

UCH-FC
Doc - R
L 951
C. 1



**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN CINÉTICA DE DERIVADOS
DE 2-ARILTIOMORFOLINA COMO INHIBIDORES DE
MONOAMINO OXIDASA”**

Tesis

Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Obtar Al Grado De

Doctora en Química

Facultad De Ciencias

Por

Susan Ivette Lühr Sierra

Agosto, 2009

Director de Tesis Dr: Bruce K. Cassels Niven
Co-Director de Tesis Dr: Patricio Iturriaga Vásquez



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

SUSAN IVETTE LÜHR SIERRA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 10 de Julio de 2009.

Director de Tesis:

Dr. Bruce Cassels

Co-Director de Tesis:

Dr. Patricio Iturriaga

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. María Cecilia Rojas

Dr. Hernán Pessoa

Dr. Ramiro Araya

Dr. Eduardo Silva

Juan L. Combs
.....
[Signature]
.....
M. Cecilia Rojas
.....
[Signature]
.....
[Signature]
.....
[Signature]
.....



“Esta Tesis se la dedico con mucho cariño a mis padres Isabel y Humberto, a mi querido hermano Daniel y en especial a mi adorado esposo Marcelo”



BIOGRAFÍA



Susan Ivette Lühr Sierra nació en Santiago de Chile el primero de Junio de 1982. Comenzó sus estudios de pregrado el año 2000 en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, obteniendo su grado de Licenciada en Ciencias con mención en Química en Marzo del año 2005. Su trabajo de grado consistió en la síntesis de derivados de arilaminopropanos y arilaminoetanol, cuyo trabajo lo realizó en el Laboratorio de Química Biodinámica, dirigido por el Dr. Bruce Cassels. En el año 2005 ingresó al Programa de Doctorado en Ciencias de las misma Facultad, y en el mismo laboratorio continuó con su interés en la síntesis orgánica de compuestos bioactivos. Aquí desarrollo su trabajo de Tesis en síntesis y evaluación cinética de derivados de 2-ariltiomorfolinas como inhibidores de monoamino oxidasa, bajo la dirección del Dr. Bruce Cassels y Co-dirección del Dr. Patricio Iturriaga.

AGRADECIMIENTOS



Quisiera agradecer de forma muy especial a:

Marcelo por entregarme su inmenso amor y paciencia. Por alentarme en los momentos más difíciles, tú sabes el apoyo que me brindaste siempre.

Mis Padres por su amor, enseñanzas y valores que me entregaron cada día con tanta paciencia, lo que me hizo crecer y transformarme en la persona que soy hoy.

Mi hermano por su gran cariño y ayuda en todo momento, gracias a sus consejos ingresé a esta Facultad.

Mis queridos Tutores, Bruce y Patricio, por compartir conmigo su enorme conocimiento cada vez que lo necesité.

Angélica y Miguel por su enorme disposición a ayudarme.

Los amigos que encontré en esta bonita etapa: Lore, Marco, Lito, Olimpo, Edwin, Vicente y Lucho.

A los miembros de la comisión por sus aportes y orientación para que esta Tesis fuera llevada a cabo con éxito.

A Conicyt por sus becas de financiamiento Doctoral y Término de Tesis.

A Mecesp por su beca de estadía corta en el extranjero.

RESUMEN

Este trabajo de tesis consistió en la síntesis de dos series de compuestos: derivados de 2-ariltiomorfolin-5-onas (tionas) y 2-ariltiomorfolinas (tinan), sin sustitución o con una cadena alcoxi lineal de 1 a 4 átomos de carbono o un grupo benciloxi en posición *para* del anillo aromático, y su evaluación como inhibidores de monoaminooxidasas A y B de rata (rMAO) y humanas (hMAO). Para racionalizar los resultados experimentales obtenidos se realizaron estudios de acoplamiento molecular *in silico* ("docking") para los inhibidores más representativos.

Todos los compuestos ensayados en las hMAO-A y -B se comportaron como inhibidores reversibles y presentaron un mecanismo de inhibición competitiva. La mayoría de los compuestos presentaron una alta potencia y selectividad por la isoforma B tanto de rata como humana. Con respecto a los derivados *n*-alcoxilados de ambas series la potencia aumenta con el largo de la cadena alquílica, siendo sin embargo, los más potentes y selectivos los derivados *O*-bencilados, **17f** y **18f**, con valores de K_i de 0,074 μM y 0,13 μM en rMAO-B y 0,048 μM y 0,037 μM en hMAO-B respectivamente.

Los estudios computacionales sugieren que la potencia de **17f** y **18f** podría estar relacionada, a lo menos en parte, a la interacción entre el sustituyente, bencilo y una serie de residuos aminoacídicos aromáticos que conforman un bolsillo de esta misma naturaleza cerca de la cavidad de entrada del sitio activo.



ABSTRACT

This thesis work consisted in the synthesis of two series of compounds: 2-arylthiomorpholin-5-one and 2-arylthiomorpholine derivatives, with an unsubstituted or with linear 1 to 4 carbon alkoxy or benzyloxy substitutions at the *para* position of the aromatic ring, and their assay as rat and human monoamine oxidase A and B inhibitors (rMAO and hMAO, respectively). In order to rationalize the experimental results, *in silico* dockings were performed for the most representative inhibitors.

All the compounds tested with hMAO-A and B were reversible inhibitors and showed a competitive mechanism. Most of the compounds exhibited high potency and selectivity for the B isoform of the rat and human enzymes. With regard to the *n*-alkoxylated derivatives in both series, the potency increases with alkyl chain length, the *O*-benzylated derivatives, **17f** and **18f**, being the most potent with K_i values of 0.074 μM and 0.13 μM against rMAO-B and 0.048 μM and 0.037 μM in hMAO-B, respectively.

The computational studies suggest that the potency of **17f** and **18f** might be related, at least in part, to an interaction between the benzyl substituent and several aminoacid residues forming an aromatic pocket near the entrance cavity of the active site of the enzyme.



INDICE DE CONTENIDO



LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE ECUACIONES.....	X
LISTA DE ESQUEMAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
Conceptos generales acerca de la monoamino oxidasa	2
Distribucion tisular	3
Función fisiológica.....	3
Estructura y sitios activos.....	5
Patologías asociadas a MAO.....	7
Desórdenes neuropsiquiátricos.....	7
Desórdenes neurodegenerativos.....	7
Inhibidores de MAO.....	9
Inhibidores irreversibles.....	9
Inhibidores reversibles.....	12
Estructuras de inhibidores.....	13
Hipótesis.....	19
Objetivos generales.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Ensayos enzimáticos en MAO de rata.....	20
Condiciones cromatográficas.....	20
Preparación de la fase móvil para ambas isoformas de la enzima de rata.....	21
Obtención de la suspensión mitocondrial.....	21
Determinación de la actividad de MAO- A	22
Determinación de la actividad de MAO-B	23

Ensayos enzimáticos en MAO humana.....	24
Determinación de la actividad en hMAO-A.....	24
Determinación de la actividad en hMAO-B.....	24
Estudios de reversibilidad.....	25
Estudios de modelamiento molecular (docking).....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Química.....	28
Ruta sintética propuesta para la obtención de derivados de 2-fenilmorfolina.....	29
Ruta sintética propuesta para la obtención de 2-(4-alcoxifenil)morfolinas.....	34
Ruta propuesta para obtener los derivados de 2-ariltiomorfolina.....	35
Síntesis de 4-benciloxifenilisopropilamina.....	37
Ensayos cinéticos.....	39
Curvas de dosis respuesta en MAO-A de rata.....	43
Derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona (17a-f).....	43
Derivados de 2-ariltiomorfolina (18a-f).....	45
Curvas de dosis respuesta en MAO-B de rata.....	47
Derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona (17a-f).....	47
Derivados de 2-ariltiomorfolina (18a-f).....	49
Gráficos de Lineweaver-Burk para los datos obtenidos con MAO-A humana (unidades: $1/[S] \mu\text{M}^{-1}$, $1/V \mu\text{M}^{-1}\text{seg}$).....	52
Gráficos de Hanes-Woolf para los datos obtenidos con MAO-A humana (unidades: [S] μM , [S]/V seg).....	54
Efecto de la concentración de inhibidor sobre la K_m aparente (K_{map}) en MAO-A humana.....	56
Gráficos de Lineweaver-Burk para los datos obtenidos con MAO-B humana (unidades: $1/[S] \mu\text{M}^{-1}$, $1/V \mu\text{M}^{-1}\text{seg}$).....	58
Gráficos de Hanes-Woolf para los datos obtenidos con MAO-B humana (unidades: S μM , [S]/V seg).....	61
Efecto de la concentración de inhibidor sobre la K_m aparente (K_{map}) en MAO-B humana.....	64
MAO de Rata.....	71
Comparación entre tinas, tinajas y derivados de fenilisopropilamina.....	71
rMAO-A.....	71
rMAO-B.....	78



Selectividad entre rMAO-A y rMAO-B.....	83
Comparación de derivados de ftalimida (16a-d) en rMAO-A y rMAO-B.....	84
MAO Humana.....	85
Comparación entre tinas y tinas.....	85
hMAO-A.....	85
hMAO-B.....	88
Selectividad entre hMAO-A y hMAO-B.....	92
Comparación entre rMAO-A y hMAO-A.....	93
Comparación entre rMAO-B y hMAO-B.....	95
CONCLUSIONES.....	97
REFERENCIAS.....	100
ANEXO 1.....	106
Química.....	106
Procedimiento general de obtención de los derivados de ftalimida 16a-d e intento de obtención de los derivados 14 y 15.....	106
Procedimiento general de obtención de los derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona (5a-f) y 2-ariltiomorfolina (6a-f).....	113
ANEXO 2.....	123
Espectros de 1H y 13C RMN y de masa del derivado de 2,5-difenilpirazina (25).....	123
1H RMN.....	123
13C RMN.....	124
Espectro de masa.....	124
Espectros de 1H RMN de los derivados de N-2-aril-2-oxoetilftalimida.....	125
N-2-fenil-2-oxoetilftalimida.....	125
N-2-(4-metoxifenil)-2-oxoetilftalimida.....	126
N-2-(4-butoxifenil)-2-oxoetilftalimida.....	127
N-2-(4-benciloxifenil)-2-oxoetilftalimida.....	128
Espectros de 1H RMN de los derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona.....	129
2-feniltiomorfolin-5-ona.....	129
2-(4'-metoxifenil)tiomorfolin-5-ona.....	130
2-(4'-etoxifenil)tiomorfolin-5-ona.....	131



2-(4'-propoxifenil)tiomorfolin-5-ona.....	132
2-(4'-butoxifenil)tiomorfolin-5-ona.....	133
2-(4'-benciloxifenil)tiomorfolin-5-ona.....	134
Espectros de ¹ H RMN de los derivados de 2-ariltiomorfolina.....	135
2-feniltiomorfolina.....	135
2-(4'-metoxifenil)tiomorfolina.....	136
2-(4'-etoxifenil)tiomorfolina.....	137
2-(4'-propoxifenil)tiomorfolina.....	138
2-(4'-butoxifenil)tiomorfolina.....	139
2-(4'-benciloxifenil)tiomorfolina.....	140

LISTA DE TABLAS

TABLA	págs.
1. <i>Valores de K_i y selectividad de las series 17a-f y 18a-f frente a las cuatro enzimas y K_i de las fenilisopropilaminas 35a-f</i>	42
2. <i>Reversibilidad de 17e, 18b, 18c, 18d y 18e en hMAO-A</i>	68
3. <i>Reversibilidad de 17e, 17f, 18d y 18e en hMAO-B</i>	69
4. <i>Valores de IC_{50} para los derivados de ftalimida en MAO de rata, 16a-d</i>	70
5. <i>Valores de K_i y selectividad de las series 17a-f y 18a-f frente a MAO-A rata y humana</i>	94
6. <i>Valores de K_i y selectividad de las series 17a-f y 18a-f frente a MAO-B-rata y humana</i>	95

LISTA DE ECUACIONES

ECUACIONES	págs.
1. <i>Cálculo del porcentaje de inhibición de MAO-A</i>	22
2. <i>Cálculo del porcentaje de inhibición de MAO-B</i>	23
3. <i>Cheng Prusoff</i>	40
4. <i>Ecuación de Lineweaver-Burk</i>	40
5. <i>Ecuación de Inhibición competitiva</i>	40
6. <i>Ecuación de Hanes-Woolf</i>	41
7. <i>Ecuación para la obtención de los valores de K_i</i>	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: anillo de isoaloxacina del FAD.....	2
Figura 2: Representación tridimensional de monoamino oxidasa inserta en la membrana.	2
Figura 3: Sustratos endógenos y exógenos de MAO.....	4
Figura 4: algunos inhibidores irreversibles de MAO.....	11
Figura 5: Inhibidores irreversibles y selectivos de MAO.....	11
Figura 6: algunos inhibidores reversibles de MAO.....	12
Figura 7: diversos inhibidores de MAO.....	13
Figura 8: Inhibidores reversibles de MAO.....	14
Figura 9: Derivados de 4-alcoxi- y alquiltioarilisopropilamina.....	16
Figura 10: Derivados de 2-arilmorfolina y ftalimida.....	17
Figura 11: Derivados de 2-ariltiomorfolina.....	18
Figura 12: Derivados de ftalimida 16 (a: X=-H, b: X=-OCH ₃ , c: X=-O(CH ₂) ₃ CH ₃ , d: - OCH ₂ Ph), 2-Ariltiomorfolinas y -tiomorfolinonas (a: X = -H, b: X=-OCH ₃ , c: X=- OCH ₂ CH ₃ , d: -(CH ₂) ₂ CH ₃ , e: X= -O(CH ₂) ₃ CH ₃ , f: X=-OCH ₂ Ph).....	28
Figura 13: Estructura de D1 y H1.....	31
Figura 14: Derivados de 2-arilisopropilamina ("anfetaminas").....	39
Figura 15: Curva dosis respuesta de 17a.....	43
Figura 16: Curva dosis respuesta de 17b.....	43
Figura 17: Curva dosis respuesta de 17c.....	44
Figura 18: Curva dosis respuesta de 17d.....	44
Figura 19: Curva dosis respuesta de 17e.....	44
Figura 20: Curva dosis respuesta de 17e.....	45
Figura 21: Curva dosis respuesta de 18a.....	45
Figura 22: Curva dosis respuesta de 18b.....	45
Figura 23: Curva dosis respuesta de 18c.....	46

Figura 24: Curva dosis respuesta de 18d.....	46
Figura 25: Curva dosis respuesta de 18e.....	46
Figura 26: Curva dosis respuesta de 18f.....	47
Figura 27: Curva dosis respuesta de 17a.....	47
Figura 28: Curva dosis respuesta de 17b.....	47
Figura 29: Curva dosis respuesta de 17c.....	48
Figura 30: Curva dosis respuesta de 17d.....	48
Figura 31: Curva dosis respuesta de 17e.....	48
Figura 32: Curva dosis respuesta de 17f.....	49
Figura 33: Curva dosis respuesta de 18a.....	49
Figura 34: Curva dosis respuesta de 18b.....	49
Figura 35: Curva dosis respuesta de 18c.....	50
Figura 36: Curva dosis respuesta de 18d.....	50
Figura 37: Curva dosis respuesta de 18e.....	50
Figura 38: Curva dosis respuesta de 18f.....	51
Figura 39: Gráfico de Lineweaver-Burk de 17e.....	52
Figura 40: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18b.....	52
Figura 41: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18c.....	52
Figura 42: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18d.....	53
Figura 43: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18e.....	53
Figura 44: Gráfico de Hanes de 17e.....	54
Figura 45: Gráfico de Hanes de 18b.....	54
Figura 46: Gráfico de Hanes de 18c.....	54
Figura 47: Gráfico de Hanes de 18d.....	55
Figura 48: Gráfico de Hanes de 18e.....	55
Figura 49: Kmap vs. [I] de 17e.....	56
Figura 50: Kmap vs. [I] de 18b.....	56
Figura 51: Kmap vs. [I] de 18c.....	56
Figura 52: Kmap vs. [I] de 18d.....	57

Figura 53: Kmap vs. [I] de 18e.....	57
Figura 54:Gráfico de Lineweaver-Burk de 17c.....	58
Figura 55:Gráfico de Lineweaver-Burk de 17d.....	58
Figura 56:Gráfico de Lineweaver-Burk de 17e.....	58
Figura 57:Gráfico de Lineweaver-Burk de 17f.....	59
Figura 58:Gráfico de Lineweaver-Burk de 18c.....	59
Figura 59:Gráfico de Lineweaver-Burk de 18d.....	59
Figura 60:Gráfico de Lineweaver-Burk de 18e.....	60
Figura 61:Gráfico de Lineweaver-Burk de 18f.....	60
Figura 62:Gráfico de Hanes de 17c.....	61
Figura 63:Gráfico de Hanes de 17d.....	61
Figura 64:Gráfico de Hanes de 17e.....	61
Figura 65:Gráfico de Hanes de 17f.....	62
Figura 66:Gráfico de Hanes de 18c.....	62
Figura 67:Gráfico de Hanes de 18d.....	62
Figura 68:Gráfico de Hanes de 18e.....	63
Figura 69:Gráfico de Hanes de 18f.....	63
Figura 70:Kmap vs. [I] de 17c.....	64
Figura 71:Kmap vs. [I] de 17d.....	64
Figura 72:Kmap vs. [I] de 17e.....	64
Figura 73:Kmap vs. [I] de 17f.....	65
Figura 74:Kmap vs. [I] de 18c.....	65
Figura 75:Kmap vs. [I] de 18d.....	65
Figura 76:Kmap vs. [I] de 18e.....	66
Figura 77:Kmap vs. [I] de 18f.....	66
Figura 78: Modelamiento molecular de 17a (morado) y 18a (fucsia) en el sitio activo de rMAO-A. Se observa un puente de hidrógeno entre el carbonilo de Phe208 y un hidrógeno de la amida o amina respectiva.....	72
Figura 79: Modelamiento molecular de 35d en el sitio activo de rMAO-A. Se observa un	

puente de hidrógeno entre el OH de Tyr444 y el grupo amino del ligando.	74
Figura 80: Modelamiento molecular de 17d (rosado) y 18d (violeta) en el sitio activo de rMAO-A.	75
Figura 81: Modelamiento molecular de 17f (verde) y 18f (celeste) en el sitio activo de rMAO-A.....	76
Figura 82: Representación de los volúmenes de van der Waals de 17f y Gly 110. Se aprecia la posibilidad de una repulsión entre los átomos de oxígeno.....	76
Figura 83: Modelamiento molecular de 17b (amarillo) y 18b (fucsia) en el sitio activo de rMAO-B.....	78
Figura 84: Modelamiento molecular de 35b en el sitio activo de rMAO-B. Se observa un puente de hidrógeno simultáneo entre los hidrógenos del grupo amino y el carbonilo del residuo Ile196 y Gln204.....	79
Figura 85: Modelamiento molecular de 17f en el sitio activo de rMAO-B.....	80
Figura 86: Modelamiento molecular de 18f en el sitio activo de rMAO-B.....	81
Figura 87: Representación de los volúmenes de van der Waals de 17f y Ile162. No se aprecia la repulsión entre los átomos de oxígeno encontrada en rMAO-A.....	82
Figura 88: superposición de los sitios activos de rMAO-A (verde) y rMAO-B (morado). Se observa que el residuo Phe208 impide que 17f adopte una orientación similar a la obtenida en rMO-B.	84
Figura 89: Modelamiento molecular de 17e (rosado) y 18e (fucsia) en el sitio activo de hMAO-A.....	86
Figura 90: Representación de los volúmenes de van der Waals de 17e y Val210. Se aprecia la posible repulsión entre los átomos de oxígeno.....	87
Figura 91: Modelamiento molecular de 17f (rosado) y 18f (verde) en el sitio activo de hMAO-A.....	87
Figura 92: Representación de los volúmenes de van der Waals de 17f y Val210. Se aprecia la posible repulsión entre los átomos de oxígeno.....	88
Figura 93: Acoplamiento molecular de 17e (celeste) y 18e (amarillo) en el sitio activo de hMAO-B.....	89

Figura 94: Modelamiento molecular de 17f en el sitio activo de hMAO-B.....	91
Figura 95: Modelamiento molecular de 18f en el sitio activo de hMAO-B.....	91
Figura 96: superposición de los sitios activos de rMAO-A (morado) y rMAO-B (naranja). Se observa que el residuo Phe208 impide que 18f adopte una orientación similar a la obtenida para hMAO-B.	92

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA S.....	págs.
1. <i>Desaminación oxidativa catalizada por MAO.....</i>	<i>5</i>
2. <i>Ruta sintética de 2-fenilmorfolina.....</i>	<i>29</i>
3. <i>Vías alternativas para la obtención de la β-cetoamina 22.....</i>	<i>30</i>
4. <i>Obtención aminoalcohol 23.....</i>	<i>33</i>
5. <i>Ruta sintética de 2-(4-alcoxilfenil)morfolinas.....</i>	<i>34</i>
6. <i>Ruta sintética de 2-ariltiomorfolinas.....</i>	<i>37</i>
7. <i>Ruta sintética de 35f</i>	<i>38</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

Å³ = angström cúbico

ADN = ácido desoxiribonucleico

Ag/AgCl = electrodo de plata / cloruro de plata

AgCl₃ = tricloruro de plata

AcOH = ácido acético

Br₂ = bromo

°C = grados Celsius

CCF = cromatografía capa fina

CHCl₃ = cloroformo

CH₂Cl₂ = diclorometano

CDCl₃ = cloroformo deuterado

Cys = cisteína

Da = Dalton

DA = dopamina

DIBAL-H = hidruro de diisobutilaluminio

4-DMAPAA = ácido 4-dimetilaminofenilacético

4-DMAPEA = 4-dimetilaminofeniletilamina

FAD = Flavina adenina dinucleótido

g = gramos

GSH = glutatión reducido

HCl = ácido clorhídrico

HClO₄ = ácido perclórico

5-HIAA = ácido hidroxindolacético

hMAO = monoamino oxidasa humana

H₂O = agua

H₂O₂ = peróxido de hidrógeno

HPLC-ED = cromatografía líquida de alto desempeño con detección electroquímica

5-HT = serotonina

IC₅₀ = concentración de inhibidor que produce 50% de inhibición de la enzima

Ile = isoleucina

IMAO = inhibidor de monoamino oxidasa

IPA = alcohol isopropílico

K₂CO₃ = carbonato de potasio

K_i = constante de inhibición

K_m = constante de Michaelis

K_{ma} = constante de Michaelis aparente

KOH = hidróxido de potasio

MAO = monoamino oxidasa

MAO-A = isoforma A de monoamino oxidasa

MAO-B = isoforma B de monoamino oxidasa

MeCN = acetonitrilo

MeOH = metanol

min = minutos

mL = mililitros

mM = milimolar

MPTP = 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidro-piridina

m/z = relación masa/carga

nA = nanoampere

NA = noradrenalina

NaOH = hidróxido de sodio

Na₂SO₄ = sulfato de sodio

N(Et)₃ = trietilamina

O₂ = oxígeno

P₄₅₀ = citocromo P₄₅₀

p.f. = punto de fusión

ppm = partes por millón

RIMA = inhibidor reversible de monoamino oxidasa A

rMAO = monoamino oxidasa de rata

seg = segundo

SNC = sistema nervioso central

SnCl₂ = cloruro de estaño

SOS = dodecilsulfato de sodio

SSRI = inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina

THF = tetrahidrofurano

tinas = 2-ariltiomorfolinas

tionas = 2-ariltiomorfolin-5-onas

V = volt

V_{máx} = velocidad máxima

vs = versus

Zn = zinc

μL = microlitro

μM = micromolar

INTRODUCCIÓN

A pesar de la intensa investigación en las áreas de bioquímica, biología y genética molecular no existe un consenso definitivo sobre la etiología y los mecanismos de acción de los trastornos neuropsiquiátricos como la depresión y neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, lo que contribuye a explicar porqué no se han podido establecer terapias definitivas que ayuden a disminuir el progreso de estas enfermedades. Sin embargo en estas patologías existe una evidencia clara de alteración de los niveles de monoaminas neurotransmisoras, principalmente serotonina, dopamina y noradrenalina.

La monoamina oxidasa (MAO), al ser una de las principales enzimas de degradación de estos neurotransmisores, se ha convertido durante décadas en un interesante blanco biológico para el diseño de nuevas drogas para tratar estas enfermedades.

Conceptos generales acerca de la monoamino oxidasa

La monoamino oxidasa (MAO; EC1.4.3.4, amina:O₂ oxidoreductasa) es una proteína que posee como grupo prostético (o cofactor) el flavina adenina dinucleótido (FAD) unido covalentemente a la cadena polipeptídica por medio de un grupo tioéter a través del grupo metilo 8α del anillo de isoaloxacina y el residuo Cys397 (Figura 1).¹

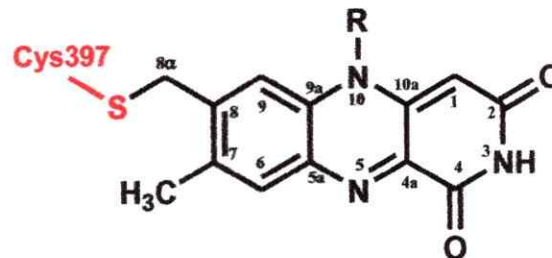


Figura 1: anillo de isoaloxacina del FAD.

La MAO se encuentra en la mayoría de los tejidos de mamíferos como dos isoformas, llamadas MAO-A y MAO-B (Figura 2).²

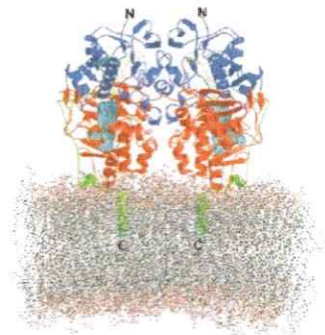


Figura 2: Representación tridimensional de monoamino oxidasa inserta en la membrana.

Las estructuras de ambas isoenzimas humanas han sido recientemente elucidadas y consisten en 526 y 520 residuos de aminoácidos con pesos moleculares 59700 y 58800 Da para MAO-A y MAO-B respectivamente y poseen sobre un 70% de identidad en su secuencia aminoacídica.³ No obstante, sus diferencias (estructurales) son suficientes para tener por resultado el que ambas difieran en su especificidad por sustrato e inhibidor.

Distribucion tisular

La MAO está presente en la parte externa de la membrana mitocondrial de: células del sistema nervioso central (SNC), también en células especializadas del sistema circulatorio como las plaquetas y en una variedad de tejidos periféricos como hígado, tracto intestinal, pulmones, y placenta.⁴ En estos últimos su función probablemente es regular los niveles de aminas exógenas generalmente provenientes de la dieta y también evitar que los neurotransmisores y sus metabolitos modulen la función celular de estos tejidos.⁵

La proporción de ambas isoformas varía según el tejido. Por ejemplo la proporción MAO-A/MAO-B en el cerebro es de 25/75, en el hígado es de 50/50 y en el intestino 80/20.^{6,7}

Función fisiológica

La MAO ayuda a controlar las concentraciones de monoaminas primarias, secundarias y terciarias presentes en el SNC y en la periferia. Más específicamente tiene la función de catalizar la oxidación del grupo amino de ciertos neurotransmisores y

también aminas exógenas. Entre los sustratos endógenos se encuentran principalmente serotonina (5-HT), y una serie de catecolaminas como dopamina (DA), adrenalina y noradrenalina (NA) y como exógenos bencilamina y la neurotoxina MPTP, una impureza presente en el opiode sintético fentanilo (Figura 3).⁸

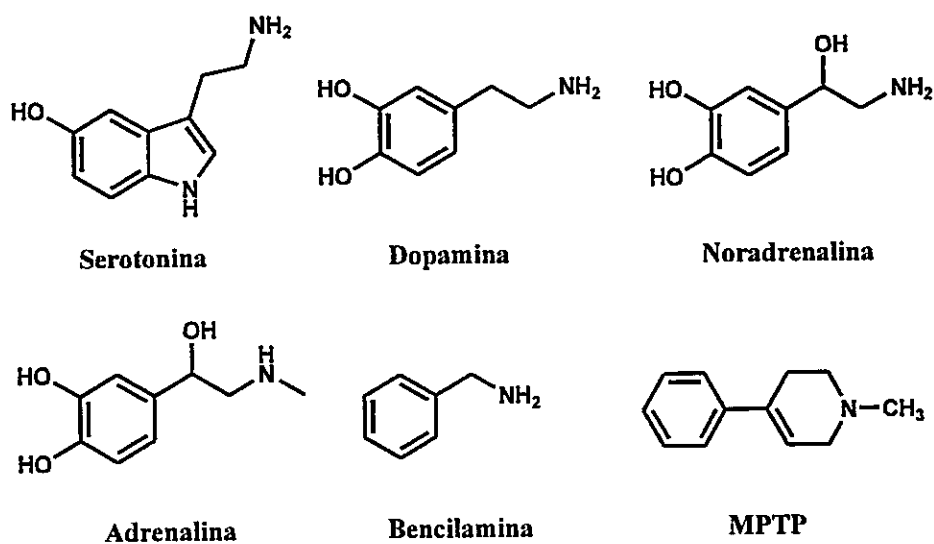
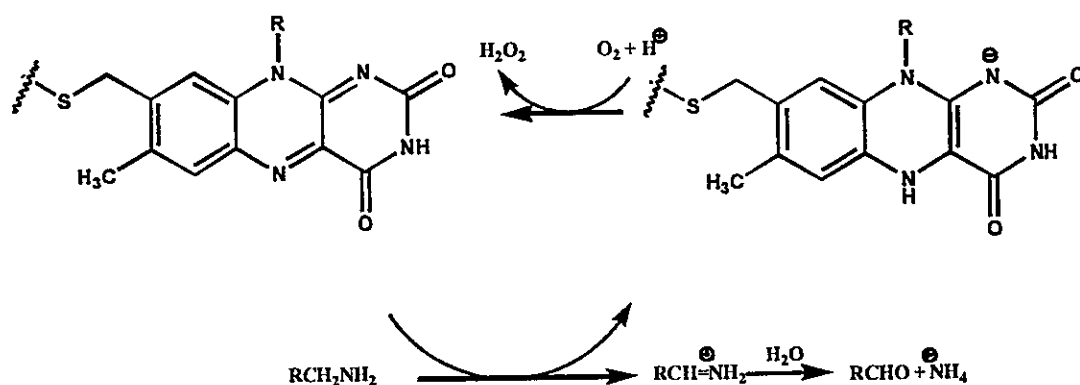


Figura 3: Sustratos endógenos y exógenos de MAO.

MAO-A preferentemente cataliza la oxidación de serotonina, en cambio MAO-B oxida más eficazmente feniletilamina y bencilamina. Dopamina, noradrenalina, tiramina, triptamina y adrenalina son igualmente metabolizadas por ambas isoformas.⁹

Su función la realiza mediante un proceso denominado desaminación oxidativa (Esquema 1).¹⁰ La reacción genera una imina protonada intermediaria, que es liberada del sitio activo de la enzima, e involucra la reducción del cofactor FAD. Posteriormente este último es reoxidado con oxígeno molecular produciendo peróxido de hidrógeno. El

intermediario imínico es hidrolizado no-enzimáticamente para formar el aldehído correspondiente junto con ión amonio (en el caso de las aminas primarias). El aldehído producido es rápidamente metabolizado por la enzima aldehído deshidrogenasa para generar los metabolitos ácidos correspondientes. Se encuentran estudios recientes sobre dos posibles mecanismos de la reacción de oxidación del sustrato al aldehído, uno de los cuales es por medio de radicales libres^{11, 12} y el otro se describe como nucleofílico polar, para el cual se propone un mecanismo concertado.^{13, 14}



Esquema 1: Desaminación oxidativa catalizada por MAO.

Estructura y sitios activos

Las estructuras cristalinas de MAO-A y MAO-B humanas (hMAO-A y hMAO-B) y MAO-A de rata (rMAO-A) ya han sido elucidadas con diferentes tipos de inhibidores.¹⁵⁻¹⁷ Sin embargo la estructura cristalina de la MAO-B de rata hasta la fecha

aun no ha sido publicada. Una vez obtenidas las estructuras tridimensionales se han realizado estudios sobre las interacciones y disposición de los residuos aminoacídicos en los sitios activos. Se observó que el sitio activo de la hMAO-A consiste en una cavidad de aproximadamente 550 \AA^3 de volumen, la cual está constituida por 11 residuos alifáticos y 5 aromáticos, lo que indicaría que esta cavidad es completamente hidrofóbica.¹⁵ No obstante muy recientemente Yamashita y col. lograron estudiar la estructura cristalina de hMAO-A a una mayor resolución, observando que además en el sitio activo se encuentran siete moléculas de agua que interactúan con el inhibidor, residuos aminoacídicos y FAD por medio de puentes de hidrógeno.¹⁸

El sitio activo de hMAO-B por su parte consiste en una cavidad hidrofóbica que aloja el sustrato, de un volumen de 420 \AA^3 , conectada a una cavidad de entrada de 290 \AA^3 . Este último sitio tiene la particularidad de que el residuo que separa ambas cavidades (Ile 199), de sustrato y de entrada, se puede comportar como "compuerta", ya que éste se puede acomodar de forma tal que deja pasar inhibidores de mayor volumen, produciéndose la fusión de ambas cavidades.¹⁵

Realizando una comparación entre los sitios activos de hMAO-A y hMAO-B, se acepta que ambos están constituidos por 20 aminoácidos, donde 7 residuos de los 20 son distintos en ambos sitios catalíticos.¹⁶ Por otra parte los dos sitios poseen una "caja aromática" que consiste en el anillo de isoaloxacina del FAD y dos residuos de tirosina que ocupan posiciones idénticas en ambos. Estudios de mutagénesis sugieren que su

función sería condicionar el volumen de los ligandos para acceder a la flavina para su interacción y aumentar la nucleofilia del grupo amino del ligando mediante la transferencia de carga desde los anillos aromáticos de las tirosinas.¹⁹

Patologías asociadas a MAO

Desórdenes neuropsiquiátricos

Por más de cuatro décadas el enfoque biológico para la depresión ha estado dominado por la hipótesis de las monoaminas. Esta hipótesis propuso que la depresión es causada por un déficit funcional de monoaminas (noradrenalina, serotonina y posiblemente dopamina) en regiones límbicas (emocionales) del cerebro. Esta hipótesis fue sustentada por el descubrimiento de que algunos pacientes tratados con reserpina (una droga antihipertensiva, la cual disminuye la disponibilidad de monoaminas) manifestaban episodios de depresión. Además observaron que drogas antidepresivas ejercían su primer efecto aumentando las concentraciones intrasinápticas de estas aminas biogénicas.²⁰

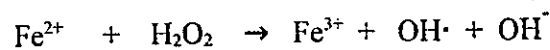
Con estos antecedentes la propiedad antidepresiva de los inhibidores de MAO (IMAO) se debería a la inhibición selectiva de MAO-A en el SNC, lo que conllevaría a un aumento de los niveles cerebrales de dopamina, noradrenalina y serotonina.

