañeros de la UGM; Kevin, Ivo, Miguel, pero por sobre todo a Pedro por su disposición siempre para ayudar, y a Douglas que hizo posible mucho del trabajo realizado aquí con sus magias, conocimientos y *scripts* salvadores de vida. A mis amigos que conocí en la Universidad como Romina, Jacqueline, Pau, Francisco y con mayor razón a quienes me ayudaron y dieron apoyo en los momentos oscuros y difíciles, como Paula que siempre me daba el empujón que a veces me faltaba para atreverme a dar la pelea, y el último tiempo me apuraba en terminar la tesis, gracias por todo amiga. A mi gran amigo de la vida

Sebastián, quien me ayudó y confió en mí dándome la mano para solucionar los inconvenientes.

A mis padres, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, el sustento y la paciencia que han tenido, sé que al igual que para mí, no ha sido fácil todo este proceso, pero que por fin termina con lo que desde pequeño me dijeron: *“lo único que podemos dejarte en esta vida, es la educación”*, gracias por habérmela dado, sé que cada mañana en que se levantan lo han hecho por mí y mi hermana, los amo, y es gracias al ejemplo que nos han dado de superación y esfuerzo que esto es hoy posible. A mis abuelos Gaby y Nono, que siempre me apoyaron en todo cuanto pudieron y estuvo a su alcance, con palabras de aliento cuando lo necesité, y todo cuanto sé que me entregaron. Gracias a mi tío José y tía Pamela que estuvieron cuando los necesité, y se mantuvieron atentos a mis avances y apoyándome. Y gracias también a cada miembro de mi familia que aportó con su grano de arena para que hoy pueda ser quien soy.

Victoria, mi amada... como no agradecer también, a la persona que ha traído tanta dicha a mi vida, a mi pareja y compañera Victoria. Gracias por cada consejo, por tu apoyo incondicional siempre, por hacerme mejor persona y más humano cada día, por tu visión diferente de la vida y del mundo, que me ha hecho mirar las cosas desde otra perspectiva, sacarme de la rutina y llevarme a conocer tu mundo, apreciando la belleza hasta en las cosas más sencillas y naturales.

Finalmente, agradecer al proyecto FONDECYT regular N°1171484, quien financió esta investigación.

## Contenidos

Índice de Figuras.....	3
Índice de Tablas.....	5
Abreviaciones.....	6
Resumen.....	8
Summary.....	9
1. Introducción.....	10
1.1 Enfermedades Neurodegenerativas.....	10
1.2 Monoamino oxidasa.....	10
1.3 Inhibidores de MAO.....	15
1.4 Propuesta de tesis.....	19
2. Hipótesis.....	20
3. Objetivos.....	20
3.1 Objetivos Generales.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4. Metodología.....	21
4.1.1 Diseño y Modelamiento Molecular.....	21
4.1.2 Optimización de los ligandos.....	22
4.1.3 Acoplamiento molecular.....	23
4.2 Cálculos teóricos de $pK_a$ .....	24
4.2.1 Consideraciones sobre $pK_a$ .....	24
4.2.2 Predicción de $pK_a$ usando Jaguar.....	25
4.3 Síntesis.....	27
4.4 Materiales y reactivos.....	28
4.4.1 Solventes y soportes de purificación.....	28
4.4.2 Reactivos.....	28
4.4.3 Equipos.....	29

5.Desarrollo experimental.....	29
5.1 Ruta de síntesis.....	29
5.1.1 Preparación de los compuestos derivados de bencilpropargilaminas: método general.....	29
5.1.2 Preparación de oxalatos.....	30
5.1.3 Datos espectroscópicos.....	30
6. Resultados y Discusiones.....	38
6.1 <i>Docking</i> .....	38
6.1.1 <i>Docking</i> MAO-A.....	39
6.1.2 <i>Docking</i> MAO-B.....	46
6.2 Estimaciones de $pK_a$ .....	52
6.3 Síntesis.....	61
6.3.1 Estudio de la metodología de síntesis.....	61
6.3.2 Preparación de oxalatos.....	62
6.3.3 Análisis Espectroscópico.....	63
7. Conclusiones.....	64
8. Referencias.....	65
9. Anexo.....	69

## Índice de Figuras

**Figura 1.** Desaminación oxidativa de aminas por MAO, dónde R representa la estructura química de diversos sustratos conocidos para MAO.

**Figura 2.** Estructura del cofactor FAD, con el C4 $\alpha$  señalado en rojo.

**Figura 3.** Estructuras químicas de algunos sustratos conocidos para MAO, con el N<sub>am</sub> de cada uno de ellos en color rojo.

**Figura 4.** a) Estructura cristalina de MAO-A humana. b) Estructura cristalina de MAO-B humana.

**Figura 5.** a) mecanismo polar nucleofílico; b) mecanismo por transferencia monoeléctronica; c) mecanismo por transferencia de hidruro y d) mecanismo de hidruro en dos etapas.

**Figura 6.** Selegilina y Rasagilina (inhibidores irreversibles selectivos de MAO-B). Clorgilina (inhibidor selectivo de MAO-A). En rojo los fragmentos responsables de la inhibición irreversible.

**Figura 7.** Estructuras de propargilamina y *N*-metilpropargilamina.

**Figura 8.** Estructuras químicas de MMP (a) y CMP (b).

**Figura 9.** Posibles puntos de deprotonación para la *N*-metilpropargilamina y para la Selegilina, señalados con color rojo los posibles hidrógenos involucrados en los mecanismos de inhibición de MAOs.

**Figura 10.** Mecanismo propuesto para la inhibición irreversible de MAO por propargilaminas.

**Figura 11.** Estructura química de la Pargilina.

**Figura 12.** Estructura base para las moléculas diseñadas. En rojo el fragmento responsable directo de la inhibición de MAO, en azul los diversos sustituyentes agregados al anillo aromático.

**Figura 13.** Representación del ciclo termodinámico utilizado por Jaguar.

**Figura 14.** Diagrama de síntesis de los compuestos derivados de bencilpropargilamina.

**Figura 15.** Energías de enlace de los sustratos AR01 al AR15, resultado del estudio de *docking* utilizando MAO-A.



**Figura 16.** a) Resultados de *docking* con AR01, incluyendo todos los residuos que conforman el sitio activo de MAO-A. b) Resultados de *docking* con AR01, considerando solo los residuos principales Tyr407 y Tyr444.

**Figura 17.** Interacciones de AR08 con el sitio activo de MAO-A, donde se observan las interacciones con Tyr407 a 4,0 Å, Cys323 a 3,5 Å y con Phe208 a 3,3 Å.

**Figura 18.** Interacciones de AR11 en el sitio activo de MAO-A, donde se observan las interacciones con Tyr407 a 3,3 Å y la interacción con Cys323 a 3,7 Å.

**Figura 19.** a) Conformación 1 para AR07 en el sitio activo de MAO-A, donde se aprecia la interacción descrita con Phe208 a 3,2 Å y la que presenta con Tyr407 a 3,7 Å. b) Conformación 2 para AR07 en el sitio activo de MAO-A, interaccionando con Cys323 a 3,9 Å y con Tyr407 a igual distancia.

**Figura 20.** a) Conformación de AR13 en el sitio activo de MAO-A, donde se muestra la interacción presente con Cys323 a 3,3 Å. b) Interacciones encontradas para AR14 en el sitio activo de MAO-A, donde destaca la formación del puente de hidrogeno con Phe208.

**Figura 21.** Energías de enlace de las estructuras AR01 a la AR15, resultado del estudio de *docking* utilizando MAO-B.

**Figura 22.** a) Resultados de *docking* con AR01, incluyendo todos los residuos que conforman el sitio catalítico de MAO-B. b) Resultados de *docking* con AR01, considerando solo los residuos principales Tyr398 y Tyr435.

**Figura 23.** Conformación de AR07 en el sitio activo de MAO-B, se muestra el puente de hidrógeno formado entre el N de AR07 y Tyr435, en conjunto con la interacción con Cys172 a 3,3 Å.

**Figura 24.** Conformación de AR05 en el sitio activo de MAO-B, donde se muestra el puente de hidrógeno formado con Tyr435.

**Figura 25.** Conformación de AR08 en el sitio activo de MAO-B, formando un puente de hidrógeno con Tyr326 y otro con Tyr435.

**Figura 26.** Conformación de AR14 en el sitio activo de MAO-B, donde se muestra la interacción con Tyr326 a 3,7 Å, con Cys172 a 3,5 Å y con Tyr398 a 3,8 Å.

**Figura 27.** a) Conformación 1 para AR09 en el sitio activo de MAO-B, con la interacción a 3,4 Å con Cys172, y la interacción con Tyr398 a 4,4 Å. b) conformación 2 para AR09 en el sitio activo de MAO-B donde se evidencia el aumento en la distancia con Cys172 a 4,2 Å.

**Figura 28.** Estructura química de ASS234.

**Figura 29.** Nomenclatura asignada para cada uno de los hidrógenos evaluados.

**Figura 30.** Gráfico  $pK_a$  de hidrógenos en la cadena alquilamina en estructuras AR01 a la AR09.

**Figura 31.** Gráfico  $pK_a$  de hidrógenos en la cadena alquilamina en estructuras AR10 a la AR15, propargilamina y *N*-metilpropargilamina.

**Figura 32.**  $pK_a$  obtenidos para los hidrógenos de ASS234 en H<sub>2</sub>O.

**Figura 33.** Estructuras químicas que cambiaron su valor de  $pK_a$  con sustituyentes específicos en el anillo aromático.

**Figura 34.** Mecanismo de reacción general, descrito a partir de la formación de pargilina a partir de benzaldehído y de *N*-metilpropargilamina.

**Figura 35.** Espectro <sup>1</sup>H-RMN de AR01 Pargilina.

### Índice de Tablas

**Tabla 1.** Sustituyentes (R<sub>1-5</sub>) seleccionados en el diseño de cada una de las moléculas propuestas.

**Tabla 2.** Valores para las constantes A y B utilizados por Jaguar.

**Tabla 3.** Resultados de energías de unión para las diversas moléculas propuestas, con MAO-A y MAO-B.

**Tabla 4.**  $pK_a$  experimentales DMSO y  $pK_a$  estimados por Jaguar para el protón alfa del carbono carbonílico de diversos compuestos.

**Tabla 5.** Resultados de  $pK_a$  calculados por Jaguar en H<sub>2</sub>O como solvente.

**Tabla 6.** Resultados de  $pK_a$  calculados por Jaguar en DMSO como solvente.

**Tabla 7.** Tiempos de agitación para la preparación de las sales de ácido oxálico.

## Abreviaciones

Enfermedad Neurodegenerativa	EN
Enfermedad de Alzheimer	EA
Enfermedad de Parkinson	EP
Monoamino Oxidasa	MAO
Protein Data Bank	PDB
Flavin Adenindinucleótido	FAD
Inhibidor de Monoamino Oxidasa	iMAO
Serotonina	5-HT
Dopamina	DA
Norepinefrina	NE
Mecanismo polar nucleofílico	PN
Mecanismo por transferencia monoelectrónica	SET
Mecanismo por transferencia de hidruro	HT
FAD semirreducido	FADH
FAD reducido	FADH <sub>2</sub>
Hidroxilo	OH
Nitro	NO <sub>2</sub>
Metoxilo	OCH <sub>3</sub>
Desviación estándar	SD
Teoría de Funcionales de la Densidad	DFT
Campo de reacción auto-consistente	SCRF
Cromatografía en capa fina	CCF
Dimetilsulfóxido	DMSO

Dimetilsulfóxido deuterado	DMSO-d <sub>6</sub>
Óxido de deuterio	D <sub>2</sub> O
Tetrametilsilano	TMS
Tetrahidrofurano	THF
<i>p</i> -cloro-β-metil-feniletilamina	CMP
<i>p</i> -metoxi-β-metilfeniletilamina	MMP
Complejo receptor-ligando	R-L

## Resumen

Varios estudios relacionados con el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (EN) han mostrado que moléculas inhibitoras de Monoamino Oxidasas (iMAO) disminuyen los efectos asociados a éstas, entre ellos se encuentra la Pargilina, un iMAO muy eficaz y que actualmente es utilizado como fármaco en el tratamiento de estas enfermedades. La Pargilina se caracteriza por poseer en su estructura química un fragmento de *N*-metilpropargilamina unido a un anillo de benceno. Diversos mecanismos de inhibición han sido propuestos para la Pargilina y sus derivados, o utilizando el fragmento de *N*-metilpropargilamina, dando como resultado nuevas moléculas con potencial uso como fármacos en el tratamiento de EN.

La variación y ubicación de sustituyentes en el anillo aromático de la Pargilina, podría provocar cambios en la efectividad de la Pargilina como iMAO ya sea por la variación del mecanismo por el cual se lleva a cabo esta inhibición o bien por cambio de la actividad de las moléculas, dependiendo del efecto electrónico generado por los sustituyentes en la acidez de los hidrógenos involucrados en dicho mecanismo.

Varios derivados de Pargilina fueron diseñados y optimizados mediante metodologías de mecánica cuántica, y posteriormente estudiados utilizando acoplamiento molecular en el sitio activo de MAO. También los efectos electrónicos causados por los diferentes sustituyentes fueron evaluados mediante la estimación teórica del  $pK_a$  de los diferentes hidrógenos en la cadena alquilamina en el fragmento de *N*-metilpropargilamina.

Las moléculas mostraron energías de unión similares a las obtenidas para Pargilina, cumpliendo con las interacciones principales descritas en el sitio activo de MAO-A (Tyr407 y Tyr444) y las principales descritas para MAO-B (Tyr398 y Tyr435). Las estimaciones de  $pK_a$  sugieren que la presencia de sustituyentes con efecto atractor de electrones en posición *orto*-, y en menor grado en posición *para*-, cambian la acidez de estos protones, especialmente los de la cadena alquímica cercanos al anillo aromático, los que disminuyeron su  $pK_a$  estimado desde 26,8 en la Pargilina, hasta un valor mínimo de 11,2 con la variación de sustituyentes; convirtiéndolos en los más ácidos de la cadena alquilamina, donde en ausencia de estos sustituyentes corresponderían a los hidrógenos menos ácidos de la Pargilina.

## Summary

Several studies related to the treatment of neurodegenerative diseases (ND) have shown that Monoamine Oxidases inhibitory molecules (iMAO) decrease the effects associated with them, among them is Pargiline, a very effective iMAO that is currently used as a drug in the treatment of these diseases. Pargiline is characterized by having in his chemical structure a fragment of *N*-methylpropargilamine linked to a benzene ring. Various mechanisms of inhibition have been proposed for Pargiline and its derivatives, or using the *N*-methylpropargilamine fragment, resulting in new molecules with potential use as drugs in the treatment of ND.

The variation and location of substituents in the aromatic ring of Pargiline, could cause changes in the effectiveness of Pargiline as iMAO either by the variation of the mechanism by which this inhibition is carried out or by change in the activity of the molecules, depending on the electronic effect generated by the substituents on the acidity of the hydrogens involved in said mechanism.

Several Pargiline derivatives were designed and optimized by quantum mechanics methodologies, and subsequently studied using molecular coupling at the MAO active site. Also, the electronic effects caused by the different substituents were evaluated by the theoretical estimation of the  $pK_a$  of the different hydrogens in the alkylamine chain in the *N*-methylpropargilamine fragment.

The molecules showed binding energies similar to those obtained for Pargiline, complying with the main interactions described in the active site of MAO-A (Tyr407 and Tyr444) and the main ones described for MAO-B (Tyr398 and Tyr435). Estimates of  $pK_a$  suggest that the presence of substituents with electron attractor effect in ortho-position, and to a lesser extent in para-position, change the acidity of these protons, especially those of the alkyl chain near the aromatic ring, which decreased its estimated  $pK_a$  from 26.8 in Pargiline, to a minimum value of 11.2 with the variation of substituents; making them the most acidic of the alkyl chain, where in the absence of these substituents they would correspond to the less acidic hydrogens of Pargiline.

## 1. Introducción

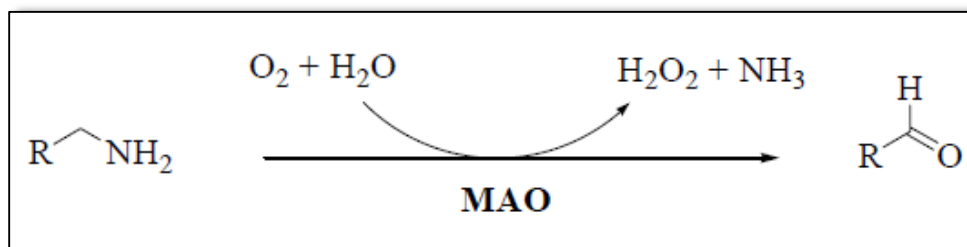
### 1.1 Enfermedades Neurodegenerativas

Las Enfermedades Neurodegenerativas (EN) abarcan a una serie de enfermedades que se caracterizan por afectar principalmente las neuronas del cerebro humano, las cuales son los componentes básicos del sistema nervioso. A su vez, las neuronas normalmente no se reproducen ni se reemplazan luego de sufrir daños. EN tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica son enfermedades debilitantes que al día de hoy carecen de cura, produciendo una degeneración progresiva, siendo las dos primeras las que tienen una mayor tasa de ocurrencia entre las EN.<sup>1</sup> La EA se caracteriza por un deterioro progresivo de la memoria y la función cognitiva, siendo la principal causa de demencia, representando entre el 50-75% de los casos.<sup>2</sup> Una pequeña porción de ocurrencia de EA y EP puede ser atribuible a mutaciones genéticas, otra porción puede ser atribuible a factores ambientales de riesgo tales como el uso de pesticidas, exposición a metales como cobre, hierro y zinc;<sup>3</sup> entre otros factores para la patogénesis de la EA, que consideran condiciones de salud, vida diaria e incluso tipo de dieta alimentaria.<sup>1</sup>

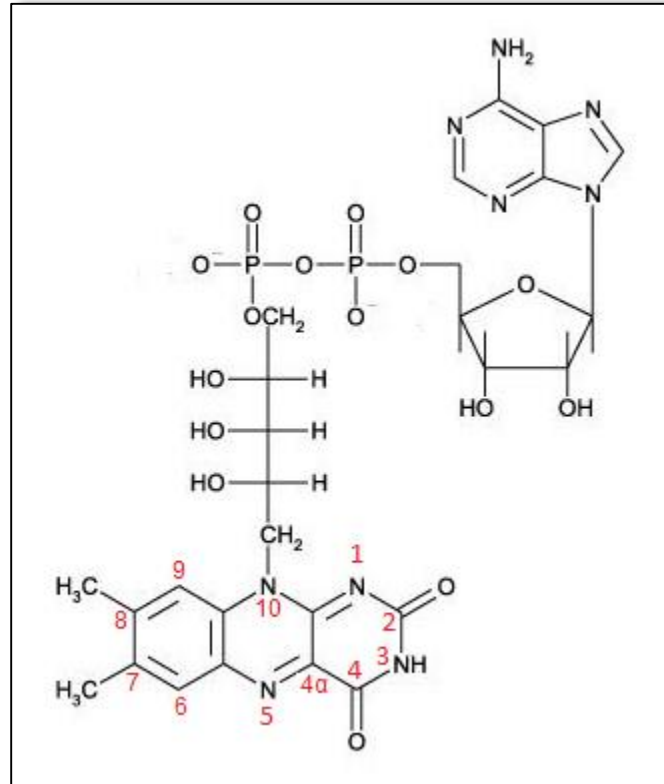
### 1.2 Monoamino oxidasa

Los estudios dirigidos al tratamiento de las EN señalan que moléculas con capacidad de inhibir enzimas como monoamino oxidasas (MAO) y/o quelar metales, disminuyen los efectos asociados a dichas enfermedades.<sup>4</sup> Las MAOs son flavoenzimas asociadas a la membrana mitocondrial externa que catalizan la desaminación oxidativa de diversas aminas biogénicas y exógenas (Figura 1), utilizando Flavin Adenindinucleótido (FAD) como cofactor (Figura 2). El descubrimiento de ciertas moléculas con actividad antidepresiva en los años 50-60, las cuales actúan como inhibidores de MAO (iMAO), ha permitido relacionar a estas enzimas con enfermedades neurológicas y EN,<sup>5</sup> tales como la depresión, EP y EA.

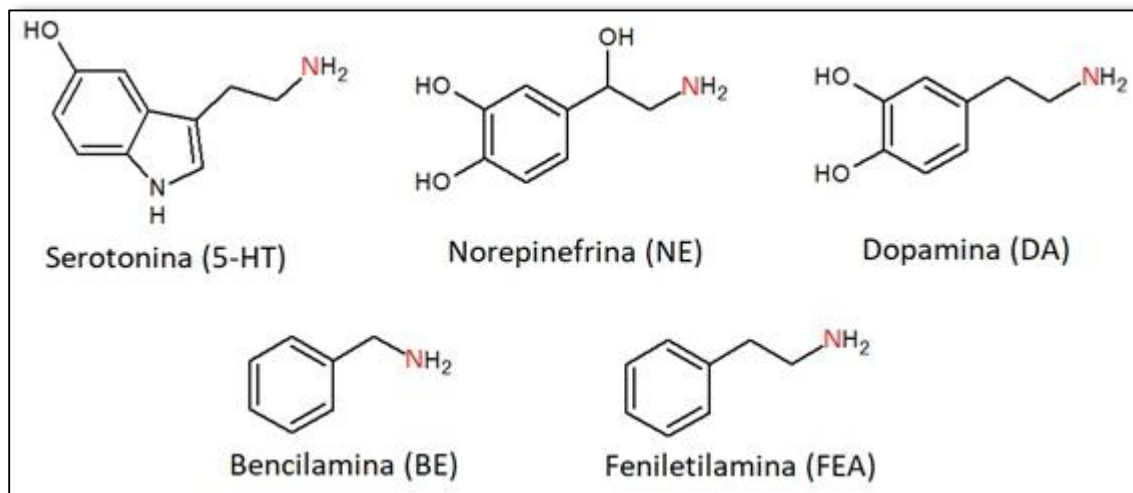
Sus principales sustratos endógenos son neurotransmisores como Serotonina (5-HT), Dopamina (DA) y Norepinefrina (NE);<sup>6</sup> sin embargo, también son capaces de oxidar otras monoaminas como la Bencilamina (BA), Feniletilaminas (FEA) y sus derivados (Figura 3).<sup>7</sup>



**Figura 1.** Desaminación oxidativa de aminas por MAO, dónde R representa la estructura química de diversos sustratos conocidos para MAO.



