



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

“Síntesis químico–enzimática de moléculas diseñadas *in silico* que posean los farmacóforos, para inhibir la oligomerización del βA_{1-42} ”

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

Oscar Aurelio Martínez Romero

Director:

Gerardo Valerio Alfaro

Codirectores:

Martha Cecilia Rosales Hernández

Carolina Peña Montes

H. VERACRUZ, VER.

Diciembre 2019



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

H. Veracruz, Veracruz, 04/diciembre/2019
Div. Estudios de Posgrado e Investigación
OFICIO: ITV/DEPI/No.524/2019

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**C. ÓSCAR AURELIO MARTÍNEZ ROMERO
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada:

"Síntesis químico-enzimática de moléculas diseñadas in silico que posean los farmacóforos para inhibir la oligomerización del βA_{1-42} "

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®

EL. H. JURADO

**BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST**

**DRA. CAROLINA PEÑA MONTES
PRESIDENTE**

Claudia
**DRA. CLAUDIA YURITZI FIGUEROA HERNÁNDEZ
SECRETARIO**

**DR. VÍCTOR JOSÉ ROBLÉS OLVERA
VOCAL**

**DRA. CYNTHIA CANO SARMIENTO
SUPLENTE 1**

**DRA. GUADALUPE SÁNCHEZ OTERO
SUPLENTE 2**

**DR. GERARDO VALERIO ALFARO
SUPLENTE 3**

c. p. Expediente del Estudiante
Archivo

BOM*



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500
www.veracruz.tecnm.mx





"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

El presente trabajo de tesis titulado **"Síntesis químico-enzimática de moléculas diseñadas in silico que posean los farmacóforos para inhibir la oligomerización del βA_{1-42} "** presentado por el (la) C. **Oscar Aurelio Martínez Romero** ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

DIRECTOR

DR. GERARDO VALERIO ALFARO

CO-DIRECTORA

DRA. CAROLINA PEÑA MONTES

CO-DIRECTORA

DRA. GUADALUPE SÁNCHEZ OTERO

REVISORA

DRA. CLAUDIA YURITZI FIGUEROA HERNÁNDEZ

REVISOR

DR. VÍCTOR JOSÉ ROBLES OLVERA

REVISORA

DRA. CYNTHIA CANO SARMIENTO



DEDICATORIAS

A mis padres y hermanos por confiar todo el tiempo en mí y ser mi motor para salir adelante en cada situación que se me presento, por escucharme y aconsejarme cuando mas lo necesite y sobre todo por decirme que nunca me rindiera todas las veces que siempre quise desistir.

A mis compañeros que se convirtieron en maestros durante mi formación, Raul y Daniel los cuales se encargaron de enseñarme de manera siempre cordial y amistosa etapas claves en este trabajo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Adan, Jeffry, Eric, Arturo, Angel, Arturo, Alexis, Xochilt, Monserrat, Elizabeth, Nadia, Lady, Ana, Raul, Daniel, Luis, Raymundo, Samuel, Xhelhua, Marcos, Astrid, Sayuri, Emilio, Irving, Yohani, Yudibeth, Mireya y Aranza con los cuales comparti diferentes momentos que nunca olvidare y sobre todo agradecerles por cada momento que pasamos juntos y brindarme su amistad.

RECONOCIMIENTOS

A mis asesores por brindarme su entera confianza para realizar este proyecto a pesar de mi inexperiencia en este ámbito, así como por aconsejarme y guiarme para desarrollar el mismo.

Al comité revisor, por las oportunas observaciones para la adecuada culminación de este manuscrito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Al laboratorio de química orgánica y supramolecular, de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional, por el apoyo brindado en los análisis de RMN empleados en este trabajo.

Se reconoce el apoyo experimental del CNMN-IPN en la realización de los trabajos presentados.

RESUMEN

Martínez Romero, Oscar Aurelio. Maestría en Ciencias de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Diciembre 2019. “Síntesis químico–enzimática de moléculas diseñadas *in silico* que posean los farmacóforos, para inhibir la oligomerización del β A₁₋₄₂”. Directores: Dr. Valerio Alfaro, Gerardo, Codirectores: Dra. Rosales Hernández. Martha Cecilia y Dra. Peña Montes. Carolina.

La enfermedad de alzhéimer es una trastorno neurodegenerativo que presenta una alta incidencia en la actualidad, a la fecha no se conoce el origen de la enfermedad por lo cual está considerada una enfermedad multifactorial, sin embargo estudios recientes describen que la formación de placas seniles (placas de β -amiloide), se encuentra relacionado con la fisiología de la enfermedad, de igual forma estudios *in silico* demuestran que las interacciones de puentes salinos de *Lys* 28 y *Asp* 23 o *Glu* 22 del péptido, así como el extremo carbonilo terminal, lo que ocasiona un efecto neurotóxico y propicia la formación de dichas placas por lo cual es necesario la síntesis de compuestos que inhiban la oligomerización de este péptido. Por lo cual el objetivo de este trabajo se centra en la síntesis, purificación, caracterización y evaluación de los compuestos como inhibidores de las oligomerización del péptido β -amiloide, por su parte las moléculas sintetizadas fueron caracterizadas mediante técnicas de espectroscópicas tales como FT-IR, ESI-MS/MS, RMN de ¹H y ¹³C, como resultados se obtuvieron cuatro de los cinco objetivos moleculares propuestos los cuales presentan características específicas para interaccionar con los residuos de aminoácido que forma el puente salino mencionado con anterioridad, de los objetivos moleculares sintetizados dos fueron empleados en la evaluación *in vitro* las cuales la vainillilamina O-alquilada ((3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) fenil) metanamina) y la valproamida de vainillilamina O-alquilada (2-etil-N-(3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il)

etoxi) bencil) butanamida), los cuales fueron seleccionados debido las interacciones mostradas en el diseño *in silico*, además de que fueron aquellas que presentaban la mejor viabilidad para emplearse en los ensayos, por su parte los resultados de las pruebas *in vitro* demostraron que ambos compuestos empleados muestran una reducción en la agregación de 34 y 91% de manera consecutiva, sin embargo los ensayos de electroforesis y microscopia de fuerza atómica no presentaron resultados concluyentes.

