

UCH-FC
MA5-Q
H967
C.1



**SÍNTESIS DE (±)-4-METILTIOANFETAMINA (MTA) Y RESOLUCIÓN DE
SUS ENANTIÓMEROS. SÍNTESIS DE DERIVADOS N-ALQUILADOS DE (±)-
MTA Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA COMO INHIBIDORES DE
MONOAMINO OXIDASA**

Tesis Entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para
optar al grado de Magister en Ciencias Químicas

Facultad de Ciencias

por

Claudio Raúl Hurtado Guzmán

Director de Tesis: Dr. Bruce K. Cassels

co-Director Tesis: Dr. Miguel Reyes Parada

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER



Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

CLAUDIO RAÚL HURTADO GUZMÁN

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Químicas, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 23 de Noviembre de 2001.

Director de Tesis:

Dr. Bruce K. Cassels

Handwritten signature of Bruce K. Cassels in black ink, written over a dotted line.

Co-Director de Tesis:

Dr. Miguel Reyes Parada

Handwritten signature of Miguel Reyes Parada in black ink, written over a dotted line.

Comisión de Evaluación de Tesis:

Dr. Ramiro Araya (Presidente)

Handwritten signature of Ramiro Araya in blue ink, written over a dotted line.

MSc. Hector Bravo

Handwritten signature of Hector Bravo in blue ink, written over a dotted line.

Dr. Diego Bustamante

Handwritten signature of Diego Bustamante in black ink, written over a dotted line.

A Raúl y Aída

AGRADECIMIENTOS

Es esperable que quien finaliza una difícil tarea como es la de estudiar un postgrado, configure una larga lista de gente que a contribuido , colaborado y apoyado de una u otra manera al estudiante en cuestión.

Mi lista, en particular, debe empezar como corresponde y es por eso que me permito hacer la siguiente reflexión.

Existen dos tipos de estudiantes de postgrado; los de primera categoría, que cuentan con financiamiento para la realización de sus estudios y como consecuencia de esto, apoyo irrestricto a sus actividades; y los de segunda, que no cuentan con él, con las consecuencias que podrán imaginar. Para estos últimos, la tarea de llegar a buen término de sus estudios es doblemente difícil y vaya para todos ellos en primer lugar mi respetuoso y honesto reconocimiento.

Habiendo escrito el párrafo precedente, siento un *femto* de liberación que me permite pensar en agradecer a quienes de manera desinteresada, han contribuido a mi formación, que a estas alturas no estoy seguro si es de científico, de técnico superior o sencillamente, de ser humano.

Sin duda alguna que mi amigo, mentor, mecenas y tutor de tesis ocupa mis agradecimientos mas inspirados. Nunca conocí a alguien con tan buena voluntad, y tanta capacidad de fascinar con su infinito conocimiento. Verlo emocionarse hasta las lagrimas cuando le comunique mi decisión de dejar el programa de Doctorado en Química, para buscar horizontes en el mundo de la farmacología, es algo que no he olvidado y que dejó una marca en nuestra manera de relacionarnos que durara por siempre. Sin tu permanente ayuda mi querido Bruce, en el contexto mas amplio que se puede entender esa palabra, nada de lo que hoy está sucediendo sería posible. Para ti, una sinfonía de agradecimientos.

Mi padre, mi madre y mis hermanos han sido siempre el pilar de mi vida. Su esfuerzo conjunto y su apoyo a toda prueba son en gran parte responsables de que haya alcanzado este objetivo académico y de convertirme en la persona que hoy recorre su propio camino. ¡Gracias! (expresión elíptica con la que expresamos nuestra gratitud) es una manera pequeña y pobre de decir cuanto les debo, pero parece ser la mas apropiada para

este contexto. Consideren siempre, sin posibilidad alguna de equivocarse, que estuve, estoy y estaré orgulloso de haber nacido entre ustedes.

De aquí en adelante, es posible que olvide a alguien que merezca estar en mis agradecimientos y me disculpo anticipadamente por ello.

A mis colegas de laboratorio, Pilar, Gerald, Ramiro Patricio, Eduardo y Marco. En particular a mis amigos y compañeros de trabajo, Patricio, John Jairo, Marcelo y Mariano con quienes hemos traspasado las barreras laborales y hemos construido un futuro de amistad permanente e indisoluble.

Una mención muy especial al Dr. Reyes, quien ha sabido soportar los mas difíciles momentos juntos y que con su "excelencia académica" me ha guiado por las sendas de la farmacología.

Imposible de olvidar, mi querido "Club de Tobi". No se lo que habría sido de mi si cada martes desde hace tres años no hubieran estado los tobianos. Nuestro *presidente* Paolo, *el cuentero* Vlaras, *macabeo* Totonno, *solapado* Suzarte, *pain in the as* Reles, *el muerto* Don Lalo y los ilustres y queridos Rulo y el Maestro Alexis.

Especialmente a Eduardo Benavides, con quien comparto una visión del mundo y un cariño muy grande. Junto a él les agradezco a Don Juan y a Don Genaro por mostrarnos que las cosas se pueden *ver* de otro modo y enseñarnos con eso que la vida no es necesariamente como la aprendimos.

A mis amigos todos, a los de antes, que ya no veo, pero que fueron importantes en otros momentos y a mis amigos actuales, que silenciosamente aportan en los mas pequeños detalles.

Finalmente a mi *principesa*, que aunque salió a la cancha solo hace un año y medio, ha sabido compenetrarse conmigo de una manera muy sabia. Ella es quien comparte mas estrechamente el día a día, sabiendo lo fácil que resulta escribirlo y lo complicado que resulta hacerlo.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE MATERIAS -----	1
INDICE DE TABLAS -----	3
INDICE DE FIGURAS -----	4
ABREVIATURAS -----	5
RESUMEN -----	6
ABSTRACT -----	7
INTRODUCCIÓN -----	8
<i>La depresión y su tratamiento farmacológico</i> -----	8
<i>Inhibidores de enzimas</i> -----	12
<i>Monoaminoxidasa</i> -----	13
<i>Liberación de serotonina</i> -----	15
<i>Neurotoxicidad</i> -----	16
<i>Síntesis química</i> -----	17
<i>Resolución enantiomérica</i> -----	19
MATERIALES Y MÉTODOS -----	24
QUÍMICA -----	25
-Resolución Enantiomérica -----	25
-Síntesis -----	28
FARMACOLOGÍA -----	42
-Evaluación de la actividad de los derivados N-alquilados de MTA como inhibidores de las dos isoformas de MAO -----	42
-Determinación de la inhibición de MAO-A -----	43
-Determinación de la inhibición de MAO-B -----	43
-Condiciones Cromatográficas -----	44
-Determinación de la reversibilidad de la inhibición de MAO-A -----	45
-Determinación de la dependencia del tiempo de la inhibición de MAO-B -----	45
-Determinación del efecto neurotóxico de algunos derivados N-alquilados de MTA en células de cultivo -----	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	48
QUÍMICA -----	48
<i>Síntesis química</i> -----	48
-Resolución de (\pm)-MTA en sus enantiómeros: -----	64
FARMACOLOGÍA -----	68
<i>Actividad I-MAO</i> -----	68
-Neurotoxicidad -----	74
CONCLUSIONES -----	76
REFERENCIAS -----	77

ANEXO 1: ESPECTROS ^1H -RMN-----	86
ANEXO 2: GRAFICOS DE INHIBICION DE MAO-A-----	113
ANEXO 3: GRAFICOS DE NEUROTOXICIDAD-----	118

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Compuestos racémicos sintetizados y sus rendimientos -----	49
Tabla 2: Evaluación de las bases comúnmente utilizadas en la reacción de Knoevenagel para la obtención de 1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno -----	51
Tabla 3: Corrimientos químicos de RMN de ¹ H de (<i>E</i>) y (<i>Z</i>)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno-----	53
Tabla 4 : Corrimientos químicos de RMN de ¹³ C de (<i>E</i>) y (<i>Z</i>)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno-----	55
Tabla 5: Efectos nucleares Overhauser observados en el espectro NOESY de (<i>Z</i>)- y (<i>E</i>)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno-----	56
Tabla 6: Resumen de los corrimientos de los protones bencílicos de los derivados <i>N</i> -alquilados de MTA -----	63
Tabla 7: Resultados de inhibición de MAO de MTA, sus enantiómeros, sus derivados <i>N</i> -alquilados y su homólogo MTAB (SE = sin efecto)-----	69
Tabla 8: Reversibilidad de la inhibición de MAO-A producida por algunos derivados de MTA-----	71
Tabla 9: Efecto de la preincubación en la inhibición de MAO-B para los derivados de MTA-----	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructuras químicas de los neurotransmisores dopamina, norepinefrina y serotonina -----	9
Figura 2: Estructuras químicas de imipramina y amitriptilina -----	10
Figura 3: Estructuras químicas de isocarboxazida y tranilcipromina -----	10
Figura 4: Estructuras químicas de fluoxetina y sertralina -----	11
Figura 5: Estructura química de L-deprenyl -----	14
Figura 6: Reacción para la obtención de β -nitroestirenos -----	17
Figura 7: Ruta sintética para la obtención de MTA y MTAB -----	50
Figura 8: Mecanismo de la reacción de síntesis de β -nitroestirenos -----	51
Figura 9: Reacción para la obtención de isómeros (<i>E</i>) y (<i>Z</i>) -----	52
Figura 10 : (<i>E</i>) y (<i>Z</i>) 1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno -----	53
Figura 11: Ruta sintética para la obtención de NMMTA -----	58
Figura 12: Ruta sintética para la obtención de DMMTA -----	58
Figura 13: Ruta sintética para la obtención de NEMTA -----	59
Figura 14: Ruta sintética para la obtención de NAMTA y DAMTA -----	61
Figura 15.- Configuraciones absolutas del Ácido de Mosher y sus derivados -----	66
Figura 16.- Señales de ^1H -RMN correspondientes a los metoxilos en las amidas de Mosher y configuración absoluta de las aminas. -----	67
Figura 17: Efecto neurotóxico de MTA y sus derivados monoalquilados sobre células de sustancia negra -----	75

ABREVIATURAS

MTA (4-metiltioanfetamina), MTAB (4-metiltio-2-aminobutano), NMMTA (*N*-metil-4-metiltioanfetamina), DMMTA (*N,N*-dimetil-4-metiltioanfetamina), NEMTA (*N*-etil-4-metiltioanfetamina), DEMTA (*N,N*-dietil-4-metiltioanfetamina), NAMTA (*N*-alil-4-metiltioanfetamina), DAMTA (*N,N*-dialil-4-metiltioanfetamina), MAO (Monoamino Oxidasa), IMAO (Inhibidor de Monoamino Oxidasa) THF (Tetrahidrofurano), ACN (Acetonitrilo), HPLC-ED (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con Detección Electroquímica), AldDH (Aldehído Deshidrogenasa de Levadura), 2-NAD (2-Nicotinamida-Adenina Dinucleótido), DMAPAA (Ácido 4-Dimetilamino Fenilacético), 5-HT (Serotonina), DMAPEA (4-Dimetilamino Feniletilamina), ISRS (Inhibidor Selectivo de Recaptación de Serotonina), ACTH (Corticosterona), i-PrOH (2-Propanol), ARA (Agente de Resolución Ácido), c (Concentración [g/100ml]), 5-HIA (5-Hidroxiidolaldehído), SOS (Octilsulfato de Sodio), PBS (Buffer Fosfato Salino)

RESUMEN

El presente trabajo de tesis es una investigación centrada en la síntesis y evaluación farmacológica de derivados *N*-alquilados de (\pm)-4-metiltioanfetamina, ((\pm)-MTA), un liberador selectivo de serotonina no neurotóxico e inhibidor selectivo reversible de MAO-A. Además se resolvieron los enantiómeros de (\pm)-MTA.

Se sintetizaron moléculas con largos de cadena *N*-alquílica desde uno a tres átomos de carbono, con patrones de sustitución mono y dialquilados. Adicionalmente se sintetizó un homólogo superior de MTA, la 4-metiltio- α -etilfeniletilamina, observándose la formación de los dos nitroestirenos isómeros geométricos precursores en la primera etapa de la síntesis, los cuales fueron caracterizados completamente por técnicas de resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones.

Todos los compuestos obtenidos fueron evaluados en cuanto a su capacidad como inhibidores de MAO-A, resultando ser todos los derivados racémicos menos potentes que MTA. (+)-MTA es la molécula más activa de las evaluadas y dos veces más potente que el compuesto racémico, (-)-MTA es 20 veces menos activa que la mezcla racémica. La inhibición de MAO-A es reversible en todos los casos. En cuanto a la inhibición de MAO-B, ninguna de las drogas evaluadas fue activa, excepto NAMTA y esto no cambió por preincubación, lo que indica que la falta de inhibición de MAO-B es independiente del tiempo.

Los derivados monoalquilados fueron evaluados en cuanto a sus propiedades neurotóxicas sobre células de cultivo. Los porcentajes de toxicidad fueron bajos y comparables con aquellos que presenta l-deprenil, usada actualmente en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

ABSTRACT

This thesis is focused on the synthesis and pharmacological evaluation of *N*-alkyl derivatives of (\pm)-4-methylthioamphetamine, ((\pm)-MTA), a selective non neurotoxic releaser agent of serotonin and selective reversible MAO-A inhibitor. Besides, the enantiomers of MTA were resolved and tested.

Molecules with one, two and three carbon atom chain bonded to the nitrogen atom were synthesized. Mono and dialkylated series were prepared. A higher homologue of MTA, 4-methylthio- α -ethylphenylethylamine was synthesized additionally. In this reaction we observed the formation of two geometric isomer nitrostyrenes precursors. They were fully characterized by one and two-dimensional $^1\text{H-NMR}$ techniques.

All racemic derivatives were less potent than MTA as monoamino oxidase A inhibitors. (+)-MTA is the most potent molecule evaluated and is twice as potent as the racemic compound, (-)-MTA is twenty times less potent than (\pm)-MTA. Almost all derivatives were inactive as MAO-B inhibitors with the exception of NAMTA. Preincubation had no effect on these results; therefore the absence of inhibitory effect is independent of time.

The neurotoxicity of the monoalkyl derivatives was evaluated. Cellular death rates were low and similar to those caused by L-deprenyl, used in Parkinson's Disease.

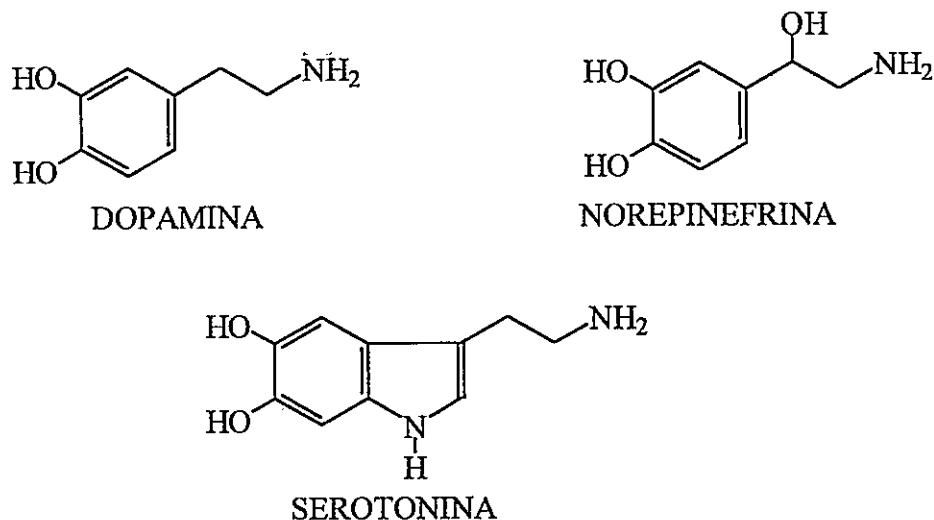
INTRODUCCIÓN

La depresión y su tratamiento farmacológico

La depresión es una enfermedad muy común en nuestros tiempos y que constantemente preocupa a los investigadores y a la comunidad en general. La depresión mayor (enfermedad unipolar, o la bipolar, maníaco-depresiva) está caracterizada por cambios en el estado de ánimo como una de sus primeras manifestaciones clínicas. La depresión mayor está caracterizada por sentimientos de intensa tristeza y desesperanza, lentitud mental, pérdida de la concentración y preocupación pesimista. También se pueden observar cambios físicos, particularmente en depresiones melancólicas o severas; estos incluyen insomnio o hipersomnio, anorexia y pérdida de peso, disminución de la energía y la libido, alteración del ritmo cardiaco normal, de la temperatura corporal y de muchas funciones endocrinas (Baldessarini, 1996).

Muchos tipos de sustancias, tanto naturales como sintéticas, se han utilizado en la historia de la humanidad para el tratamiento de las enfermedades que afectan el comportamiento. En 1959, Everett y Toman postularon por primera vez la hipótesis de que las catecolaminas (dopamina o DA, norepinefrina o NE) y la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) desempeñaban un papel importante en relación con la depresión (Calderón, 1984) (Fig. 1). Actualmente se sabe que en la patogenia de este cuadro intervienen alteraciones psicológicas y trastornos bioquímicos.

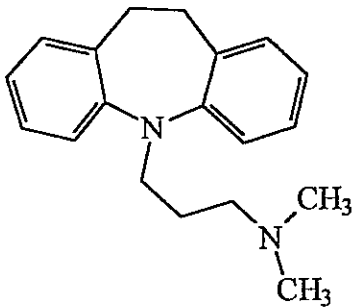
Figura 1: Estructuras químicas de los neurotransmisores dopamina, norepinefrina y serotonina



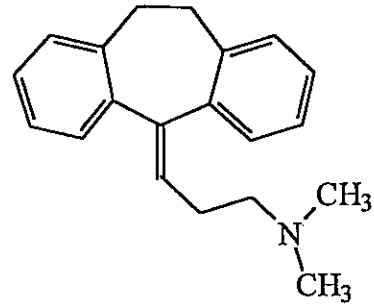
Uno de los enfoques más utilizados para el tratamiento de estos cuadros patológicos se basa en el empleo de los fármacos antidepresivos. Ellos se pueden clasificar en tres grupos principales:

- a) Los tricíclicos, cuya denominación corresponde a características estructurales de las moléculas, ya que la mayoría comparte un estructura molecular de tres anillos. Su mecanismo de acción está estrechamente relacionado con la prolongación de la actividad de aminas biógenas mediante el bloqueo de los principales medios de inactivación fisiológica como son el transporte y recaptación en los terminales nerviosos. Ejemplos de este tipo de fármacos son la imipramina y la amitriptilina (Nieforth, 1981) (Fig. 2).

Figura 2: Estructuras químicas de imipramina y amitriptilina



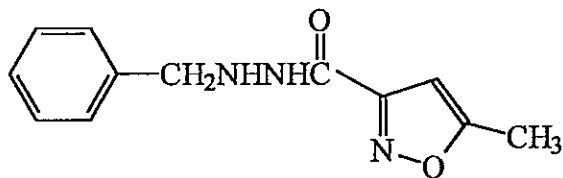
IMIPRAMINA



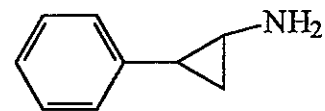
AMITRIPTILINA

- b) Los inhibidores de monoaminoxidasa (I-MAO), cuyo efecto terapéutico depende de la inhibición de otro importante mecanismo de inactivación de monoaminas cual es la degradación enzimática. La inhibición de las MAO se traduce en un aumento de la concentración de las aminas biógenas en el espacio sináptico y, por consecuencia, un efecto antidepresivo. Algunas drogas conocidas son isocarboxazida y tranilcipromina (Fig. 3).

Figura 3: Estructuras químicas de isocarboxazida y tranilcipromina



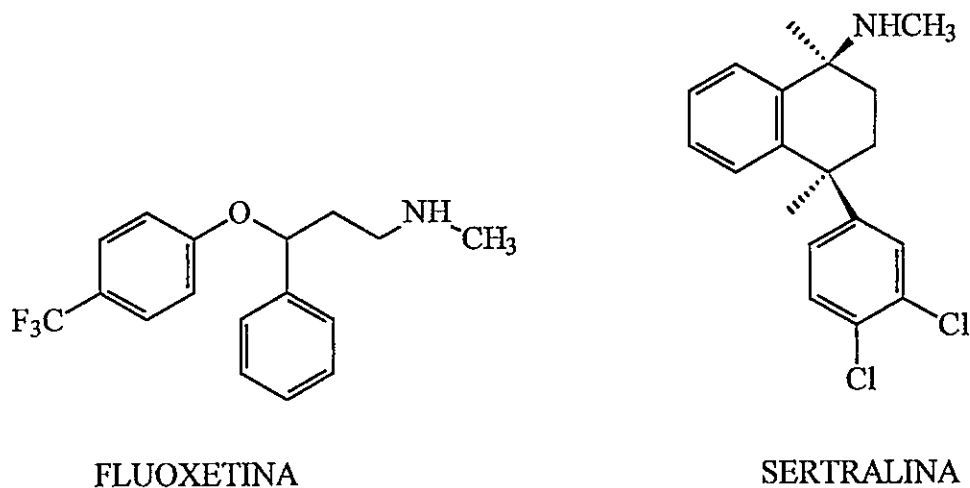
ISOCARBOXAZIDA



TRANILCIPROMINA

c) Por último, los inhibidores de la recaptación de serotonina (IRS) que selectivamente bloquean el sistema de recaptación de este neurotransmisor (Baldessarini, 1980, 1980, Nieforth, 1981, Green y Dawkins, 1997). Aquí se pueden mencionar como ejemplos representativos de drogas con este mecanismo de acción la fluoxetina (Prozac) y la sertralina cuyas estructuras se muestran en la Figura 4.

Figura 4: Estructuras químicas de fluoxetina y sertralina



Por tanto, la mayoría de los antidepresivos actualmente en uso actúan, aunque en diferentes grados, modificando los niveles extracelulares de algunos neurotransmisores que están involucrados directa o indirectamente con la enfermedad, y en particular, los niveles de serotonina.

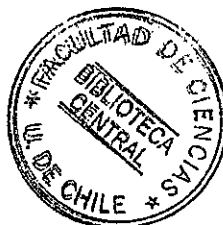
En general, los efectos secundarios indeseados y el retardo en el inicio de la acción terapéutica en el tratamiento con fármacos antidepresivos hacen que se mantenga abierto este campo para la investigación de nuevas moléculas bioactivas. Visto que el

incremento de la neurotransmisión serotoninérgica se correlaciona muy bien con el efecto antidepressivo, es de mucho interés estudiar un nuevo grupo de moléculas cuyo efecto es el de aumentar los niveles de serotonina libre a una escala mucho mayor que los IRS. Estas moléculas están clasificadas, de acuerdo a su mecanismo de acción, como liberadores selectivos de serotonina.

Inhibidores de enzimas

La inhibición de enzimas representa una de las estrategias más frecuentes en el diseño de drogas y casi un tercio de las drogas más importantes en uso actualmente son inhibidores de enzimas. La inhibición de una reacción catalizada por una enzima permite la modulación selectiva de una variedad de procesos bioquímicos tales como crecimiento y división celular, o la interrupción de una ruta metabólica, bloqueando la formación de un metabolito indeseado. La inhibición de enzimas es complementaria a la modulación de receptores mediante antagonistas y en algunos casos puede ser usada para potenciar la actividad biológica de una especie química deseada, inhibiendo su degradación.

Los inhibidores de enzimas caen en dos categorías principales: reversibles, los cuales usualmente se unen a la enzima a través de enlaces no covalentes o fuerzas covalentes débiles y pueden ser separados de la enzima por dilución, filtración en gel o diálisis, e irreversibles, que forman uniones covalentes fuertes con la enzima y no son removidos por los métodos mencionados anteriormente y cuyo grado de inhibición es dependiente del tiempo (Roberts, 1994).



Monoaminoxidasa

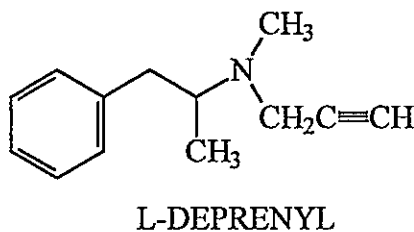
La monoaminoxidasa (EC 1.4.3.4, amina:O₂ oxidoreductasa, MAO), cataliza la desaminación oxidativa de una variedad de monoaminas, tales como catecolaminas y serotonina. Esta enzima existe en dos isoformas diferentes (MAO-A y -B) que son distinguibles por su selectividad hacia substratos, sensibilidad inhibitoria y secuencia de aminoácidos (Johnston, 1968; Murphy, 1978; Bach y col., 1988).

Inhibidores de monoaminoxidasa (IMAO) no selectivos e irreversibles se han usado como drogas antidepresivas desde los inicios de la farmacoterapia de la depresión hacia 1960. Sin embargo, efectos laterales indeseados tales como insomnio, irritabilidad, hipotensión, mareos, retención urinaria, constipación, impotencia y crisis hipertensivas (efecto queso) después de la ingesta de alimentos ricos en tiramina, han limitado su uso (Youdim, 1983; Murphy y col., 1987; Shulman, 1994). Un mayor entendimiento de las diferentes actividades de las dos isoformas enzimáticas ha conducido al desarrollo de una nueva generación de antidepresivos, basado en la inhibición selectiva y reversible de la MAO-A. Esta clase de compuestos tienen actividad antidepresiva y parecen interactuar solo débilmente con la tiramina de los alimentos (Möller y Paykel, 1992; Waldmeier y col., 1994; Bieck y Antonin, 1994). En casos de pacientes deprimidos con disfunción sexual, moclobemida, un inhibidor de MAO-A, reportó efectos adversos con una frecuencia diez veces menor que inhibidores de recaptación de serotonina (Philips y col., 2000). Algunos IMAO disminuyen la autoadministración de etanol en ratas, sugiriendo otro posible uso terapéutico de este tipo de compuestos (Cohen y col., 1999).

Por otra parte, inhibidores de MAO-B, en particular, L-deprenil ejercen efectos protectores del efecto tóxico producido por el péptido β -amiloide tanto en tejidos

vasculares como neuronales y esto hace posible posteriores consideraciones en el tratamiento de enfermedades vasculares y neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, como las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer (Thomas, 2000).

Figura 5: Estructura química de L-deprenyl

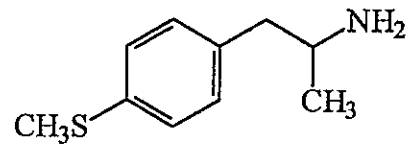


Varias fenilisopropilaminas, incluyendo la anfetamina, han sido evaluadas como IMAO (Mantle y col., 1976). Generalmente, los sustituyentes en el anillo aromático de la molécula (en particular en la posición *para*), tales como amino (Florvall y col., 1978; Florvall y col., 1986; Reyes-Parada y col., 1994), halógenos (Fuller y Hemrick-Luecke, 1982), hidroxilos (Arai y col., 1990), y grupos metoxilos (Green y El Hait, 1980; Kumar y col., 1983), conducen a un aumento de la potencia y selectividad hacia la MAO-A.

Los derivados alquiltio substituidos en la posición *para* de las fenilisopropilaminas producen mayores incrementos de la actividad IMAO-A que los grupos funcionales mencionados anteriormente (Scorza y col., 1997). Sin embargo, no existe información consistente sobre como la *N*-alquilación de fenilisopropilaminas puede modificar la potencia y selectividad de estas moléculas.

Liberación de serotonina

Varios años atrás, (\pm)-4-metiltioanfetamina o 1-(4-metiltiofenil)-2-aminopropano (MTA) mostró ser un potente y selectivo liberador de serotonina (5-HT) que no presenta neurotoxicidad en ensayos *in vitro* (Huang y col., 1992). Este hecho abre la posibilidad de hacer nuevas investigaciones dentro del campo de los liberadores de serotonina y sus posibles aplicaciones como antidepresivos. Por otra parte, estudios de microdiálisis en ratas anestesiadas mostraron que MTA produce un rápido y persistente aumento de la liberación basal de 5-HT en el hipocampo y además es un potente y selectivo inhibidor reversible de MAO-A (Scorza y col., 1997). Esto sugiere que MTA podría conducir al desarrollo de nuevos antidepresivos de rápida acción (Scorza y col., 1999). Otra publicación sobre MTA demostró aumentos de la secreción de las hormonas ACTH, corticosterona, prolactina y renina, presumiblemente producida, en parte al menos, por estimulación de la neurotransmisión serotoninérgica (Li y col., 1996). Se ha reportado también que MTA revierte el déficit en el comportamiento de recompensa en ratas sometidas a stress (Marona-Lewincka y Nichols, 1997) y como droga de abuso (De Boer y col., 1999). Todos estos resultados, sin embargo, fueron obtenidos con MTA racémico y no se conocen estudios de relaciones entre estructura y actividad de derivados de MTA. Por lo tanto, se consideró de interés hacer una evaluación preliminar del efecto de la alquilación sobre el nitrógeno de MTA y de la estereoquímica de esta droga sobre las actividades farmacológicas de esta serie de compuestos.

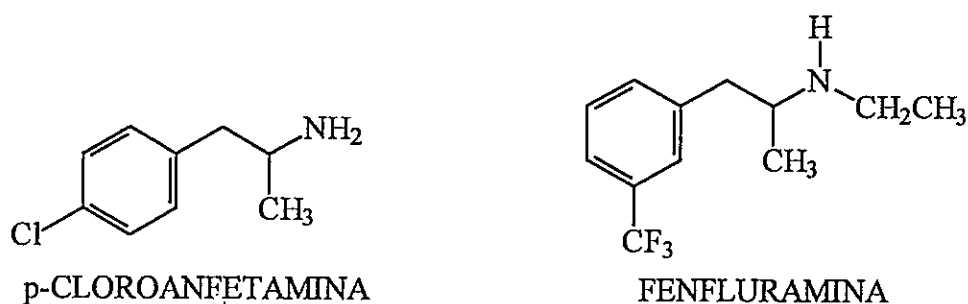


4-metiltioanfetamina (MTA)

Neurotoxicidad

La *p*-cloroanfetamina y otras fenilisopropilaminas halogenadas promueven la liberación de 5-HT desde neuronas. La rápida liberación de 5-HT es seguida por un vaciamiento selectivo de este neurotransmisor en el cerebro. La Fenfluramina, una *N*-etilfenilisopropilamina sustituida con un grupo trifluorometilo en el anillo aromático, es un anorexígeno usado clínicamente. Esta droga es capaz de producir un agotamiento de serotonina de larga duración y además una pérdida de proteínas selectivamente localizadas en neuronas serotoninérgicas, sugiriendo que algunos derivados de anfetamina tienen un efecto neurotóxico, pese a lo cual no se han encontrado señales neuroanatómicas claras de muerte neuronal (Sanders-Bush, 1996).

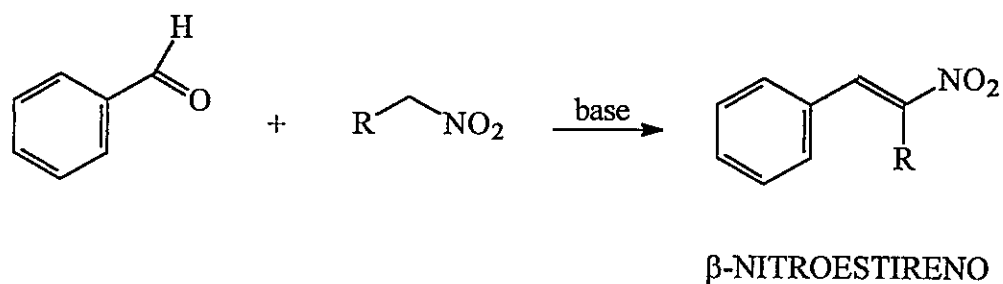
La liberación no vesicular de dopamina juega un rol importante en la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por drogas, de compuestos de la familia de las anfetaminas. MTA ha mostrado ser relativamente inerte como agente catecolaminérgico y por tanto no debe ser neurotóxico (Huang y col., 1992). Es importante confirmar estos resultados para MTA utilizando un diseño experimental distinto como es, células dopaminérgicas de cultivo y además evaluar algunos derivados *N*-alquilados de MTA.



Síntesis química

Desde el punto de vista de la síntesis, ya en 1898 el químico alemán Knoevenagel describía un procedimiento para la condensación de aldehídos y cetonas que usualmente no contenían un hidrógeno α con compuestos de la forma $Z\text{-CH}_2\text{-Z}'$ o $Z\text{-CHR-Z}'$ donde Z y Z' pueden ser CHO , COR , COOH , CN , NO_2 , etc., usando una base como catalizador. Si la base es suficientemente fuerte, la reacción puede ser usada en compuestos que poseen sólo un grupo Z como CH_3Z o RCH_2Z (March, 1992). Si Z es NO_2 el producto es un β -nitroestireno.

Figura 6: Reacción para la obtención de β -nitroestirenos



Posteriormente, esta metodología ha sido la más utilizada para la síntesis de distintos nitroestirenos precursores de feniletilaminas. La reducción de nitrocompuestos se puede realizar por varios procedimientos, entre los cuales los más comunes utilizan metales como Zn, Sn o Fe en medio ácido, hidrogenación catalítica o por algunos hidruros metálicos como NaBH_4 en medios catalizados. Sin embargo, la reducción de nitroestirenos con metales en medio ácido conduce generalmente a oximas o a las cetonas correspondientes y la hidrogenación catalítica suele llevar a nitroalcanos relativamente difíciles de reducir. En 1948, Brown describió la reducción de un importante número de compuestos orgánicos con hidruro de litio y aluminio, entre los cuales se encuentran los nitroestirenos (Nystrom y Brown, 1948).

Dado el interés por obtener derivados de MTA con grupos alquilo unidos al nitrógeno, se sintetizaron derivados mono- y di-*N*-alquilados con substituyentes de 1, 2 y 3 átomos de carbono. Los métodos propuestos aquí para la síntesis de derivados *N*-alquilados son indirectos, es decir, por formación inicial de amidas o carbamatos como productos de acilación de aminas con anhídridos o ésteres de ácidos carboxílicos o haloformiatos respectivamente. Estos intermediarios se reducen posteriormente con un reductor fuerte como el hidruro de litio y aluminio (March, 1992; Shulgin y Shulgin, 1991). Existe una alternativa adicional para la preparación de los derivados *N*-alquilados de MTA que utiliza los métodos clásicos de alquilación directa de aminas con halogenuros o sulfatos de alquilo.