**Figura 2.** Estructura del cofactor FAD, con el C4 $\alpha$  señalado en rojo.



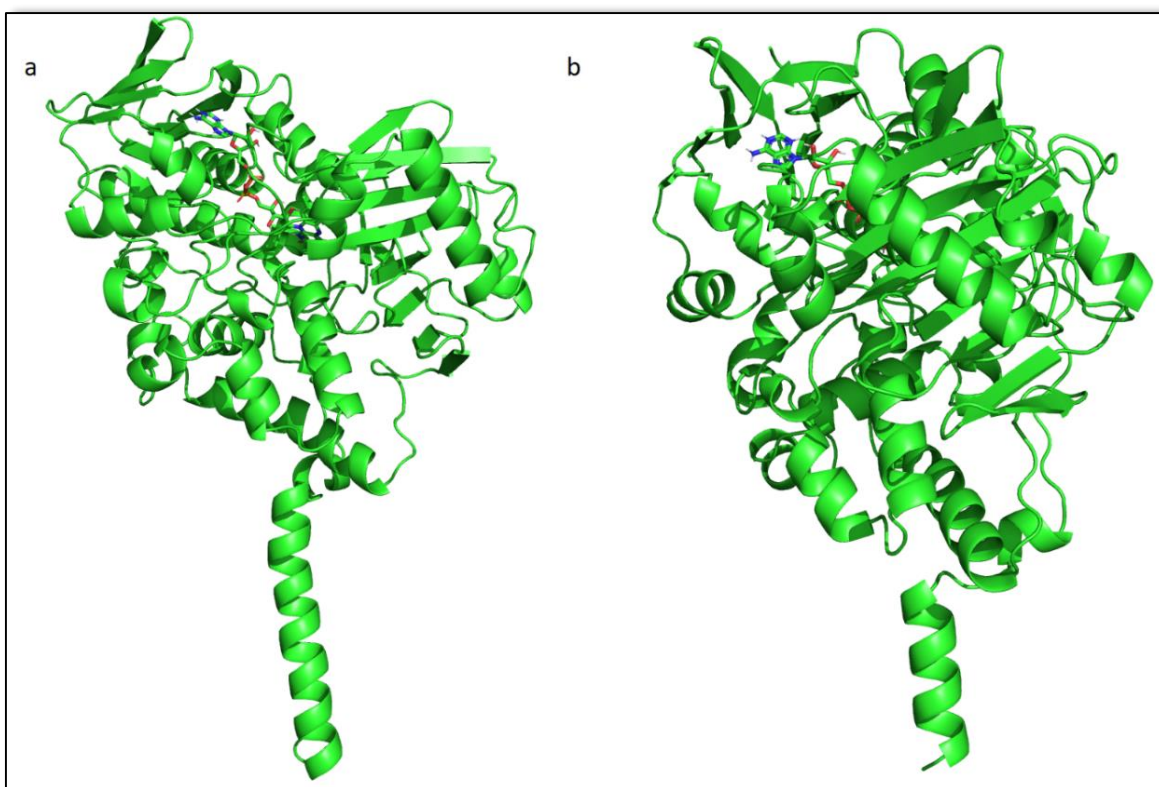
**Figura 3.** Estructuras químicas de algunos sustratos conocidos para MAO, con el N<sub>am</sub> de cada uno de ellos en color rojo.

Las MAO se pueden encontrar en las isoformas A y B (Figura 4), las cuales comparten un 70% de identidad.<sup>6</sup> Ambas se encuentran ancladas a la membrana mitocondrial externa a través de un segmento transmembranal polipeptídico conocido como C-terminal.<sup>7</sup> Se han llevado a cabo diversos estudios para dilucidar



el mecanismo de reacción catalítico para la desaminación oxidativa de las aminas neurotransmisoras, tanto para MAO-A y B; sin embargo, aún no existe información determinante.<sup>8</sup>

A pesar de esto, a la fecha se cuenta con tres mecanismos con mayor aceptación: el mecanismo polar nucleofílico (PN) (Figura 5a),<sup>9</sup> el mecanismo por transferencia monoeléctrica (SET, Single Electron Transfer) (Figura 5b)<sup>10</sup> y el mecanismo por transferencia de hidruro (HT, Hydride Transfer)<sup>11</sup> que puede ser considerado en una o dos etapas (Figura 5c-d). El mecanismo SET ha sido descartado debido a la falta de evidencia tanto experimental como teórica, en cambio, el mecanismo HT es el que cuenta con mayor aceptación sobre los demás, se ha sugerido que este mecanismo puede operar en dos etapas para MAO-B (Figura 5d).<sup>12,13</sup>



**Figura 4.** a) Estructura cristalina de MAO-A humana (Código PDB 2Z5X, resolución 2,2 Å). b) Estructura cristalina de MAO-B humana (Código PDB 6FW0, resolución 1,6 Å).

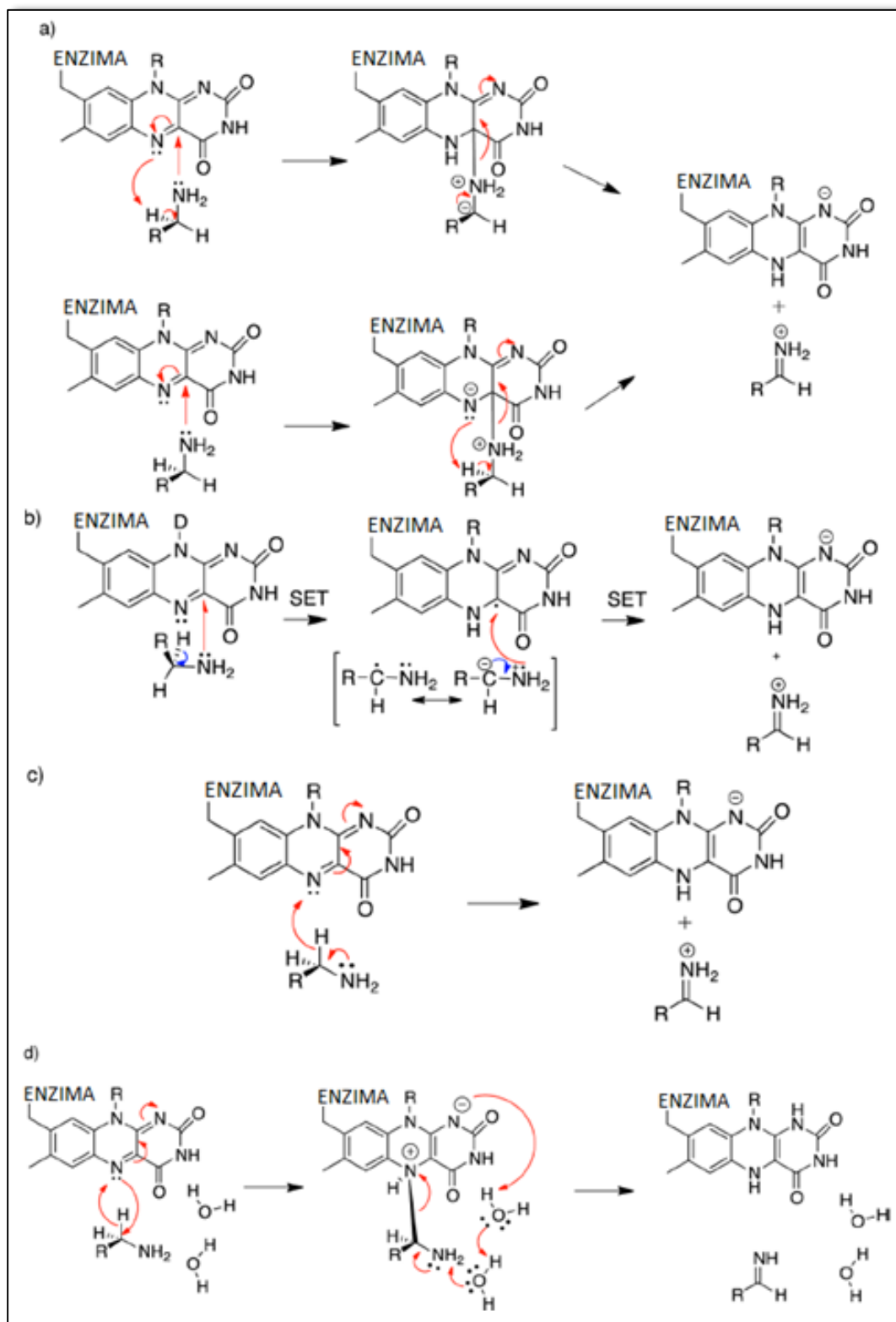
**Mecanismo PN.** Este mecanismo está basado en la transferencia de un protón desde la cadena alquilamina, la cual podría ocurrir a través de dos vías propuestas, una sincrónica (Figura 5a, superior) y una asincrónica (Figura 5a, inferior). En este mecanismo se observa la formación de un aducto que une al sustrato y a la flavina a través de la unión  $N_{am}-C4\alpha$ . Finalmente, el aducto pasa a productos por

deslocalización electrónica hacia el N(1) del FAD, formando el FAD semirreducido (FADH) y el ion iminio correspondiente.

**Mecanismo SET.** Este mecanismo también conocido como mecanismo radicalario, se caracteriza por la transferencia de un electrón desde el  $N_{am}$  del sustrato hacia el  $C4\alpha$  del FAD y la abstracción de un hidruro por parte N(5) del FAD. Luego, se transfiere el segundo electrón desde una especie resonante radicalaria hacia el FAD, dando como producto el FADH y el ion iminio correspondiente.

**Mecanismo HT.** Este mecanismo es posible por dos efectos, el primero debido a la capacidad de deslocalización de carga desde el N(5) hacia el N(1) del anillo de isoaloxacina del FAD y el segundo por la donación del par electrónico libre hacia el enlace  $N_{am}-C4\alpha$ . Por lo tanto, ambos efectos combinados dan la posibilidad de transferencia de hidruro desde el sustrato hacia el FAD, dando como producto el FADH y el ión iminio en una sola etapa. Existe una alternativa que involucra la formación de un aducto intermediario entre el N(5) -  $C4\alpha$  y a su vez la semirreducción del FAD. Finalmente, el ataque del N(1) a una molécula de agua dentro de una red de ellas, hace que se obtenga como producto el FAD completamente reducido ( $FADH_2$ ) y una imina desprotonada.

Estudios estructurales en MAO han mostrado que dos residuos (Tyr398 y Tyr435 en MAO-B) ubicadas en el sitio activo aproximadamente perpendiculares al FAD cumplen un rol funcional en esta enzima, formando una "caja aromática" que tiene como función estabilizar al sustrato.<sup>14</sup> Otro residuo importante es Lys296, el cual forma un puente de hidrógeno que une al sitio activo con el cofactor FAD a través de una molécula de agua.<sup>15</sup> Las nuevas investigaciones con respecto a los posibles mecanismos catalíticos para la desaminación oxidativa de las aminas neurotransmisoras por parte de la MAO-B se han puesto a disposición recientemente.<sup>8,16</sup> Aun así, faltan estudios detallados de las interacciones en la llamada cavidad de entrada, o incluso más lejos del FAD.



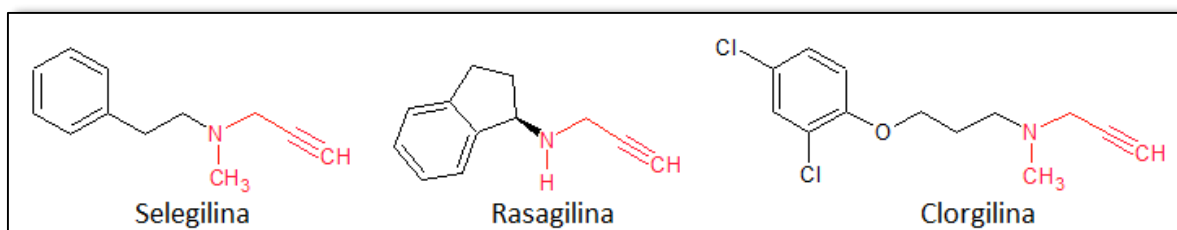
**Figura 5.** a) mecanismo polar nucleofílico; b) mecanismo por transferencia monoeléctrica; c) mecanismo por transferencia de hidruro y d) mecanismo de hidruro en dos etapas.

### 1.3 Inhibidores de MAO

Varios estudios han revelado que la MAO-A está involucrada en trastornos psicológicos como la depresión, mientras que la MAO-B se relaciona con los desórdenes neurodegenerativos mencionados previamente. Por esta razón los iMAO se han transformado en sustancias de alto interés gracias a su potencial uso farmacológico. Algunas investigaciones han encontrado evidencia que indica que algunos iMAO tienen propiedades neuroprotectoras y neurorescatadoras, existiendo una gran diversidad de estructuras químicas para estos inhibidores.<sup>17</sup>

Los primeros iMAOs irreversibles utilizados en tratamientos principalmente para la depresión, los cuales son algunos de los primeros fármacos probados en la EP, presentaron diversos efectos secundarios que provocaron una disminución en el uso de éstos, entre ellos el efecto adverso más conocido es el “efecto queso”.<sup>18</sup> La inhibición de estas enzimas provoca un aumento de tiramina, aminoácido encargado de regular la presión arterial, lo que puede llegar a generar un aumento grave de la presión arterial y requerir un tratamiento de emergencia o incluso provocar la muerte del individuo. Por lo tanto, el desarrollo de inhibidores selectivos y reversibles, evitaría los peligrosos efectos secundarios de estos primeros inhibidores.<sup>19</sup>

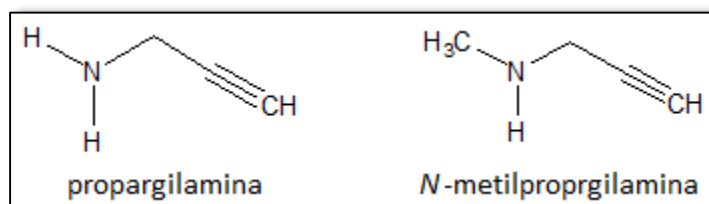
La búsqueda de inhibidores con alto nivel de especificidad requiere conocer la estructura y las propiedades fisicoquímicas de los residuos en el sitio activo. Entre los inhibidores irreversibles de MAO desarrollados a la fecha, se encuentran el I-Deprenil o también llamado Selegilina (selectivo para MAO-B) y Clorgilina (selectivo para MAO-A) (Figura 6), ambos forman aductos con el N(5) del anillo de isoaloxazina. Por otro lado, varios derivados de fenilisopropilaminas (referidas comúnmente como anfetaminas sustituidas), han demostrado ser inhibidores selectivos de MAO-A.<sup>20</sup>



**Figura 6.** Selegilina y Rasagilina (inhibidores irreversibles selectivos de MAO-B). Clorgilina (inhibidor selectivo de MAO-A). En rojo los fragmentos responsables de la inhibición irreversible.

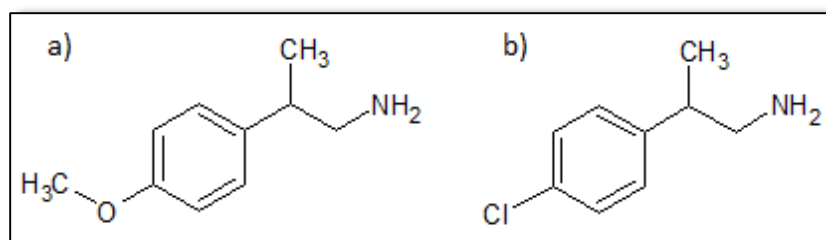
Por otro lado, para el tratamiento de la acinesia y las fluctuaciones motoras en la EP, se recomiendan inhibidores de MAO-B irreversibles selectivos como la Rasagilina y Selegilina (Figura 6). El fragmento indicado, responsable de la inhibición corresponde a un derivado de la propargilamina y de la N-

metilpropargilamina (Figura 7), los cuales han sido ampliamente estudiados como iMAOs.<sup>21,22</sup>



**Figura 7.** Estructuras de propargilamina y *N*-metilpropargilamina.

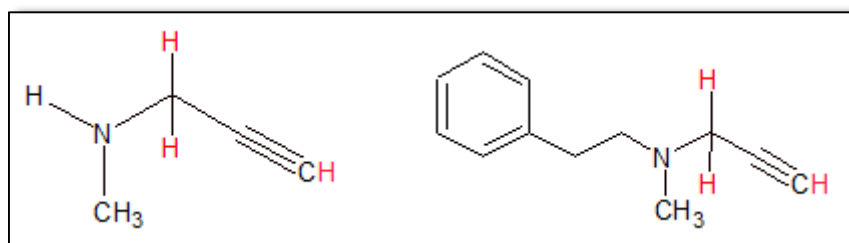
La comprensión de las interacciones en los sistemas de neurotransmisores tiene una importancia fundamental en procesos de optimización y desarrollo de métodos terapéuticos, y diseño de nuevos fármacos orientados al tratamiento de enfermedades como las EN. Se ha reportado previamente que pequeños cambios en la estructura molecular pueden causar cambios drásticos en la actividad de las moléculas, como es el caso de la bencilamina (Figura 3), un conocido sustrato de MAO, la cual ve afectada su afinidad con el sitio activo de MAO cuando se le agrega un grupo nitro en posición *para*- del anillo aromático, dando como resultado la *p*-nitrobencilamina, la cual ha sido identificada como un iMAO.<sup>23</sup> Estudios recientes han demostrado que la variación en los sustituyentes (respecto a sus propiedades electrónicas, que provoquen cambios en la estabilidad interna de la molécula o que generen interacciones diferentes en el sitio activo de MAO), son capaces de originar cambios en la actividad de una molécula, como es el caso reportado de la *p*-metoxi-β-metilfeniletilamina (MMP) (Figura 8a) y *p*-cloro-β-metilfeniletilamina (CMP) (Figura 8b), donde se ha demostrado experimentalmente que CMP es un inhibidor de MAO-B,<sup>24</sup> mientras que MMP ha resultado ser un sustrato para la misma MAO-B.<sup>25</sup>



**Figura 8.** Estructuras químicas de MMP (a) y CMP (b).

Varias estructuras de aductos covalentes y mecanismos por el cual las propargilaminas inactivan a MAOs se han propuesto previamente, muchos de ellos incluso sin evidencias experimentales que los respalden.<sup>26</sup> Los estudios computacionales realizados a estos derivados, han propuesto como un probable punto reactivo al resto acetilénico de la propargilamina, el cual luego de desprotonarse, actúa como la especie reactiva que ataca al N(5) del FAD oxidado, resultando en un aducto que lleva un resto acetileno;<sup>27</sup> sin embargo, no descartan

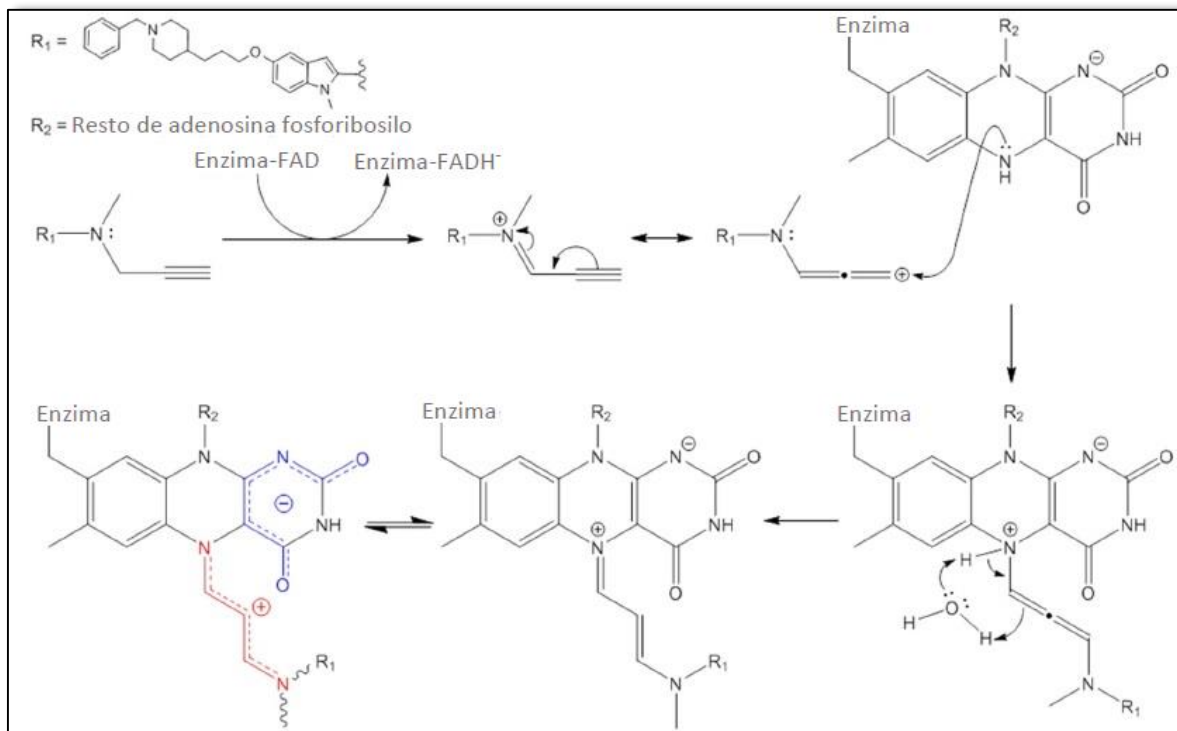
que el mecanismo se pueda llevar a cabo mediante la deprotonación inicial del triple enlace terminal o del carbono metílico adyacente al N (Figura 9), debido a sus similitudes en los valores de energía de desprotonación y a los  $pK_a$  estimados.<sup>27</sup>



**Figura 9.** Posibles puntos de desprotonación para la *N*-metilpropargilamina y para la Selegilina, señalados con color rojo los posibles hidrógenos involucrados en los mecanismos de inhibición de MAOs.

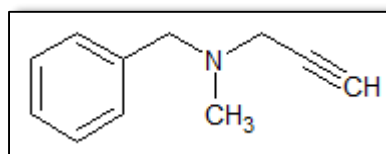
Estudios computacionales posteriores realizados con propargilamina han confirmado la existencia del aducto covalente formado por la propargilamina, en conjunto con la importancia que tiene la existencia de un grupo metileno entre el triple enlace C-C y el N de la propargilamina que permita un reordenamiento de electrones para estabilizar la estructura, proponiendo además un posible mecanismo más refinado para la inhibición de MAO por propargilaminas (Figura 10). Este estudio, destaca la hipótesis que las interacciones electrostáticas intramoleculares son de suma importancia en términos de estabilidad del compuesto, en conjunto con el hecho que es necesaria y fundamental para el mecanismo catalítico de MAO la desprotonación de la propargilamina para dar paso a la inhibición, proponiendo además la necesidad de profundizar el enfoque en este tipo de estudios para confirmar y comprender de mejor manera el efecto de desprotonación del sustrato.<sup>26</sup>

Desde este enfoque, se ha propuesto profundizar en la importancia de la desprotonación del fragmento de la propargilamina presente en las moléculas diseñadas, considerando la evaluación del  $pK_a$  de los protones involucrados en el proceso de inhibición llevado a cabo por propargilaminas que ya han sido estudiados, y como afectarían estos hidrógenos en la efectividad de estas moléculas como iMAOs.



**Figura 10.** Mecanismo propuesto para la inhibición irreversible de MAO por propargilaminas.<sup>26</sup>

La Pargilina (Figura 11) corresponde a un derivado de bencilpropargilaminas que ha sido utilizado previamente como medicamento en el tratamiento de EN, debido a su comportamiento comprobado como iMAO. Es una molécula utilizada como base en el desarrollo de nuevos fármacos derivados de su estructura, que contengan un fragmento de Pargilina en ellos.<sup>28</sup> La Pargilina presenta en su estructura química el fragmento de *N*-metilpropargilamina involucrado directamente en la inhibición de MAO, pero a la fecha no se han llevado a cabo estudios enfocados en los efectos de la adición de diferentes sustituyentes en su anillo aromático. Estos permitirían comprender mejor el mecanismo de inhibición de MAO, lo que puede aportar nuevas directrices en el desarrollo de nuevos fármacos.



**Figura 11.** Estructura química de la Pargilina.

Para estos fines, son útiles las herramientas de modelado molecular, tales como los protocolos de acoplamiento molecular que permiten la exploración de los diferentes sitios de unión probables, facilitando el diseño de fármacos, mejorando la selectividad y eficiencia de éstos. Para llevar a cabo este tipo de estudios, es

necesario combinar la información estructural disponible para los objetivos planteados y disponer de la estructura cristalina de la enzima.