ABSTRACT

Martinez Romero, Oscar Aurelio. Master in Biochemical Engineering Sciences. Technological Institute of Veracruz. Food Research and Development Unit. December 2019. “Chemical-enzymatic synthesis of chemical molecules designed *in silico* that the pharmacophore possesses, to inhibit the oligomerization of βA_{1-42} ”. Advisors: Dr. Valerio Alfaro, Gerardo, Dr. Rosales Hernández, Martha Cecilia and Dra. Peña Montes, Carolina.

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder that has a high incidence at present, to date it is not known the origin of the disease for which it is considered a multifactorial disease, however recent studies describe that the formation of senile plaques (plaques of β -amyloid), is related to the physiology of the disease, in the same way *in silico* studies show that the interactions of saline bridges of Lys 28 and Asp 23 or Glu 22 of the peptide, as well as the terminal carbonyl end, which It causes a neurotoxic effect and promotes the formation of these plaques, which is why the synthesis of compounds that inhibit the oligomerization of this peptide is necessary. Therefore, the objective of this work is focused on the synthesis, purification, characterization and evaluation of the compounds as inhibitors of the oligomerization of the β -amyloid peptide, on the other hand the synthesized molecules were characterized by spectroscopic techniques such as FT-IR , ESI-MS / MS, 1H and ^{13}C NMR, as results four of the five proposed molecular targets were obtained which have specific characteristics to interact with the amino acid residues that form the saline bridge mentioned above, of the molecular targets synthesized two were used in the *in vitro* evaluation which O-alkylated vanillylamine ((3-methoxy-4- (2- (piperidin-1-yl) ethoxy) phenyl) methanamine) and O-alkylated vanillyl amine valproamide (2- ethyl-N- (3-methoxy-4- (2- (piperidin-1-yl) ethoxy) benzyl) butanamide), which were selected due to the interactions shown in the *in silico* design, in addition to which were those that presented the best viability to be used in the tests, meanwhile the

results of the in vitro tests showed that both compounds used show a reduction in aggregation of 34 and 91% consecutively, however electrophoresis tests and atomic force microscopy did not present conclusive results.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xxi
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1. La enfermedad de Alzheimer.....	3
1.1.1. Factores de riesgo	3
1.2. Terapia contra la enfermedad de Alzheimer.....	4
1.2.1. Fármacos aprobados para el tratamiento de EA.....	4
1.3. Hipótesis amiloidogénica	7
1.3.1. El péptido β -Amiloide (β A)	8
1.3.2. Mecanismos de la formación de placas seniles	9
1.3.3. Alternativas anti amiloidogénicas	11
1.4. Investigación en fármacos para la reducir la producción de β A.	12
1.4.1. Inhibidores de la β -secretasa.....	12
1.4.2. Inhibidores o moduladores de la enzima γ -secretasa (GSI)	13
1.4.3. Terapias que promueven la eliminación del péptido β A.....	14
1.4.3.1. Inmunoterapia pasiva.....	14
1.4.3.2. Inmunoterapia activa.....	15
1.4.4. Fármacos para la prevención de la agregación de β A	15
1.5. Diseño de fármacos	16
1.5.1. Optimización estructural	18
1.6. Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC).....	19
1.7. Uso de estrategias de DIFAC en el desarrollo de fármacos contra β A	21

1.7.1. Evaluación de ligandos mediante técnicas de acoplamiento molecular contra la inhibición de β A.....	23
1.8. Análisis retrosintético y propuesta de síntesis de los objetivos moleculares.....	25
1.9. Las oximas.....	28
1.10. Reacciones de O-alkilación de vainillina.....	29
1.11. Conversión de aldehídos aromáticos en oximas.....	31
1.12. Reducción química de oximas a aminas	34
1.13. Oximólisis-acilación químico-enzimática.....	36
1.14. Aminólisis químico-enzimática	38
1.15. Elucidación de espectrometría de masas mediante ionización por electrospray	39
2. OBJETIVOS.....	42
OBJETIVO GENERAL	42
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3. MATERIALES Y METODOS.....	43
Materiales.....	43
Métodos	43
3.1. Evaluación <i>in silico</i> de los compuestos	44
3.2. Síntesis de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído (aldehído de vainillina O-alkilado).....	45
3.3. Síntesis de oxima de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído (Oxima de vainillina O-alkilada).....	46
3.4. Reducción química de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído mediante NaBH_4/I_2	47
3.5. Síntesis de clorhidrato de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) fenil) metanamina mediante hidrogenación catalítica	48
3.6. Reacción de acilación química de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído con cloruro de valproilo	48
3.7. Reacción de acilación química de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il)etoxi) fenil) metanamina.....	49