Desórdenes neurodegenerativos

Enfermedades como las de Parkinson y Alzheimer se caracterizan por una

degeneración específica de neuronas que se encuentran localizadamente en ciertas regiones del cerebro. En el caso de la enfermedad de Parkinson, esta degeneración afecta principalmente el sistema dopaminérgico nigroestriatal (que vincula las áreas cerebrales denominadas *substantia nigra* y *cuerpo estriado*), teniendo como consecuencia directa una drástica disminución de los niveles de dopamina que llegan al estriado. En la enfermedad de Alzheimer existe la pérdida de neuronas colinérgicas en el hipocampo, disminuyendo la concentración de acetilcolina.^{21,22}

En ambas patologías, los pacientes presentan además una disminución de los niveles de serotonina, dopamina y noradrenalina comparados con cerebros sanos y además se ha observado que existe un aumento de la actividad de MAO-B,²³ y una disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH), utilizado por la glutatión peroxidasa para inactivar el peróxido de hidrógeno, producto del metabolismo normal de aminas por MAO, dismutándolo en H₂O y O₂.²⁴ En consecuencia, al disminuir la eficacia de esta vía de detoxificación, el peróxido de hidrógeno formado podría acumularse y por ende estar más disponible para la reacción de Fenton:



En esta reacción el ion ferroso genera a partir de H₂O₂ radicales hidroxilos que son altamente reactivos, produciendo altos niveles de estrés oxidativo. Estos radicales hidroxilos producen daños en la membranas lipídicas de la células, proteínas y ADN, lo que puede conducir al deterioro y muerte neuronal.

Por esto los IMAO-B en estos pacientes no sólo aumentarían los niveles de

monoaminas (en especial dopamina) sino que también disminuirían la producción de peróxido de hidrógeno y la potencial formación de radicales hidroxilos y el consecuente estrés oxidativo.

Inhibidores de MAO

Los inhibidores de MAO se clasifican principalmente en irreversibles y reversibles. Los primeros tienen la propiedad de formar un intermediario reactivo que puede tratarse de una especie radicalaria o electrofílica, la cual inactiva la enzima permanentemente por medio de la formación de un enlace covalente entre el IMAO y el anillo de isoaloxacina. Los reversibles producen su efecto inhibitorio mediante interacciones no covalentes, las cuales al ser revertidas permiten que se restablezca la actividad de la enzima al estado normal. Estos últimos inhibidores pueden ser clasificados dependiendo de su mecanismo cinético en competitivos, acompetitivos y no competitivos.

Inhibidores irreversibles

Los primeros IMAO fueron descubiertos por casualidad hace más de cincuenta años cuando pacientes con tuberculosis fueron tratados con iproniazida. Al administrar este compuesto los médicos observaron un notable mejoramiento del ánimo de los pacientes. Estudios de Zeller y col. establecieron que iproniazida es un potente inhibidor

de MAO. Continuando con estos estudios, en 1957 Kline y col. la introdujeron al mercado para la terapia de la depresión convirtiéndose en el primer antidepresivo moderno. Este y otros derivados de hidracina como fenelzina, todos irreversibles e inespecíficos, constituyeron la primera generación de IMAOs (Figura 4).²⁵

Sin embargo en la década de los sesenta se estableció que iproniazida y sus derivados presentaban altos índices de hepatotoxicidad, debido a la inactivación del citocromo P₄₅₀ asociada a su estructura derivada de hidrazina. Este problema fue resuelto con el desarrollo de nuevos inhibidores que no son derivados de hidrazina, como tranilcipromina. Sin embargo tanto esta última droga al igual que las anteriores presentó otro serio efecto secundario, la "reacción del queso". Esta reacción es inducida por tiramina y otras aminas presentes en la comida (más comúnmente en el queso, a lo que debe su nombre) y bebidas fermentadas, como vino y cerveza. Bajo circunstancias normales tales aminas son metabolizadas por MAO en la pared intestinal y en el hígado, evitando su ingreso al sistema circulatorio. En la presencia de IMAO irreversibles este sistema de protección es inactivado y tiramina junto con otras aminas no son metabolizadas y por ende se introducen al sistema circulatorio. Su entrada induce una significativa liberación de noradrenalina desde las neuronas adrenérgicas periféricas. La consecuencia de esta liberación desmedida provoca una crisis hipertensiva que en algunos casos puede ser fatal.

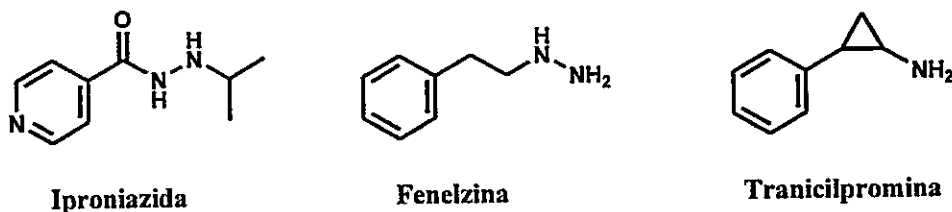


Figura 4: algunos inhibidores irreversibles de MAO.

En vista de estos efectos se estimuló la búsqueda de antidepresivos que no fueran IMAO, sino inhibidores de la recaptación de los neurotransmisores por sus transportadores. Así se descubrieron los antidepresivos tricíclicos (TCA), poco selectivos, y los más comúnmente utilizados hoy en día, los inhibidores de la recaptación selectiva de serotonina (SSRI) como fluoxetina.

Los inhibidores irreversibles y selectivos más conocidos de MAO son clorgilina y L-deprenil, de MAO-A y MAO-B respectivamente. (Figura 5). Este último fue probado por Riederer a fines de los años setenta para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson como adyuvante de L-dopa e incluso más recientemente existen estudios de su utilización como monoterapia.²⁶

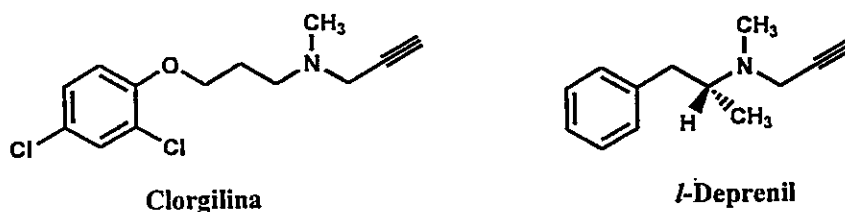


Figura 5: Inhibidores irreversibles y selectivos de MAO.

Inhibidores reversibles

Debido a los serios efectos secundarios de los inhibidores irreversibles como hepatotoxicidad y la reacción del queso se desarrollaron inhibidores reversibles de MAO-A (RIMA), inhibidores de nueva generación, tales como moclobemida y toloxatona (Figura 6), los cuales permiten inhibir suficientemente la MAO-A en el SNC para obtener un efecto antidepresivo, mientras que la tiramina proveniente de la dieta es capaz de desplazar al inhibidor de la MAO-A periférica, permitiendo su metabolismo por ésta y por la MAO-B que no ha sido inhibida.²⁷ Toloxatona, un derivado de oxazolidinona, fue el primer potente, reversible y selectivo inhibidor de MAO-A clínicamente usado como antidepresivo.²⁸ En este tipo de inhibidores es donde se ha centrado la búsqueda de diversas estructuras cada vez más selectivas y potentes de cada isoforma.

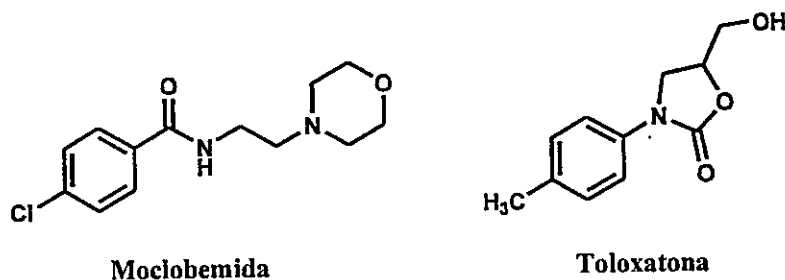


Figura 6: algunos inhibidores reversibles de MAO.

Estructuras de inhibidores

En la literatura se encuentran registradas diferentes series de compuestos que ejercen una potente inhibición de una u otra isoforma de la MAO, los cuales presentan una gran diversidad estructural. Entre éstos destacan las series de los derivados de α -metilmonoaminas (1), los cuales son selectivos inhibidores de MAO-A.²⁹ Ciertos sistemas tricíclicos, al igual que los anteriores, son inhibidores de MAO-A, donde el compuesto BW 1370U87 (2) es uno de los más potentes con una $K_i = 10$ nM.³⁰ Al contrario, determinados derivados de hidroquinonas (3) con sustituciones en los átomos de oxígeno son reversibles y selectivos inhibidores de MAO-B.³¹ Algunos análogos de indoles como ciertos espirociclopentanoindoles (4) y derivados de isoquinolinas (5) son selectivos inhibidores de MAO-A con valores de K_i submicromolares (Figura 7).^{32,33}

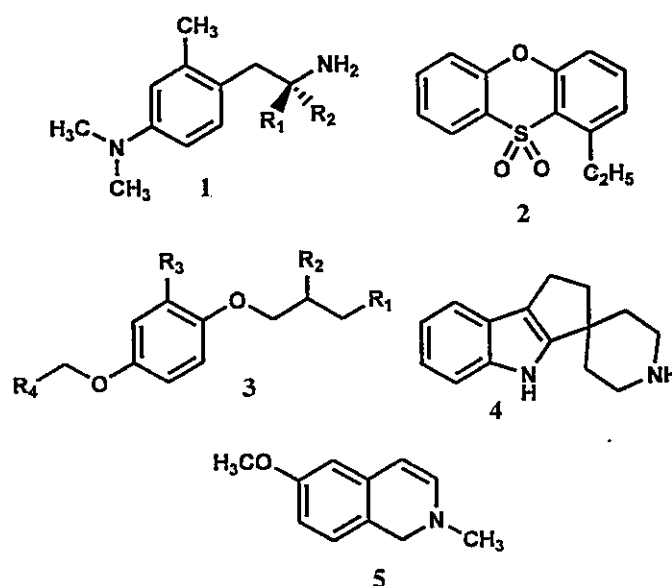


Figura 7: diversos inhibidores de MAO.

La gran diversidad estructural de los inhibidores hace que la búsqueda racional de subestructuras imprescindibles para establecer interacciones fundamentales con el sitio activo de la enzima sea muy compleja. Con la finalidad de acotar la variedad estructural, se seleccionaron de la literatura ciertos tipos estructurales de inhibidores reversibles de MAO-A y B, derivados de ariloxadiazolona (6), ariltiadiazolona (7), ariltiadiazoltiona (8) ariloxadiazinona (9), ariloxadiazinotona (10),^{34, 35} ariltetrazol (11)³⁶ y ariloxazolidinona (12, 13)³⁷ (Figura 8).

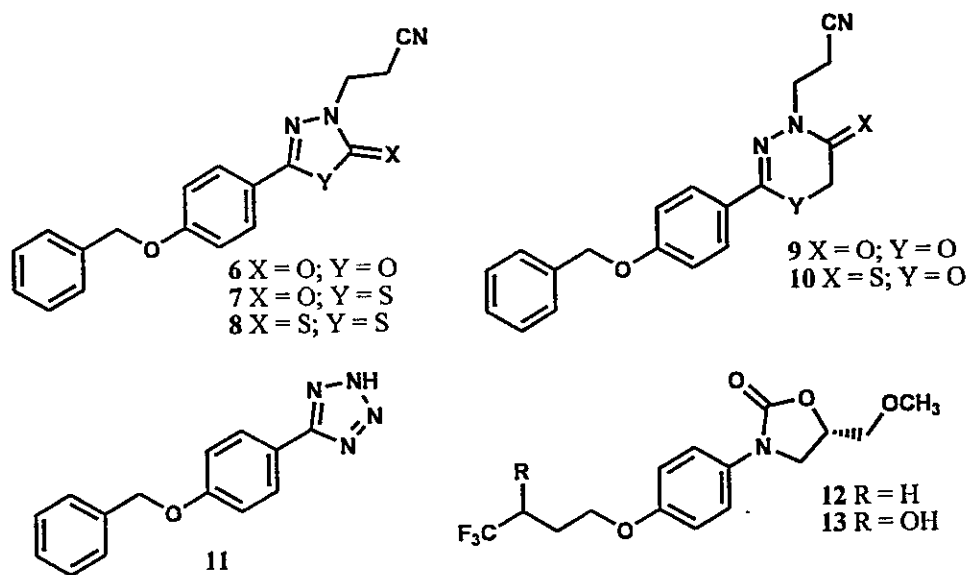


Figura 8: Inhibidores reversibles de MAO.

Se observó que las estructuras de los derivados 6-13 contienen las siguientes tres subunidades importantes:

[hidrofóbica]-O-[bencénica]-[heterocíclica]

Además, en la porción heterocíclica, generalmente poco básica, se encuentran grupos aceptores de puente de hidrógeno. La parte hidrofóbica comúnmente es un grupo bencénico, el cual puede encontrarse sustituido con diferentes grupos electrón-dadores y aceptores (no se muestran en la figura 8). Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, los autores concluyen que sin importar el carácter del sustituyente del anillo aromático (electrón-dador o aceptor), estos derivados presentan actividades de inhibición inferiores a aquellas de los compuestos no sustituidos en el anillo.³⁴ Otra porción de tipo hidrofóbica puede estar constituida por cadenas alifáticas, eventualmente con un grupo trifluorometilo o hidroxilo en su extremo (12-13), los cuales podrían generar potenciales puentes de hidrógeno con algún residuo del sitio activo de la enzima.³⁷ Esta subunidad hidrofóbica se encuentra unida por un puente éter a la fracción aromática central, que consiste en un anillo bencénico, el cual a su vez está unido a un heterociclo parcialmente insaturado, de tamaño y sustitución diversos. En la mayoría de los casos el heterociclo corresponde a un derivado de hidrazina, ya que los primeros IMAO desarrollados consistieron en derivados de este tipo pero acíclicos. Debido a sus efectos secundarios (mencionado anteriormente), los autores contemplaron el diseño de inhibidores con el grupo N-N integrado en un heterociclo.³⁵

Por otra parte se sabe que derivados de 4-alcoxi- o alquiltiofenilisopropilamina (formalmente derivados de anfetamina) son potentes inhibidores de MAO, generalmente de MAO-A, en los cuales la subunidad heterocíclica está reemplazada por una cadena alifática aminada (Figura 9).³⁸ Muy recientemente se han agregado a éstos algunos

análogos con un grupo naftilo en lugar del fenilo.³⁹

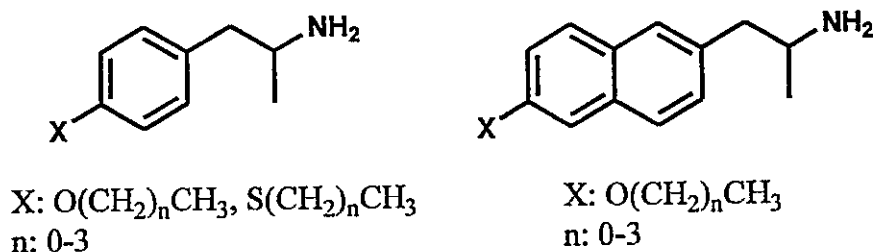


Figura 9: Derivados de 4-alcoxi- y alquiltioarilisopropilamina.

En vista de estos resultados se propone que la ciclación de la cadena lateral aminada de estos últimos compuestos, conteniendo en el ciclo los heteroátomos oxígeno o azufre y nitrógeno, podría mantener la afinidad de estos derivados por la enzima. Por otra parte se cree que al aumentar la hidrofobicidad de la molécula por medio de la ciclación podrían aumentar las interacciones con residuos aminoacídicos que presenten esta propiedad, pudiéndose lograr una mayor afinidad por el sitio activo predominantemente hidrofóbico (una vez desplazadas las moléculas de agua) de la enzima.

En base a estas observaciones, este tesis contempló el diseño, la síntesis y la evaluación farmacológica de análogos de feniletilamina, en los cuales la cadena aminada está constreñida formando un heterociclo. Este último se encuentra unido a un anillo bencénico que está unido por un éter a una parte hidrofóbica. Aquí se reconocen las tres subunidades básicas mencionadas anteriormente, aunque en estos casos se trata de heterociclos saturados no derivados de hidracina. Además se sintetizaron los análogos

ciclados sin sustitución en el anillo aromático.

En cada una de las series se modificó la extremidad hidrofóbica en posición *para* del anillo aromático. Al parecer, debido a la hidrofobicidad de una parte del sitio activo antes mencionada, cadenas alifáticas de longitud adecuada o grupos bencílicos podrían aumentar las interacciones de los posibles IMAO con los residuos aminoacídicos de esta misma naturaleza.

Se propuso sintetizar una primera serie de derivados de 2-arilmorfolin-5-ona (14) y de 2-arilmorfolina (15) con diferentes sustituciones alquílicas (y bencílicas) en el oxígeno en *para* con respecto al heterociclo (Figura 9). Sin embargo mediante la ruta sintética propuesta sólo se logró el intermediario anterior a la ciclación, lo que se discute más detalladamente en el capítulo de resultados y discusión. No obstante mediante esta ruta se obtuvieron como intermediarios cuatro derivados de ftalimidas (16) que satisfacen la propuesta de las tres subunidades, por lo que también fueron evaluados como IMAO (Figura 10).

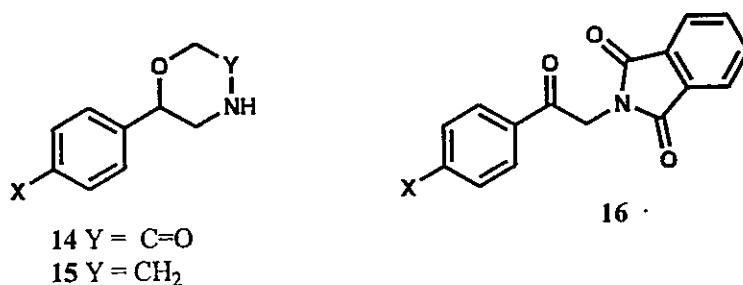


Figura 10: Derivados de 2-arilmorfolina y ftalimida.

Debido a la no formación de los derivados de morfolina se sintetizaron los análogos azufrados que constituyen una serie de derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona (17) y 2-ariltiomorfolina (18), los que fueron evaluados como IMAO (Figura 11).

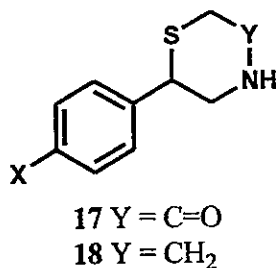


Figura 11: Derivados de 2-ariltiomorfolina.

Se realizaron estudios teóricos de modelamiento molecular (“docking”) utilizando metodologías computacionales con el objeto de intentar una racionalización de los resultados y proponer algunas interacciones importantes que se estén efectuando entre el ligando y algunos residuos aminoacídicos del sitio activo.

Hipótesis

Considerando que algunos derivados de feniletilaminas son potentes inhibidores de MAO, que su potencia aumenta con la longitud de la cadena unida a la posición *para* del anillo bencénico (hasta 4-5 átomos pesados) y que estudios de "docking" indican que este grupo lipofílico puede orientarse hacia el cofactor FAD y entre residuos aminoacídicos que contienen grupos susceptibles de formar puentes de hidrógeno, se propone como hipótesis que:

1. Al incorporar en los derivados de feniletilamina nuevos átomos de carbono para ciclar la cadena aminada y en los sustituyentes en la posición *para* del anillo aromático, se acrecentará la potencia inhibitoria frente a la MAO.
2. Al incluir en el nuevo ciclo generado un átomo aceptor de puentes de hidrógeno como oxígeno, azufre o nitrógeno, o un grupo dador como NH, aumentará la actividad inhibitoria de la enzima.

Objetivos generales

El objetivo general de este proyecto fue sintetizar y evaluar la actividad farmacológica como posibles inhibidores de la enzima monoaminoxidasa de una serie de derivados de 2-arilmorfolina y eventualmente de sistemas en los cuales el oxígeno del heterociclo estuviera reemplazado por azufre, nitrógeno o metileno, con el fin de explorar los requerimientos estructurales asociados con la actividad inhibitoria de las 2-ariletilaminas sustituidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos enzimáticos en MAO de rata

El método utilizado para determinar la actividad de MAO fue la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ED). Ésta permite cuantificar la cantidad de producto formado en la reacción enzimática catalizada por MAO y en la oxidación ulterior, por medición directa de la altura de los picos de los metabolitos en los cromatogramas de las evaluaciones en serie.

Condiciones cromatográficas

Previo a cada experimento se inyectó en el cromatógrafo estándares de concentración conocida de sustratos selectivos de cada isoforma de la enzima y de sus principales metabolitos: 5-HT y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) para MAO-A y 4-dimetilaminofeniletamina (4-DMAPEA) y ácido 4-dimetilaminofenilacético (4-DMAPAA) para MAO-B. Esto permite conocer los tiempos de retención de sustratos y metabolitos y la separación de los picos cromatográficos.

Se utilizó una columna de fase reversa LichroCART C₁₈ (ODS 250 mm × 4.0 mm, Merck USA), un detector amperométrico (Merck-Recipe L3500A) equipado con un electrodo de trabajo de carbono vítreo y un cromato-integrador (Merck-Hitachi D2500).

El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min.

Preparación de la fase móvil para ambas isoformas de la enzima de rata

Para preparar la fase móvil se disolvieron 15,75 g de ácido cítrico en 445 mL de agua con calidad para HPLC y se agregó NaOH hasta pH 3,0; luego se adicionaron 100 mg de octadecilsulfato de sodio (SOS) y se agitó durante 5 min. La solución se filtró con un sistema de microfiltro utilizando papel con tamaño de poro 0,2 μm para desgasificar la solución, y el matraz se dejó al vacío, agitando de vez en cuando, por aproximadamente 20 min. Se realizó una segunda filtración a través de una frita de poro N° 5 pasando la solución a una botella, repitiendo el proceso de desgasificación por otros 20 min. Cuidadosamente y evitando la formación de burbujas se adicionó lentamente y por las paredes 35 mL de MeCN y 20 mL de THF de calidad para HPLC. La sensibilidad del detector fue fijada en 50 nA y el potencial de trabajo en 0,75 V frente a un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

Obtención de la suspensión mitocondrial

Se utilizó como fuente de enzima una suspensión mitocondrial de cerebro de rata sacrificada por decapitación. El tejido fue homogeneizado en 10 mL de sacarosa 0,32 M (homogeneizador Potter-Elvehjem de teflón-vidrio) y centrifugado a $800 \times g$ durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue cuidadosamente extraído y centrifugado a $10000 \times g$ durante 20 min a 4°C. El "pellet" obtenido fue resuspendido en el mismo 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 y utilizado en forma inmediata o mantenido a 0 °C por no más de dos horas antes de su uso.

Determinación de la actividad de MAO- A

La mezcla de incubación consistió en una solución de 200 µL de tampón de fosfato de sodio pH 7,4, 50 µL de 5-HT 100 µM y 50 µL del inhibidor disuelto en agua en concentraciones desde 10⁻⁴ a 10⁻⁷ M en la mayoría de los casos. Esta mezcla fue incubada en un baño termoregulado por 10 min a 37 °C, para luego dar comienzo a la reacción agregando 200 µL de suspensión mitocondrial. 10 min más tarde la reacción fue detenida adicionando 200 µL de HClO₄ 1 M. La mezcla fue centrifugada a 15000 × g durante 5 min a 4 °C, y 50 µL del sobrenadante fueron inyectados en el sistema de HPLC-ED. Los experimentos control fueron hechos sin inhibidor. Las alturas de los picos cromatográficos del principal metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), fueron usadas para calcular la actividad de la enzima. Los valores de IC₅₀ (concentración de inhibidor que hace que la actividad de la enzima se reduzca en un 50%), fueron calculados a partir de las curvas de inhibición construidas utilizando el programa GraphPad Prism, graficando el porcentaje de inhibición versus -log de la concentración del inhibidor.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{[(D) \cdot 100]}{\text{control}}$$

Ecuación 1: Cálculo del porcentaje de inhibición de MAO-A

Determinación de la actividad de MAO-B

La mezcla de incubación consistió en una solución de 200 μL de tampón de fosfato de sodio pH 7,4, 25 μL de 4-DMAPEA 100 μM y 50 μL del inhibidor en concentraciones desde 10^{-4} a 10^{-7} M en la mayoría de los casos. Esta mezcla fue incubada en un baño termoregulado por 10 min a 37 $^{\circ}\text{C}$, para luego dar comienzo a la reacción agregando 180 μL de suspensión mitocondrial. 10 min más tarde la reacción fue detenida adicionando 200 μL de HClO_4 1M. La mezcla fue centrifugada a $15000 \times g$ durante 5 min a 4 $^{\circ}\text{C}$, y 50 μL del sobrenadante fueron inyectados en el sistema de HPLC-ED. Los experimentos control fueron hechos sin inhibidor. Las alturas de los picos cromatográficos del principal metabolito fueron usadas para calcular la actividad de la enzima. Los valores de IC_{50} (concentración de inhibidor que hace que la actividad de la enzima se reduzca en un 50 %), fueron calculados a partir de las curvas de inhibición construídas utilizando el programa GraphPad Prism, graficando el porcentaje de inhibición versus $-\log$ de la concentración del inhibidor.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{[(D) \cdot 100]}{\text{control}}$$

Ecuación 2: Cálculo del porcentaje de inhibición de MAO-B

Ensayos enzimáticos en MAO humana

Determinación de la actividad en hMAO-A

La actividad de MAO-A (forma recombinante hepática humana)⁴⁰ fue medida espectrofotométricamente a 30 °C en fosfato de potasio 50 mM a pH 7,4, conteniendo 0,05 % de Triton X-100. La formación de producto fue seguida a 314 nm, usando kinuramina 0,3 mM ($2 \times K_m$) como sustrato. Los valores de IC_{50} fueron determinados usando diferentes concentraciones de los compuestos a ensayar. Los valores de K_i fueron determinados usando un rango de concentraciones de sustrato 0,1-0,9 mM. La naturaleza hidrofóbica de los compuestos ensayados en este estudio requirió su solubilización en dimetilsulfóxido y se agregaron alícuotas de esta solución a las suspensiones de ensayo. Los valores de K_m aparente para cada concentración de inhibidor (gráficos de Hanes-Woolf en el programa de Cinética Shimadzu UV-2101PC) fueron graficados como función de las concentraciones de inhibidor, cuyo valor en el eje X cuando $Y = 0$ se tomó como el valor de K_i respectivo. Los datos fueron presentados en un gráfico de Lineweaver-Burk (programa Prism 4.0) para ilustrar el no cambio de V_{max} .

Determinación de la actividad en hMAO-B

La actividad de MAO-B (humana recombinante)⁴¹ fue medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 250 nm a 25 °C en fosfato de potasio 50 mM a pH 7,4, conteniendo 0,05 % de Triton X-100, utilizando bencilamina

como sustrato. Primero se realizó un "screening" a dos concentraciones de inhibidor, 100 μM y 10 μM . Sólo a los compuestos que mostraron aproximadamente un 100 % de inhibición a esas concentraciones se les determinaron las K_i , usando un rango de concentraciones de sustrato 0,05-1 mM. La naturaleza hidrofóbica de los compuestos ensayados en este estudio requirió su solubilización en dimetilsulfóxido y se agregaron alícuotas de esta solución a las suspensiones de ensayo. Los valores de K_m aparente para cada concentración de inhibidor fueron graficados como función de las concentraciones de inhibidor, cuyo valor en el eje X cuando $Y = 0$ se tomó como el valor de K_i respectivo. Los datos fueron presentados en un gráfico de Lineweaver-Burk (programa Prism 4.0) para ilustrar el no cambio de V_{max} .

Estudios de reversibilidad

Se prepararon dos muestras de control. La primera de ellas (C1) contenía sustrato (kinuramina 0,15 mM o bencilamina 0,3 mM para hMAO-A y hMAO-B respectivamente) y 10 μL de enzima recombinante purificada, cuyos resultados corresponderían al 100 % de la actividad de la enzima. El segundo control (C2) contenía además inhibidor a una concentración tal que la actividad de la enzima se redujera en aproximadamente un 50 %. A ambos se le agregó buffer hasta completar un volumen final de 1000 μL . Una vez preparados, las absorbancias de ambos controles fueron medidas de inmediato espectrofotométricamente a 25 °C por 60 segundos.

Una solución X de enzima más inhibidor fue preparada (concentración de

inhibidor igual a C2), la cual fue incubada en hielo.

Simultáneamente se prepararon tres cubetas (A), las cuales contenían sustrato (kinuramina 0,15 mM para MAO-A y bencilamina 0,3 mM para MAO-B) y 980 μ L de buffer.

A la primera cubeta se le agregó 10 μ L de la solución X recién preparada (tiempo = 0), a la segunda se le agregó a los 5 minutos de incubación en hielo de la solución enzima-inhibidor y a la última se le agregó a los 10 minutos de incubación. Después de agregar la solución X a cada cubeta, su absorbancia fue medida espectrofotométricamente a 25 °C por 60 segundos.

Estudios de modelamiento molecular (docking)

Los datos cristalográficos de rMAO-A, hMAO-A y hMAO-B (PDB: 105W, 2BXS y s3B respectivamente)⁴² fueron usados para todos los cálculos. Ya que rMAO-B no se encuentra aun cristalizada fue necesario realizar los modelamientos moleculares en un modelo construido por homología con hMAO-B, el cual no fue generado en este trabajo de tesis.⁴³ Los átomos de hidrógeno de la proteína y de la molécula del FAD fueron introducidos en los modelos usando Insight II y las estructuras de 12 derivados fueron dibujadas y optimizadas en el programa Gaussian 0.3.^{44,45} Los mapas de grilla fueron calculados usando la opción autogrid4 y fueron centrados en el sitio de unión del

ligando. Los volúmenes escogidos para los mapas de grilla fueron construidos de $60 \times 60 \times 60$ puntos con un espaciamiento de $0,375 \text{ \AA}$. Las cargas parciales de los ligandos fueron corregidas mediante cálculos de ESP. La constante dieléctrica fue ajustada a 10 para hMAO-A y 2 para rMAO-A en el archivo (gpf) de parámetros de grilla de Autodock. Para realizar los estudios de modelamiento molecular se utilizó el programa Autodock 4.0 usando el Algoritmo Genético Lamarckiano.⁴⁶ La visualización de las moléculas acopladas se realizó en el programa Pymol 1.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Química

En este trabajo de tesis se propuso la síntesis de derivados de 2-arilmorfolin-5-ona (14) y 2-arilmorfolina (15). Ya que no fue posible su obtención mediante la ruta sintética propuesta, debido a que sólo se llegó a sintetizar el último intermediario de la ruta completa, se prepararon los bioisómeros azufrados, seis derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona ("tionas" 17a-f) y seis derivados de 2-ariltiomorfolina ("tinas" 18a-f) mediante otra alternativa sintética. Sin embargo la modificación de ciertas etapas de la primera ruta dio lugar a la obtención de cuatro intermediarios derivados de ftalimida (16a-d) los cuales junto con las tionas y tinas fueron evaluadas como IMAO (Figura 12).

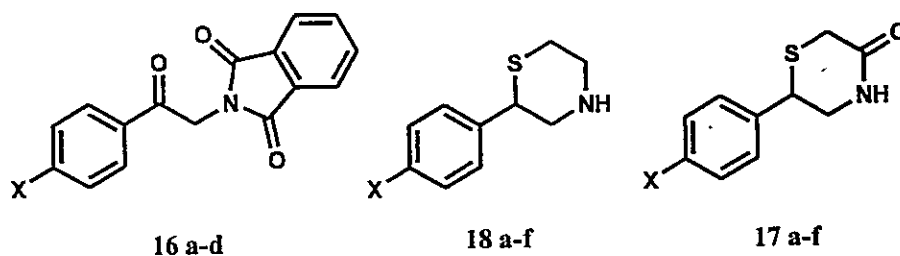
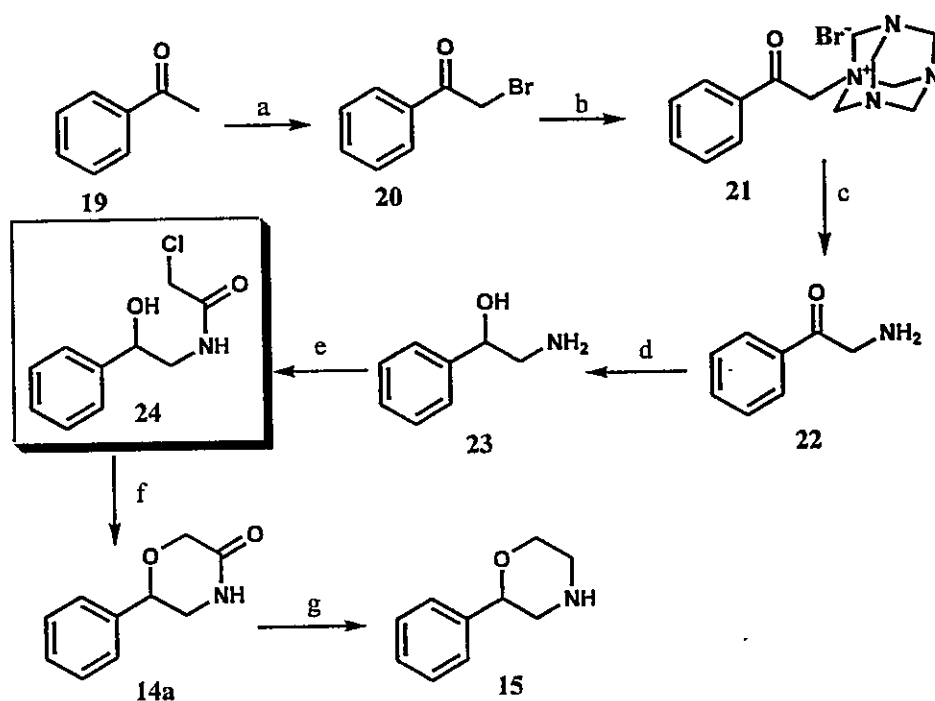


Figura 12: Derivados de ftalimida 16 (a: X=-H, b: X=-OCH₃, c: X=-O(CH₂)₃CH₃, d: -OCH₂Ph), 2-Ariltiomorfolinas y -tiomorfolinonas (a: X = -H, b: X=-OCH₃, c: X=-OCH₂CH₃, d: -O(CH₂)₂CH₃, e: X= -O(CH₂)₃CH₃, f: X=-OCH₂Ph).