Los resultados obtenidos mediante química computacional no son suficientes para asegurar si una determinada molécula se comportará como inhibidor o sustrato de una enzima tal como las MAOs, lo que hace necesario complementar estos estudios con pruebas experimentales que confirmen el papel que desempeña una molécula propuesta. Estos resultados permiten enriquecer el conocimiento que se tiene del sitio activo y sus interacciones, y de ahí aportar nuevas luces para el desarrollo de nuevas moléculas mediante el uso de síntesis orgánica y la posterior evaluación de su actividad biológica.

#### **1.4 Propuesta de tesis**

A pesar de los esfuerzos llevados a cabo para desarrollar fármacos capaces de curar EN, o de detener el avance de éstas en el organismo, no se han obtenido compuestos capaces de cumplir con estos objetivos de forma totalmente exitosa, siendo las EN aún hoy, enfermedades con pocas posibilidades de tratamiento efectivo para pacientes que ven irremediablemente deteriorada su condición física y/o mentales. Con el fin de desarrollar nuevas moléculas capaces de combatir estas enfermedades, y mediante el uso de las herramientas que ofrece la Química Computacional y de Síntesis Orgánica, enfocándose netamente en las moléculas con actividad iMAO, se diseñó una batería de moléculas basadas en el fragmento de la *N*-metilpropargilamina, utilizado y probado ampliamente como iMAO, y debido a las propiedades neuroprotectoras demostradas por compuestos que contienen el fragmento de propargilamina.<sup>29</sup> Estas moléculas diseñadas consisten en un sistema aromático bencílico con diferentes tipos de sustituyentes acoplados a un fragmento derivado de la *N*-metilpropargilamina.

En esta tesis, se diseñó el conjunto de moléculas planteadas teniendo como base la Pargilina, y se estudiaron las interacciones que estos sistemas llevan a cabo en el sitio activo, utilizando las estructuras cristalinas de MAO en sus isoformas A y B. Para llevar a cabo este objetivo se utilizaron herramientas de modelado molecular considerando las restricciones geométricas y posiciones más probables en la formación del complejo ligando-receptor. Estas moléculas fueron sometidas a estudios teóricos en el cual se estimaron los valores de  $pK_a$  de cada uno de los protones involucrados en el proceso catalítico del ligando con el sitio activo de MAO, para evaluar si un cambio en los sustituyentes podría implicar un posible cambio en el mecanismo de unión ya conocido para MAO con los derivados de metilpropargilamina.

Posteriormente, se procedió a llevar a cabo la síntesis experimental de estas moléculas, de manera de poder disponer de ellas, para que a futuro estas puedan ser sometidas a ensayos biológicos que permitan correlacionar los datos obtenidos



de manera teórica, y a su vez probar la efectividad y selectividad de éstas como posibles iMAOs.

## 2. Hipótesis

El cambio de la posición y naturaleza de sustitución en el anillo aromático en derivados de Pargilina, causarían un cambio en la acidez de los protones en el fragmento de propargilamina. Estos cambios en acidez deberían reflejarse en una alteración del mecanismo de inhibición propuesto, y eventualmente en la actividad biológica de estas moléculas.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivos Generales

Diseñar y sintetizar una serie de moléculas con posible actividad inhibitoria para la enzima MAO, obteniendo nuevas pistas para la obtención de nuevos fármacos útiles en el tratamiento de las EN.

### 3.2 Objetivos Específicos

1. Diseñar y optimizar mediante el uso de herramientas de modelado molecular una serie de moléculas que contengan un fragmento derivado de *N*-metilpropargilamina unido a un anillo aromático, diferenciándose entre ellas por los sustituyentes unidos al anillo aromático.
2. Identificar las interacciones de las moléculas diseñadas con residuos específicos en las estructuras cristalinas de MAO-A y MAO-B.
3. Evaluar teóricamente los posibles efectos de los diferentes sustituyentes en el anillo aromático, en la afinidad de los ligandos con los receptores de MAO-A y MAO-B.
4. Predecir los valores de  $pK_a$  de las diferentes moléculas propuestas, y cómo podrían influenciar los diferentes sustituyentes en el anillo aromático a estos valores de  $pK_a$ .
5. Sintetizar los compuestos diseñados a partir de reactivos comerciales.
6. Caracterizar los compuestos obtenidos mediante  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ .

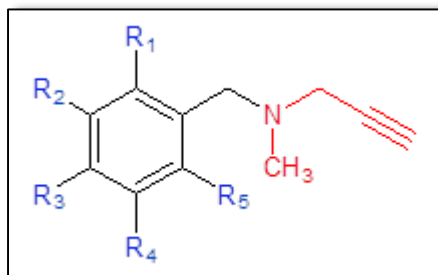
## 4. Metodología

### 4.1.1 Diseño y Modelamiento Molecular

Para obtener una serie de moléculas que tengan la capacidad de comportarse como iMAOs, se propone el diseño de moléculas que contengan el fragmento de *N*-metilpropargilamina, un derivado de propargilamina, el cual ya ha sido ampliamente utilizado como iMAO, y específicamente como fármaco en el tratamiento de EA.<sup>21,22</sup> Estos fármacos forman un enlace covalente con el N(5) del cofactor FAD, produciendo un aducto de flavocianina. El fragmento de *N*-metilpropargilamina se diseña unido a un anillo aromático, el cual a su vez será sustituido con diferentes grupos funcionales, los que podrían determinar el comportamiento de las moléculas propuestas como iMAO en esta investigación (Figura 12). Los sustituyentes (R<sub>1-5</sub>), seleccionados para cada una de las moléculas diseñadas, entre los que se encuentran en diferentes posiciones del anillo aromático los grupos hidroxilo (OH), nitro (NO<sub>2</sub>), metoxilo (OCH<sub>3</sub>), y en una de las moléculas una dimetilamina en posición meta (R<sub>4</sub>) del anillo aromático se muestran en la Tabla 1.

Con estos sustituyentes seleccionados, se propone el estudio de un total de 15 moléculas (**AR01** – **AR15**), teniendo como punto de partida y de comparación la molécula **AR01**, conocida previamente como Pargilina,<sup>30-32</sup> en la que todos sus sustituyentes presentes en el anillo aromático son átomos de hidrógeno. Se propone además de un cambio de sustituyentes, un cambio en la posición de un mismo sustituyente, lo que permitirá evaluar en base a cálculos teóricos de química computacional, si un mismo sustituyente en diferente posición podría implicar algún efecto sobre la afinidad de la molécula con el sitio activo de las MAOs, y a su vez permitirá evaluar si la naturaleza de los diferentes grupos funcionales presentes en el anillo aromático podría ser consecuencia de una modificación en los posibles mecanismos ya conocidos por los cuales actúan los iMAO, más específicamente respecto a lo que ya se ha propuesto como mecanismo de inhibición de la Pargilina.

Las estructuras propuestas en la Tabla 1, con posible actividad iMAO fueron modeladas usando el software Gaussian09.<sup>33</sup>



**Figura 12.** Estructura base para las moléculas diseñadas. En rojo el fragmento responsable directo de la inhibición de MAO, en azul los diversos sustituyentes agregados al anillo aromático.

**Tabla 1.** Sustituyentes (R<sub>1-5</sub>) seleccionados en el diseño de cada una de las moléculas propuestas.

	R1	R2	R3	R4	R5
AR01	H	H	H	H	H
AR02	OH	H	H	H	H
AR03	H	OH	H	H	H
AR04	H	H	OH	H	H
AR05	H	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
AR06	NO <sub>2</sub>	H	H	H	H
AR07	H	NO <sub>2</sub>	H	H	H
AR08	H	H	NO <sub>2</sub>	H	H
AR09	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H
AR10	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H
AR11	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
AR12	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
AR13	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
AR14	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
AR15	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	H

#### 4.1.2 Optimización de los ligandos

Se utilizó el software Gaussian09 para llevar a cabo la optimización de cada una de las 15 estructuras propuestas. En primer lugar, cada estructura fue optimizada utilizando un método semiempírico de parametrización PM6.<sup>34,35</sup> Posteriormente, cada una de las estructuras parametrizadas, fueron optimizadas a un nivel de Teoría de Funcionales de la Densidad<sup>36,37</sup> (DFT) B3LYP,<sup>38,39</sup> utilizando una base de cálculo 6-31g (d,p). Luego, utilizando el programa RED-VIII.4, se determinaron las cargas RESP<sup>40</sup> de cada una de las moléculas optimizadas. Finalmente, las 15 moléculas a utilizar como ligandos para MAO-A y MAO-B, fueron preparados para el acoplamiento molecular utilizando AutoDockTools 1.5.6.<sup>41</sup>

Una vez terminada la preparación de los ligandos, desde la base de datos Protein Data Bank (PDB) se seleccionó la estructura cristalina de MAO-A, PDB<sub>id</sub>: 2z5y<sup>20</sup> con una resolución de 2,17 Å, mientras que la estructura cristalina seleccionada para MAO-B, PDB<sub>id</sub>: 1s3e<sup>42</sup> tiene una resolución de 1,6 Å. Ambas estructuras cristalinas fueron preparadas con el software PyMOL, de manera de sólo dejar en la estructura cristalina los residuos aminoacídicos y la estructura del cofactor FAD en el centro activo de cada una de ellas, dejándolas limpias para ser utilizadas como receptores.

### 4.1.3 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (*Docking*) es una técnica semiempírica utilizada en modelación molecular para predecir energías de unión y modos de unión entre un ligando y el sitio activo de una enzima o el sitio de unión de un receptor, el cual corresponde principalmente a proteínas,<sup>43</sup> de manera que éstos formen un complejo estable. Estos estudios entregan información que puede ser de gran utilidad en el diseño de compuestos con fines terapéuticos.

AutoDock Vina<sup>44</sup> es un software que funciona por AutoDock Tools, utilizado para realizar cálculos de acoplamiento molecular. Trabaja calculando automáticamente los mapas de grilla y clústers de los resultados. El desarrollo de la función de puntuación en AutoDock Vina, conocida como “*scoring*” proviene del modelo de interacción entre un par de átomos, expresado matemáticamente como:

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij})$$

Donde  $c$  es la sumatoria de todos los pares de átomos que pueden ser relativos unos con otros, excluyendo las interacciones 1-4, lo que puede ser reescrito como:

$$c = c_{inter} + c_{intra}$$

La optimización descrita da un valor global mínimo de  $c$  y otros puntajes bajos, los que se ordenan según la energía libre de enlace calculada, la que es obtenida desde la parte intermolecular de la conformación de puntuación como:

$$s_i = g(c_1 - c_{intra1}) = g(c_{inter1})$$

Donde  $g$  es una función esencialmente arbitraria y no lineal. Por razones modulares muchos de los programas ajustan en una forma particular  $f_{t_i t_j}$  o  $g$ . Estas funciones se toman como parámetros del resto del código, y representan las interacciones intermoleculares. La desviación de la función de puntuación cambia con algunos correctores de potencial electrostático y datos de sistemas empíricos. La interacción  $f_{t_i t_j}$  es definida sobre la superficie de distancia

$$d_{ij} = r_{ij} - R_{t_i} - R_{t_j}$$

donde,  $R_t$  representa el radio de Van der Waals de un átomo tipo  $t$ .  $h_{t_i t_j}$  es la suma de la interacción estérica, idéntica para todos los pares de átomos. De aquí se ponderan por factores definidos estadísticamente para las siguientes funciones dependientes de esas distancias  $d_{ij}$ .

Los términos estéricos son:

$$gauss_1(d) = e^{-\left(d/0,5\text{\AA}\right)^2}$$

$$gauss_2(d) = e^{-\left(\frac{(d-3\text{\AA})}{2\text{\AA}}\right)^2}$$

$$repulsión = \begin{cases} d^2, & \text{si } d < 0 \\ 0, & \text{si } d \geq 0 \end{cases}$$

La función hidrofóbica es igual a 1 cuando  $d < 0,5 \text{ \AA}$ ; y 0 cuando  $d > 1,5 \text{ \AA}$ . Cualquier punto intermedio se interpola. Para la función de interacción de hidrógeno, ésta es igual a 1 cuando  $d < 0,7 \text{ \AA}$  y 0 cuando  $d > 0$ , interpolando los valores intermedios. Todas las interacciones  $f_{ij}$  son acortadas hasta  $r_{ij} = 8 \text{ \AA}$ . Por último, la función  $g$  del algoritmo corresponde a la “conformación independiente” y se define como:

$$g(c_{inter}) = \frac{c_{inter}}{1 + \omega N_{rot}}$$

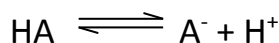
Donde  $N_{rot}$  es el número de enlaces activos que rotan entre átomos pesados y  $\omega$  es su peso asociado.

Utilizando AutoDock Vina se realizaron los estudios de acoplamiento molecular para cada una de las moléculas propuestas con las estructuras cristalinas disponibles de MAO-A y MAO-B.

## 4.2 Cálculos teóricos de $pK_a$

### 4.2.1 Consideraciones sobre $pK_a$

La constante de acidez ( $K_a$ ) es una medida de la propensión de una molécula a desprotonarse en solución acuosa, la cual está directamente relacionada con la energía libre de la reacción de desprotonación. La disociación de un ácido débil está representada por la siguiente ecuación:



Donde la expresión para la constante de equilibrio puede ser expresada de la siguiente forma:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad (1)$$

La cual puede ser expresada convenientemente como la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (2)$$

$$\text{donde } pK_a = -\log K_a$$

El  $pK_a$  es una magnitud que permite cuantificar la tendencia que tiene una molécula a disociarse en solución acuosa, siendo una forma conveniente de expresar la fuerza relativa de un ácido. La determinación experimental de  $pK_a$  se lleva a cabo mediante procesos de titulación, siendo una técnica sencilla siempre y cuando exista un grupo tituable involucrado.<sup>45</sup>

Considerando los mecanismos propuestos en la actualidad para la inhibición de MAOs por propargilaminas, se ha propuesto profundizar en la importancia de la desprotonación del fragmento de propargilamina presente en las moléculas diseñadas. En este caso se determinó de forma computacional el  $pK_a$  de los protones que ya han sido estudiados en el fragmento de la propargilamina, incluyendo además los hidrógenos más lejanos al triple enlace, específicamente para las moléculas propuestas en este estudio, los hidrógenos metílicos entre el átomo de N y el anillo aromático, considerando a su vez si los diferentes sustituyentes podrían modificar el  $pK_a$  de los diversos hidrógenos presentes en estas estructuras, ya que cambios considerables en los  $pK_a$  de estos hidrógenos, podrían afectar en el mecanismo catalítico de la inhibición de MAO por propargilaminas, influyendo en la efectividad de estas moléculas como iMAO.

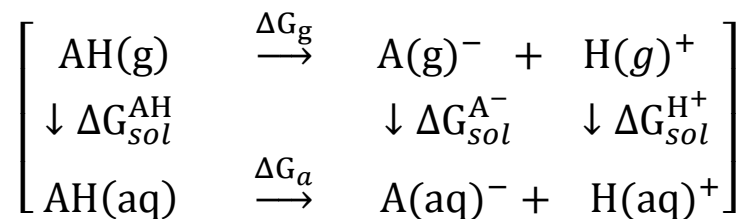
#### 4.2.2 Predicción de $pK_a$ usando Jaguar

Para predecir los  $pK_a$  de los diferentes protones en estudio, se utilizó el software Jaguar V10.5.<sup>46</sup> Este software fue uno de los primeros utilizados para reproducir de manera confiable estos valores en medio acuoso,<sup>47</sup> utilizando una combinación de correlaciones de química cuántica *Ab initio*, un tratamiento continuo de solvatación de campo de reacción auto-consistente (SCRF), añadiendo además correcciones empíricas para reparar las deficiencias en los modelos de solvatación *Ab initio* y continuo.

La estrategia que utiliza Jaguar para esta predicción se basa en la relación directa de la energía libre de la reacción de desprotonación y el  $pK_a$ :

$$pK_a = \frac{\Delta G_a}{2,303RT} \quad (3)$$

La desprotonación de un compuesto en solución acuosa puede ser representada como parte de un ciclo termodinámico:<sup>48</sup>



**Figura 13.** Representación del ciclo termodinámico utilizado por Jaguar.

Donde:  $\Delta G_g$  = cálculo de la energía de desprotonación en fase gaseosa de la molécula.

$\Delta G_{sol}^{AH}$  = energía libre de solvatación de la molécula protonada.

$\Delta G_{sol}^{A^-}$  = energía libre de solvatación de la molécula desprotonada.

$\Delta G_{sol}^{H^+}$  = energía libre de solvatación del protón.

$\Delta G_a$  = energía libre de desprotonación deseada en solución.

La estrategia de Jaguar consiste en calcular los términos  $\Delta G_g$ ,  $\Delta G_{sol}^{AH}$  y  $\Delta G_{sol}^{A^-}$  del ciclo anterior. El  $pK_a$  real relacionado con la energía libre de desprotonación  $\Delta G_a$  según la ecuación 3, se puede obtener sumando los cambios de energía libre para estos tres componentes. Para la determinación del valor de  $pK_a$ , se utiliza el valor experimental de la energía libre de solvatación para un protón, la que corresponde a  $-259,5$  kcal/mol.

La suma de las energías libres alrededor del ciclo debe sumar cero, por lo tanto, el quinto término,  $\Delta G_a$ , puede calcularse a partir de los otros tres términos:

$$\Delta G_a = \Delta G_g - \Delta G_{sol}^{AH} + \Delta G_{sol}^{A^-} + \Delta G_{sol}^{H^+} \quad (4)$$

La energía libre de desprotonación en la fase gaseosa  $\Delta G_g$ , es calculada según:

$$\Delta G_g = \Delta H_g - T\Delta S \quad (5)$$

$$\Delta G_g = E^{A^-} + E_{vib}^{A^-} + \frac{5}{2}RT - E^{AH} - E_{vib}^{AH} - T\Delta S^{H^+} \quad (6)$$

Previo a la evaluación de estas expresiones, Jaguar lleva a cabo una optimización de la geometría de las especies protonadas (AH) y desprotonadas (A<sup>-</sup>) de las moléculas a evaluar, utilizando una base de cálculo 6-31g (d,p). Posteriormente realiza una evaluación precisa de las energías utilizando cálculos de punto sencillo (*single-point*) para cada geometría optimizada utilizando una base de cálculo cc-pVTZ(+). Finalmente, se realizaron los cálculos de las energías libres de solvatación de las especies protonadas y desprotonadas, usando las geometrías optimizadas en fase gaseosa.

Debido a los errores intrínsecos involucrados en cada paso, es necesario aplicar un esquema de corrección empírica a los datos en bruto para lograr un buen resultado, de acuerdo con datos obtenidos de manera experimental. La corrección empírica aplicada por Jaguar para reducir el error es:

$$pK_a = A(pK_a^{raw}) + B \quad (7)$$

Donde  $pK_a^{raw}$  corresponde al  $pK_a$  obtenido previo a la corrección. A y B corresponden a constantes específicas para cada uno de los grupos funcionales presentes en la molécula, obtenidos a partir de datos experimentales. Algunos valores para la constante A y B se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Valores para las constantes A y B utilizados por Jaguar.<sup>47</sup>

Molécula	A	B
Alcoholes	0,7629	-6,391
Fenoles	0,4713	0,631
Ácidos carboxílicos	0,4035	0,155
Tioles	1,0760	-6,894
Sulfonamidas	0,6768	-5,556
Imidas	0,3405	1,321
Aminas primarias	0,3009	5,110
Aminas secundarias	0,7705	-5,305
Aminas Terciarias	0,7043	-5,412
Heterociclos	0,8028	-6,166
Amidinas	1,2977	-16,97

### 4.3 Síntesis

El proceso de síntesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Síntesis Orgánica a cargo del Dr. Vicente Castro Castillo, ubicado en el cuarto piso del edificio Luis Cerutti, perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. La síntesis se llevó a cabo a partir de diversos benzaldehídos, a los cuales mediante aminación reductiva se les añadió el fragmento de *N*-metilpropargilamina responsable de la inhibición de MAO, dando como resultado derivados de bencilpropargilaminas con las sustituciones en el anillo aromático según se describe en la Tabla 1.

En el proceso de síntesis de las moléculas planteadas mediante aminación reductiva, se utilizó el triacetoxiborohidruro de sodio como agente reductor debido a su carácter de agente reductor suave y selectivo, reduciendo solo la imina formada.<sup>49</sup> Este agente reductor permite llevar a cabo la aminación en presencia de grupos funcionales reducibles tales como el nitro o enlaces múltiples sin verse estos reducidos. Además de ser éste un reductor selectivo, evita el procedimiento de tener que aislar la imina que se forma como intermediario de la reacción, desplazando el equilibrio químico hacia la formación de la amina deseada.



## 4.4 Materiales y reactivos

### 4.4.1 Solventes y soportes de purificación

Los solventes utilizados fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y Merck en grado reactivo para análisis (ACS), los cuales corresponden a:

- Acetato de etilo para análisis, Merck
- Metanol para análisis, Merck
- Etanol para análisis, Merck
- Cloroformo para análisis, Merck
- Diclorometano para análisis, Merck
- Tetrahidrofurano para análisis, Merck
- Dietil eter para análisis, Merck
- 2-propanol para análisis, Merck
- Placas de sílica gel F-254 para cromatografía en capa fina, Merck.
- Sílica gel para cromatografía en columna
- Bicarbonato de sodio, grado técnico
- Sulfato de sodio anhidro, grado técnico

### 4.4.2 Reactivos

- *N*-metilpropargilamina 95%, Sigma-Aldrich
- Benzaldehído  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich
- 2-hidroxibenzaldehído  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich
- 3-hidroxibenzaldehído  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich
- 4-hidroxibenzaldehído 98%, Sigma-Aldrich
- 4-(dimetilamino) benzaldehído 98%, Sigma-Aldrich
- 2-nitrobenzaldehído 98%, Sigma-Aldrich
- 3-nitrobenzaldehído 99%, Sigma-Aldrich
- 4-nitrobenzaldehído 98%, Sigma-Aldrich
- 2-metoxibenzaldehído 98%, Sigma-Aldrich
- 3-metoxibenzaldehído 97%, Sigma-Aldrich
- 4-metoxibenzaldehído 98%, Sigma-Aldrich
- 2,4-dimetoxibenzaldehído 98%, Sigma-Aldrich
- 2,5-dimetoxibenzaldehído 99%, Sigma-Aldrich
- 3,4,5-trimetoxibenzaldehído 98%, Sigma-Aldrich
- 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído  $\geq 99\%$ , Merck
- Triacetoxiborohidruro de sodio 97%, Sigma-Aldrich.

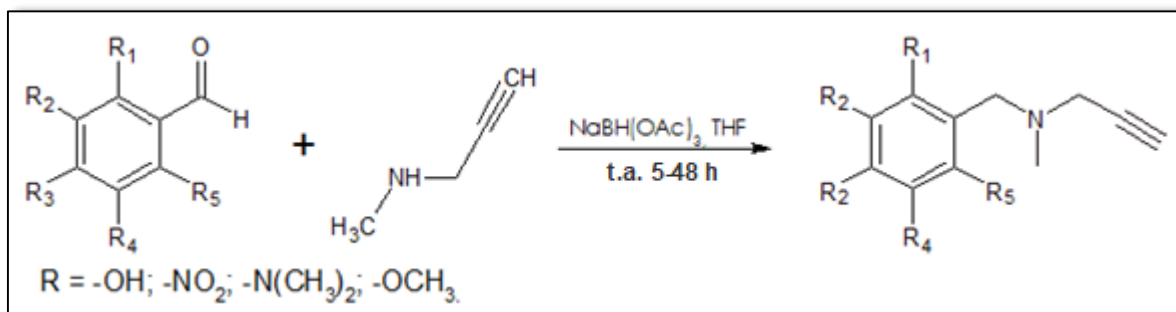
### 4.4.3 Equipos

Los análisis espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Avance-200 y en un espectrómetro Bruker Avance III HD-400 en la Facultad de Química de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se utilizó dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) y óxido de deuterio ( $\text{D}_2\text{O}$ ) al 99,9% para la disolución y análisis de los compuestos. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Además, las multiplicidades de las señales se expresaron como singulete (s), doblete (d), doblete de doblete (dd), triplete (t), cuarteto (q) o multiplete (m). El estándar interno utilizado en la determinación de los espectros fue tetrametilsilano (TMS).