3.8. Reacción de acilación catalizada por lipasa CAL-B de oxima de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído con valproato de etilo	49
3.9. Análisis de las reacciones químicas y de las biotransformaciones	50
3.10. Evaluación de los compuestos como inhibidores de la agregación del β A1-42	51
3.10.1. Análisis mediante fluorescencia con ThT.....	52
3.10.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	53
3.10.3. Análisis de las muestras mediante microscopia de fuerza atómica	54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
4.1. Resultados de la evaluación <i>in silico</i>	55
4.1.1. Análisis de las interacciones de la conformación α -hélice.....	56
4.1.2. Análisis de las interacciones de la conformación β -plegada.....	60
4.1.3. Análisis de las interacciones de la conformación Random Coil (RC).	64
4.2. Obtención de los sustratos de interés.....	68
4.2.1. Resultados de la síntesis de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il)etoxi) benzaldehído (Vainillina O-alkilada)	68
4.2.2. Elucidación estructural de compuesto 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1- il) etoxi) benzaldehído (Vainillina O-alkilada).....	69
4.2.3. Síntesis de oxima de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído.....	75
4.2.4. Elucidación estructural de la oxima 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído	76
4.2.5. Síntesis del compuesto (3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina mediante el sistema de NaBH_4/I_2	81
4.2.6. Síntesis de clorhidrato de (3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina mediante hidrogenación catalítica.....	81
4.2.7. Elucidación estructural del compuesto clorhidrato de (3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina	82
4.2.8. Síntesis de la valproamida de (3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi)fenil) metanamina.	86
4.2.9. Elucidación estructural de la valproamida de (3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.	87

4.2.10. Síntesis químico-enzimática de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) fenil) benzaldehído O-(2-etoxibutanoil) oxima (Valproato de oxima de vainillina O-alkilada).....	92
4.3. Resultados de los ensayos biológicos.....	92
4.3.1. Resultados de fluorescencia con tioflavina T;Error! Marcador no definido.	
4.3.2. Resultados de la electroforesis en gel de acrilamida;Error! Marcador no definido.	
4.3.3 Resultados de la microscopia de fuerza atómica (MFA)..... ;Error! Marcador no definido.	
CONCLUSIONES	100
REFERENCIAS	101

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. 1 Inhibidores de AChE usados de manera comercial y sus características.....	6
TABLA 3. 1 Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE al 14%.....	54
TABLA 4. 1 Energía libre (Kcal/ mol) de cada compuesto obtenido y aa de interacción en un radio de 5 Å obtenidos de los estudios de Docking con el β A1-42 en conformación α -hélice, hoja- β y Random Coil (RC).....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Sinapsis colinérgica (Sánchez y Salcedo, 2008)	5
FIGURA 1.2 Estructura química de la memantina.....	7
FIGURA 1.3 Proceso proteolítico de PPA a β A con su subsecuente oligomerización (Wolfe, 2016).....	8
FIGURA 1.4 Mecanismo de las rutas amiloidogénica y no amiloidogénica de la proteína precursora amiloide	9
FIGURA 1.5 Modelo tridimensional de un oligómero de β A (EMBL-EBI 2015) ...	11
FIGURA 1.6 Estructuras químicas de la rosiglitazona y de la pioglitazona	13
FIGURA 1.7 Estructuras químicas de fármacos diseñadas para la inhibición de GSI	14
FIGURA 1.8 Representación 3D de la unión de solanezumab al péptido β A (EMBL- EBI 2015)	15
FIGURA 1.9 Estructuras químicas de compuestos desarrollados para la prevención de la agregación del β A	16
FIGURA 1.10 Modificaciones empleadas en la variación de sustituyentes	18
FIGURA 1.11 Proceso del DIFAC (Saldívar <i>et al.</i> , 2017)	21
FIGURA 1.12 Estructura propuesta para asegurar las mejores interacciones con β A (Hernández <i>et al.</i> , 2015).....	24
FIGURA 1.13 Objetivos moleculares propuestos contra β A	25
FIGURA 1.14 Análisis retrosintético de valproato de oxima de vainillina O-alquilada y valproamida de vainillilamina O-alquilada	26
FIGURA 1.15 Ruta de síntesis propuesta para la obtención de: A) Oxima de vainillina O-alquilada; B) Valproamida de vainillilamina O-alquilada.....	27
FIGURA 1.16 Reacciones de interconversión de grupos funcionales para la síntesis de los objetivos moleculares	29
FIGURA 1.17 O-alquilación de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído con distintos halogenuros de alquilo	30
FIGURA 1.18 O-alquilación de 4-hidroxibenzoato de metilo	30
FIGURA 1.19 Reacción de síntesis de oxima de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído por método clásico	32
FIGURA 1.20 Síntesis mecanoquímica de la oximas de aldehídos aromáticos	33