Ruta sintética propuesta para la obtención de derivados de 2-fenilmorfolina

El intento de síntesis de los derivados de 2-arilmorfolina, los primeros derivados propuestos, se llevó a cabo de forma análoga a la ruta sintética de Glennon y col., donde se modificaron sólo algunas etapas, generalmente iniciales, en las cuales los productos obtenidos se obtuvieron con bajos rendimientos o simplemente no se formaron en cantidades detectables.⁴⁷

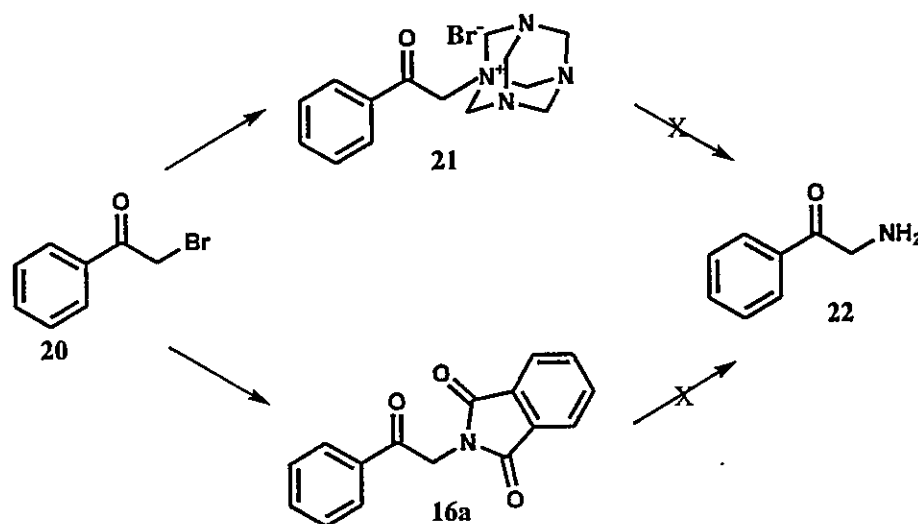
Por la ruta sintética para la obtención de 2-fenilmorfolina a partir de acetofenona (19) (Esquema 2) se formó primeramente α -bromoacetofenona (20) mediante la bromación del carbono α .



Esquema 2: Ruta sintética de 2-fenilmorfolina. Reactivos y condiciones: a) Br_2 , AlCl_3 , Et_2O ; b) hexametilentetramina, CHCl_3 ; c) HCl , EtOH 95%; d) NaBH_4 , MeOH ; e) ClCH_2COCl , NaOH , CH_2Cl_2 ; f) EtOH , KOH ; g) LiAlH_4 , THF . Rectángulo representa al último intermediario obtenido.

Cabe destacar que las condiciones utilizadas para la bromación de la acetofenona (19), en la cual inicialmente se utilizó Br_2 en CHCl_3 con un 49% de rendimiento (purificado por cromatografía en columna),⁴⁷ fueron reemplazadas por Br_2 y AlCl_3 usando Et_2O como solvente.⁴⁸ Esto condujo a la obtención de 20 como producto único sin necesidad de purificarlo y un aumento considerable en el rendimiento aislado (81 %).

Con una cantidad razonable del intermediario 20 se intentó la siguiente etapa, la formación de la α -aminocetona 22, la cual se llevó a cabo por medio de dos vías alternativas (Esquema 3), ambas a partir del compuesto 20.



Esquema 3: Vías alternativas para la obtención de la β -cetoamina 22.

La primera vía consistió en la reacción de Delépine (etapas 2 y 3 de la ruta propuesta), cuyo producto obtenido no fue el deseado (22), sino un producto único D1 (caracterización en Anexo1) (esta reacción fue ensayada en varias ocasiones antes de continuar con otra ruta). Por este motivo se ensayó una segunda alternativa para la

formación de la α -aminocetona, basada en la síntesis de Gabriel.⁴⁹ Mediante este procedimiento se obtuvo la sustitución del halógeno por la ftalimida (**16a**) con rendimientos satisfactorios, pero su hidracinólisis en medio ácido tampoco condujo a la formación del producto esperado, sino a un producto **H1** (caracterización en Anexo 1). Ambos productos (**D1** por Delépine y **H1** por Gabriel) presentaron comportamientos cromatográficos en capa fina (relaciones de frente) y señales espectroscópicas de ^1H y ^{13}C RMN idénticas. Ambos espectros de ^1H RMN contenían únicamente señales sobre los 7 ppm correspondientes a cuatro tipos de protones distintos, indicando la ausencia de protones unidos a carbonos sp^3 . Con estos resultados se infirió que la estructura del producto podría ser la de un dímero derivado de la α -aminocetona. Ya que la estructura de este intermediario contiene un centro nucleofílico (grupo amino) y uno electrofílico (grupo carbonilo), éstos podrían reaccionar entre ellos, formándose una doble imina, la cual se oxidaría fácilmente en presencia de aire para dar un derivado de pirazina de mayor estabilidad (**25**) (Figura 13).

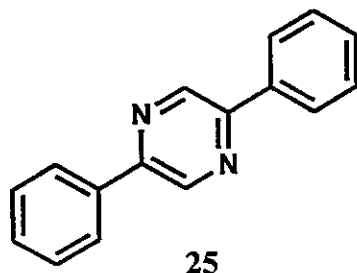


Figura 13: Estructura de **D1** y **H1**.

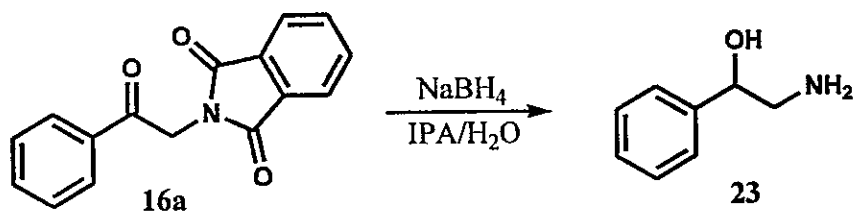
Los espectros de ^{13}C presentaron señales correspondientes a seis tipos de carbonos, probablemente con hibridación sp^2 y dos de ellos cuaternarios (Anexo 2), de

acuerdo con la estructura propuesta. Por espectroscopía de masas, la señal principal presentó una relación m/z de 232, la cual concuerda con el peso molecular aproximado de 25. Para la fórmula $C_{16}H_{12}N_2$ la masa exacta calculada es 232,10005 y la experimental fue 232,00044 y 232,100035 para **D1** y **H1** respectivamente. Inesperadamente se encontró un artículo de Immediata y col., en el cual se describe la dificultad de obtener una α -aminocetona debido a la formación de un derivado de 2,5-diarilpirazina.⁵⁰ Además en este mismo artículo los autores relatan que Gabriel en 1908 ya había reportado que el producto aislado al tratar clorhidrato de 2-aminoacetofenona con base es la 2,5-difenilpirazina, formulando el proceso de la misma manera descrita más arriba.⁵¹ En estos trabajos antiguos las diarilpirazinas no fueron caracterizadas espectroscópicamente como se realizó en este trabajo de tesis, que corrobora las propuestas de los autores citados y por lo tanto exigió la búsqueda de nuevos caminos de síntesis.

Se realizó una pequeña búsqueda bibliográfica de derivados de pirazina con el fin de encontrar una posible aplicación biológica. Uno de los trabajos encontrados reportaba propiedades citotóxicas e intercalación de ADN de una serie de derivados de 2,6-difenilpirazina en células de leucemia.⁵² Debido a la similitud estructural entre estos derivados y la 2,5-difenilpirazina se realizaron estudios preliminares de su citotoxicidad pero, en células tumorales de mama de ratón de la línea TA3. El resultado de citotoxicidad es bastante prometedor con un valor de IC_{50} 2,78 μ M al compararlo con reportes previos para una serie de derivados de antracentriona y tetralona, cuyos valores de IC_{50} son mayores a 80 μ M.^{53, 54} Si bien una investigación más profunda es necesaria

para determinar el verdadero potencial de estos compuestos como agentes citotóxicos, posibles modificaciones estructurales, como diferentes sustituciones en el anillo aromático, podrían generar una nueva batería de compuestos, abriendo un nuevo campo de investigación.

Continuando con la búsqueda de nuevas posibilidades se encontró un artículo de Osby y col., quienes utilizaron NaBH_4 para el rompimiento de la ftalimida con liberación del grupo amino.⁵⁵ Esta alternativa presentaba la posibilidad de la reducción del grupo carbonílico al alcohol deseado. Satisfactoriamente se obtuvo como único producto aislado y caracterizado el 2-amino-1-feniletanol (23) (Esquema 4), con un rendimiento aceptable del 63%.



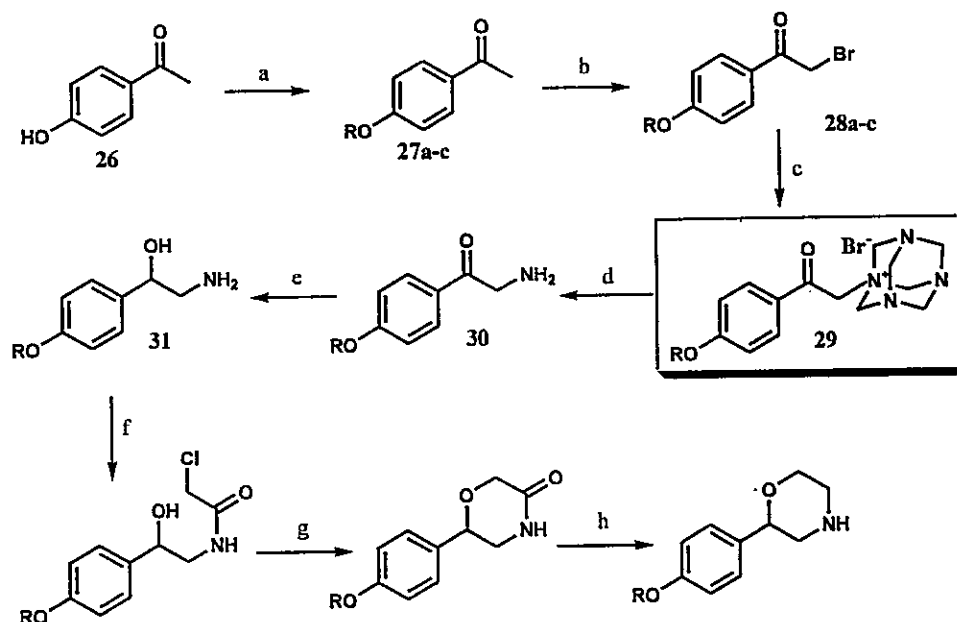
Esquema 4: Obtención aminoalcohol 23.

Del mismo modo que para el compuesto 16a, se sustituyó el bromo de los intermediarios 28a-c por el grupo ftalimida, con lo que se aislaron y caracterizaron 16b-d (procedimiento en Anexo 1). Así, además de obtener un producto deseado, se eliminaron dos etapas de la ruta sintética. Con el producto 16a se continuó la síntesis, que permitió aislar y caracterizar la amida 24. Pese a que se ensayaron algunas formas de ciclación de esta amida, como por ejemplo variaciones de temperatura de la mezcla

de reacción, no fue posible su obtención.

Ruta sintética propuesta para la obtención de 2-(4-alcoxifenil)morfolinas

A partir de 4-hidroxiacetofenona (26), se prepararon los compuestos *O*-alquilados 27a-c por medio de la reacción de Williamson. Luego, mediante su bromación en el carbono α , se obtuvieron los derivados bromados 28a-c.⁴⁷ Solamente con el compuesto metoxilado en la posición *para* del anillo aromático (28a) y el no sustituido se continuaron las siguientes etapas de la ruta sintética. Se realizó la reacción de Delépine,⁵⁶ que permitió caracterizar la sal de amonio 29 y el clorhidrato de la α -aminocetona 30. No obstante es necesario considerar que este último producto se obtuvo con un rendimiento en extremo insatisfactorio (0,24 %) (Esquema 5). Con la pequeña cantidad obtenida fue imposible continuar con las siguientes etapas de la ruta sintética.



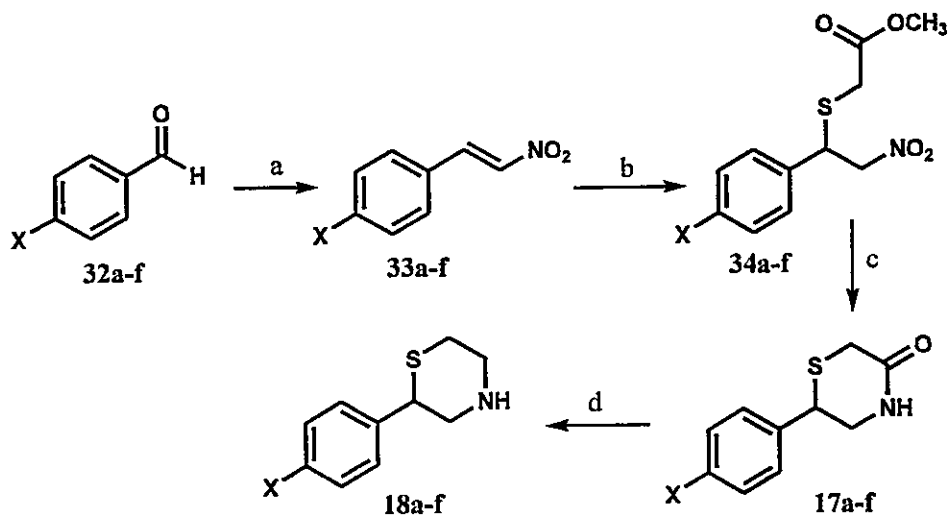
Esquema 5: Ruta sintética de 2-(4-alcoxifenil)morfolinas. Reactivos y condiciones: a) RX, K_2CO_3 , CH_3CN ; b) Br_2 , $CHCl_3$; c) hexametilentetramina, $CHCl_3$; d) HCl, EtOH 95%; e) $NaBH_4$, MeOH; f) $ClCH_2COCl$, NaOH, CH_2Cl_2 ; g) EtOH, KOH; h) $LiAlH_4$, THF. a: R = $-CH_3$, b: R = $-(CH_2)_3CH_3$, c: R = $-CH_2Ph$. Rectángulo representa al último intermediario obtenido.

Se consideró primordial lograr la síntesis de los compuestos finales propuestos en el proyecto de tesis. Por esta razón la búsqueda de nuevas condiciones de reacción, con el fin de aumentar rendimientos en las etapas iniciales, así como también el planteamiento de nuevas rutas sintéticas, fue un trabajo imprescindible durante el transcurso de este periodo. Con el objeto de obtener algún bioisómero con fines comparativos se comenzó simultáneamente a intentar la síntesis de ariltiomorfolinas. Ya que con estos ensayos se obtuvieron resultados positivos, sólo se priorizó la obtención de estos derivados.

Ruta propuesta para obtener los derivados de 2-ariltiomorfina

Los derivados 4-alcoxilados **32c-f** fueron sintetizados a partir de 4-hidroxibenzaldehído, cuyo hidroxilo fenólico fue alcoxilado con cuatro halogenuros de alquilo diferentes en medio básico. La siguiente etapa, formación de los nitroestirenos (**33a-f**) (los compuestos **33a** y **33b** fueron sintetizados a partir de benzaldehído **32a** y anisalaldehído **32b** respectivamente), involucró una condensación de Henry-Knoevenagel del aldehído correspondiente con nitrometano, catalizada por base y seguida de una deshidratación. El posterior ataque nucleofílico del azufre del metiltioglicolato al doble enlace permitió obtener los nitroésteres **34a-f**.⁵⁷ La reducción del grupo nitro a la amina correspondiente y su inmediata ciclación se ensayó de acuerdo al protocolo descrito por Kelly y col., quienes realizaron la reducción de un grupo nitro (en su caso aromático) a

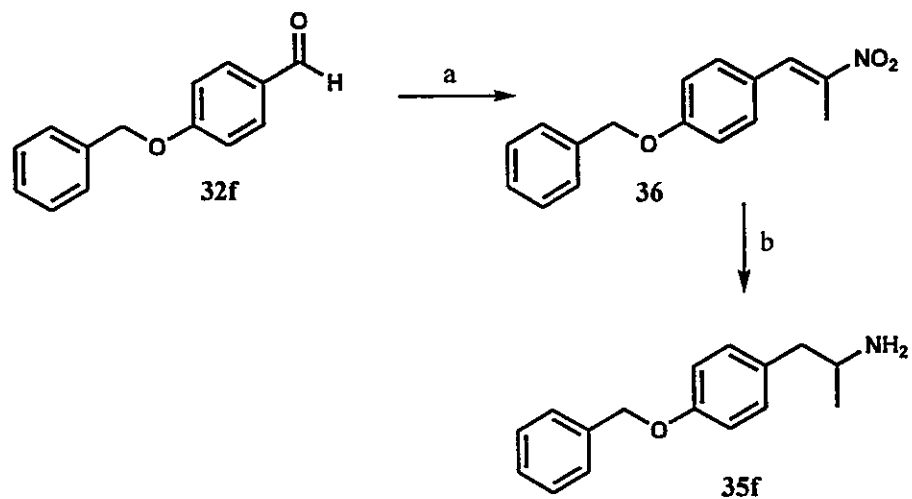
la amina correspondiente empleando SnCl_2/HCl , lo que además induce el ataque nucleofílico de esta última a un grupo éster próximo.⁵⁸ Sin embargo mediante este procedimiento se formó una serie de compuestos que no pudieron ser aislados ni caracterizados. Continuando con la búsqueda se encontraron otros artículos, en los cuales se describe la reducción de un grupo nitro, unido a un carbono secundario, a una amina, con Zn/AcOH ^{59, 60} o con $\text{Zn}/\text{HCl}/\text{IPA}$.⁶¹ Finalmente se utilizó el método de Battersby y col., donde el grupo nitro fue reducido con Zn en ácido acético, lo que condujo al ataque nucleofílico inmediato de la amina al centro electrofílico del grupo éster para la formación del heterociclo correspondiente.⁶² La formación del heterociclo fue respaldado por ^1H RMN, donde se observaron cuatro señales características de este heterociclo. A δ 3,35 y 3,53 ppm se observa dos dobletes que integran para un protón cada uno, correspondientes a los protones CH_2NH . Luego en δ 3,68-3,78 ppm aparece un multiplete que integra para dos protones, correspondiente a CH_2S . En δ 4,25-4,30 un doble de dobletes que integra para un protón correspondiente para CH_2CHS . Por último a δ 6,20-6,30 ppm aparece un singlete ancho correspondiente a NH . Finalmente la reducción de las lactamas (**17a-f**) se produjo con hidruro de di-isobutilaluminio (DIBAL-H), obteniéndose los derivados de tiomorfolina **18a-f** (Esquema 6).⁶³ En los espectros de ^1H RMN, se observan seis multipletes entre δ 2,8 ppm a 4,3 ppm, los cuales corresponden a los siete protones del heterociclo reducido.



Esquema 6: Ruta sintética de 2-ariltiomorfolinas. Reactivos y condiciones: a) CH_3NO_2 , CH_3COONa , Tolueno; b) $\text{HSCH}_2\text{COOMe}$, N(Et)_3 , THF; c) Zn , CH_3COOH ; d) DIBAL-H , THF. (a: $X = -\text{H}$, b: $X = -\text{OCH}_3$, c: $X = -\text{OCH}_2\text{CH}_3$, d: $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$, e: $X = -\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, f: $X = -\text{OCH}_2\text{Ph}$)

Síntesis de 4-benciloxifenilisopropilamina

Los doce derivados sintetizados en este trabajo experimental fueron comparados con seis derivados de arilisopropilamina sustituidos en el carbono cuatro, de los cuales solamente la 4-benciloxifenilisopropilamina fue sintetizada en este trabajo a partir de 4-benciloxibenzaldehído (33f), el cual fue tratado con nitroetano catalizado por base para obtener el nitropropeno correspondiente (35). Finalmente el doble enlace y el grupo nitro fueron reducidos simultáneamente con LiAlH_4 a la amina correspondiente 36f (Esquema 7).



Esquema 7: Ruta sintética de 35f. Reactivos y condiciones: a) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NO}_2$, CH_3COOH , ciclohexilamina; b) LiAlH_4 , THF.

Ensayos cinéticos

En la Tabla 1 se muestran los valores de las constantes de inhibición obtenidas para las dos series de compuestos sintetizados en este trabajo de tesis, 2-ariltiomorfolin-5-onas ("tionas", 17a-f) y 2-ariltiomorfolininas ("tinias", 18a-f), que fueron ensayadas como posibles inhibidores de monoamino oxidasas A y B, tanto de rata como humana. Además se presentan los respectivos valores de inhibición para seis derivados racémicos de arilisopropilamina (35a-f, Figura 14) evaluados únicamente sobre ambas isoformas de MAO de rata, que permitieron establecer una valiosa comparación entre éstos y las dos series conformacionalmente restringidas de tionas y tinias.

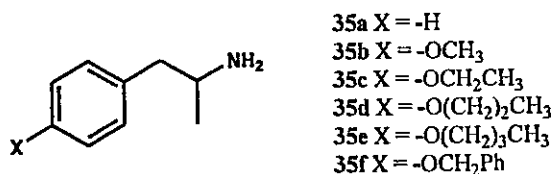


Figura 14: Derivados de 2-arilisopropilamina ("anfetaminas").

Con hMAO-A se realizaron experimentos enzimáticos para obtener los valores de IC₅₀, donde sólo los compuestos con estas concentraciones menores a 100 µM se sometieron a experimentos cinéticos para obtener sus respectivas constantes de inhibición. Para hMAO-B se realizó un "screening" a dos concentraciones diferentes de inhibidor (100 µM y 10 µM) y posteriormente los compuestos cuyas actividades inhibitorias eran de aproximadamente 100 % en ambas concentraciones se sometieron a ensayos cinéticos con el fin de obtener las constantes de inhibición correspondientes. En

cambio para las enzimas de rata se obtuvieron valores de IC_{50} de las curvas de dosis-respuesta, los cuales fueron utilizados en el supuesto que la inhibición fuera competitiva, para el cálculo de las constantes de inhibición por medio de la ecuación de Cheng-Prusoff. Ésta relaciona los valores de IC_{50} con las constantes de inhibición dependiente de la concentración de sustrato como se muestra en la Figura 15.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S]/K_m}$$

Ecuación 3: Ecuación de Cheng-Prusoff

Por último, la Tabla 1 muestra una tercera columna correspondiente a la selectividad mostrada por los compuestos entre las dos isoformas de enzima y que se define aquí por la proporción $K_i(\text{MAO-A})/K_i(\text{MAO-B})$.

Los experimentos cinéticos realizados permitieron la construcción de gráficos de Lineweaver-Burk, donde se grafica el recíproco de la concentración de sustrato versus el recíproco de la velocidad de acuerdo a la siguiente ecuación

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Ecuación 4: Ecuación de Lineweaver-Burk

De acuerdo al tipo de gráfica obtenida se infirió que todos los derivados ensayados en las enzimas humanas actúan como inhibidores competitivos, donde se observa un aumento de la K_m .

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{[S]} \cdot \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \frac{1}{V_{max}}$$

Ecuación 5: Ecuación de Inhibición competitiva

Sin embargo al parecer a altas concentraciones de inhibidor podría éste estar interactuando con algún sitio alostérico de la enzima, provocando que las rectas a mayores concentraciones de inhibidor no intersecten perfectamente por el mismo punto en eje Y, teniendo como consecuencia pequeñas variaciones en V_{max} .

Mediante la linealización de Hanes-Woolf se obtuvieron los valores de las K_m aparentes, ya que los de Lineweaver-Burk presentan mayores rangos de error a las concentraciones de sustrato utilizadas (Ecuación 6).

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{[S]}{V_{max}}$$

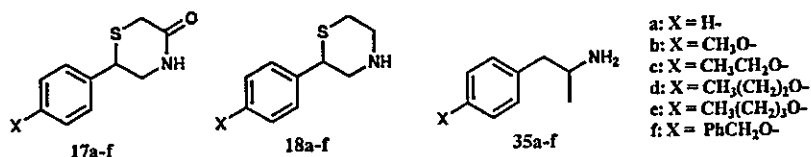
Ecuación 6: Ecuación de Hanes-Woolf

Finalmente los valores de la constantes de inhibición fueron obtenidos como el intercepto en el eje X, al graficar las K_m aparentes versus la concentración de inhibidor (Ecuación 7).

$$K_{map} = K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Ecuación 7: Ecuación para la obtención de los valores de K_i

Tabla 1: Valores de K_i y selectividad de los inhibidores de las series 17a-f y 18a-f y para las fenilisopropilaminas 35a-f frente a MAO A y B de rata y humana.



Comp	K_i MAO-A [μ M]		K_i MAO-B [μ M]		Selectividad ^b	
	humana ^a	rata	humana	rata	humana	rata
17a	>100	9,19 \pm 1,43	>100	9,58 \pm 1,75	—	1
17b	>100	9,28 \pm 2,09	>100	13,6 \pm 2,16	—	0,68
17c	60 \pm 8,57	12,3 \pm 1,14	16,9	3,40 \pm 1,01	3,5	3,6
17d	40 \pm 1,85	8,68 \pm 1,12	2,4	1,49 \pm 0,03	16,7	6
17e	10 \pm 0,34	50,9 \pm 6,19	0,46 \pm 0,18	0,16 \pm 0,01	22	318
17f	>100	27,5 \pm 4,62	0,048 \pm 0,03	0,074 \pm 0,003	>2000	373
18a	>100	10,6 \pm 0,41	>100	2,23 \pm 0,03	—	5
18b	16,2 \pm 2,29	6,39 \pm 0,14	>100	3,85 \pm 0,01	—	1,7
18c	9,60 \pm 1,63	2,17 \pm 0,13	2,1	2,17 \pm 0,31	5	1
18d	6,62 \pm 0,34	3,69 \pm 0,39	0,13 \pm 0,011	0,98 \pm 0,11	51	4
18e	2,50 \pm 0,25	14,1 \pm 1,22	0,068 \pm 0,016	0,27 \pm 0,02	37	52
18f	>100	19,0 \pm 0,36	0,037 \pm 0,003	0,13 \pm 0,004	>2700	146
35a	ND	12,2 \pm 2,72 ^c	ND	>100 ^c	—	>0,12
35b	ND	0,25 \pm 0,04 ^c	ND	>100 ^c	—	>0,0025
35c	ND	0,22 \pm 0,02 ^c	ND	>100 ^c	—	>0,0022
35d	ND	0,13 \pm 0,02 ^c	ND	ND ^c	—	—
35e	ND	0,32 \pm 0,04 ^c	ND	ND ^c	—	—
35f	ND	3,42 \pm 0,17 ^c	ND	0,71 \pm 0,11 ^c	—	5

^a: Los errores estándar para hMAO-A fueron calculados para la regresión sigmoideal, los cuales no son comparables con la desviación estándar calculada por el promedio de diferentes ensayos como en los otros casos. ND: no determinado; ^b: se calculó mediante la proporción (K_i MAO-A)/(K_i MAO-B). ^c: datos obtenidos de la literatura para fines comparativos.

En las siguientes figuras se muestran las curvas de dosis-respuesta para los doce derivados de 2-ariltiomorfina ensayados en ambas isoformas de rata. Además a continuación se presentan las curvas de Lineweaver-Burk, Hanes y curvas para la obtención de los valores de K_i de los derivados que fueron ensayados en las enzimas humanas.

Curvas de dosis respuesta en MAO-A de rata

Derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona (17a-f)

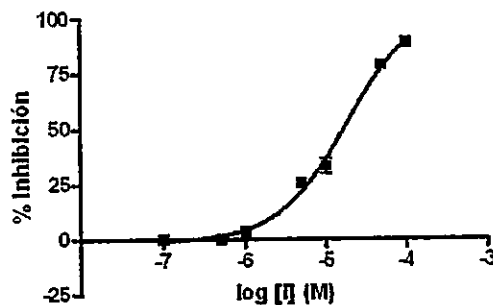


Figura 15: Curva dosis respuesta de 17a.

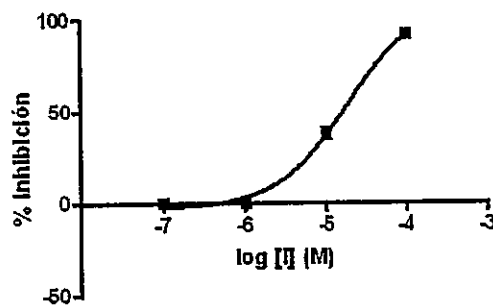


Figura 16: Curva dosis respuesta de 17b.

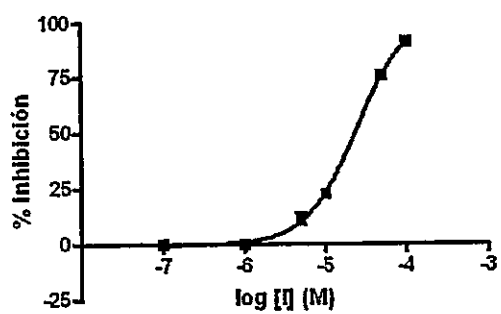


Figura 17: Curva dosis respuesta de 17c.

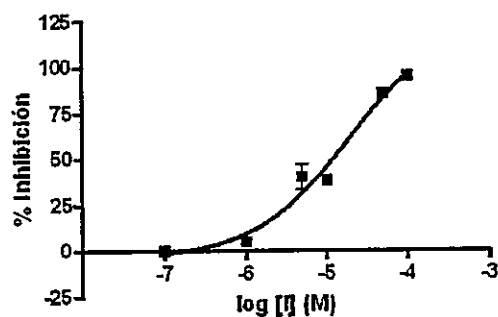


Figura 18: Curva dosis respuesta de 17d.

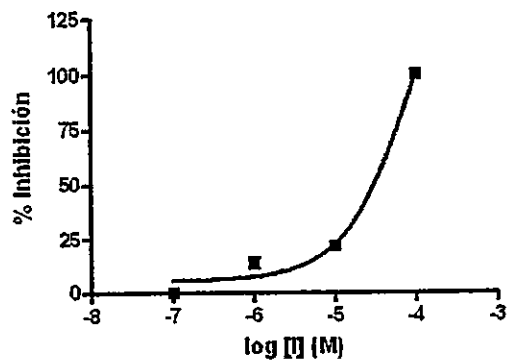


Figura 19: Curva dosis respuesta de 17e.

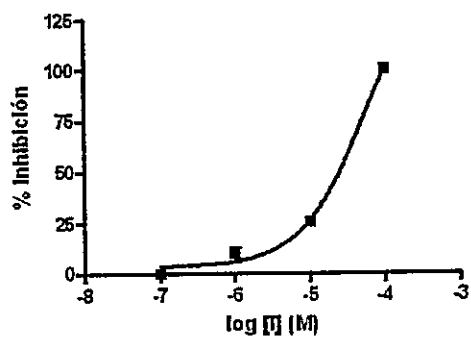


Figura 20: Curva dosis respuesta de 17e.

Derivados de 2-ariltiomorfina (18a-f)

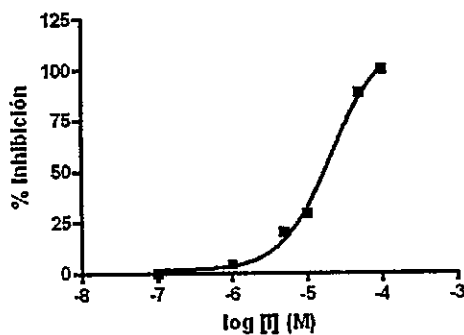


Figura 21: Curva dosis respuesta de 18a.

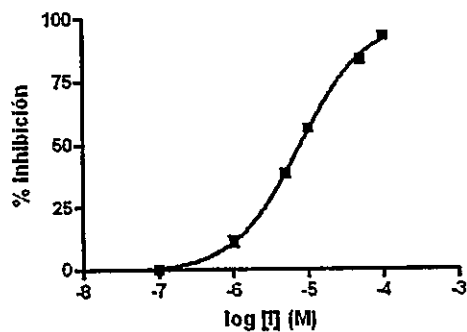


Figura 22: Curva dosis respuesta de 18b.

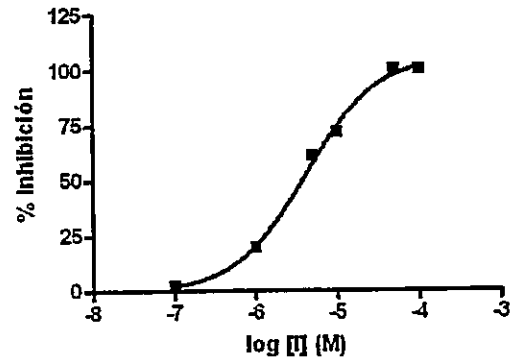


Figura 23: Curva dosis respuesta de 18c.

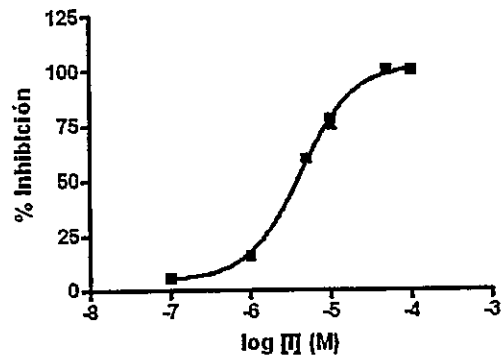


Figura 24: Curva dosis respuesta de 18d.

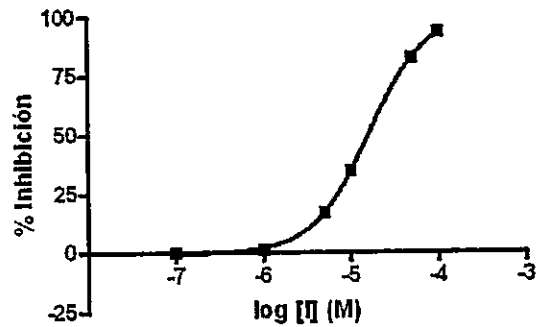


Figura 25: Curva dosis respuesta de 18e.

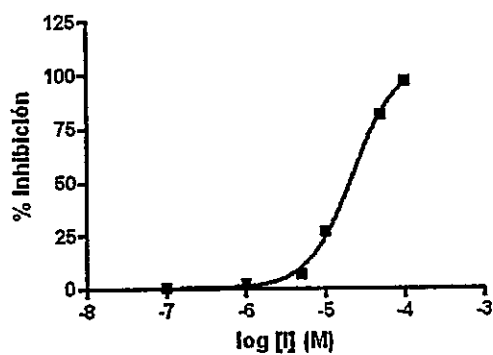


Figura 26: Curva dosis respuesta de 18f.