## 5. Desarrollo experimental

### 5.1 Ruta de síntesis

La ruta del proceso general por el cual se llevó a cabo el proceso de síntesis para las moléculas propuestas se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Diagrama de síntesis de los compuestos derivados de bencilpropargilamina.

#### 5.1.1 Preparación de los compuestos derivados de bencilpropargilaminas: método general

La síntesis de los derivados de bencilpropargilaminas se basó en la metodología propuesta por Krysiak y colaboradores.<sup>31</sup>

Una disolución de 5,0 mmol (1,0 eq.) del benzaldehído sustituido en 20 mL de THF fue tratada con 5,5 mmol (1,1 eq.) de *N*-metilpropargilamina. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante y temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió en una porción, 7,0 mmol (1,4 eq.) de triacetoxiborohidruro de sodio, obteniéndose una mezcla espesa y turbia que fue monitoreada por cromatografía en capa fina (CCF) hasta el completo consumo del

aldehído. Luego, se agregaron 25 mL de solución de NaHCO<sub>3</sub> saturado y se extrajo con acetato de etilo (4x20 mL). El extracto orgánico fue secado con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrado y concentrado al vacío para dar lugar al producto deseado.

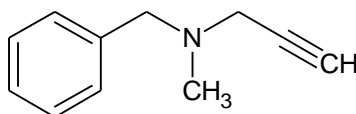
En algunos casos fue necesario realizar posteriormente, una cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria, y fase móvil según se especifica en cada caso.

### 5.1.2 Preparación de oxalatos

Una disolución de 2,0 mmol (2,0 eq.) de cada una de las bases preparadas previamente en 0,5 mL de 2-propanol fue tratada con una disolución de 1,0 mmol (1,0 eq.) de ácido oxálico en 0,5 mL de 2-propanol, la cual se agregó gota a gota. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante y a temperatura ambiente durante 2-24 h. Luego, se añadieron 5 mL de dietil éter. El producto de reacción se dejó precipitar durante 1-2 h. El sólido obtenido fue filtrado y posteriormente secado en desecador.<sup>50</sup>

### 5.1.3 Datos espectroscópicos

#### Síntesis de oxalato de *N*-bencil-*N*-metilprop-2-in-1-amina, AR01

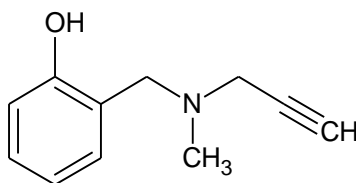


PM = 159,23 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de benzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,4 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 469 mg del compuesto puro como un sólido blanco (89% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.43 (s, 5H), 4.32 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.10 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.84 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 165.73, 130.93, 130.35, 129.39, 128.62, 80.40, 71.52, 58.61, 44.22, 39.36.

### Síntesis de oxalato de 2-((metil(prop-2-in-1-il)amino)metil)fenol, AR02

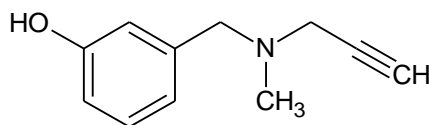


PM = 175,23 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 2-hidroxibenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,4 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 790 mg del compuesto puro como un sólido amarillo (90% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.32 (dd, *J* = 13.8, 7.6 Hz, 2H), 6.93 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 3.07 (s, 1H), 2.85 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 169.68, 155.47, 132.67, 132.16, 120.56, 115.69, 80.15, 71.56, 54.85, 44.62, 39.60.

### Síntesis de 3-((metil(prop-2-in-1-il)amino)metil)fenol, AR03

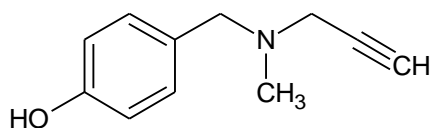


PM = 175,23 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 3-hidroxibenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,4 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 613 mg del compuesto como un sólido café (85% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO. <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO) δ 9.28 (s, 1H), 7.09 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.79 – 6.51 (m, 3H), 3.40 (s, 2H), 3.24 (s, 2H), 3.15 (s, 1H), 2.18 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 157.78, 140.37, 129.58, 119.74, 115.94, 114.48, 79.40, 76.38, 59.76, 44.93, 41.61.

### Síntesis de oxalato 4-((metil(prop-2-in-1-il)amino)metil)fenol, AR04

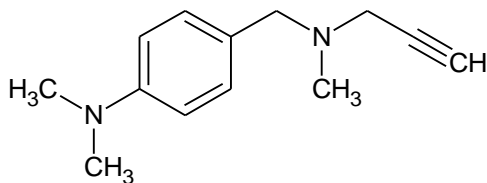


PM = 175,23 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 4-hidroxibenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,4 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 790 mg del compuesto puro como un sólido ocre (90% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.30 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.24 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.08 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.81 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 168.03, 157.23, 132.78, 120.33, 116.03, 80.24, 71.61, 58.13, 43.82, 39.07.

### Síntesis de oxalato de *N,N*-dimetil-4-((metil(prop-2-in-1-il)amino)metil)anilina, AR05

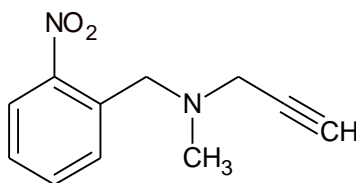


PM = 202,30 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 4-(dimetilamino)benzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,8 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 616 mg del compuesto puro como un sólido blanco (90% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.52 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.33 (s, 2H), 3.87 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.10 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.06 (s, 6H), 2.82 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 169.31, 146.74, 132.81, 126.03, 118.89, 80.48, 71.48, 57.69, 44.11, 39.33.

### Síntesis de oxalato de *N*-metil-*N*-((2-nitrofenil)metil)prop-2-in-1-amina, AR06

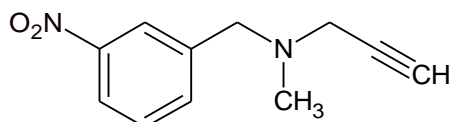


PM = 204,23 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 2-nitrobenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,5 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio. El producto final fue purificado utilizando cromatografía en columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de acetato de etilo:cloroformo 1:2 como fase móvil, dando lugar a 730 mg del compuesto puro como un sólido blanco (87% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.76 – 7.66 (m, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.11 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.15 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.01 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 165.52, 148.41, 135.43, 135.12, 132.33, 126.46, 124.05, 80.95, 71.05, 56.80, 45.57, 40.33.

### Síntesis de oxalato de *N*-metil-*N*-((3-nitrofenil)metil)prop-2-in-1-amina, AR07

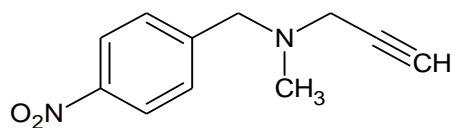


PM = 204,23 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 3-nitrobenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,5 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio. El producto final fue purificado utilizando cromatografía en columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de metanol:diclorometano 1:8 como fase móvil, dando lugar a 697 mg del compuesto puro como un sólido blanco (83% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.18 (dd, *J* = 14.4, 6.2 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.67 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.49 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 2.57 – 2.46 (m, 1H), 2.35 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 162.31, 148.33, 136.29, 130.37, 124.12, 123.06, 77.99, 77.83, 58.34, 45.05, 41.03.

### Síntesis de oxalato de *N*-metil-*N*-((4-nitrofenil)metil)prop-2-in-1-amina, AR08

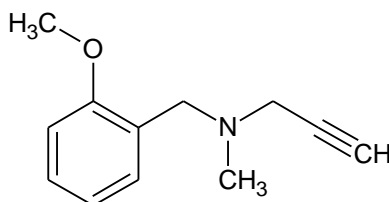


PM = 204,23 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 4-nitrobenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,5 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio. El producto final fue purificado utilizando cromatografía en columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de acetato de etilo:hexano 4:5 como fase móvil, dando lugar a 722 mg del compuesto puro como un sólido blanco-amarillo (86% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.23 (dd, *J* = 5.0, 3.5 Hz, 2H), 7.73 – 7.64 (m, 2H), 4.50 (s, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.14 (s, 1H), 2.90 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 165.53, 148.65, 135.74, 132.22, 124.35, 80.81, 71.23, 57.40, 44.74, 39.75.

### Síntesis de oxalato de *N*-((2-metoxifenil)metil)-*N*-metilprop-2-in-1-amina, AR09

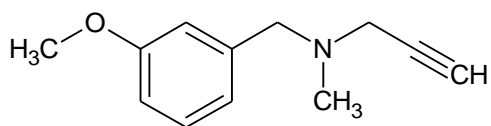


PM = 189,25 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 2-metoxibenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,8 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 405 mg del compuesto puro como un sólido blanco (83% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.43 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 22.2 Hz, 2H), 4.29 (d, *J* = 50.6 Hz, 2H), 3.88 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.08 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 165.55, 157.96, 132.49, 120.99, 116.95, 111.34, 80.17, 71.52, 55.40, 54.89, 44.71, 39.75.

### Síntesis de oxalato de *N*-((3-metoxifenil)metil)-*N*-metilprop-2-in-1-amina, AR10

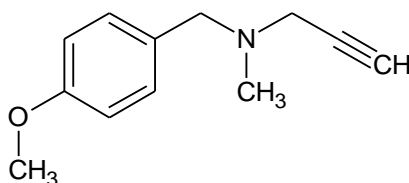


PM = 189,25 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 3-metoxibenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,8 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 598 mg del compuesto puro como un sólido blanco (86% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.38 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.09 – 6.99 (m, 3H), 4.31 (s, 2H), 3.90 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.11 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.85 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 165.57, 159.37, 130.72, 130.16, 123.44, 116.35, 115.86, 80.44, 71.48, 58.46, 55.44, 44.29, 39.44.

### Síntesis de oxalato de *N*-((4-metoxifenil)metil)-*N*-metilprop-2-in-1-amina, AR11



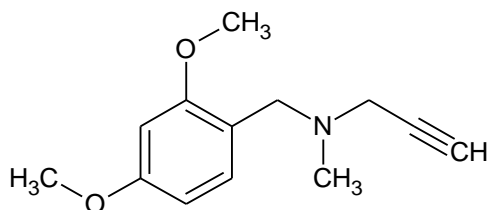
PM = 189,25 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 4-metoxibenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,8 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 553 mg del compuesto puro como un sólido blanco (88% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.34 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.25 (d, *J* = 15.9 Hz, 2H), 3.85 (d, *J* = 14.5 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.09 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.81 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 165.52, 160.26, 132.58, 120.96, 114.68, 80.31, 71.58, 58.04, 55.40, 43.88, 39.11.



### Síntesis de oxalato de *N*-[(2,4-dimetoxifenil)metil]-*N*-metilprop-2-in-1-amina, AR12

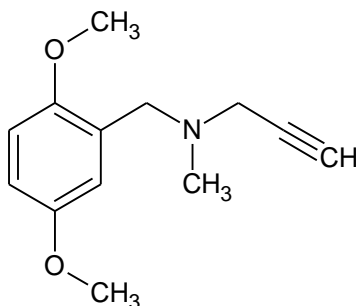


PM = 219,28 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 2,4-dimetoxibenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,8 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 570 mg del compuesto puro como un sólido blanco (86% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.23 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.22 (d, *J* = 46.5 Hz, 2H), 3.87 (d, *J* = 15.2 Hz, 2H), 3.77 (d, *J* = 5.7 Hz, 6H), 3.07 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.80 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 165.49, 162.30, 159.25, 133.56, 109.66, 105.48, 98.42, 80.03, 71.61, 55.51, 54.46, 44.41, 39.48.

### Síntesis de oxalato de *N*-[(2,5-dimetoxifenil)metil]-*N*-metilprop-2-in-1-amina, AR13

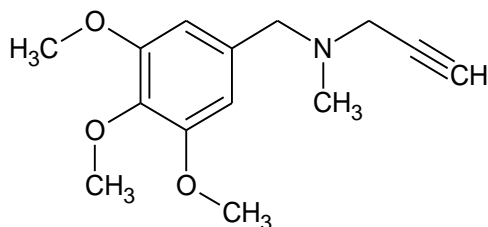


PM = 219,279 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 2,5-dimetoxibenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,8 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 561 mg del compuesto puro como un sólido blanco (85% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.01 (dd, *J* = 9.1, 2.9 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 17.1, 6.0 Hz, 2H), 4.27 (d, *J* = 37.2 Hz, 2H), 3.90 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.09 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.83 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 165.6, 152.62, 152.36, 118.26, 117.74, 116.99, 112.45, 80.24, 71.46, 55.85, 54.77, 44.80, 39.80.

### Síntesis de oxalato de *N*-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-*N*-metilprop-2-in-1-amina, AR14

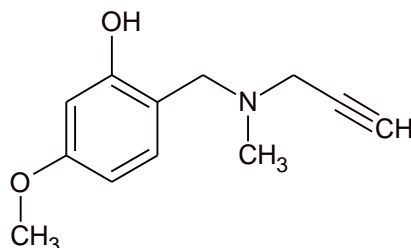


PM = 249,31 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 3,4,5-trimetoxibenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,8 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 422 mg del compuesto puro como un sólido blanco (83% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 6.75 (s, 2H), 4.27 (d, *J* = 13.1 Hz, 2H), 3.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 3.78 (s, 6H), 3.71 (s, 3H), 3.11 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.85 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 164.92, 152.88, 138.02, 125.10, 108.33, 80.45, 71.47, 60.87, 58.67, 56.12, 44.21, 39.41.

### Síntesis de oxalato de 5-metoxi-2-((metil(prop-2-in-1-il)amino)metil)fenol, AR15



PM = 205,25 g/mol

El compuesto se obtuvo siguiendo el método descrito anteriormente, utilizando 1 equivalente de 2-Hidroxi-4-metoxibenzaldehído, 1,1 equivalentes de *N*-metilpropargilamina y 1,8 equivalentes de triacetoxiborohidruro de sodio, dando lugar a 403 mg del compuesto puro como un sólido blanco (85% rendimiento).

Fórmula molecular: C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.28 (s, 2H), 3.92 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.07 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.85 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 173.15, 161.81, 156.80, 133.64, 108.70, 106.05, 101.42, 79.97, 71.72, 55.44, 54.39, 44.29, 39.33.

## 6. Resultados y Discusiones

### 6.1 Docking

Para evaluar si el cambio en los sustituyentes podría influenciar algún tipo de cambio como los ya mencionados previamente, se llevaron a cabo los estudios de *docking* con las moléculas propuestas utilizando las estructuras cristalinas de MAO-A y MAO-B, analizando la posibilidad que tienen cada una de éstas de formar un complejo estable con las 15 moléculas propuestas. A la Pargilina se le asignó el código de **AR01** para incluirla en este estudio y tener un punto de comparación con una molécula que se reconoce ya como iMAO. Se obtuvieron las energías de enlace para la formación del complejo receptor-ligando (R-L), considerando cada ligando propuesto optimizado en su forma neutra, con el fin de describir para cada uno de ellos, su posible grado de afinidad hacia una u otra de las isoformas existentes de MAO. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3, indicándose la desviación estándar (SD) para los valores de energía obtenidos con MAO-A y MAO-B.

**Tabla 3.** Resultados de energías de unión para las diversas moléculas propuestas, con MAO-A y MAO-B.

Molécula	Energía de unión (kcal/mol)		Molécula	Energía de unión (kcal/mol)	
	MAO A	MAO B		MAO A	MAO B
<b>AR01</b>	-7,2	-6,4	<b>AR09</b>	-7,0	-6,3
<b>AR02</b>	-7,2	-6,6	<b>AR10</b>	-7,2	-6,4
<b>AR03</b>	-7,2	-6,5	<b>AR11</b>	-7,5	-6,7
<b>AR04</b>	-7,1	-6,5	<b>AR12</b>	-7,1	-6,7
<b>AR05</b>	-7,1	-6,8	<b>AR13</b>	-6,3	-6,6
<b>AR06</b>	-7,2	-6,5	<b>AR14</b>	-6,2	-6,3
<b>AR07</b>	-7,4	-6,9	<b>AR15</b>	-7,3	-6,7
<b>AR08</b>	-7,6	-6,8			

SD MAO-A = 0,38    SD MAO-B = 0,16

Los resultados de energías totales obtenidas mediante estudios de *docking* realizado con AutoDock Vina, muestran *a priori* que cada uno de los ligandos tienen un valor similar al obtenido con la Pargilina (-7,2 kcal/mol para MAO-A y -6,4 kcal/mol para MAO-B) la cual ha sido usada como punto de comparación debido a su conocido rol como inhibidor selectivo para MAO-B,<sup>28,32</sup> siendo incluso la mayoría de las energías obtenidas levemente mayores (diferencia superior ca. 0,5 kcal/mol en la estructura **AR07** como ligando para MAO-B) al valor estimado para la Pargilina. Es observable también, que los valores energéticos de MAO-B presentan una menor SD en comparación a los obtenidos para MAO-A, lo que implica una menor variación de los datos energéticos obtenidos con MAO-B.

Esto podría considerarse como un indicio que una modificación de los sustituyentes en el anillo aromático para estas moléculas derivadas de bencilpropargilaminas, no

provocaría cambios realmente significativos en la probabilidad que estos ligandos específicos puedan ser capaces de acceder al centro activo de las MAO y formar complejos R-L estables en términos energéticos, comparándose con la afinidad que presenta la Pargilina.

Es importante destacar que, según los valores de energías obtenidas, las cuales resultan ser todas favorables y con un valor neto mínimo de -6,2 kcal/mol, todas las moléculas propuestas podrían acceder al centro activo de MAO-A y MAO-B formando complejos estables sin excepción alguna. De la Tabla 3 se desprende que la mayoría de las moléculas propuestas presentarían mejores interacciones en el sitio de unión de MAO-A, ya que sus energías son más negativas en la mayoría de los casos presentados, con excepción de las estructuras denominadas como AR13 y AR14, las cuales tienen una mayor probabilidad de enlazar con MAO-B debido a sus energías levemente mayores con esta isoforma. Esta diferencia, podría deberse a los sustituyentes presentes en ambas moléculas, las cuales coinciden en que presentan más de un grupo metoxilo como sustituyente del anillo aromático, encontrándose en ambas moléculas uno de los grupos metoxilos en la posición 5 del anillo aromático.

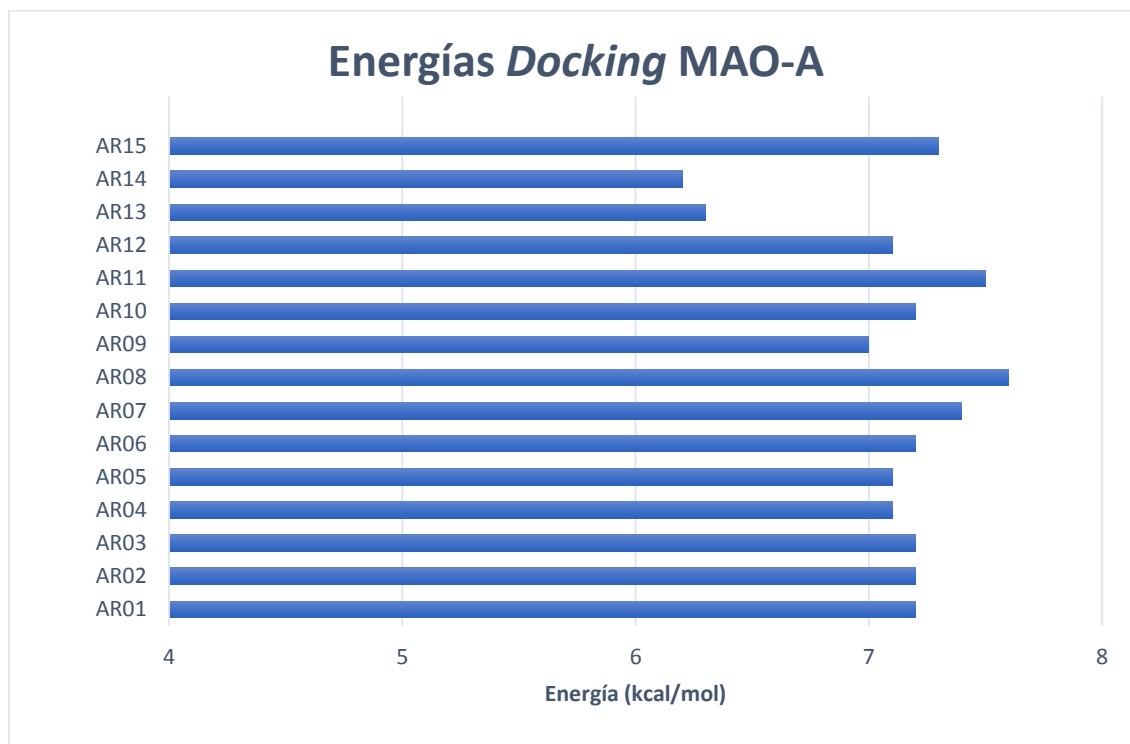
### 6.1.1 Docking MAO-A

Como se mencionó previamente, las energías de enlace fueron levemente mayores en MAO-A. Estas energías obtenidas para cada una de las moléculas en estudio se muestran en el gráfico de la Figura 15.

De forma general, las moléculas en estudio presentan una energía de unión con MAO-A superior a las -7 kcal/mol (con excepción de **AR13** y **AR14**) lo cual corresponde a energías cercanas a la Pargilina, por lo que desde este punto de vista cualquiera de los ligandos propuestos podría formar un complejo estable con MAO-A. Entre los valores de energía más favorables obtenidos, se encuentran las estructuras **AR07**, **AR08** y **AR11** con valores de energía de -7,4; -7,6 y -7,5 kcal/mol, respectivamente. Estas energías solo presentan una diferencia máxima de 0,4 kcal/mol con respecto a la Pargilina, lo que no permite identificar con los sustituyentes evaluados, que éstos modifiquen de forma favorable y en condiciones notables la afinidad de la Pargilina con el sitio activo de MAO-A, esto considerando solamente los valores de energías entregados por los estudios de *docking*.