FIGURA 1.21 Reducción química oxima de piridoxina a piridoxamina	34
FIGURA 1.22 Obtención de vainillilamina mediante reducción química del nitrilo de vainillina, seguida de la acilación con cloruro de ácido	35
FIGURA 1.23 Síntesis química con NaBH₄/I₂ de 2-amino-2-(p-tolil) etanol	35
FIGURA 1.24 Síntesis de vainillilamina mediante hidrogenación catalítica.....	36
FIGURA 1.25 Acilación enzimática de oxima de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído para obtención de nitrilos y esteres de oxima.....	37
FIGURA 1.26 Obtención de vainillil nonanoato mediante acilación enzimática .	37
FIGURA 1.27 Síntesis del éster de oxima de apocinina con distintitos cloruros de ácidos grasos.....	38
FIGURA 1.28 Síntesis de amidas de ácidos grasos catalizada por lipasas empleando vainillilamina.....	39
FIGURA 1.29 Representacion de la ionización mediante espectrometría ESI-MS/MS.....	40
FIGURA 4.1 Interacciones de vainillina O-alkilada con la isoforma α-hélice....	56
FIGURA 4.2 Interacciones de oxima de vainillina O-alkilada con la isoforma α-hélice.....	57
FIGURA 4.3 Interacciones de vainillilamina O-alkilada con la isoforma α-hélice	58
FIGURA 4.4 Interacciones de la valproamida de vainillilamina O-alkilada con la isoforma α-hélice	59
FIGURA 4.5 Interacciones del valproato de oxima de vainillina O-alkilada con la isoforma α-hélice	60
FIGURA 4.6 Interacciones de vainillina O-alkilada con la isoforma β-plegada	61
FIGURA 4.7 Interacciones de la oxima de vainillina O-alkilada con la isoforma β-plegada.....	62
FIGURA 4.8 Interacciones de la vainillilamina O-alkilada con la isoforma β-plegada	62
FIGURA 4.9 Interacciones de la valproamida de vainillilamina O-alkilada con la isoforma β-plegada.....	63
FIGURA 4.10 Interacciones del valproato de oxima de vainillilamina O-alkilada con la isoforma β-plegada.....	64

FIGURA 4.11 Interacciones de vainillina O-alquilada con la isoforma Random coil (RC).....	65
FIGURA 4.12 Interacciones de la oxima de vainillina O-alquilada con la isoforma Random Coil (RC)	66
FIGURA 4.13 Interacciones de la vainillilamina O-alquilada con la isoforma Random Coil (RC)	66
FIGURA 4.14 Interacciones de la valproamida de vainillilamina O-alquilada con la isoforma Random Coil (RC).....	67
FIGURA 4.15 Interacciones del valproato de oxima de vainillilamina O-alquilada con la isoforma Random Coil (RC)	68
FIGURA 4.16 Cromatografía en capa fina de la reacción de alquilación de la vainillina donde A= aldehído de vainillina y Rx= corresponde a la de la Vainillina O-alquilada obtenida.	69
FIGURA 4.17 Diagrama de regiones de absorción de espectroscopia infrarroja (Hesse <i>et al.</i>, 1995).....	69
FIGURA 4.18 Espectro de Infrarrojo de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído	70
FIGURA 4.19 Espectro de Masas (ESI) de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído	71
FIGURA 4.20 Rangos aproximados de desplazamiento químico de ¹H para carbono en compuestos orgánicos (Jacobsen, 2017)	72
FIGURA 4.21 Espectro de RMN de ¹H de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído obtenido experimentalmente	73
FIGURA 4.22 Rangos aproximados de Desplazamiento químico de ¹³C para carbono en compuestos orgánicos (Jacobsen, 2017)	74
FIGURA 4.23 Espectro de RMN de ¹³C de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído obtenido experimentalmente.	75
FIGURA 4.24 CCF de la reacción de síntesis de oxima de vainillina alquilada, donde A=Vainillina, O=Oxima de vainillina, Vs=Aldehído O-alquilado, Ov1 y 2= oxima de vainillina O-alquilada 1 y 2	76
FIGURA 4.25 Espectro de Infrarrojo de oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído.....	77
FIGURA 4.26 Espectro de masas de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il)etoxi) benzaldehído	78
FIGURA 4.27 Espectro de RMN de ¹H experimental de la oxima de 3-metoxi-4-(2- (piperidin-1-il)etoxi) benzaldehído.....	79

FIGURA 4.28 Espectro de RMN de C13 obtenido experimentalmente de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído.....	80
FIGURA 4.29 CCF de la reacción de reducción química con NaBH₄/I₂ donde As=Aldehído O-alkilado, Os=Oxima O-alkilada, Rx= Reacción de reducción	81
FIGURA 4.30 CCF de la reacción de hidrogenación catalítica donde VOS=Oxima de vainillina O-alkilada y Rx 1,2 y 3 = amina de vainillina O-alkilada	82
FIGURA 4.31 Espectro de Infrarrojo de 3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il- etoxi) fenil) metanamina.....	83
FIGURA 4.32 Espectro de Masas de 3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.....	83
FIGURA 4.33 Espectro de RMN de ¹H, obtenido experimentalmente, de 3-metoxi-4(- 2-(peridin-1-il-etoxi)fenil)metanamina.....	85
FIGURA 4.34 Espectro de RMN de ¹³C, obtenido experimentalmente, de 3-metoxi- 4(-2-(peridin-1-il-etoxi)fenil)metanamina.....	86
FIGURA 4.35 Espectro infrarrojo de 3-metoxi-4(-2-(peridin-1-il-etoxi)fenil) metanamina.....	88
FIGURA 4.36 Espectro de masas de valproamida de 3-metoxi-4(-2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.	89
FIGURA 4.37 Espectro de RMN de ¹H de la valproamida de 3-metoxi-4(-2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.....	90
FIGURA 4.38 Espectro de RMN de ¹³C de la valproamida de 3-metoxi-4(-2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.....	91
FIGURA 4.39 A) CCF de la reacción de transesterificación de la oxima de vainillina alquilada, O=Oxima de vainillina alquilada T=testigo de la reacción RX1= reacción 1 Rx2=reacción 2; B) CCF de la reacción de acilación de la oxima de vainillina alquilada a temperatura ambiente (TA) donde As= vainillina alquilada, Os=Oxima alquilada, RQ= Reacción química RE= Reacción enzimática	92
FIGURA 4.40 Espectro de fluorescencia ThT de los compuestos inhibitorios...93	93
FIGURA 4.41 Porcentaje de inhibición de la agregación de los compuestos.....94	94
FIGURA 4.42 Gel de electroforesis al 14% tiempo inicial (0 horas).....95	95
FIGURA 4.43 Gel de electroforesis 14% tiempo final (48 horas) con compuestos inhibidores.....96	96
FIGURA 4.44 Micrografía control de βA tiempo final (48 horas).....97	97