Curvas de dosis respuesta en MAO-B de rata

Derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona (17a-f)

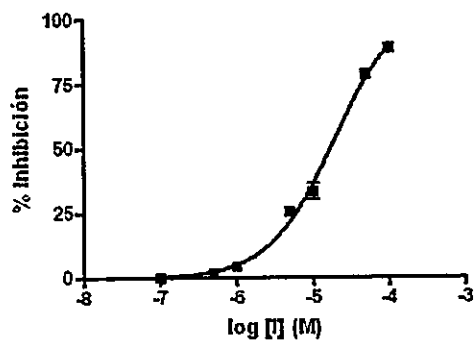


Figura 27: Curva dosis respuesta de 17a.

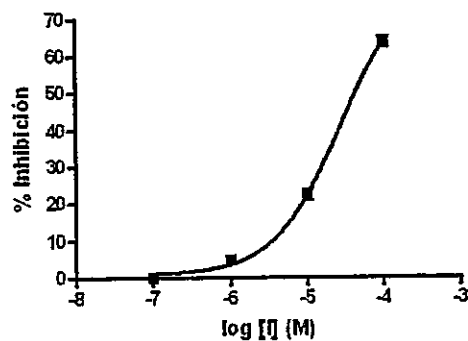


Figura 28: Curva dosis respuesta de 17b.

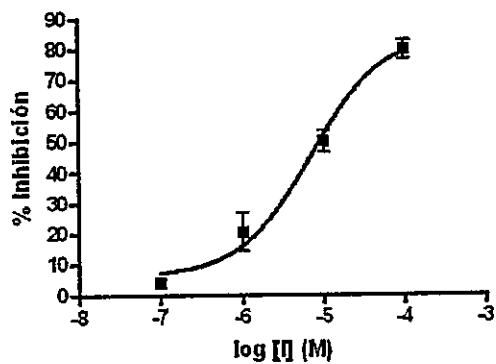


Figura 29: Curva dosis respuesta de 17c.

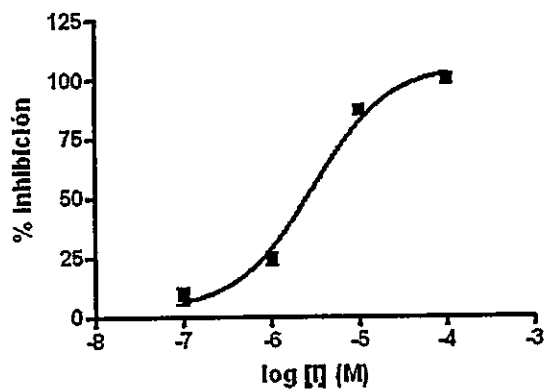


Figura 30: Curva dosis respuesta de 17d.

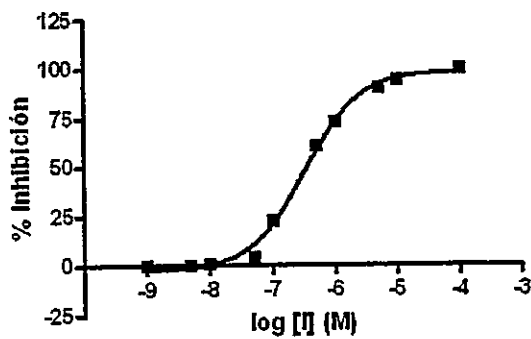


Figura 31: Curva dosis respuesta de 17e.

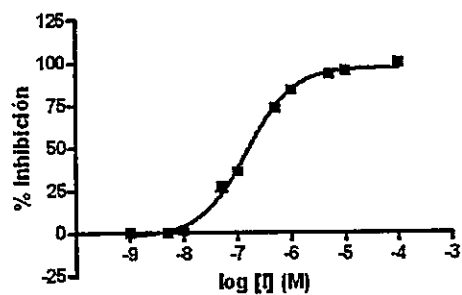


Figura 32: Curva dosis respuesta de 17f.

Derivados de 2-ariltiomorfina (18a-f)

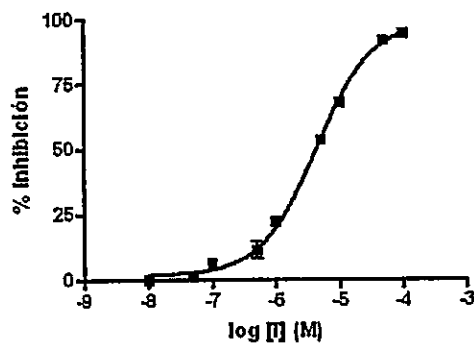


Figura 33: Curva dosis respuesta de 18a.

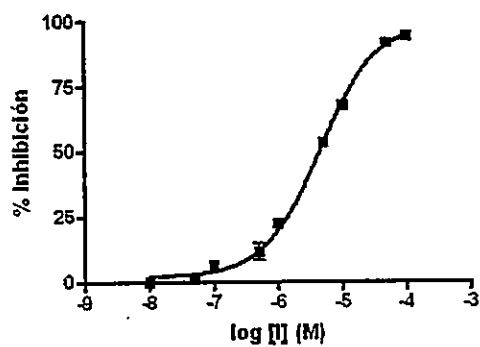


Figura 34: Curva dosis respuesta de 18b.

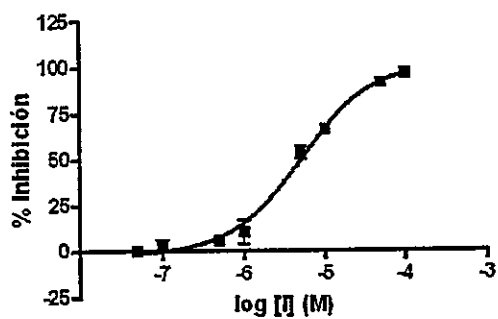


Figura 35: Curva dosis respuesta de 18c.

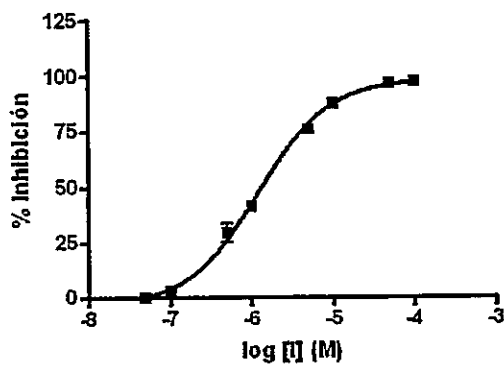


Figura 36: Curva dosis respuesta de 18d.

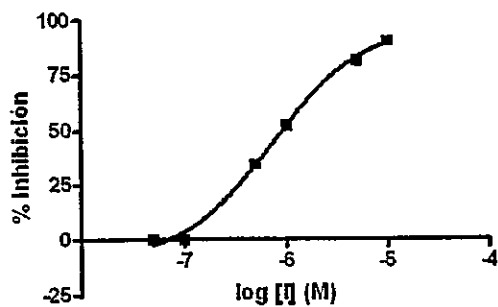


Figura 37: Curva dosis respuesta de 18e.

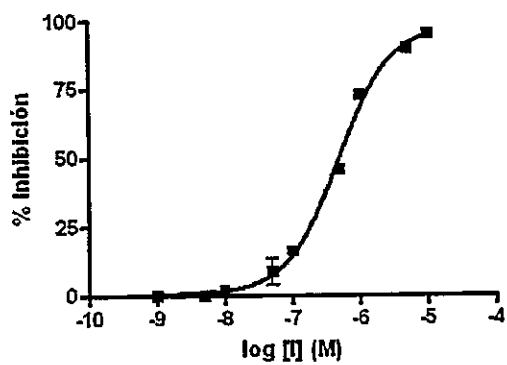


Figura 38: Curva dosis respuesta de 18f.

Gráficos de Lineweaver-Burk para los datos obtenidos con MAO-A humana (unidades: $1/[S]$ μM^{-1} , $1/V$ $\mu\text{M}^{-1}\text{seg}$)

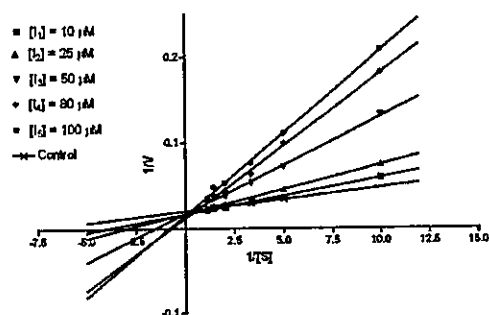


Figura 39: Gráfico de Lineweaver-Burk de 17e.

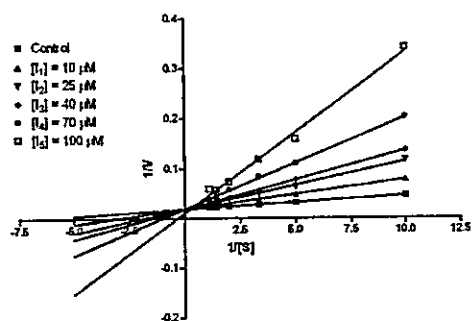


Figura 40: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18b.

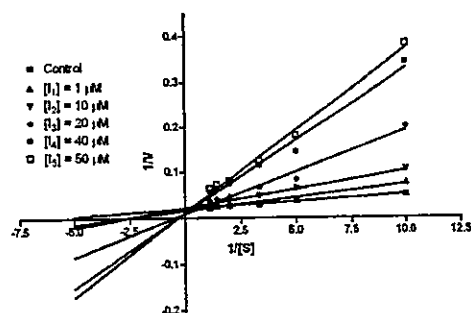


Figura 41: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18c.

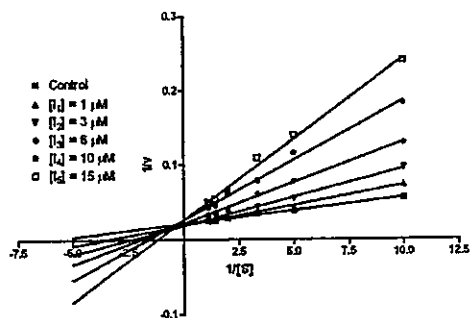


Figura 42: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18d.

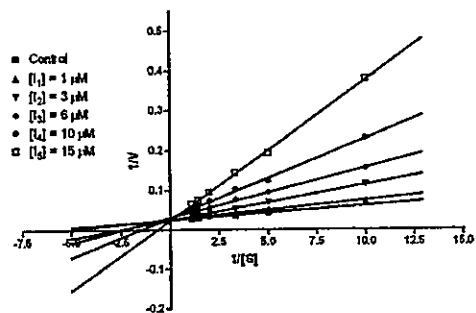


Figura 43: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18e.

Gráficos de Hanes-Woolf para los datos obtenidos con MAO-A humana (unidades: [S] μM , [S]/V seg)

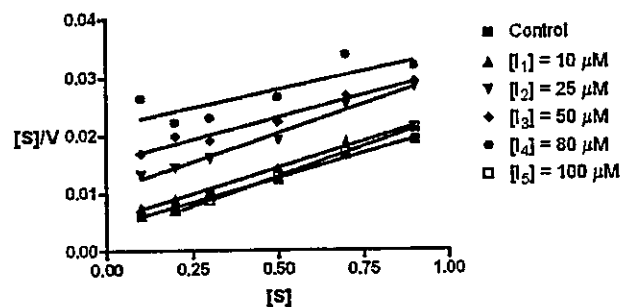


Figura 44: Gráfico de Hanes de 17e.

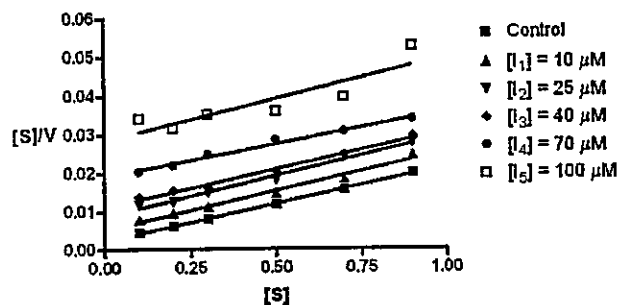


Figura 45: Gráfico de Hanes de 18b.

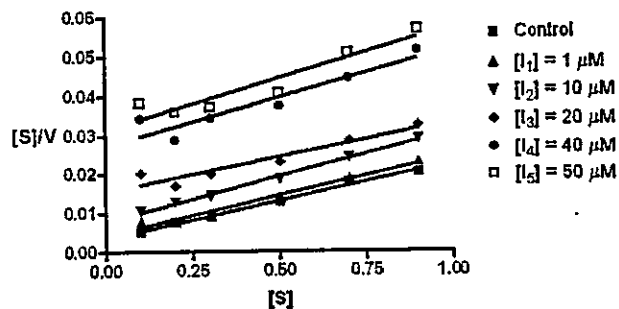


Figura 46: Gráfico de Hanes de 18c.

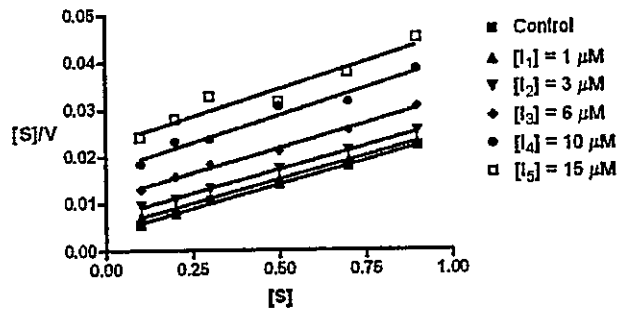


Figura 47: Gráfico de Hanes de 18d.

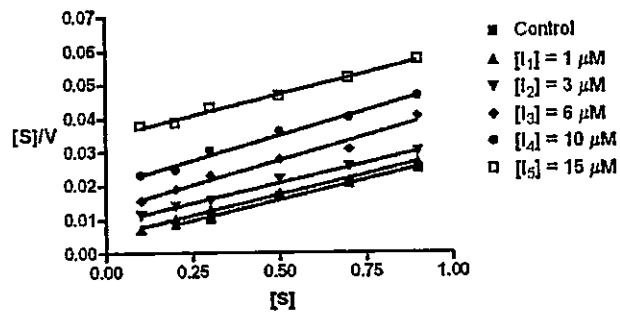


Figura 48: Gráfico de Hanes de 18e.

Efecto de la concentración de inhibidor sobre la K_m aparente (K_{map}) en MAO-A humana

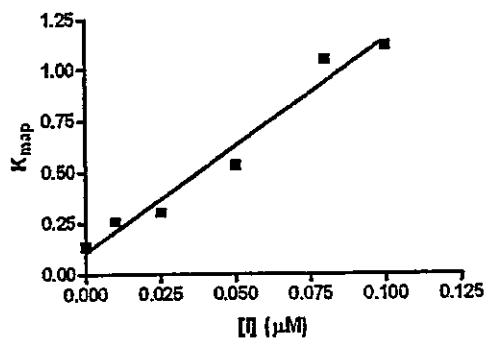


Figura 49: K_{map} vs. $[I]$ de 17e.

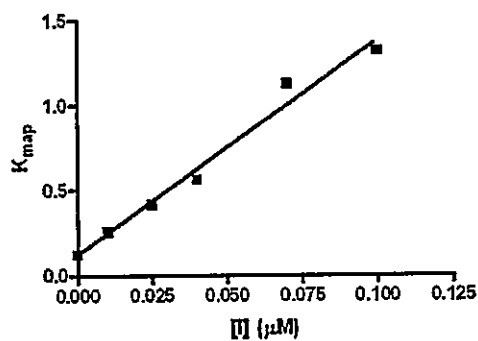


Figura 50: K_{map} vs. $[I]$ de 18b.

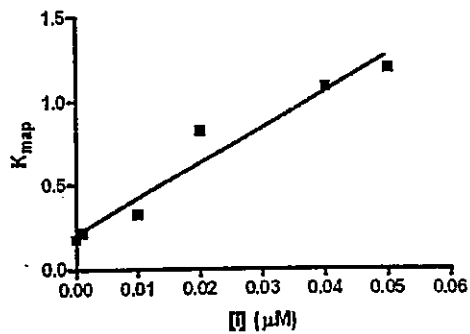


Figura 51: K_{map} vs. $[I]$ de 18c.

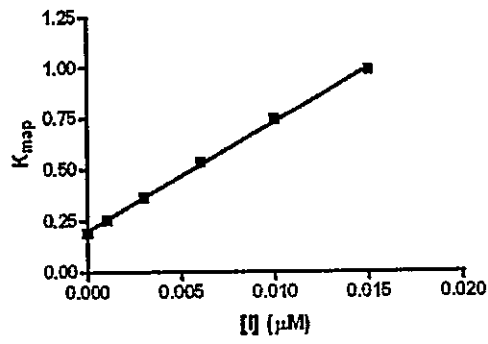


Figura 52: K_{map} vs. $[I]$ de 18d.

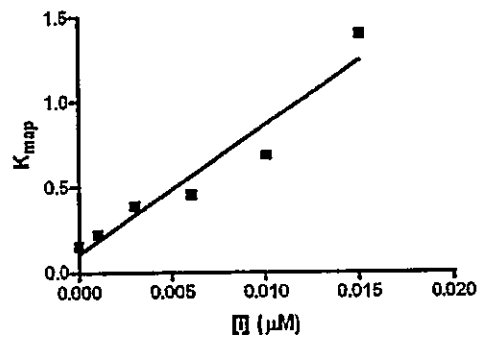


Figura 53: K_{map} vs. $[I]$ de 18e.

Gráficos de Lineweaver-Burk para los datos obtenidos con MAO-B humana (unidades: $1/[S]$ μM^{-1} , $1/V$ $\mu\text{M}^{-1}\text{seg}$)

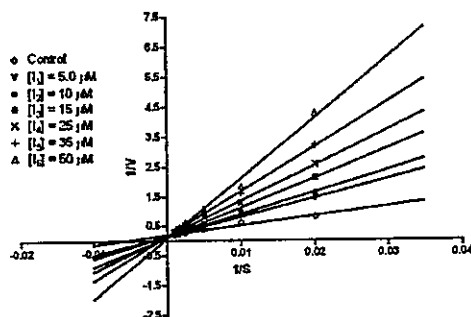


Figura 54: Gráfico de Lineweaver-Burk de 17c.

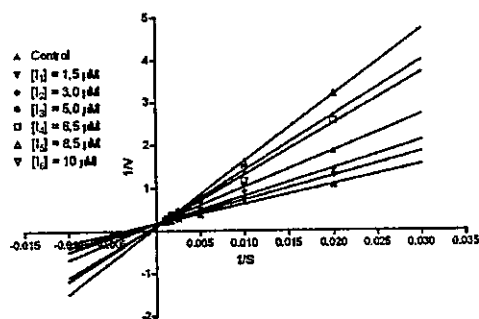


Figura 55: Gráfico de Lineweaver-Burk de 17d.

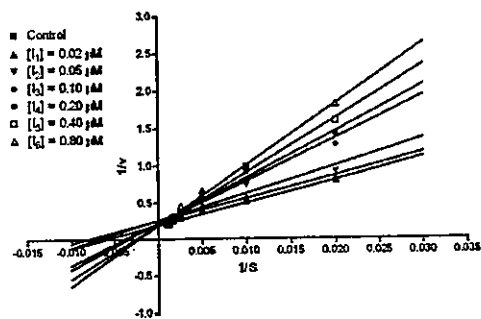


Figura 56: Gráfico de Lineweaver-Burk de 17e.

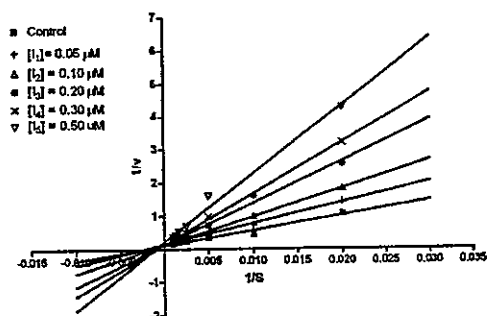


Figura 57: Gráfico de Lineweaver-Burk de 17f.

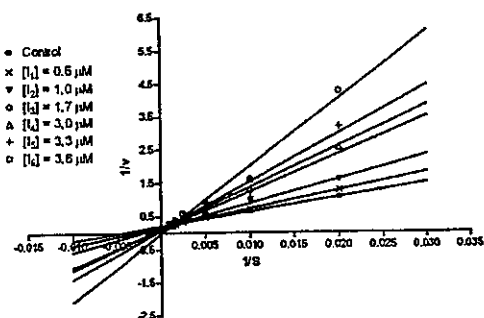


Figura 58: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18c.

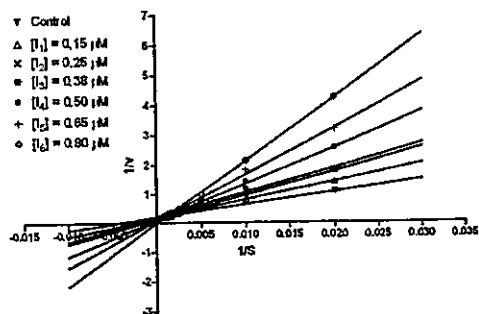


Figura 59: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18d.

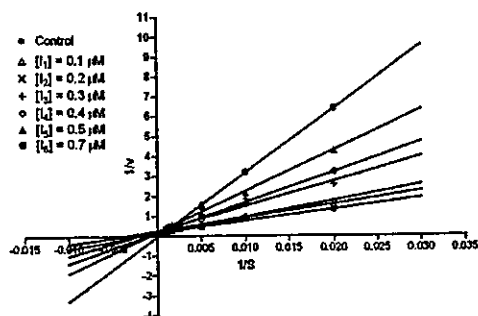


Figura 60: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18e.

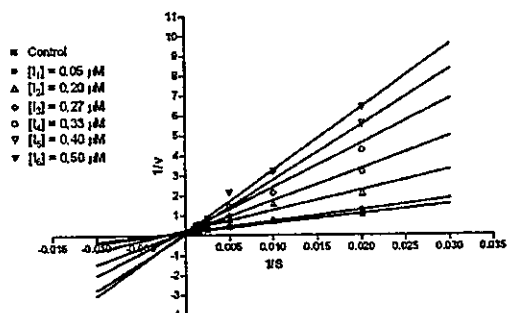


Figura 61: Gráfico de Lineweaver-Burk de 18f.

Gráficos de Hanes-Woolf para los datos obtenidos con MAO-B humana (unidades: S μ M, [S]/V seg)

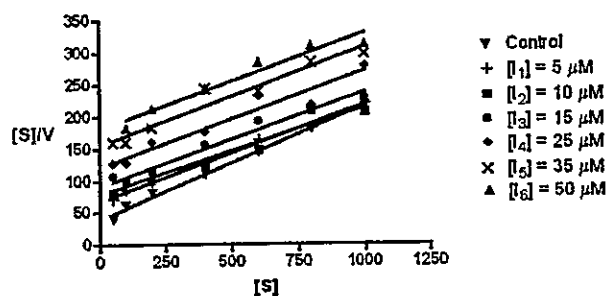


Figura 62: Gráfico de Hanes de 17c.

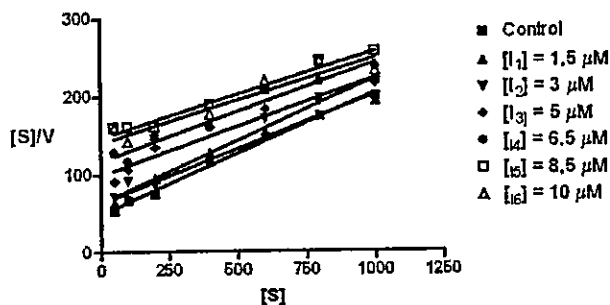


Figura 63: Gráfico de Hanes de 17d.

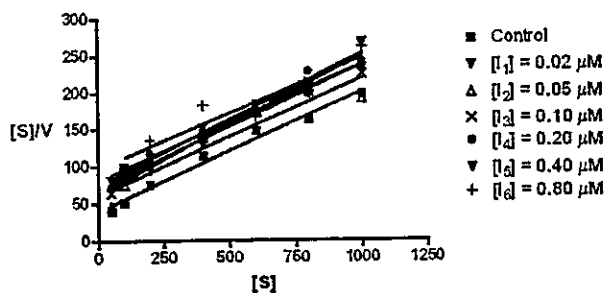


Figura 64: Gráfico de Hanes de 17e.

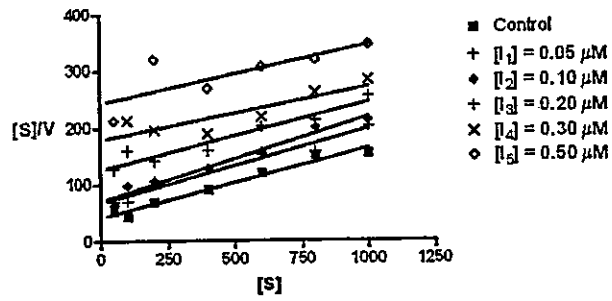


Figura 65: Gráfico de Hanes de 17f.

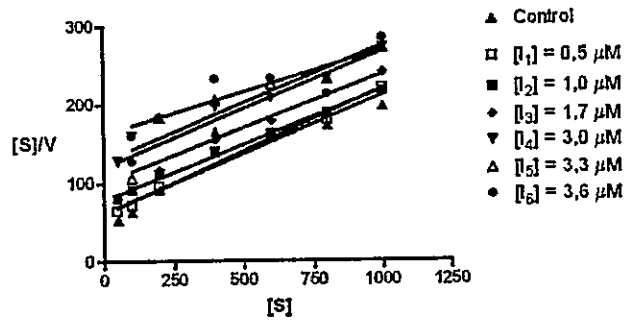


Figura 66: Gráfico de Hanes de 18c.

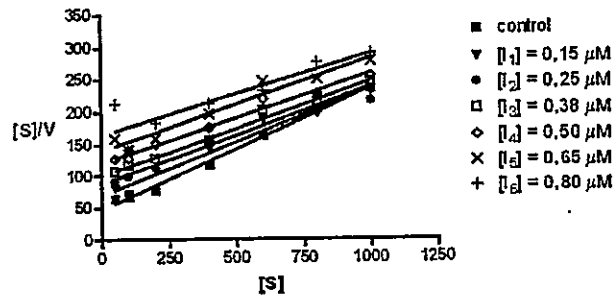


Figura 67: Gráfico de Hanes de 18d.

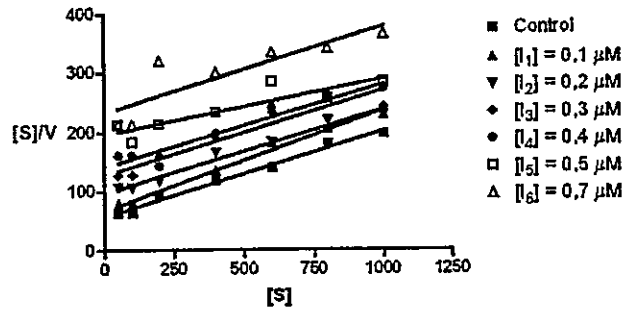


Figura 68: Gráfico de Hanes de 18e.

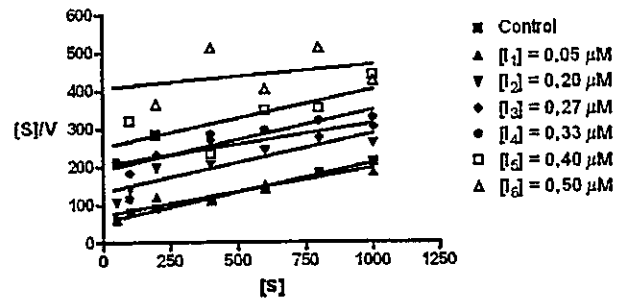


Figura 69: Gráfico de Hanes de 18f.

Efecto de la concentración de inhibidor sobre la K_m aparente (K_{map}) en MAO-B humana

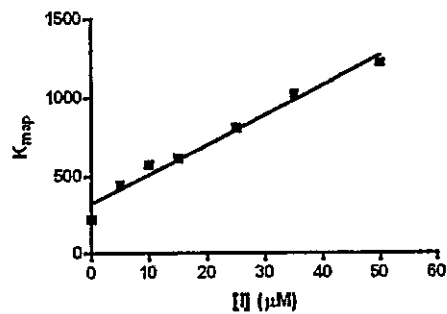


Figura 70: K_{map} vs. $[I]$ de 17c.

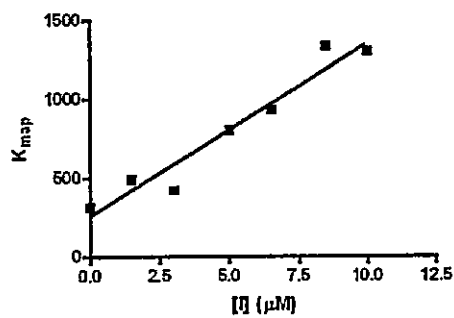


Figura 71: K_{map} vs. $[I]$ de 17d.

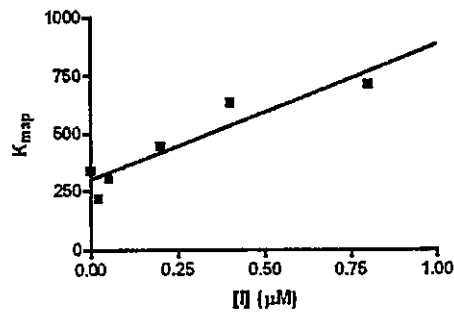


Figura 72: K_{map} vs. $[I]$ de 17e.

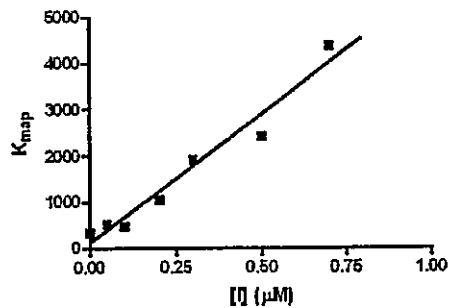


Figura 73: K_{map} vs. $[I]$ de 17f.

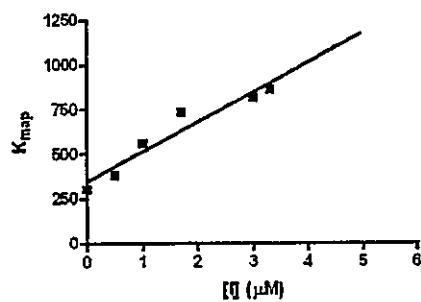


Figura 74: K_{map} vs. $[I]$ de 18c.

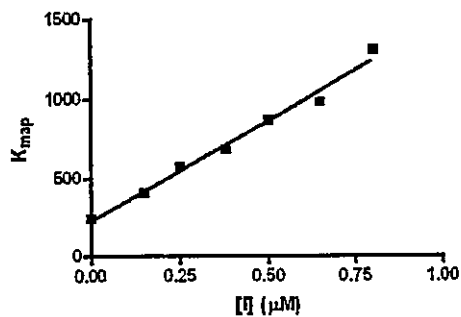


Figura 75: K_{map} vs. $[I]$ de 18d.

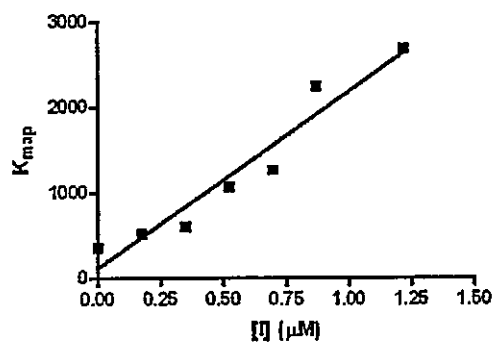


Figura 76: K_{map} vs. $[I]$ de 18e.

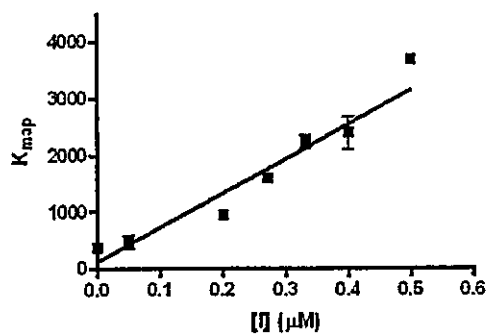
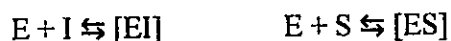


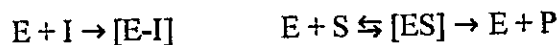
Figura 77: K_{map} vs. $[I]$ de 18f.

Además de estudios cinéticos se realizaron experimentos de reversibilidad, aunque sólo para las isoformas humanas A y B. En las Tablas 2 y 3 se presentan las actividades enzimáticas para hMAO-A y hMAO-B respectivamente. C1 y C2 corresponden a los controles y representan el 100 % y el 50 % de actividad enzimática respectivamente. A corresponde a la muestra en estudio, a la cual se le adicionó una solución enzima-inhibidor preincubada en hielo a tres tiempos diferentes (0, 5 y 10 minutos) antes de agregar a la solución de sustrato. El procedimiento para estudiar la reversibilidad se encuentra más detallado en la Parte Experimental.

Un inhibidor reversible competitivo se caracteriza por la formación de un equilibrio entre enzima e inhibidor (enlaces no covalentes involucrados), el cual es definido por una constante de equilibrio. Este equilibrio compite con el equilibrio enzima-sustrato de acuerdo a las concentraciones de sustrato, inhibidor y enzima presentes y en forma independiente del tiempo de preincubación de la enzima con el inhibidor.



En cambio un inhibidor irreversible es caracterizado por formar un enlace covalente con la enzima y el progreso de esta reacción será dependiente del tiempo, definido por una constante de velocidad. Por lo tanto la fracción de enzima unida al inhibidor disminuye la cantidad de enzima libre para poder generar el complejo enzima-sustrato y por ende reduce la velocidad de reacción de acuerdo al tiempo de preincubación de enzima con inhibidor.



De acuerdo a las Tablas 2 y 3 se obtiene que en todos los compuestos la actividad enzimática (A) es independiente del tiempo, por consiguiente todos los compuestos ensayados se comportaron como inhibidores reversibles. La actividad enzimática (A) no se reduce hasta un 50 % como en C2, ya que la concentración de inhibidor se diluye 100 veces en este experimento y el efecto inhibitorio es menor. Por estas razones se descarta la posibilidad de que los inhibidores estudiados correspondan a inhibidores irreversibles, ya que a medida que aumenta el tiempo de preincubación no disminuye la actividad enzimática.