Resolución enantiomérica

Un aspecto de gran interés es la diferencia en la respuesta biológica que usualmente muestran los organismos vivos frente a moléculas estereoisoméricas. Frecuentemente, un enantiómero de un fármaco (llamado "eutómero" por Ariëns) produce el efecto deseado, mientras que otro (el "distómero") puede ser inactivo o incluso producir un efecto indeseado. Estas grandes diferencias posibles en la actividad entre estereoisómeros establecen la necesidad de evaluar muy exactamente el comportamiento de cada una de estas moléculas en el campo de la investigación farmacológica y han conducido al imperativo legal de hacerlo como parte del desarrollo de nuevas entidades terapéuticas. Más específicamente, las diferencias en las propiedades fisiológicas entre enantiómeros, en muchos casos, no han sido estudiadas adecuadamente debido a las dificultades que presenta la obtención de ambas formas en estado estereoquímicamente puro (Ahuya, 1991).

Una mezcla de enantiómeros que no presenta actividad óptica, debido a que está constituida por cantidades iguales de ambos, se denomina una *modificación racémica*, pudiéndose encontrar mezclas racémicas, compuestos racémicos y soluciones sólidas racémicas dependiendo de la afinidad que tengan los enantiómeros para formar pares en el cristal con moléculas del mismo tipo o de configuración opuesta (Eliel, 1962). Como los procesos de síntesis habituales, son no estereoselectivos y por lo mismo más económicos, conducen a la obtención de productos racémicos, la separación de una modificación racémica en sus componentes enantioméricos puros es de vital importancia y se denomina *resolución* (Garbarino, 1984). La resolución de modificaciones racémicas normalmente es un procedimiento difícil de realizar y cuyos resultados no siempre son

exitosos. La razón de esto no está clara y muchos investigadores continúan viendo la resolución como un arte (Wilén y col., 1977).

Los métodos más importantes para la resolución de compuestos ópticamente activos son:

- 1.- Resolución por cristalización espontánea
- 2.- Activación óptica enzimática
- 3.- Resolución cinética
- 4.- Resolución por formación de diastereómeros.

La conversión de mezclas de enantiómeros a diastereómeros por reacción con reactivos homogéneamente quirales u homoquirales constituye el principal método de resolución práctica y por tanto es el método que se propuso para esta tesis.

Diastereómeros se definen como estereoisómeros que no presentan una relación de imagen especular entre ellos. Estos difieren en sus propiedades físicas y en su reactividad química, teniendo generalmente diferentes puntos de ebullición, de fusión, características de solubilidad y cromatográficas; inclusive su rotación óptica puede diferir normalmente tanto en signo como en magnitud.

Las reacciones ácido-base para la formación de sales diastereoméricas constituyen un método comúnmente utilizado y cuyo éxito depende de las diferencias de la solubilidad de las sales formadas. Por su parte, se puede producir diastereómeros por formación de compuestos covalentes como amidas o ésteres, en cuyo caso, la separación puede hacerse por métodos cromatográficos (Wilén y col., 1977).

Existen varias características deseables para el éxito de la resolución, entre las cuales se puede mencionar la estabilidad del agente de resolución, reacción rápida y

completa en condiciones suaves y no destructivas tanto para el sustrato como para el agente de resolución, fácil aislamiento de la mezcla de productos, separación completa de la mezcla diastereomérica resultante, completa reacción reversa para obtener los compuestos ópticamente activos en condiciones de mínima racemización, etc.

Por otra parte, la pureza óptica del agente de resolución determina directamente el máximo de pureza óptica que se puede alcanzar para un sustrato en una resolución (Allinger y Eliel, 1971). Existen varios criterios simples de pureza óptica pero ninguno es completamente seguro. Por ejemplo, un diastereómero o un enantiómero cristalino es considerado ópticamente puro cuando su punto de fusión y su rotación óptica no varían con posteriores recristalizaciones. Por su parte, la resolución es considerada completa cuando ambos enantiómeros presentan rotación específica igual en magnitud y de signo opuesto. Hay otras maneras descritas para la determinación de la pureza óptica, como son los métodos enzimáticos, isotópicos y de correlación química con otros compuestos de pureza óptica conocida (Eliel, 1962). Adicionalmente se ha desarrollado un método para la determinación del exceso enantiomérico por medio de la preparación de amidas de Mosher y el análisis de la no equivalencia de señales de $^1\text{H-RMN}$ y $^{19}\text{F-RMN}$ (Hoye y Renner, 1996)

Algunos autores piensan que es conveniente el uso de ácidos o bases relativamente fuertes para la resolución por formación de sales diastereoméricas ya que cuando son débiles pueden conducir a la formación incompleta de la sal. Además se cree que aquellos reactivos de resolución que contienen varios grupos polares o anillos aromáticos presentan buenas características para la formación de sales diastereoméricas separables con un número importante de compuestos racémicos debido a que estos

grupos permiten la interacción a través de varios puntos en la molécula, diferente para uno y otro enantiómero.

La elección tanto del solvente como del agente de resolución son sin duda claves en el éxito de la separación. Sin embargo, no existen criterios que permitan predecir cuales de ellos usar, de manera que se recomienda contar con un número importante de agentes de resolución (Wilén y col., 1977).

Considerando el marco teórico expuesto previamente, se plantearon primero algunos objetivos químicos y asociados a éstos los objetivos farmacológicos. Desde el punto de vista de la química, se propuso mejorar el rendimiento de la síntesis de (\pm)-MTA, realizar la preparación de las series mono- y di-alquiladas correspondientes *N*-metil, *N*-etil y *N*-alil, así como la de su homólogo superior 1-(4-metiltiofenil)-2-butilamina (MTAB). Por otra parte se propuso la separación de los enantiómeros de MTA por formación de sales diastereoméricas.

Desde la farmacología se propuso la evaluación de todas las moléculas como inhibidores de monoaminoxidasa y además la determinación de la neurotoxicidad de una muestra representativa de las moléculas sobre células dopaminérgicas en cultivo.

Como es ya conocido, una pequeña modificación en la estructura de una molécula puede hacer variar considerablemente la farmacología de ésta. Se espera por tanto, que los homólogos superiores de MTA [(\pm)-1-(4-metiltiofenil)-2-aminobutano, *N*-metil-, *N*-etil-o *N*-alil-MTA] cambien su actividad como inhibidores de MAO permitiéndonos conocer un poco mejor los parámetros estructurales que gobiernan la

interacción de la molécula con el sistema biológico en estudio. Hasta ahora, no existe información sistemática respecto de relaciones estructura-actividad IMAO para feniletilaminas *N*-alquiladas, sin embargo los antecedentes publicados sugieren que la *N*-alquilación disminuye la actividad. (Suzuki y col. 1980; Florvall y col. 1983; Robinson, 1985; Leonardi y Azmitia, 1994). En general, se puede decir que la actividad biológica disminuye con la *N*-alquilación, aunque las magnitudes de este efecto son variables para cada tipo de actividad, como liberación de serotonina, actividad alucinógena, inhibición de recaptación de monoaminas, etc. Este efecto variable depende del largo de la cadena alquílica. (Nichols, 1994).

Finalmente, la evaluación de los enantiómeros de MTA como IMAO debería arrojar luz sobre los requerimientos estéricos de la enzima para ser inhibida y se espera que el enantiómero (+)-MTA sea mas potente como IMAO. (Suzuki y col., 1980, Ask y col., 1985; Lane y Baker, 1999; Ulus y col., 2000)

MATERIALES Y MÉTODOS

Los puntos de fusión fueron determinados en una platina microscópica de Kofler Reichert-Jung Galen III. La rotación óptica fue determinada con un polarímetro electrónico Schmidt-Haensch Polartronic. Los espectros de RMN fueron registrados en CDCl_3 para las bases libres y en D_2O para los clorhidratos usando un instrumento Bruker AMX 300, operando a 300.13 MHz (^1H). Los corrimientos químicos son reportados en valores de δ . Los microanálisis elementales fueron realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Todos los productos químicos fueron usados del grado comercial para síntesis, salvo tetrahidrofurano (THF) y acetonitrilo (ACN) que eran de calidad para HPLC de Merck, y las excepciones señaladas en el texto. Los metabolitos de monoaminas, aldehído deshidrogenasa de levadura (AldDH) y β -nicotinamida-adenina dinucleótido (β -NAD) eran de Sigma (St. Louis, Mo., USA). Dimetilamino feniletilamina (DMAPAA) era de Aldrich (Milwaukee, Wi., USA).

QUÍMICA

-Resolución Enantiomérica

En los ensayos preliminares se utilizaron varios agentes de resolución ácidos (ARA). El único que arrojó buenos resultados fue el ácido (+)-*O,O'*-di-*p*-toluilitartárico. Se preparó una solución de 3.13 g (17.3 mmol) de (±)-MTA en un volumen mínimo de *i*-PrOH p.a. (10-15 ml). Aparte se preparó una solución de 6.7 g (17.3 mmol) de ácido (+)-*O,O'*-di-*p*-toluilitartárico en un volumen mínimo de *i*-PrOH p.a. (10-15 ml). Se agregó gota a gota la solución del ARA sobre la solución agitada de la base a resolver. Se mantuvo agitando por un período de tiempo de aproximadamente 5 minutos para asegurar una precipitación pareja. Se filtró la sal formada y se dejó secar por un período de 48 h dentro de un desecador al vacío y sobre H₂SO₄ y luego 2 h en una estufa a 66 °C. Así se obtuvo 7.17 g (73%) de una mezcla de (+)(+) y (+)(-)-*O,O'*-di-*p*-toluilitartrato de MTA. Esta mezcla se disolvió en MeOH p.a. a ebullición a una razón de 86.5 ml por gramo de sal, se dejó enfriar lentamente durante varias horas y luego se mantuvo a -20 °C durante un período de 14 días. Los cristales obtenidos se filtraron al vacío y se mantuvieron en desecador al vacío y sobre H₂SO₄ por 48 h, obteniéndose cristales blancos tipo agujas (1.45 g, 40%). Estos cristales enriquecidos en el enantiómero (+)-MTA se disolvieron en una solución de NaOH 2N y se extrajo con CHCl₃ (4 x 20 ml), lavando la fase clorofórmica varias veces con un pequeño volumen (10-20 ml) de una solución de Na₂CO₃ 10% para eliminar los restos de ácido y finalmente con agua destilada. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se eliminó el solvente en

evaporador rotatorio. Así se obtuvo 692 mg de la base libre enriquecida en (+)-MTA. Se midió la rotación específica de la base libre enriquecida en (+)-MTA. Para ello se preparó una solución de 251.7 mg de base en 5 ml de MeOH ($c = 5$). De esta manera se encontró un valor de $+ 24^\circ$.

Las aguas madres de la cristalización fueron evaporadas a sequedad y el sólido obtenido (5.72 g) fue hidrolizado siguiendo el mismo método antes descrito. La base enriquecida en el enantiómero (-)-MTA (1.33 g) fue utilizada para preparar la sal del ácido (-)-*O,O'*-di-*p*-toluilitartárico siguiendo el mismo procedimiento que para (+)-MTA. La razón volumen/masa utilizada en este caso fue 133 ml de MeOH por cada gramo de sal. Finalmente se obtuvo una sal cristalina (1.05 g, 32%). Estos cristales fueron hidrolizados como se describió previamente y así se obtuvo 513 mg de la base enriquecida en el enantiómero (-)-MTA. Para medir la rotación específica se pesó 253.4 mg de la base y se disolvió en 5 ml de MeOH. ($c = 5$). Se obtuvo un valor de $- 23.4^\circ$. Se prepararon los correspondientes clorhidratos de los enantiómeros enriquecidos, mezclando en cantidades equimolares el enantiómero disuelto en una mínima cantidad de *i*-PrOH p.a. y ácido clorhídrico concentrado. La posterior adición de Et₂O precipita la sal clorhídrica. Las sales fueron recristalizadas en *i*-PrOH p.a. obteniendo (+)-MTA·HCl (**23**) y (-)-MTA·HCl (**24**). Para medir los valores de rotación específica de cada una de las sales de los enantiómeros, se preparó una solución de la sal correspondiente pesando 100.0 mg de **24** en 5 ml de H₂O ($c = 2$), y 100.5 mg de **23** en 5 ml de H₂O ($c = 2$). Así se obtuvo valores de rotación específica de $- 22.0^\circ$ y $+ 21.5^\circ$ correspondientemente.

El exceso enantiomérico fue determinado preparando las amidas de Mosher de la mezcla racémica, y de los enantiómeros enriquecidos y registrando los espectros de ^1H -RMN en CDCl_3 .

En un tubo de ensayo los reactivos fueron agregados en el siguiente orden: Piridina seca (300 μl , 300 mg); (R)-(-)-MTPA-Cl (35 mg, 26 μl , 0.14 mmol); tetracloruro de carbono (300 μl) y la amina (0.10 mmol). La reacción fue agitada manualmente hasta completar la reacción, cuya evidencia es la no formación de precipitado de clorhidrato de piridina (la reacción de completa rápidamente). Luego se adiciona un exceso de 3-dimetil-amino-1-propilamina (20 mg, 0.2 mmol, 24 μl) y la mezcla se mantiene en reposo por 5 minutos, luego se diluye con eter, lavando con soluciones de HCl diluido, Na_2CO_3 saturada y NaCl saturada y finalmente se seca con MgSO_4 . El solvente es evaporado a sequedad y secado en desecadora por una horas antes de registrar el espectro.

-Síntesis**1-(4-Metiltiofenil)-2-nitropropeno (2)**

Una mezcla de 10 ml (0,075 mol) de 4-metiltiobenzaldehído (1), 6 g (0.081 mol) de acetato de amonio anhidro, 55 ml (0.75 mol) de nitroetano y 100 ml de tolueno fueron calentados a temperatura de reflujo durante 24 h en un aparato de Dean-Stark. Se redujo el volumen de la mezcla a aproximadamente 70 ml y se enfrió a -20°C . Los cristales amarillos del nitropropeno (2, 8.45 g, 54 %) fueron filtrados, las aguas madres concentradas a presión reducida y el residuo amarillo-naranja se diluyó en 80 ml de MeOH caliente. Luego del enfriamiento a temperatura ambiente cristalizó otra fracción de nitropropeno (5.34 g, 34 %). Se removió el MeOH y el residuo fue purificado por columna cromatográfica de gel de sílice, eluyendo con CHCl_3 para recuperar la última fracción del producto sumando un total de 14.3 g (91 %). Se determinó el punto de fusión de los cristales, se registró el correspondiente espectro de ^1H -RMN y se asignó las señales, confirmando tanto la pureza como la estructura de la molécula.

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 2.46 (s, 3H, S- CH_3), 2.52 (s, 3H, CH=C- CH_3), 7.28/7.36 (sistema AA'BB', 4H, $J = 8.4$ Hz, Ar- H), 8.04 (s, 1H, Ar- $\text{CH}=\text{C}$). P.f = 73-74.5 $^{\circ}\text{C}$.

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-aminopropano (MTA) (3)

Se agregó gota a gota una solución de 13 g (0.062 mol) de 2 en 100 ml de THF seco a una suspensión agitada de 13 g (0.342 mol) de LiAlH_4 (LAH) en 200 ml de THF seco. La mezcla de reacción fue mantenida a reflujo durante 24 h y luego enfriada hasta

0 °C. La reacción fue terminada por adición lenta, con agitación, de 15 ml de agua, luego 13 ml de NaOH 40% y finalmente 45 ml de agua. La suspensión fue filtrada y el sólido lavado con 100 ml de THF. El solvente fue evaporado a presión reducida y el residuo, un aceite amarillo impuro fue destilado a presión reducida (150-155 °C, 0.1 mm Hg aprox.). Se obtuvo 10 g de un aceite incoloro (3). Se registró el correspondiente espectro de ^1H -RMN y se asignó las señales.

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 1.08 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz, CHCH_3), 2.44 (s, 3H, S- CH_3), 2.47 (dd, 1H, $J = 13.4$ Hz, $J' = 8.0$ Hz CH_2CH), 2.64 (dd, 1H, $J = 13.3$ Hz, $J' = 7.9$ Hz, CH_2CH), 3.11 (m, 1H, $J = 6.3$ Hz, CH_3CH), 7.08 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}), 7.19 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}).

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-aminopropano (clorhidrato) ($\text{MTA} \cdot \text{HCl}$) (4)

Se mezcló cantidades equimolares de ácido clorhídrico concentrado y de 3 disuelto en una mínima cantidad de *i*-PrOH. El clorhidrato así formado es precipitado por adición de Et_2O .

RMN- ^1H (D_2O) δ 1.22 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, CHCH_3), 2.42 (s, 3H, S- CH_3), 2.84 (d, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH_2CH), 3.55 (m, 1H, $J = 6.8$ Hz, CH_3CH), 7.19 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}), 7.36 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}).

IR (cm^{-1}) 2987, 2908, 2807 (estiramiento N-H, sal de amina primaria); 1607 (estiramiento C=C anillo aromático ó flexión N-H); 1492 (estiramiento C=C anillo aromático); 1083. (flexión C-H en el plano del anillo aromático); 795 (flexión C-H fuera del plano de anillo aromático 1,4 disustituido); 515 (estiramiento C-S).

P.f. = 190-192 °C. Análisis elemental calculado para $C_{11}H_{15}NS \cdot HCl$: C, 55.19; N, 6.44; H, 6.90; S, 14.72. Encontrado: C, 55.67; N, 6.69; H, 7.46; S, 13.08.

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-N-etoxicarbonilaminopropano (5)

A una solución de 1.76 g (9.7 mmol) de **3** en 30 ml de $CHCl_3$, se agregó 5 ml (52.4 mmol) de cloroformiato de etilo. La reacción fue mantenida a reflujo por varias horas y controlada por CCF. La eliminación del solvente permitió obtener 2.18 g (87 %) de un aceite incoloro **5**. Se registró el correspondiente espectro de 1H -RMN y se asignó las señales.

RMN- 1H ($CDCl_3$) δ 1.10 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, $CHCH_3$), 1.21 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, $O-CH_2CH_3$), 2.48 (s, 3H, $S-CH_3$), 2.64 (dd, 1H, $J = 13.5$ Hz, $J' = 7.1$ Hz, CH_2CH), 2.80 (dd, 1H, $J = 13.5$ Hz, $J' = 5.6$ Hz, CH_2CH), 3.93 (m, 1H, CH_3CH), 4.08 (c, 2H, $J = 7.1$ Hz, $O-CH_2CH_3$), 4.52 (s ancho, 1H, N-H), 7.10 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar-H), 7.20 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar-H).

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(N-metil)-aminopropano (NMMTA) (6)

Una solución de 2.95 g de **5** (11.7 mmol) en 50 ml de Et_2O anhidro fue vertida gota a gota sobre una suspensión de 2.57 g (67.7 mmol) de $LiAlH_4$ en 150 ml de éter etílico anhidro. La mezcla de reacción fue mantenida a reflujo por 24 h. El exceso de $LiAlH_4$ fue destruido por adición de H_2SO_4 diluido (20 g en 500 ml de agua), hasta disolver completamente las sales de litio. La fase etérea se separó y la fase acuosa fue extraída con 70 ml de éter etílico y luego con 2 x 80 ml de CH_2Cl_2 . La mezcla fue

basificada hasta pH 9 con NaOH 40 % y extraída nuevamente con 3 x 150 ml de CH_2Cl_2 . Los extractos se juntaron, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el solvente a presión reducida. El aceite amarillento obtenido fue destilado a presión reducida (150-155 °C, 0.1 mm Hg aprox.), para obtener 1.54 g (68 %) de un aceite incoloro (6).

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 1.04 (d, 3H, $J = 6.1$ Hz, CHCH_3), 2.43 (s, 3H, N- CH_3), 2.47 (s, 3H, S- CH_3), 2.58 (dd, 1H, $J = 12.9$ Hz, $J' = 6.3$ Hz, CH_2CH), 2.68 (dd, 1H, $J = 13.2$ Hz, $J' = 6.8$ Hz, CH_2CH), 2.75 (m, 1H, $J = 6.4$ Hz, CH_3CH), 7.11 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}), 7.20 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}).

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(N-metilamino)-propano (clorhidrato) (NMMTA·HCl) (7)

Se mezcló cantidades equimolares de ácido clorhídrico concentrado y de 6 disuelto en una mínima cantidad de *i*-PrOH. El clorhidrato así formado es precipitado por adición de Et_2O .

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 1.22 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, CHCH_3), 2.46 (s, 3H, S- CH_3), 2.67 (s, 3H, N- CH_3), 2.82 (dd, 1H, $J = 13.8$ Hz, $J' = 6.3$ Hz, CH_2CH), 3.01 (dd, 1H, $J = 13.8$ Hz, $J' = 6.1$ Hz, CH_2CH), 3.47 (m, 1H, $J = 6.6$ Hz, CH_3CH), 7.22 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}), 7.30 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}).

IR (cm^{-1}): 2836, 2800, 2743, 2448, 1492, 1090, 795, 521.

P.f. = 169-171 °C. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NS}\cdot\text{HCl}$: C, 57.03; N, 6.04; H, 7.77; S, 13.85. Encontrado: C, 57.28; N, 6.85; H, 8.23; S, 15.20.

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(*N,N*-dimetilamino)-propano (DMMTA) (8)

A una solución de 0.2 g (0.11 mmol) de clorhidrato de (±)-1-(4-metiltiofenil)-2-aminopropano en 8 ml de metanol que contenía 2.4 ml de formaldehído 40 % se adicionó en pequeñas porciones 0.9 g (14.3 mmol) de cianoborohidruro de sodio. El pH fue controlado constantemente y mantenido en 6 por adición ocasional de HCl concentrado. Cuando el pH se estabilizó (aprox. 48 h), la mezcla de reacción fue vertida sobre 70 ml de H₂O y basificada por adición de NaOH 40 %. La solución acuosa fue extraída con 3 x 20 ml CH₂Cl₂, los extractos juntados y extraídos con 3 x 20 ml de H₂SO₄ diluido. Los extractos ácidos fueron basificados y extraídos con CH₂Cl₂. El solvente fue evaporado a presión reducida para obtener 0.710 g de un aceite incoloro (8) (73 %).

RMN-¹H (CDCl₃) δ 1.00 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, CHCH₃), 2.43 (dd, 1H, *J* = 12.9 Hz, *J*' = 2.8 Hz, CH₂CH), 2.45 (s, 6H, N-(CH₃)₂), 2.47 (s, 3H, S-CH₃), 2.95 (m, 1H, CH₃CH), 3.10 (dd, 1H, *J* = 13.0 Hz, *J*' = 4.2 Hz, CH₂CH), 7.11 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 7.20 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-H).

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(*N,N*-dimetilamino)-propano(clorhidrato) (DMMTA·HCl) (9)

Se mezcló cantidades equimolares de ácido clorhídrico concentrado y de 8 disuelto en una mínima cantidad de *i*-PrOH. El clorhidrato así formado es precipitado por adición de Et₂O.

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 1.18 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, CHCH_3), 2.44 (s, 3H, S- CH_3), 2.75 (dd, 1H, parcialmente oculto bajo señal N-(CH_3) $_2$, CH_2CH), 2.80 (s, 6H, N-(CH_3) $_2$), 3.06 (dd, 1H, $J = 13.6$ Hz, $J' = 5.2$ Hz, CH_2CH), 3.61 (m, 1H, CH_3CH), 7.22 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}), 7.28 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}).

IR (cm^{-1}): 2642, 2520, 2477, 1600, 1492, 1090, 810; 522.

P.f. = 163-165 °C. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NS}\cdot\text{HCl}$: C, 58.63; N, 5.70; H, 7.81; S, 13.04. Encontrado: C, 58.53; N, 5.95; H, 8.21; S, 10.88.

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-acetamidopropano (AAMTA) (10)

A una solución de 1.0 g (5.52 mmol) de **3** en 5.2 ml de piridina, se le adicionó 0.68 g (6.7 mmol) de anhídrido acético y la mezcla fue mantenida a temperatura ambiente por 30 min, y luego vertida sobre 60 ml de H_2O y acidificada con HCl diluido. La fase acuosa se extrajo con 3 x 20 ml de CH_2Cl_2 , los extractos se juntaron y secaron con Na_2SO_4 anhidro. El solvente fue removido a presión reducida, para dar 1.10 g de un aceite incoloro (**10**) (89 %).

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 1.09 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, CHCH_3), 1.93 (s, 3H, COCH_3), 2.47 (s, 3H, S- CH_3), 2.67 (dd, 1H, $J = 13.5$ Hz, $J' = 7.2$ Hz CH_2CH), 2.79 (dd, 1H, $J = 13.6$ Hz, $J' = 5.7$ Hz, CH_2CH), 4.23 (m, 1H, $J = 6.9$ Hz, CH_3CH), 7.09 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}), 7.20 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}).

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(N-etilamino)-propano (NEMTA) (11)

A una suspensión agitada de 1.0 g (25.9 mmol) de LiAlH_4 en 80 ml de THF, se adicionó gota a gota una solución de 1.10 g (4.9 mmol) de **10** en 5 ml de THF. La mezcla de reacción fue mantenida a reflujo por 4 días. El exceso de LiAlH_4 fue destruido por adición cuidadosa de 1 ml de H_2O , seguido de 1 ml de NaOH 40 % y 3 ml adicionales de H_2O . El solvente fue removido en un evaporador rotatorio a presión reducida para obtener un aceite café claro. Este producto fue destilado a presión reducida (180 °C, 0.1 mm Hg aprox.) produciendo 0.75 g de un aceite incoloro (**11**) (73%).

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 1.06 (d y t no resueltos, 6H, CHCH_3 y $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$), 2.46 (s, 3H, S-CH_3), 2.58 (m complejo, 2H de $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$ y 1H de CH_2CH), 2.71 (m complejo, 2H de $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$ y 1H de CH_2CH), 2.89 (m, 1H, $J = 6.4$ Hz, CH_3CH), 7.10 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar-H), 7.20 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar-H).

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(N-etilamino)-propano (clorohidrato) (NEMTA · HCl) (12)

Se mezcló cantidades equimolares de ácido clorhídrico concentrado y de **11** disuelto en una mínima cantidad de *i*-PrOH. El clorohidrato así formado es precipitado por adición de Et_2O .

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 1.2 (d y t no resueltos, 6H, CHCH_3 y $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$), 2.44 (s, 3H, S-CH_3), 2.74 (dd, 1H, $J = 13.5$ Hz, $J' = 8.9$ Hz, CH_2CH), 3.08 (m complejo, 2H de $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$ y 1H de CH_2CH), 3.48 (m, 1H, $J = 6.4$ Hz, CH_3CH), 7.20 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar-H), 7.28 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar-H).

IR (cm^{-1}): 2843, 2793, 2714, 2469, 1579, 1492, 1083; 522.

P.f. = 184-187 °C. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NS}\cdot\text{HCl}$: C, 58.66; N, 5.70;

H, 8.14; S, 13.07. Encontrado: C, 57.44; N, 6.02; H, 8.10; S, 12.06.

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(*N,N*-dietilamino)-propano (DEMTA) (13)

A 1.0 g de tamices moleculares en 15 ml de DMF se adicionó 0.25 g (4.5 mmol) de KOH y la suspensión fue agitada vigorosamente durante 10 min. Luego se agregó 0.81 g (4.5 mmol) de **3** y se mantuvo agitando por 30 min adicionales. Finalmente se agregó 1.0 ml de yoduro de etilo (7.7 mmol). La mezcla de reacción fue mantenida a temperatura ambiente durante 24 h. El sólido se filtró y lavó con EtOAc. El solvente fue removido y al residuo se le adicionó 40 ml de NaOH 2 N y se extrajo con 4 x 20 ml de EtOAc. Los extractos fueron lavados con una solución saturada de NaCl y secados con Na_2SO_4 anhidro. El solvente fue removido a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3(\text{aq})$ (90/9/1) para obtener 0.372 g de **13** (35 %).

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 0.91 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, CHCH_3), 1.05 (t, 6H, $J = 7.1$ Hz, $\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.35 (dd, 1H, $J = 12.9$ Hz, $J' = 9.4$ Hz, CH_2CH), 2.46 (s, 3H, S- CH_3), 2.54 (m, 4H, $\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.88 (dd, 1H, $J = 12.7$ Hz, $J' = 4.2$ Hz, CH_2CH), 2.98 (m, 1H, $J = 6.5$ Hz, CH_3CH), 7.09 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- H), 7.19 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- H).

(±)-1-(4-Metiltiofenil)- 2-(*N,N*-dietilamino)-propano (bromhidrato) (DEMTA·HBr)
(14)

Se mezcló cantidades equimolares de ácido bromhídrico concentrado y de **13** disuelto en una mínima cantidad de *i*-PrOH. El bromhidrato así formado es precipitado por adición de Et₂O.

RMN-¹H (CDCl₃) δ 1.19 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz, CHCH₃), 1.29 (t, 6H, *J* = 5.7 Hz, N-(CH₂CH₃)₂), 2.45 (s, 3H, S-CH₃), 2.81 (dd, 1H, *J* = 13.4 Hz, *J'* = 9.8 Hz, CH₂CH), 3.08 (dd, 1H, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 5.0 Hz, CH₂CH), 3.24 (m, 4H, N-(CH₂CH₃)₂), 3.72 (m, 1H, *J* = 6.3 Hz, CH₃CH), 7.24 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 7.32 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-H).

IR (cm⁻¹): 2635, 2498, 1593, 1492, 1090, 810, 522.

P.f. = 149-151 °C. Análisis elemental calculado para C₁₄H₂₃NS·HBr: C, 52.85; N, 4.40; H, 7.23; S, 10.06. Encontrado: C, 53.24; N, 4.56; H, 7.66; S, 10.87.

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(*N*-alilamino)-propano (NAMTA) (15) y (±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(*N,N*-dialilamino)-propano (DAMTA) (16)

A 0.3 g de tamicés moleculares en 6 ml de DMF se adicionó 0.062 g (1.1 mmol) de KOH y la suspensión fue agitada vigorosamente durante 10 min. Luego se agregó 0.2 g (1.1 mmol) de **3** y se mantuvo agitando por 30 min adicionales. Finalmente se agregó 0.3 ml de bromuro de alilo. La mezcla de reacción fue mantenida a temperatura ambiente durante 24 h. El sólido se filtró y lavó con EtOAc y el solvente fue removido hasta volumen mínimo. Al residuo se le adicionó 40 ml de NaOH 2 N y se extrajo con 4 x 20 ml de EtOAc. Los extractos fueron lavados con una solución saturada de NaCl y

secados con Na_2SO_4 anhidro. El solvente fue removido a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente EtOAc/EtOH 9:1, para obtener 0.061 g de **15** (25 %) y 0.141 g de **16** (49 %).

(15)

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 1.06 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz, CHCH_3), 2.47 (s, 3H, S- CH_3), 2.59 (dd, 1H, $J = 13.4$ Hz, $J' = 6.9$ Hz, CH_2CH), 2.76 (dd, 1H, $J = 13.4$ Hz, $J' = 6.5$ Hz, CH_2CH), 2.95 (m, 1H, $J = 6.5$ Hz, CH_3CH), 3.23 (dd, 2H, $J = 13.9$ Hz, $J' = 5.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.34 (dd, 2H, $J = 13.9$ Hz, $J' = 5.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.09 (dd, 1H, $J = 13.8$ Hz, $J' = 1.2$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$, *cis*), 5.15 (dd, 1H, $J = 17.2$ Hz, $J' = 1.5$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$, *trans*), 5.86 (ddt, 1H, $J = 22.9$ Hz, $J' = 16.5$ Hz, $J'' = 6.0$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.11 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}), 7.20 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}).

(16)

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 0.92 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, CHCH_3), 2.36 (dd, 1H, $J = 13.1$ Hz, $J' = 9.0$ Hz, CH_2CH), 2.46 (s, 3H, S- CH_3), 2.87 (dd, 1H, $J = 13.1$ Hz, $J' = 5.1$ Hz, CH_2CH), 3.09 (m complejo, 1H de CH_3CH y 4H de $(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)_2$), 5.08 (d, 2H, $J = 10.0$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$, *cis*), 5.16 (dd, 2H, $J = 17.2$ Hz, $J' = 5.2$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$, *trans*), 5.84 (ddt, 2H, $J = 23.2$ Hz, $J' = 16.4$ Hz, $J'' = 6.2$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.06 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}), 7.17 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar- \underline{H}).

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(*N*-alilamino)-propano (clorhidrato) (NAMTA · HCl) (17)

Se mezcló cantidades equimolares de ácido clorhídrico concentrado y de **15** disuelto en una mínima cantidad de *i*-PrOH. El clorhidrato así formado es precipitado por adición de Et₂O.

RMN-¹H (CDCl₃) δ 1.22 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, CHCH₃), 2.46 (s, 3H, S-CH₃), 2.78 (dd, 1H, *J* = 13.8 Hz, *J'* = 8.7 Hz, CH₂CH), 3.07 (dd, 1H, *J* = 13.8 Hz, *J'* = 5.6 Hz, CH₂CH), 3.54 (dd, 2H, *J* = 14.0 Hz, *J'* = 6.3 Hz, CH₂CH=CH₂), 3.66 (m, 1H de CH₃CH y 1H de CH₂CH=CH₂), 5.43 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, CH=CH₂, *cis*), 5.48 (d, 1H, *J* = 10.1 Hz, CH=CH₂, *trans*), 5.85 (ddt, 1H, *J* = 23.8 Hz, *J'* = 17.0 Hz, *J''* = 6.7 Hz CH=CH₂), 7.22 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-H).

IR (cm⁻¹): 2879, 2793, 2735, 2412, 1571, 1492, 1090, 795, 515

P.f. = 171-173 °C. Análisis elemental calculado para C₁₁H₁₉NS·HCl: C, 60.59; N, 5.44; H, 7.38; S, 12.43. Encontrado: C, 60.91; N, 5.62; H, 7.70; S, 11.66.

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(*N,N*-dialilamino)-propano (clorhidrato) (DAMTA · HCl) (18)

Se mezcló cantidades equimolares de ácido clorhídrico concentrado y de **16** disuelto en una mínima cantidad de *i*-PrOH. El clorhidrato así formado es precipitado por adición de Et₂O.