FIGURA 4.45 Micrografía de βA + valproamida de vainillilamina O-alkilada tiempo final (48 horas).....	98
FIGURA 4.46 Micrografía de βA + vainillilamina O-alkilada tiempo final (48 horas).....	99

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
βA	Beta amiloide
AChe	Acetilcolinesterasa
Ach	acetilcolina
GSI	Gama secretase inhibitor (Inhibidor de gama secretasa)
BchE	Butilcolinesterasa
Bch	Butilcolina
NMDA	N-metil-D aspartato
APP	Amyloid Precursor Protein (Proteína precursora amiloide)
FDA	Food and Drugs Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
Å	Angstrom
MgSO₄-2H₂O	Sulfato de magnesio dihidratado
LiAlH₄	Hidruro de litio y aluminio
NaBH₄	Boro hidruro de sodio
4-DMAP	4-dimetil amino piridina
AGL	Algoritmo Genético Lamarckiano
CHCl₃	Cloroformo
DCM	Diclorometano
EDCI	1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimida
Hobt	Hidroxibenzotriazol
Pd/C	Paladio sobre carbono
NH₂-OH-HCl	Clorhidrato de hidroxilamina
THF	Tetrahidrofurano
HCl	Ácido clorhídrico
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
TEMED	Tetrametiletilendiamina
APS	Persulfato de amonio

INTRODUCCIÓN

El síndrome o trastorno de la demencia está catalogado como un padecimiento crónico degenerativo progresivo, el cual ocasiona un deterioro de las funciones cognitivas, de una manera anormal a lo que se presenta por envejecimiento, este se presenta en múltiples etapas en las cuales se manifiestan múltiples signos de la progresión de la enfermedad la cual ataca fuertemente las habilidades de la memoria y el pensamiento, siendo de igual forma reducidas las habilidades cognitivas y de lenguaje, a su vez se presenta un deterioro emocional y social (Wolfe, 2016).

Dentro de la sintomatología que presenta se encuentran los cambios de la memoria desde etapas tempranas siendo en sus inicios de la enfermedad muy común, la tendencia al olvido, pérdida de la noción espacio-temporal, dentro de una etapa intermedia se ven aumentados los síntomas por lo cual se puede observar una mayor pérdida de la memoria y la desubicación espacio-temporal, sin embargo, de igual forma comienzan a presentarse problemas de lenguaje y habilidades motrices. Por último, en una etapa tardía la presencia de una pérdida drástica de la memoria y habilidades cognitivas sumado a una deficiencia de habilidades motoras, así como un cambio conductual radical, lo cual se traduce en una dependencia casi total del paciente (Braak, 1991).

En la actualidad aproximadamente 50 millones de personas padecen alguna enfermedad relacionada a la demencia, dentro de las cuales del 60 al 70% se debe a la enfermedad de Alzheimer la cual está catalogada como la enfermedad relacionada con la mayor incidencia en la población mundial (OMS, 2017). Las personas que padecen dicha enfermedad se encuentran en un rango de edad de 65 años en adelante, aunque existen los casos de personas por debajo de la edad mencionada que puedan padecer la enfermedad, por lo cual se considera que un factor de incidencia elevado es la edad y este aumenta casi en un 40% en edades más avanzadas (Glenner y Wong, 1984).

Por lo cual es de importancia encontrar alternativas que ofrezcan una mejora en la calidad de vida, de las personas que la padecen, e incluso lograr una reducción de la aparición de la misma. Por lo anterior, en el presente trabajo se plantea la síntesis de objetivos moleculares, previamente diseñados *in Sillico* mediante el modelamiento de farmacóforos que posean una acción inhibitoria contra una de las causales con mayor relevancia de esta enfermedad, que es la formación de placas seniles de β A (β -amiloide) que está sustentada en la hipótesis amiloidogénica, considerada como una de las precursoras de dicha enfermedad: En base a estudios recientes se ha encontrado que compuestos que contengan una amina terciaria y un anillo aromático, son posibles candidatos con actividad contra la agregación del péptido β A debido a que la amina terciaria presente en la molécula es capaz de interaccionar con los residuos *Asp 23* y *Glu 22* del péptido los cuales forman puentes de sal con *Lys 28* los cuales favorecen la agregación y posterior oligomerización, además de que el adición de anillos aromáticos favorece las interacciones π con anillos vecinos. Por lo cual se plantea el diseño y síntesis de moléculas que posean estas características estructurales mencionadas con anterioridad, procediendo de igual forma con su elucidación estructural mediante técnicas espectroscópicas y espectrofotométricas.

Con la elucidación completada se procedió a la evaluación de los compuesto con la finalidad de observar su actividad inhibitoria de la agregación realizando espectrofotometría de fluorescencia en el cual se adiciona Tioflavina T para observar la absorción de la fluorescencia en los ensayos con los compuestos evaluados, electroforesis en gel de acrilamida al 14% con tinción de azul de coomassie para distinguir el peso de los agregados formados y microscopía de fuerza atómica para observar la morfología presentada en el péptido con y sin compuestos inhibidores.