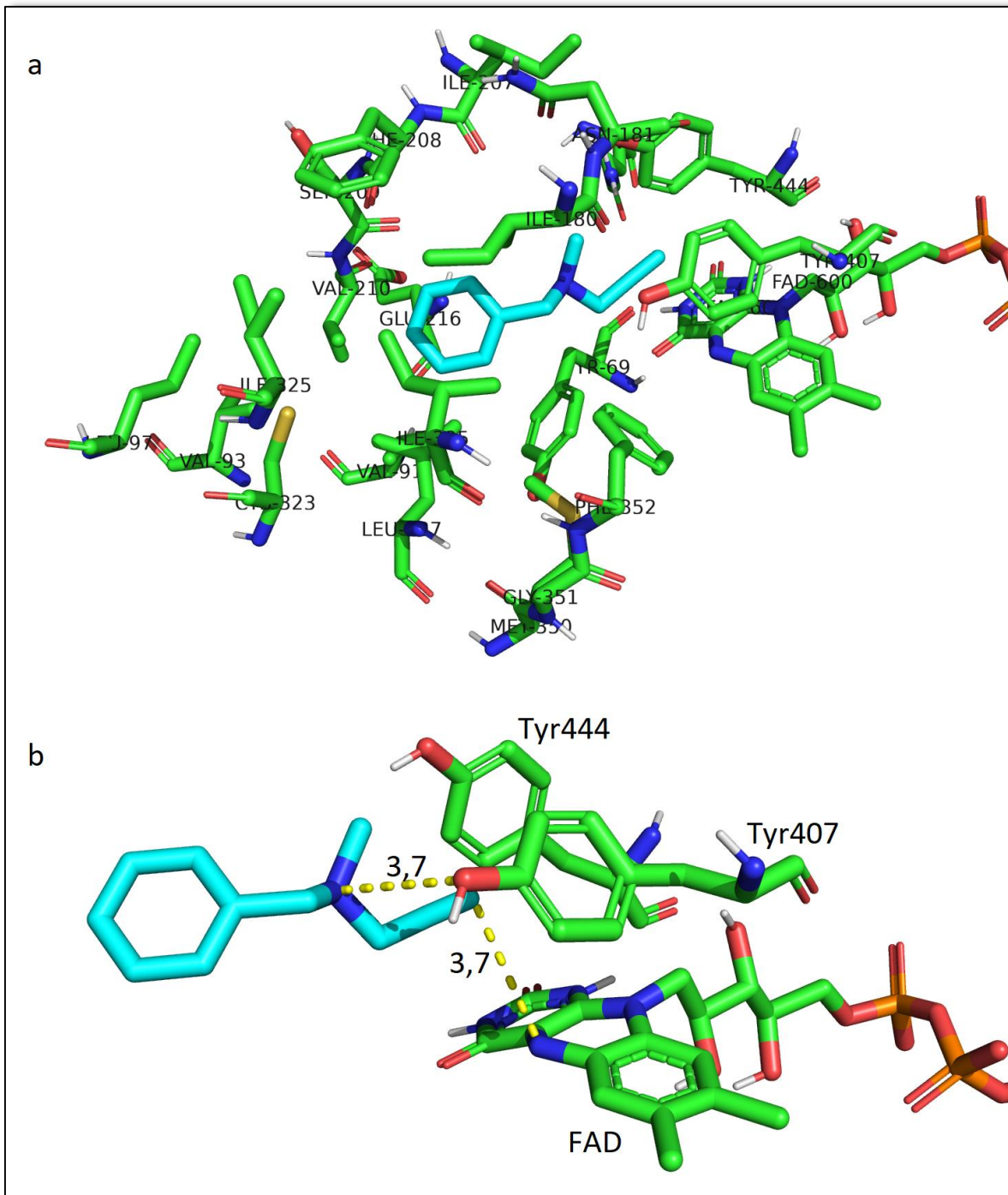
Las moléculas que presentan menores energías con MAO-A son las estructuras **AR13** y **AR14**, de las cuales ya se mencionó su diferencia principal con respecto a las demás estructuras propuestas en el punto 6.1, a su vez estos ligandos son los que presentarían energías más negativas con MAO-B respecto de MAO-A. Los valores obtenidos con estas moléculas son menores que la energía obtenida para la Pargilina, para la cual se obtuvo una energía de -7,2 kcal/mol; sin embargo, los valores obtenidos pueden ser considerados como aceptables para indicar que la

interacción entre ligando y aceptor ocurre de todas maneras, puesto que energías inferiores a -6,0 kcal/mol pueden considerarse como favorables en este tipo de estudios de *docking*, pudiendo acercarse ambos ligandos al sitio activo de MAO-A.



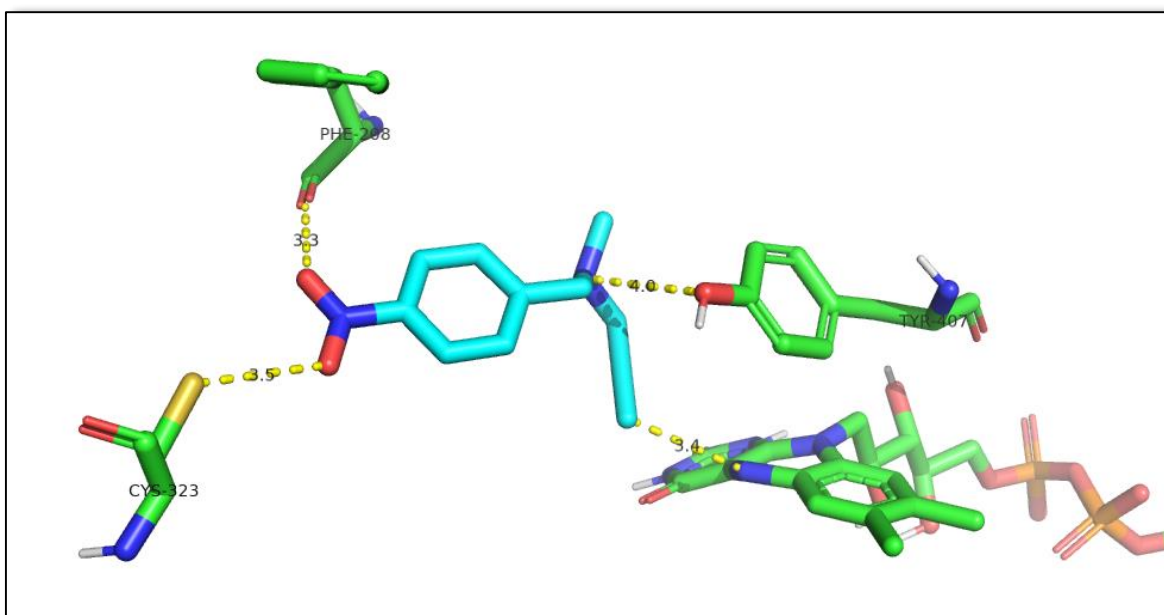
**Figura 15.** Energías de enlace de los sustratos **AR01** al **AR15**, resultado del estudio de *docking* utilizando MAO-A.

Para analizar la conformación de los ligandos en la cavidad de unión con MAO-A, hay que considerar como está constituido el sitio activo de MAO: un cofactor FAD y dos residuos de tirosinas (Tyr407 y Tyr444) que se encuentran en forma casi perpendicular al anillo de isoaloxazina del FAD, entre otros residuos.<sup>51</sup> La Figura 16a muestra el ligando **AR01** en el sitio activo de MAO-A considerando todos los residuos que lo conforman, mientras que la Figura 16b muestra los resultados obtenidos del *docking* con el ligando **AR01** considerando solo los residuos principales Tyr407 y Tyr444. Se puede observar como el sustrato ingresa con el carbono terminal del grupo acetileno acercándose hacia el N(5) del anillo de isoaloxazina del FAD, tal como se ha demostrado que actúa el mecanismo de inhibición de MAO para propargilaminas, con una distancia entre el carbono terminal de la Pargilina y el N(5) de 3,7 Å, haciéndolo de manera paralela a Tyr407, formando a su vez una interacción entre el N de la Pargilina y el O de la Tyr407.



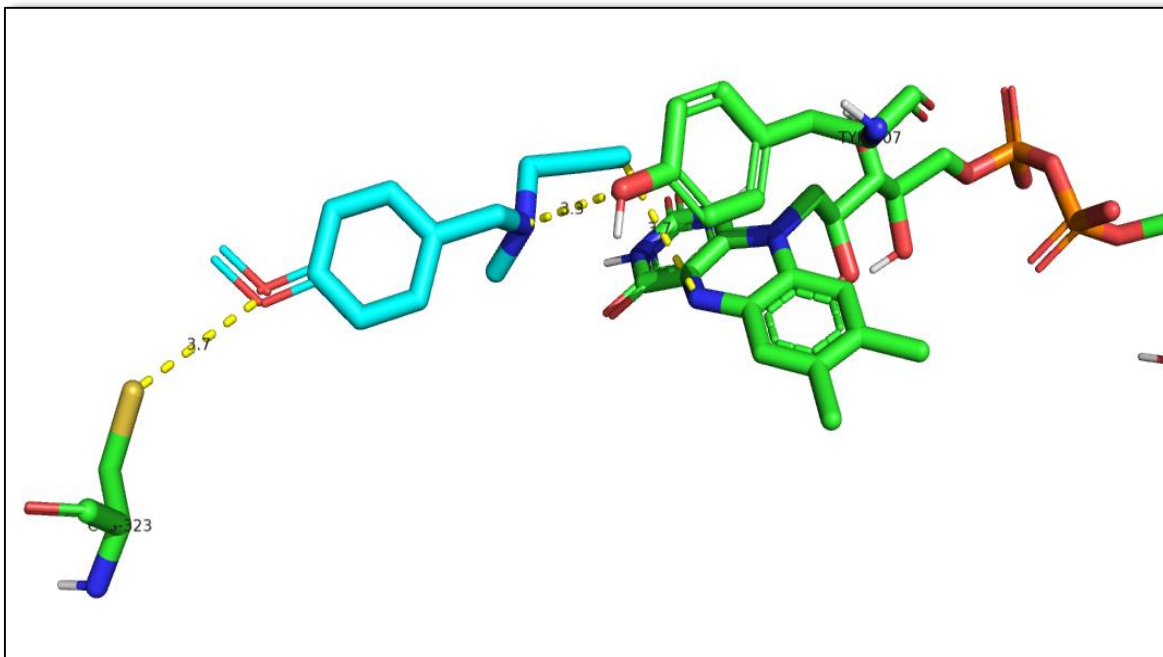
**Figura 16.** a) Resultados de *docking* con **AR01**, incluyendo todos los residuos que conforman el sitio activo de MAO-A. b) Resultados de *docking* con **AR01**, considerando solo los residuos principales Tyr407 y Tyr444.

Los resultados de energías de afinidad con MAO-A arrojaron el valor más favorable con la estructura **AR08**, al ser esta energía más negativa que la de Pargilina. La Figura 17 muestra que esta molécula adquiere una conformación en el sitio activo de MAO-A de la misma forma que lo hace la Pargilina. **AR08** adquiere una conformación con el carbono terminal del grupo acetileno en dirección hacia el N(5) del FAD, a una distancia de 3,4 Å, la cual resultó ser un poco menor a la distancia con la que se aproxima **AR01**, posicionándose a su vez paralelo al residuo Tyr407, a una distancia de 4,0 Å entre el N del fragmento de propargilamina y el oxígeno de Tyr407. A su vez, aumentan las interacciones con el sitio activo de MAO-A, formando un puente de hidrógeno con el residuo Phe208 y/o una interacción con Cys323 a una distancia de 3,5 Å.



**Figura 17.** Interacciones de **AR08** con el sitio activo de MAO-A, dónde se observan las interacciones con Tyr407 a 4,0 Å, Cys323 a 3,5 Å y con Phe208 a 3,3 Å.

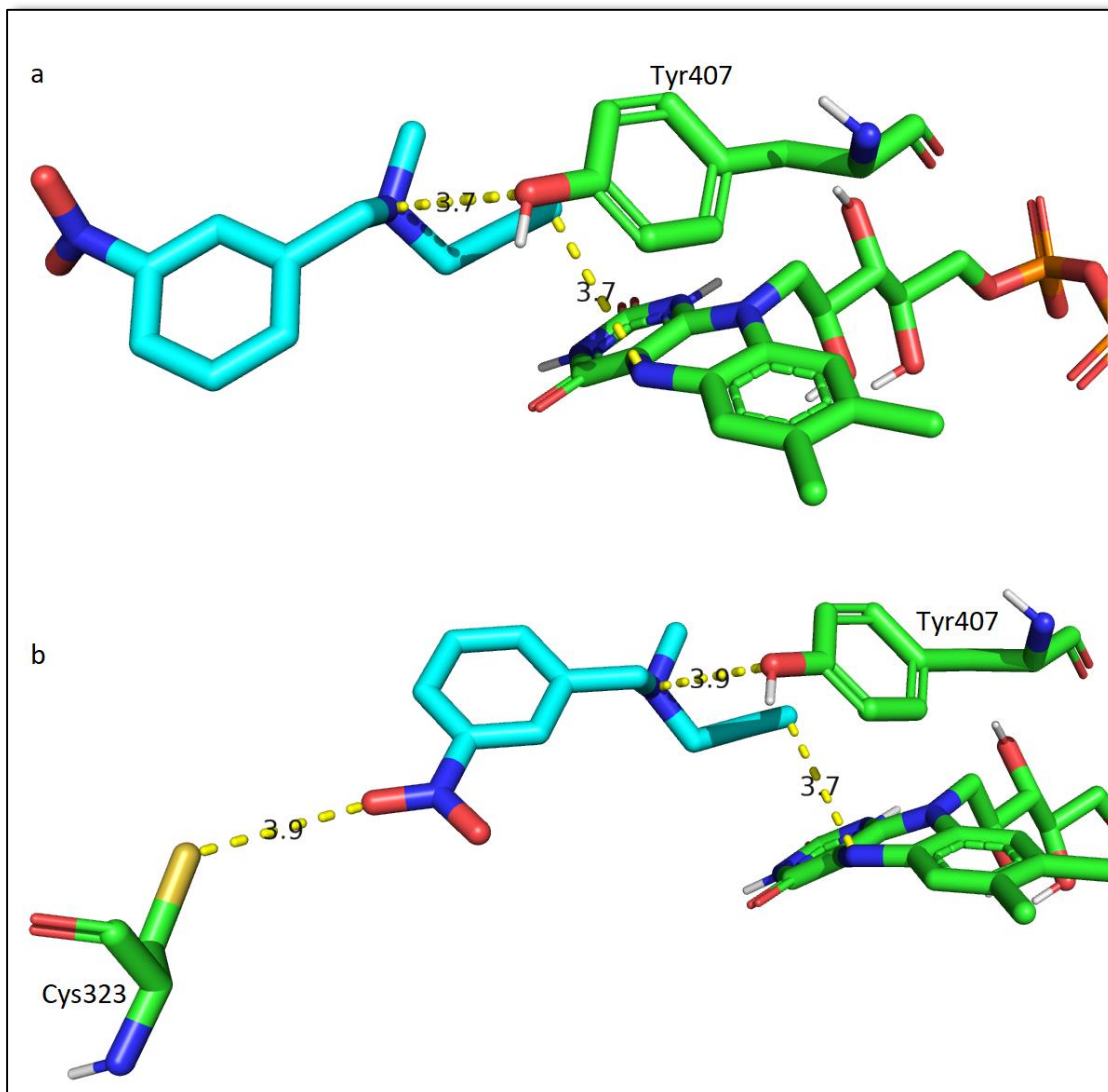
La Figura 18 muestra la conformación que adquiere la molécula **AR11** en el sitio activo de MAO-A, la cual arrojó la segunda energía más favorable. Esta molécula se sitúa en el sitio activo en similares condiciones a las mencionadas previamente, orientándose de manera paralela el anillo aromático de **AR11** con respecto a Tyr407, formando una interacción tipo aromática a una distancia de 3,3 Å entre el N de **AR11** y el O de la tirosina. El carbono terminal del grupo acetileno se encuentra a una distancia de 3,7 Å del N(5) del FAD, mientras que la interacción con Phe208 no se ve presente. Se mantiene la interacción con Cys323 a una distancia de 3,7 Å.



**Figura 18.** Interacciones de **AR11** en el sitio activo de MAO-A, donde se observan las interacciones con Tyr407 a 3,3 Å y la interacción con Cys323 a 3,7 Å.

La Figura 19 muestra las interacciones de **AR07** en el sitio activo de MAO-A, última estructura seleccionada como las que arrojaron las afinidades más altas dentro del grupo de moléculas estudiadas. Para esta molécula se encontraron dos posibles conformaciones que cumplen con la tendencia mostrada hasta este momento para las moléculas estudiadas con MAO-A, adquiriendo conformaciones en el sitio activo en forma paralela al residuo de Tyr407. La primera de las conformaciones (Figura 19a) muestra una distancia de aproximación entre el carbono terminal del grupo acetileno y el N(5) del FAD de 3,7 Å, misma distancia que mantiene con el residuo principal de Tyr407. La segunda conformación más estable (Figura 19b) encontrada tiene la misma distancia de aproximación entre el carbono terminal del grupo acetileno y el N(5) del FAD, pero aumenta la distancia con el residuo Tyr407 a 3,9 Å. El puente de hidrógeno formado con Phe208 desaparece, pero en su lugar da paso a una interacción diferente con el residuo de Cys323 a una distancia de 3,9 Å.

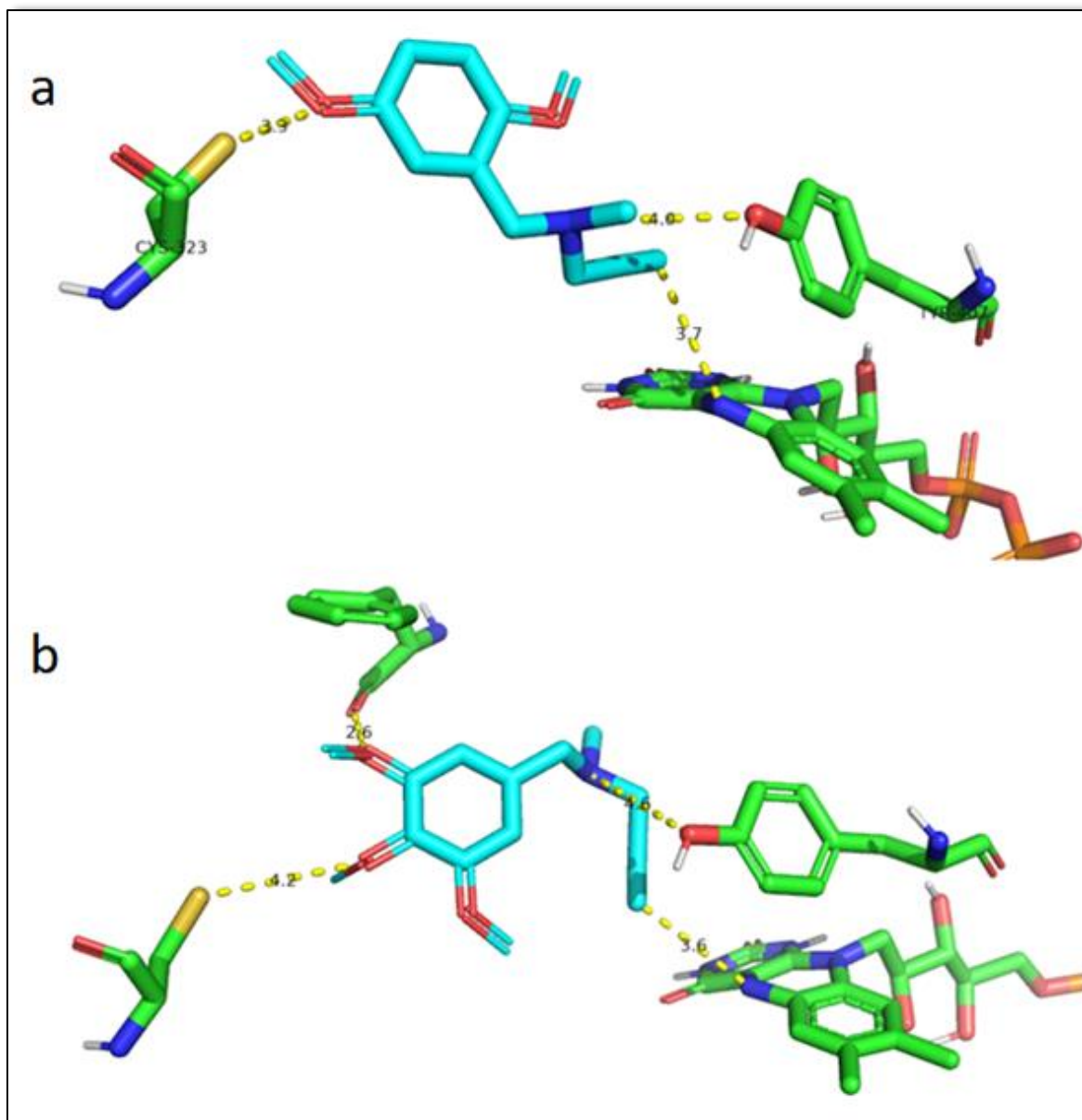




**Figura 19.** a) Conformación 1 para **AR07** en el sitio activo de MAO-A, donde se aprecia la interacción descrita con Tyr407 a 3,7 Å. b) conformación 2 para **AR07** en el sitio activo de MAO-A, interaccionando con Cys323 a 3,9 Å y con Tyr407 a igual distancia.

Como se mencionó previamente, las energías menos favorables (menos negativas) corresponden a las estructuras **AR13** y **AR14**. Estos resultados obtenidos con MAO-A, a pesar de ser energías menos favorables, siguen estando dentro de valores aceptables al ser menores a -6 kcal/mol. La Figura 20 muestra la conformación de ambas moléculas en el sitio activo de MAO-A, en ella se aprecia que ambas muestran distancias similares entre el carbono terminal del grupo acetileno y el N(5) del FAD y que a su vez están en correspondencia a lo observado en las estructuras discutidas previamente, las cuales presentan distancias similares para este parámetro. La diferencia principal radica en un aumento en la distancia entre el N de estas estructuras y el oxígeno del residuo Tyr407, como se observa en la Figura

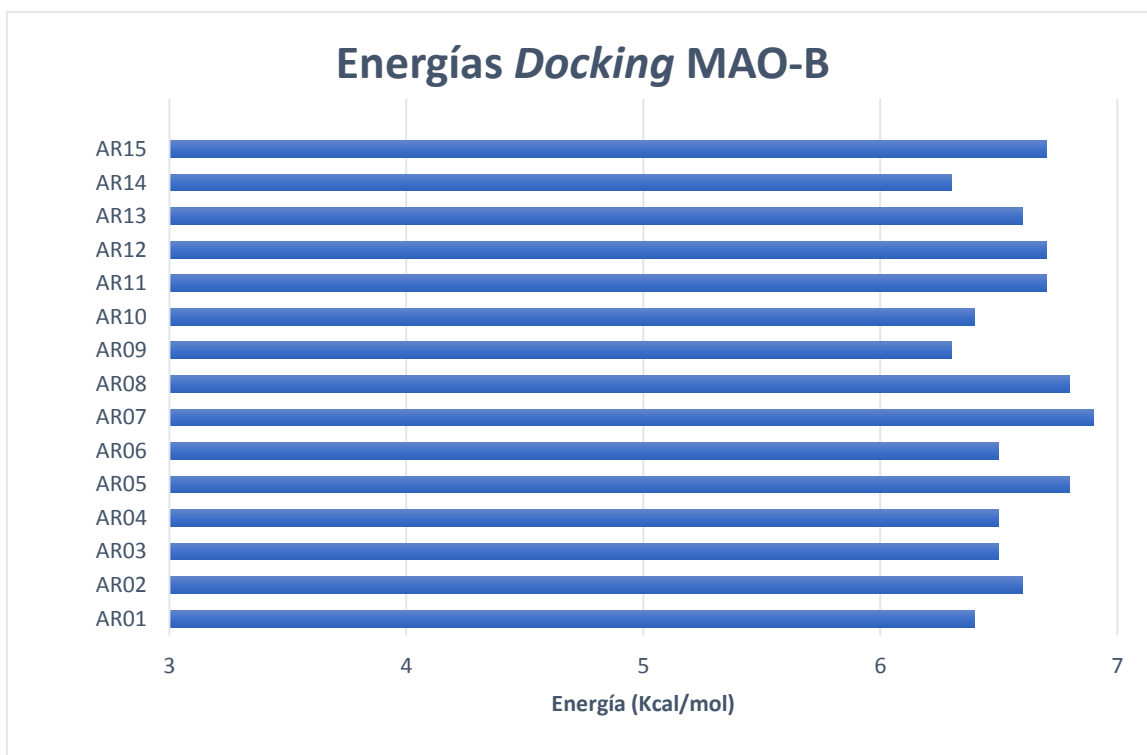
20a. Esta distancia se incrementa a 4,0 Å para la estructura **AR13**, mientras que para **AR14** la distancia se ve incrementada a 4,6 Å, situación ilustrada en la Figura 20b. Otras interacciones mencionadas previamente no sufren cambios, formando **AR13** una interacción con Cys323 a una distancia de 3,3 Å, mientras que **AR14** forma un puente de hidrógeno con Phe208.