Tabla 2: Reversibilidad de 17e, 18b, 18c, 18d y 18e en hMAO-A. C1: control 1 correspondiente al 100 % de la actividad enzimática; C2: control 2 correspondiente al 50 % de la actividad enzimática; A: datos correspondientes a una muestra a la cual se le adicionó una solución enzima-inhibidor incubada en hielo durante 0, 5 ó 10 minutos.

Comp	Actividad enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$)				
	C1	C2	A		
			0'	5'	10'
17e	17,6	8,8	13,5	14,2	14,9
18b	19,8	9,9	15,3	16,4	16,7
18c	17,5	11,4	13,8	13,6	14,7
18d	20,0	10,3	15,2	15,2	15,3
18e	21,2	12,3	15,2	15,1	14,3

Tabla 3: Reversibilidad de 17e, 17f, 18d y 18e en hMAO-B. C1: control 1 correspondiente al 100 % de la actividad enzimática; C2: control 2 correspondiente al 50 % de la actividad enzimática; A: datos correspondientes a una muestra a la cual se le adicionó una solución enzima-inhibidor incubada en hielo durante 0, 5 ó 10 minutos.

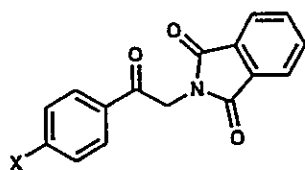
Comp	Actividad enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$)				
	C1	C2	A		
			0'	5'	10'
17e	29,8	20,0	23,4	25,3	24,2
17f	29,3	17,1	22,2	19,4	20,0
18d	26,6	17,0	19,2	20,3	21,1
18e	32,1	16,2	24,2	23,1	25,0
18f	30,0	15,2	21,0	21,2	20,9

Para intentar racionalizar y apoyar los resultados experimentales se realizaron estudios de modelamiento molecular con el fin de encontrar posibles interacciones u orientaciones espaciales de los ligandos en el sitio catalítico, que pudieran tener algún papel fundamental en la actividad inhibitoria. Como se sintetizaron las mezclas racémicas de todos los compuestos fue necesario elegir uno de los enantiómeros para realizar los modelamientos. El procedimiento utilizado fue buscar buenas correlaciones entre los resultados experimentales y las energías de "docking" principalmente en hMAO-B, donde los compuestos fueron más potentes. Se encontró una buena representación con los isómeros *S*. Por lo tanto éstos fueron utilizados para los "docking" en las cuatro tipos de enzimas. Sin embargo, además se realizaron los modelamientos de los isómeros *R* para los dos compuestos más potentes (17f y 18f) y uno prácticamente inactivo (17b) frente a hMAO-B. Se observó que las orientaciones y las energías prácticamente no son alteradas. Ya que rMAO-B no se encuentra aun

cristalizada fue necesario realizar los modelamientos moleculares utilizando un modelo construido por homología con hMAO-B, el cual no fue generado en este trabajo de tesis.⁴³

En la tabla 4 se muestran los valores de IC_{50} para los derivados de ftalimida en MAO de rata, 16a-d. No se calcularon sus valores de K_i , ya que no se conoce su mecanismo de inhibición.

Tabla 4: valores de IC_{50} para los derivados de ftalimida en MAO de rata, 16a-d.



- 16a: X = H-
- 16b: X = CH₃O-
- 16c: X = CH₃(CH₂)₃O-
- 16d: X = PhCH₂O-

Comp	IC_{50} [μ M]	
	<i>rMAO-A</i>	<i>rMAO-B</i>
16a	11,14 \pm 1,32	30,10 \pm 2,96
16b	12,81 \pm 0,82	ND
16c	> 100	15,2 \pm 0,71
16d	21,33 \pm 1,25	ND

ND: no determinado.

MAO de Rata

Comparación entre tionas, tinas y derivados de fenilisopropilamina

rMAO-A

Comenzando con la comparación entre las tres series, tionas, tinas y arilisopropilaminas, se observa que de acuerdo a los valores que se muestran en la Tabla 1 solamente los derivados sin sustitución en el anillo bencénico **17a** ($K_i = 9,19 \mu\text{M}$) y **18a** ($K_i = 10,58 \mu\text{M}$) son levemente más potentes que la débilmente activa anfetamina (**35a**, $K_i = 14,0 \mu\text{M}$) en rMAO-A, mientras que las restantes tionas y tinas son menos potentes en uno a dos órdenes de magnitud que las correspondientes arilisopropilaminas con igual sustitución. De estos resultados se podría inferir que sistemas rígidos como el heterociclo en **17a** y **18a** favorecen poco o nada la actividad inhibitoria de esta isoforma de la enzima, aunque el sitio catalítico podría albergar un grupo más voluminoso que la cadena alifática isopropílica.

El modelamiento molecular de **17a** y **18a** en el sitio activo de rMAO-A (Figura 78) muestra que ambos compuestos se ubican en el mismo lugar del sitio y con la misma orientación, es decir con el anillo bencénico apuntando hacia el cofactor (FAD) y de forma aproximadamente paralela a los anillos de las tirosinas 407 y 444, que comprenden la caja aromática, aunque no dentro de ésta. Estos anillos podrían estar estabilizados en esta posición debido a una posible interacción π - π entre ellos y el grupo amídico del residuo de Gln215 que se encuentra a una distancia de aproximadamente 4 Å de ambos ligandos. Una interacción importante es la formación de un puente de

hidrógeno entre el hidrógeno del grupo amida (**17a**) o amino (**18a**) con el oxígeno del grupo carbonilo del residuo Phe208 a una distancia de 2.16 Å y 2.42 Å respectivamente.

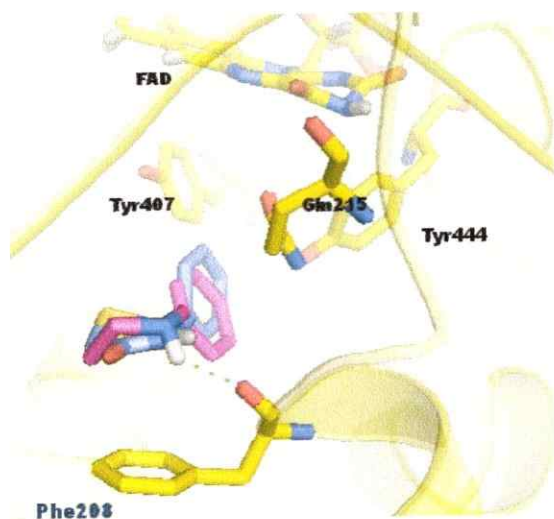


Figura 78: Modelamiento molecular de 17a (morado) y 18a (fucsia) en el sitio activo de rMAO-A. Se observa un puente de hidrógeno entre el carbonilo de Phe208 y un hidrógeno de la amida o amina respectiva.

La importancia de este residuo ha sido destacada en varios trabajos de relaciones estructura actividad (SAR) para diversos tipos de inhibidores de rMAO-A, entre los cuales se encuentran derivados de indolilmetilamina y arilisopropilamina.^{39,64} Además recientes estudios de modelamiento molecular indican que la amfetamina se ubica de forma muy similar a **17a** y **18a** en el sitio activo de la rMAO-A, generando el grupo amino un puente de hidrógeno con el carbonilo de Phe208.⁶⁵ La contribución energética proveniente, tanto de la semejante orientación y ubicación, y además el mismo tipo de interacciones de **17a**, **18a** y **35a** a la energía global podrían avalar las semejanzas en sus potencias.

Con estos resultados se esperaba que los derivados C-4 alcoxilados de tionas y

tinias fueran levemente mejores inhibidores que los derivados alcoxilados de arilisopropilaminas o, a lo menos, de potencia similar. Contrariamente a esta suposición, todos los demás compuestos (17b-f y 18b-f) presentaron constantes de inhibición bastante superiores. Se debe destacar, sin embargo, que las tinias mostraron una potencia hasta seis veces mayor que las correspondientes tionas (17c, 18c) en contraste a lo ocurrido en los compuestos sin sustitución. Un hecho relevante es que en las tres series, la longitud de la cadena unida al grupo alcoxi en la posición *para* del anillo bencénico modula la potencia inhibitoria, de tal forma que la óptima actividad se observa con dos a tres átomos de carbono (17d $K_i = 8,68 \mu\text{M}$, 18c $K_i = 2,17 \mu\text{M}$, 35d $K_i = 0,13 \mu\text{M}$). Esta longitud óptima de sustituyentes alcoxi concuerda con datos publicados recientemente para una serie de derivados de 6-alcoxinaftilisopropilaminas.³⁹

Al analizar los modelos computacionales para los derivados de cada serie con tres átomos de carbono unidos al oxígeno en la posición *para*, se observa que 35d presenta un modo de unión invertido con respecto a 17d y 18d (Figuras 79 y 80). La primera se encuentra ubicada en el sitio activo con el grupo propoxi orientado hacia el exterior de la cavidad y la cadena aminada hacia el FAD y posiblemente formando un puente de hidrógeno entre un hidrógeno del grupo amino y el OH de la Tyr444, los cuales se encuentran a una distancia de 2.08 Å. Además el grupo bencénico de 35d se ubica de forma casi perpendicular a una distancia de aproximadamente 3.90 Å del anillo bencénico del residuo de Phe208, generándose posiblemente una interacción tipo $\pi-\pi$ entre ambos anillos.

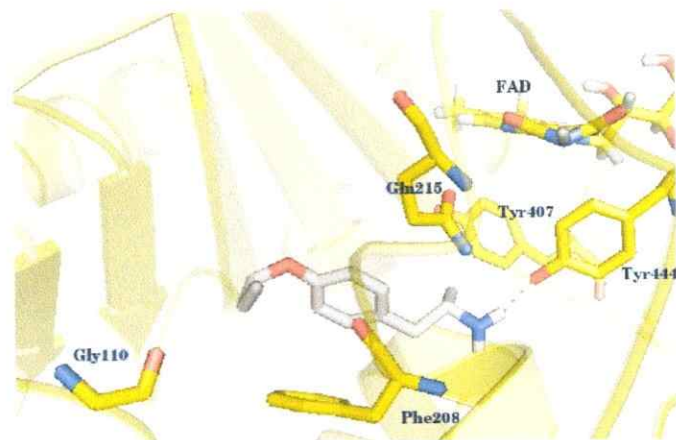


Figura 79: Modelamiento molecular de **35d** en el sitio activo de rMAO-A. Se observa un puente de hidrógeno entre el OH de Tyr444 y el grupo amino del ligando.

Por su parte **17d** y **18d** se encuentran con su anillo aromático en casi la misma ubicación pero con el grupo propoxi apuntando hacia el cofactor. En ambos ligandos el oxígeno del grupo alcoxi se encuentra generando un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la Tyr407 a distancias de 2,38 Å y 2,29 Å respectivamente. El hidrógeno del grupo amino de **18d** forma un posible puente de hidrógeno adicional con el oxígeno del carbonilo de Phe208 a una distancia de 2,11 Å. Esta última interacción podría dar cuenta de la diferencia de potencia entre ellos.

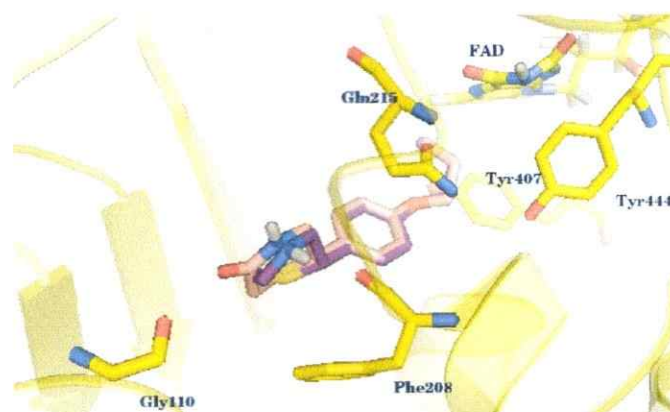


Figura 80: Modelamiento molecular de **17d** (rosado) y **18d** (violeta) en el sitio activo de rMAO-A.

Las diferentes potencias inhibitorias entre los derivados ciclados, **17d** y **18d** por un lado y **35d** por el otro pueden deberse a la orientación opuesta que adoptan en sitio activo.

Comparando los derivados con un grupo benciloxi **17f** ($K_i = 27,47 \mu\text{M}$) y **18f** ($K_i = 19,01 \mu\text{M}$, el peor valor de las tinas), éstos también presentan una menor actividad inhibitoria que **35f** ($K_i = 3,80 \mu\text{M}$). Esta disminución en la actividad podría deberse a un impedimento estérico existente con algún residuo de la enzima, debido a la presencia simultánea del heterociclo y un sustituyente voluminoso en el carbono *para* del anillo bencénico. En los modelamientos moleculares de **17f** y **18f** se observa que ambos se encuentran en la misma ubicación y orientación, es decir, con el grupo bencilo apuntando hacia el FAD (Figura 81) de forma paralela y cercana a ambas tirosinas 407 y 444. Esta ubicación del grupo bencilo que podría generar interacciones estéricas poco favorables con estos residuos, lo que podría explicar el desplazamiento del esqueleto del ligando hacia afuera del sitio; este desplazamiento provocaría la pérdida del puente de

hidrógeno con el residuo Phe208, ya que el dador de hidrógenos en ambos derivados se encuentra más alejado, perdiéndose una posible interacción favorable para la actividad.

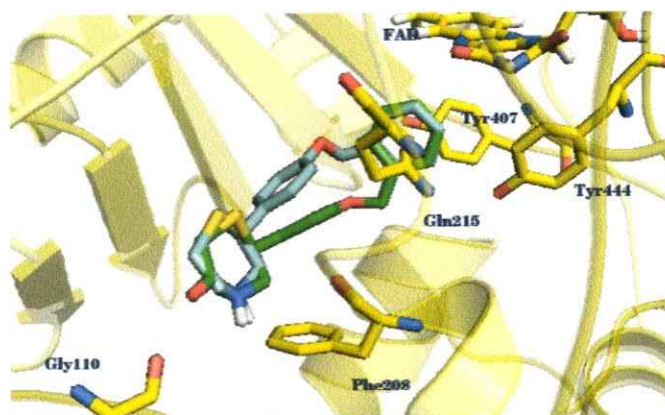


Figura 81: Modelamiento molecular de 17f (verde) y 18f (celeste) en el sitio activo de rMAO-A.

Además se observó mediante la gráfica que representa superficies de van der Waals que las superficies del átomo de oxígeno de 17f y del oxígeno del residuo de Gly110 se encuentran intercaladas, generándose una probable repulsión entre ambos átomos (Figura 82).

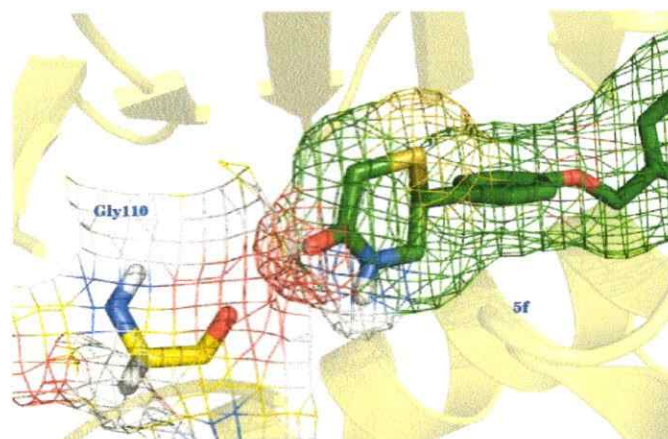


Figura 82: Representación de los volúmenes de van der Waals de 17f y Gly 110. Se aprecia la posibilidad de una repulsión entre los átomos de oxígeno.

A esta desfavorable interacción podría atribuirse la diferencia entre las potencias de **17f** y **18f**, ya que aunque **18f** es un pobre inhibidor, es casi tres veces más potente que **17f**. Interacciones poco favorables ya han sido demostradas en otros estudios computacionales de docking.⁶⁶ La razón de por qué un ligando adopta cierta orientación a pesar de la existencia de este tipo de interacciones, radica en que en el "docking" la molécula debe adoptar la mejor orientación (de menor energía) posible en el espacio delimitado por los residuos aminoácidos del sitio activo, y la contribución energética de éstas es mucho menor que la sumatoria de todas las otras contribuciones provenientes de las posibles interacciones favorables.

A pesar de estas interacciones encontradas entre los derivados de tinas y tinas y el sitio de unión, la orientación de los ligandos podría ser la principal responsable de la gran diferencia de afinidad entre estas fenilisopropilaminas y las series de tinas y tinas.

rMAO-B

Al comparar los valores de K_i de ambas series con los de los derivados de arilisopropilamina, que son en su mayoría inactivos frente a rMAO-B, se observa que tanto tionas como tinas aumentan fuertemente la potencia frente a esta isoforma de la enzima llegando a valores de inhibición submicromolares. De acuerdo a los resultados biológicos obtenidos es posible deducir que la potencia también se encuentra afectada por la longitud de la cadena alcoxilada, tal como sucede en rMAO-A, pero en este caso la potencia se incrementa linealmente al aumentar el número de carbonos de la siguiente manera $\text{MeO} < \text{EtO} < \text{PrO} < \text{BuO}$. La única diferencia notable entre ambas series en este aspecto es que en la serie de las tionas la potencia aumenta más fuertemente que el caso de las tinas. Se realizaron estudios de modelamiento molecular de **35b**, **17b** y **18b** en rMAO-B, con el fin de encontrar posibles diferencias en la ubicación y/u orientación de estos ligandos en el sitio activo (Figuras 83 y 84).

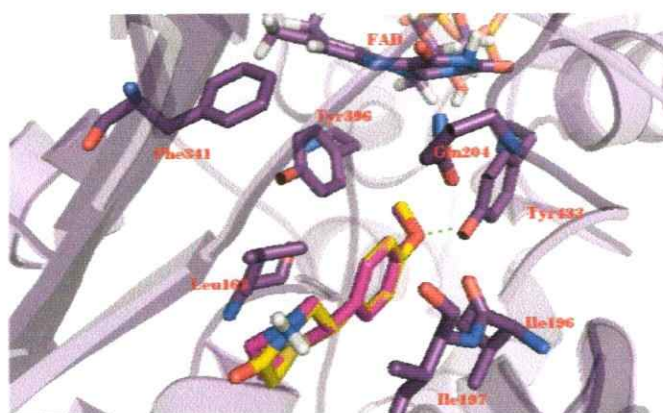


Figura 83: Modelamiento molecular de **17b** (amarillo) y **18b** (fucsia) en el sitio activo de rMAO-B.

El modelo computacional (obtenido por homología con hMAO-B)⁴³ muestra una clara diferencia entre el modo de unión de **35b** y el que comparten **17b** y **18b**. Estas dos últimas se encuentran con el grupo metoxilo orientado hacia al FAD y su átomo de oxígeno se encuentra formando un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del residuo Tyr433.

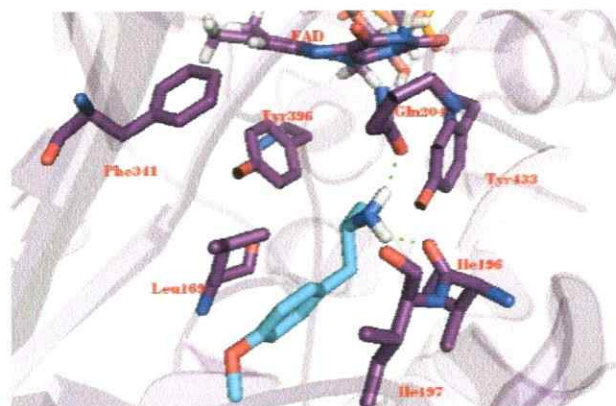


Figura 84: Modelamiento molecular de 35b en el sitio activo de rMAO-B. Se observa un puente de hidrógeno simultáneo entre los hidrógenos del grupo amino y el carbonilo del residuo Ile196 y Gln204.

Contrariamente, **35b** se encuentra con el grupo amino dirigido hacia el cofactor y aunque se observan dos puentes de hidrógeno simultáneos entre el grupo amino de **35b** y los oxígenos de los grupos carbonilo de los residuos de Ile196 y de Gln204 a una distancia de 1.89 Å y 1.86 Å respectivamente, éstos no serían relevantes para la potencia. Más allá de estas interacciones la distinta orientación podría ser nuevamente la responsable de la gran diferencia entre las actividades de estas fenilisopropilaminas y las series de tinas y tinas.

Los derivados bencilados **17f** ($K_i = 0,074 \mu\text{M}$) y **18f** ($K_i = 0,13 \mu\text{M}$) son los más potentes de ambas series y mejores inhibidores que **35f** ($K_i = 0,71 \mu\text{M}$). Estos resultados sugieren que grupos voluminosos y/o aromáticos en posición *para* favorecen la actividad inhibitoria en esta isoforma. Esto podría deberse a la formación de alguna interacción de carácter aromático entre los grupos fenilos y un residuo aminoacídico de esta naturaleza. Para corroborar este supuesto se realizaron modelamientos moleculares de **17f** y **18f** en rMAO-B (Figuras 85 y 86).

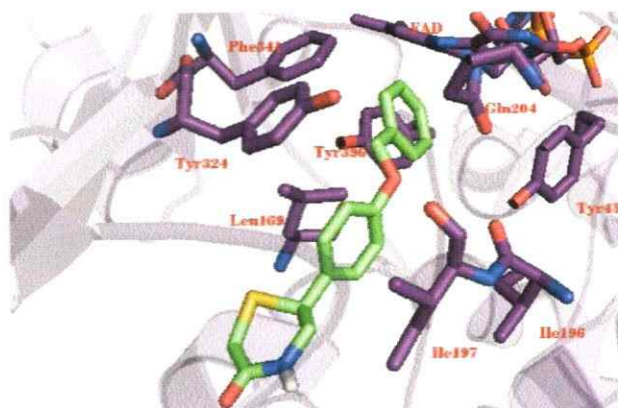


Figura 85: Modelamiento molecular de **17f** en el sitio activo de rMAO-B.

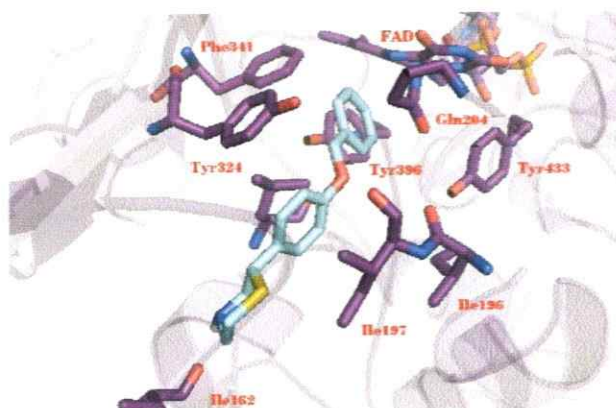
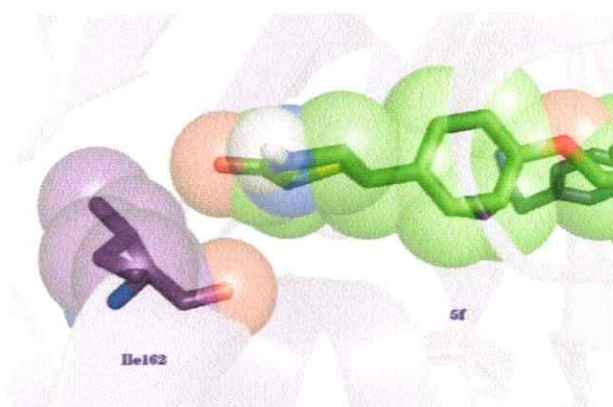


Figura 86: Modelamiento molecular de **18f** en el sitio activo de *rMAO-B*.

Efectivamente, los grupos bencénicos de **17f** y **18f** interactúan con varios residuos del sitio activo. El anillo del grupo bencilo en ambos compuestos se encuentra apuntando hacia el FAD, entre las Tyr433 y Tyr396 y en forma aproximadamente paralela a éstas. Además es posible observar interacciones atractivas que involucran donores de hidrógeno y anillos aromáticos. Estas interacciones son denominadas interacciones hidrógeno- π , las cuales a pesar de ser más débiles que un puente de hidrógeno clásico contribuyen a la estabilidad del sistema. Como se observó específicamente para **17f** y **18f**, el grupo hidroxilo del residuo Tyr398 se ubica a aproximadamente 3,0 Å del centro del anillo bencénico del sustituyente, donde el grupo aromático estaría actuando como aceptor π de un puente de hidrógeno estabilizando de esta forma su posición en la cavidad. Simultáneamente, el anillo del sustituyente forma una posible interacción π - π con el grupo amídico del residuo de Gln204 a una distancia

de aproximadamente 3,80 Å. Al parecer también puede estar interactuando mediante interacciones π (posible “ π -stacking”) con el residuo Phe341 que se encuentra a 3.85 y 3.35 Å en **17f** y **18f** respectivamente. Por otra parte el anillo central de estos ligandos se encuentra entre los residuos de Leu169 e Ile197. Este anillo también presenta posibles interacciones π con el de la Tyr324 que se encuentra a una distancia de aproximadamente 3.40 Å. La única interacción que se observó para **18f** y no para **17f** fue un puente de hidrógeno que generaría el hidrógeno del grupo amino del primero con el carbonilo de Ile162, a una distancia de 2.12 Å.

Aunque **17f** se encuentra en una conformación extendida, los volúmenes de van der Waals del oxígeno del grupo amídico del ligando y del carbonilo del residuo de Ile162 no se superponen, como se observó en rMAO-A. Esto nos permite deducir que no existiría tal interacción desfavorable en esta isoforma para este residuo con una sustitución más voluminosa.



*Figura 87: Representación de los volúmenes de van der Waals de **17f** y Ile162. No se aprecia la repulsión entre los átomos de oxígeno encontrada en rMAO-A.*

Selectividad entre rMAO-A y rMAO-B

Inversamente a lo que se observa con los derivados de arilisopropilamina (35a-f), que son en su mayoría selectivos por rMAO-A, los resultados obtenidos indican que la mayoría de las tinas y tinas ensayadas actúan preferentemente como inhibidores de rMAO-B, con la excepción de 17b y 18c. Los compuestos 17e y 17f además de ser los más potentes son los más selectivos, presentando selectividades de 373 y 238 veces respectivamente. Sin embargo los análogos reducidos 18e y 18f, los más potentes y selectivos de la tinas, presentan selectividades mucho menores de 52 y 146 veces respectivamente. Cabe destacar que la selectividad en el caso de la 35f por la isoforma A se pierde drásticamente presentando una potencia mayor hacia la isoforma B. Se podría concluir que grupos bencilo en la posición *para* del anillo bencénico favorecen la actividad inhibitoria de la rMAO-B.

Es factible inferir gracias a estos resultados que la transformación de la cadena aminada de los derivados de arilisopropilaminas a un heterociclo y además la incorporación de un grupo bencilo en posición *para* son características estructurales apropiadas para aumentar la afinidad por la isoforma B. Aunque la rMAO-B no se encuentra aún cristalizada se podría suponer que el bolsillo catalítico es de mayor volumen que el de rMAO-A, tolerando de esta manera sustituyentes alcoxilados en la posición *para* del anillo aromático de por lo menos cuatro átomos de carbono y grupos aromáticos tan voluminosos como el bencilo.

Continuando con la búsqueda de explicaciones de la alta selectividad mostrada

por **17f** se realizó una superposición de los sitios catalíticos de ambas isoformas de rata (Figura 88), con **17f** modelada en rMAO-B. Aquí se puede apreciar que existe un residuo en rMAO-A que impide que el ligando adopte una posición más favorable como en el caso de rMAO-B. Se trata del residuo de Phe208, cuyo homólogo en rMAO-B es la Ile199 que no es tan voluminosa como la fenilalanina.

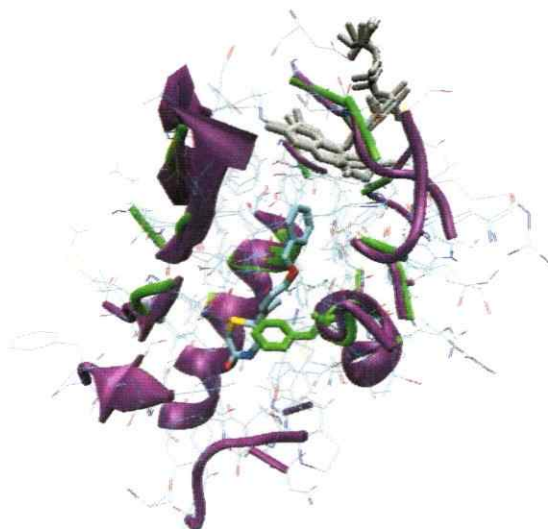


Figura 88: superposición de los sitios activos de rMAO-A (verde) y rMAO-B (morado). Se observa que el residuo Phe208 impide que 17f adopte una orientación similar a la obtenida en rMO-B.

Comparación de derivados de ftalimida (16a-d) en rMAO-A y rMAO-B

Los resultados experimentales reflejan que ninguno de los derivados **16a-d** es un inhibidor potente ni de rMAO-A ni rMAO-B. Sin embargo se puede observar que el aumento de la cadena alcoxilada en *para* del anillo aromático desde un átomo de carbono (**16b** $IC_{50} = 12,81 \mu\text{M}$) a cuatro (**16c** $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) desfavorece fuertemente la actividad inhibitoria.

MAO Humana

Comparación entre tionas y tinas

Es necesario recordar que, por razones logísticas y de disponibilidad de tiempo, no fue posible ensayar los derivados de arilisopropilamina en las enzimas humanas. Por lo tanto las comparaciones establecidas a continuación se limitan a las series de tionas y tinas.

hMAO-A

De acuerdo a los resultados biológicos obtenidos, el único compuesto que presenta una leve actividad inhibitoria de la serie **17a-f** fue **17e** ($K_i = 10,0 \mu\text{M}$). Sin embargo las tinas presentaron una mayor actividad inhibitoria, siendo la más activa **18e** con una K_i de $2,5 \mu\text{M}$. La potencia en esta serie se mantiene para una cadena alcoxilada con uno o dos átomos de carbono y luego asciende a medida que aumenta el largo de la cadena, como se observa para los derivados con grupos propoxi (**18d**) y butoxi (**18e**), con valores de K_i de $6,62$ y $2,5 \mu\text{M}$ respectivamente. Claramente en esta isoforma se puede establecer que el heterociclo de tiomorfolina es más afin por el sitio que el de las lactamas correspondientes.

Se realizaron modelamientos moleculares para **17e** y **18e**, las más potentes de cada serie en hMAO-A, para buscar alguna diferencia que pudiera estar relacionada con la diferencia en la potencia (Figura 89). Al superponer las estructuras de ambos derivados en el sitio activo de la enzima, éstas se ubican entre los mismos residuos

aminoácidos y con la misma orientación, con la posibilidad de formar un puente de hidrógeno entre el grupo amida o amina y el oxígeno carbonílico de Ser209.

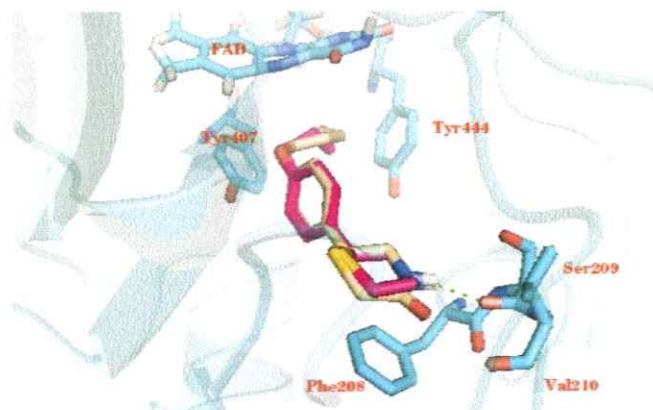


Figura 89: Modelamiento molecular de 17e (rosado) y 18e (fucsia) en el sitio activo de hMAO-A.

Como este tipo de enlace es más fuerte para un grupo amino que para un grupo amida, esta podría ser una de las explicaciones de las diferencias entre las potencias inhibitorias de tinas y tinas. Además es posible observar una probable interacción π - π entre los anillos de benceno de los ligandos y del residuo de Phe208 que se encuentra a una distancia de 4.2 Å. Una posible interacción desfavorable, ya observada en rMAO-A, consiste en una repulsión generada entre los oxígenos carbonílicos del 17e y del residuo Val210, los que se encontrarían a una distancia de 2,8 Å (Figura 90). Ya que el análogo reducido no presenta esta interacción, esta repulsión puede ser la responsable de la diferencia de las constantes de inhibición entre 17e y 18e y por ende otra respuesta a la diferencia entre tinas y tinas.

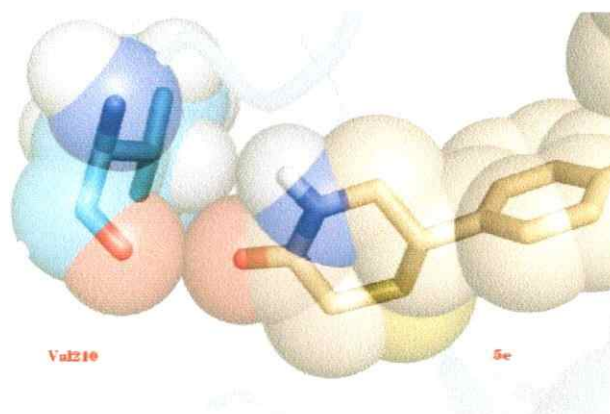


Figura 90: Representación de los volúmenes de van der Waals de 17e y Val210. Se aprecia la posible repulsión entre los átomos de oxígeno.

Para el caso de los derivados bencilados **17f** y **18f** los resultados experimentales indican que éstos son inactivos frente a la MAO-A humana. Los análisis computacionales muestran a ambos derivados con la misma orientación y ocupando el mismo lugar dentro del sitio activo (Figura 91). Se puede apreciar que el anillo bencénico del sustituyente se encuentra justo delante de la caja aromática, sin entrar a ésta para evitar algún tipo de repulsión entre las tirosinas y el anillo de isoaloxacina del FAD, impidiendo que los ligandos se encuentren completamente extendidos.

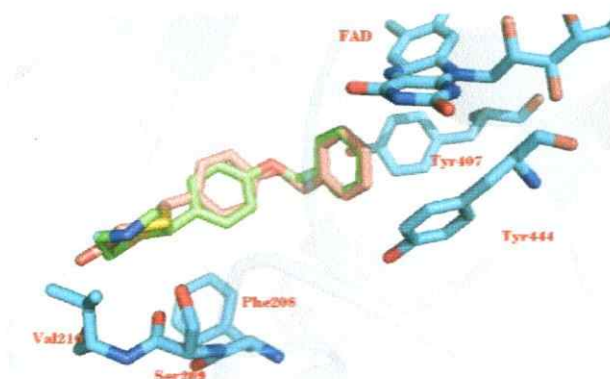


Figura 91: Modelamiento molecular de 17f (rosado) y 18f (verde) en el sitio activo de hMAO-A.