1. ANTECEDENTES

1.1. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad el Alzheimer es un desorden neurodegenerativo que causa una pérdida progresiva en la memoria y habilidades cognitivas, estrechamente relacionado con la edad, el cual culmina en muerte del paciente en un plazo de 5 a 20 años una vez diagnosticada la enfermedad (Wolfe, 2016). Es considerada una enfermedad multifactorial progresiva aunque se desconoce en gran medida la causa exacta de la misma.

1.1.1. Factores de riesgo

Existen múltiples factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, uno de los principales factores es la edad, encontrándose la mayor incidencia de los casos de EA en adultos mayores de 65 años, sin embargo, no es la única causa directa del padecimiento ya que existen casos del padecimiento a una edad por debajo de la mencionada (Wolfe, 2016), Otro factor de riesgo factor a considerar es la predisposición genética de los individuos.

Se ha encontrado que la EA está relacionada con el alelo $\epsilon 4$ perteneciente a la apolipoproteína E, la cual se encuentra relacionada con el mecanismo cerebral (Kumar, 2015). De igual forma se han planteado algunas hipótesis sobre la causa principal de la misma dentro de las cuales se encuentran como las principales la formación de ovillos neurofibrilares (hiperfosforilación de la proteína *tau*) y la formación de placas amiloideas (Glennner y Wong, 1984). Siendo la hipótesis de la amiloidogenesis de vital importancia debido a estudios recientes mencionan la posibilidad de que pueda ser precursora de los demás mecanismos de desarrollo de la enfermedad (Hernández *et al.*, 2014).

1.2. Terapia contra la enfermedad de Alzheimer

El tratamiento actual aprobado para el manejo de la EA es considerada como una medida paliativa ya que disminuye síntomas específicos como la arritmia respiratoria y la pérdida de memoria (Wilson, 2011). Lo cual favorece una ligera mejoría en la calidad de vida del paciente; sin embargo, no existe ningún fármaco capaz de aumentar la síntesis de la acetilcolina a nivel presináptico; detener, revertir o impedir el proceso neurodegenerativo; ni proporcionar una mejoría considerable relacionada al deterioro cognitivo de los pacientes con Alzheimer (Roberson y Mucke, 2006).

1.2.1. Fármacos aprobados para el tratamiento de EA

Estos fármacos están encargados de la regulación de la acetilcolinesterasa la cual es una enzima que se encuentra en tejidos nerviosos y cuenta con la función principal de hidrolizar rápidamente al compuesto neurotransmisor acetilcolina en acetato y colina en un tiempo de milisegundos, el cual es de suma importancia en la sinapsis neuronal (Figura 1.1) y una reducción gradual del mismo puede ocasionar un deterioro cognitivo progresivo, como el presentado en la EA (Sánchez y Salcedo, 2008).

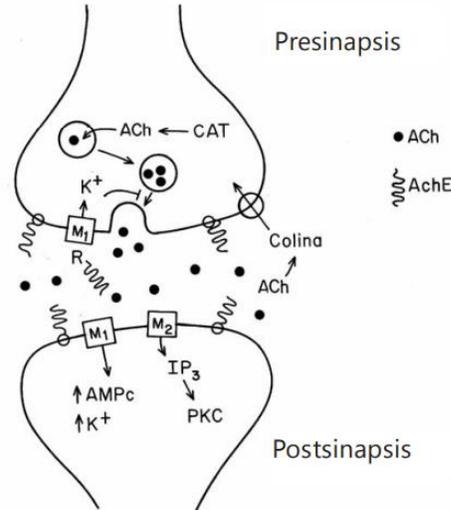
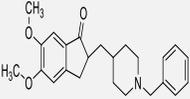
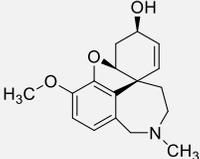
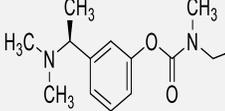
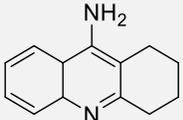


FIGURA 1. 1 Sinapsis colinérgica (Sánchez y Salcedo, 2008)

En la actualidad existen cinco fármacos aprobados para el tratamiento esta enfermedad, de las cuales cuatro se centran en la inhibición de la acetilcolinesterasa como la tacrina, donezepilo, rivastigimina, y galantamina (Tabla 1.1), que actúan bloqueando de hidrolisis de acetilcolina (Korabecny *et al.*, 2014), de igual forma existe un quinto fármaco que actúa de una manera diferente a las mencionadas con anterioridad, la cual lleva por nombre memantina que se encarga de regular la actividad de glutamato liberado en el cerebro, permitiendo que el calcio entre a la célula (Olivares *et al.*, 2012 ; Korabecny *et al.*, 2014).

La memantina (Figura 1.2) es un compuesto antagonista no competitivo, el cual no interacciona con la AChE si no con los receptores de NMDA, los cuales están relacionados con la interrupción de la sinapsis neuronal, por lo cual la memantina en combinación con el glutamato tiene un efecto potenciado, logrando inhibir el metabolismo del receptor de NMDA estableciendo una acción neuroprotectora (Olivares *et al.*, 2012; Korabecny *et al.*, 2014).