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.25 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, CHCH₃), 2.46 (s, 3H, S-CH₃), 2.81 (dd, 1H, *J* = 13.3 Hz, *J'* = 10.0 Hz, CH₂CH), 3.11 (dd, 1H, *J* = 13.5 Hz, *J'* = 4.7 Hz, CH₂CH), 3.76 (m complejo, 1H de CH₃CH y 4H de (CH₂CH=CH₂)₂), 5.58 (m mal

resuelto, 2H, CH=CH₂, cis), 5.58 (m mal resuelto, 2H, CH=CH₂, trans), 5.58 (m mal resuelto, 2H, CH=CH₂), 7.20 (d, 2H, , $J = 8.2$ Hz, Ar-H), 7.28 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar-H).

IR (cm⁻¹): 2876, 2614, 2522, 2440, 1492, 1440, 1122, 969, 946, 791, 522.

P.f. = 136-138 °C. Análisis elemental calculado para C₁₁H₂₃NS·HCl: C, 64.55; N, 4.71; H, 7.73; S, 10.76. Encontrado: C, 64.59; N, 4.84; H, 8.03; S, 11.31.

(E)-1-(4-Metiltiofenil)-2-nitrobuteno (19) y (Z)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno (20)

Una mezcla de 1.3 ml (0,010 mol) de 4-metiltiobenzaldehído, 1.3 ml (0.010 mol) de *N,N*-dimetiletilendiamina, 4.5 ml (0.041 mol) de nitropropano y 10 ml de tolueno fue calentada a temperatura de reflujo durante 24 h en un aparato de Dean-Stark. Se redujo el volumen de la mezcla a sequedad y se intentó cristalizar el producto en MeOH, AcOH, acetona, EtOAc, C₆H₆ y MeCN, sin éxito alguno. La mezcla de productos (1.17 g) se fraccionó por cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con CHCl₃ para obtener el isómero *E* (19, 1.08 g, 91% en la mezcla) y el *Z* (20, 0.096 g, 9% en la mezcla (rendimiento global 54%). Se registró el correspondiente espectro de ¹H-RMN y se asignó las señales.

(19)

RMN-¹H (CDCl₃) δ 1.28 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH₂CH₃), 2.52 (s, 3H, S-CH₃), 2.88 (c, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH₃CH₂C=CH), 7.29 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, H3' y H5'), 7.36 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, H2' y H6'), 7.98 (s, 1H, Ar-CH=C).

HRMS m/z (M⁺) = 223.06621; calc. para C₁₁H₁₃NO₂S = 223.06670.

(20)

RMN-¹H (CDCl₃) δ 1.20 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH₂CH₃), 2.46 (s, 3H, S-CH₃), 2.67 (c, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH₃CH₂C=CH), 6.29 (s, 1H, Ar-CH=C), 7.16 (s aparente, 4H, $J = 9.2$ Hz, Ar-H).

HRMS m/z (M⁺) = 223.06622; calc. para C₁₁H₁₃NO₂S = 223.06670.

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-aminobutano (MTAB) (21)

Se agregó gota a gota una solución de 2.33 g (10.4 mmol) de mezcla de 19 y 20 en 20 ml de THF seco a una suspensión agitada de 2.21 g (58.4 mmol) de LiAlH₄ en 80 ml de THF. La mezcla de reacción fue mantenida a reflujo durante 24 h y luego fue enfriada hasta 0 °C. La reacción fue terminada por adición gota a gota de 2.5 ml de agua, luego 2 ml de NaOH 40 % y finalmente 8 ml de agua. La suspensión fue filtrada y el sólido lavado con 50 ml THF. El solvente fue evaporado a presión reducida para obtener un aceite amarillo que fue destilado a presión reducida (155-160 °C, 0.1 mm Hg aprox.) para obtener 1.82 g de un aceite incoloro (21) (90 %).

RMN-¹H (CDCl₃) δ 0.97 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH₂CH₃), 1.44 (cd, 2H, $J = 13.8$ Hz, $J' = 7.3$ Hz, CH₂CH₃), 2.41 (dd, 1H, $J = 13.4$ Hz, $J' = 8.6$ Hz, CH₂CH), 2.43 (s, 3H, S-CH₃), 2.75 (dd, 1H, $J = 13.4$ Hz, $J' = 4.7$ Hz, CH₂CH), 2.87 (m complejo, 1H, CH₃CH₂CH), 7.11 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar-H), 7.20 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, Ar-H).

(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-aminobutano (clorhidrato) (MTAB · HCl) (22)

Se mezcló cantidades equimolares de ácido clorhídrico concentrado y de **21** disuelto en una mínima cantidad de *i*-PrOH. El clorhidrato así formado es precipitado por adición de Et₂O.

RMN-¹H (CDCl₃) δ 0.95 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 1.65 (cd, 2H, *J* = 14.7 Hz, *J*' = 7.6 Hz, CH₂CH₃), 2.43 (s, 3H, S-CH₃), 2.78 (dd, 1H, *J* = 14.3 Hz, *J*' = 7.9 Hz, CH₂CH), 2.96 (dd, 1H, *J* = 14.3 Hz, *J*' = 6.2 Hz, CH₂CH), 3.40 (m, 1H, *J* = 6.5 Hz, CH₃CH₂CH), 7.20 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 7.27 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-H). P.f. = 159-161 °C.

IR (cm⁻¹): 3016, 2965, 2922, 1600, 1492, 1090, 788, 515. Análisis elemental calculado para C₁₁H₁₇NS·HCl: C, 57.03; N, 6.04; H, 7.77; S, 13.85. Encontrado: C, 56.22; N, 6.38; H, 7.79; S, 12.55.

FARMACOLOGÍA

-Evaluación de la actividad de los derivados *N*-alquilados de MTA como inhibidores de las dos isoformas de MAO

Se utilizó como fuente de enzima una suspensión mitocondrial obtenida de cerebro de rata. Los animales fueron sacrificados por decapitación y se disecó rápidamente el cerebro descartándose el cerebelo. Posteriormente, el tejido fue homogeneizado en 10 ml de sacarosa 0.32 M (homogeneizador Potter-Elvehjem de teflón-vidrio) y el homogeneizado fue centrifugado a 800 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante (conteniendo las mitocondrias) fue cuidadosamente extraído y centrifugado a 10000 x g durante 20 min a 4 °C. El "pellet" obtenido fue resuspendido en el volumen original de sacarosa 0.32 M y se repitió la centrifugación. El nuevo "pellet" obtenido fue resuspendido en 10 mL de tampón de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4, posteriormente alicuotado (1 mL) y mantenido a 4 °C, para ser utilizado al día siguiente. La actividad mitocondrial de la MAO fue determinada por cromatografía de líquidos de alta resolución asociada a detección electroquímica (HPLC-DE), utilizando serotonina (5-HT) como substrato selectivo para MAO-A y 4-dimetilaminofeniletamina (4-DMAPEA) para MAO-B. La suspensión mitocondrial obtenida del cerebro de un animal, sirvió para realizar la evaluación de todas las concentraciones de una droga en un mismo día de experimento.

-Determinación de la inhibición de MAO-A

Para determinar la inhibición de MAO-A, la mezcla de incubación consistió en 50 μL de una solución de 5-HT 25 μM (concentración final 2.5 μM en un volumen final de 0.5 mL); 200 μL de tampón de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4; el inhibidor a ser evaluado a concentraciones apropiadas (50 nM - 10 μM) en 50 μL de agua destilada; y 200 μL de suspensión mitocondrial. La reacción enzimática fue iniciada por el agregado de la suspensión mitocondrial. Las mezclas fueron incubadas por 10 min a 37 °C en un baño con agitación constante en tubos abiertos. La reacción fue detenida agregando 200 μL de HClO_4 1M. La mezcla fue centrifugada a 15000 x g durante 5 min a 4 °C, y 50 μL del sobrenadante fueron inyectados en el sistema de HPLC-DE. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Los experimentos control fueron hechos sin inhibidor mientras que los blancos se realizaron sin suspensión mitocondrial. Las alturas de los picos cromatográficos de 5-hidroxiindolaldehído (5-HIA) fueron usadas para calcular la actividad de MAO. Los valores de IC_{50} fueron calculados a partir de las curvas de inhibición construidas utilizando el programa GraphPadPrism.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{[h(\text{droga}) * 100]}{h(\text{control})}$$

-Determinación de la inhibición de MAO-B

Para determinar la inhibición de MAO-B, la mezcla de incubación consistió en 25 μL de una solución de 4-dimetilaminofeniletilamina (4-DMAPEA), 100 μM (concentración final 5 μM en un volumen final de 0.5 mL); 105 μL de tampón de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4; el inhibidor a ser evaluado a concentraciones apropiadas (50 nM - 10 μM) en 50 μL de agua destilada; 100 μL de aldehído deshidrogenasa (AldDH)

(1mg/5ml); 100 μ L de β -NAD (16.5mg/ 5ml) y 120 μ L de suspensión mitocondrial. La reacción enzimática fue iniciada por el agregado de la suspensión mitocondrial. Las mezclas fueron incubadas por 5 min a 37 °C en un baño con agitación constante en tubos abiertos. La reacción fue detenida por el agregado de 200 μ L de HClO₄ 1M. La mezcla fue centrifugada a 15000 x g durante 5 min a 4 °C, y 50 μ L del sobrenadante fueron inyectados en el sistema de HPLC-DE. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Los experimentos control fueron hechos sin inhibidor mientras que los blancos se realizaron sin suspensión mitocondrial. Las alturas de los picos cromatográficos de 4-DMAPEA y su principal metabolito, ácido 4-dimetilaminofenilacético (4-DMAPAA) fueron usados para calcular la actividad de MAO-B.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{[h(\text{droga}) * 100]}{h(\text{control})}$$

-Condiciones Cromatográficas

Para el análisis de las mezclas se utilizaron una columna de fase reversa C₁₈ (250 x 5 mm), una bomba Hitachi L-7110, un detector amperométrico Merck-Recipe L-3500 A equipado con un electrodo de trabajo de carbono vítreo y un registrador gráfico Merck-Hitachi D-2500. El flujo de la fase móvil fue 1ml/min y su composición fue la siguiente:

Para un volumen de 1L: 31.5 g de ácido cítrico, 960 ml de agua de calidad para HPLC, suficiente NaOH para alcanzar un pH = 3, 200 mg de octilsulfato de sodio (SOS), 30 ml de acetonitrilo (ACN), 10 ml de tetrahidrofurano (THF). La sensibilidad del detector fue

50 nA y el potencial de oxidación se fijó en 0.75 V, utilizando el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia de Ag/AgCl.

-Determinación de la reversibilidad de la inhibición de MAO-A

Para determinar la reversibilidad de la inhibición de MAO-A, la mezcla de incubación consistió en 50 μL de una solución de 5-HT 25 μM (concentración final 2.5 μM en un volumen final de 0.5 mL); 200 μL de tampón de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4; el inhibidor a ser evaluado a concentraciones apropiadas (50 nM - 10 μM) en 50 μL de agua destilada; y 200 μL de suspensión mitocondrial. La reacción enzimática fue iniciada por el agregado de la suspensión mitocondrial. Las mezclas fueron incubadas por 10 min a 37 °C en un baño con agitación constante en tubos abiertos con lo cual se calculó el porcentaje de inhibición para las drogas evaluadas. Luego la preparación fue lavada tres veces por centrifugación y resuspensión en buffer, se incubó nuevamente con el sustrato y se determinó, en esas condiciones la actividad de la MAO.

-Determinación de la dependencia del tiempo de la inhibición de MAO-B

Para determinar la inhibición de MAO-B, la mezcla de incubación consistió en 25 μL de una solución de 4-dimetilaminofeniletamina (4-DMAPEA) 100 μM (concentración final 5 μM en un volumen final de 0.5 mL); 305 μL de tampón de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4; el inhibidor a ser evaluado a concentración 10 μM en 50 μL de agua destilada y 120 μL de suspensión mitocondrial. La mezcla de incubación fue preincubada durante 30 y 60 minutos a 37 °C en tubos separados sin adicionarle el sustrato selectivo 4-DMAPEA. La reacción enzimática fue iniciada por el agregado del

sustrato. Las mezclas fueron incubadas por 8 min a 37 °C en un baño con agitación constante en tubos abiertos. La reacción fue detenida por el agregado de 200 µL de HClO₄ 1M. La mezcla fue centrifugada a 15000 x g durante 5 min a 4 °C, y 50 µL del sobrenadante fueron inyectados en el sistema de HPLC-DE. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Los experimentos control fueron hechos sin inhibidor mientras que los blancos se realizaron sin suspensión mitocondrial. Las alturas de los picos cromatográficos de 4-DMAPEA y su principal metabolito, ácido 4-dimetilaminofenilacético (4-DMAPAA) fueron usados para calcular la actividad de MAO.

-Determinación del efecto neurotóxico de algunos derivados *N*-alquilados de MTA en células de cultivo

Cultivo celular. Se utilizó la línea celular RCSN-3, derivada desde sustancia negra de ratas Fisher 344 de cuatro meses de edad (Paris, 2001).

Las placas con las células de cultivo sembradas sobre tres cubreobjetos fueron incubadas por 2 h con las drogas a evaluar en concentraciones entre 0 y 100 µM en medio de cultivo sin suero bovino fetal. Una vez concluido ese tiempo, se lavó con 1 ml de buffer de fosfato salino (PBS). Se agregó 80 µL de una solución de tinción 0.5 µM calceína AM y 5 µM de homodímero de etidio-1 en buffer PBS. En estas condiciones se incubó durante 45 minutos en cámara húmeda en ausencia de luz. A continuación se retiraron las placas de la cámara y se lavaron tres veces con 1 ml de PBS. Los cubreobjetos se retiraron uno a uno desde las placas con pinzas de punta fina y se montaron en el portaobjeto utilizando medio de montaje para fluorescencia DAKO®. Las células fueron contadas por microscopía de fluorescencia haciendo tres barridos por cubreobjeto

contando en promedio 70 células por barrido. Se consideró células muertas aquellas que fluorescen con color rojo y vivas las que lo hacen con color verde. Los datos fueron expresados como porcentaje de toxicidad \pm DS ($\% \text{ Toxicidad} = \text{Células muertas} * 100 / \text{Células totales}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

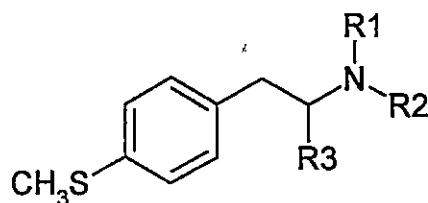
QUÍMICA

Síntesis química

Se sintetizaron 3 derivados *N*-monoalquilados de MTA con largos de cadena de 1, 2 y 3 carbonos y los correspondientes derivados *N,N*-dialquilados. Además se sintetizó un derivado de fenilbutilamina (MTAB) homólogo superior de MTA, sin sustitución sobre el átomo de nitrógeno. La ruta sintética está representada en la figura 7. Por último, MTA racémico se resolvió en sus isómeros ópticos mediante cristalización de sus *O,O'*-di-*p*-toluilitartratos.

El primer objetivo sintético de esta tesis fue el de mejorar el rendimiento en la obtención de (\pm) MTA, publicada solo en una patente (Holland, 1964), donde se reportaba un 37 % para la síntesis del nitroestireno correspondiente y un 63 % para la reducción de éste incluyendo la preparación del clorhidrato lo que conducía a un rendimiento global de apenas 23 %. El presente trabajo mejoró sustantivamente ambos rendimientos, alcanzándose un 91 % para la primera etapa y un 75 % para la segunda. La mejoría obtenida fue debida, en parte, a la utilización de acetato de amonio anhidro en lugar de amilamina y por otra parte a la realización de la condensación de Knoevenagel en un aparato de Dean-Stark que permite la eliminación del agua del sistema y con esto desplazar la reacción hacia la formación del producto de interés.

Tabla 1.- Compuestos racémicos sintetizados y sus rendimientos

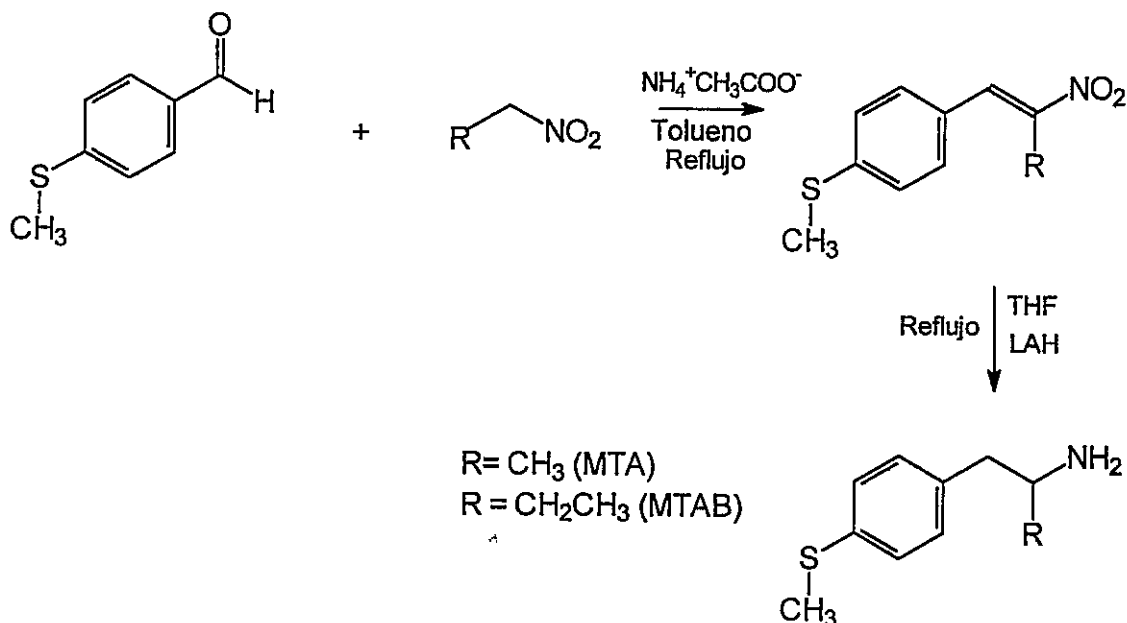


COMPUESTO	R ₁	R ₂	R ₃	% Rendimiento
(±)-MTA	H	H	CH ₃	73 ^a
(±)-NMMTA	H	CH ₃	CH ₃	60 ^b
(±)-DMMTA	CH ₃	CH ₃	CH ₃	73 ^b
(±)-NEMTA	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃	65 ^b
(±)-DEMTA	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	35 ^b
(±)-NAMTA	H	CH ₂ CH=CH ₂	CH ₃	25 ^b
(±)-DAMTA	CH ₂ CH=CH ₂	CH ₂ CH=CH ₂	CH ₃	49 ^b
(±)-MTAB	H	H	CH ₂ CH ₃	50 ^a

a: Rendimiento global desde 4-metilbencaldehído.

b: Rendimiento desde MTA.

Figura 7: Ruta sintética para la obtención de MTA y MTAB



En segundo lugar se planteó la necesidad de evaluar las bases utilizadas como catalizadores en la reacción de Knoevenagel para la obtención de 1-(4-metilfenil)-2-nitrobuteno. En un estudio preliminar realizado en esta tesis, se determinó que las bases ciclohexilamina ($K_b = 4.4 \times 10^{-4}$) y butilamina ($K_b = 4.1 \times 10^{-4}$) (Solomons, 1988) se comportaban cualitativamente con casi idénticas propiedades frente a la reacción en estudio. Esto es coherente con la proximidad de los valores de K_b de ambas bases.

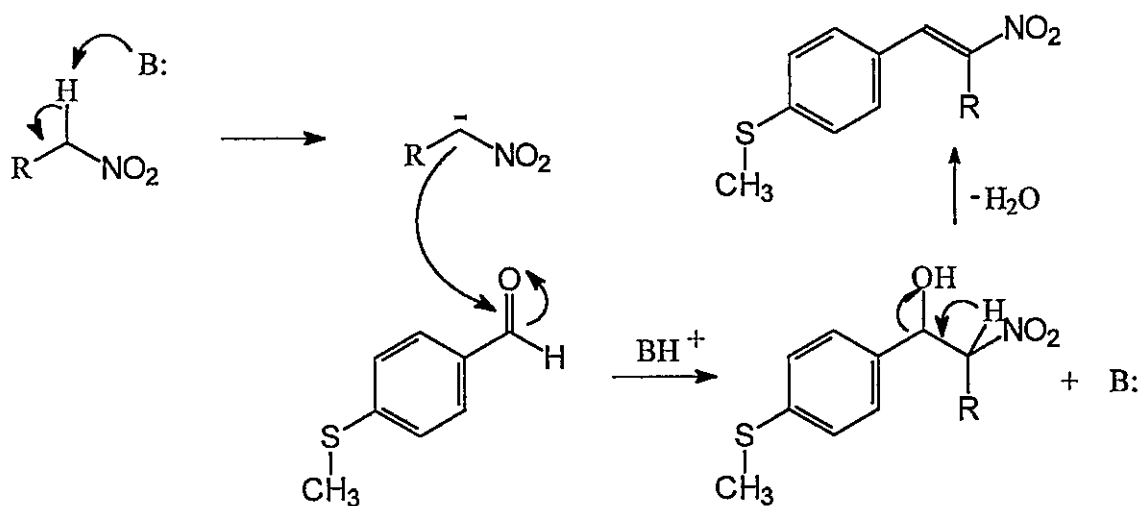
Vistos estos antecedentes y considerando que el punto de ebullición de la butilamina (78 °C) es notablemente mas bajo que el de la ciclohexilamina (134 °C), se eligió esta última para ser considerada en el estudio comparativo con otras bases, ya que se podía esperar que su concentración en la mezcla reaccionante a la temperatura de ebullición del tolueno se mantuviera más elevada.

Tabla 2: Evaluación de las bases comúnmente utilizadas en la reacción de Knoevenagel para la obtención de 1-(4-metilfenil)-2-nitrobuteno

BASE	% Rendimiento de mezcla	% Z en mezcla (*)
Ciclohexilamina	17	2.5
Acetato de amonio	42	4.0
<i>N,N</i> -Dimetiletilendiamina	54	8.0

(*) El porcentaje informado en la mezcla es del producto purificado por cromatografía.

Figura 8: Mecanismo de la reacción de síntesis de β -nitroestirenos



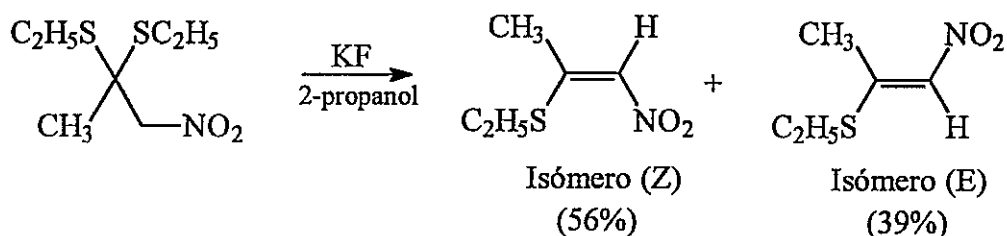
Los resultados del estudio (tabla 2) muestran que la *N,N*-dimetiletilendiamina es la mejor base para esta reacción en las condiciones en que se llevó a cabo. De acuerdo al mecanismo propuesto para esta reacción, el catalizador sustrae un protón en α con

respecto al grupo nitro, lo que genera un carbanión que posteriormente ataca el carbonilo deficiente en electrones (Figura 8). Sin embargo, la base podría actuar como nucleófilo y atacar directamente al carbonilo, lo que da cuenta de una reacción competitiva del proceso. Probablemente, la *N,N*-dimetiletilendiamina presenta una relación más favorable entre sus propiedades como base y como nucleófilo.

Un aspecto de interés en esta reacción fue que, purificando el nitrobuteno formado, se pudo aislar los dos isómeros geométricos y caracterizarlos completamente por sus espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C , HMQC, HMBC y NOESY (tablas 3, 4 y 5), lo que permitió confirmar las estructuras del producto mayoritario *E* y del minoritario *Z*.

Existen reportes previos de la obtención con buenos rendimientos de (*Z*)-nitroolefinas por deshidratación del correspondiente nitroalcohol a muy baja temperatura. (Corey, 1978). Por otra parte, la reacción de 2-alciltio-1-nitropropanos con fluoruro de potasio produce una mezcla de los dos isómeros con altos rendimientos del isómero (*Z*) (Node, 1984) (Figura 9).

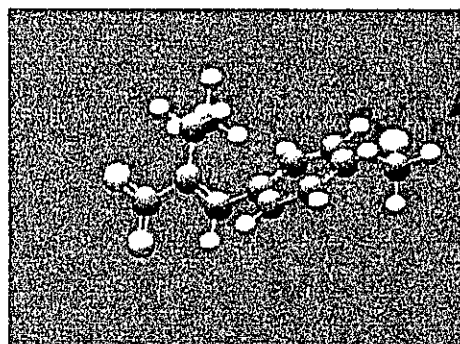
Figura 9: Reacción para la obtención de isómeros (*E*) y (*Z*)



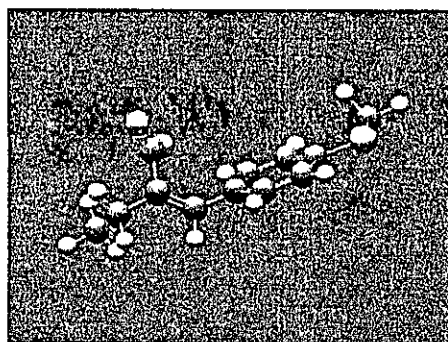
Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H de las mezclas de isómeros de 1-nitropropeno obtenidos por deshidratación del correspondiente nitroalcohol, muestran mayores cantidades del isómero (*E*) y menores cantidades del isómero (*Z*)

(Vaskov, 1964), lo cual es coherente con los resultados obtenidos en esta tesis. La figura 10 muestra las estructuras de los isómeros estudiados.

Figura 10 : (*E*) y (*Z*) 1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno



ISOMERO (*E*)



ISOMERO (*Z*)

Tabla 3: Corrimientos químicos de RMN de ^1H de (*E*) y (*Z*)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno

^1H	Isómero E	Isómero Z
CH_2CH_3	1.38 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)	1.20 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)
SCH_3	2.52 (3H, s)	2.46 (3H, s)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}=\text{CH}$	2.88 (2H, c, $J = 7.4$ Hz)	2.67 (2H, c, $J = 7.4$ Hz)
$\text{ArCH}=\text{C}$	7.98 (1H, s)	6.29 (1H, s)
H-3' y H-5' (Ar-H)	7.29 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	7.16 (4H, s_{ap})
H-2' y H-6' (Ar-H)	7.36 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	7.16 (4H, s_{ap})

El espectro de RMN de ^1H del isómero *E* muestra un corrimiento de la resonancia del H-1 a campo más bajo (7.98 ppm) que los protones del anillo aromático. Este mismo protón, en el isómero *Z*, aparece a campo más alto (6.29 ppm) que los protones del anillo. Estas diferencias espectrales tan notorias pueden ser atribuidas a diferencias conformacionales entre ambos isómeros, asumiendo que solo el *E* podría mantener una estructura plana con un sistema π conjugado desde el grupo nitro hasta el anillo aromático. De esta manera debería esperarse que el H-1 en el isómero *E* estuviera situado en el plano del ciclo, fuertemente desapantallado por la corriente de anillo. Por el contrario, la resonancia a alto campo del H-1 en el isómero *Z* sugiere una pobre conjugación de este sistema π , asociado con una pérdida de planaridad forzada por la compresión estérica entre el grupo nitro y un hidrógeno unido al ciclo, lo cual desplazaría a este protón fuera del plano de anillo y disminuiría el efecto desapantallante anisotrópico. Alternativamente se podría pensar en un cambio de la densidad electrónica en el entorno del H-1 debido a una torsión del grupo nitro con respecto al plano del doble enlace C=C. (Hurtado-Guzmán y col, 2001)

Otro aspecto que apoya la pérdida de conjugación en el isómero *Z* es la desaparición del clásico sistema AA'BB', característico de anillos aromáticos 1,4-disustituidos asimétricamente. En el espectro de este compuesto (anexo espectros) se puede observar un aparente singlete con pequeños picos laterales centrado en 7.16 ppm, lo cual se espera para un sistema A_2B_2 muy distorsionado, donde las diferencias en los corrimientos químicos de los protones A y B son muy pequeñas. Se puede plantear así que la señal de los H-3'/5' se ha corrido en aproximadamente 0.13 ppm hacia campos

más altos, y que el desplazamiento correspondiente de la señal de los H-2'/6' se ha corrido en cerca de 0.20 ppm en igual sentido. No es inmediata una interpretación de estos cambios, pero se puede pensar que sean consecuencia del efecto anisotrópico del grupo nitro, muy próximo a los H-2'/6' y no tanto a los H-3'/5'.

Tabla 4 : Corrimientos químicos de RMN de ^{13}C de (*E*) y (*Z*)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno

^{13}C	Isómero E	Isómero Z
C-1	132.85	122.41
C-2	152.46	151.80
C-3	20.88	27.27
C-4	12.42	11.49
C-1'	128.48	128.29
C-2' y C-6'	130.28	128.43
C-3' y C-5'	125.28	126.11
C-4'	142.31	140.28
CH ₃ -S	15.04	15.25

Los espectros de correlación bidimensional ^1H - ^{13}C (HMQC, HMBC), permitieron la asignación completa e inequívoca de todas las resonancias de los núcleos de carbono de estas moléculas. Una observación interesante es que los corrimientos químicos de los carbonos C-2', C-3', C-5' y C-6' no dependen fuertemente de la configuración de cada isómero, lo que presumiblemente se debe a que las resonancias de ^{13}C están en una región de campo mucho más bajo y por consecuencia, energía mucho

más alta. Pequeños cambios en la conformación de la molécula afectan relativamente poco los corrimientos químicos en esta región del espectro, aunque la señal de los C-2'/6' muestra un neto desplazamiento hacia campos más altos.

Finalmente, la tabla 5 muestra los efectos nucleares Overhauser observados en el espectro NOESY de cada uno de los isómeros.

Tabla 5: Efectos nucleares Overhauser observados en el espectro NOESY de (Z)- y (E)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno

¹ H-NOESY	Isómero E	Isómero Z
H-1	H-2',6'	H-Ar; H-3, H-4
H-3	H-2',6'; H-4	H-1, H-4
H-4	H-2',6'; H-3	H-1, H-3
H-2',6'	H-1, H-3, H-4	H-1
H-3',5'	CH ₃ -S	CH ₃ -S
CH ₃ -S	H-3',5'	H-Ar

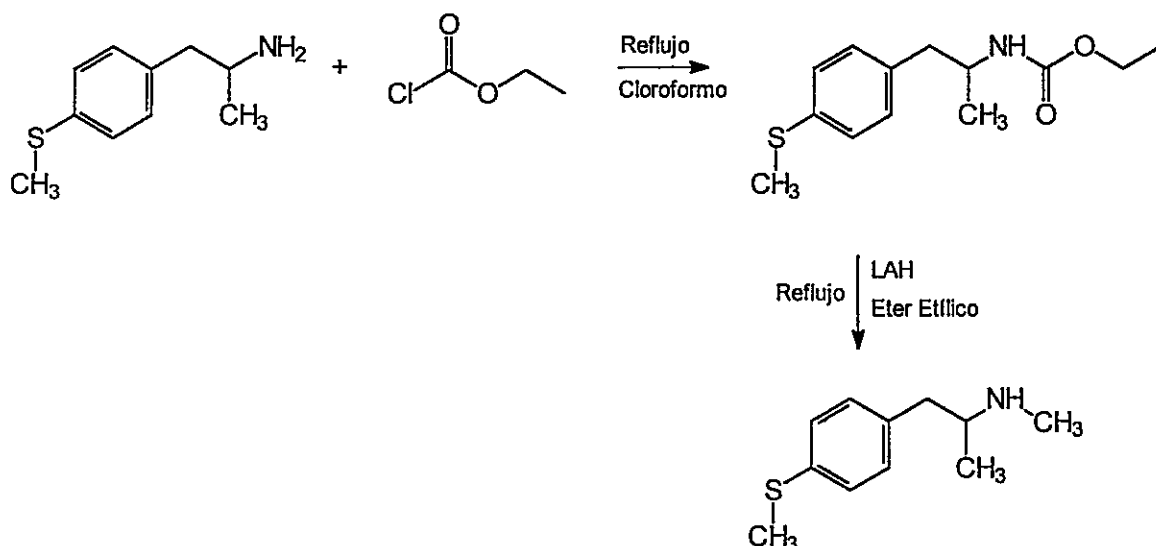
Las interacciones a través del espacio observadas en los experimentos NOESY entregan una clara evidencia de que ambos compuestos son isómeros geométricos, y contribuyen a la asignación correcta de sus espectros de RMN de ¹H. El espectro NOESY para el isómero Z muestra una fuerte interacción del H-1 con los protones del

metileno y el metilo del grupo etilo, además de la interacción con los protones aromáticos. Por otra parte, en el experimento realizado con el isómero *E*, los protones del grupo etilo (H-3 y H-4) interactúan claramente con los protones del anillo. Estas interacciones son coherentes con los cálculos de optimización de geometría hechos por AM1 (figura 10).

Con respecto a la síntesis de derivados *N*-alquilados de MTA, se preparó un mayor número de sustancias que las propuestas originalmente en el proyecto de esta tesis, lo que permitió hacer un estudio de relación estructura-actividad más acabado en relación a la sustitución sobre el átomo de nitrógeno. Este objetivo modificado contempló la sustitución de los protones del nitrógeno por sustituyentes alquílicos de uno, dos y tres carbonos para obtener las series mono- y dialquilada. Para ello se preparó las moléculas que se describen resumidamente en la tabla 1 y todos los intermediarios y su caracterización se encuentran en la sección materiales y métodos de esta tesis.