Además para **17f** se encontró la misma posible repulsión con el residuo de Val210 que para **17e**, entre los átomos de oxígeno carbonílicos (Figura 92).

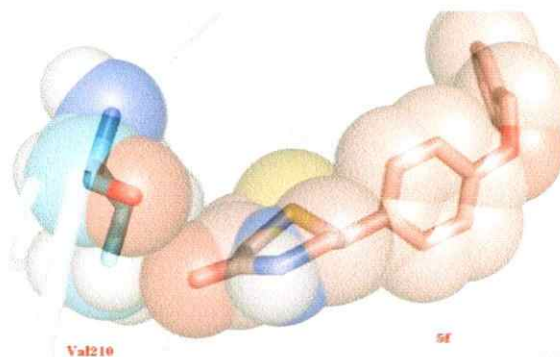


Figura 92: Representación de los volúmenes de van der Waals de 17f y Val210. Se aprecia la posible repulsión entre los átomos de oxígeno.

Partiendo de estos análisis se puede inferir que **17f** y **18f** se encuentran entre la Val210 y la caja aromática. Este espacio al parecer no es favorable para este tipo de ligando con un sustituyente voluminoso y rígido a su vez.

hMAO-B

Nuevamente, tal como se observó en rMAO-B, algunos de los compuestos son potentes inhibidores de esta isoforma. Tanto en las series de tionas como de tinas, sólo presentaron una potencia bastante considerable los compuestos con sustituyentes alcoxilados con dos o más átomos de carbono. En ambas series la potencia nuevamente se incrementa al aumentar el largo de cadena, es decir en el orden EtO, PrO, BuO con valores de K_i que van desde 16,9 μM hasta 0,46 μM para la serie de tionas y desde 2,1 μM hasta 0,068 μM para las tinas. En el caso los derivados con grupos bencilo como

sustituyente (**17f** y **18f**), éstos presentaron las mayores potencias con valores de K_i de 0,048 y 0,037 μM respectivamente. Haciendo una comparación entre ambas series, la de los derivados reducidos (**18c-f**) es más potente al igual que en hMAO-A.

Por otra parte, ya que tanto la K_m como la K_i pueden ser consideradas como constantes de afinidad de la enzima por el sustrato y el inhibidor repectivamente, y además debido a que el mecanismo de inhibicion resultó ser competitivo, se puede hacer una comparación entre estos valores. Para fenieltilamina, la cual es sustrato selectivo de MAO B, se reporta una K_m de 4 μM , mientras que en este trabajo el valor de K_i obtenido para la benciloxitina fue de 0,037 μM , es decir y de acuerdo la explicación previa la enzima, *in vitro*, sería más de 100 veces más afin por el inhiidor que por su sustrato.

Se realizaron estudios de acoplamiento molecular para para los derivados *n*-alcoxilados más potentes, **17e** y **18e**, de cada serie. En estudios fue posible apreciar que ambos ligandos se encuentran con la misma ubicación y orientación en el sitio activo (Figura 93).

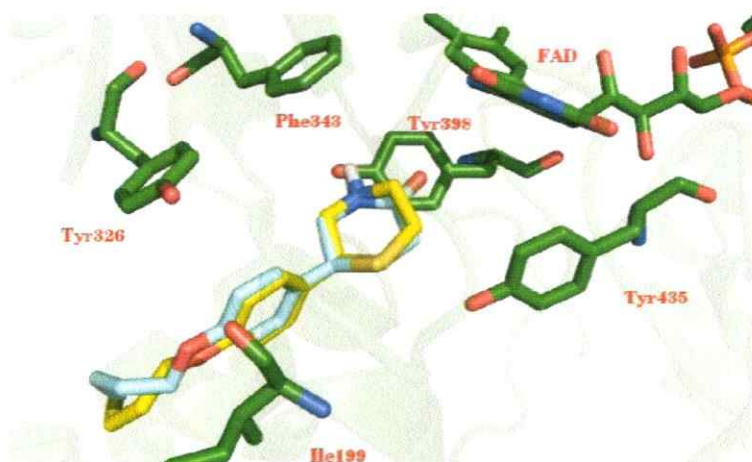


Figura 93: Acoplamiento molecular de **17e** (celeste) y **18e** (amarillo) en el sitio activo de hMAO-B.

Éstos se encuentran con el heterociclo hacia el FAD y con la cadena butoxilada hacia la cavidad de entrada, contrariamente a lo que se ha observado en los otros sistemas (rMAO-A, rMAO-B y hMAO-A). Aunque **18e** es casi 7 veces más potente que **17e**, no fue posible establecer alguna explicación a esta diferencia entre sus potencias mediante estos estudios computacionales.

Los estudios de modelamiento molecular de **17f** y **18f**, indican que se encuentran en el sitio catalítico con la misma orientación y ubicación (Figura 94 y 95). Se puede destacar también que al igual que los derivados butoxilados el heterociclo de ambos se encuentra orientado hacia el FAD y, por lo tanto, con el grupo benciloxi dirigido hacia el exterior de la cavidad. A pesar de este cambio de orientación al parecer permanece la interacción de tipo apilamiento π (π -stacking) entre el residuo aromático Tyr326 y el benceno central del ligando a una distancia aproximada de 5 Å, como se observó para rMAO-B. En cambio el anillo bencénico perteneciente al sustituyente se encuentra interactuando posiblemente con varios residuos aromáticos como Phe168, Trp119, Phe103 y Phe99. Estos residuos podrían formar un bolsillo aromático cercano a la cavidad de entrada del sitio catalítico lo que permitiría la estabilización del sustituyente aromático de los ligandos.

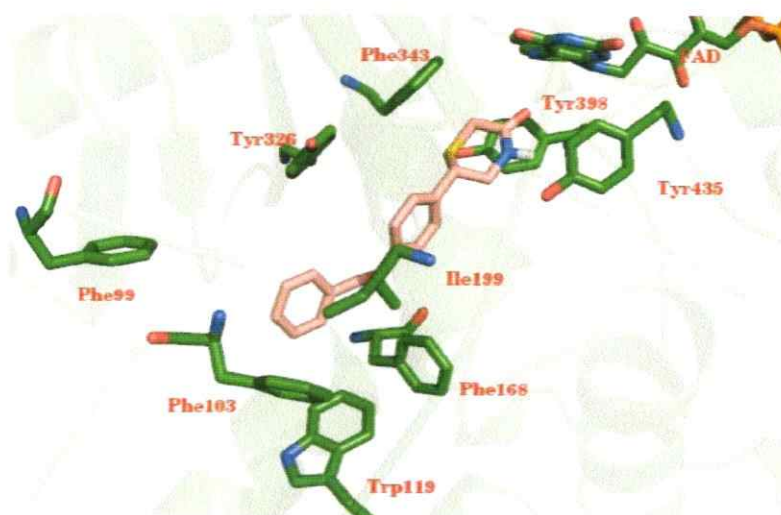


Figura 94: Modelamiento molecular de 17f en el sitio activo de hMAO-B.

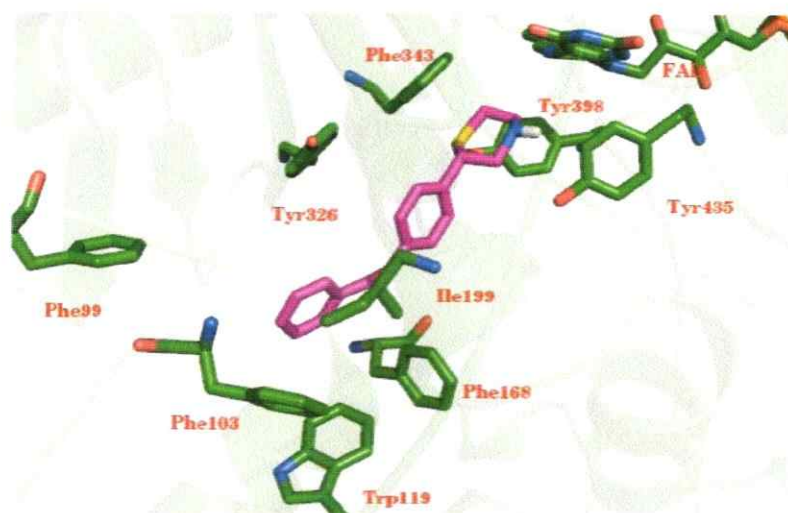
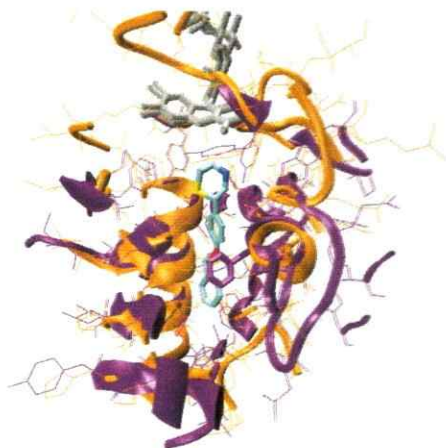


Figura 95: Modelamiento molecular de 18f en el sitio activo de hMAO-B.

Selectividad entre hMAO-A y hMAO-B

Tal como sucede en las isoformas de rata, todos los compuestos son selectivos por la isoforma B, donde **17f** y **18f** son los más potentes, presentando una selectividad que supera las 2000 y 2700 veces respectivamente.

Al superponer los sitios de unión de MAO-A y MAO-B humanas en presencia de **18f** (modelado en hMAO-B) se observa que, al igual a lo descrito para la enzima de rata, existiría un impedimento para acomodar el ligando debido a la presencia del residuo aminoacídico Phe208 de hMAO-A (Figura 96). En relación a esto, un reciente trabajo de Son y col. destaca la importancia del residuo de Phe208 de hMAO-A como uno de los aminoácidos responsables de la selectividad. En este trabajo superponen los dos sitios activos de las isoformas humanas cristalizadas con diferentes inhibidores observan que la estructura de un inhibidor de hMAO-B, 1,2-difenilbuteno, no puede acomodarse dentro del sitio de la isoforma A debido al solapamiento con la Phe208.¹⁸



*Figura 96: superposición de los sitios activos de rMAO-A (morado) y rMAO-B (naranja). Se observa que el residuo Phe208 impide que **18f** adopte una orientación similar a la obtenida para hMAO-B.*

Comparación entre rMAO-A y hMAO-A

Aunque hMAO-A y rMAO-A comparten un 92 % de identidad en su secuencia aminoacídica, los volúmenes de sus sitios activos son considerablemente diferentes, de 550 y 450 Å³ respectivamente. Sin embargo los residuos aminoacídicos que comprenden el sitio activo se mantienen en ambas enzimas.¹⁶ Con estos antecedentes era posible pensar que las tionas y tinas que inhiben rMAO-A, arrojarían resultados de inhibición similares para hMAO-A, ya que esta última al poseer un sitio activo de mayor volumen y con los mismos residuos podría albergar los potenciales inhibidores más fácilmente. Inesperadamente la mayoría de los compuestos presentaron valores de K_i muy disímiles dificultando una comparación directa de los resultados entre las enzimas de rata y humano.

Por otra parte no se observa una misma tendencia de los valores de K_i con las características de la cadena del sustituyente alcoxlado entre ambas enzimas. En rMAO-A la máxima actividad se alcanza con una cadena de dos a tres átomos de carbono (17d y 18c). Esto también puede observarse claramente en la serie de los derivados de arilisopropilamina (35a-b), donde la 4-propoxilada 35d presenta la menor constante de inhibición. En cambio para hMAO-A la mayor potencia en ambas series se obtiene con los derivados butoxilados 17e y 18e. Estas diferencias en resultados de inhibición relacionadas con el largo de cadena entre MAO-A de rata y humana también fueron observadas en el trabajo de Fierro y col., donde se concluye que no es posible predecir la actividad inhibitoria en una u otra enzima y claramente los resultados dependen de la

fuelle de enzima que se esté utilizando.⁶⁷

Tabla 5: valores de K_i y selectividad de las series 17a-f y 18 a-f frente a MAO-A rata y humana.

Comp	K_i MAO-A [μ M]	
	humana ^a	rata
17a	>100	9,19 \pm 1,43
17b	>100	9,28 \pm 2,09
17c	60 \pm 8,57	12,3 \pm 1,14
17d	40 \pm 1,85	8,68 \pm 1,12
17e	10 \pm 0,34	50,9 \pm 6,19
17f	>100	27,5 \pm 4,62
18a	>100	10,6 \pm 0,41
18b	16,2 \pm 2,29	6,39 \pm 0,14
18c	9,60 \pm 1,63	2,17 \pm 0,13
18d	6,62 \pm 0,34	3,69 \pm 0,39
18e	2,50 \pm 0,25	14,1 \pm 1,22
18f	>100	19,0 \pm 0,36

^a: Los errores estándar para hMAO-A fueron calculados para la regresión sigmoideal, los cuales no son comparables con la desviación estándar calculada por el promedio de diferentes ensayos como en los otros casos.

Por otra parte, en este contexto, el comportamiento de los compuestos 4-O-benciloxi-sustituídos en la enzima humana y la de rata difiere profundamente, ya que en la primera prácticamente desaparece la actividad inhibitoria mientras que en la segunda no difiere mucho de la que se pudo medir para los análogos 4-O-butoxilados.

Comparación entre rMAO-B y hMAO-B

De acuerdo a los datos que se muestran en la tabla 6, se puede observar mediante los valores de K_i que la serie de las tinas son mejores inhibidores de rMAO que de humana. Exceptuando el caso de 17f donde la actividad se invierte, siendo más potente por la enzima humana. Las mayores diferencias de potencia se registran para los derivados 17a-c. Para el caso de la tinas se observa una gran diferencia para 18a y b, luego para 18c la actividad inhibitoria es idéntica en ambas enzimas. Finalmente los derivados 18d-f son claramente más afines por la enzima humana que por la de rata.

Tabla 6: valores de K_i y selectividad de las series 17a-f y 18 a-f frente a MAO-B rata y humana.

Comp	K_i MAO-B [μ M]	
	humana	rata
17a	ND	9,58 \pm 1,75
17b	>100	13,6 \pm 2,16
17c	16,9	3,40 \pm 1,01
17d	2,4	1,49 \pm 0,03
17e	0,46 \pm 0,18	0,16 \pm 0,01
17f	0,048 \pm 0,03	0,074 \pm 0,003
18a	ND	2,23 \pm 0,03
18b	ND	3,85 \pm 0,01
18c	2,1	2,17 \pm 0,31
18d	0,13 \pm 0,11	0,98 \pm 0,11
18e	0,068 \pm 0,016	0,27 \pm 0,02
18f	0,037 \pm 0,003	0,13 \pm 0,004

ND: no determinado, ya que a concentraciones de inhibidor de 100 μ M y 10 μ M no se observó un porcentaje de inhibición considerable.

Aunque no se puede dar una explicación concreta del por qué de estas diferencias, ya que no se encuentra cristalizada la rMAO-B como se mencionó anteriormente, se supone que éstas podrían deberse a variaciones estructurales aun no identificadas entre ambos sitios activos.

De todas maneras es necesario destacar que, a pesar de que los valores de las constantes obtenidas son diferentes, las tendencias en la potencia son las mismas. En ambas enzimas y series (tionas y tinas) la potencia aumenta al incrementar el largo de la cadena alcoxilada y los derivados con grupos butoxi (17e y 18e) y benciloxi (17f y 18f) son los más potentes. Con respecto a los derivados bencilados es posible apreciar que incluso el derivado 35f pierde su selectividad por rMAO-A ($K_i = 3,8 \mu\text{M}$) presentando una potencia ligeramente mayor frente a la isoforma B ($K_i = 0,7 \mu\text{M}$) de rata. Por lo tanto este sustituyente (bencilo) parece ser de gran importancia para la selectividad por MAO-B humana y de rata. Esta observación se ha hecho anteriormente en un estudio CoMFA de una serie de derivados de indoles en rMAO-B, donde se observa que existen regiones cercanas a la cavidad de entrada del sitio activo que pueden tolerar sustituyentes voluminosos y con una alta densidad de carga.⁶⁴ Otro trabajo con derivados de indoles, también se destaca la relevancia del grupo benciloxi en su comportamiento selectivo hacia rMAO-B.⁶⁸ Por otra parte se han desarrollado derivados de cumarina como inhibidores selectivos de hMAO-B, cuya estructura contiene un grupo benciloxi.⁶⁹ Estos trabajos corroboran la probable importancia de este sustituyente para el diseño de nuevos inhibidores de MAO-B.

CONCLUSIONES

- La síntesis de la serie de derivados de 2-arilmorfolina no se puede realizar eficientemente por medio de la ruta sintética propuesta debido a la formación de un derivado de 2,5-difenilpirazina.
- El derivado de 2,5-difenilpirazina resultó ser apreciablemente citotóxico, lo que lleva a considerar la posibilidad de sintetizar una serie de análogos para evaluar su eventual interés como compuestos antitumorales.
- La ruta sintética diseñada fue óptima para la obtención de una serie de derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona y sus análogos reducidos, 2-ariltiomorfolinas.
- Algunos de los compuestos ensayados son selectivos y potentes inhibidores de rMAO-B y muy especialmente hMAO-B.
- Las 2-ariltiomorfolinas (18d-f) son ligeramente más potentes que las 2-ariltiomorfolin-5-onas (17d-f) como inhibidores de hMAO-B, pero es necesario realizar un estudio de acoplamiento computacional más detallado para observar alguna diferencia entre los heterociclos que de cuenta de la diferencia entre tionas y tinas en hMAO-B.

- Tanto en rMAO-B como hMAO-B la potencia inhibitoria aumenta al incrementar el número de átomos de carbono en los derivados n-alcoxilados, por lo menos hasta un grupo butoxi.
- Los compuestos sintetizados son pobres inhibidores de MAO-A. En el caso de hMAO-A la potencia aumenta por lo menos hasta un grupo butoxi, pero en rMAO-A al parecer se alcanza una potencia máxima con una cadena de dos a tres átomos de carbono.
- Los derivados *O*-bencilados, **17f** y **18f**, son los más potentes con valores de K_i de 0,074 μM y 0,13 μM en rMAO-B y 0,048 μM y 0,037 μM en hMAO-B respectivamente.
- En hMAO-B los derivados **17f** y **18f** son los más selectivos, >2000 y >2700 veces respectivamente, no sólo porque producen un aumento en la potencia por esta isoforma, sino que porque además pierden completamente actividad frente a la isoforma A.
- El análisis de la superposición de los sitios activos de ambas isoformas sugiere que es el residuo de Phe208 presente en el sitio activo de la isoforma A podría ser

el responsable de la alta selectividad mostrada por **17f** y **18f**, ya que impide que estos ligandos adopten una ubicación más favorable como en el caso de la isoforma B.

- Todos los compuestos ensayados en las enzimas humanas (MAO-A y -B) se comportaron como inhibidores reversibles y mostraron un mecanismo de inhibición competitivo.
- En relación a la MAO-B, la hipótesis propuesta fue comprobada: la ciclación de la cadena aminada de derivados de feniletilamina y la inclusión de un segundo heteroátomo (azufre) al nuevo ciclo generado produce potentes y selectivos inhibidores de esta isoforma. No se cumple lo mismo con respecto a MAO-A.
- Se puede postular la hipótesis de que nuevos derivados *O*-bencilados de tinas y tinas con diferentes clases de sustituyentes en el bencilo serían capaces de establecer interacciones estabilizantes con el bolsillo aromático que se encuentra en la cavidad de entrada de la hMAO-B y a la vez desestabilizantes con el residuo de Phe 208 de la hMAO-A, generando una nueva serie de potentes y selectivos IMAOs B.

REFERENCIAS

1. Walker W. H., Kearney E. B., Seng R., Singer T. P., *Biochem. Biophys. Commun.*, **44**, 287-292 (1979).
2. Johnston J. P., *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 1285-1287 (1968).
3. Nagatsu T., *Neurotoxicol.*, **25**, 11-20 (2004)
4. Fiedorowicz J. G., Swartz K. L., *J. Psychiatr. Pract.*, **10**, 239-248 (2004).
5. Pizzinat N., Copin N., Vindis C., Parini A., Cambon C., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **359**, 428-431 (1999).
6. To S. E., Zepf R. A., Woods A. G., *J. Neurosci. Nurs.*, **37**, 102-107 (2005).
7. Billett E. E., *Neurotoxicol.*, **25**, 139-148 (2004).
8. Youdim M. B. H., Finberg J. P. M., Tipton K. F., Catecholamines II. Handbook of Experimental Pharmacology (eds Trendelenburg, U. & Weiner, N.) 127-199 (Springer, Berlin 1988).
9. Youdim M. B. H., Bakhle Y. S., *Brit. J. Pharm.*, **147**, 287-296 (2006).
10. Shih, J. C., *Neurotoxicol.*, **25**, 21-30 (2004).
11. Silverman, R. B., *Acc. Chem. Res.*, **28**, 335-342 (1995)
12. Silverman, R. B., Hoffman, S. J.; Catus, W. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7126-7128 (1980).
13. Edmondson E. D., Mattevi A., Binda C., Li M., Hubálek F; *Curr. Med. Chem.*, **11**, 1938-1993 (2004).
14. Miller, J. R., Edmondson, D. E.; *Biochemistry*, **38**, 13670-13683 (1999).
15. Binda C., Newton-Vinson P., Hubálek F., Edmondson D. E., Mattevi A., *Nature. Struc. Biol.*, **9**, 22-26 (2002).
16. De Collibus L., Li M., Binda C., Lustig A., Edmondson D. E., Mattevi A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12684-12689 (2005).
17. Ma J., Yoshimura M., Yamashita E., Nakagawa A., Ito A., Tsukihara T., *J. Mol. Biol.*, **338**, 103-114 (2004).

18. Son S., Ma J., Kondo M., Yoshimura M., Yamashita E., Tsukihara T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5739-5744 (2008).
19. Li M., Binda C., Mattevi A., Edmondson D.E., *Biochemistry*, **45**, 4575-4784 (2006).
20. Pacher P., Kecskemeti V., *Curr. Med. Chem.*, **11**, 925-943 (2004).
21. BMJ, doi:10.1136/bmj.38184.606169.AE (published 13 August 2004).
22. Sterling J., Herzig Y., Goren T., Finkelstein N., Lerner D., Goldenberg W., Miskolczi I., Molnar S., Rantal F., Tamas T., Toth G., Zagyva A., Zekany A., Lavian G., Gross A., Friedman R., Razin M., Huang W., Kraiss B., Chorev M., Youdim M. B. H., Weinstock M., *J. Med. Chem.*, **45**, 5260-5279 (2002).
23. Knoll J., Dallo J., Yen T. T., *Life. Sci.*, **45**, 525-531 (1989).
24. Riederer P., Sofic E., Rausch W.D., Schmidt B., Reynolds G.P., Jellinger K., Youdim M.B. H., *J. Neurochem.*, **46**, 515-520 (1989).
25. Goodman L.S., Gilman A., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Quinta Edición, Macmillan Publishing Co., Inc., New York, 1975, pág. 180.
26. Youdim M. B. H., Edmondson D. E., Tipton K. F., *Nature Reviews*, **7**, 295-309 (2006).
27. Anderson M. C., Hasan F., McCrodden J. M., Tipton K. F., *Neurochem. Res.*, **18**, 1145-1149 (1993).
28. Raynaud G., Gouret C., *Chim. Thér.*, **3**, 328-330 (1973).
29. Robinson J. B., *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 4105-4108 (1985).
30. White H. L., Scates P. W., *Drug. Dev. Res.*, **25**, 191-199 (1992).
31. Arvanitis A., Scholfield E., Grigoriadis D., Heytler P., Bowdle J., Chorvat R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 115-120 (1996).
32. Fink D. M., Palermo M. G., Bores G. M., Huger F. P., Kurys B. E., Merriman M. C., Olsen G. E., Petko W., O'Malley G. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 625-630 (1996).
33. Bembenek M. E., Abell C. W., Chrisey L. A., Rozwadowska M. D., Gessner W.,

- Brossi A., *J. Med. Chem.*, **33**, 147-152 (1990).
34. Mazouz F., Gueddari S., Burstein C., Mansuy D., Milcent R., *J. Med. Chem.*, **36**, 1157-1167 (1993).
35. Mazouz F., Lebreton L., Milcent R., Burstein C., *Eur. J. Med. Chem.*, **25**, 659-671 (1990).
36. Lebreton L., Curet O., Gueddari S., Mazouz F., Bernard S., Burstein C., Milcent R., *J. Med. Chem.*, **38**, 4786-4792 (1995).
37. Wouters J., Moureau F., Evrard G., Koenig J., Jegham S., George P., Durant F., *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 1683-1693 (1999).
38. Scorza, M. C., Carrau C., Silveira R., Zapata-Torres G., Cassels B. K., Reyes-Parada M., *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 1361-1369 (1997).
39. Vilches-Herrera M., Sepúlveda J., Rebolledo-Fuentes M., Fierro A., Lühr S., Iturriaga-Vásquez P., Cassels B.K., Reyes-Parada M., *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 2452-2460 (2009).
40. Tan A. K., Weyler W., Salach J. I., Singer T. P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 1084-1088 (1991).
41. Hubálek F., Binda C., Li M., Herzig Y., Sterling J., Youdim M. B. H., Mattevi A., Edmondson D. E., *J. Med. Chem.*, **47**, 1760-1766 (2004).
42. Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, **28** pp. 235-242 (2000).
43. Tesis Doctoral: Fierro A., "Estudio de las interacciones presentes en el sitio activo de la enzima Monoamino Oxidasa con derivados de fenilisopropilaminas", págs. 45 y 67, 2008, Universidad de Santiago de Chile.
44. Insight II and Discover, User Guide, Accelrys, San Diego, CA, USA, 1998.
45. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery Jr. J. A., Vreven T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M.,

- Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
46. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J., *J. Comp. Chem.*, **19**, 1639, 1998
47. Glennon R. A., Bondarev M. L., Khorana N., Young R., *J. Med. Chem.*, **47**, 6034-6041 (2004).
48. Cowper R. M., Davidson L. H., *Org. Syn. Coll. Vol. 2*, 480-481 (1943). En línea <<http://www.orgsyn.org>>
49. Furniss B. S., Hannaford A. J., Smith P. W., Tatchell A. R., *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Quinta Edición, Longman, Essex, 1989, págs 779-781.
50. Inmediata T., Day A. R., *J. Org. Chem.*, **5**, 512-527 (1940).
51. Gabriel S., *Ber. dtsh. chem. Ges.*, **41**, 1127-1132 (1908).
52. Dias N., Jacquemard U., Baldeyrou B., Lansiaux A., Goossens J., Bailly C., Routier S., Mérour J., *Eur. J. Med. Chem.*, **40**, 1206-1213 (2005).
53. Araya-Maturana R., Cardona W., Cassels B. K., Delgado-Castro T., Ferreira J., Miranda D., Pavani M., Pessoa-Mahana H., Soto-Delgado J., Weiss-López B., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 4664-4669 (2006).

54. Araya-Maturana R., Delgado-Castro T., Gárate M., Ferreira J., Pavani M., Pessoa-Mahana H., Cassels B. K., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 3057-3060 (2002).
55. Osby J. O., Martin M. G., Ganem B., *Tetrahedron Lett.*, **25**, 2093-2096 (1984).
56. Meyers A. I., Warmus J. S., Dilley G. J., *Org. Syn. Coll. Vol.* **6**, 666-669 (1998).
En línea <<http://www.orgsyn.org>>.
57. Beck J. J., Stermitz F. R., *J. Nat. Prod.*, **58**, 1047-1055 (1995).
58. Kelly T. R., Kim M. H., Curtis A. D. M., *J. Org. Chem.*, **58**, 5855-5857 (1993).
59. Das N. B., Sarma J. C., Sharma R. P., Bordoloi M., *Tetrahedron Lett.*, **34**, 869-872 (1993).
60. Fornicola R. S., Oblinger E., Montgomery J., *J. Org. Chem.*, **63**, 3528-3529 (1998).
61. Sheehan J. C., Bolhofer W. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2786-2788 (1950).
62. Battersby A., Baker M., Broadbent H., Fookes C., Leeper F., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2027-2048 (1987).
63. Yamashita M., Ojima I., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6339-6342 (1983).
64. Moron J. A., Campillo M., Pérez V., Unzeta M., Pardo L., *J. Med. Chem.*, **43**, 1684-1691 (2000).
65. Chimenti F., Secci D., Bolasco A., Chimenti P., Granese A., Carradori S., Befani O., Turine P., Alcaro S., Ortuso F., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 4135-4138 (2006)
66. Leonetti F., Capaldi C., Pisani L., Nicolotti O., Muncipinto G., Stefanachi A., Cellamare S., Caccia C., Carotti A., *J. Med. Chem.*, **50**, 4909-4916 (2007).
67. Fierro A., Osorio-Olivares M., Cassels B. K., Edmondson, D. E., Sepúlveda-Boza S., Reyes-Parada M., *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5198-5206 (2007).
68. Pérez V., Marco J. L., Fernández-Álvarez E., Unzeta M., *Br. J. Pharm.*, **127**, 869-876 (1999).
69. Binda C., Wang J., Pisani L., Caccia C., Carotti A., Salvati P., Edmondson D.E., Mattevi A., *J. Med. Chem.*, **50**, 5848-5852 (2007).

-
70. *Beil.* 8, II, 87.
71. *Beil.* 8, I, 335.
72. Windholz M., Budavari S., Blumetti R.F., Otterbein E.S., *The Merck Index*, Décima Edición, Merck & Co. Inc., Rahway, 1983, pág. 183.
73. Sheehan J.C., Bolhofer W.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2786-2788 (1950).
74. Worrall D.E., *Org. Syn. Coll. Vol.* 1, 413 (1941). En línea <<http://www.orgsyn.org>>.

ANEXO 1

Química

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C fueron registrados a 400 y 100 MHz respectivamente (Bruker AMX 400) en CDCl_3 , D_2O o $\text{DMSO-}d_6$, usando TMS como patrón interno. Los espectros de masas fueron registrados en un equipo Thermo Finnigan MAT 95XP con analizador de doble enfoque, sector magnético y eléctrico, utilizando como referencia FC-43, ionización EI^+ , modo Scan. Los puntos de fusión fueron determinados en una platina microscópica de Kofler Reichert-Jung Galen III acoplada a un termómetro de termocupla DUAL JTEK Digi-Sense. Las reacciones y las mezclas de productos fueron rutinariamente monitoreadas por cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice 60-F₂₅₄ Merck, utilizando como eluyente generalmente CH_2Cl_2 , MeOH o mezclas $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$.

Procedimiento general de obtención de los derivados de ftalimida 16a-d e intento de obtención de los derivados 14 y 15.

Derivados de 4-alcoxiacetofenona (27a-c). En CH_3CN (100 mL) se disolvió 4-hidroxiacetofenona (26) (0,051 moles, 7,00 g), se adicionó K_2CO_3 (0,103 moles, 14,2 g) y el halogenuro de alquilo (CH_3I , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{Cl}$, 0,051 moles). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación y a reflujo durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se evaporó el solvente. Luego se redisolvió la mezcla en AcOEt

y se extrajo con una solución de NaOH 25% (2×100 mL) y luego con H₂O (2×100 mL). Posteriormente la fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y por último se evaporó el solvente, obteniéndose: 7,0 g (92%) de 27a como cristales de color café claro, pf 32-34 °C, lit.⁷⁰ 37,5-38,5 °C, ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.55 (s, 3H, COCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 6.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH), 7.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH); 8,3 g (85%) de 27b como un aceite de color amarillo, ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₃), 1.50 (m, 2H, CH₂), 1.80 (m, 2H, CH₂), 2.50 (s, 3H, COCH₃), 4.00 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, OCH₂), 6.90 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH), 7.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ArH); 9,8 g (85%) de 27c como cristales con forma de placas irregulares de color crema-amarillo claro, pf 89-91 °C, ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.49 (s, 3H, COCH₃), 5.06 (s, 2H, OCH₂), 6.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.31 (m, 5H, ArH), 7.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH).

Derivados de 4'-alcoxi-2-bromoacetofenona (28a-c). Se disolvió la acetofenona *O*-alquilada (27a-c) (0,050 moles) en CHCl₃ (100 mL) y se le adicionó por goteo, a una temperatura de aproximadamente 5 °C, una solución de Br₂ (0,050 moles) en CHCl₃ (20 mL). Una vez finalizada la adición se dejó alcanzar la temperatura ambiente y luego se mantuvo con agitación durante 3 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo picado. Se separó la fase orgánica y se extrajo con H₂O (2×100 mL), una solución saturada de NaHCO₃ y por último con H₂O (2×100 mL) nuevamente. Después la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó el solvente. Por último los productos crudos obtenidos fueron purificados por cromatografía en columna de gel de

sílice, utilizando CH_2Cl_2 como eluyente, obteniéndose: 1,51 g (13%) de **28a** como cristales de color rosado pálido en MeOH, pf 64-67 °C, lit.⁷¹ 73 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 3.88 (s, 3H, OCH_3), 4.40 (s, 2H, COCH_2), 6.96 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ArH), 7.97 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH); 3,52 g (26%) de **28b** como cristales con forma de rombos incoloros en MeOH, pf 37-39 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 1.00 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_3), 1.80 (m, 2H, CH_2), 1.45(m, 2H, CH_2), 4.05 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, OCH_2), 4.40 (s, 2H, COCH_2), 6.95 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH), 7.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH); 2,41 g (16%) de **28c** como cristales incoloros, pf 84-87 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 4.40 (s, 2H, OCH_2), 5.15 (s, 2H, COCH_2), 7.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH), 7.38 (m, 5H, ArH), 7.96 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH).

2-Bromoacetofenona (20). A una solución de acetofenona (**19**) (0,085 moles, 10,27 g) en Et_2O anhidro (20 mL) con agitación, enfriada en un baño de hielo, se le adicionó AlCl_3 (0,75 mmoles, 0,10 g). A esta mezcla de reacción se agregó gradualmente Br_2 (0,085 moles, 13,6 g). Una vez completada la adición se removió el solvente bajo presión reducida. El producto crudo obtenido se lavó con una mezcla fría de éter de petróleo/ H_2O (1:1). Luego los cristales fueron filtrados al vacío y lavados con la misma mezcla. Se obtuvieron 13,78g (81%) de **20** como cristales con forma de agujas de color rosado pálido, pf 48-50 °C, lit.⁷² 51 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 4.45 (2H, s, CH_2), 7.50 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, Ar), 7.62 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, ArH), 7.98 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, ArH).