**Figura 20.** a) Conformación de **AR13** en el sitio activo de MAO-A, donde se muestra la interacción presente con Cys323 a 3,3 Å. b) Interacciones encontradas para **AR14** en el sitio activo de MAO-A, donde destaca la formación del puente de hidrogeno con Phe208.

### 6.1.2 Docking MAO-B

En la Figura 21, se encuentran las energías de enlace de los ligandos **AR01** al **AR15**, resultado del estudio de *docking* utilizando MAO-B.

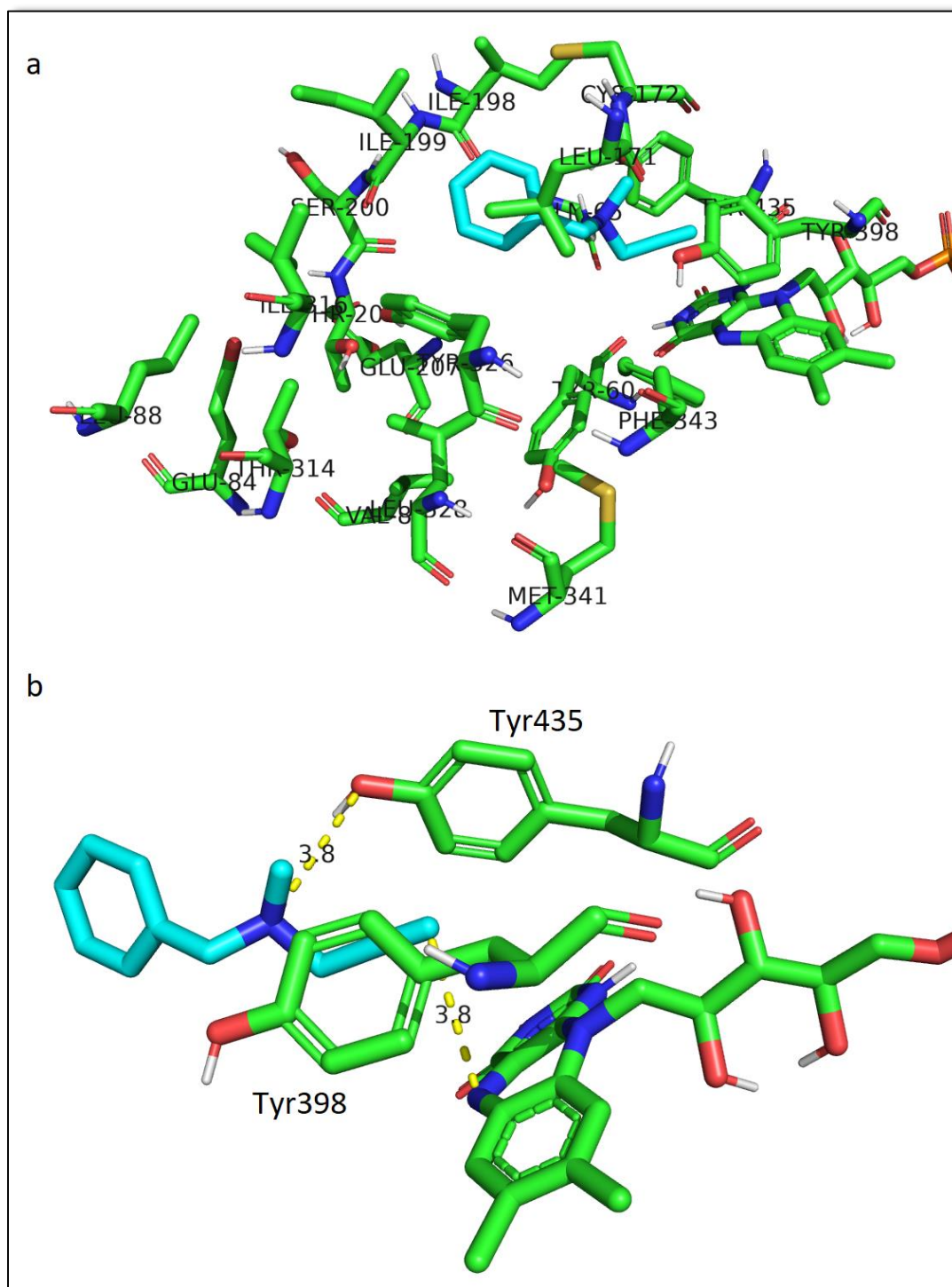


**Figura 21.** Energías de enlace de las estructuras **AR01** a la **AR15**, resultado del estudio de *docking* utilizando MAO-B.

Los resultados de *docking* para las moléculas con MAO-B indican energías menores a las obtenidas con MAO-A, hecho que es consistente con la evaluación de Pargilina. La mayoría de las moléculas tienen una energía similar o superior a la medida para la Pargilina, donde la estructura **AR07** tiene la energía de enlace más favorable, superando en 0,5 kcal/mol el valor obtenido para la Pargilina, misma estructura que presentó uno de los valores más altos en los estudios de *docking* con MAO-A. Esta molécula, presenta como diferencia un grupo nitro en posición *meta*-del anillo aromático.

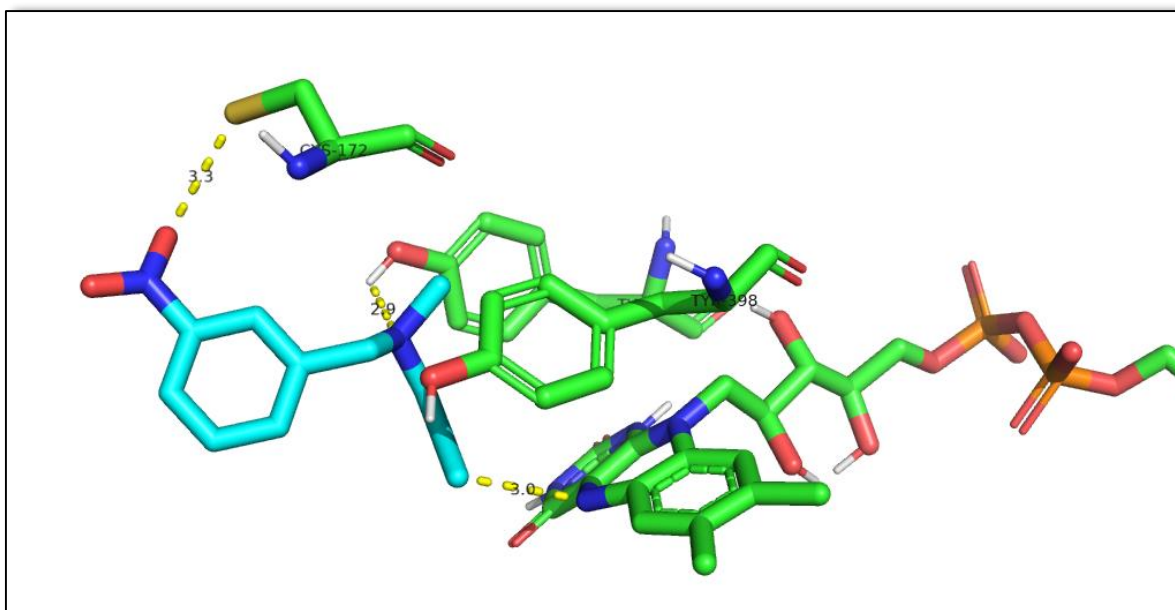
Al analizar los resultados de *docking* para MAO-B desde el punto de vista conformacional, es necesario considerar los residuos que conforman la cavidad de unión en el sitio activo de MAO-B, el cual al igual que en MAO-A está compuesto por el FAD, dos residuos principales que corresponden a Tyr398 y Tyr435 entre otros que se muestran en la Figura 22a.<sup>51</sup> Los resultados muestran que **AR01** se acomoda en el sitio activo de MAO-B de manera similar a MAO-A, con el carbono terminal del grupo acetileno aproximándose hacia el FAD, más específicamente hacia el N(5) del FAD, a una distancia de 3,8 Å. El acercamiento a estos dos residuos mencionados lo hace de manera similar a como lo hace con MAO-A,

ingresando en el espacio que se da entre ambos, más cercano a Tyr435 a una distancia de 3,8 Å entre el N del ligando y el O de esta tirosina (Figura 22b).



**Figura 22.** a) Resultados de *docking* con **AR01**, incluyendo todos los residuos que conforman el sitio catalítico de MAO-B. b) Resultados de *docking* con **AR01**, considerando solo los residuos principales Tyr398 y Tyr435.

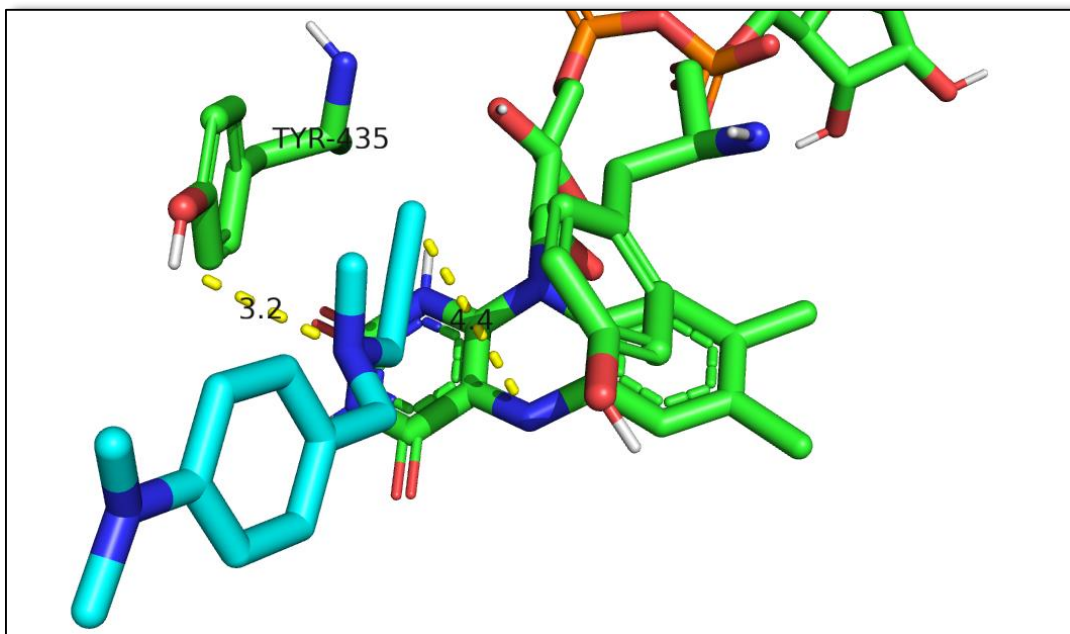
La estructura con el valor de energía más favorable entre las estructuras evaluadas fue **AR07** con un valor de 6,9 kcal/mol. El análisis de los estudios de *docking* mostró que dentro de las conformaciones probables, la más favorable presenta una aproximación mayor entre el carbono terminal del grupo acetileno y el N(5) del FAD, siendo esta distancia de 3,0 Å (3,8 Å en el caso de **AR01**) como se muestra en la Figura 23. Además, se ve reducida la distancia de acercamiento que favorece la formación del enlace covalente fundamental para la inhibición, mientras que la distancia a Tyr435 también se ve reducida considerablemente a 2,9 Å, formando un puente de hidrógeno. Esta molécula además presenta una interacción extra con el sitio activo de MAO-B, la cual se da con el residuo de Cys172 a una distancia de 3,3 Å entre uno de los O del grupo nitro del ligando y el S de Cys172.



**Figura 23.** Conformación de **AR07** en el sitio activo de MAO-B, se muestra el puente de hidrógeno formado entre el N de **AR07** y Tyr435, en conjunto con la interacción con Cys172 a 3,3 Å.

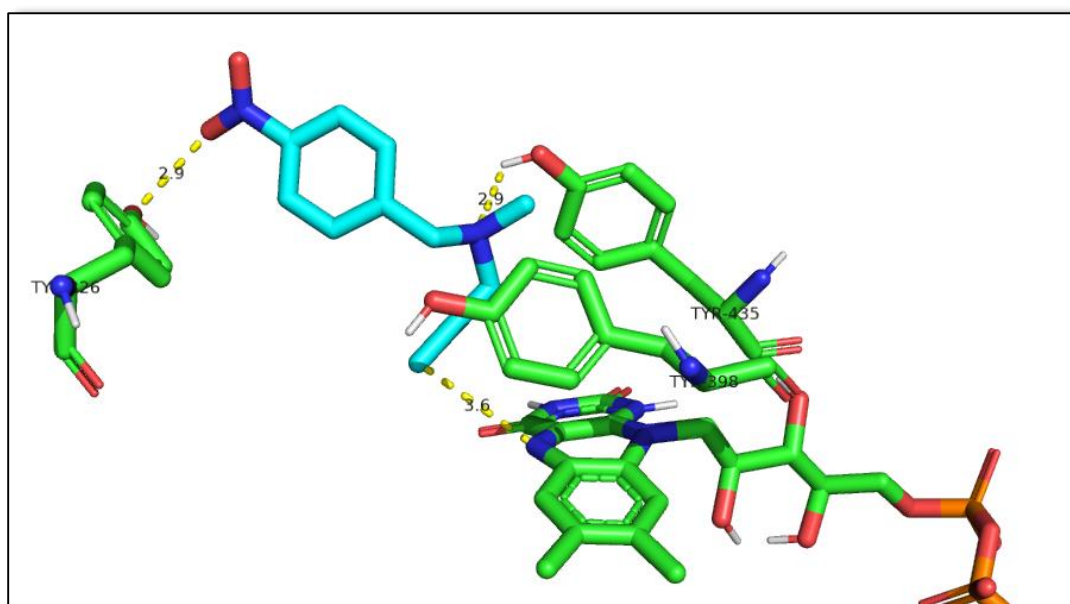
Siguiendo en orden decreciente de energías obtenidas mediante *docking*, las estructuras **AR05** y **AR08** arrojaron como resultado una energía de 6,8 kcal/mol. La Figura 24 muestra como AR05 se posiciona en el centro activo de MAO-B, lo que permite observar que se acerca el carbono terminal del grupo acetileno al N(5) del FAD a una distancia de 4,4 Å, la que resulta ser mayor a las observadas previamente; sin embargo, se podría explicar esta alta afinidad que arrojaron los resultados a la formación de un puente de hidrógeno entre el N del fragmento de Pargilina del ligando con Tyr435.





**Figura 24.** Conformación de **AR05** en el sitio activo de MAO-B, donde se muestra el puente de hidrógeno formado con Tyr435.

Situación similar ocurre con **AR08** como muestra la Figura 25, la cual también forma un puente de hidrógeno con Tyr435 a una distancia de 2,9 Å. También se puede ver que esta estructura formaría un puente de hidrógeno adicional con Tyr326, y reduciendo además la distancia de acercamiento del carbono terminal del grupo acetileno a 3,6 Å.



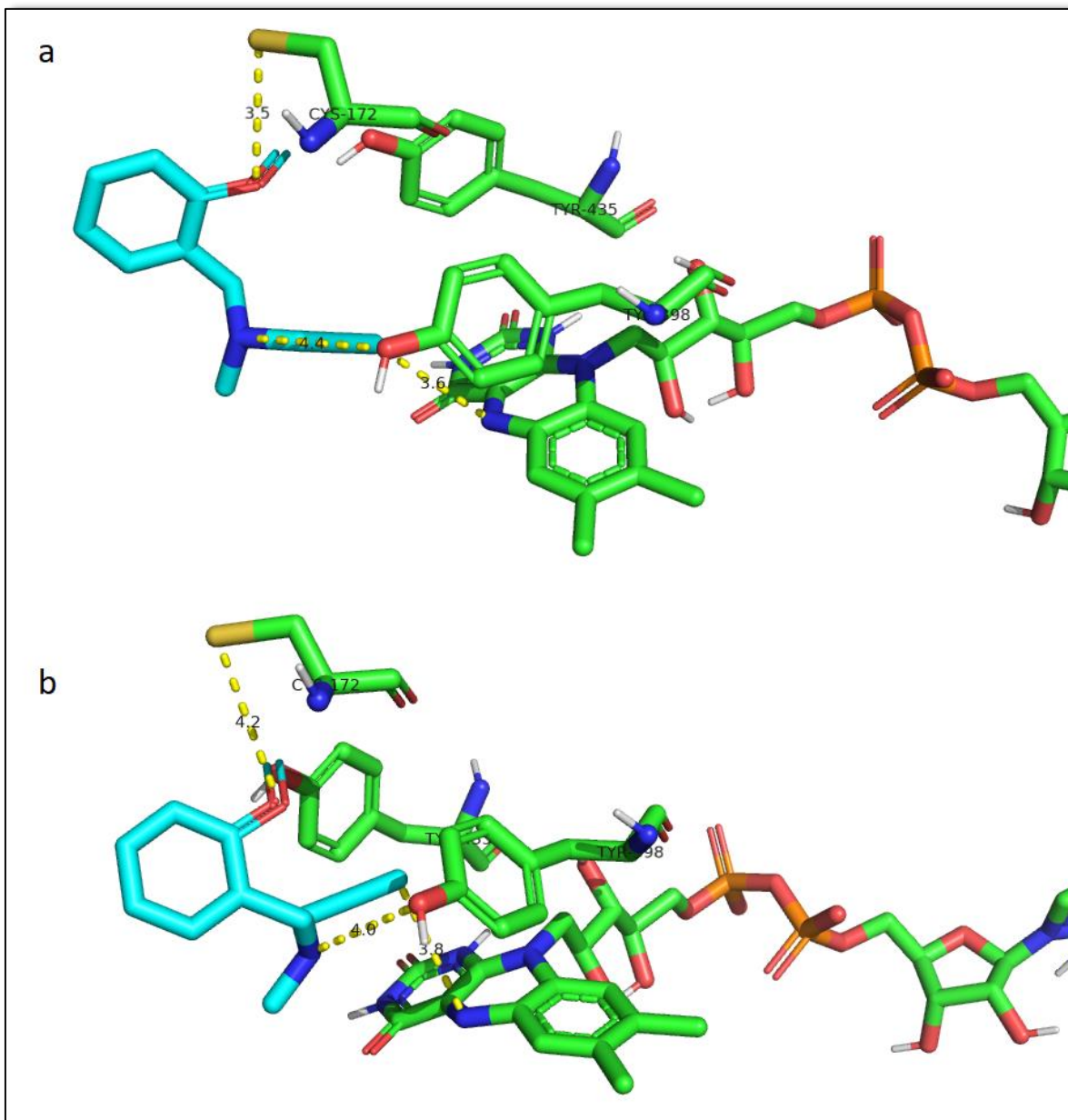
**Figura 25.** Conformación de **AR08** en el sitio activo de MAO-B, formando un puente de hidrógeno con Tyr326 y otro con Tyr435.

Las energías menos favorables fueron las obtenidas con las estructuras **AR14** y **AR09**; con  $-6,3$  kcal/mol cada una. Lo que comparten en común estas dos estructuras al estudiar el sitio activo con MAO-B, es que ambas se verían impedidas de formar alguno de los puentes de hidrógenos que mostraron las estructuras con valores energéticos más favorables; sin embargo, mantienen algunas de las interacciones descritas anteriormente, pero aumentando las distancias, que sin embargo no anularían estas interacciones. **AR14** tiene una distancia de aproximación de  $4,0$  Å y una interacción con el residuo de Tyr398 a una distancia de  $3,8$  Å como se puede observar en la Figura 26. La presencia de más de un grupo metoxilo, permite que se sume una interacción con Tyr326 a  $3,7$  Å en conjunto con una interacción con Cys172 a una distancia de  $3,5$  Å.

Figure 26 shows a 3D ball-and-stick model of the ligand AR14 (cyan) bound to the active site of MAO-B. The protein residues are shown in green. Three specific hydrogen bond interactions are highlighted with yellow dashed lines and labeled with their distances: 3.7 Å between the ligand and Tyr326, 3.5 Å between the ligand and Cys172, and 4.0 Å between the ligand and Tyr398. The labels 'TYR326', 'CYS172', and 'TYR398' are visible near their respective residues. The ligand is a complex aromatic structure with multiple methoxy groups. The protein backbone and side chains are shown in a stick representation with green coloring. The overall scene is set against a white background with a black border around the image area.

**Figura 26.** Conformación de **AR14** en el sitio activo de MAO-B, donde se muestra la interacción con Tyr326 a  $3,7$  Å, con Cys172 a  $3,5$  Å y con Tyr398 a  $3,8$  Å.

Finalmente, **AR09** mostró dos conformaciones. La primera de ellas mostrada en la Figura 27a muestra una distancia de aproximación del carbono terminal del grupo acetileno de  $3,6$  Å. La interacción con los residuos principales se da con Tyr398 a  $4,4$  Å en conjunto con una interacción a  $3,5$  Å con el residuo Cys172. La segunda de las conformaciones encontradas muestra un aumento en la distancia de aproximación a  $3,8$  Å, en conjunto con un aumento en la distancia de interacción con Cys172 a  $4,2$  Å, mientras que la interacción con Tyr398 presente en la primera conformación disminuyó a  $4,0$  Å, resultados que se muestran en la Figura 27b.



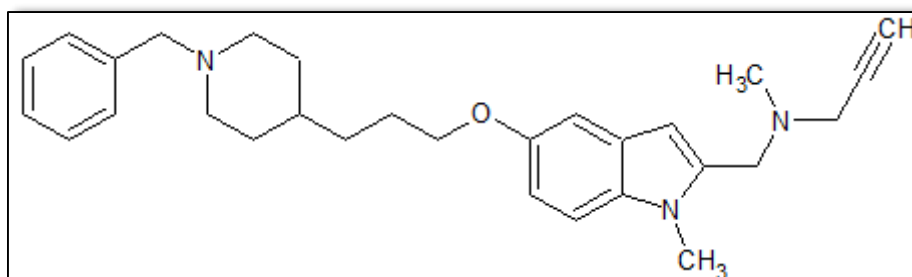
**Figura 27.** a) Conformación 1 para **AR09** en el sitio activo de MAO-B, con la interacción a 3,4 Å con Cys172, y la interacción con Tyr398 a 4,4 Å. b) conformación 2 para **AR09** en el sitio activo de MAO-B donde se evidencia el aumento en la distancia con Cys172 a 4,2 Å.



## 6.2 Estimaciones de $pK_a$

Como se mencionó en el punto 4.2.1, diversos estudios han propuesto mecanismos probables mediante los cuales moléculas que contengan un fragmento de propargilamina llevan a cabo la inhibición de MAOs, los cuales dependen de la facilidad con la que los hidrógenos presentes en el fragmento (metileno y metino) sean transferidos hacia el anillo de isoaloxazina, dando origen a reordenamientos internos que dan paso a la formación del enlace covalente entre el N(5) de la isoaloxazina y el carbono terminal que contiene el triple enlace en la propargilamina.