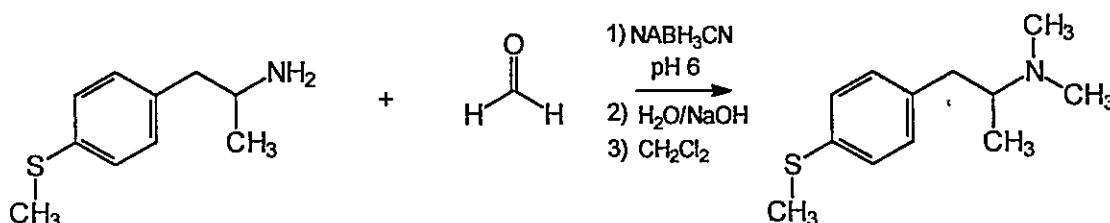
NMMTA fue sintetizada de acuerdo al esquema de la Figura 11 y los rendimientos obtenidos para cada una de las etapas, 87 % para la reacción de formación del etilcarbamato de MTA, y 68 % para la reducción de éste, están dentro de lo esperado para este tipo de reacciones.

Figura 11: Ruta sintética para la obtención de NMMTA



Por su parte, DMMTA se sintetizó por el camino de formilación reductiva “one pot”, de acuerdo al esquema de la Figura 12 que se muestra a continuación.

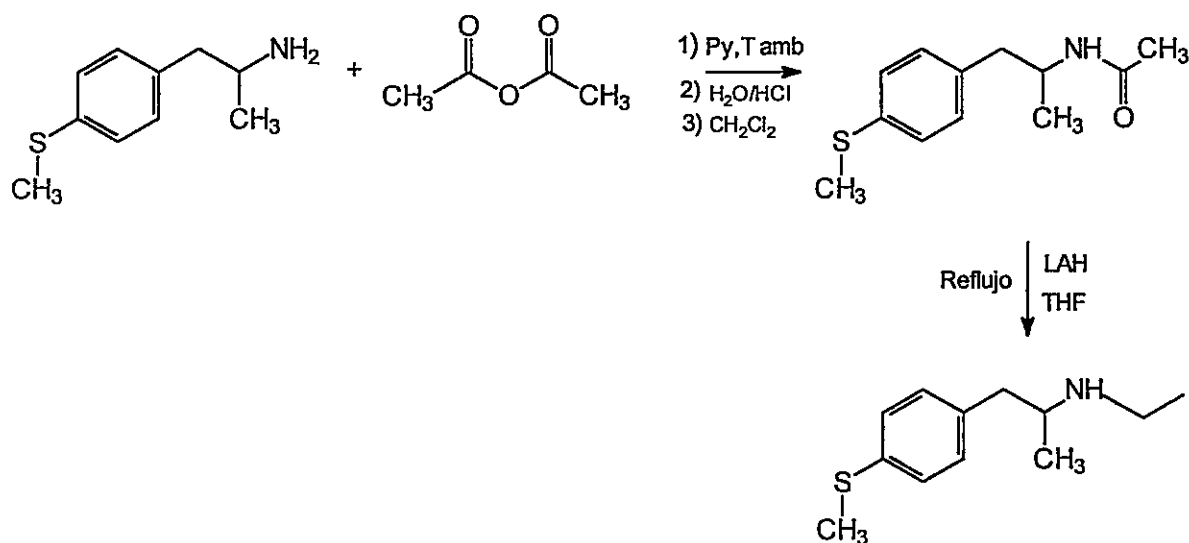
Figura 12: Ruta sintética para la obtención de DMMTA



Este método resulta muy conveniente debido a que la reacción se detiene cuando se ha reducido el segundo grupo hidroximetilo introducido, ya que en las condiciones básicas empleadas la amina posee solo dos hidrógenos lábiles, los cuales son el reactivo limitante de la reacción. Un rendimiento de 73 % está dentro de lo esperado y es posible atribuir las pérdidas principalmente al tratamiento de término de la reacción.

La metodología sintética que se usó para la obtención de NEMTA fue la *N*-acetilación y posterior reducción de la acetamida correspondiente. En este caso los rendimientos, 89 % para la acilación y 73 % para la reducción con LiAlH_4 , están dentro de lo esperado, ya que es conocido que las amidas presentan dificultad para ser reducidas. Este resultado es coherente con el obtenido en la preparación de NMMTA por un método análogo. La figura 13 muestra la ruta utilizada. (Shulgin y Shulgin, 1991)

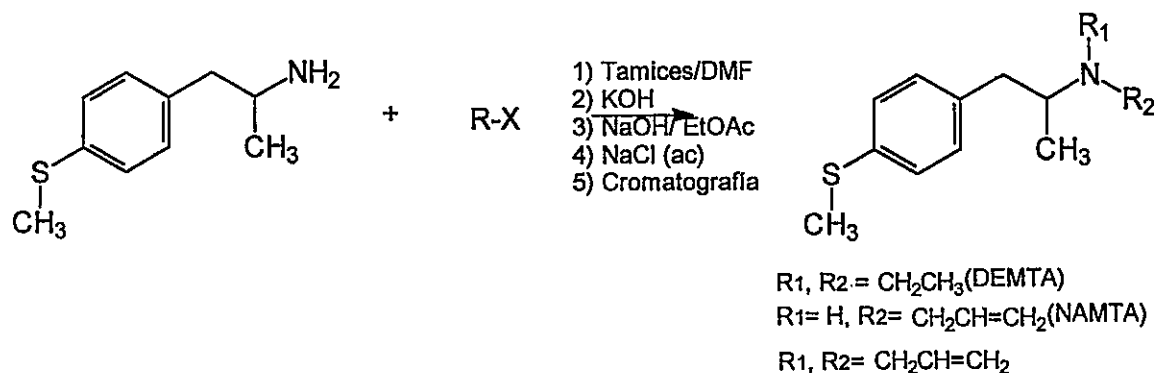
Figura 13: Ruta sintética para la obtención de NEMTA



Finalmente, en lo referente a la síntesis de los restantes derivados *N*-alquilados de MTA, fue necesario utilizar métodos de alquilación directa. La metodología propuesta inicialmente para la síntesis de DEMTA era la misma usada para NMMTA, por medio de acetilación de NEMTA y posterior reducción de la amida formada. Así fue posible preparar el derivado *N*-acetil-*N*-etil-MTA. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, fue imposible reducir el grupo acetamido con LiAlH_4 . Esto último obligó a

pensar en métodos de alquilación directa por reacción de la amina con haluros de alquilo, que sin duda tendrían menores rendimientos debido a la sobrealquilación, proceso que es difícil controlar. Intentando limitar la sobrealquilación se hizo algunas reacciones utilizando CsOH como agente promotor de la mono-*N*-alquilación selectiva de aminas (Salvatore, 1999). En dicho trabajo los autores evaluaron algunas bases y la mayor selectividad se obtuvo con CsOH, pero los sustituyentes alquílicos eran voluminosos comparados con aquellos que en este trabajo se intentaba introducir. Cuando en el desarrollo de esta tesis se intentó alquilar con bromuro de etilo en presencia de CsOH se obtuvo una mezcla compleja de productos que hacen inaplicable el método con este tipo de sustituyentes. Esta metodología de alquilación selectiva fue aplicada exitosamente en la formación de los derivados *N*-alilados de MTA. Ya que en este caso interesaba obtener ambos derivados en una misma reacción se utilizó KOH, con el que no se esperaba obtener gran selectividad pero sí buenos rendimientos. Con el objetivo de orientar la reacción a la monosustitución, se hizo la reacción con cantidades estequiométricas del halogenuro de alilo. Sin embargo, siempre se obtuvo el derivado monoalquilado como el producto minoritario.

Figura 14: Ruta sintética para la obtención de NAMTA y DAMTA



Analizando los espectros de RMN de ¹H de los derivados *N*-alquilados de MTA, se puede apreciar que, en general, si se compara el clorhidrato con la respectiva base libre, se observa un corrimiento de casi todas las señales hacia campo mas bajo, excepto la correspondiente al grupo (S-CH₃). Este conocido desplazamiento se relaciona con el desapantallamiento que produce la carga formal del átomo de nitrógeno sobre los protones cercanos. El efecto del cambio de solvente sin embargo, produce un corrimiento a campo alto, aunque es mas importante sobre el átomo directamente solvatado, por lo tanto la mayoría de las señales, en estas moléculas se ven poco afectadas por el solvente.

Hay que hacer notar que los protones CH₂CH aparecen como un doblete (2.84 ppm) en el clorhidrato de MTA y como dos dobletes de dobletes en la base (2.47 ppm, 2.64 ppm). En algunos casos, dependiendo de la cercanía del centro quiral de la molécula y del efecto de apantallamiento particular de ella, los protones diaterotópicos aparecen como magnéticamente equivalentes (Jennings, 1975; Silverstein y col, 1991), lo que se relacionaría con una diferencia en la conformación promedio y posiblemente

en la flexibilidad conformacional. Analizando los espectros de RMN de ^1H de la serie de derivados monolquilados de MTA, se observan desplazamientos interesantes aunque pequeños solo en las señales de los protones CH_2CH . El corrimiento químico para uno de ellos se mueve hacia campo más bajo (de 2.47 para MTA hasta 2.59 para NAMTA) y la señal del otro protón también se mueve a campo menor (de 2.64 ppm para MTA hasta 2.76 para NAMTA). Estos desplazamientos podrían estar relacionados un cambio conformacional en la molécula que hace que estos protones entren durante una mayor fracción del tiempo en el plano de anillo y sean levemente más afectados por la corriente anisotrópica de éste.

Ahora, si se analizan las resonancias de estos mismos protones, pero esta vez para la serie de derivados dialquilados de MTA, encontramos un comportamiento diferente. La señal de uno de los protones CH_2CH , el que aparece a campo más alto, se desplaza hacia campo mayor a medida que se aumenta el largo de la cadena carbonada sobre el nitrógeno (de 2.47 ppm para MTA hasta 2.36 ppm para DAMTA). En cambio, la señal del otro protón se desplaza a campo más bajo, aunque no con una tendencia clara. Este comportamiento podría ser consecuencia de un efecto inverso al caso de los derivados monoalquilados, provocando, en este caso que uno de los protones salga del plano de anillo y el otro entre.

Tabla 6: Resumen de los corrimientos de los protones benéficos de los derivados *N*-alquilados de MTA

Compuesto	CH ₂ CH (ppm)	CH ₂ CH (ppm)
MTA	2.47	2.64
MTA · HCl	2.84	2.84
NMMTA	2.58	2.68
NMMTA · HCl	2.82	3.01
DMMTA	2.43	3.10
DMMTA · HCl	2.75	3.06
NEMTA	2.58	2.71
NEMTA · HCl	2.74	3.08
DEMTA	2.35	2.88
DEMTA · HCl	2.81	3.08
NAMTA	2.59	2.76
NAMTA · HCl	2.78	3.07
DAMTA	2.36	2.87
DAMTA · HCl	2.81	3.11
MTAB	2.41	2.75
MTAB · HCl	2.78	2.96

Adicionalmente, fueron registrados los espectros de infrarrojo de las sales de todos los derivados *N*-alquilados de MTA. Se encontró señales características para este tipo de moléculas como estiramiento C=C del anillo aromático, flexión C-H en el plano del anillo aromático o flexión C-H en el plano del anillo aromático para un sistema aromático 1,4-disustituido, estiramiento C-S y junto a esta última una de las señales más características para estos derivados, cual es el estiramiento N-H para cada una de las sales. Se observó un corrimiento de estas bandas desde la región de los 3000 cm⁻¹, para una sal de amina primaria hasta los 2500 cm⁻¹, para una sal de amina terciaria. Estas

observaciones están de acuerdo con lo reportado en la literatura (Silverstein, 1991), lo que permitió asignar las bandas señaladas.

-Resolución de (\pm)-MTA en sus enantiómeros:

Utilizando el método de resolución por formación de sales diastereoméricas, como se describió en la sección de materiales y métodos de esta tesis, se ha obtenido (+)-MTA y (-)-MTA. Los valores de rotación específica medidos a 589 nm ($[\alpha]_D$) para cada uno de los enantiómeros son $+24^\circ$ y -23° y para sus correspondientes clorhidratos $+21.5^\circ$ y -22.0° . Los resultados obtenidos son coherentes con los valores de rotación específica registrados para la anfetamina propiamente dicha y algunos de sus derivados sustituidos en el anillo (D-anfetamina sulfato $[\alpha]_D = +21.8^\circ$, D-p-cloroanfetamina clorhidrato $[\alpha]_D = +19.5^\circ$) (Newman, 1980)

El buen resultado obtenido en la resolución de MTA está basado en una gran cantidad de ensayos fallidos que permitieron alcanzar la experiencia necesaria en este tipo de experimentos. Estos incluyeron la formación de sales diastereómeras con varios agentes de resolución ácidos (ARA) entre los cuales se puede mencionar los ácidos (-)-málico, (+)-tartárico, (+)-*O,O'*-dibenzoiltartárico y (-)-*O,O'*-dibenzoiltartárico. Las condiciones de temperatura a las que se hicieron las mezclas, así como los volúmenes y los solventes utilizados, el tiempo de espera para la recristalización de las sales y la temperatura a la que se cristalizaron éstas, fueron todas variables que se modificaron entre un experimento y otro con el objeto de mejorar los rendimientos de formación de sales con un exceso enantiomérico apreciable. A partir de esta experiencia, se llegó a

establecer los solventes y sus volúmenes necesarios para una cristalización óptima desde el punto de vista del enriquecimiento de un enantiómero en los cristales formados. Esto sin embargo, y como era de esperar, fue en detrimento del rendimiento de la sal obtenida. En este proceso resultó crítica la razón de volumen de metanol empleado por unidad de masa de la sal cristalizada previamente en *i*-PrOH. Otro factor que afecta notablemente la reproducibilidad en la rotación específica de las aminas que se obtienen es el lavado de la fase orgánica que contiene la amina libre enriquecida en un enantiómero con solución de Na₂CO₃ para eliminar el ARA y posteriormente con agua destilada. Pequeños restos del ARA pueden alterar y de hecho modifican notablemente el valor de $[\alpha]_D$.

Para determinar el exceso enantiomérico de los productos purificados, se procedió a realizar estudios de RMN de ¹H de las amidas de Mosher. Basado en resultados publicados previamente se sabe que el ácido de Mosher enantioméricamente puro (ácido-(+)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético) forma sales diastereómeras (Benson y col, 1988) y amidas (Dale y Mosher, 1973) con variadas estructuras de aminas y que se producen no equivalencias en algunas señales del espectro de ¹H-RMN como producto del apantallamiento estereoselectivo que produce el grupo trifluorometilo sobre cada uno de los enantiómeros de la mezcla enriquecida. Las amidas (SR y SS) muestran singuletes de metoxilos (3.26 y 3.31 ppm) correspondientes a los metoxilos de las amidas formadas por cada uno de los enantiómeros (figura 16). Las integrales correspondientes muestran la proporción de 50% para cada enantiómero en la amida preparada con la mezcla recémica. La amida enriquecida en el enantiómero (+) muestra

un singlete mayoritario (3.26 ppm) y uno minoritario (3.31 ppm). Estas amidas (la de (\pm)-MTA y la de la base enriquecida en el enantiómero (+) fueron preparadas con el R-(-)-cloruro de ácido de Mosher (Figura 15). La amida enriquecida en el enantiómero (-) fue preparada con el S-(+)-Cloruro de ácido de Mosher y por lo tanto la señal del enantiómero mayoritario sigue siendo la de 3.26 ppm. Las integrales de las señales en las mezclas enriquecidas permitieron calcular un exceso enantiomérico (ee) mayor o igual a 90 %. El desplazamiento químico a campo alto de una de las señales de los metoxilos puede asociarse al apantallamiento que le produce una interacción con el sistema π del anillo aromático de la amina. Un análisis de la configuración absoluta permite asignar los enantiómeros como (S)-(+)-MTA y (R)-(-)-MTA (Dale y Mosher, 1973).

Figura 15.- Configuraciones absolutas del Ácido de Mosher y sus derivados

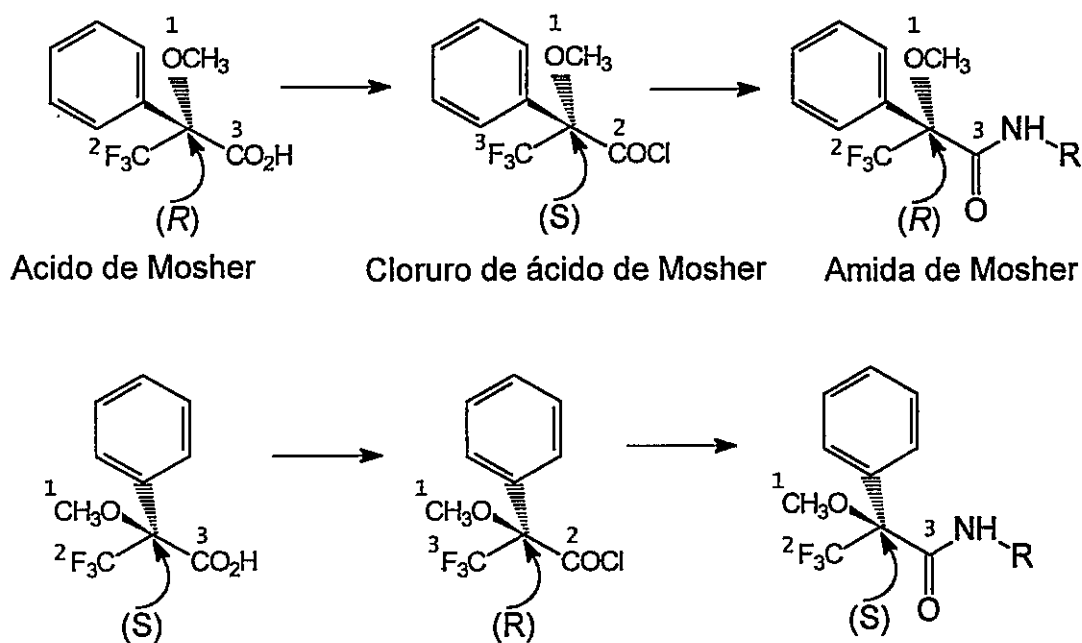
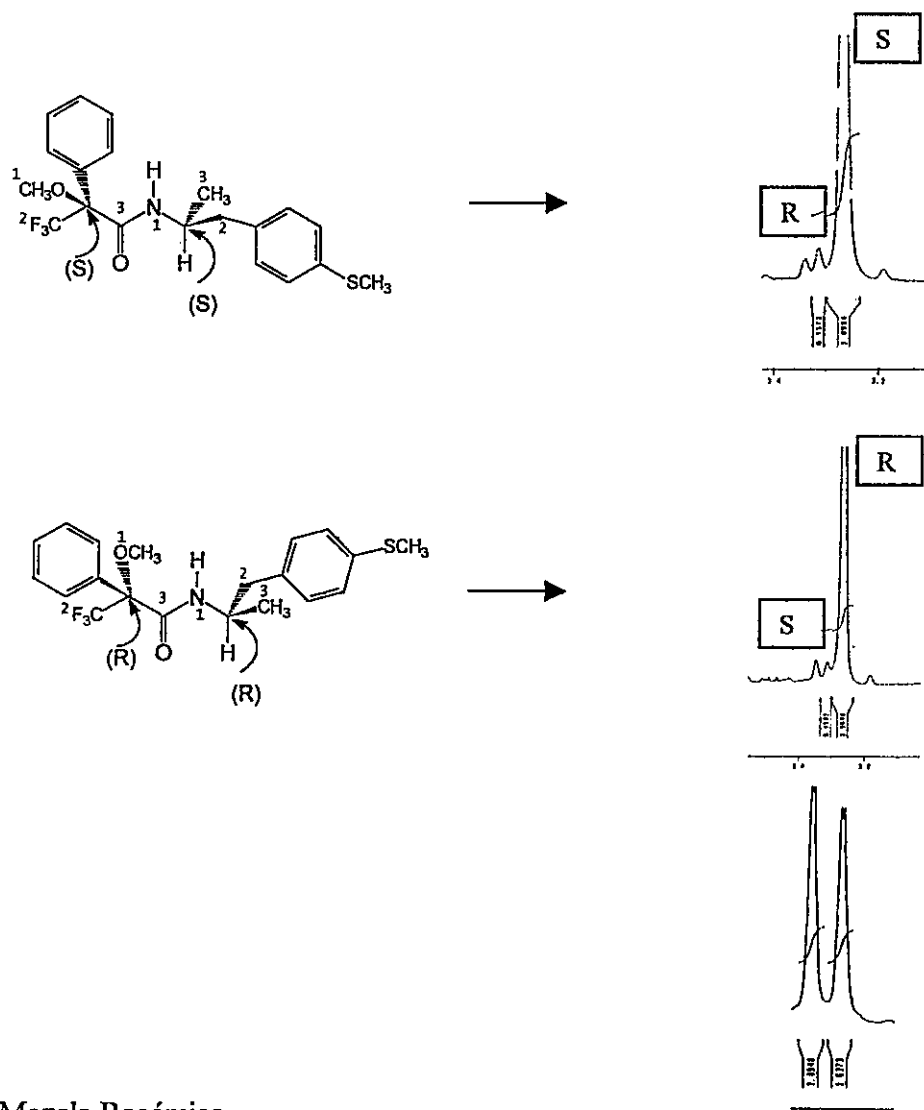


Figura 16.- Señales de ^1H -RMN correspondientes a los metoxilos en las amidas de Mosher y configuración absoluta de las aminas.



Mezcla Racémica

FARMACOLOGÍA

Actividad I-MAO

Una de las hipótesis planteadas al principio de este trabajo era que la alquilación sobre el átomo de nitrógeno debería cambiar importantemente la actividad inhibidora de MAO señalada con anterioridad para MTA y se podía especular que debería disminuirla a medida que el nitrógeno estuviese más impedido estéricamente, suponiendo que esto dificultara la unión al sitio activo de la enzima. Los resultados mostrados en la tabla 7 son muy consistentes con esta hipótesis e indican que a medida que aumenta el número de átomos de carbono sobre el nitrógeno, disminuye la capacidad inhibitoria de las moléculas evaluadas sobre MAO-A. En general se observa también que este tipo de moléculas carece de actividad apreciable como inhibidores de MAO-B. Sin embargo, uno de estos derivados, NAMTA, presenta inhibición de la isoforma B de la enzima y esto resulta interesante por la similitud estructural que este derivado tiene con L-deprenil, un conocido, potente e irreversible IMAO-B actualmente utilizado en la terapia de la enfermedad de Parkinson. Esta observación resulta interesante en la perspectiva de la búsqueda de nuevos inhibidores de MAO-B que sean reversibles e igualmente potentes.

Tabla 7: Resultados de inhibición de MAO de MTA, sus enantiómeros, sus derivados *N*-alquilados y su homólogo MTAB (SE = sin efecto)

COMPUESTO	MAO-A IC ₅₀ [μM]	MAO-B IC ₅₀ [μM]
(±)-MTA (4)	0.25	SE
(±)-NMMTA (7)	0.86	SE
(±)-DMMTA (9)	1.66	SE
(±)-NEMTA (12)	1.46	SE
(±)-DEMTA (14)	4.82	SE
(±)-NAMTA (17)	2.9	>10
(±)-DAMTA (18)	>10	SE
(±)-MTAB (22)	0.71	SE
(+)-MTA (23)	0.11	SE
(-)-MTA (24)	2.08	SE

Respecto de los valores mostrados en la tabla se puede apreciar que en la serie monoalquilada, a medida que aumenta el número de carbonos sobre el átomo de nitrógeno, la potencia inhibitoria sobre MAO-A disminuye. Esto puede deberse a que, aunque la *N*-alquilación provoca un aumento de la disponibilidad del par electrónico del nitrógeno, también aumenta el impedimento estérico sobre éste y el efecto resultante es dominado por el efecto estérico, lo que se traduce en una menor actividad. Ahora, si se

analiza la serie dialquilada, se observa una tendencia análoga, pero esta vez, aumentada, llegando a hacerse muy notoria en el caso del derivado DAMTA, donde el impedimento estérico es el mayor de toda la serie.

Si se analiza los valores por pares de derivados mono- y dialquilados, se observa que se mantiene la tendencia de disminución de la actividad en función del impedimento estérico sobre el nitrógeno. Este efecto es mucho más notable a medida que aumenta el largo de la cadena carbonada. Así se puede apreciar que las diferencias en los valores de IC_{50} entre el derivado monoalquilado y el derivado dialquilado se incrementan notablemente, desde 0.8 para metilo, a 3.4 para etilo y 95 para alilo). Efectos como estos han sido observados y descritos para otro tipo de actividades farmacológicas. (Nichols, 1994).

Si se compara, ahora, MTA con MTAB, es decir si se alarga la cadena alquímica unida al carbono α , se observa también una disminución en el valor de IC_{50} comparable a la que resulta de la sustitución de un hidrógeno por un grupo metilo en el nitrógeno, lo que podría estar indicando que el largo de esta cadena también reviste alguna importancia en la actividad inhibidora de la enzima. Sin embargo, esta observación es poco concluyente debido a que solo resulta de la comparación de dos compuestos. Sería necesario contar con derivados de cadenas más largas para sacar conclusiones en este sentido, moléculas que están fuera de los alcances de esta tesis.

Los valores de inhibición de MAO-A obtenidos para los enantiómeros de MTA reflejan la estereoselectividad de la actividad farmacológica en general y en particular la mayor actividad de (+)-MTA que es dos veces mayor que la de la mezcla racémica. A su

vez, (-)-MTA presenta una potencia de 19 veces menor que la mezcla racémica. Estas diferencias han sido descritas previamente por varios autores (Ask y col., 1982, 1985; Dostert y col., 1983).

Respecto de los experimentos de reversibilidad, se evaluó una muestra representativa donde se incluyó DMMTA, NEMTA, NAMTA y MTAB. Se encontró que todas las drogas presentan una inhibición reversible (Tabla 8). Las variaciones encontradas para las diferentes drogas son atribuibles al diseño del experimento, en el cual la cantidad de suspensión mitocondrial residual después de los lavados varía bastante. Sin embargo se observa el comportamiento reversible de todas las drogas.

Tabla 8: Reversibilidad de la inhibición de MAO-A producida por algunos derivados de MTA

Compuesto [10 ⁻⁵ M]	Porcentaje de inhibición de MAO-A	
	Antes de lavado	Después del lavado
DMMTA	81.4 ± 1.4	31.0 ± 17.6
NEMTA	79.7 ± 1.4	0.0 ± 8.8
NAMTA	74.2 ± 1.5	0.0 ± 8.3
MTAB	91.2 ± 0.0	21.4 ± 5.8

Adicionalmente se hicieron experimentos para evaluar si la inactividad de los derivados hacia la inhibición de MAO-B era dependiente del tiempo. Los resultados

indican que la inhibición no es dependiente del tiempo para todas las drogas evaluadas, excepto para L-deprenil, utilizado como control positivo (Tabla 9).

Tabla 9: Efecto de la preincubación en la inhibición de MAO-B para los derivados de MTA

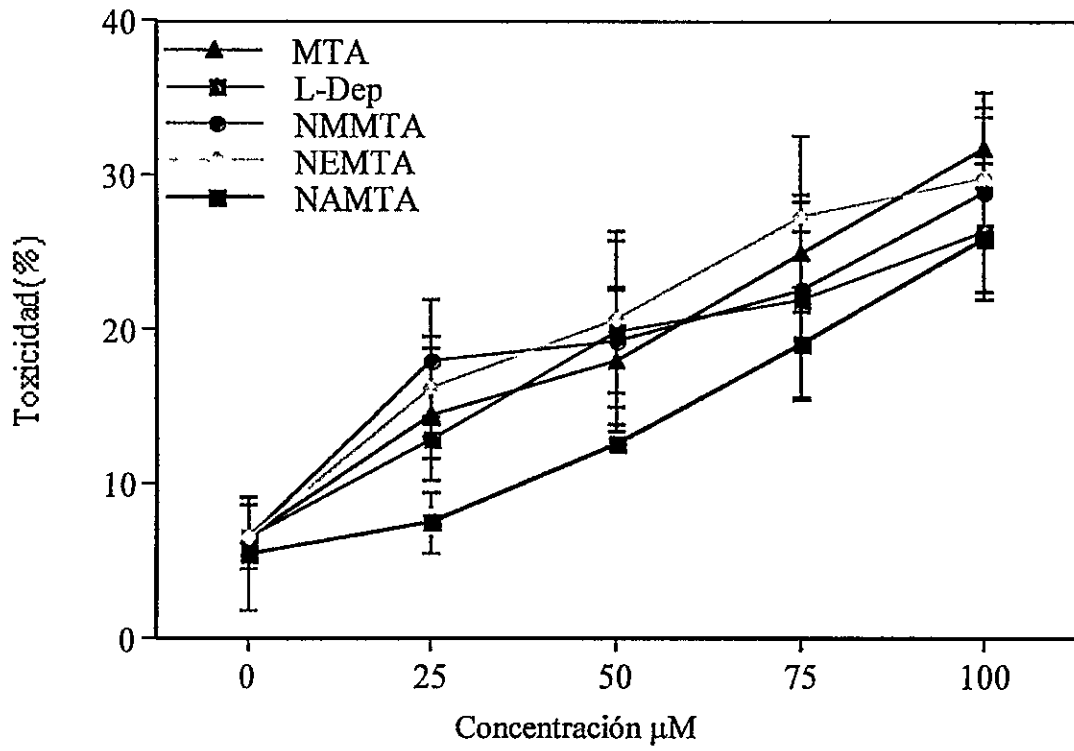
Compuesto [10 ⁻⁵ M]	Porcentaje de inhibición de MAO-A		
	0 (min)	30 (min)	60 (min)
MTA	3.8 ± 5.16	3.7 ± 6.4	8.2 ± 8.2
NMMTA	15.6 ± 3.1	9.7 ± 5.7	6.7 ± 4.2
NEMTA	17.8 ± 4.2	15.0 ± 5.8	7.6 ± 13.3
DMMTA	14.4 ± 1.6	2.3 ± 4.0	14.0 ± 11.4
DEMTA	21.2 ± 1.4	32.5 ± 4.3	15.3 ± 7.6
NAMTA	35.6 ± 3.6	34.3 ± 9.0	35.0 ± 2.9
DAMTA	5.8 ± 5.4	2.3 ± 4.0	25.7 ± 4.7
MTAB	0.0 ± 2.7	5.7 ± 7.4	16.3 ± 9.1
(-)-MTA	2.0 ± 3.4	3.0 ± 3.0	5.3 ± 4.6
(+)-MTA	2.0 ± 3.3	13.7 ± 12.7	15.0 ± 13.5
L-Deprenil [10 ⁻⁸ M]	2.0 ± 0.2	65.3 ± 4.0*	81.0 ± 0.1*

* P < 0.05 en el test de Student, comparado con tiempo cero de preincubación

-Neurotoxicidad

Se evaluó el efecto de MTA y sus derivados monoalquilados sobre la muerte de células de sustancia negra en cultivo que presentan características de células dopaminérgicas. Los resultados resumidos en la figura 17 indican que todas las drogas evaluadas (derivados monoalquilados de MTA), entre las cuales fue incluido L-deprenil, presentan bajos niveles de toxicidad de una manera dependiente de la concentración. No se observan diferencias significativas entre las diferentes drogas evaluadas, excepto NAMTA, que es menos tóxica que el resto de las moléculas. Ninguna de las drogas evaluadas origina tasas de muerte celular mayores al 30 % a concentraciones tan altas, en un contexto farmacológico, como 100 μ M. Un aspecto que es muy interesante es que las nuevas fenilisopropilaminas evaluadas en esta tesis presentan valores de toxicidad, en el sistema de estudio, muy similares al L-deprenil, droga que es actualmente utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Esto podría tener implicancias en el sentido de reabrir la investigación con derivados de fenilisopropilamina que presentan características de inhibidores de MAO y eventualmente liberadores de serotonina, con potenciales aplicaciones en el campo de la farmacología antidepresiva.

Figura 17: Efecto neurotóxico de MTA y sus derivados monoalquilados sobre células de sustancia negra



CONCLUSIONES

La potencia como inhibidores de MAO-A de los derivados de MTA disminuye con el aumento del impedimento estérico sobre el átomo de nitrógeno. Esta inhibición es dependiente del largo de la cadena alquílica y del número de sustituyentes sobre el nitrógeno.

El derivado *N*-alil-MTA presenta baja potencia como inhibidor de MAO-A y también presenta baja actividad como inhibidor de MAO-B. Esto es importante ya que es la única molécula evaluada que presenta algún grado de actividad como IMAO-B y podría representar un compuesto guía para la búsqueda de nuevos inhibidores de esta isoforma de la enzima.

El enantiómero (S)-(+) es dos veces más potente que la mezcla racémica y es la droga más potente evaluada en esta tesis.

REFERENCIAS

- Ahuya S. 1991, Chiral Separations by Liquid Chromatography, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Allinger N. L. and Eliel E. L. 1971, Topics in Stereochemistry, Vol 6, Wiley-Interscience, New York.
- Arai Y., Kim S. K., Kinemuchi H., Tadano T., Satoh S-E., Satoh N. and Kisara K. 1990, Inhibition of brain type A monoamine oxidase and 5-hydroxytryptamine uptake by two amphetamine metabolites, *p*-hydroxyamphetamine and *p*-hydroxynorephedrine. *J Neurochem.* 55: 403-408.
- Ask A. L., Hogberg K., Schmidt L., Kiessling H and Ross S. B. 1982, (+)-4-Dimethylamino-2,α-dimethylphenethylamine (FLA 336(+)), a selective inhibitor of the A form of monoamine oxidase in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 31, 1401-1406.
- Ask A. L., Fagervall I., Florvall L., Ross S. B. and Ytterborn S. 1985, Inhibition of monoamine oxidase in 5-hidroxytryptaminergic neurons by substituted *p*-aminophenylalkylamines. *Br. J. Pharmac.* 85, 683-690.
- Bach A. W. J., Lan N. C., Johanson D. L., Abell C. W., Bembenek M. E., Kwan S. W., Seeburg P. H. and Shih J. C. 1988, cDNA cloning of human monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4934-4938.

Baldessarini R. J., 1996, en Goodman y Gilman's "The pharmacological basis of therapeutics", Ninth Edition, Editores Hardman J. G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W., Goodman A., Capítulo 19, pp 431, McGraw-Hill, N Y.

Baldessarini R. J., 1980, en Goodman y Gilman's "The pharmacological basis of therapeutics", Sixth Edition, Editores Goodman A., Goodman L., Gilman A. Capítulo 19, pp 391, Macmillan Publishing Co., Inc., N Y.