Derivados de bromuro de 2-aril-2-oxoetilhexametilentetraminio (21,29). Se agregó el compuesto bromado (20, 28a) (0,043 moles) a una solución de hexametilentetramina (0,043 moles) en CHCl_3 (210 mL). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación y a reflujo durante 4 h. Al terminar este tiempo, se dejó alcanzar la temperatura ambiente y el precipitado se filtró y lavó con CHCl_3 (2×100 mL). Se obtuvo finalmente 15,3 g (97%) de 29 como un sólido de color blanco, pf 187-190 °C, ^1H RMN (D_2O) δ 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.60 (m, 12H, CH_2), 5.34 (s, 2H, COCH_2), 6.98 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.85 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, ArH). El compuesto 21 no fue caracterizado, sino que se utilizó directamente para la siguiente etapa.

Intento de obtención de clorhidrato de 2-amino-1-ariletanona (22, 30). A EtOH 95% (50 mL) se le adicionó lentamente HCl concentrado (4,36 mL). A la mezcla aún caliente se le agregó la sal cuaternaria 21 ó 29 (0,040 moles). La mezcla de reacción se mantuvo agitando a temperatura ambiente durante 18 h. Al transcurrir este tiempo la mezcla se enfrió a 0°C y el precipitado (NH_4Cl) se filtró al vacío y lavó con EtOH 95% (2×100 mL) frío. El filtrado se concentró bajo presión reducida y al semisólido remanente se le agregó EtOH 95% frío (40 mL), produciéndose más precipitado (NH_4Cl). El nuevo sólido se filtró y lavó con EtOH (2×100 mL) frío. El filtrado se concentró bajo presión reducida. El procedimiento de filtrar, lavar y concentrar el filtrado se repitió 2 veces más. Finalmente al concentrar se obtuvo un sólido de color amarillo (posiblemente un derivado de pirazina que no fue identificado). La sal de NH_4Cl filtrado, se disolvió en

agua básica (NH_4OH) y se extrajo con AcOEt (3×50 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , filtró y concentró dando un aceite de color amarillo. El aceite se disolvió en una pequeña cantidad de EtOH (0,5 mL), se le agregó 2 gotas de HCl concentrado hasta pH ácido y se adicionó Et_2O hasta observar la precipitación del clorhidrato. Se filtró una sal de color crema (**30**), 0,002 g (0,24%), pf 195-199 °C, ^1H RMN (D_2O) δ 3.78 (s, 3H, OCH_3), 4.50 (s, 2H, COCH_2), 7.00 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, ArH), 7.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH). El compuesto **22** no fue obtenido y en su lugar se obtuvo un sólido de color verde (**D1**), pf 195-198 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 7.48 (m, 6H, CH), 8.05 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H, ArH), 9.06 (s, 2H, ArH), ^{13}C RMN (CDCl_3) 150.69, 141.26, 136.35, 129.87, 129.09, 126.82. m/z 102.01, 232.05, Para la fórmula $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2$ la masa exacta calculada es 232.10005 y la experimental fue 232.00044.

Derivados de *N*-2-aril-2-oxoetilftalimida (16a-d). Se disolvió ftalimida (0,10 moles, 15 g) en EtOH absoluto (300 mL) caliente. Luego en caliente se decantó sobre una solución de KOH (0,20 moles, 11,5 g) en H_2O (12 mL) y EtOH (36 mL). El precipitado se filtró de inmediato y a las aguas madres alcohólicas se les agregó más ftalimida (0,10 moles, 15 g) y se repitió el proceso. Finalmente se obtuvieron 20 g de ftalimida de potasio.

Ftalimida de potasio (0,027 moles) se adicionó a una solución de derivado bromado **20**, **27a-c** (0,025 moles) en DMF (20 mL). Se mantuvo con agitación y a temperatura ambiente durante 3 h. Una vez transcurrido este tiempo, a la mezcla se le

agregó CHCl_3 (30 mL) y se vertió sobre H_2O (100 mL). Se equilibraron y separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con CHCl_3 (2×10 mL). Posteriormente se juntaron las fases orgánicas y se lavaron con una solución de NaOH 0,2 N (20 mL) y luego con H_2O (20 mL). Después se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente. Los cristales formados se trituraron con Et_2O obteniéndose: 5,97 g (90%) de **16a** como cristales cúbicos incoloros, pf 175-176, lit.⁷³ 165-167 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 5.15 (s, 2H, COCH_2), 7.56 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, ArH), 7.65 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, ArH), 7.75 (dd, $J_1 = 5.3$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 2H, ArH), 7.90 (dd, $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 3.1$ Hz, 2H, ArH), 8.02 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, ArH); 5,75 g (78%) de **16b** como cristales cúbicos incoloros, pf 165-169 °C, ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3.81 (s, 3H, OCH_3), 5.14 (s, 2H, COCH_2), 7.05 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH), 7.83 (dd, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 2H, ArH), 7.88 (dd, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 2H, ArH), 8.01 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH); 7,00 g (83%) de **16c** como cristales con forma de agujas incoloras, pf 169-172 °C. ^1H RMN (CDCl_3) δ 0.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.52 (m, 2H, CH_2), 1.81 (m, 2H, CH_2), 4.05 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, OCH_2), 5.09 (s, 2H, COCH_2), 6.97 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, ArH), 7.75 (dd, $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 2H, ArH), 7.90 (dd, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 3.1$ Hz, 2H, ArH), 7.98 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH); 7,61 g (82%) de **16d** como cristales cúbicos incoloros, pf 200-203 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 5.05 (s, 2H, OCH_2), 5.14 (s, 2H, COCH_2), 7.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH), 7.37 (m, 5H, ArH), 7.72 (dd, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 2H, ArH), 7.87 (dd, $J_1 = 5.3$ Hz, $J_2 = 3.3$ Hz, 2H, ArH), 7.96 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH).

Clorhidrato de 2-amino-1-feniletanol (23). A una solución de la ftalimida **16a** (0,038 moles, 10 g) en IPA (320 mL) y H₂O (53 mL), se agregó NaBH₄ (0,19 moles, 7,17 g). La mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo a la solución se le adicionó gradualmente AcOH (3 mL) y luego HCl concentrado hasta pH 2. Se mantuvo la mezcla de reacción a reflujo durante 3 h. El proceso de acidificación con HCl y reflujo se repitió 3 veces. Luego se evaporó el solvente y se adicionó Et₂O hasta observar la precipitación del clorhidrato. La sal se filtró y se obtuvieron 4,13 g (63%) de **23** como un producto cristalino incoloro, pf 133-136 °C, ¹H RMN (D₂O) δ 3.12 (dd, *J*₁ = 4.3 Hz, *J*₂ = 8.8 Hz, 1H, CH₂), 3.20 (dd, *J*₁ = 4.0 Hz, *J*₂ = 9.1 Hz, 1H, CH₂), 4.89 (dd, *J*₁ = 4.0 Hz, *J*₂ = 8.8 Hz, 1H, CH), 7.34 (s, 5H, ArH).

N-(2-Cloroacetil)amino-1-feniletanol (24). Cloruro de cloroacetilo (0,035 moles, 4,01 g) fue agregado gota a gota a una mezcla vigorosamente agitada de NaOH (0,030 moles, 1,2 g) en H₂O (100 mL) y la base libre de **23** en CH₂Cl₂ (100 mL) a 0 °C. Una vez que la adición fue completa se dejó aumentar la temperatura de la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se siguió agitando durante 6 h adicionales. Una vez transcurrido este tiempo se separaron las fases y la porción orgánica se lavó con una solución al 3 % de HCl (2 × 25 mL) y con una solución saturada de NaHCO₃ (2 × 25 mL), se secó con Na₂SO₄, filtró por gravedad y concentró a presión reducida para dar 3 g de cristales de color crema de **24**, (55%), pf 101-105 °C, ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.40 (m, 1H, CH₂), 3.75

(m, 1H, CH₂), 4.08 (s, 2H, CH₂), 4.87 (m, 1H, CH), 7.03 (bs, 1H, NH), 7.37 (m, 5H, ArH).

Procedimiento general de obtención de los derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona (5a-f) y 2-ariltiomorfolina (6a-f).

4-Alcoxibenzaldehídos (32c-f). En CH₃CN (100 mL) se disolvió 4-hidroxibenzaldehído (31) (0,051 moles, 7,00 g), se adicionó K₂CO₃ (0,103 moles, 14,2 g) y el halogenuro de alquilo (CH₃CH₂Br, CH₃CH₂CH₂Br, CH₃CH₂CH₂CH₂Br, C₆H₅CH₂Cl, 0,051 moles). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación y a reflujo durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se evaporó el solvente. Luego se redisolvió la mezcla en AcOEt y se lavó con una solución de NaOH 25% (2 × 100 mL) y luego con H₂O (2 × 100 mL). Posteriormente la fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y por último se evaporó el solvente, obteniéndose: 11,3 g (92%) de 32c como un aceite de color amarillo, ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,45 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 4,10 (m, 2H, OCH₂), 6,99 (d, J = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,80 (d, J = 8,6 Hz, 2H, ArH), 9,85 (s, 1H, CHO); 12,6 g (97 %) de 32d, -aceite de color anaranjado, ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,05 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₃), 1,75-1,90 (m, 2H, CH₂), 4,00 (t, J = 6,6 Hz, 2H, OCH₂), 6,99 (d, J = 8,8 Hz, 2H, ArH), 7,80 (d, J = 8,8 Hz, 2H, ArH), 9,85 (s, 1H, CHO); 13,72 g (94 %) de 32e, aceite anaranjado, ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,95 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 1,40-1,55 (m, 2H, CH₂), 1,70-1,85 (m, 2H, CH₂), 4,05 (t, J = 6,6 Hz, 2H, OCH₂), 7,00 (d, J = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,80 (d, J = 8,6 Hz, 2H, ArH), 9,85 (s, 1H, CHO); 11,4 g (94 %) de 32f, cristales incoloros: pf 68,5-69,3 °C,

^1H RMN (CDCl_3) δ 5,15 (s, 2H, CH_2), 7,10 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,25-7,48 (m, 5H, ArH), 7,85 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 9,90 (s, 1H, CHO).

Arilnitroestirenos (33a-f). A una solución del aldehído correspondiente (0,082 moles) en tolueno (100 mL) se agregó $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0,328 moles, 32,5 g) y nitrometano (0,820 moles, 50 g). El sistema se equipó con una trampa de Dean-Stark y se calentó a reflujo durante 3 h. Una vez transcurrido este tiempo se redujo el volumen de tolueno a un cuarto bajo presión reducida y se vertió sobre MeOH, obteniéndose: 9,6 g (46 %) de 33a como cristales amarillos con forma de agujas: pf 49,8-50,7 °C, lit.⁷⁴ 55-58 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,35-7,57 (m, 5H, ArH), 7,60 (d, $J = 13,9$ Hz, 1H, CH), 8,00 (d, $J = 13,7$ Hz, 1H, CH); 12,2 g (83 %) de 33b como cristales amarillos con forma de agujas: pf 85-87 °C, lit.⁷⁵ 86-87 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 3,87 (s, 3H, OCH_3), 6,97 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,50 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,55 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H, ArCH), 7,98 (d, $J = 13,7$ Hz, 1H, CHNO_2); 13,3 g (92 %) de 33c como cristales amarillos con forma de agujas: pf 111-112,8 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,45 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, CH_3), 4,08 (m, 2H, OCH_2), 6,93 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,50 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, ArH), 7,52 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, ArCH), 7,98 (d, $J = 13,7$ Hz, 1H, CHNO_2); 9,54 g (60 %) de 33d como cristales amarillos con forma de agujas: pf 93,8-94,2 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,05 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH_3), 1,75-1,90 (m, 2H, CH_2), 3,98 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, OCH_2), 6,92 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 7,44 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, ArH), 7,51 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H, ArCH), 7,94 (d, $J = 13,7$ Hz, 1H, CHNO_2); 13,5 g (78 %) de 33e como cristales amarillos con forma de

agujas: pf 63,2-63,8 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,96 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH_3), 1,43-1,58 (m, 2H, CH_2), 1,73-1,82 (m, 2H, CH_2), 4,00 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, OCH_2), 6,92 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,47 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, ArH), 7,52 (d, $J = 13,4$ Hz, 1H, ArCH), 7,95 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H, CHNO_2); 2,96 g (65 %) de **33f** como cristales amarillos con forma de agujas: pf 117,4-118,2 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 5,13 (s, 2H, OCH_2), 7,04 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,35-7,45 (m, 5H, ArH), 7,50 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,55 (d, $J = 13,7$ Hz, 1H, ArCH), 7,97 (d, $J = 13,7$ Hz, 1H, CHNO_2).

1-Metiltioglicolil-1-aril-2-nitroetanos (34a-f). A una solución del nitroestireno (0,017 moles) en THF (50 mL) se agregó tioglicolato de metilo (0,019 moles, 2,02 g) y Et_3N (0,020 moles, 2,02 g). La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente por 2 h. Luego se adicionó 10 gotas de HCl concentrado y se concentró al vacío. Al semisólido obtenido se le adicionó una solución de HCl 2 M (20 mL). Posteriormente se separaron las fases y la porción acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3×25 mL). Las fases orgánicas se secaron, filtraron y concentraron al vacío, quedando un sólido (exceptuando **34a**), el cual fue recristalizado en EtOH absoluto para dar: 15,8 g (97 %) de **34a** como un aceite de color café: ^1H RMN (CDCl_3) δ 3,05 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, SCH_2), 3,15 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, SCH_2), 3,70 (s, 3H, OCH_3), 4,76-4,84 (m, 3H, CHCH_2NO_2), 7,33-7,48 (m, 5H, ArH); 12,5 g (68 %) de **34b** como un aceite de color verde-amarillento que solidifica a una temperatura inferior a 20 °C, ^1H RMN (CDCl_3) δ 3,05 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, SCH_2), 3,15 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, SCH_2), 3,70 (s, 3H, OCH_3), 3,80 (s, 3H, OCH_3), 4,75-4,85 (m,

3H, $CHCH_2NO_2$), 6,85 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,25 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, ArH); 3,76 g (81 %) de **34c** como cristales incoloros, pf 47,8-48,5 °C, 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,39 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH_3), 3,05 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, SCH_2), 3,15 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, SCH_2), 3,70 (s, 3H, OCH_3), 4,02 (q, 2H, OCH_2), 4,75-4,87 (m, 3H, $CHCH_2NO_2$), 6,85 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,25 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH); 3,76 g (86 %) de **34d** como cristales incoloros, 68,6-69,3 °C, 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,00 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, CH_3), 1,72-1,85 (m, 2H, CH_2), 3,05 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, CH_2), 3,15 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, CH_2), 3,70 (s, 3H, OCH_3), 3,90 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, OCH_2), 4,70-4,85 (m, 3H, $CHCH_2NO_2$), 6,85 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,25 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH); 19,3 g (91 %) de **34e** como cristales incoloros, pf 48,5-49,2 °C, 1H RMN ($CDCl_3$) δ 0,95 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, CH_3), 1,40-1,50 (m, 2H, CH_2), 1,70-1,80 (m, 2H, CH_2), 3,05 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, CH_2), 3,15 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, CH_2), 3,68 (s, 3H, OCH_3), 3,90 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, OCH_2), 4,73-4,85 (m, 3H, $CHCH_2NO_2$), 6,84 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,23 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH); 3,65 g (93 %) de **34f** como cristales de color dorado con forma de láminas, pf 90,0-96,8 °C 1H RMN ($CDCl_3$) δ 3,05 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, CH_2), 3,15 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, CH_2), 3,65 (s, 3H, OCH_3), 4,70-4,85 (m, 3H, $CHCH_2NO_2$), 5,03 (s, 2H, OCH_2), 6,85 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,25 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,28-7,45 (m, 5H, ArH).

Aril-2-tiomorfolin-5-onas (17a-f). Se disolvieron los nitroésteres (0,02 moles) en 5 mL de MeOH y luego se adicionaron 500 mL de CH_3COOH glacial y finalmente poco a poco Zn (0,4 moles) en polvo. Se mantuvo la mezcla de reacción a una temperatura

aproximada de 80 °C durante 48 h. Una vez transcurrido este tiempo se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se filtró al vacío con Celite®. El sólido, antes de ser descartado, se lavó con CH₂Cl₂ (2 × 100 mL) y el filtrado fue concentrado a presión reducida. El residuo se redisolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con H₂O basificada con NH₃ aq. (2 × 100 mL). La fase orgánica se secó con Na₂CO₃, filtró y concentró quedando un sólido, el cual fue recristalizado en EtOH absoluto para dar: 1,05 g (9 %) de **17a** como cristales incoloros con forma de agujas, pf 144,3-145 °C, ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,45 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, CH₂), 3,55 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, CH₂), 3,78-3,85 (m, 2H, CH₂), 4,35 (dd, *J*₁ = 4,6 Hz, *J*₂ = 8,6 Hz, 1H, SCH), 6,15-6,25 (br s, 1H, NHCO), 7,33-7,50 (m, 5H, ArH), análisis elemental calculado para C₁₀H₁₁NOS·0,5H₂O: C 59,38%, H 5,98%, N 6,92%, S 15,85%, experimental C 58,98%, H 5,96%, N 6,86%, S 16,88%; 1,87 g (48 %) de **17b** como cristales incoloros con forma de agujas, pf 158,3-159,1 °C, ¹H RMN (CDCl₃) δ 3,43 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, CH₂), 3,55 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, CH₂), 3,70-3,80 (m, 2H, CH₂), 3,85 (s, 3H, CH₃), 4,25-4,33 (dd, *J*₁ = 4,6 Hz, *J*₂ = 9,1 Hz, 1H, SCH), 6,25-6,35 (br s, 1H, NHCO), 6,91 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,36 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, ArH), análisis elemental calculado para C₁₁H₁₃NO₂S: C 59,17%, H 5,87%, N 6,27%, S 14,36%, experimental C 58,91%, H 6,24%, N 6,30%, S 15,53%; 0,25 g (62 %) de **17c** como cristales incoloros con forma de agujas, pf 161,5-162,5 °C, ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,45 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, CH₃), 3,45 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H, CH₂), 3,50 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H, CH₂), 3,60-3,70 (m, 2H, CH₂), 4,00-4,10 (q, 2H, OCH₂), 4,25-4,33 (dd, *J*₁ = 4,5 Hz, *J*₂ = 8,8 Hz, 1H, SCH), 6,40-6,50 (br s, 1H, NHCO), 6,90 (d, *J* = 8,6

Hz, 2H, ArH), 7,35 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), análisis elemental calculado para $C_{12}H_{15}NO_2S$: C 60,73%, H 6,37%, N 5,90%, S 13,51%, experimental C 60,66%, H 7,13%, N 5,88%, S 14,85%; 0,20 g (50 %) de 17d como cristales incoloros con forma de agujas, pf 163,7-164,3 °C, 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,05 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H, CH_3), 1,75-1,90 (m, 2H, CH_2), 3,35 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, CH_2), 3,53 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, CH_2), 3,68-3,78 (m, 2H, CH_2), 3,95 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, OCH_2), 4,25-4,30 (dd, $J_1 = 4,5$ Hz, $J_2 = 8,8$ Hz, 1H, SCH), 6,20-6,30 (br s, 1H, NHCO), 6,90 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,35 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, ArH); 2,5 g (30 %) de 17e como cristales incoloros con forma de agujas, pf 166,1-167,6 °C, 1H RMN ($CDCl_3$) δ 0,95 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH_3), 1,40-1,53 (m, 2H, CH_2), 1,68-1,80 (m, 2H, CH_2), 3,35 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, CH_2), 3,45 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, CH_2), 3,60-3,75 (m, 2H, CH_2), 3,90 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, OCH_2), 4,20-4,25 (dd, $J_1 = 4,6$ Hz, $J_2 = 8,8$ Hz, 1H, SCH), 6,40-6,50 (br s, 1H, NHCO), 6,85 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,25 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), análisis elemental calculado para $C_{14}H_{19}NO_2S$: C 60,36%, H 7,22%, N 5,28%, S 12,08%, experimental C 60,52%, H 8,49%, N 5,33%, S 14,22%; 1,85 g (62 %) de 17f como cristales incoloros con forma de agujas, pf 193,9-194,6 °C, 1H RMN ($CDCl_3$) δ 3,35 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, CH_2), 3,45 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, CH_2), 3,62-3,70 (m, 2H, CH_2), 4,25-4,30 (dd, $J_1 = 4,8$ Hz, $J_2 = 8,9$ Hz, 1H, SCH), 5,02 (s, 2H, CH_2), 6,20-6,30 (br s, 1H, NHCO), 6,92 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,30 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,30-7,43 (m, 5H, ArH), análisis elemental calculado para $C_{17}H_{17}NO_2S$: C 68,20%, H 5,72%, N 4,68%, S 10,71%, experimental C 67,92%, H 6,10%, N 4,73%, S 12,84%.

Oxalatos de 2-ariltiomorfolinas (18a-f). A una solución hirviendo a reflujo de **17a-f** (0,0030 moles) en 10 mL de THF fue agregada una solución de DIBAL-H 1 M en n-hexano (0,012 moles). La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo con agitación durante 2 h. Posteriormente se agregó a la mezcla de reacción 50 mL de H₂O, y se extrajo con CH₂Cl₂ (2 × 30 mL). Luego la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrada y evaporado el solvente bajo presión reducida. Finalmente se obtuvo un aceite amarillo, el cual se disolvió en aproximadamente 15 mL de EtOH y se agregó lentamente ácido oxálico en exceso disuelto en EtOH y Et₂O para la precipitación del oxalato correspondiente, obteniéndose: 0,73 g (40 %) de **18a** como un sólido de color anaranjado claro, pf 226,9-227,5 °C, ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 2,90 (m, 1H, CH₂), 3,05 (m, 1H, CH₂), 3,15 (m, 1H, CH₂), 3,35 (m, 1H, CH₂), 3,60 (m, 2H, CH₂), 4,30 (m, 1H, SCH), 7,25-7,48 (m, 5H, ArH), análisis elemental calculado para C₂₀H₂₆NS·C₂H₂O₄·H₂O: C 56,63%, H 6,48%, N 6,00%, S 13,74%, experimental C 56,67%, H 6,56%, N 5,82%, S 15,83%; 0,25 g (14 %) de **18b** como un sólido de color anaranjado claro, pf 195,6-196,1 °C. Análisis elemental calculado para C₁₇H₁₉NOS·C₂H₂O₄·0,5H₂O: C 59,36%, H 5,77%, N 3,64%, S 8,34%, experimental C 59,72%, H 5,91%, N 3,70%, S 10,88%. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 2,75 (m, 1H, CH₂), 2,95 (m, 1H, CH₂), 3,10 (m, 1H, CH₂), 3,25 (m, 1H, CH₂), 3,48 (m, 2H, CH₂), 3,68 (s, 3H, OCH₃), 4,24 (m, 1H, SCH), 6,86 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,22 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, ArH), análisis elemental calculado para C₁₁H₁₃NOS·C₂H₂O₄·0,25H₂O: C 51,39%, H 5,81%, N 4,61%, S 10,55%, experimental C

51,35%, H 6,02%, N 4,77%, S 12,56%; 0,53 g (29 %) de **18c** como un sólido de color anaranjado claro, pf 204,3-204,9 °C, ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 1,30 (m, 3H, CH₃), 2,65 (m, 1H, CH₂), 2,90 (m, 1H, CH₂), 3,05 (m, 1H, CH₂), 3,15 (m, 1H, CH₂), 3,40 (m, 2H, CH₂), 3,90 (q, 2H, OCH₂), 4,00 (d, 1H, SCH), 6,90 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, ArH), 7,25 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, ArH), análisis elemental calculado para C₂₄H₃₄NOS·C₂H₂O₄: C 58,18%, H 6,76%, N 5,22%, S 11,95%, experimental C 57,75%, H 6,91%, N 5,19%, S 13,59%; 0,75 g (39 %) de **18d** como un sólido de color anaranjado claro, pf 197,3-197,8 °C, ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 0,93 (m, 3H, CH₃), 1,60-1,75 (m, 2H, CH₂), 2,80 (m, 1H, CH₂), 3,05 (m, 1H, CH₂), 3,15 (m, 1H, CH₂), 3,25 (m, 1H, CH₂), 3,55 (m, 2H, CH₂), 3,90 (m, 2H, OCH₂), 4,28 (d, 1H, SCH), 6,90 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, ArH), 7,15 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, ArH), análisis elemental calculado para C₁₃H₁₉NOS·C₂H₂O₄·0,5H₂O: C 53,55%, H 6,59%, N 4,16%, S 9,53%, experimental C 53,40%, H 6,85%, N 4,18%, S 11,84%; 0,64 g (33 %) de **18e** como un sólido de color anaranjado claro, pf 202,1-202,9 °C, ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 0,96 (m, 3H, CH₃), 1,30-1,50 (m, 2H, CH₂), 1,60-1,75 (m, 2H, CH₂), 2,85 (m, 1H, CH₂), 3,05 (m, 1H, CH₂), 3,15 (m, 1H, CH₂), 3,30 (m, 1H, CH₂), 3,55 (m, 2H, CH₂), 3,95 (m, 2H, OCH₂), 4,30 (m, 1H, SCH), 6,90 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,25 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, ArH), análisis elemental calculado para C₁₄H₂₁NOS·C₂H₂O₄·H₂O: C 53,46%, H 7,01%, N 3,90%, S 8,92%, experimental C 53,13%, H 7,05%, N 3,83%, S 10,57%; 0,74 g (14 %) de **18f** como un sólido de color anaranjado claro, pf 201,3-201,6 °C, ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 2,83 (m, 1H, CH₂), 3,05 (m, 1H, CH₂), 3,15 (m, 1H, CH₂), 3,30 (m, 1H, CH₂), 3,55 (m, 2H, CH₂), 4,25 (m, 1H, SCH), 5,10 (s, 2H, OCH₂), 6,95 (d,

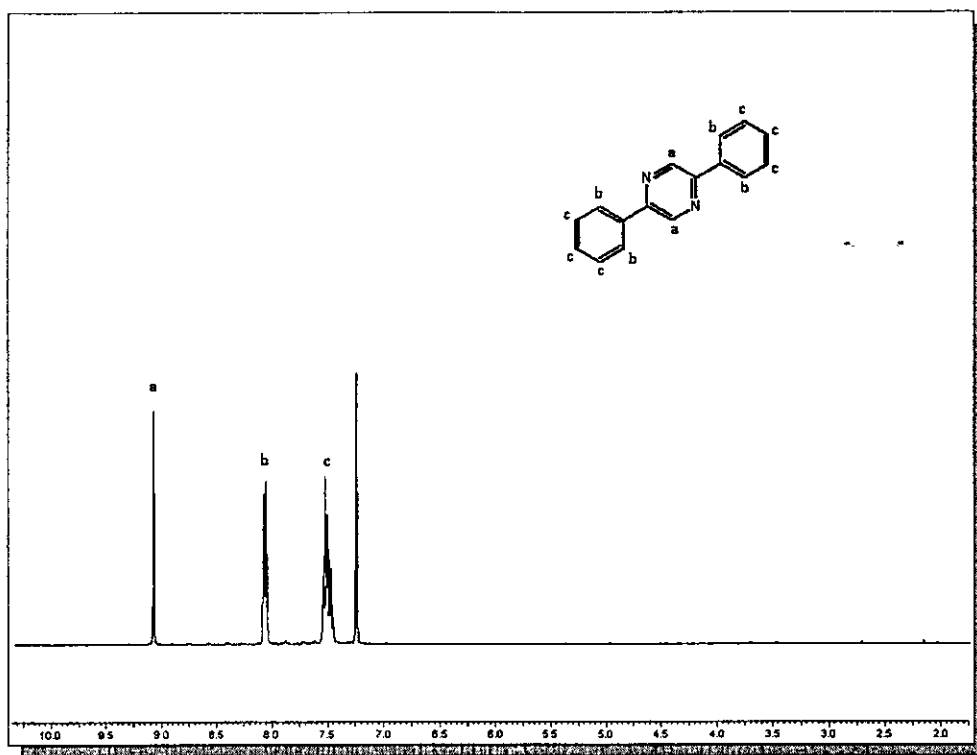
$J = 8,4$ Hz, 2H, ArH), 7,30 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, ArH), 7,37-7,48 (m, 5H, ArH), análisis elemental calculado para $C_{17}H_{19}NOS \cdot C_2H_2O_4 \cdot 0,5H_2O$: C 59,36%, H 5,77%, N 3,64%, S 8,34%, experimental C 59,72%, H 5,91%, N 3,70%, S 10,88%.

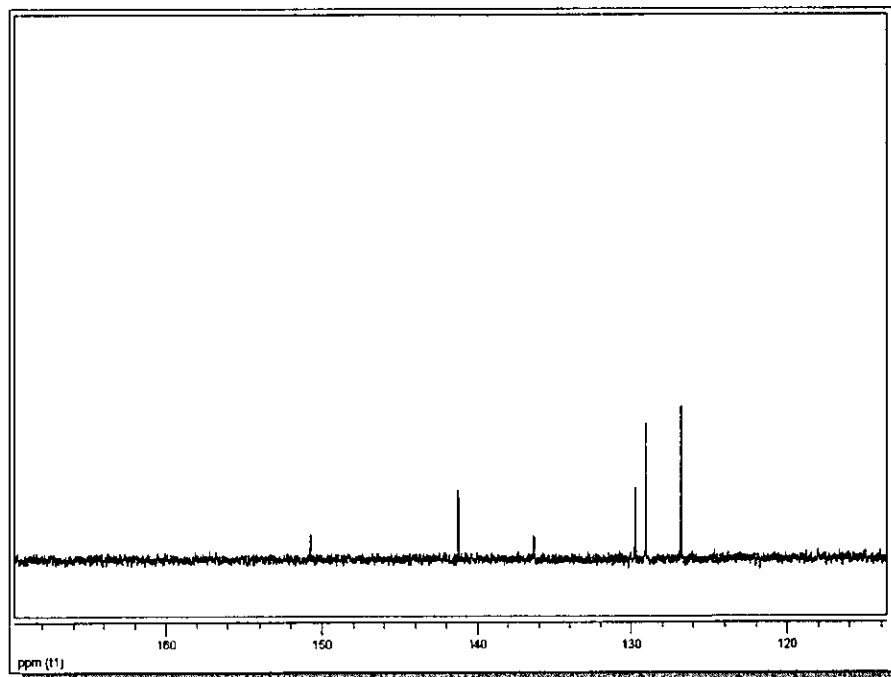
1-(4-Benciloxifenil)-2-nitropropeno (35). A una solución de 4-benciloxibenzaldehído (32f, 0,082 moles) en CH_3COOH (100 mL) se agregó ciclohexilamina (0,328 moles, 32,5 g) y nitrometano (0,820 moles, 50 g). La mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 3 h. Una vez transcurrido este tiempo se redujo el volumen de CH_3COOH a un cuarto bajo presión reducida y se vertió sobre MeOH, obteniéndose: 9,6 g (46 %) de 35 como cristales amarillos con forma de agujas, pf 143,3-144,7 °C, 1H RMN ($CDCl_3$) δ 2,45 (s, 3H, CH_3), 5,15 (s, 2H, CH_2O), 7,15 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH) 7,40 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,35-7,57 (m, 5H, ArH) 8,01 (s, 1H, ArCH).

Clorhidrato de 1-(4-benciloxifenil)-2-aminopropano (35f). El nitropropeno 35 fue disuelto en 100 mL de THF y la solución fue agregada gota a gota desde un embudo de adición a una suspensión de $LiAlH_4$ en 100 mL de THF. Una vez que la adición se completó la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 48 h. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se adicionó lentamente 3 mL de una solución de NaOH al 40 % y posteriormente 3 mL de agua. Luego se filtró al vacío, lavando el sólido con 3×50 mL de THF y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida. El aceite obtenido se redisolvió en EtOH y se acidificó con gotas de HCl

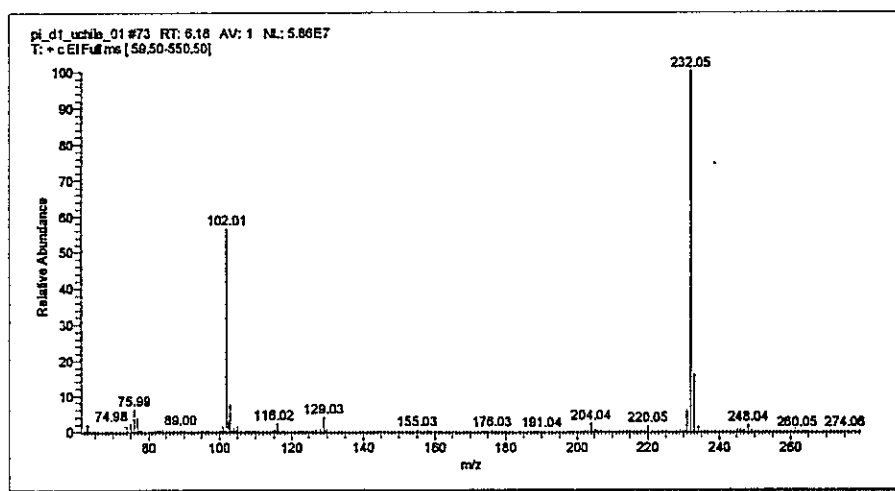
acuoso concentrado. Finalmente se adicionó pequeñas cantidades de Et₂O hasta la precipitación del clorhidrato obteniéndose 3,4 g (35 %) de **35f** como cristales blancos, *mp* 158,9-159,6 °C, ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 1,06 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, CH₃), 2,59 (m, 1H, ArCH₂), 2,89 (m, 1H, ArCH₂), 3,33 (m, 1H, CH), 5,05 (s, 2H, CH₂O), 6,95 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,12 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, ArH), 7,27-7,45 (m, 5H, ArH).