El mecanismo propuesto en base a estudios llevados a cabo con el derivado de propargilamina ASS234 (Figura 28),<sup>26</sup> propone la unión covalente entre el carbono terminal del grupo acetileno y el N(5) del FAD, en conjunto con la importancia de la desprotonación del fragmento de propargilamina en el mecanismo catalítico de la inhibición de MAO-A, considerando como sitios de desprotonación y de reordenamiento probables solo los hidrógenos cercanos al triple enlace, considerados como los con mayor probabilidad de abandonar el fragmento al ser los más ácidos de este fragmento, para dar inicio al mecanismo de inhibición y al reordenamiento final.



**Figura 28.** Estructura química de ASS234.

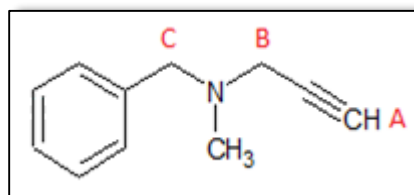
Como muestra la Figura 28, la estructura química de la molécula ASS234 en la que se basaron Albreht y col,<sup>26</sup> tiene dos protones metilénicos adyacentes al nitrógeno, (al igual que lo tienen la Pargilina y las moléculas propuestas en este trabajo de tesis) los cuales podrían participar en el reordenamiento mencionado, o ciertamente podrían ser la especie que deje la molécula para dar inicio al mecanismo de unión entre el ligando y el sitio activo de la MAO, dependiendo de si tienen una mayor o menor facilidad de ser el hidrógeno cedido.

Para aclarar si estos protones pueden estar involucrados en el proceso de desprotonación y/o reordenamiento, de acuerdo al patrón de sustitución en el anillo aromático de los derivados de propargilamina sintetizados en esta tesis, se procedió a calcular el  $pK_a$  en forma teórica de los diferentes hidrógenos presentes en el fragmento de propargilamina, utilizando la metodología que se describió en la sección 4.2.2, esto considerando que el conocer los valores teóricos de  $pK_a$  para los diferentes hidrógenos, permite evaluar cuál de ellos tendrá una mayor probabilidad

de ser el hidrógeno saliente que dé inicio al mecanismo de inhibición. Previo a la estimación teórica de los  $pK_a$  de los protones de interés en los ligandos propuestos como posibles iMAO, con la finalidad de evaluar la efectividad del mecanismo de estimación de  $pK_a$  utilizado por el software maestro, se compararon datos experimentales de  $pK_a$  con los resultados arrojados por el software. La Tabla 4 muestra los valores de  $pK_a$  experimentales (protón del carbono  $\alpha$ ) para una serie de compuestos en solvente DMSO, y los resultados obtenidos por Jaguar de manera teórica en este mismo solvente.

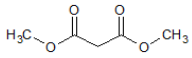
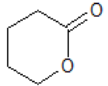
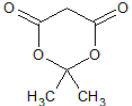
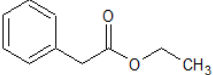
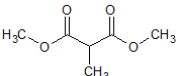
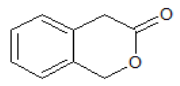
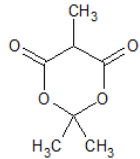
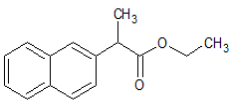
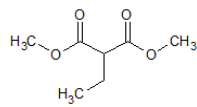
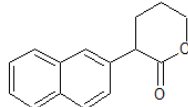
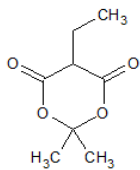
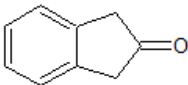
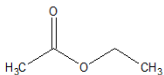
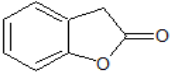
La Tabla 4 muestra en este grupo de moléculas, que los valores de  $pK_a$  de los hidrógenos enlazados al carbono  $\alpha$  entregados por Jaguar son cercanos a los valores experimentales. La comparación de los resultados teóricos y experimentales muestran diferencias prácticamente despreciables, y en algunos casos un valor exactamente igual a los experimentales que fueron recopilados. Luego de estos primeros cálculos, se llevó a cabo la estimación de  $pK_a$  para los hidrógenos de interés en cada una de las moléculas involucradas en esta tesis, donde además se incluyó la Pargilina y *N*-metilpropargilamina. Los cálculos de  $pK_a$  se llevaron a cabo en agua y en DMSO como solventes.

Los resultados obtenidos en agua se muestran en la Tabla 5, mientras que los resultados obtenidos en solvente DMSO se muestran en la Tabla 6. Ambas tablas consideran la nomenclatura de hidrógenos A, B y C, asignados como muestra la Figura 29.



**Figura 29.** Nomenclatura asignada para cada uno de los hidrógenos evaluados.

**Tabla 4.**  $pK_a$  experimentales DMSO y  $pK_a$  estimados por Jaguar para el protón alfa del carbono carbonílico de diversos compuestos.

	Compuesto	pKa exp DMSO	pKa maestro DMSO		Compuesto	pKa exp DMSO	pKa maestro DMSO
1		15,9	14,3	8		25,2	26,2
2		7,3	7,6	9		22,6	20,8
3		18,0	18,2	10		18,8	17,9
4		7,4	8,0	11		24,0	23,7
5		18,5	18,0	12		20,1	19,3
6		7,6	7,2	13		16,9	16,9
7		30,0	27,1	14		13,5	13,3

**Tabla 5.** Resultados de  $pK_a$  calculados por Jaguar en H<sub>2</sub>O como solvente.

<b>Molécula</b>	<b>H(A)</b>	<b>H(B)</b>	<b>H(C)</b>
AR01	19,2	23,6	26,8
AR02	19,1	11,5	11,2
AR03	20,1	23,4	26,6
AR04	20,1	23,9	28,2
AR05	20,6	24	28,2
AR06	19,5	22,4	16,1
AR07	19,4	24,4	23,3
AR08	19,6	23,3	17,2
AR09	19,4	23,4	25,7
AR10	19,4	23,8	25,4
AR11	19,4	23,9	27,6
AR12	19,4	23,8	27,3
AR13	19,6	23,7	25
AR14	19,8	24,1	25,9
AR15	19,3	11,6	11,5
Propargilamina	19,1	22,8	-
<i>N</i> -metilpropargilamina	19,3	22,7	-

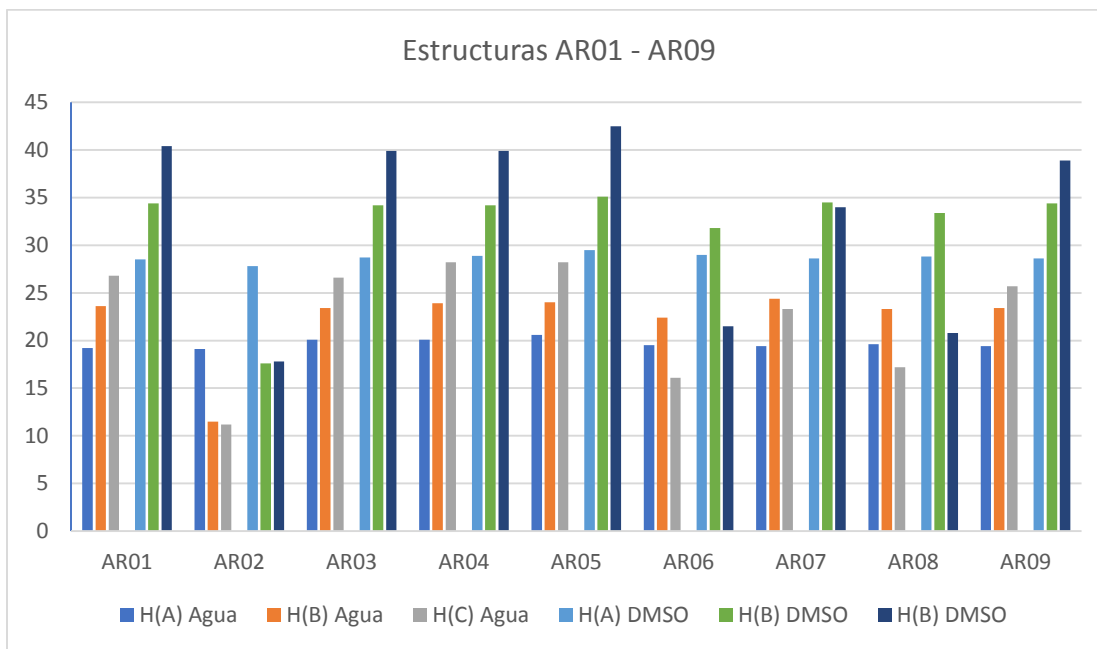
**Tabla 6.** Resultados de  $pK_a$  calculados por Jaguar en DMSO como solvente.

<b>Molécula</b>	<b>H(A)</b>	<b>H(B)</b>	<b>H(C)</b>
AR01	28,5	34,4	40,4
AR02	27,8	17,6	17,8
AR03	28,7	34,2	39,9
AR04	28,9	34,2	39,9
AR05	29,5	35,1	42,5
AR06	29	31,8	21,5
AR07	28,6	34,5	34
AR08	28,8	33,4	20,8
AR09	28,6	34,4	38,9
AR10	29	34,5	40,2
AR11	28,9	34,9	42,3
AR12	28,8	34,9	41,8
AR13	28,8	34,4	38,2
AR14	29,6	35,2	39,9
AR15	28,1	17,8	17,7
Propargilamina	27	32,8	-
<i>N</i> -metilpropargilamina	27,2	32,9	-

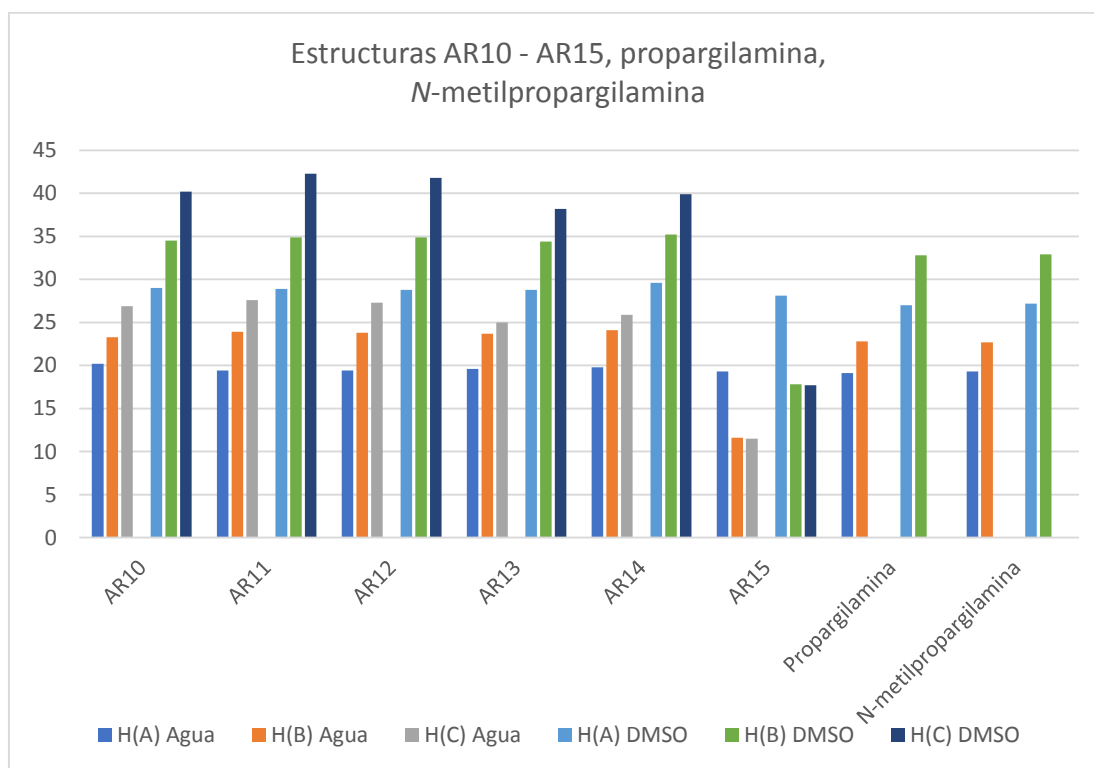
Los valores de  $pK_a$  predichos con Jaguar, muestran una correlación al comparar los resultados de manera individual con cada una de las estructuras, coincidiendo la tendencia de los valores obtenidos con agua y DMSO como solventes, como se muestra en las Figuras 30 y 31. La discusión de los resultados obtenidos en agua pueden ser correlacionados a los obtenidos con DMSO al ser consistentes, presentando cada una de las moléculas el mismo comportamiento en ambos solventes, tal como se puede interpretar en las gráficas de las Figuras 30 y 31. La diferencia radica en los  $pK_a$  obtenidos en agua los cuales resultan ser menores a los obtenidos en DMSO, implicando esto, que en medio acuoso las moléculas presentadas tendrán una acidez mayor. Esto se debe a la diferencia de polaridades entre estos solventes, siendo el agua un solvente más polar que el DMSO, con constante dieléctricas ( $\epsilon$ ) de 80 y de 47 respectivamente. La solvatación de las especies iónicas en un solvente de mayor polaridad será mayor, desplazando el equilibrio ácido/base hacia la formación de productos, por ende, aumentando la fuerza del ácido.

Se observa en las Tablas 5 y 6 que los  $pK_a$  de los hidrógenos en estudio tienen la tendencia general  $A < B < C$ , con excepciones que serán discutidas más adelante.

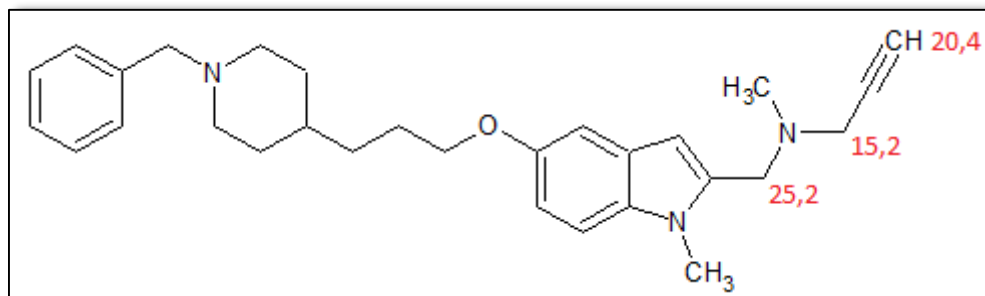
De las Tablas 5 y 6 se desprende que los  $pK_a$  obtenidos para el hidrógeno A no varían significativamente en presencia de los diferentes sustituyentes utilizados en el anillo aromático, incluso los valores obtenidos con todas las estructuras son similares a los predichos para la propargilamina y la *N*-metilpropargilamina, lo que podría implicar en que cualquier sustituyente en el anillo aromático de la Pargilina no provocará cambios considerables en el carácter ácido de este hidrógeno. Se consideró también la estructura ASS234, resultados que se muestran en la Figura 32, los cuales muestran un valor de  $pK_a$  estimado de 20,4 para el hidrógeno A, valor muy cercano a lo promediado por todas las estructuras en estudio, lo que permite ampliar la hipótesis previa considerando un efecto nulo de los sustituyentes, hasta el punto de que incluso un cambio estructural drástico en la estructura de derivados de propargilaminas, no provocaría cambios en el carácter ácido de este hidrógeno.



**Figura 30.** Gráfico  $pK_a$  de hidrógenos en la cadena alquilamina en estructuras **AR01** a la **AR09**.



**Figura 31.** Gráfico  $pK_a$  de hidrógenos en la cadena alquilamina en estructuras **AR10** a la **AR15**, propargilamina y *N*-metilpropargilamina.



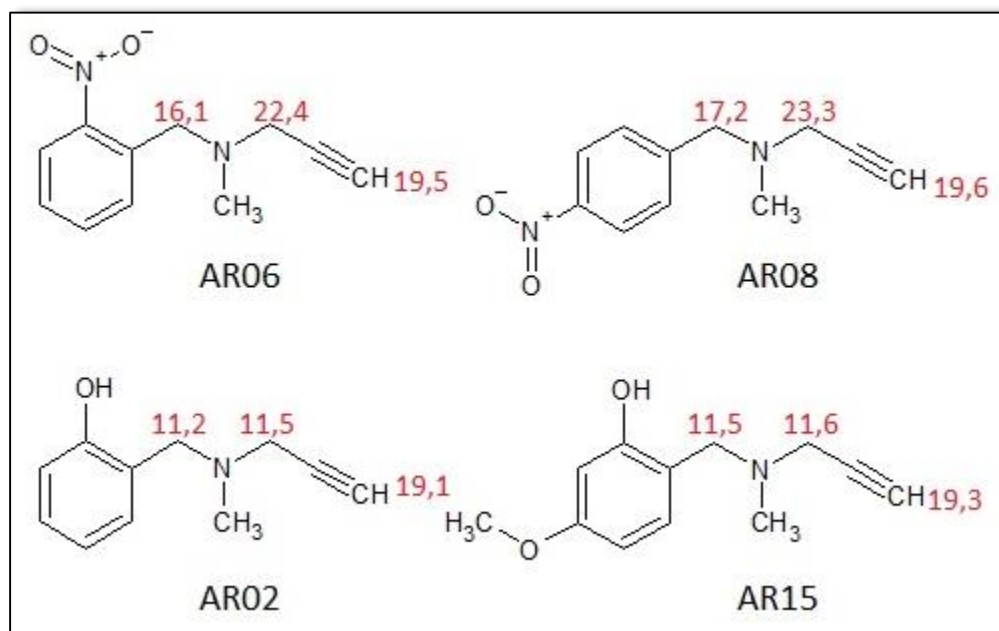
**Figura 32.**  $pK_a$  obtenidos para los hidrógenos de ASS234 en  $H_2O$ .

Los valores de  $pK_a$  mostrados en la Tabla 5, utilizando agua como solvente muestran que, para el caso de la Pargilina, el hidrógeno más ácido corresponde al adherido al carbono (denominado como A), con triple enlace terminal en el fragmento derivado de la propargilamina, seguido del hidrógeno B y finalmente el hidrógeno C. Esto indicaría que la desprotonación inicial de la Pargilina como inhibidor para MAOs tendría una probabilidad más alta de ocurrir en este hidrógeno ubicado en el triple enlace. De ser probable la pérdida de otro hidrógeno para dar inicio al mecanismo de formación del enlace covalente entre Pargilina y el N(5) del FAD, podría ser el hidrógeno B ubicado en el fragmento de propargilamina, en el cual se estimó un  $pK_a$  mayor en 4,4 unidades con respecto al hidrógeno A. La diferencia entre los hidrógenos A y C en la molécula base de propargilamina resultó ser de 7,6 unidades, lo que prácticamente descarta la posibilidad que sea el hidrógeno C el desprendido en una etapa inicial de este mecanismo, o que esta parte de la molécula esté involucrada en el reordenamiento de cargas propuesto por Albreht y col.<sup>26</sup>

Como se mencionó previamente, este resultado obtenido para la Pargilina es extrapolable a lo obtenido con la mayoría de las moléculas propuestas, entre ellas la propargilamina y la *N*-metilpropargilamina. La Figura 33 muestra las moléculas en estudio que no mantuvieron este comportamiento y los respectivos valores de  $pK_a$  obtenidos para cada uno de los hidrógenos en evaluación, considerando agua como solvente.

Las moléculas que sufrieron cambios drásticos en su  $pK_a$  representadas en la Figura 33 se agrupan en dos grupos. El primer grupo que considera las moléculas **AR06** y **AR08**, mantuvieron valores de  $pK_a$  similares a los de Pargilina en sus hidrógenos A y B, pero sus hidrógenos C vieron reducido el valor de  $pK_a$  en 3,4 y 2,4 unidades, respectivamente. Ambas moléculas tienen en común como sustituyente un grupo nitro, en posición *orto*- y *para*-, respectivamente. El segundo grupo que representan las moléculas **AR02** y **AR15** presentan un cambio aún más drástico en el  $pK_a$  estimado de los hidrógenos C y B, disminuyendo en 7,8 unidades promedio, lo que indica que estos hidrógenos son considerablemente más ácidos que el hidrógeno A de sus correspondientes moléculas, además, son más ácidos que los hidrógenos

equivalentes de la Pargilina. Estas moléculas del segundo grupo tienen en común el grupo hidroxilo en posición *orto*- del anillo aromático.



**Figura 33.** Estructuras químicas que cambiaron su valor de  $pK_a$  con sustituyentes específicos en el anillo aromático.

Las diferentes variaciones, específicamente la disminución del  $pK_a$  de los hidrógenos evaluados, se puede discutir desde el punto de vista del efecto electrónico, el cual corresponde al efecto sobre la estructura o la reactividad que se atribuye al cambio de distribución electrónica que causa un sustituyente en una molécula o sistema.<sup>52</sup> La presencia de un sustituyente atractor de electrones va a generar una disminución de la densidad electrónica en el centro al cual se encuentra unido (en este caso el anillo de benceno y por consecuencia directa en el fragmento de propargilamina), lo que va a ocasionar un debilitamiento de los enlaces, en este caso puntual, un debilitamiento de los enlaces C-H presentes en el fragmento de propargilamina, siendo más fácil romper estas uniones, disminuyendo el  $pK_a$ .

Dos son los efectos eléctricos que puede presentar un sustituyente. El efecto inductivo actúa en sistemas con enlaces  $\delta$ , viéndose afectado principalmente por la distancia a la que se encuentre el sustituyente, debilitándose a medida que esta aumenta,<sup>53</sup> mientras que el efecto mesomérico o por resonancia afecta solamente a sistemas  $\pi$  conjugados, perdiéndose el efecto si no hay enlaces  $\pi$  conjugados mediante los cuales se transmita este efecto eléctrico.<sup>54</sup> A pesar de que un determinado sustituyente tenga ambos efectos eléctricos de manera implícita en su naturaleza, el efecto que estos causan en un sistema o la predominancia de uno u de otro efecto solo puede determinarse de manera experimental.



El grupo nitro es un sustituyente con carácter atractor de electrones a través de efecto inductivo y de resonancia. La disminución de  $pK_a$  más considerable en presencia del grupo nitro es cuando este se encuentra en posición *orto*- del anillo aromático, siendo esta posición la más cercana al hidrógeno C, mientras que en posición *para*- la disminución de  $pK_a$  de este hidrógeno es menor en 1,1 unidades.

Al no existir cambios considerables en los hidrógenos B de las estructuras comparadas con los valores de  $pK_a$  de la Pargilina, implicaría que el efecto predominante en las moléculas derivadas de Pargilina **AR06** y **AR08**, es el de resonancia. Esto podría reafirmarse con la evidencia de que el grupo nitro sólo provocó una disminución de 3,5 unidades de  $pK_a$  en el hidrógeno C de la molécula **AR07**, donde sólo estaría actuando el efecto inductivo del grupo nitro.

El grupo hidroxilo es considerado como captador de electrones mediante efecto inductivo, y como un donador de electrones mediante efecto de resonancia. Como se mencionó, el grupo hidroxilo causó las disminuciones de  $pK_a$  más considerables para los hidrógenos B y C en las estructuras **AR02** y **AR15** cuando este se encuentra en posición *orto*-, siendo levemente más ácidos los hidrógenos C. Este hecho indicaría que el efecto predominante es el inductivo en esta posición, principalmente por el cambio que genera en el  $pK_a$  del hidrógeno B, el cual la única manera de modificar sería mediante el efecto inductivo, ya que no hay un sistema  $\pi$  conjugado que llegue hasta él.