Baskov Yu. V., Urbański T., Witanowski M. and Stefaniak L. 1964, Isomeric nitropropenes and their nuclear magnetic resonance spectra. *Tetrahedron* 20, 1519-1526.

Benson S. C., Cai P., Colon M., Haiza M. A., Tokles M. And Zinder J.K. 1988, Use of Carboxylic Acids as Chiral Solvating Agents for Determination of Optical Purity of Chiral Amines by NMR Spectroscopy. *J. Org. Chem*, 53, 5335-5341.

Bieck P. R. and Antonin K.-H. 1994, Tyramine potentiation during treatment with MAOIs. In: *Clinical Advances in Monoamine Oxidase Inhibitor Therapies* (Ed. Kennedy S. H.), pp. 83-110, American Psychiatric Press, Washington DC.

Calderón Narvárez Guillermo 1984, *Depresión: Causas, manifestaciones y tratamiento*, Primera Edición, México, Trillas.

Cohen C., Curet O., Perrault G., Sanger D. J., 1999, Reduction of oral ethanol self-administration in rats by monoamine oxidase inhibitors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 535-9.

Corey E. J. and Estreicher H. 1978, A new synthesis of conjugated nitro cyclo olefins, unusually versatile synthetic intermediates. *J. Amer. Chem. Soc.* 100, 6294-6295.

Dale J. A. and Mosher H. S. 1973, Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Reagents. Configurational Correlations *via* Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of

Diastomeric Mandelate, *O*-methylmandelate, and *K*-Methoxy- *K*-trifluoromethylphenylacetate (MTPA) Esters. *J. Am. Chem. Soc.* 92:2, 512-519.

De Boer D., Egberts T and Maes R A., 1999. Para-methylthioamphetamine, a new amphetamine designer drug of abuse, *Pharm. World Sci.* 21(1), 47-48.

Dostert P., Benedetti M. S. and Guffroy C. 1983, Different stereoselective inhibition of monoamine oxidase-B by the R- and S-enantiomers of MD 780236, *J. Pharmacol. Pharmacol.* 35, 161-165.

Elieil E. L. 1962, *Stereochemistry of Carbon Compounds*, McGraw-Hill, Series in Advanced Chemistry, New York.

Florvall L., Ask A.-L., Ögren S.-O and Holm A.-C. 1983, Selective monoamino oxidase inhibitors. II. 4-aminophenylalkylamine derivatives. *Acta Pharm. Suec.* 20, 255-270.

Florvall L., Ask A.-L., Ögren S.-O. and Ross S. B. 1978, Selective MAO inhibitors. Compounds related to 4-aminophenethylamine. *J. Med. Chem.* 21, 56-63.

Florvall L., Ask A.-L., Fagervall I. and Ross S. B. 1986, Selective MAO inhibitors. 4. 4-aminophenethylamine derivatives with neuron selective action: *J. Med. Chem.* 29, 2250-2256.

Fuller R. W. and Hemrick-Luecke S. K. 1982, Influence of ring and side chain substituents on the selectivity of amphetamine as a monoamine oxidase inhibitor. *Res. Commun. Substance Abuse* 3, 159-164.

Garbarino J. A. 1984, *Introducción a la Estereoquímica*, Secretaría General de la Organización de Estados Americanos, Washington, D.C.

- Green A. L. and El Hait M. A. S. 1980, *p*-Methoxyamphetamine, a potent reversible inhibitor of type-A monoamine oxidase *in vitro* and *in vivo*. J. Pharm. Pharmacol. 32, 262-266.
- Green L. D. and Dawkins K., 1997 Antidepressant Agents, en "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery", Vol 5: Therapeutic agents, Ed. Manfred E. Wolff, John Wiley and Sons, N.Y.
- Holland G. F. 1964, U.S. Patent 3,117,160.
- Hoye T. R. and Renner M. K. 1996. Applications of MTPA(Mosher) amides of secondary amines: Assignment of absolute configuration in chiral cyclic amines. J. Org. Chem. 61, 24, 8489-8495.
- Huang X., Marona-Lewicka D. and Nichols D. E. 1992, *p*-Methylthioamphetamine is a potent new non-neurotoxic serotonin-releasing agent. Eur. J. Pharmacol. 229, 31-38.
- Hurtado-Guzmán C., Iturriaga P., Zapata-Torres G. And Cassels B.K.,2001 Conformational study by AM1 of 1,4-disubstitued nitrostyrene series and full characterization by one- and two-dimensional NMR of (*E*) and (*Z*)-1-(4-methylthiophenyl)-2-nitrobutenes. En redacción final.
- Johnston J. P. 1968, Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in human brain. Biochem. Pharmacol. 17, 1285-1297.
- Jennings W. B., 1975, Chemical Shift Nonequivalence in Prochiral Groups, Chem. Rev., 75, 3, 307-322.
- Kumar Y., Florvall L., Ask A.-L., Ross S. B., Holm A.-C. and Ögren S.-O. 1983, Selective monoamine oxidase inhibitors. Compounds derived from phenethylamine and 1-phenoxy-2-aminopropane. Acta Pharm. Suec. 20, 349-364.

- Lane R. M. and Baker G. B. 1999, Chirality and drugs Used in Psychiatry: Nice to Know or Need to Know?. 19, 3, 355-372
- Leonardi E. T. And Azmitia E. A. 1994, MDMA (Ecstasy) Inhibition of MAO Type A and Type B: Comparision with Fenfluramine and Fluoxetine (Prozac). Neuropsychopharmacol. 10, 4, 231-237.
- Li Q., Nurakami I., Stall S., Levy A. D., Brownfield M. S., Nichols D. E., Van de Kar L. D., 1996, Neuroendocrine pharmacology of three serotonin releasers: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butane (MBDB), 5-methoxy-6-methyl-2-aminoindan (MMAi) and p-methylthioamphetamine (MTA), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 3, 1261-1267.
- Mantle T. J., Tipton K. F.. and Garrett N. J. 1976, Inhibition of monoamine oxidase by amphetamine and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* 25, 2073-2077.
- March J. 1992, "Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure", Fourth Edition, John Wiley and Sons Inc., New York.
- Marona-Lewicka D. and Nichols D. E. 1997. The effect of selective serotonin releasing agents in the chronic mild stress model of depression in rats. *Stress*, 2, (2), 91-100.
- Möller H.-J. and Paykel E. S. (Eds.) 1992, Renaissance of Monoamine Oxidase Inhibitors: the New Selective and Reversible Generation. Royal Society of Medicine, London.
- Murphy D. L. 1978, Substrate-selective monoamine oxidases. *Biochem. Pharmacol.* 27, 1889-1893.
- Murphy D. L., Aulakh C. S., Garrik N. A. and Sunderland T. 1987, Monoamine oxidase inhibitors as antidepressants: implication for the mechanism of action of antidepressants

and the psychobiology of the affective disorders and some related disorders. en "Psychopharmacology: The Third Generation of Progress" (Ed. Meltzer H. Y.), pp. 545-552. Raven Press, New York.

Newman Paul, 1980, "Optical Resolution Procedures for Chemical Compounds, Vol 1 Amines and Related Compounds", Manhattan College, New York.

Nichols D.E., 1994, en "Amphetamine and Its Analogs. Psychopharmacology, Toxicology and Abuse. Cho A. K and Segal D S. Eds. pp 3-41. Academic Press, San Diego, California.

Nieforth K. A., and Cohen M. L., 1981, en "Principles of Medicinal Chemistry", Second Edition, Editor Foye W. O., Capítulo13, pp 303, Lea and Febiger, Philadelphia.

Node M., Kawabata T., Fujimoto M. and Fuji K. 1984, General Synthesis of 1-Ethylthio-2-nitroolefins. *Synthesis*, 234-237.

Nystrom R. F. and Brown W. G. 1948, Reductions of Organic Compounds by Lithium Aluminium Hydride. III. Halides, Quinones Miscellaneous Nitrogen Compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 70 3737-3740.

Paris I., Dagnino-Subiabre A., Marcelain K., Bennett L B., Caviedes P., Caviedes R., Olea-Azar C. and Segura-Aguilar J., 2001, Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper uptake and one-electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. *J. Neurochem.* 77, 519-529.

Phillips M., Tiller J. W., Baier D., Kohnen R. 2000, Comparison of moclobemide with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on sexual function in depressed adults. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 10, 305-14.

- Reyes-Parada M., Scorza M. C., Silveira R., Dajas F., Costa G., Tipton K. F. and Cassels B. K. 1994, Monoamine oxidase inhibitory effects of some 4-aminophenethylamine derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1365-1371.
- Roberts D. A. 1994, "Medicinal Chemistry: Principles and Practice", Capítulo 3, p 36, Editor King F. D., The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Robinson J. B. 1985, Stereoselectivity and Isoenzyme Selectivity of Monoamine Oxidase Inhibitors. Enantiomers of amphetamine, *N*-methyamphetamine and Deprenyl. 34, 23, 4105-4108.
- Salvatore R. N., Nagle A. S., Schmidt S. E. and Jung K W. 1999, Cesium Hydroxide Promoted Chemoselective *N*-Alkylation for the Generally Efficient Synthesis of Secondary Amines, *Organic Letters*, 1, 12, 1893-1896.
- Sanders-Bush E., Mayer S. E., 1996, en "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, Editors Hardman J. G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W., Goodman A., Capítulo 11, pp 249, McGraw-Hill, N Y.
- Scorza M. C., Silveira R., Zapata-Torres G., Cassels B. K. And Reyes-Parada M., 1999. Monoamine oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 54, 1361-1369.
- Scorza M. C., Silveira R., Nichols D., Reyes-Parada M., 1999. Effects of 5-HT-releasing agents on the extracellular hippocampal 5-HT of rats. Implications for the development of novel antidepressants with a short onset of action. *Neuropharmacol.* 38, 1055-1061.
- Shulgin A. and Shulgin A. 1991, "PIHKAL, A Chemical Love Story", Transform Press, Berkeley.

Shulman K. I. 1994, Dietary issues and the "irreversible" MAOIs. En "Clinical Advances in Monoamine Oxidase Inhibitor Therapies" (Ed. Kennedy S. H.), pp. 111-124, American Psychiatric Press, Washington DC.

Silverstein R. M., Bassler G. C and Morrill T.C. 1991, Spectrometric identification of organic compounds, John Wiley and Sons Inc. New York.

Solomons T. W. G., 1988 Química Orgánica, pp 864, Editorial Limusa, Mexico.

Thomas T. 2000, Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 343-348.

Suzuki O., Oya M. And Katsumata Y. 1980, Characterization of *N*-methylphenylethylamine and *N*-methylphenylethanolamine as substrates for type A and type B monoamine oxidase. 29, 3663-2667.

Suzuki O., Hattori H., Asano M., Oya M. And Katsumata Y. 1980, Inhibition of monoamine oxidase by d-amphetamine. *Biochem. Pharmacol.* 29, 2071-2073.

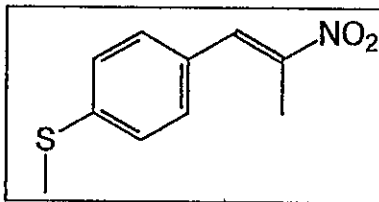
Ulus I. H., Maher T. J. and Wurman R. J. 2000, Characterization of Phentermine and Related Compounds as Monoamine Oxidase (MAO) Inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1611-1621.

Waldmeier P. C., Amrein R. and Schmid-Burgk W. 1994, Pharmacology and pharmacokinetics of brofaromine and moclobemide in animals and humans. En "Clinical Advances in Monoamine Oxidase Inhibitor Therapies" (Ed. Kennedy S. H.), pp. 33-59, American Psychiatric Press, Washington DC.

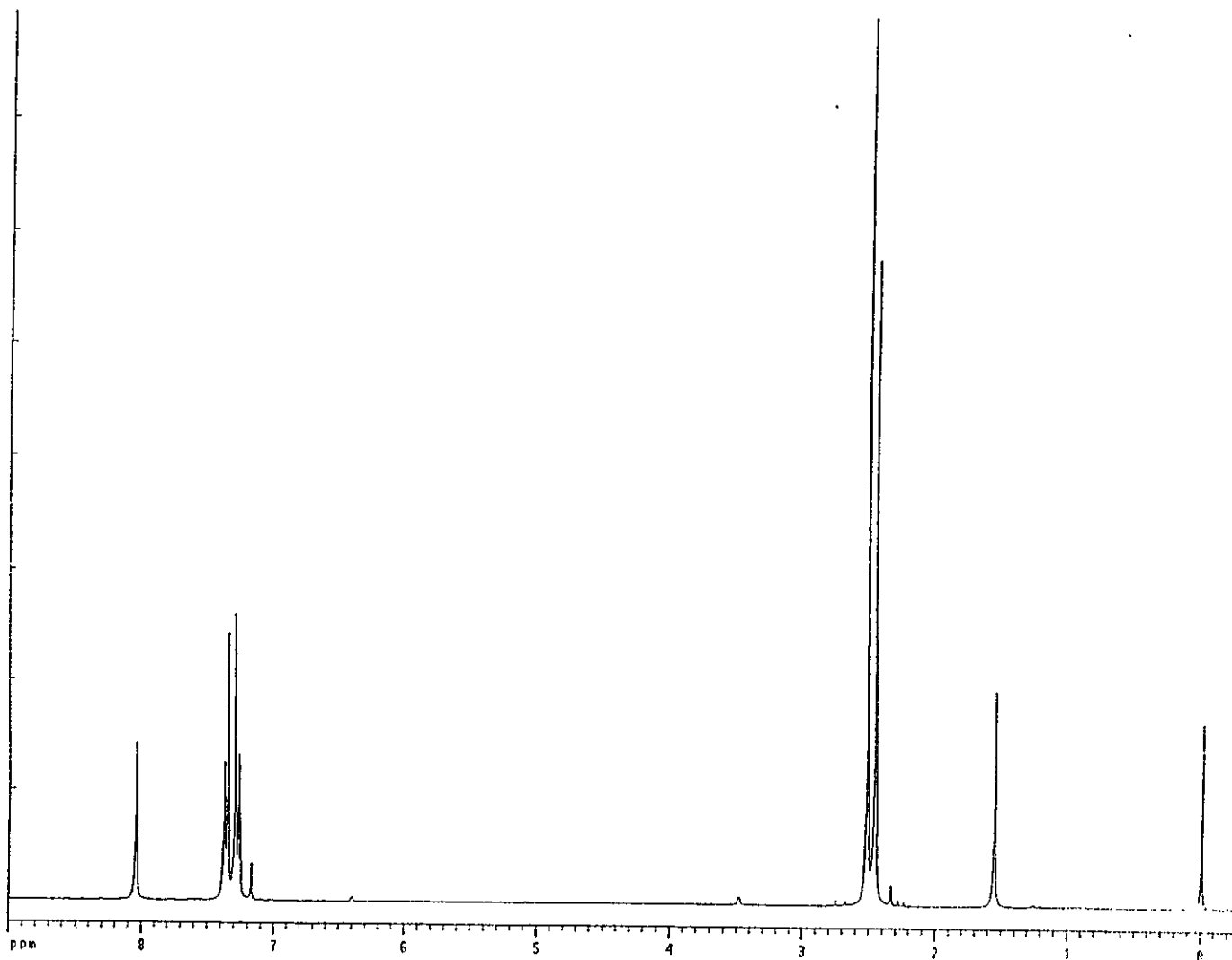
Wilen S. H., Collet A. and Jacques J. 1977, Strategies in Optical Resolutions, *Tetrahedron*, 33, 2725-2736.

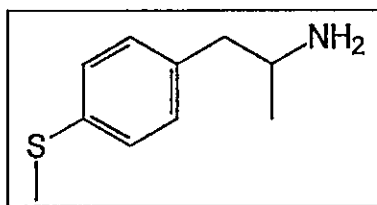
Wolff M. E. 1997, "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery", Fifth edition, Volumen V: Therapeutic Agents, Wiley-Interscience Publication, New York.

Youdim M. B. H. 1983, Implications of MAO-A and MAO-B inhibitors for antidepressant therapy. *Mod. Prob. Pharmacopsychiat.* 19: 63-74.

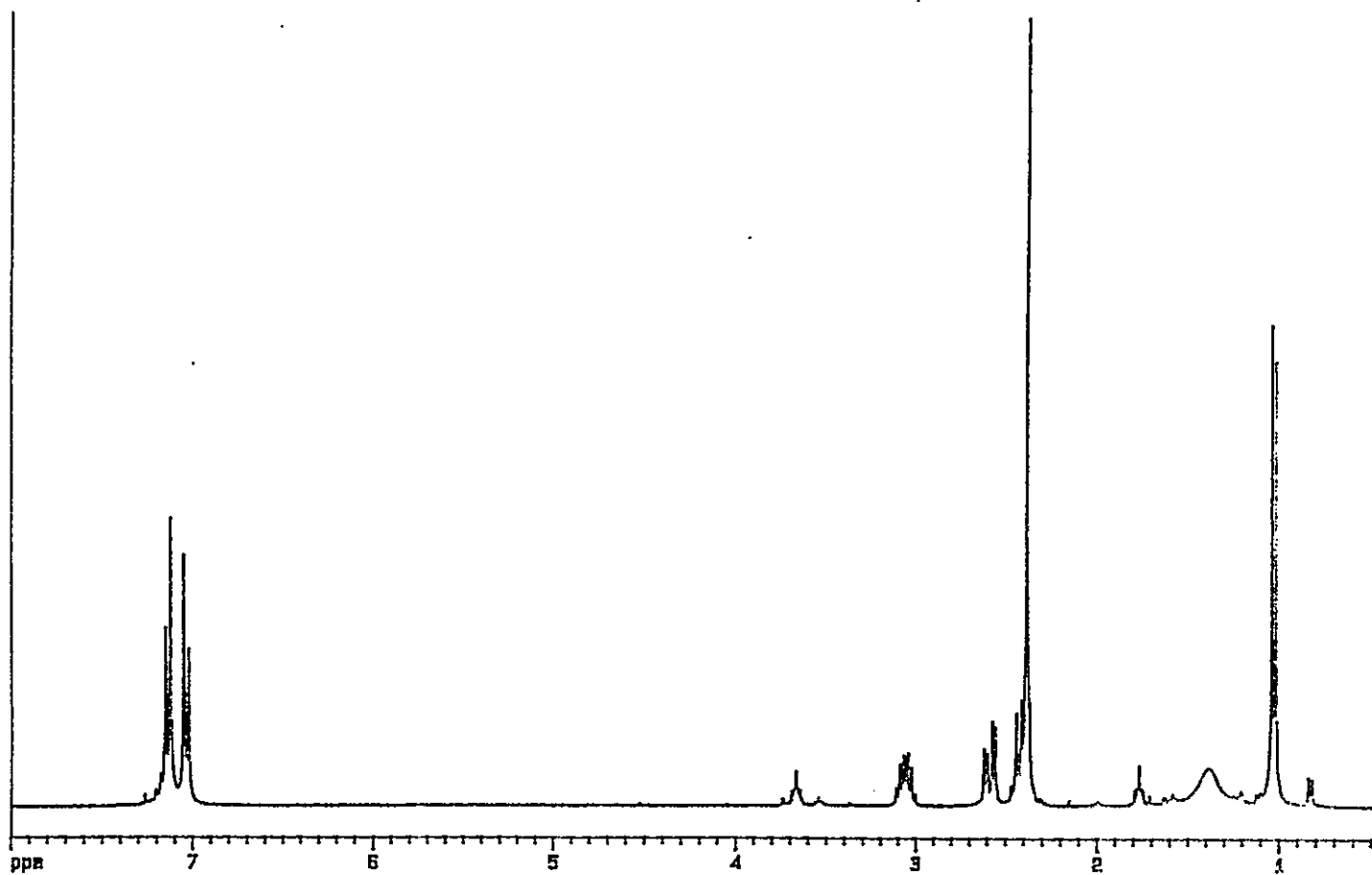
ANEXO 1: ESPECTROS ^1H -RMN

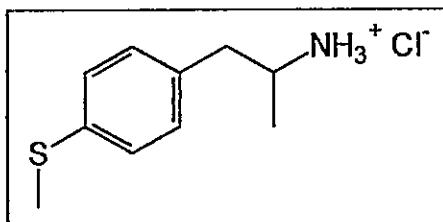
1-(4-Metiltiofenil)-2-nitropropeno (2)



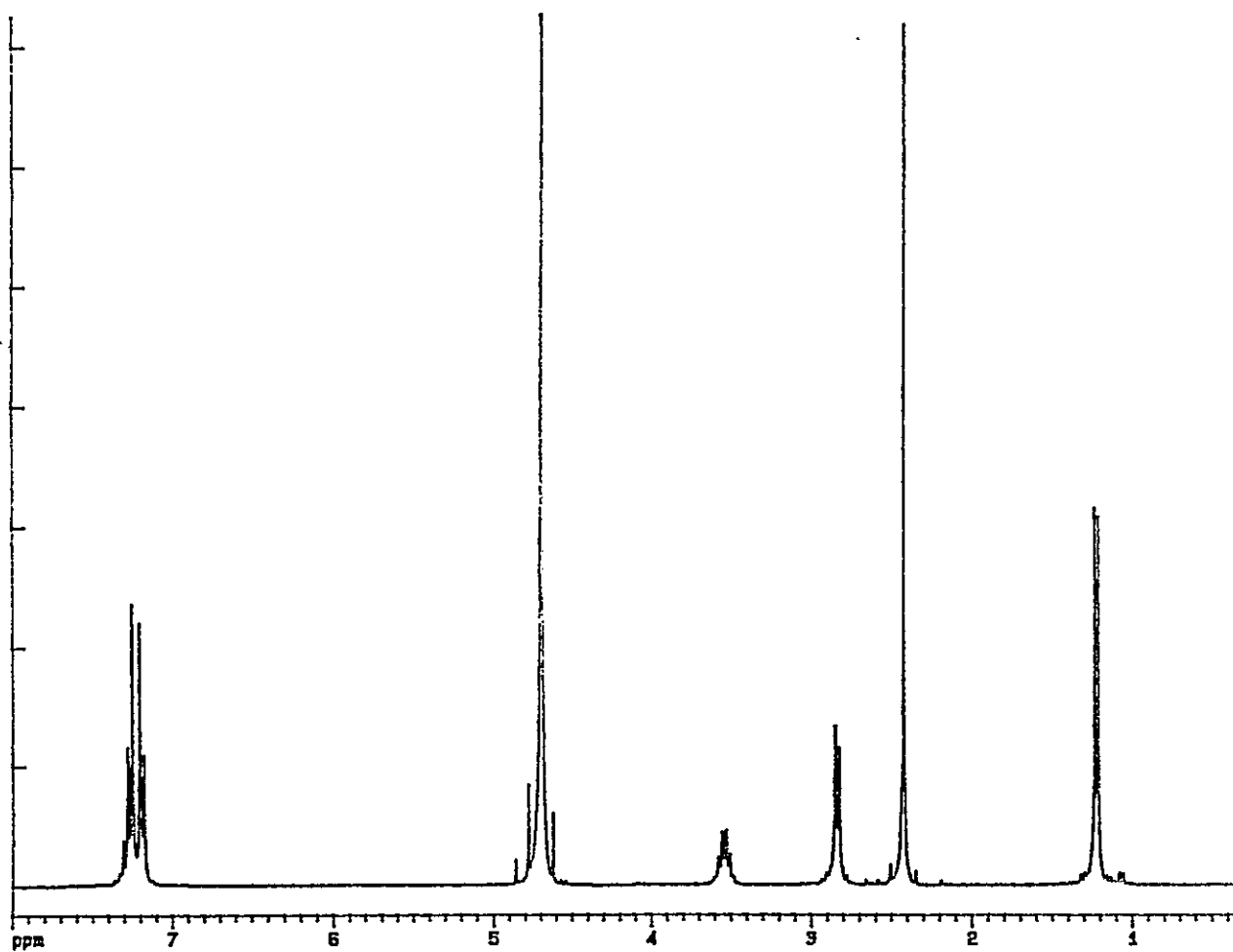


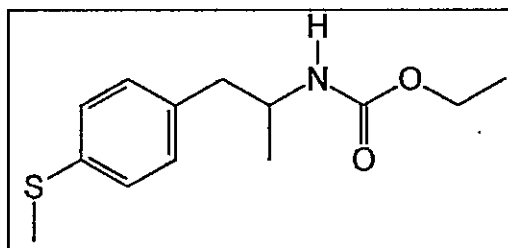
(±)-1-(4-Methylthiophenil)-2-aminopropano (MTA) (3)



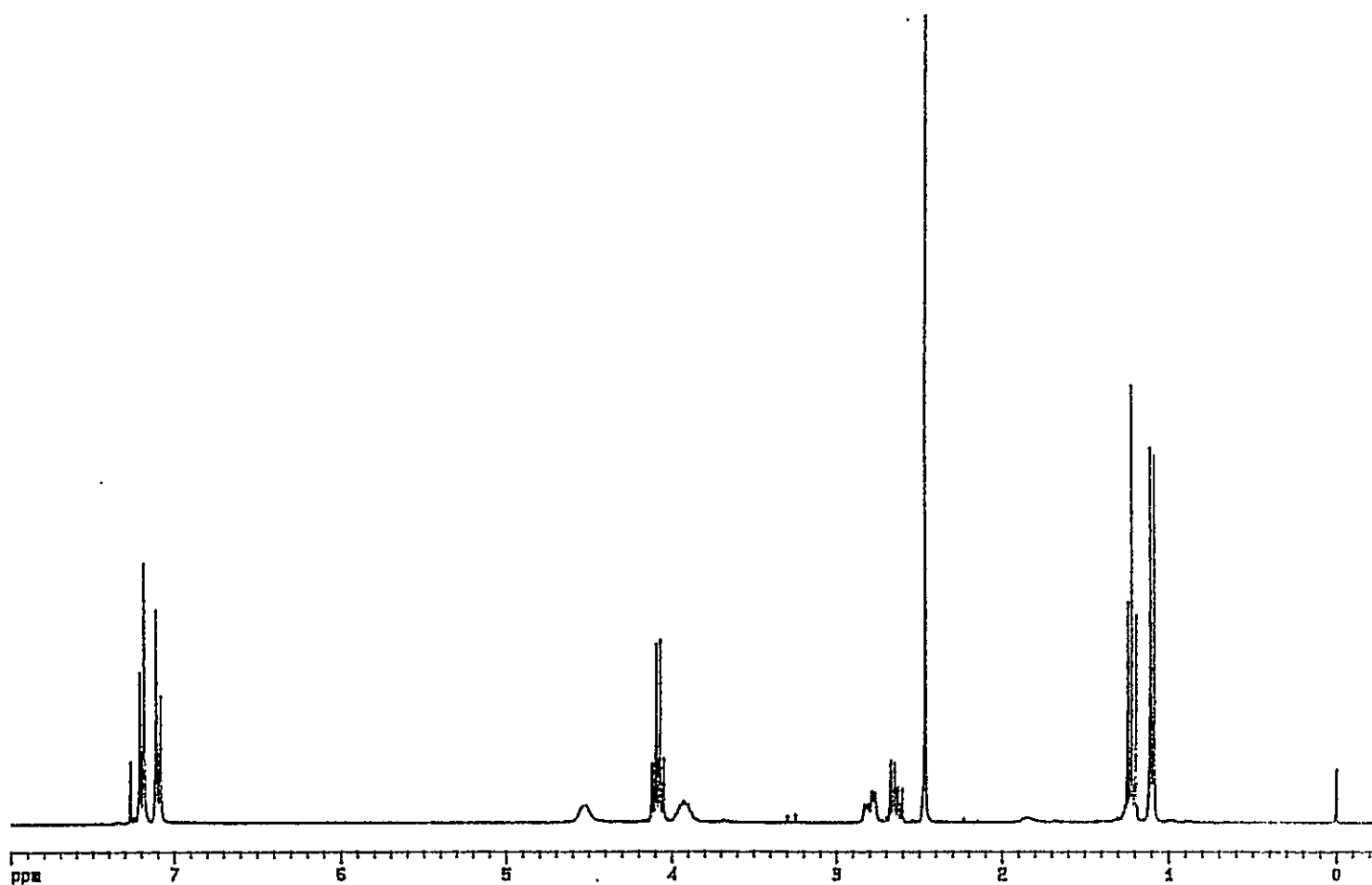


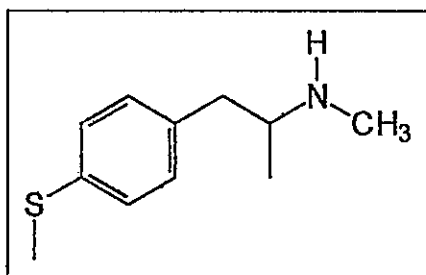
(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-aminopropano (clorhidrato) (MTA · HCl) (4)



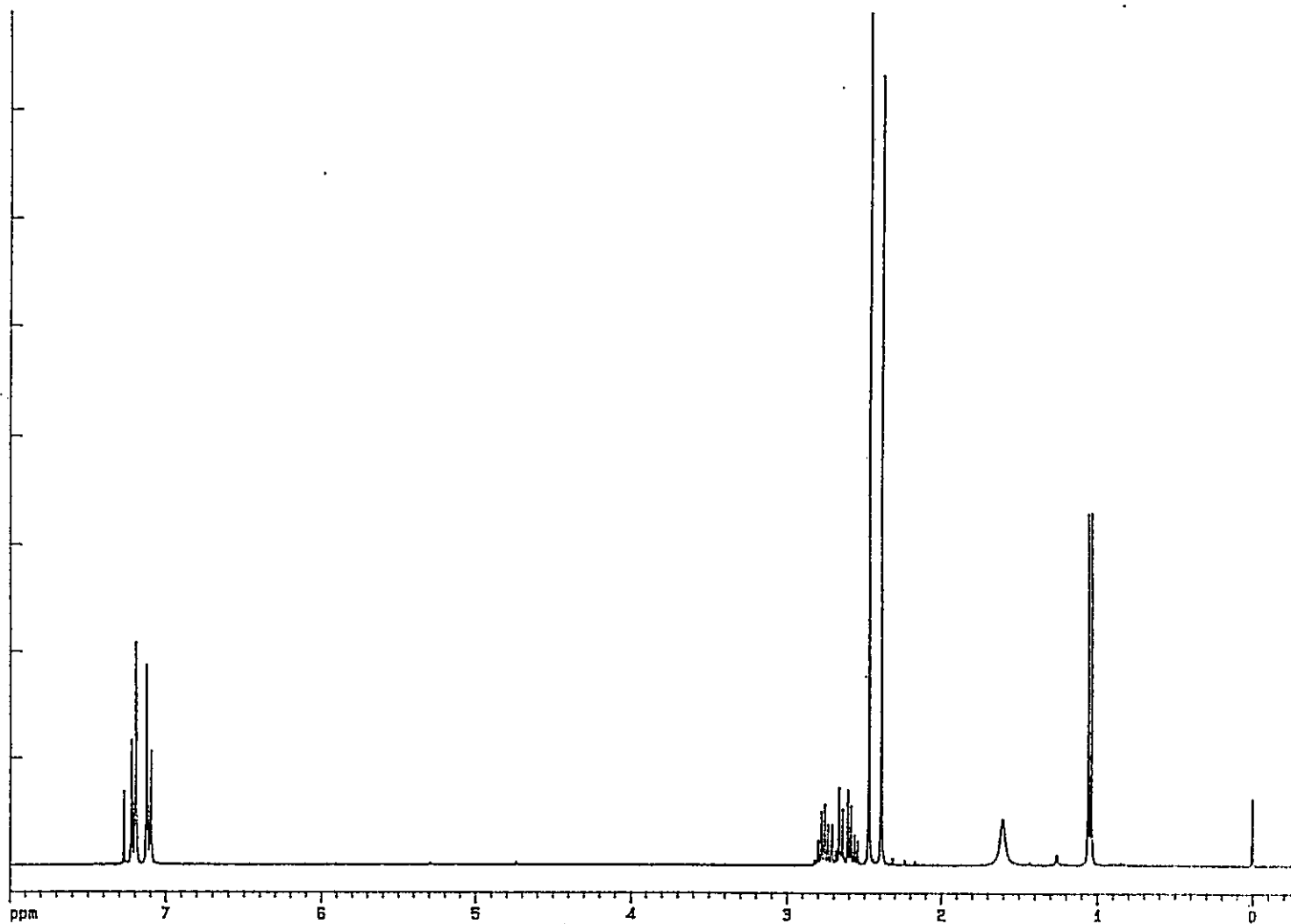


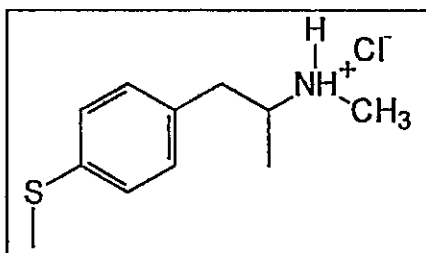
(±)-1-(4-Methyltiofenil)-2-N-ctoxicarbonilaminopropano (5)