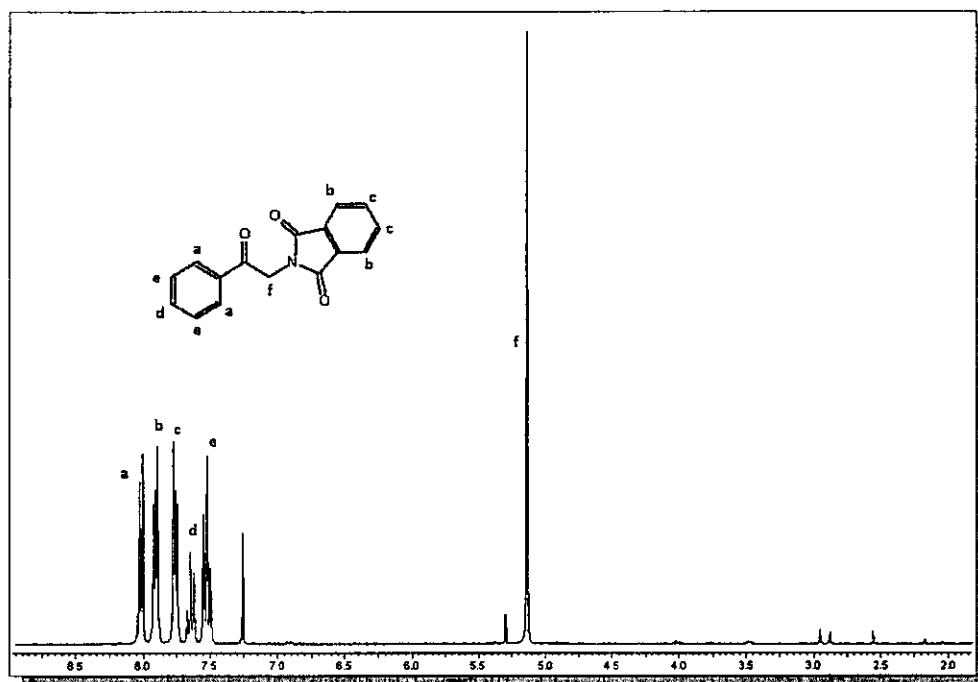
ANEXO 2

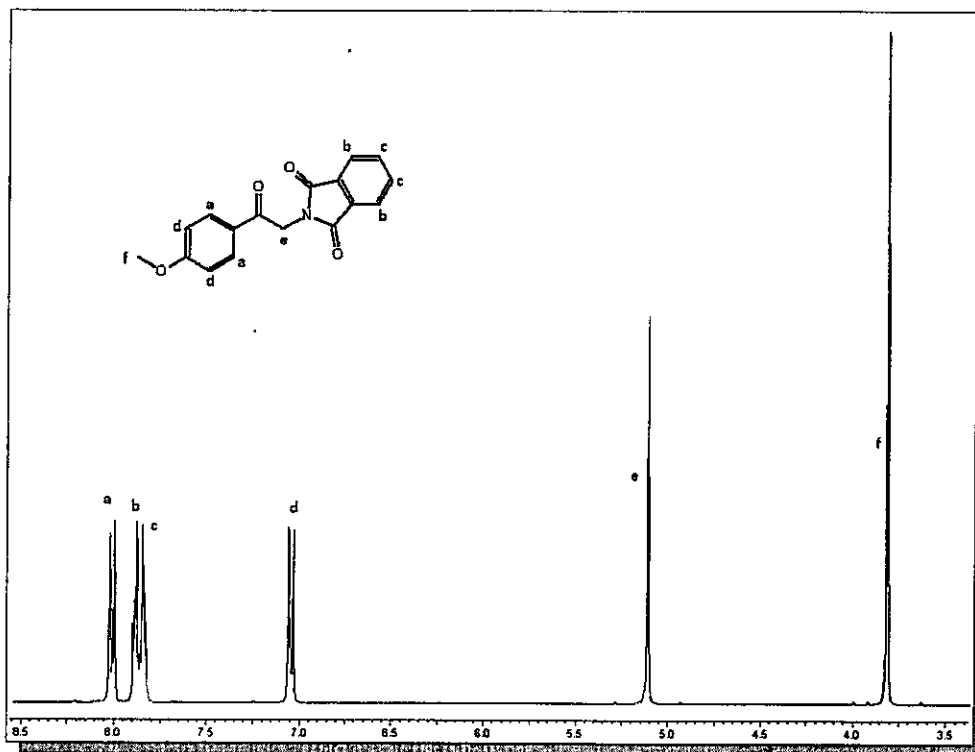
Espectros de ^1H y ^{13}C RMN y de masa del derivado de 2,5-difenilpirazina (25) ^1H RMN

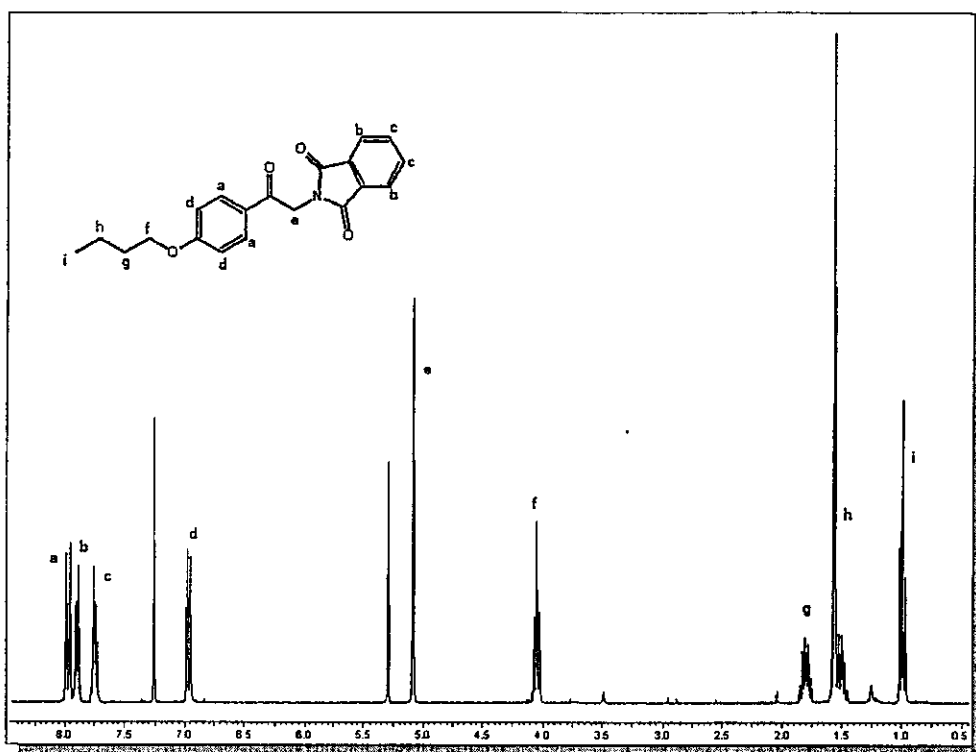
^{13}C RMN

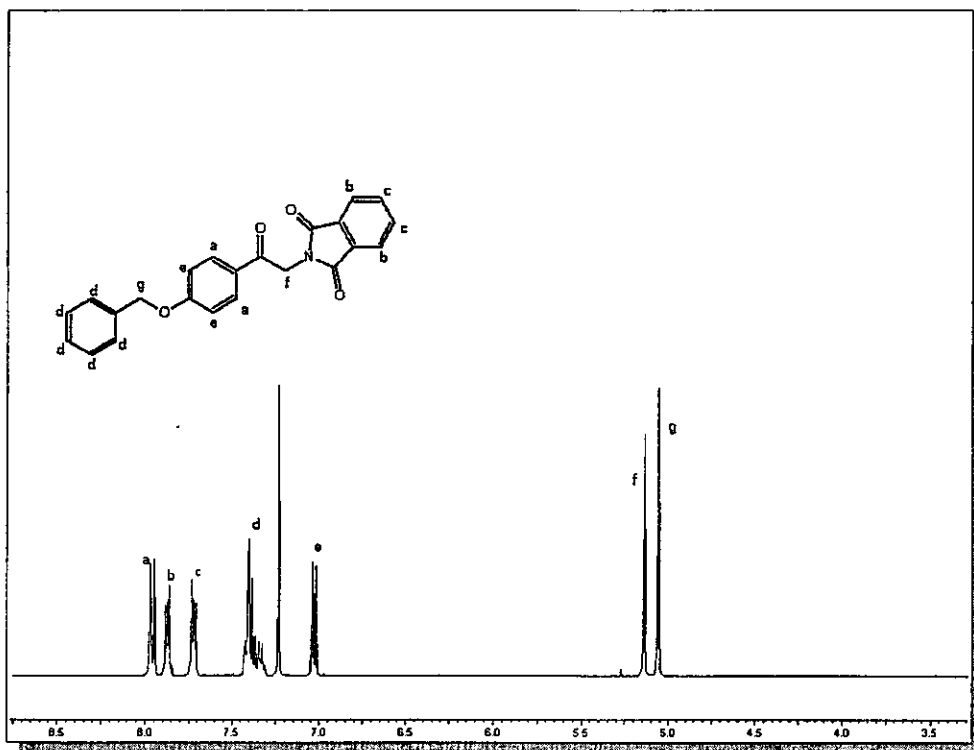
Espectro de masa

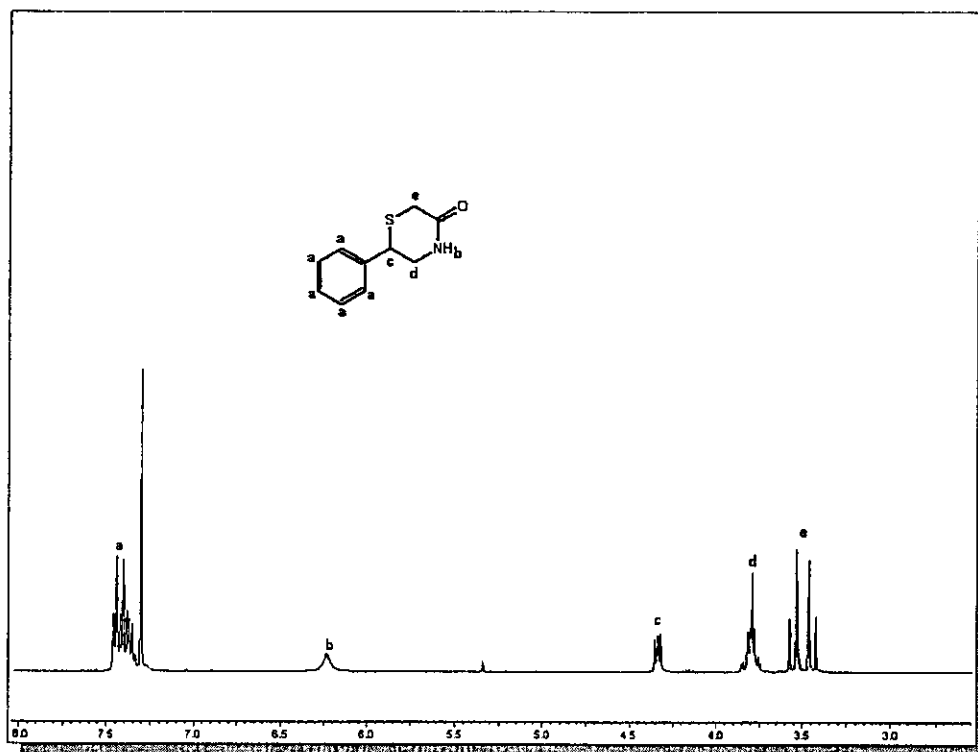


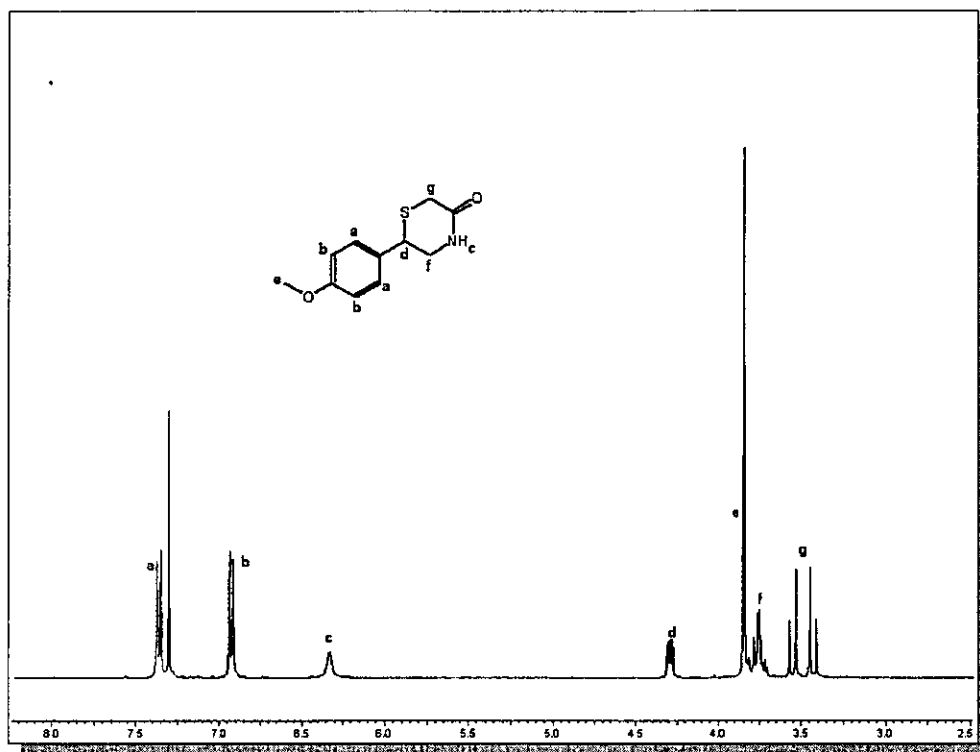
Espectros de ^1H RMN de los derivados de *N*-2-aril-2-oxoetilftalimida*N*-2-fenil-2-oxoetilftalimida

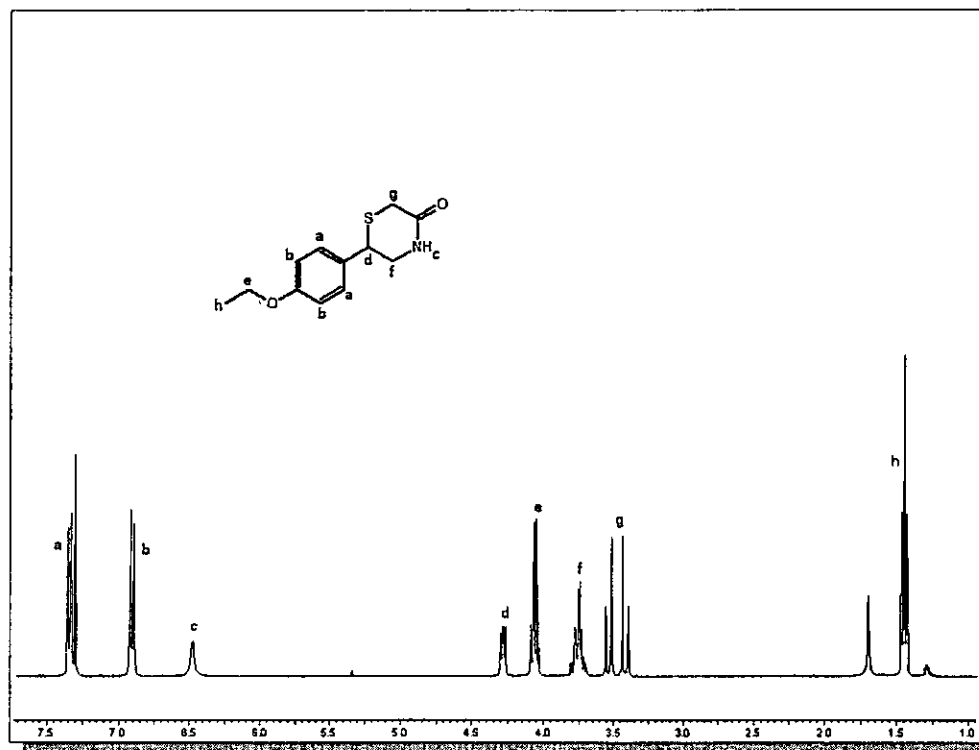
N-2-(4-metoxifenil)-2-oxoetilfalimida

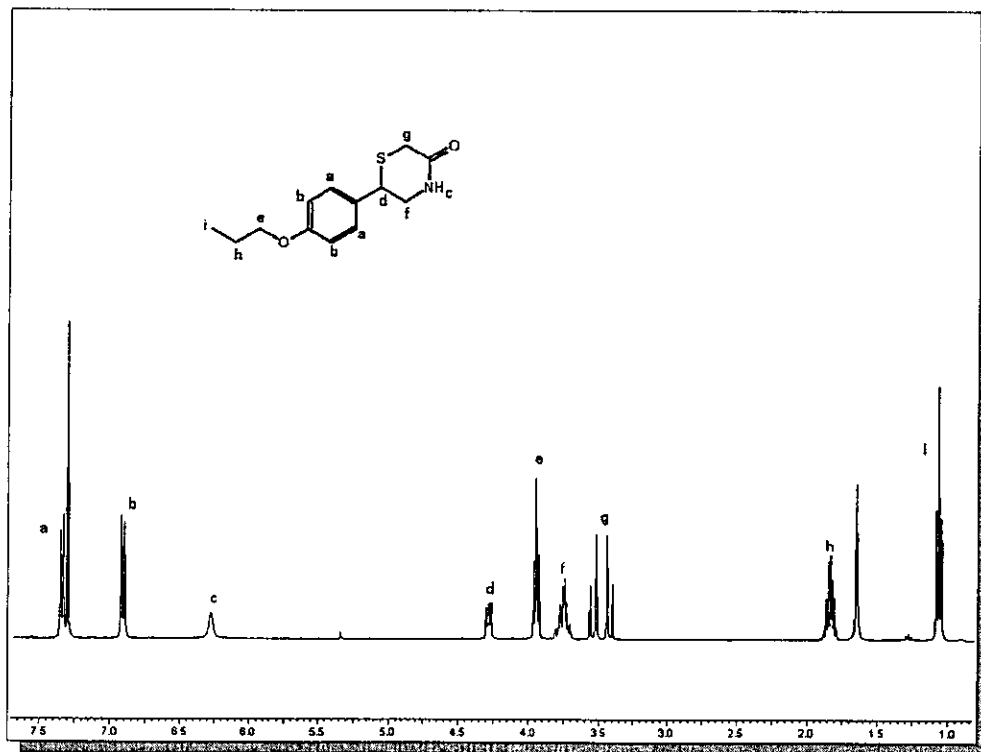
N-2-(4-butoxifenil)-2-oxoetilftalimida

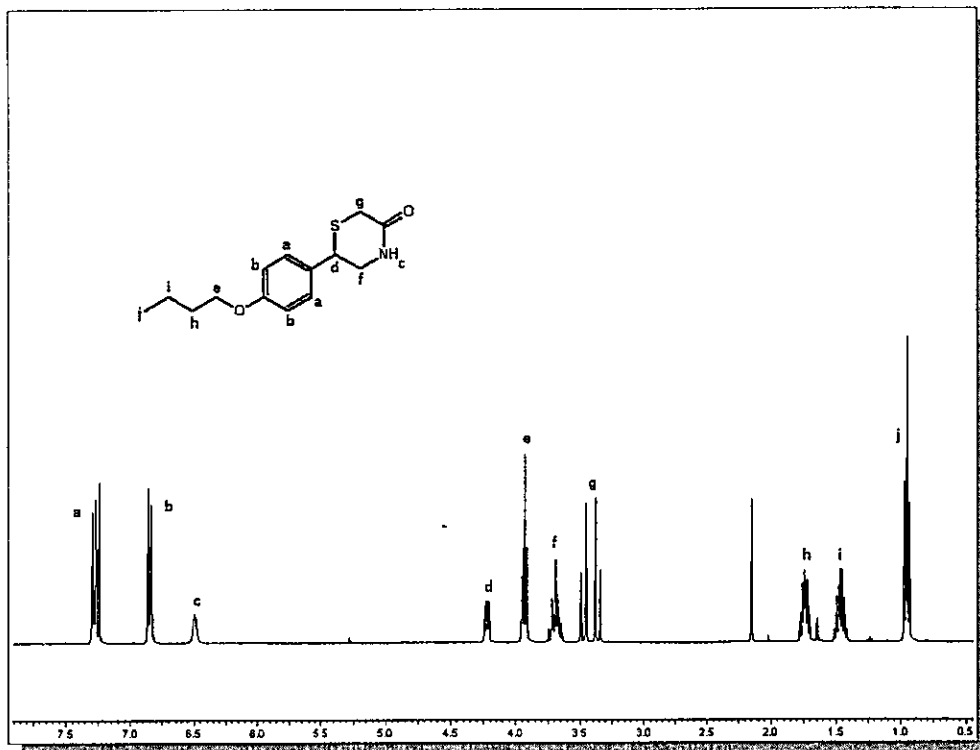
N-2-(4-benciloxifenil)-2-oxoetilfitalimida

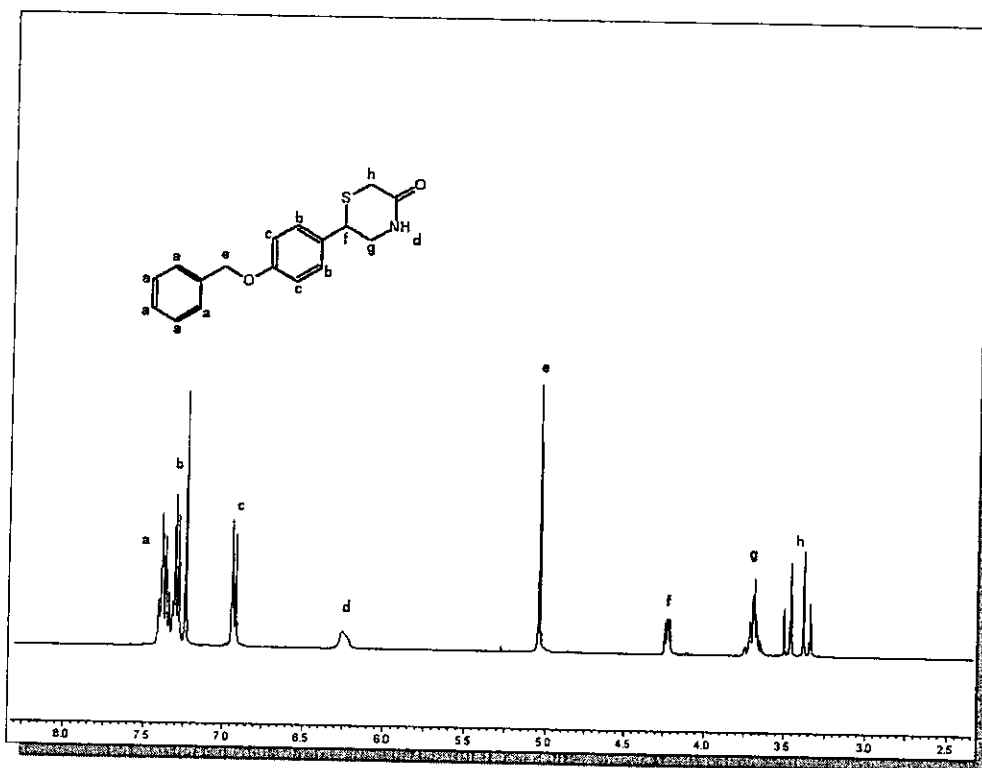
Espectros de ^1H RMN de los derivados de 2-ariltiomorfolin-5-ona***2-feniltiomorfolin-5-ona***

2-(4'-metoxifenil)tiomorfolin-5-ona

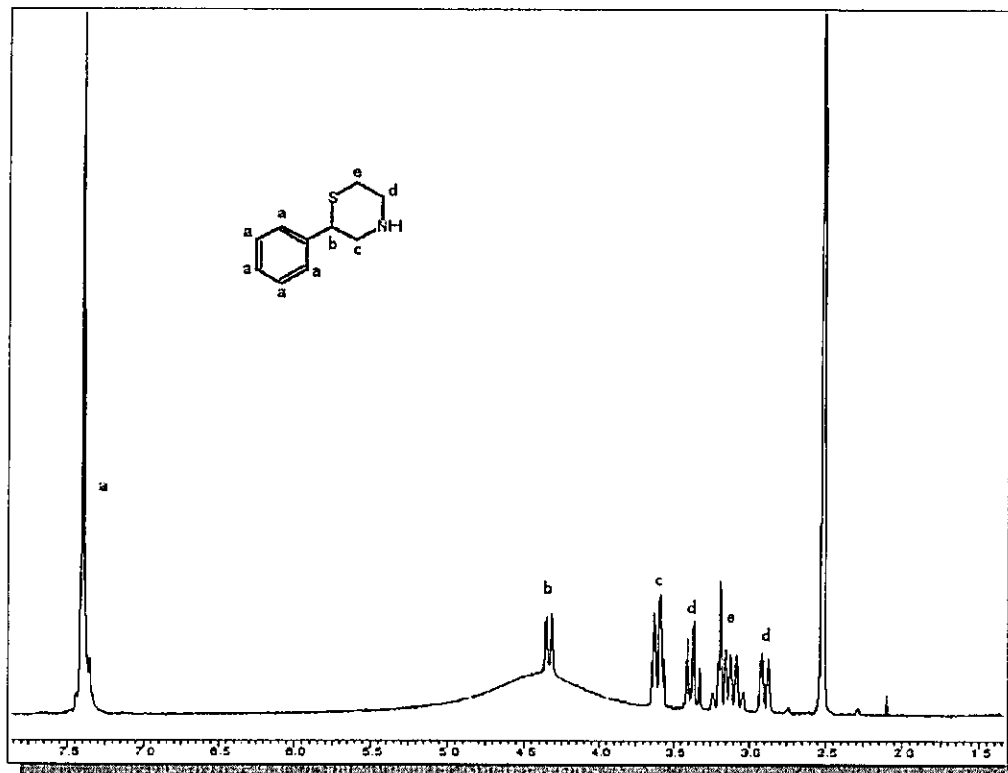
2-(4'-etoxifenil)tiomorfolin-5-ona

2-(4'-propoxifenil)tiomorfolin-5-ona

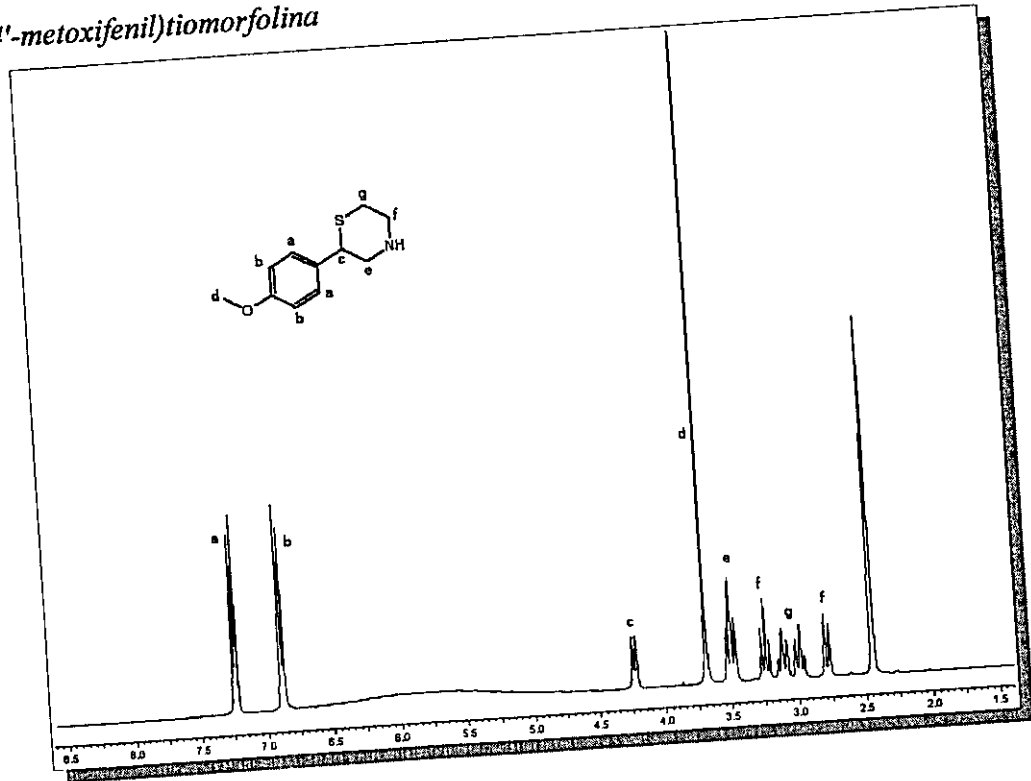
2-(4'-butoxifenil)tiomorfolin-5-ona

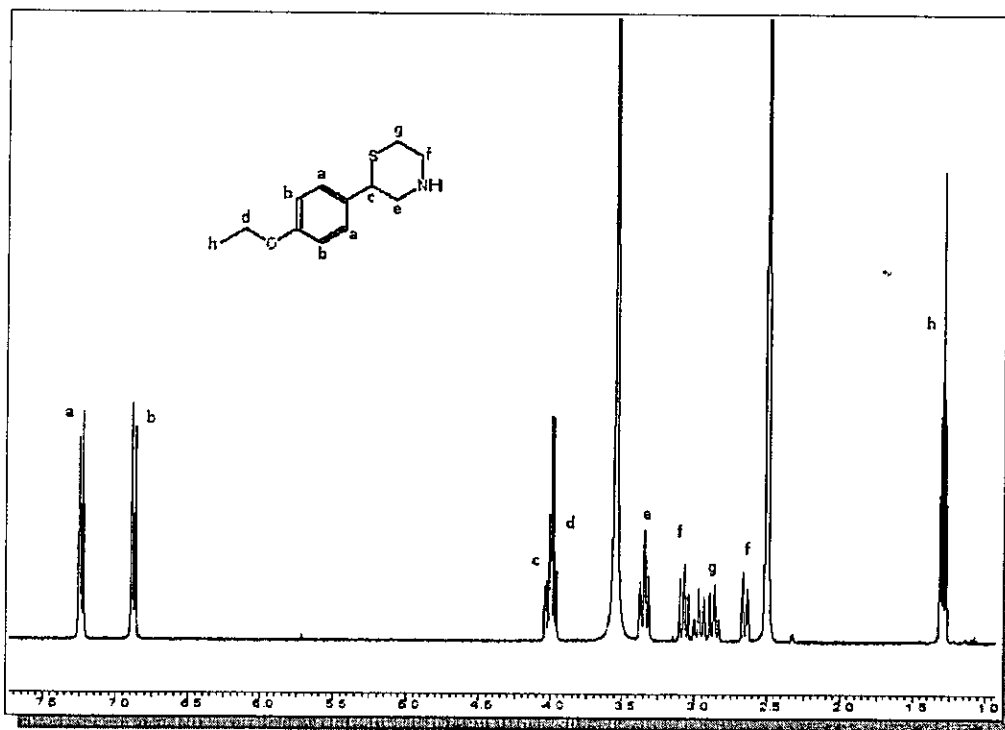
2-(4'-benciloxifenil)tiomorfolin-5-ona

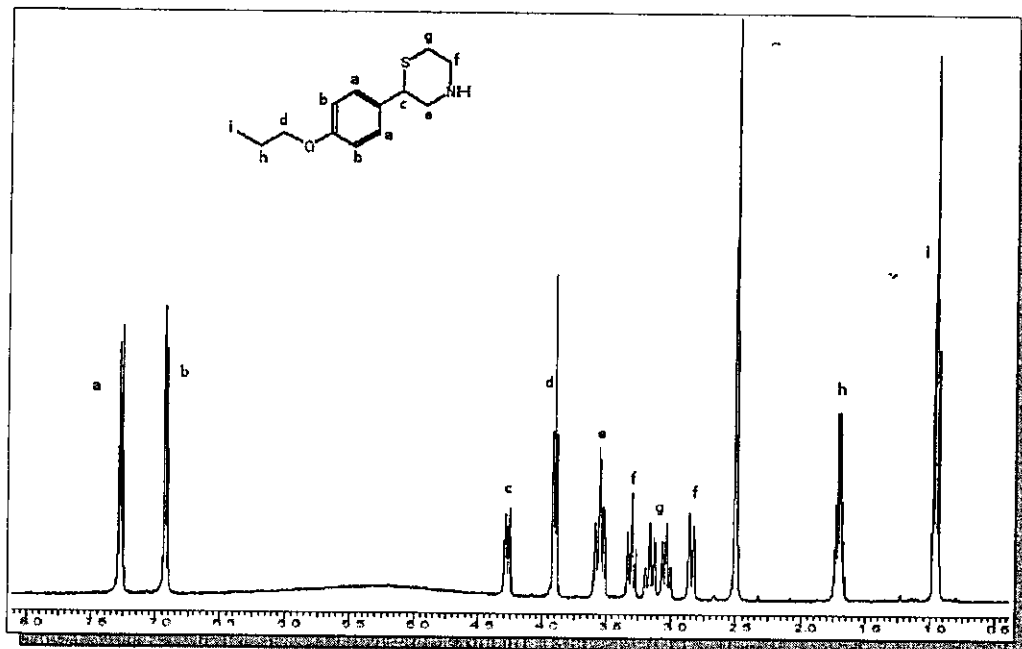
Espectros de ^1H RMN de los derivados de 2-ariltiomorfina
2-feniltiomorfina

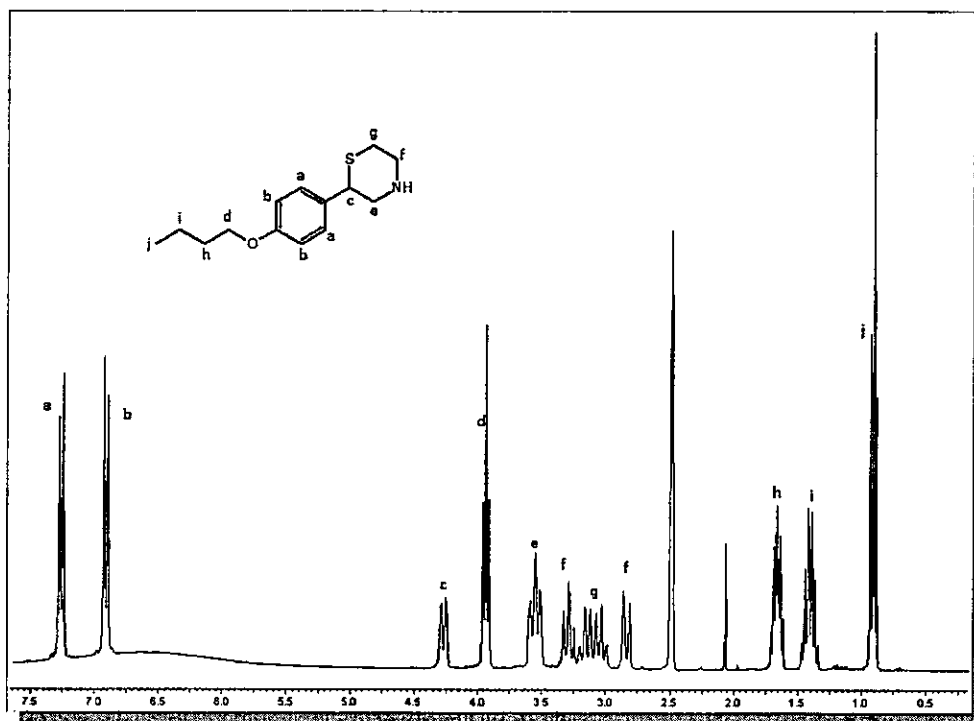


2-(4'-metoxifenil)tiomorfolina



2-(4'-etoxifenil)tiomorfolina

2-(4'-propoxifenil)tiomorfolina

2-(4'-butoxifenil)tiomorfolina

2-(4'-benciloxifenil)tiomorfolina