TABLA 1. 1 Inhibidores de AChE usados de manera comercial y sus características

Nombre	Donepezilo	Galantamina	Rivastigmina	Tacrina
Clasificación química	Derivado de la piperidina	Alcaloide del tipo de la isoquinolina	Carbamato	Derivado de la Acridina
Objetivo de la enzima	AChE	AChE	AchE/BChE	AchE/BChE
Tipo de Inhibición	No competitiva y rápidamente reversible	Competitiva, rápidamente reversible	Competitiva, lentamente reversible	No competitiva, rápidamente reversible
Metabolismo	CYP2D6 a 3 ^a 4.	CYP2D6 a 3 ^a 4	AChE y BChE	CPY1A2
Formulaciones Disponibles	Tabletas	Tabletas, soluciones y tabletas de liberación prolongada	Parches transdermales, capsulas	Capsulas
Vida media plasmática	70 horas	7 horas	3 horas (parches) 1 horas (capsulas)	6 horas
Estructura química				

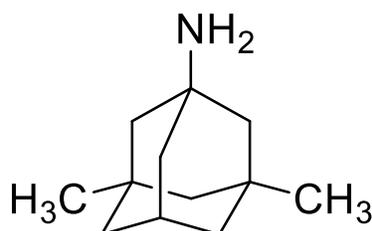


FIGURA 1. 2 Estructura química de la memantina

1.3. Hipótesis amiloidogénica

Un postulado que cuenta con respaldo por parte de la comunidad científica es la teoría propuesta de la cascada amiloide, en la cual se analiza el origen de la enfermedad de Alzheimer como una serie alteraciones en el procesamiento y secreción de la proteína precursora amiloidea (APP) (Figura 1.3). Un desequilibrio entre la producción y la acumulación del β A es el evento inicial desencadenante, y responsable de las alteraciones posteriores observadas (Salloway *et al.*, 2008). Así pacientes con la enfermedad de Alzheimer presentan una mayor acumulación del péptido amiloide a nivel cerebral (Wang *et al.*, 2006). El β A es un péptido con elevada resistencia a degradación proteolítica. La subsecuente neurodegeneración se asocia a una serie de alteraciones donde el péptido amiloide es protagonista como: aumento en la fosforilación de la proteína *Tau* (τ), aumento del estrés oxidativo y alteraciones en la homeostasis del ion calcio (Fuentes y Slachevsky, 2005), aspectos relacionados con muerte neuronal. Son numerosas las evidencias que señalan las modificaciones de la proteína τ junto con los oligómeros de β A como los principales mediadores de la disfunción neuronal en la patogénesis de la EA (Stoothoff y Johnson, 2005).

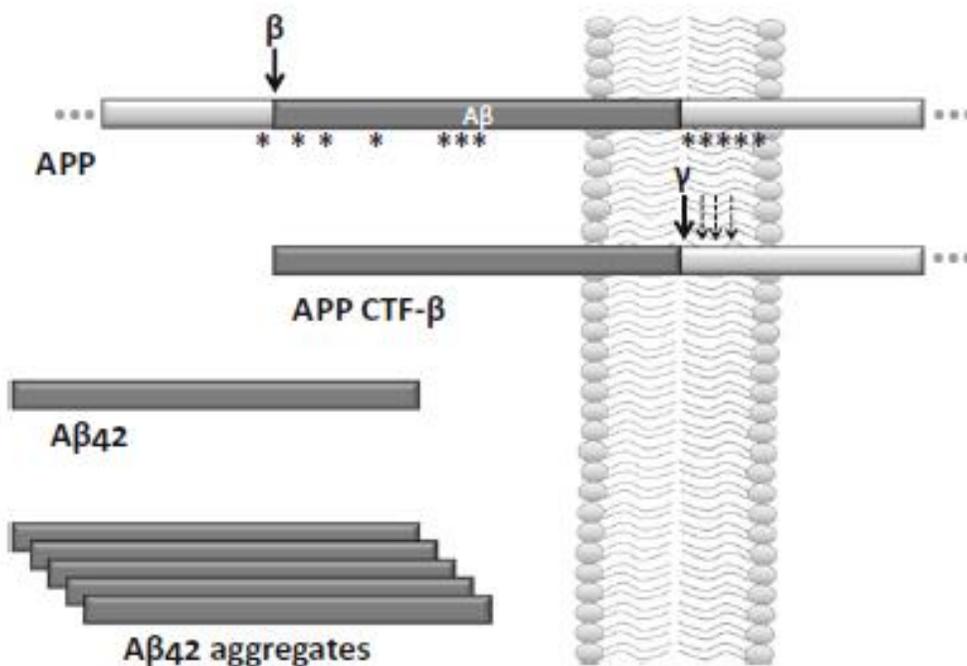


FIGURA 1. 3 Proceso proteolítico de PPA a β A con su subsecuente oligomerización
(Wolfe, 2016)

1.3.1. El péptido β -Amiloide (β A)

El péptido β A de las placas neuríticas es un producto del metabolismo normal de una glicoproteína transmembranal llamada proteína precursora del amiloide (APP). El cual consta de entre 37 a 43 aminoácidos, y sus isoformas 1-40 y 1-42 son las más frecuentes (Deane, 2009). Aunque el péptido β A ha demostrado toxicidad tanto *in vivo* como *in vitro*, los mecanismos fundamentales subyacentes a dicha toxicidad son muy complejos y actualmente no se conocen en su totalidad (Peña, 2006). Recientemente se ha afirmado que el procesamiento anormal de la APP debido a mutaciones que ha presentado, conduce a la enfermedad de Alzheimer. Existe evidencia importante que indica que la variabilidad genética en el catabolismo

del péptido β A y su remoción pueden contribuir al riesgo de desarrollo temprano del Alzheimer. Por otra parte, diversos reportes sugieren como evento primario para la patogénesis del Alzheimer la acumulación masiva del péptido β A₁₋₄₂, lo cual favorece la formación de las llamadas placas seniles.

1.3.2. Mecanismos de la formación de placas seniles

La regulación de las hidrolisis catalizadas por las enzimas α , β y γ secretasas sobre la PPA regulan severamente la formación de las placas seniles (Kumar, 2015), dividiéndola en dos rutas metabólicas diferentes, la cuales son: la ruta amiloidogénica y la ruta no amiloidogénica (Figura 1.4).