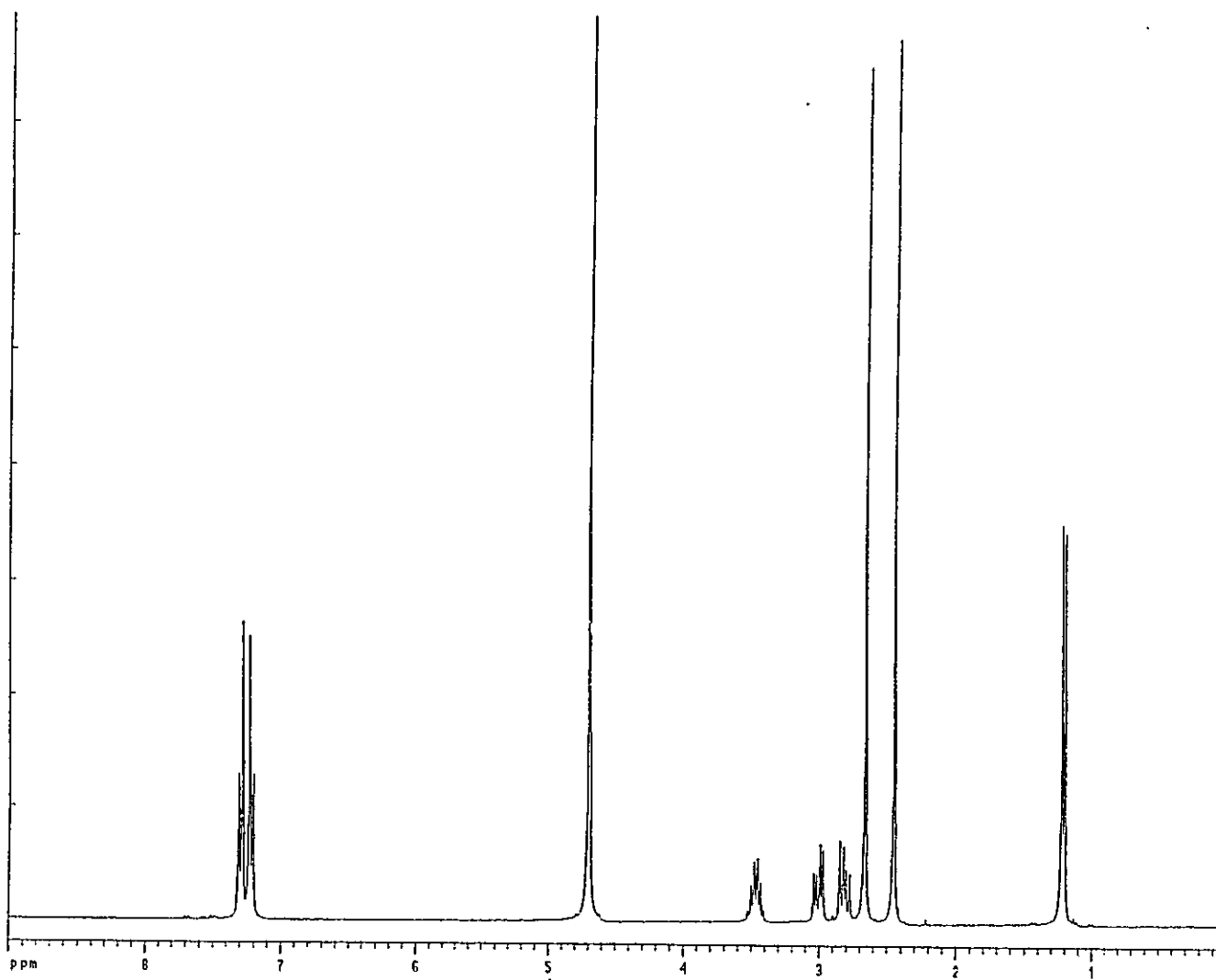


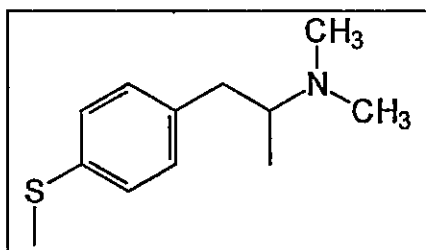
(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(N-metil)-aminopropano (NMMTA) (6)



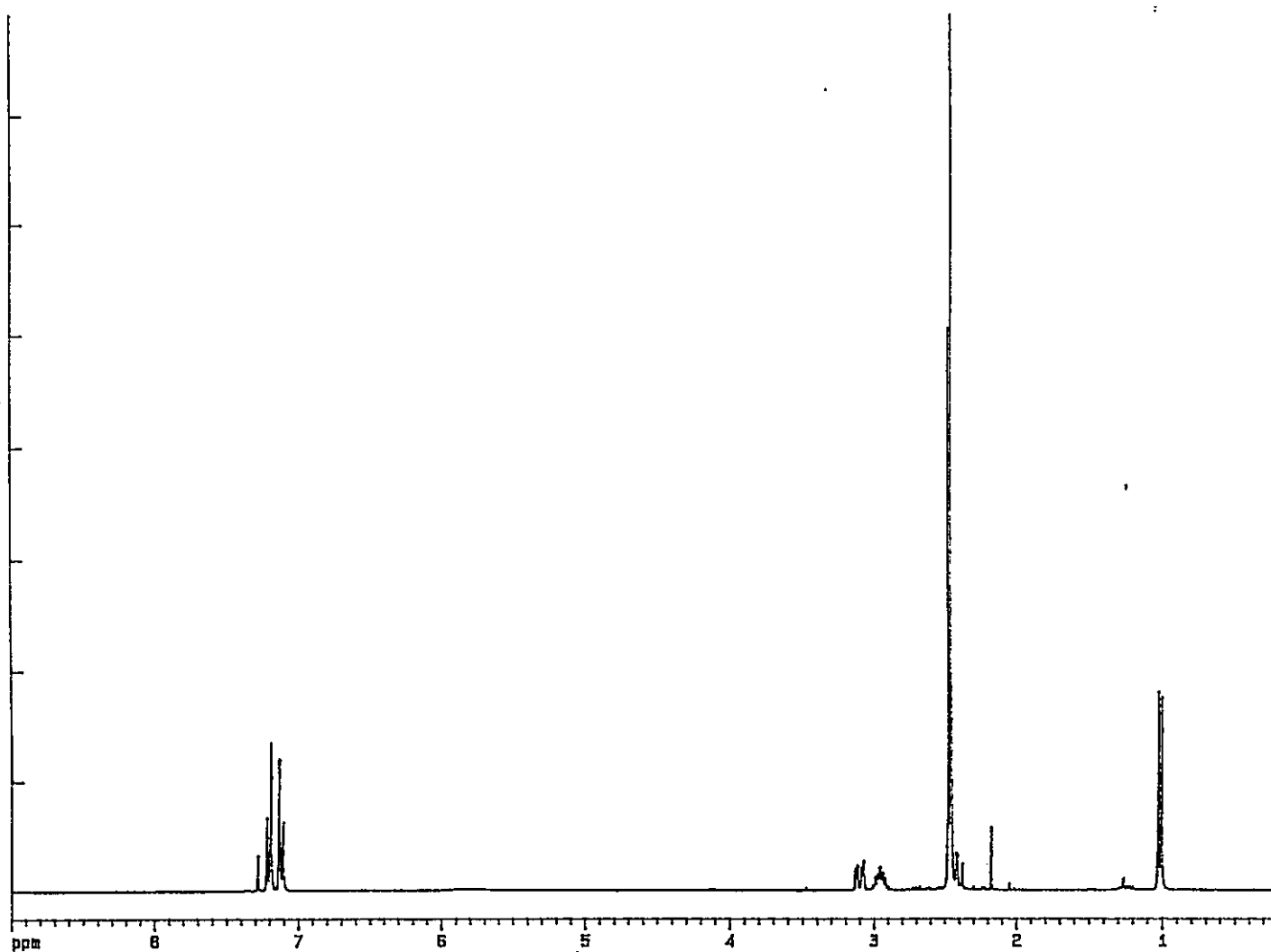


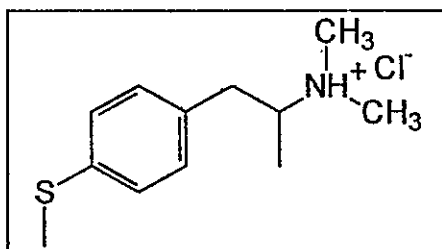
(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(*N*-metilamino)-propano (clorhidrato) (NMMTA·HCl) (7)





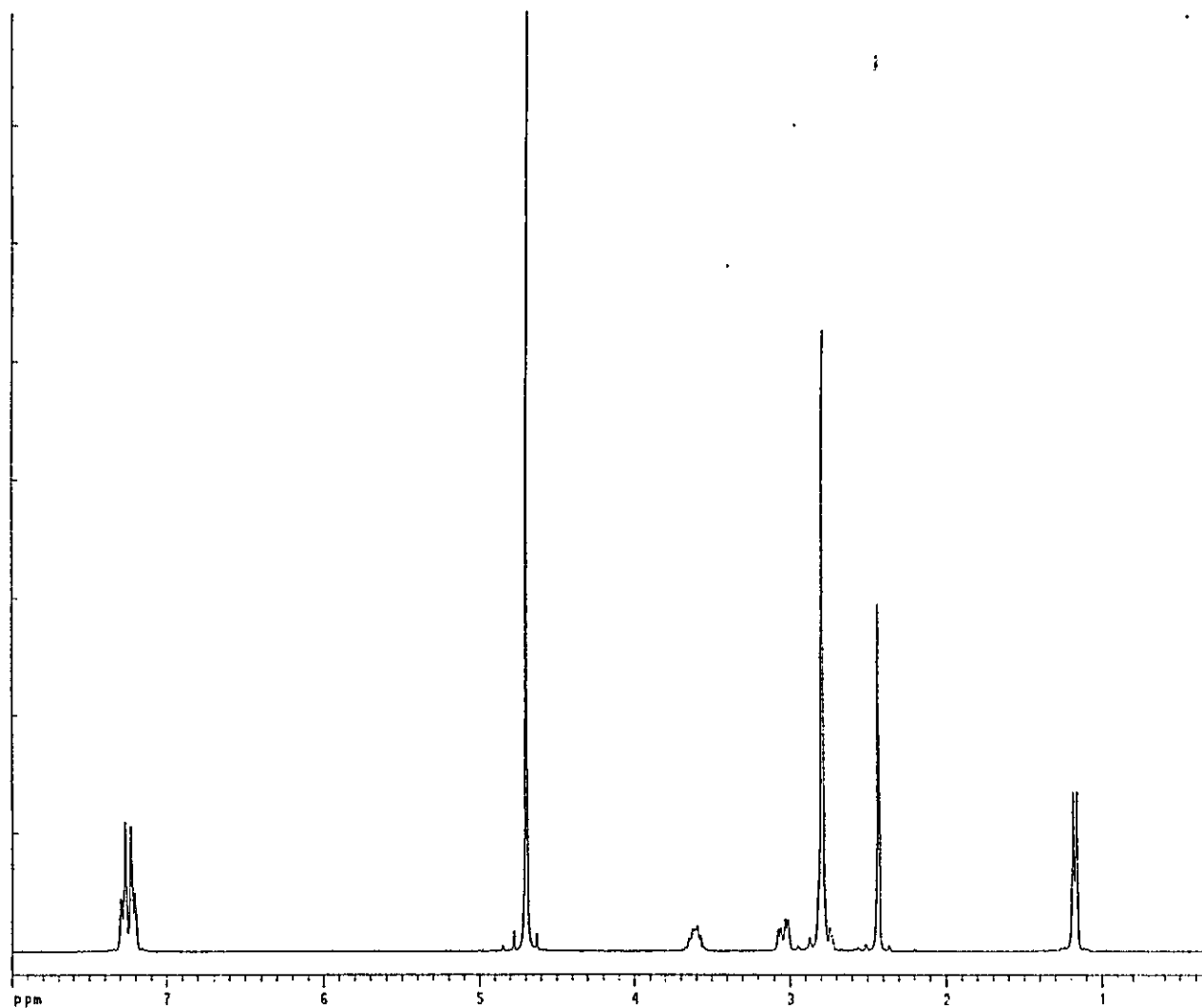
(±)-1-(4-Methylthiophenyl)-2-(*N,N*-dimetilamino)-propano (DMMTA) (8)

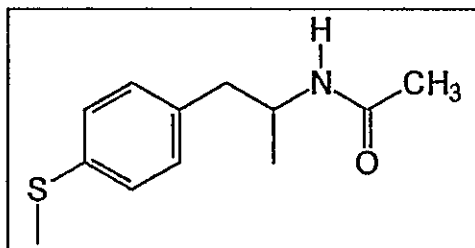




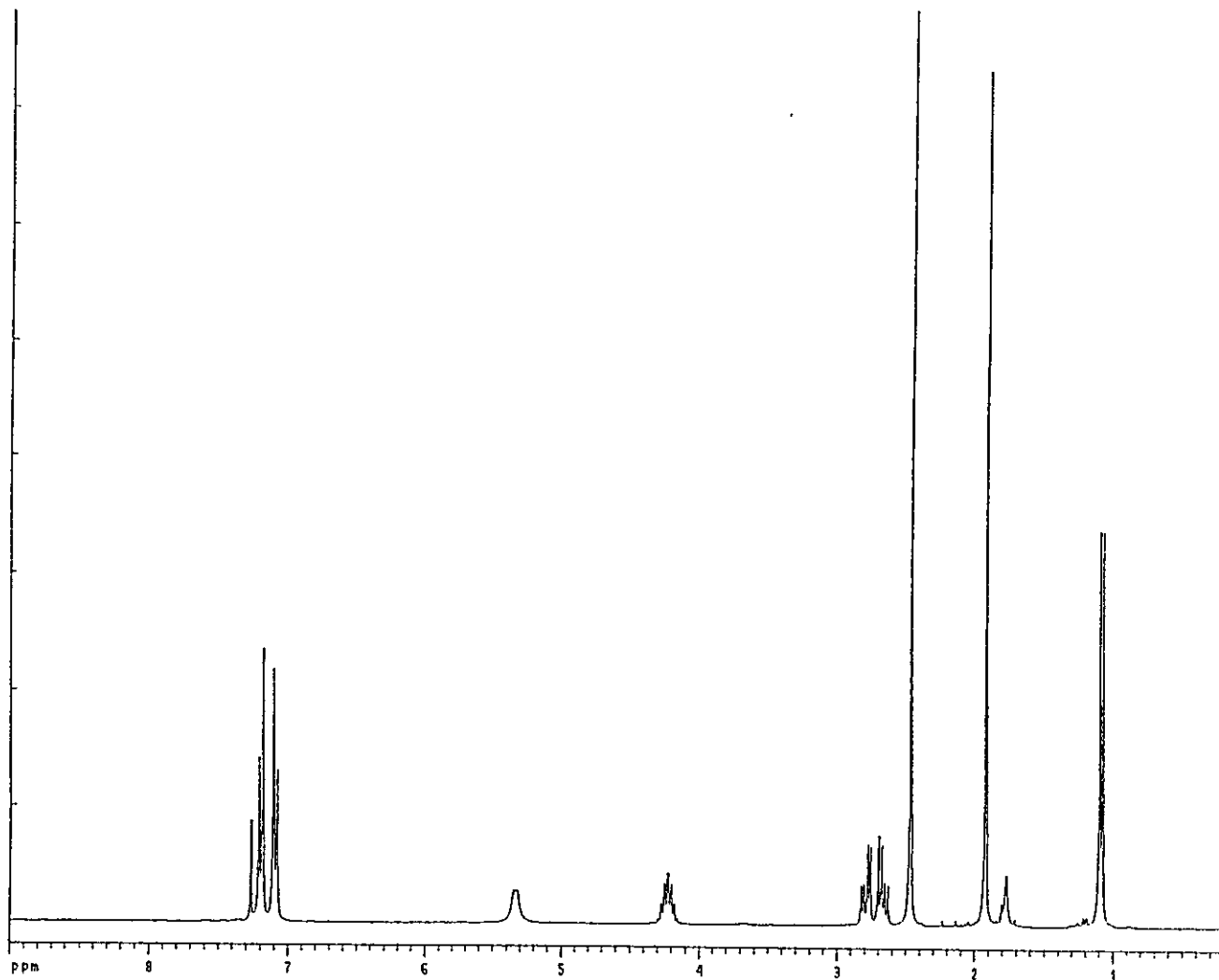
(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(*N,N*-dimetilamino)-propano(clorhidrato) (DMMTA·HCl)

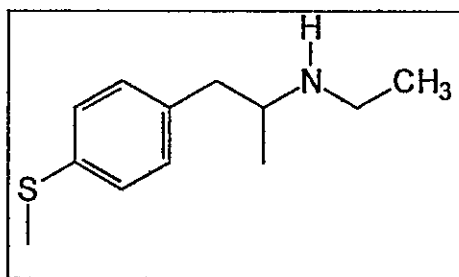
(9)



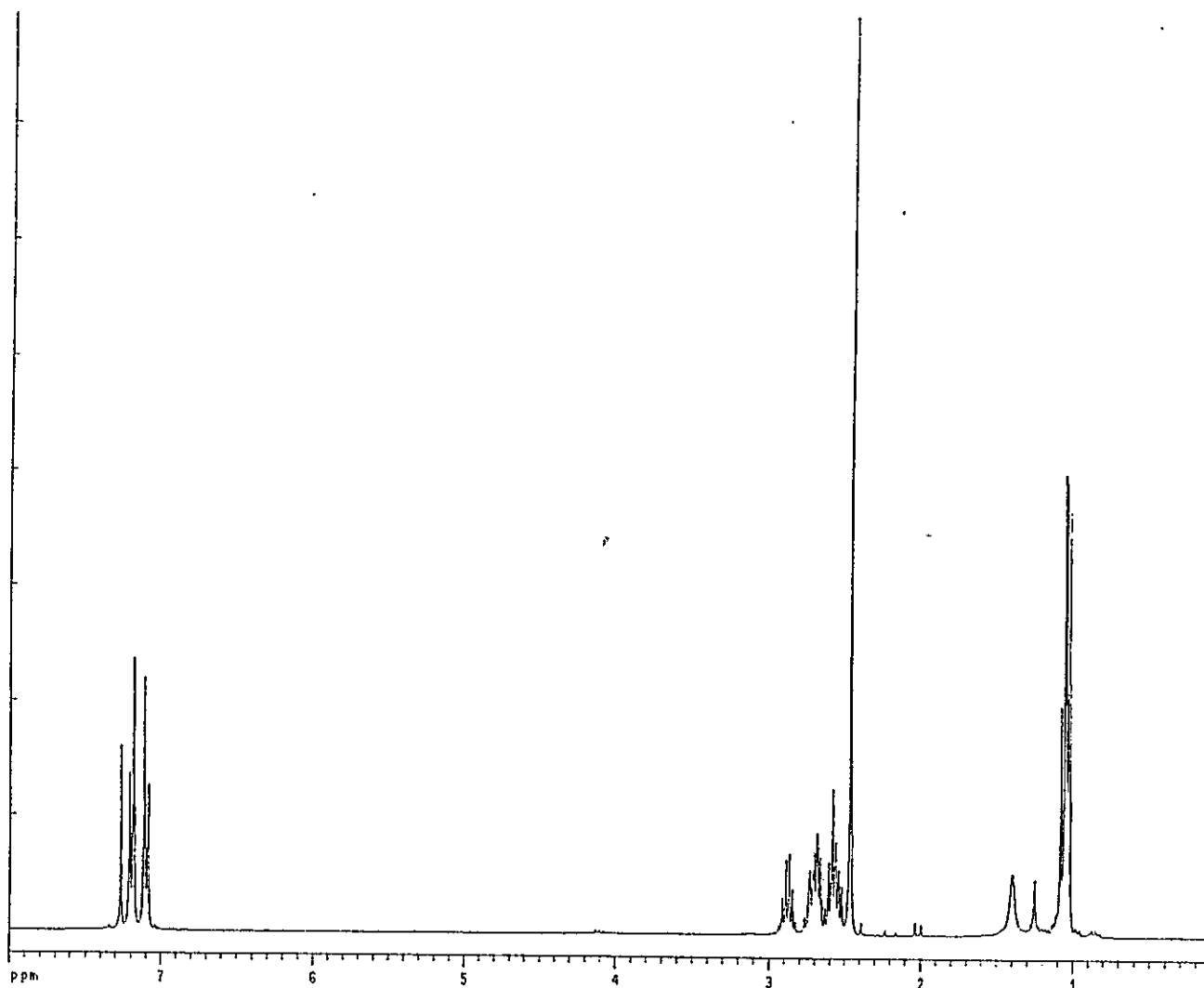


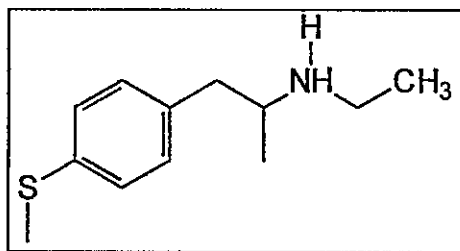
(±)-1-(4-Methylthiofenil)-2-acetamidopropano (AAMTA) (10)



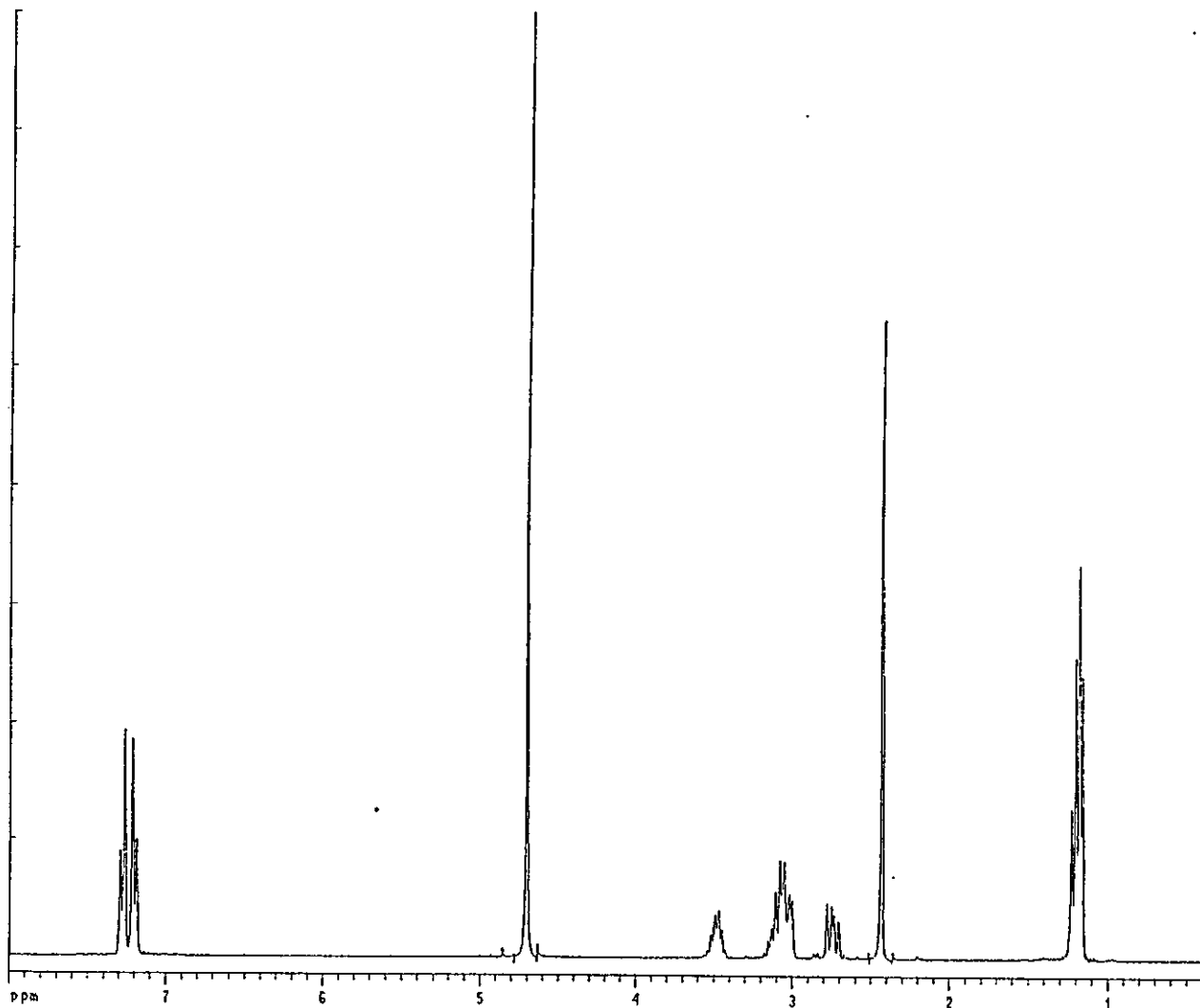


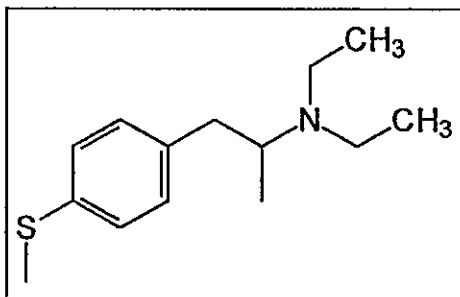
(±)-1-(4-Metiltiofenil)- 2-(N-etilamino)-propano (NEMTA) (11)



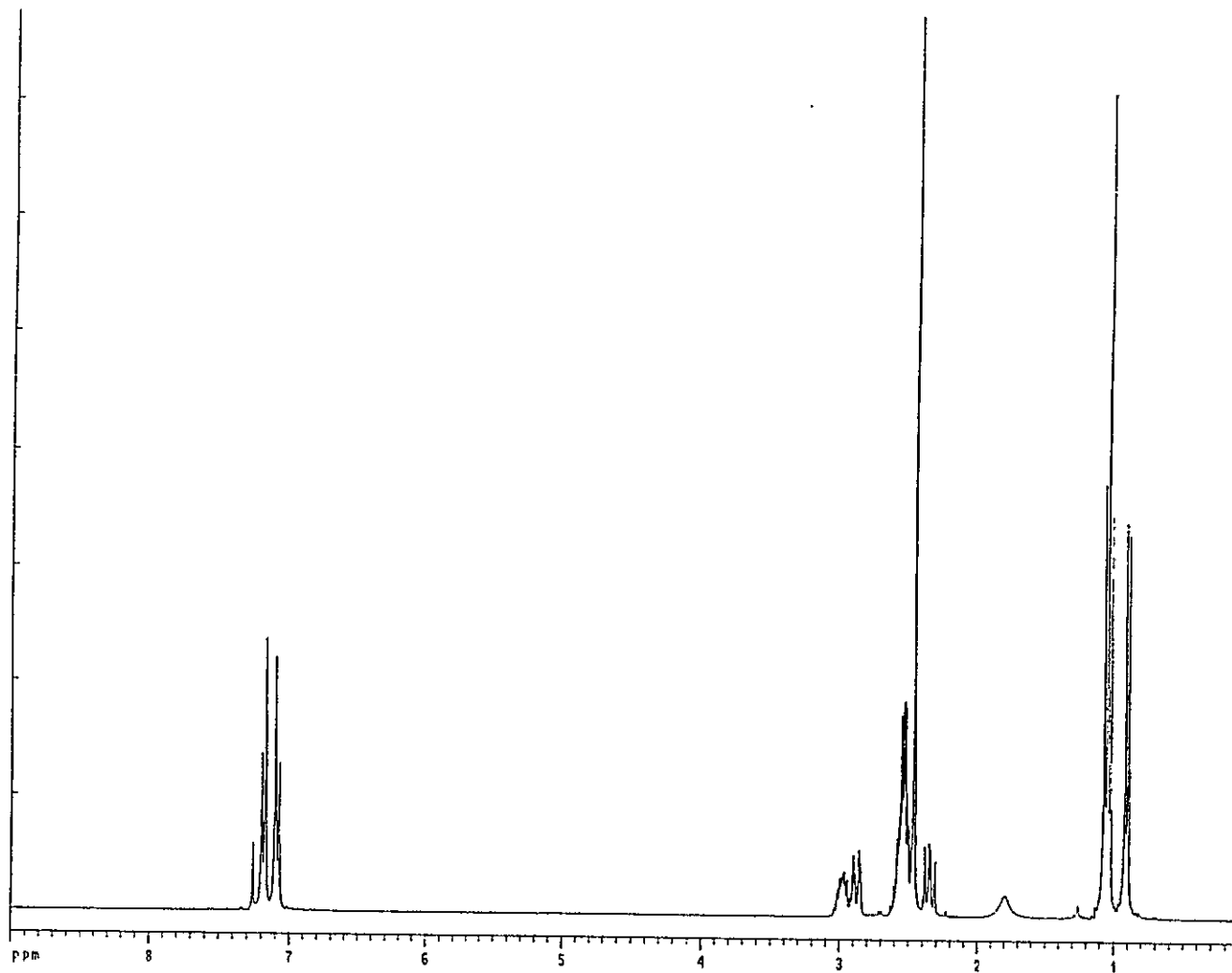


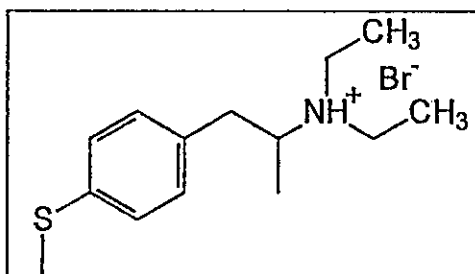
(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(N-etilamino)-propano (clorohidrato) (NEMTA · HCl) (12)





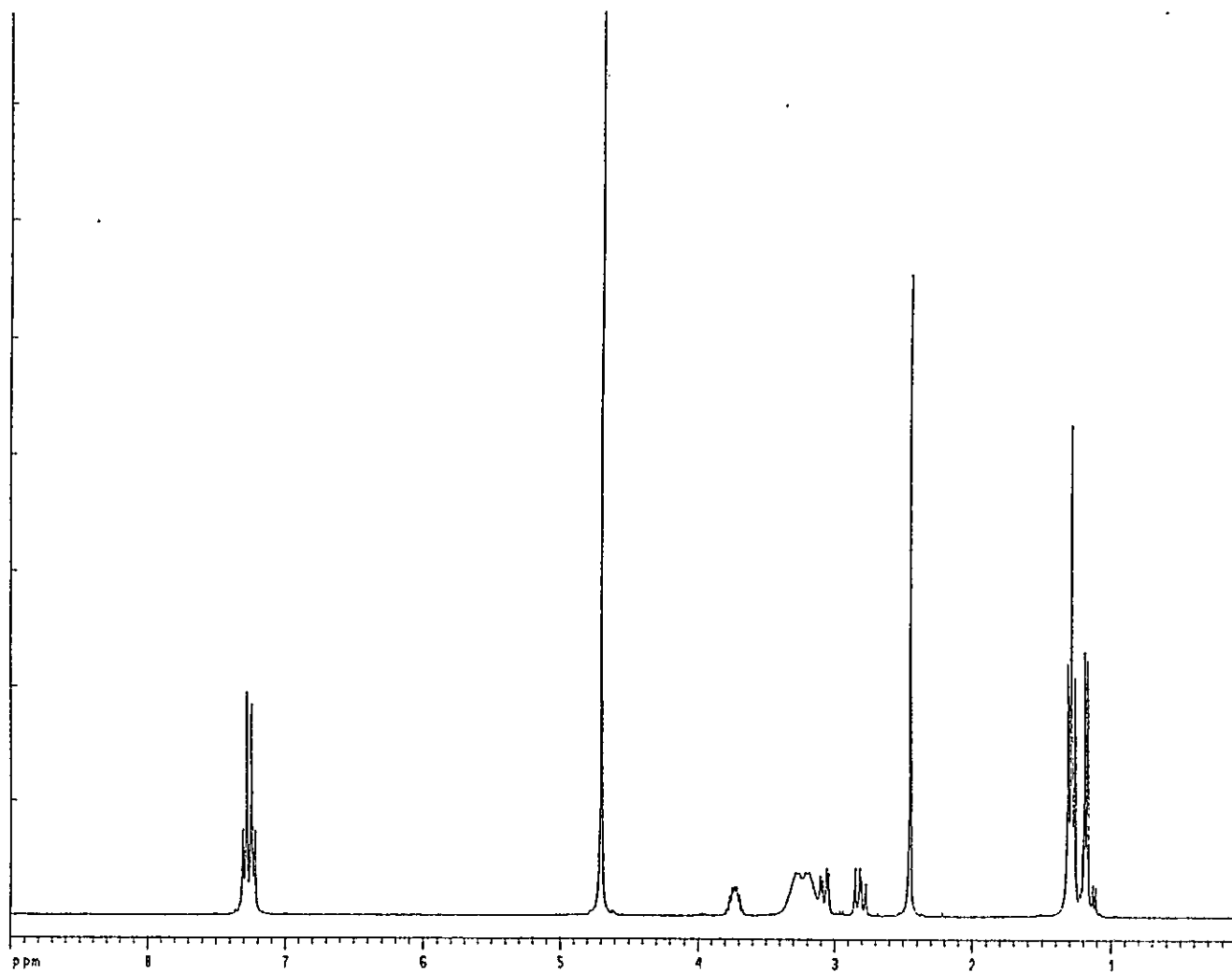
(±)-1-(4-Methylthiofenil)-2-(*N,N*-diethylamino)-propano (DEMTA) (13)