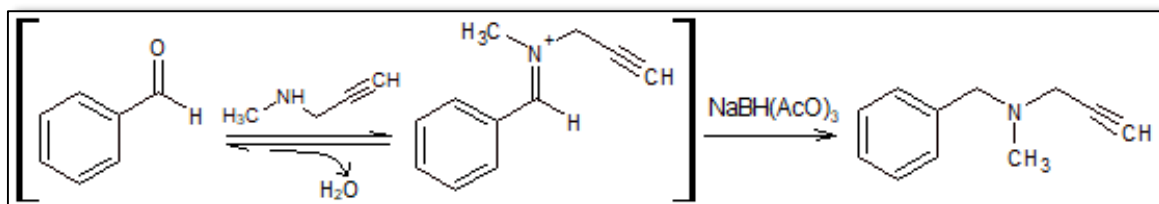
Los resultados indican que moléculas con un grupo hidroxilo en otras posiciones del anillo aromático no presentan cambios considerables en los  $pK_a$  evaluados; sin embargo, se puede ver que en posición *para*- el grupo hidroxilo provocó un aumento en el  $pK_a$  del hidrógeno C, por lo que en esta posición estaría predominando el efecto de resonancia donador de electrones que tiene el grupo hidroxilo como sustituyente, probablemente anulando el efecto inductivo aceptor de electrones. Estos resultados indicarían, además, que el efecto eléctrico producido por el grupo hidroxilo es mucho más fuerte que los producidos por el grupo nitro, en lo que a la disminución de  $pK_a$  respecta.

Los otros dos sustituyentes, dimetilamino y metoxilo, los cuales son ambos sustituyentes con el mismo carácter que el hidroxilo, no demostraron tener variaciones de  $pK_a$  en las posiciones del anillo aromático que se consideraron, por lo que no se podría identificar para estos sistemas la predominancia de alguno de los efectos eléctricos involucrados.

## 6.3 Síntesis

### 6.3.1 Estudio de la metodología de síntesis

La ruta de síntesis utilizada en esta tesis, basada en la metodología propuesta por Krysiak y col.<sup>31</sup> fue estudiada desde el punto de su efectividad y rendimiento para obtener las moléculas propuestas en este trabajo, mediante la aminación reductiva de aldehídos unidos a un anillo aromático.



**Figura 34.** Mecanismo de reacción general, descrito a partir de la formación de propargilina a partir de benzaldehído y de *N*-metilpropargilamina.

La Figura 34 muestra el mecanismo general mediante el cual se llevaron a cabo las reacciones para formar los derivados de bencilpropargilaminas en estudio, usando THF como solvente, en el cual los reactantes arrojaron una buena solubilidad. No fue necesario el uso de THF seco como describen los métodos en los cuales se basó el proceso de síntesis, dando cuenta que el uso de THF sin secar no influyó de manera negativa, obteniéndose rendimientos dentro de lo reportado para el método usando THF seco.

Este tipo de reacciones se caracteriza por la formación de un equilibrio entre el aldehído y la formación de una imina intermediaria como muestra la Figura 34, por lo que la elección del agente reductor debió ser cuidadosa, eligiéndose un agente reductor capaz de desplazar el equilibrio hacia la formación del producto deseado sin reducir el aldehído a su correspondiente alcohol y sin la necesidad de aislar la imina formada. Tal como ha sido reportado, el triacetoxiborohidruro de sodio es capaz de llevar a cabo la reducción de la imina sin reducir el aldehído,<sup>49</sup> además de no reducir el triple enlace presente en la *N*-metilpropargilamina, lo cual fue comprobado en los resultados obtenidos.

La síntesis de las moléculas propuestas se llevó a cabo con rendimientos de entre 80-90%. La diferencia de sustituyentes en el anillo aromático no generó problemas en el rendimiento de las reacciones una vez encontradas las condiciones ideales para cada aldehído utilizado. Para las reacciones que arrojaron menores rendimientos, se comprobó que un aumento en los tiempos de agitación y la cantidad de agente reductor agregado era un cambio suficiente en las condiciones de reacción para aumentar el porcentaje de rendimiento hasta los niveles reportados en bibliografía.

### 6.3.2 Preparación de oxalatos

Para definir si las moléculas propuestas en esta tesis tendrán un comportamiento como iMAO o como sustratos de MAO, en conjunto con su selectividad para MAO-A o MAO-B, se hace necesario someter a estudios biológicos estas moléculas, los que serán llevados a cabo posteriormente. Estos estudios requieren que las moléculas objetivo se encuentren en un alto estado de pureza, e idealmente sean solubles en medio acuoso. Para satisfacer este requerimiento, es común precipitar los compuestos sintetizados en forma de clorhidratos o mediante el uso de contraiones que permitan la precipitación del compuesto como una sal, procesos que a pesar de la importancia que tienen para la industria farmacéutica, hoy en día siguen siendo métodos llevados a cabo por ensayo y error.<sup>50,55</sup>

Las moléculas obtenidas fueron tratadas con HCl para obtenerlas en forma de clorhidrato, obteniéndose sólidos blancos solubles en agua; sin embargo, los resultados espectroscópicos demostraron la reducción del triple enlace. Posteriormente, se probó la preparación de estos clorhidratos mediante burbujeo de HCl, lo cual dio como resultado, sólidos estables en solución, pero que perdían su estabilidad al ser filtrados, siendo delicuescentes.

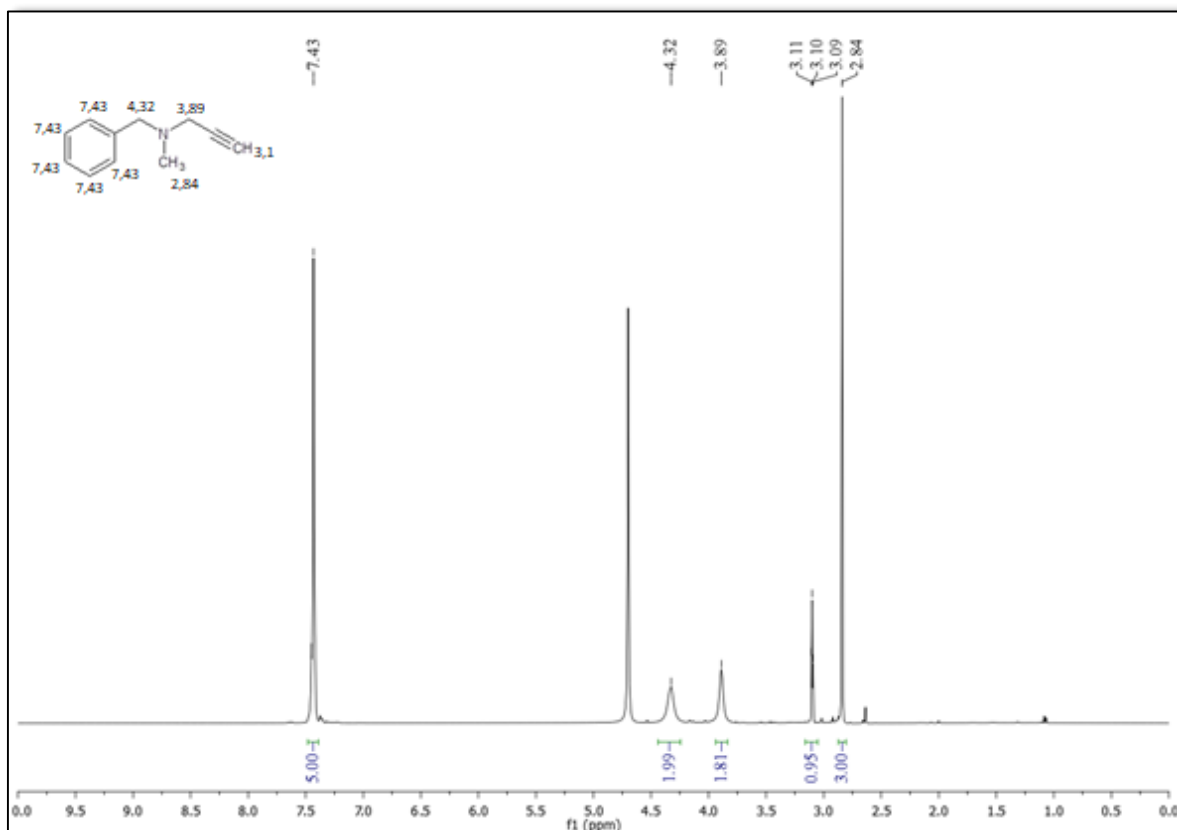
Dada esta situación, se descartó la posibilidad de preparar las moléculas como clorhidratos y se optó por preparar los compuestos en forma de sales de ácido oxálico, según la metodología descrita en la sección 5.1.2. La Tabla 7 resume los tiempos de agitación necesarios para la preparación de cada uno de estos compuestos, factor que se identificó como el determinante en la preparación exitosa de estas sales, en conjunto con la necesidad de llevar a cabo la reacción con la mínima cantidad posible de solvente y un cambio de polaridad en el medio agregando éter dietílico una vez cumplido el tiempo necesario de agitación. De forma general, las moléculas que presentan algún grupo hidroxilo como sustituyente en el anillo aromático fueron las que requirieron más tiempo de agitación para la preparación de los oxalatos y a su vez fueron las que presentaron mayor dificultad en el proceso. La molécula designada como **AR03**, la cual tiene un grupo hidroxilo en posición *meta*-, no pudo ser precipitada como sal mediante este método, probándose distintas variaciones en la metodología sin arrojar resultados positivos.

**Tabla 7.** Tiempos de agitación para cada una de las sales de ácido oxálico.

tiempo de agitación (h)	Molécula
2	AR01, AR05
4	AR06, AR07, AR09, AR10, AR11, AR13
14	AR12, AR14
24	AR02, AR04, AR08, AR15

### 6.3.3 Análisis Espectroscópico

La Figura 35 muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para Pargilina (**AR01**). Esta permite ilustrar las señales características que presentan todos los compuestos sintetizados, las cuales corresponden a los hidrógenos de la cadena alquilamina que no fue sometida a cambios, por lo que en el desplazamiento químico que presentan estas señales fueron similares en todas las moléculas sintetizadas, por lo que el análisis realizado para esta estructura puede ser extrapolado para todas las moléculas planteadas en este estudio.



**Figura 35.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de AR01 Pargilina.

Las señales características son principalmente cuatro, el grupo metilo (2,84 ppm) apantallado por la presencia del nitrógeno cercano; el hidrógeno del grupo acetileno (3,1 ppm); mientras que los metilenos de la cadena alquilamina tienen diferentes desplazamientos, donde el más apantallado corresponde al más cercano al triple enlace (3,89 ppm), siendo el restante desapantallado por su cercanía con el anillo aromático (4,32 ppm). La señal singulete observada corresponde al solvente  $\text{D}_2\text{O}$  (4,7 ppm).

Los protones correspondientes al anillo aromático son los que permitieron verificar la sustitución en esta parte de las moléculas (~7 ppm). En el caso de la Pargilina

sólo se observa una señal (7,43 ppm), correspondiente a un benceno monosustituído.

Se puede establecer una comparación en detalle consultando la sección de anexo, donde se adjuntan todos los espectros de Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y de  $^{13}\text{C}$ -RMN de las moléculas sintetizadas.

## 7. Conclusiones

Las conformaciones obtenidas mediante los estudios de acoplamiento molecular muestran que se cumplen las interacciones descritas para ambas isoformas en los sitios activos de MAO, acomodándose a una distancia lo suficientemente cercana al N(5) del anillo de isoaloxazina del FAD para formar el enlace covalente necesario para la inhibición de MAOs realizada por este tipo de moléculas derivadas de propargilaminas, lo que indica que las moléculas propuestas podrán interactuar con estas enzimas. Esto también puede ser confirmado por las energías obtenidas con los estudios realizados en ambas isoformas, donde todos los resultados fueron favorables para la unión entre los ligandos y ambas isoformas de MAO; sin embargo, se hace necesario profundizar en este tipo de estudios teóricos, con la realización de estudios de dinámica molecular que permitan predecir la forma en que cada una de estas estructuras acceden al sitio activo, complementando los datos obtenidos en esta tesis.

Los resultados de los estudios teóricos de  $pK_a$  sugieren que un cambio en los hidrógenos presentes en el anillo aromático de la Pargilina por sustituyentes tales como grupos nitro o hidroxilo en posición *orto*- del anillo, provocarían un cambio en la acidez de los protones de la cadena alquilamina que no ha sido considerado en estudios previos de mecanismos por los cuales se lleva a cabo la inhibición de MAO por propargilaminas. El considerar estos nuevos antecedentes, podría entregar nuevas directrices en el desarrollo de nuevos fármacos orientados al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Los métodos de síntesis utilizados demostraron ser convenientes y simples de llevar a cabo, con buenos rendimientos para la obtención de esta clase de compuestos, pudiendo producir sin inconvenientes estas moléculas, las que serán puestas a disposición de nuevos grupos de investigación que puedan estudiar experimentalmente sus características en futuras investigaciones.

## 8. Referencias

1. J. Campdelacreu. Enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer: Factores de riesgo ambientales. *Neurología* **2014**, 29 (9), 541–549.
2. H. Niu, I. Álvarez-Álvarez, F. Guillén-Grima, I. Aguinaga-Ontoso. Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología* **2017**, 32 (8), 523–532.
3. T.P. Brown, P.C. Rumsby, A.C. Capleton, L. Rushton, L.S. Levy. Pesticides and Parkinson's disease - Is there a link? *Environmental Health Perspectives*. 2006.
4. Y. xiang Xu, H. Wang, X. kang Li, et al. Discovery of novel propargylamine-modified 4-aminoalkyl imidazole substituted pyrimidinylthiourea derivatives as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143, 33–47.
5. D. Matveychuk, E. Nunes, N. Ullah, et al. Elevation of rat brain tyrosine levels by phenelzine is mediated by its active metabolite  $\beta$ -phenylethylidenehydrazine. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2014**, 53, 67–73.
6. D.E. Edmondson, C. Binda, J. Wang, A.K. Upadhyay, A. Mattevi. Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. *Biochemistry* **2009**, 48 (20), 4220–4230.
7. C. Binda, P. Newton-Vinson, F. Hubálek, D.E. Edmondson, A. Mattevi. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9 (1), 22–26.
8. G. Zapata-Torres, A. Fierro, G. Barriga-González, J.C. Salgado, C. Celis-Barros. Revealing Monoamine Oxidase B Catalytic Mechanisms by Means of the Quantum Chemical Cluster Approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, 55 (7), 1349–1360.
9. J.R. Miller, D.E. Edmondson. Structure-activity relationships in the oxidation of para-substituted benzylamine analogues by recombinant human liver monoamine oxidase A. *Biochemistry* **1999**, 38 (41), 13670–13683.
10. R.B. Silverman. Radical Ideas about Monoamine Oxidase. *Acc. Chem. Res.* **1995**.
11. P.F. Fitzpatrick. Oxidation of amines by flavoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, 493 (1), 13–25.
12. R. Vianello, M. Repič, J. Mavri. How are biogenic amines metabolized by monoamine oxidases? *European J. Org. Chem.* **2012**, No. 36, 7057–7065.
13. M. Poberžnik, M. Purg, M. Repič, J. Mavri, R. Vianello. Empirical valence bond simulations of the hydride-transfer step in the monoamine oxidase a catalyzed metabolism of noradrenaline. *J. Phys. Chem. B* **2016**, 120 (44), 11419–11427.
14. M.A. Akyüz, S.S. Erdem, D.E. Edmondson. The aromatic cage in the active site of monoamine oxidase B: Effect on the structural and electronic properties of bound benzylamine and p-nitrobenzylamine. *J. Neural Transm.* **2007**, 114 (6), 693–698.
15. B. Karasulu, M. Patil, W. Thiel. Amine oxidation mediated by lysine-specific

- demethylase 1: Quantum mechanics/molecular mechanics insights into mechanism and role of lysine 661. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (36), 13400–13413.
16. E. Abad, R.K. Zenn, J. Kästner. Reaction mechanism of monoamine oxidase from QM/MM calculations. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117 (46), 14238–14246.
  17. M.S. Song, D. Matveychuk, E.M. MacKenzie, et al. An update on amine oxidase inhibitors: Multifaceted drugs. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2013**, 44, 118–124.
  18. M.C. Anderson, F. Hasan, J.M. McCrodden, K.F. Tipton. Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. *Neurochem. Res.* **1993**, 18 (11), 1145–1149.
  19. M.B.H. Youdim, M. Weinstock. Therapeutic Applications of Selective and Non-Selective Inhibitors of Monoamine Oxidase A and B that do not Cause Significant Tyramine Potentiation. *Neurotoxicology* **2004**, 25 (1–2), 243–250.
  20. S.-Y. Son, J. Ma, Y. Kondou, et al. Human monoamine oxidase A: structure and control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **2008**, 64 (a1), C457–C457.
  21. M. Unzeta, G. Esteban, I. Bolea, et al. Multi-target directed donepezil-like ligands for Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* **2016**, 10 (MAY), 1–24.
  22. F. Blandini. Neuroprotection by rasagiline: A new therapeutic approach to Parkinson's disease? *CNS Drug Rev.* **2005**, 11 (2), 183–194.
  23. M. Li, C. Binda, A. Mattevi, D.E. Edmondson. Functional role of the "aromatic cage" in human monoamine oxidase B: Structures and catalytic properties of Tyr435 mutant proteins. *Biochemistry* **2006**, 45 (15), 4775–4784.
  24. H. Kinemuchi, Y. Arai, Y. Toyoshima, T. Tadano, K. Kisara. Studies on 5-Fluoro- $\alpha$ -Methyltryptamine and p-Chloro- $\beta$ -Methylphenethylamine: Determination of the MAO-A or MAO-B Selective Inhibition in Vitro. *Jpn. J. Pharmacol.* **1988**.
  25. A. Fierro, D.E. Edmondson, C. Celis-Barros, M. Rebolledo-Fuentes, G. Zapata-Torres. Why p-OMe- and p-Cl- $\beta$ -Methylphenethylamines display distinct activities upon MAO-B binding. *PLoS One* **2016**, 11 (5), 1–10.
  26. A. Albrecht, I. Vovk, J. Mavri, J. Marco-Contelles, R.R. Ramsay. Evidence for a cyanine link between propargylamine drugs and monoamine oxidase clarifies the inactivation mechanism. *Front. Chem.* **2018**, 6 (MAY), 1–11.
  27. R. Borštnar, M. Repič, M. Kržan, J. Mavri, R. Vianello. Irreversible inhibition of monoamine oxidase B by the antiparkinsonian medicines rasagiline and selegiline: A computational study. *European J. Org. Chem.* **2011**, No. 32, 6419–6433.
  28. H.L. Yang, P. Cai, Q.H. Liu, et al. Design, synthesis and evaluation of coumarin-propargylamine hybrids as novel dual inhibitors of monoamine oxidases and amyloid- $\beta$  aggregation for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**.
  29. I. Bolea, A. Gella, M. Unzeta. Propargylamine-derived multitarget-directed ligands: Fighting Alzheimer's disease with monoamine oxidase inhibitors. *J. Neural Transm.* **2013**, 120 (6), 893–902.
  30. N.G. Panova, L.N. Axenova, A.E. Medvedev. The stimulating effects of ethanol

consumption on synthesis of rat brain monoamine oxidases and their sensitivity to the irreversible inhibitor, pargyline. *Neurosci. Lett.* **2000**, 292 (1), 66–68.

31. J.M. Krysiak, J. Kreuzer, P. MacHeroux, et al. Activity-based probes for studying the activity of flavin-dependent oxidases and for the protein target profiling of monoamine oxidase inhibitors. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, 51 (28), 7035–7040.
32. D.L. Murphy, F. Karoum, D. Pickar, et al. Differential trace amine alterations in individuals receiving acetylenic inhibitors of MAO-A (clorgyline) or MAO-B (selegiline and pargyline). *J. Neural Transm. Suppl.* **1998**, No. 52, 39–48.
33. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, et al. Gaussian 09, Revision B.01. *Gaussian 09, Revision B.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT.* 2009.
34. J.J.P. Stewart. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* **2007**, 13 (12), 1173–1213.
35. J.J.P. Stewart. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.* **2013**, 19 (1), 1–32.
36. R.O. Jones. Density functional theory: Its origins, rise to prominence, and future. *Rev. Mod. Phys.* **2015**, 87 (3).
37. A.J. Cohen, P. Mori-Sánchez, W. Yang. Challenges for density functional theory. *Chem. Rev.* **2012**, 112 (1), 289–320.
38. F.J. Devlin, J.W. Finley, P.J. Stephens, M.J. Frisch. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields: A comparison of local, nonlocal, and hybrid density functionals. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99 (46), 16883–16902.
39. J. Tirado-Rives, W.L. Jorgensen. Performance of B3LYP density functional methods for a large set of organic molecules. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, 4 (2), 297–306.
40. C.S. François-Yves Dupradeau, Adrien Pigache, Thomas Zaffran, and P.C. Rodolphe Lelong, Nicolas Grivel, Dimitri Lelong, Wilfried Rosanski. The R.E.D. Tools: Advances in RESP and ESP charge derivation *Phys Chem Chem Phys*; **2010**; Vol. 77.
41. G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**.
42. C. Binda, F. Hubálek, M. Li, et al. Crystal Structures of Monoamine Oxidase B in Complex with Four Inhibitors of the N-Propargylaminoindan Class. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (7), 1767–1774.
43. M. Velásquez, J. Drosos, C. Gueto, J. Márquez, R. Vivas-Reyes. A Autodock???PM6 metodo pra seleccionar o melhor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Rev. Colomb. Quim.* **2013**, 42 (1), 1–8.
44. O. Trott, A. Olson. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31 (2), 455–461.



45. A.C. Lee, G.M. Crippen. Predicting pKa. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**.
46. A.D. Bochevarov, E. Harder, T.F. Hughes, et al. Jaguar: A high-performance quantum chemistry software program with strengths in life and materials sciences. *Int. J. Quantum Chem.* **2013**, 113 (18), 2110–2142.
47. J.J. Kličić, R.A. Friesner, S.Y. Liu, W.C. Guida. Accurate prediction of acidity constants in aqueous solution via density functional theory and self-consistent reaction field methods. *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106 (7), 1327–1335.
48. C. Lim, D. Bashford, M. Karplus. Absolute pKa calculations with continuum dielectric methods. *J. Phys. Chem.* **1991**.
49. A.F. Abdel-Magid, K.G. Carson, B.D. Harris, C.A. Maryanoff, R.D. Shah. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. *J. Org. Chem.* **1996**.
50. A.T.M. Serajuddin. Salt formation to improve drug solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59 (7), 603–616.
51. L. De Colibus, M. Li, C. Binda, et al. Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102 (36), 12684–12689.
52. L. Salvatella. Q uímica educación. **2017**, 232–237.
53. L.M. Stock. The origin of the inductive effect. *J. Chem. Educ.* **1972**, 49 (6), 400–404.
54. R.C. Kerber. If it's resonance, what is resonating? *J. Chem. Educ.* **2006**, 83 (2), 223–227.
55. D.A. Haynes, L.K. Pietersen. Hydrogen bonding networks in ammonium carboxylate salts: The crystal structures of phenylethylammonium fumarate-fumaric acid, phenylethylammonium succinate-succinic acid and anilinium fumarate-fumaric acid. *CrystEngComm* **2008**, 10 (5), 518–524.

## 9. Anexo