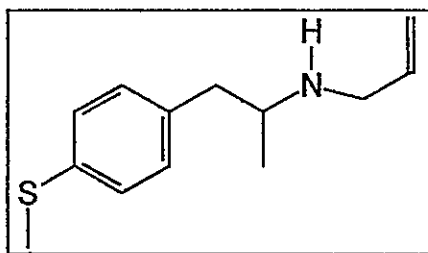




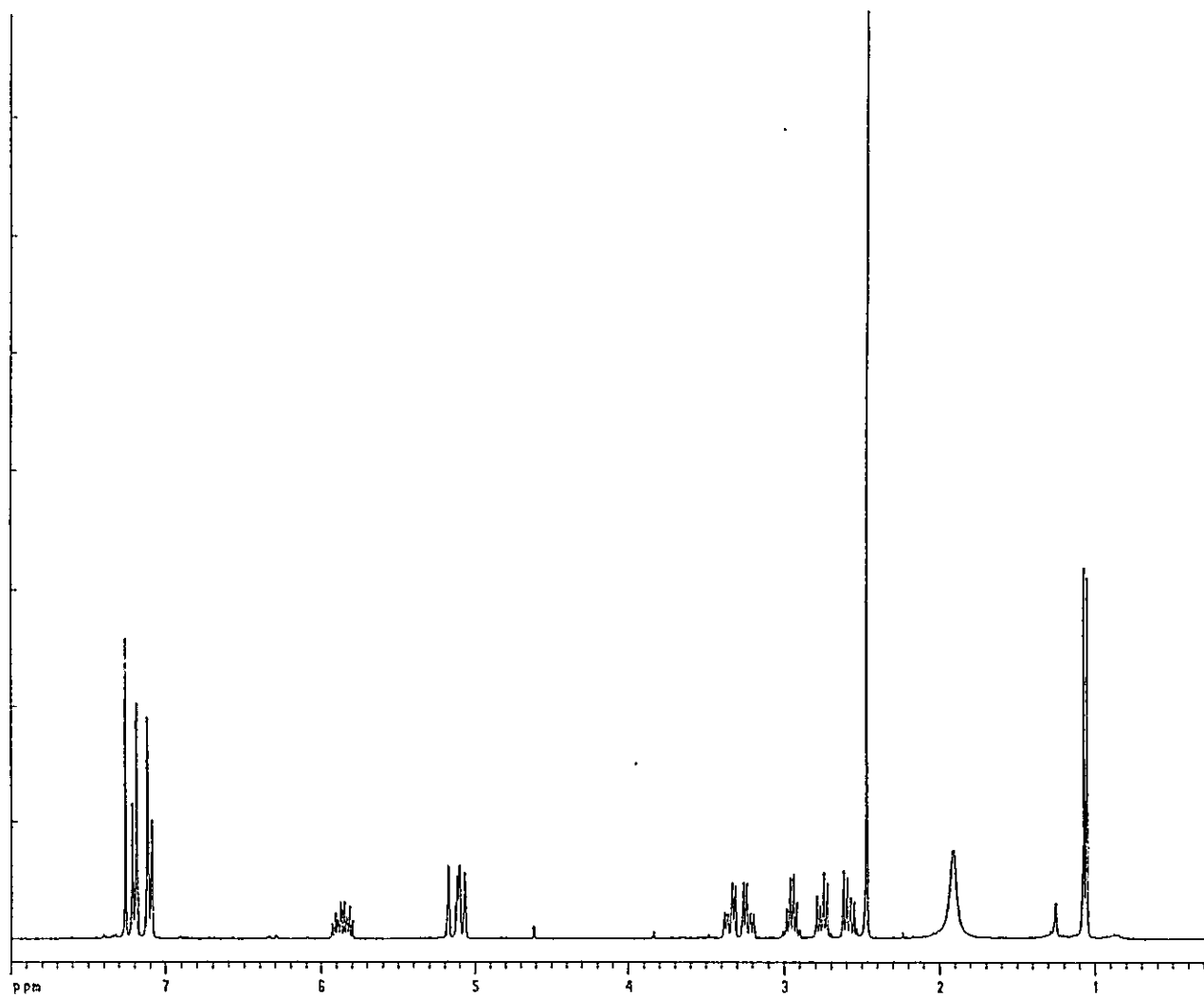
(±)-1-(4-Methylthiophenyl)-2-(N,N-diethylamino)-propano (bromhidrato) (DEMTA·HBr)

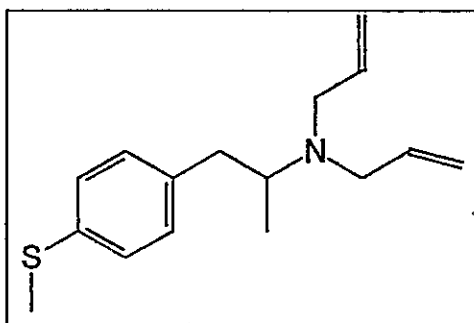
(14)



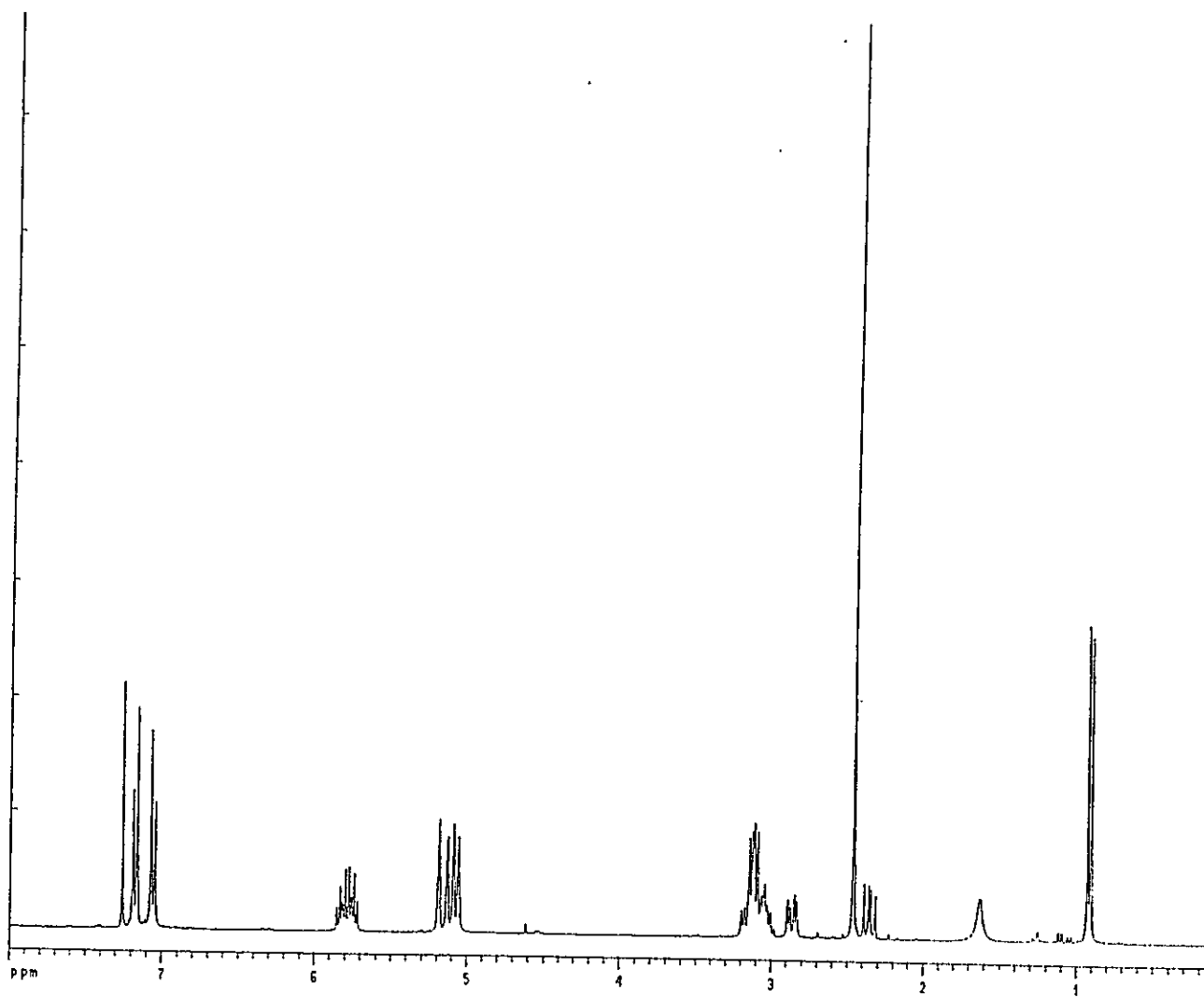


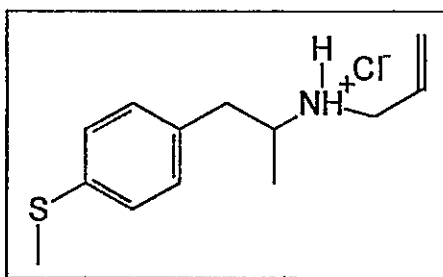
(±)-1-(4-Methylthiophenyl)-2-(*N*-allylamino)-propano (NAMTA) (15)



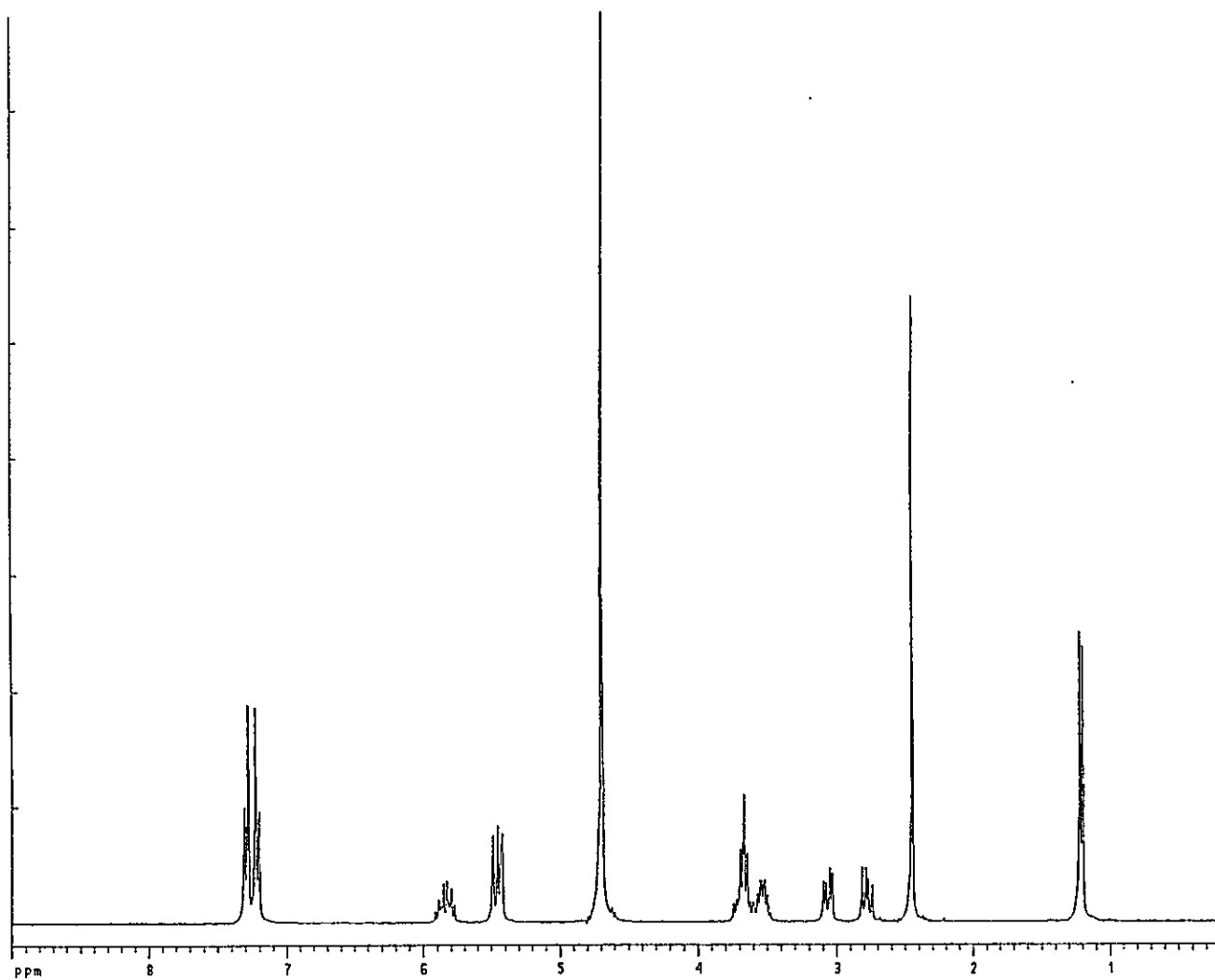


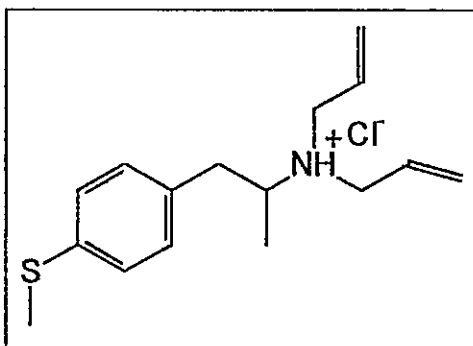
(±)-1-(4-Methylthiophenyl)-2-(*N,N*-dialilamino)-propano (DAMTA) (16)





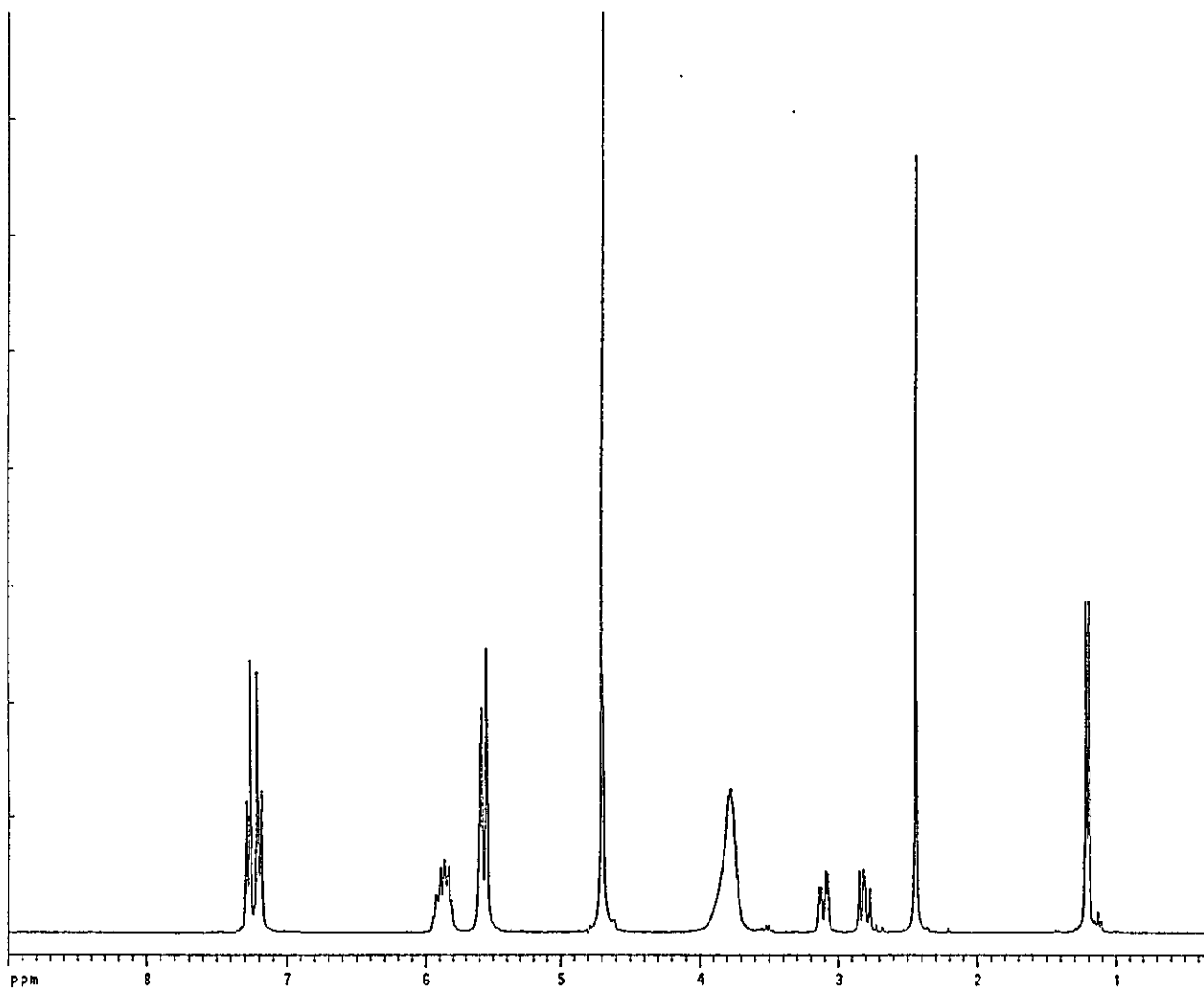
(±)-1-(4-Methylthiophenyl)-2-(*N*-allylamino)-propano (clorhidrato) (NAMTA · HCl) (17)

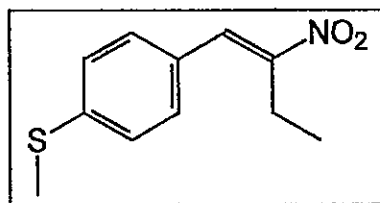




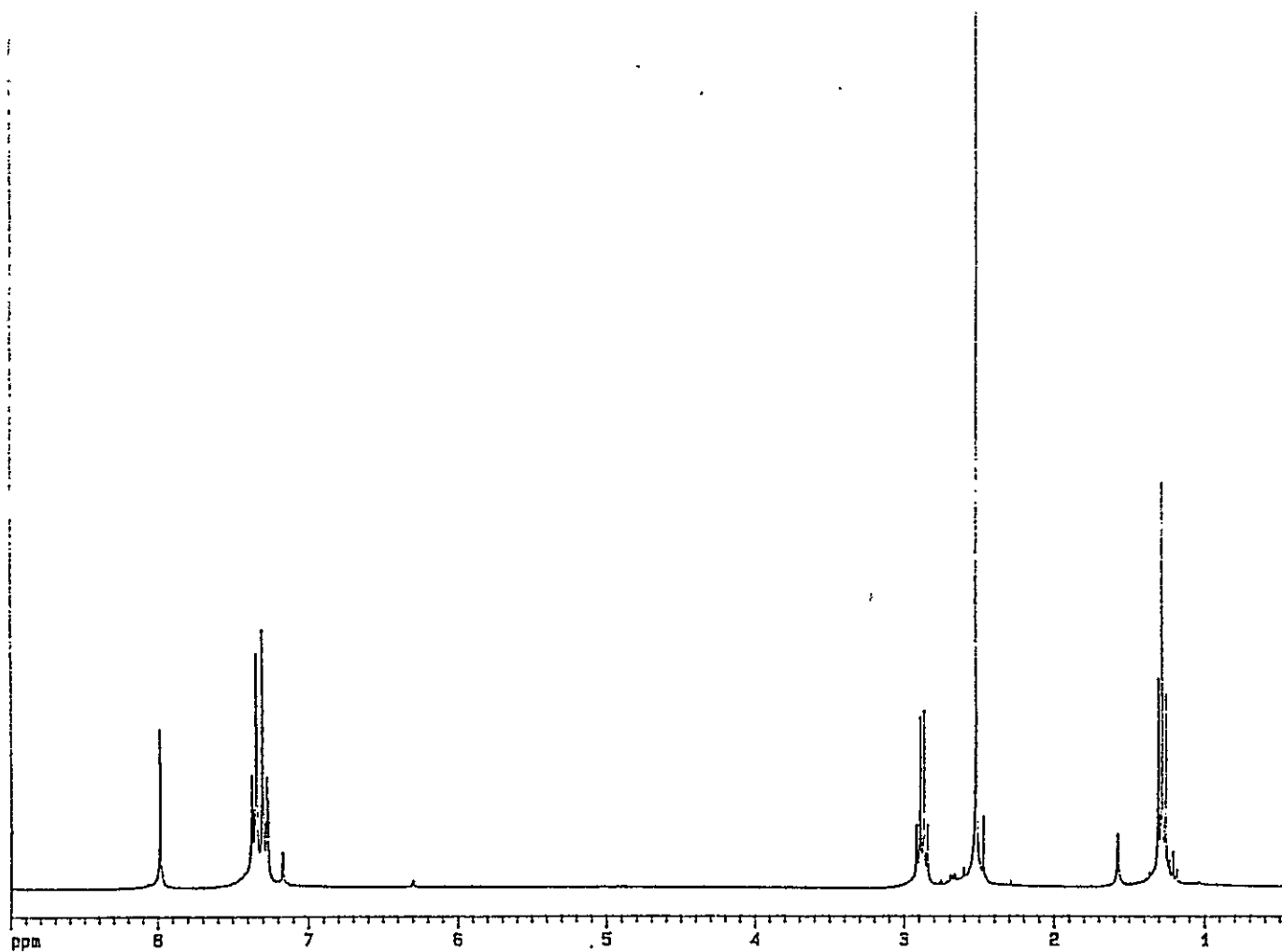
(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-(N,N-dialilamino)-propano (clorhidrato) (DAMTA · HCl)

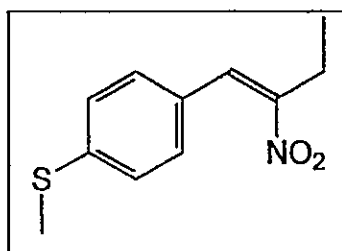
(18)



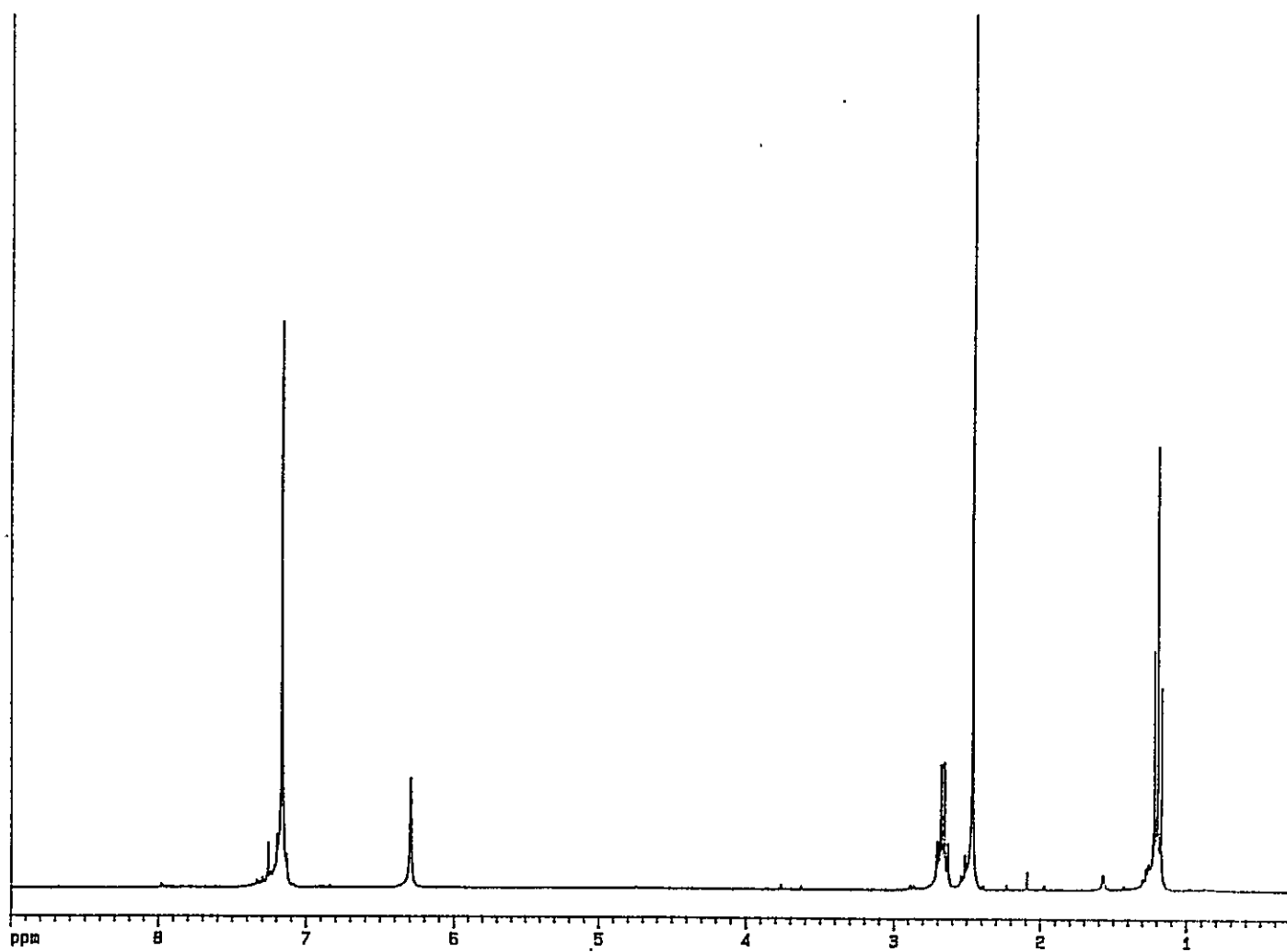


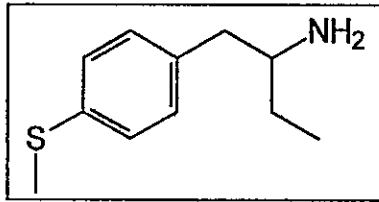
(E)-1-(4-Metiltiofenil)-2-nitrobuteno (19)



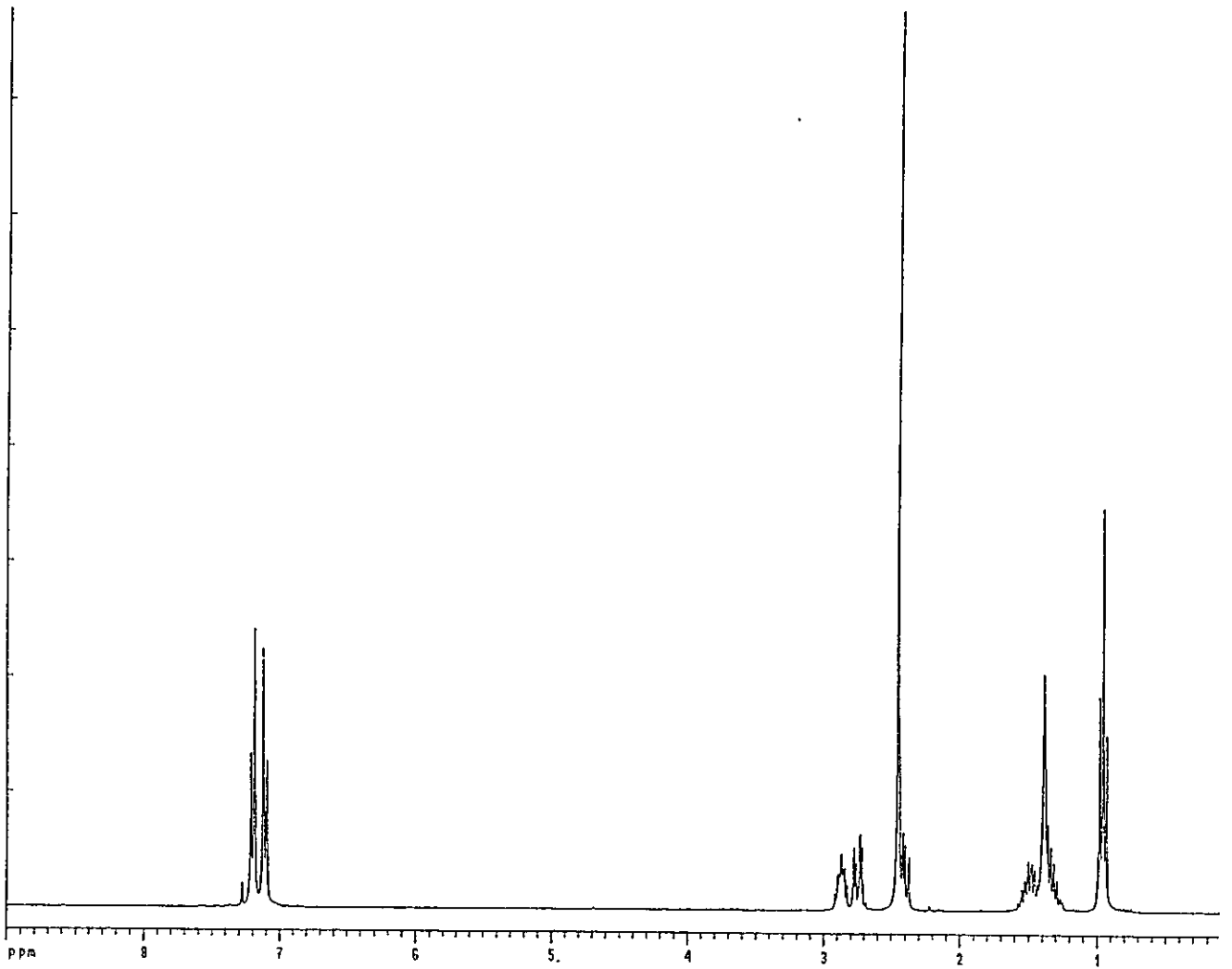


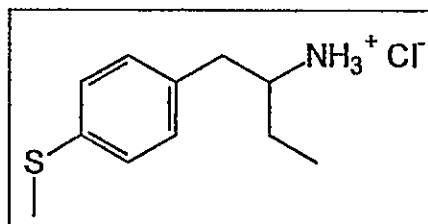
(Z)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno (20)



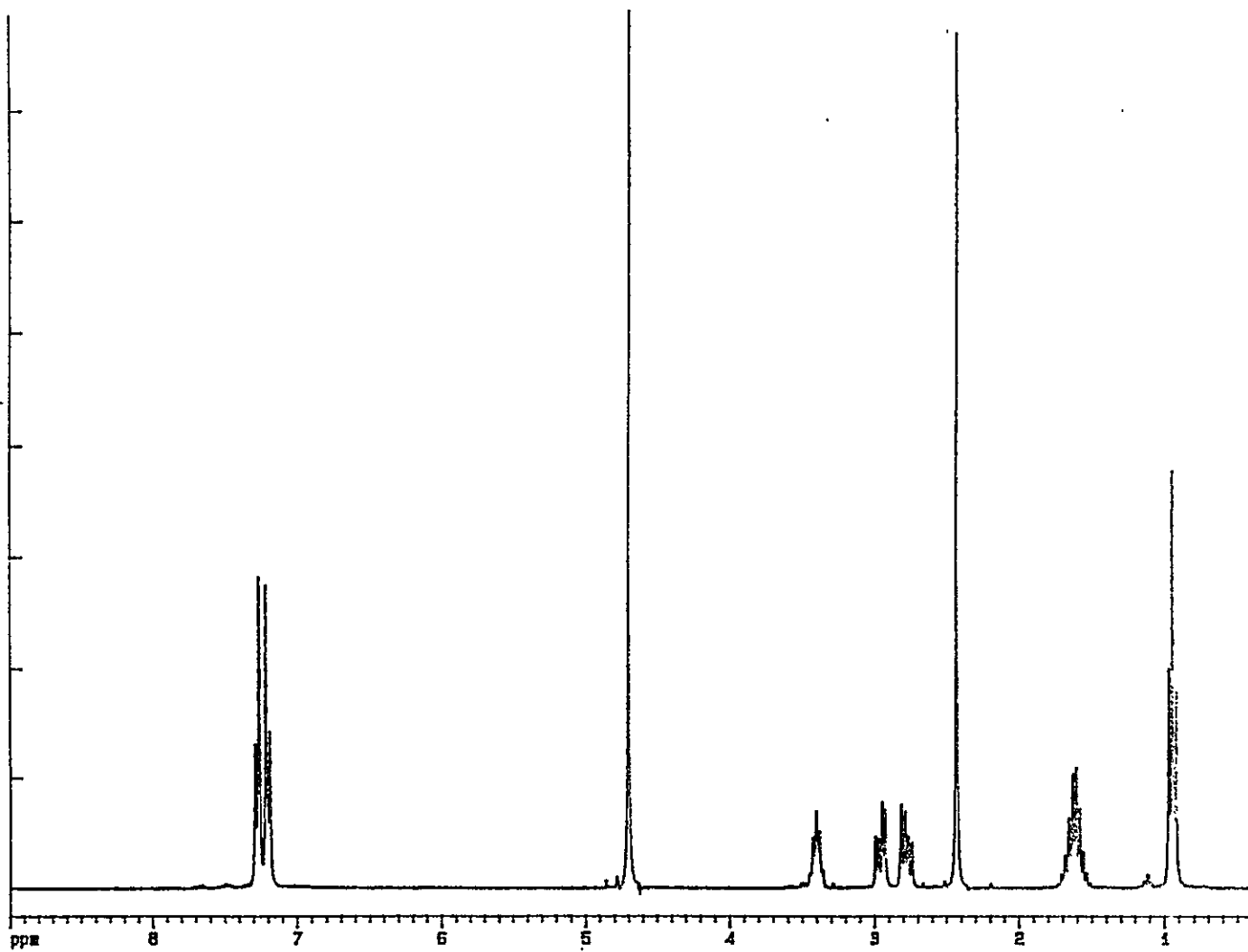


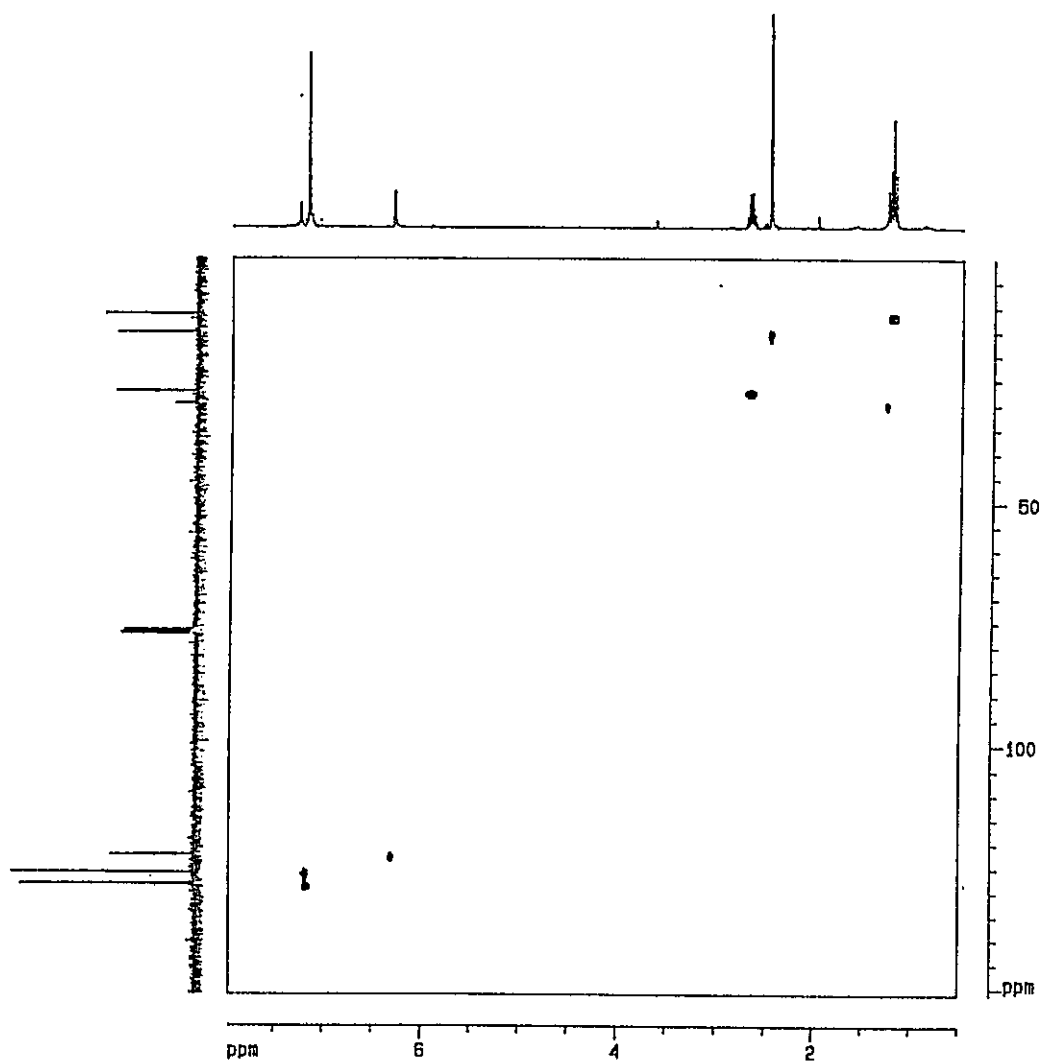
(±)-1-(4-Methylthiophenil)-2-aminobutano (MTAB) (21)



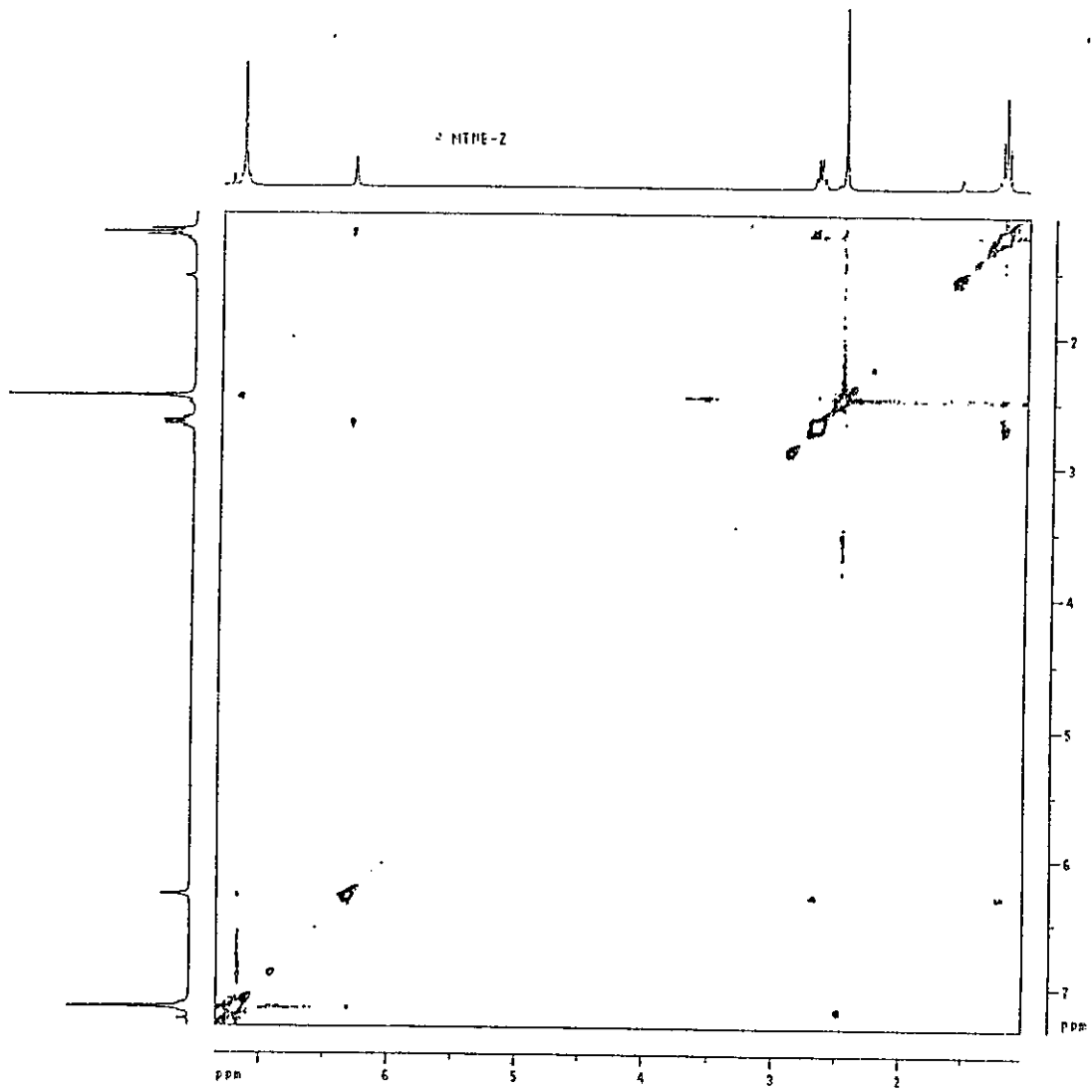


(±)-1-(4-Metiltiofenil)-2-aminobutano (clorhidrato) (MTAB · HCl) (22)

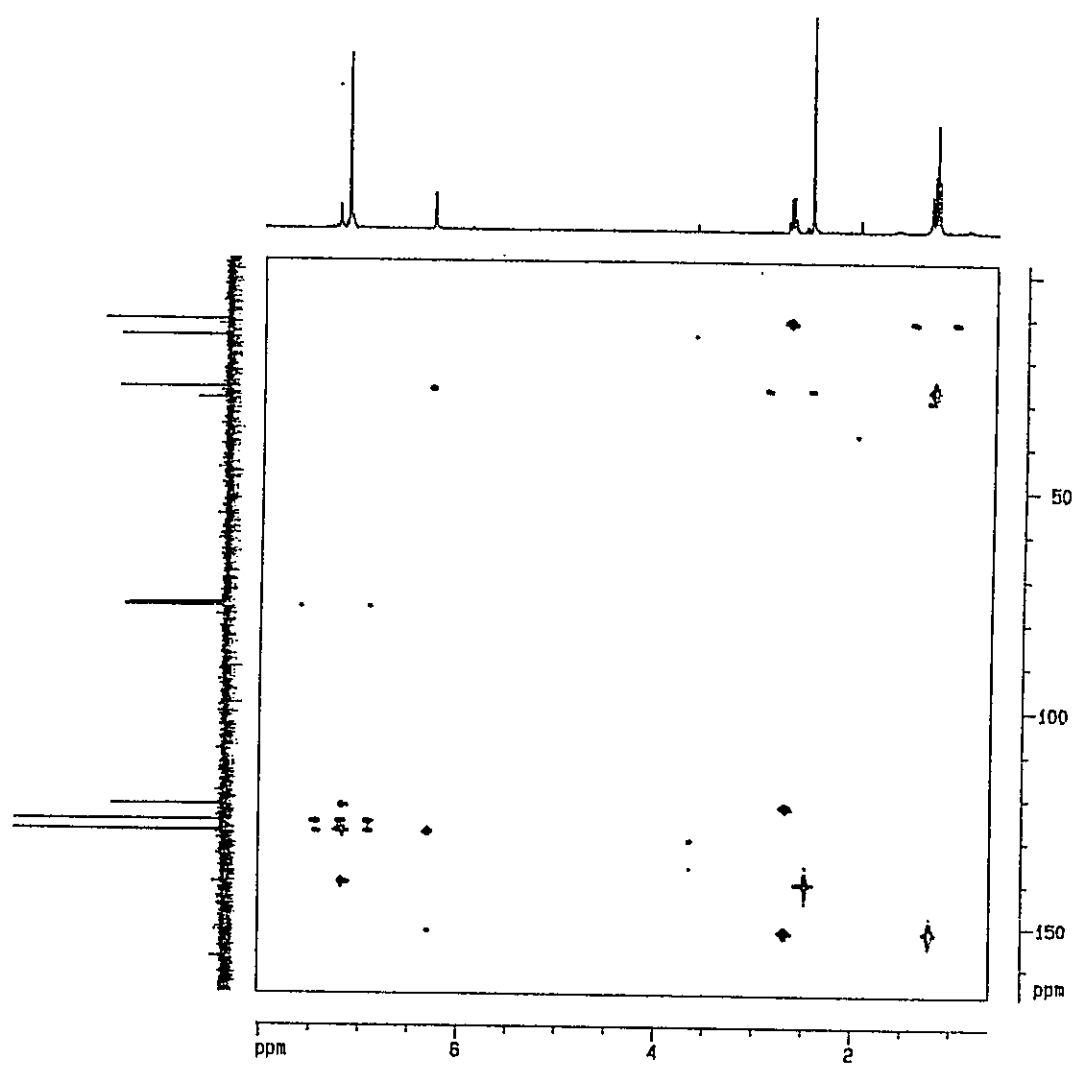


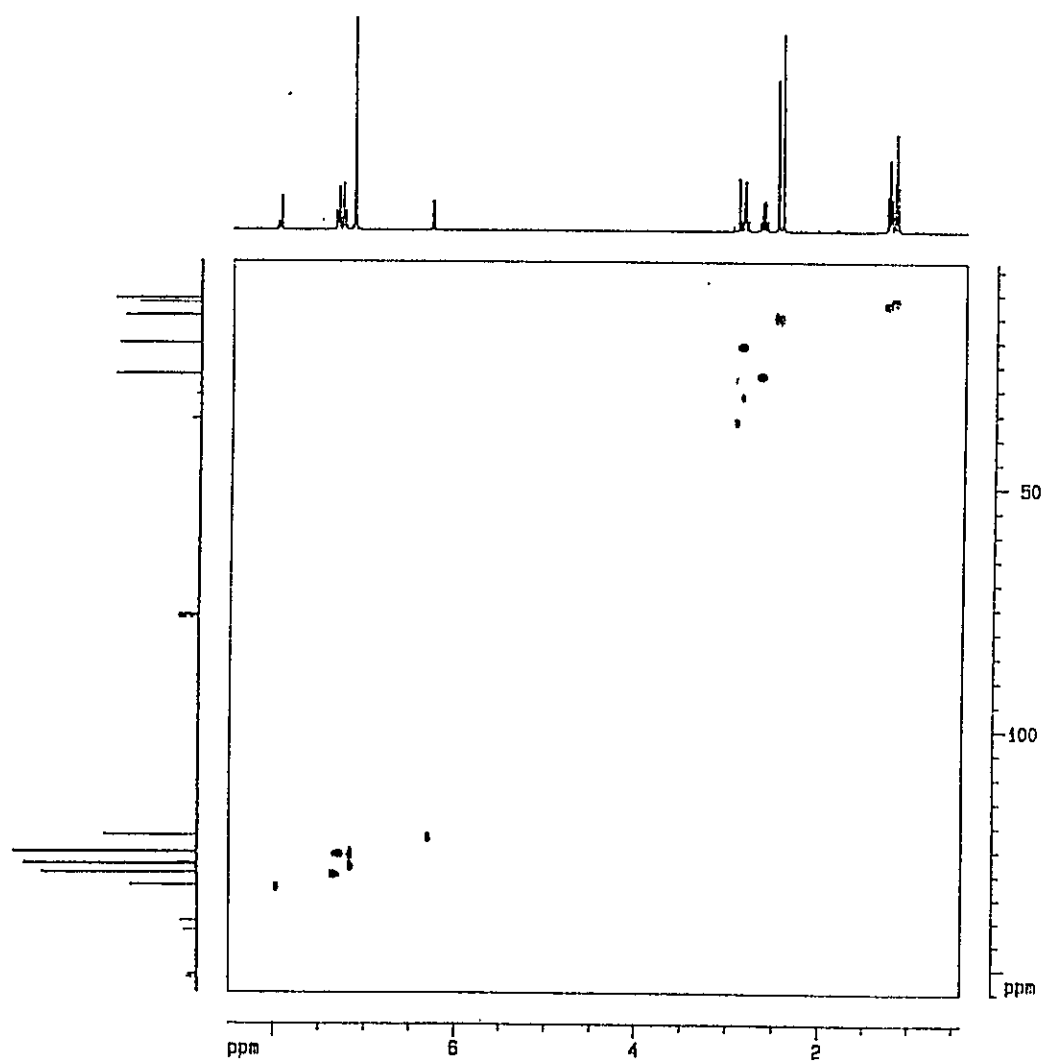
Espectro HMQC de (*Z*)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno (20)

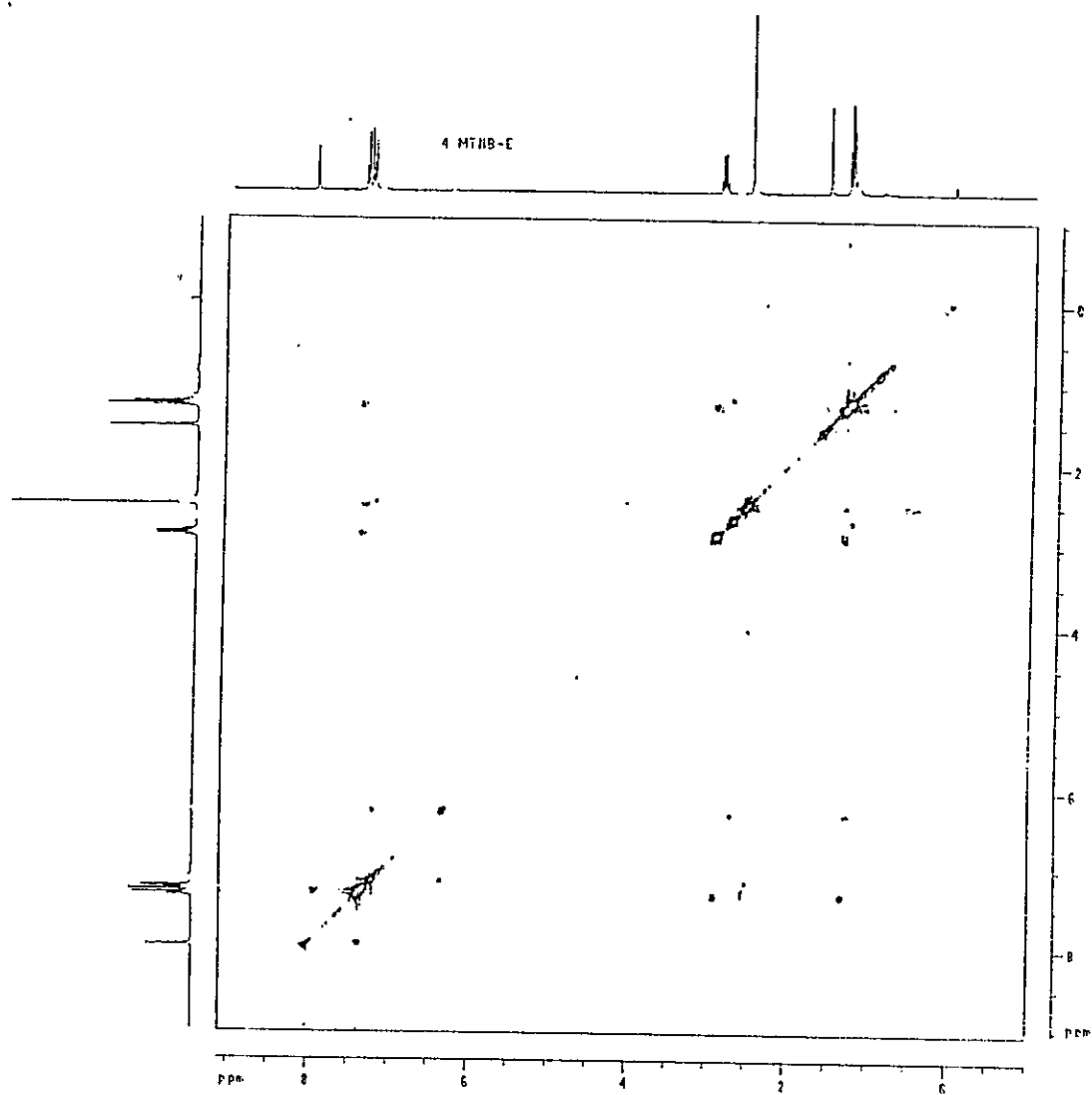
Espectro NOESY de (Z)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno (20)



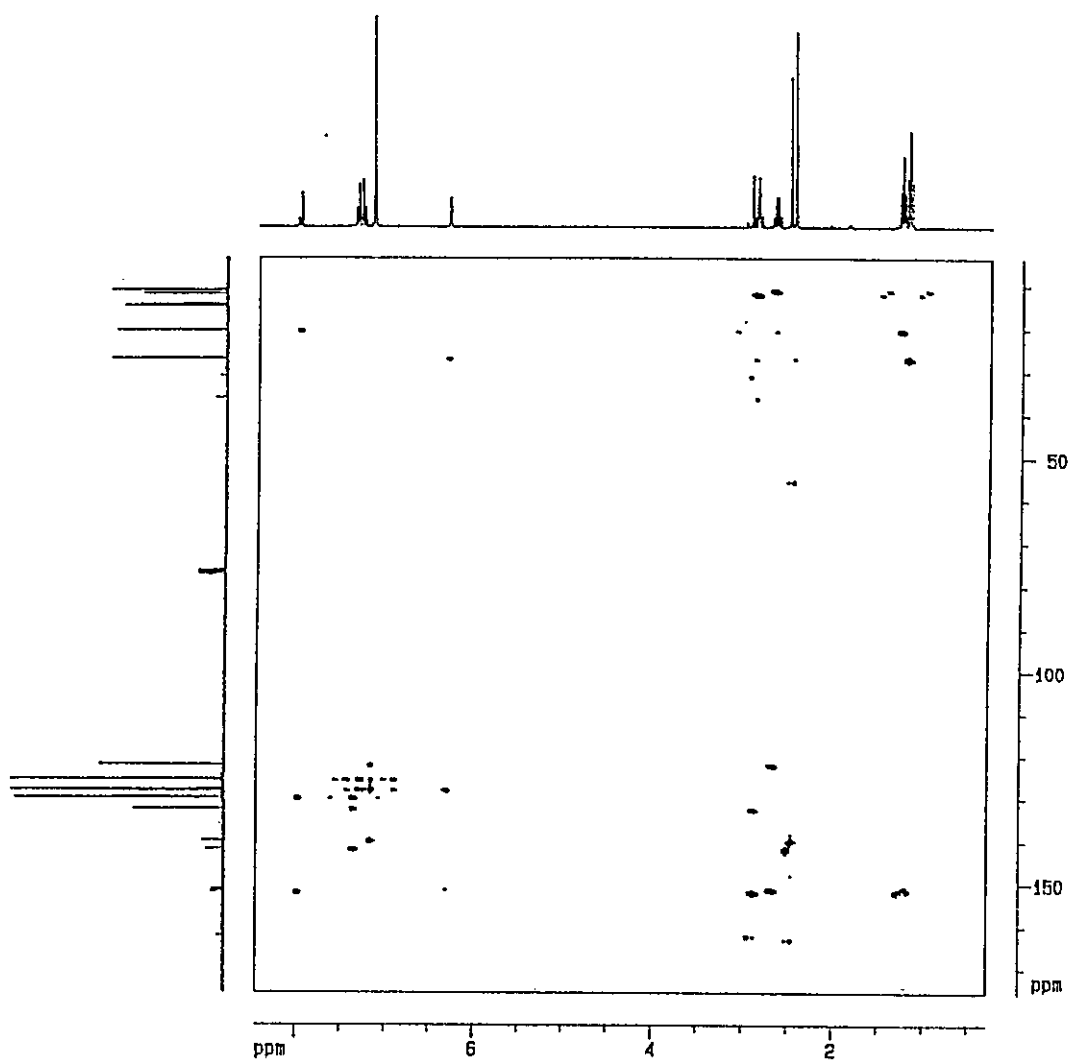
Espectro HMBC de (Z)-1-(4-metilfenil)-2-nitrobuteno (20)



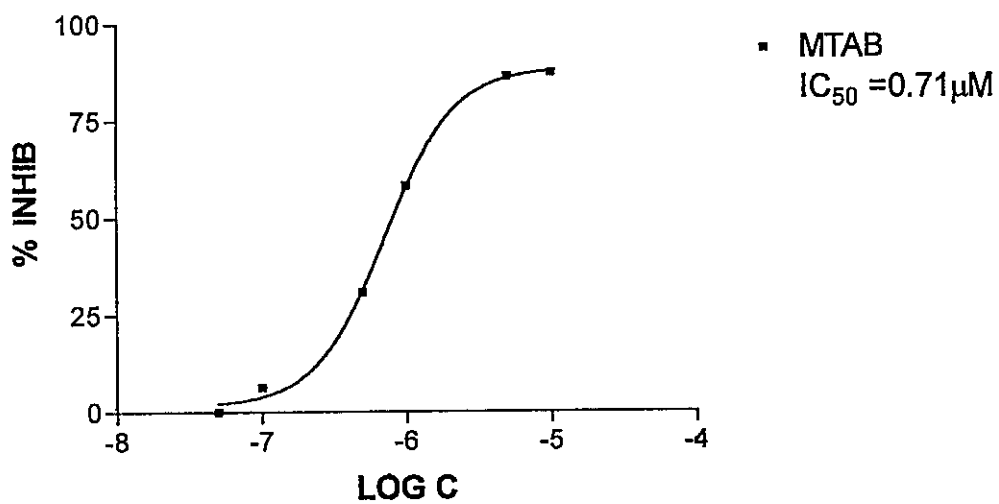
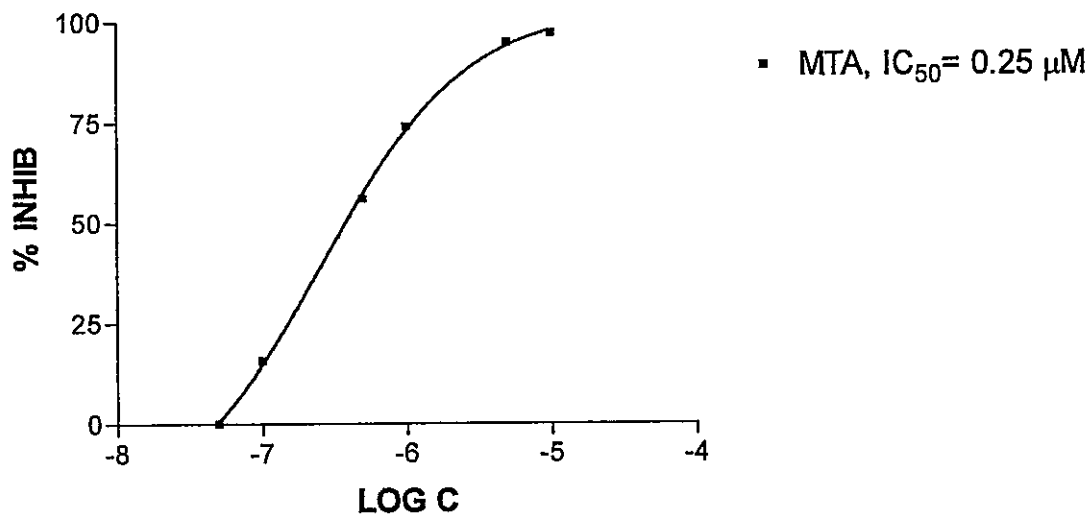
Espectro HMQC de (*E*)-1-(4-metilfenil)-2-nitrobuteno (19)

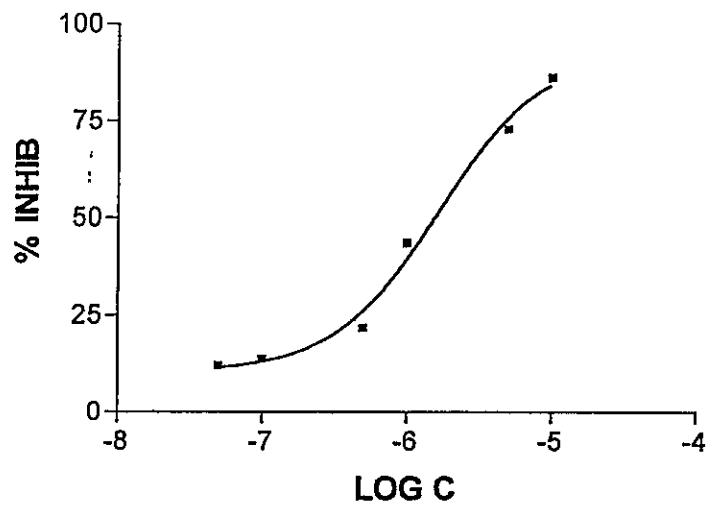
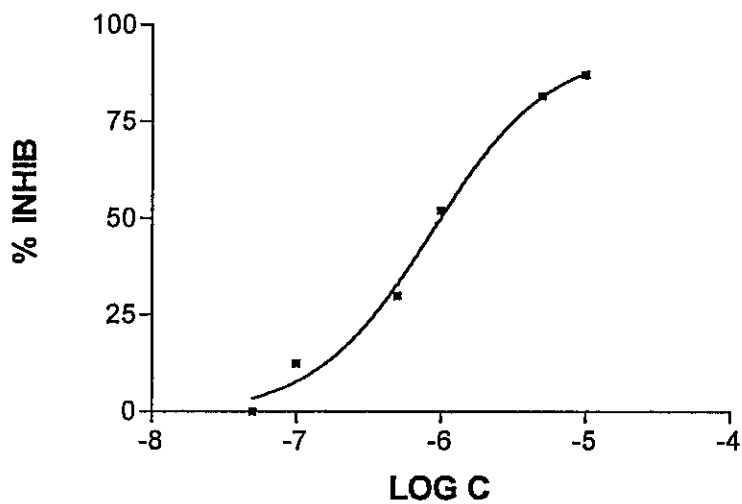
Espectro NOESY de (*E*)-1-(4-metilfenil)-2-nitrobuteno (19)

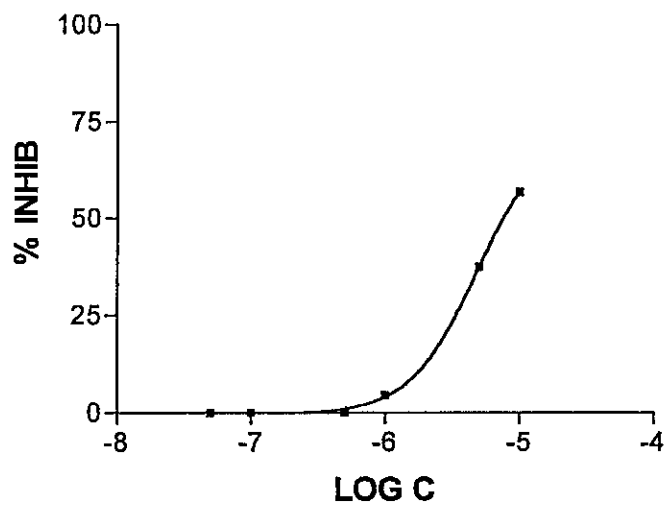
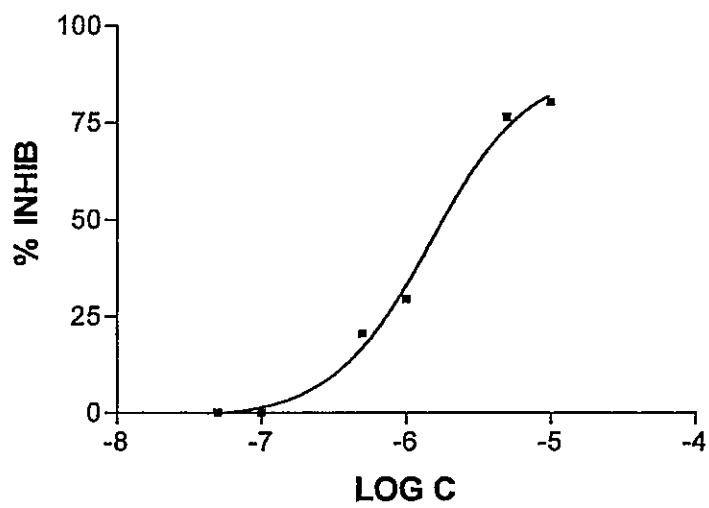
Espectro HMBC de (Z)-1-(4-metiltiofenil)-2-nitrobuteno (19)

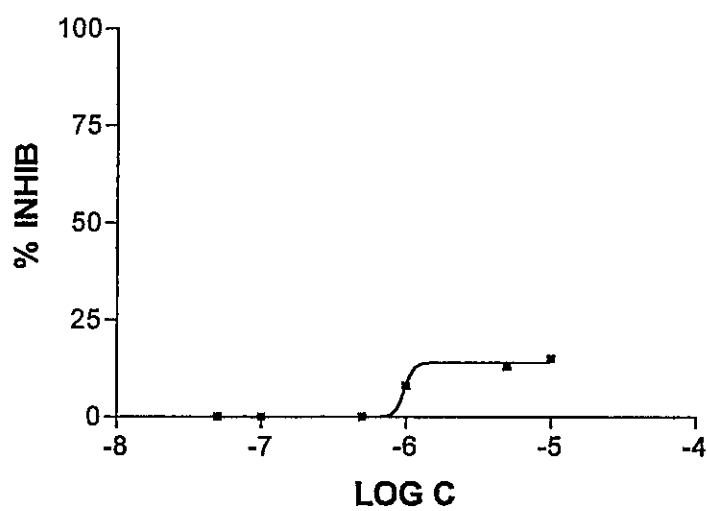
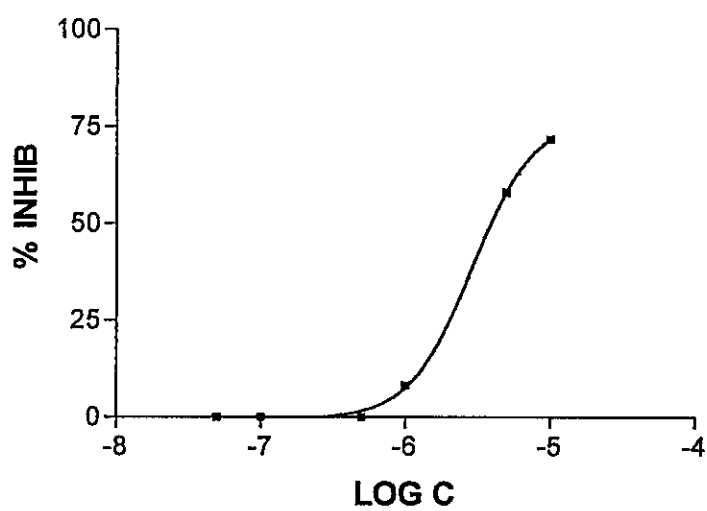


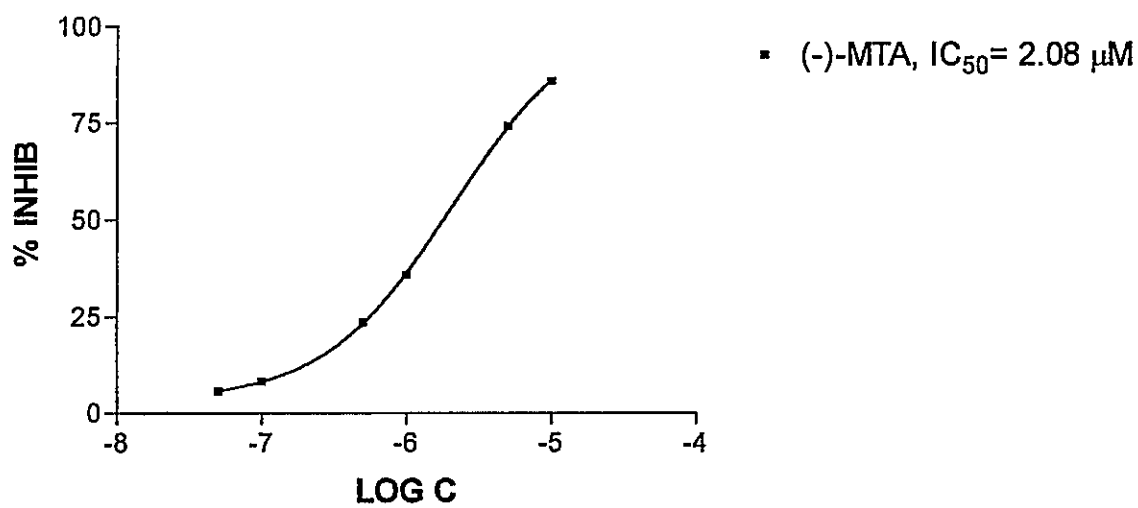
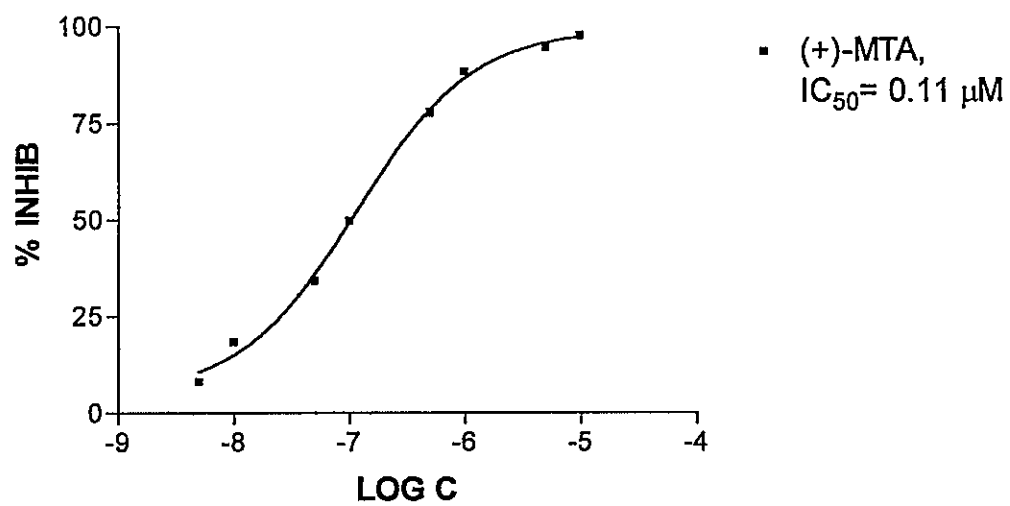
ANEXO 2: GRAFICOS DE INHIBICION DE MAO-A











ANEXO 3: GRAFICOS DE NEUROTOXICIDAD