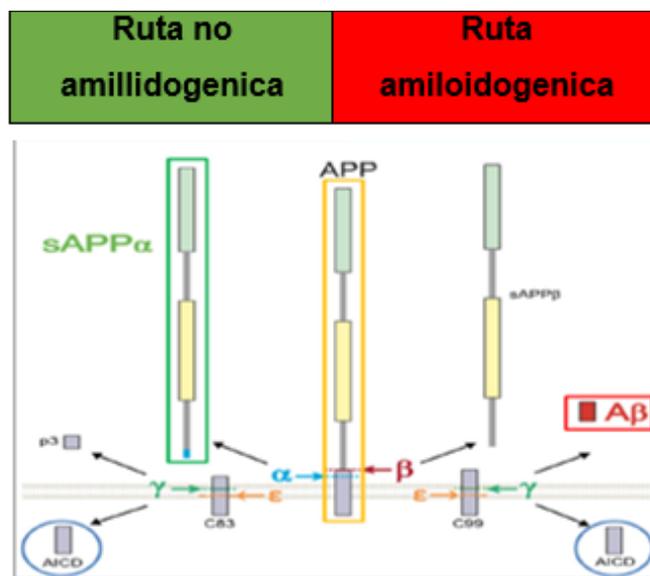


FIGURA 1. 4 Mecanismo de las rutas amiloidogénica y no amiloidogénica de la proteína precursora amiloide

En el caso de la ruta no amiloidogénica la PPA es primeramente hidrolizada por la α -secretasa que produce un fragmento soluble de la proteína secretándola de manera extracelular, posteriormente la γ -secretasa realiza una hidrólisis en el fragmento restante dividiendo en dos partes de las cuales una es liberada y es denominada fragmento p3 y de manera intermembranal se conserva el resto del fragmento. Siendo de esta forma la ruta que no produce el péptido neurotóxico, por el caso contrario en la ruta amiloidogénica la enzima que realiza la primera hidrólisis es la β -secretasa la cual de igual forma divide a la PPA en dos fragmentos sin embargo el fragmento hidrolizado es menor en tamaño al excretado por α -secretasa, lo cual aumenta el tamaño del fragmento liberado por γ -secretasa el cual a su vez libera el péptido de β A en cualquiera de sus isoformas siendo la isoforma 1-40 producida en mayor medida sin embargo, durante la EA se incrementa la producción de la isoforma 1-42 (Figura 1.5) (Wolfe, 2016).

De igual forma a su liberación estos péptidos presentan una estructura de aminoácidos específicos que les permite realizar uniones entre sí mediante puentes salinos de *Lys 28* y *Asp 23* o *Lys 28* y el carboxilo terminal, formando oligómeros o placas de distintos pesos moleculares, lo cual favorece de manera significativa a la citotoxicidad celular, respuesta neuroinflamatoria y disfunción sináptica (Wang *et al.*, 2006). Por lo cual es considerado en la actualidad que el estudio de las bases biológicas de suma importancia para el control de la enfermedad.

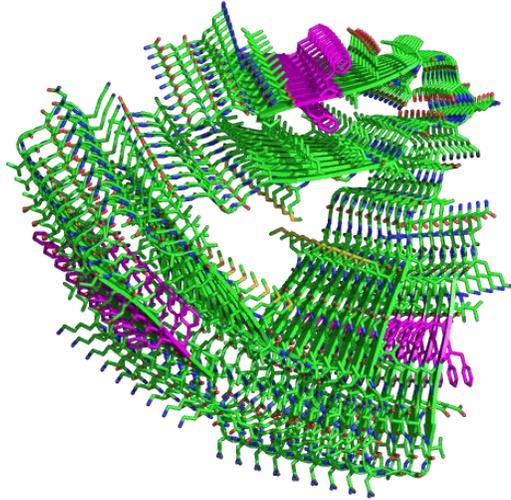


FIGURA 1. 5 Modelo tridimensional de un oligómero de β A (EMBL-EBI 2015)

1.3.3. Alternativas anti amiloidogénica

Determinadas moléculas conocidas como inhibidores PPI (protein-protein interaction) son capaces de interactuar directamente con los monómeros de β -amiloide impidiendo su oligomerización y posterior acumulación (Blazer, 2009). Dentro de este grupo destacan las serin proteasas con actividad hidrolasa (Gervais *et al.*, 2007), ciertos antihipertensivos (Qing *et al.*, 2008) y glicosaminoglucanos miméticos (Rafii y Aisen, 2009). De la misma manera la administración de quelantes, al disminuir la disponibilidad de iones metálicos Zn, Cu, entre otros, que favorecen la oligomerización, mediante la formación de complejos modulan el ensamble de dímeros y trímeros del péptido β -amiloide y su posterior formación en fibrillas (Citron, 2010).

Por lo tanto, los esfuerzos realizados en la actualidad para ofrecer estrategias de control contra el desarrollo de este tipo de patología, se encuentran centradas en el desarrollo de alternativas antiamiloidogénicas, mediante el diseño y síntesis de reductores de la producción de β A, inactivadores de enzimas secretasas, incremento de la eliminación del β A o mediante moléculas que bloqueen la agregación del péptido.

1.4. Investigación en fármacos para la reducir la producción de β A.

1.4.1. Inhibidores de la β -secretasa

Los inhibidores de la enzima secretasa- β , la cual es la encargada de la formación del péptido β A que genera neurotoxicidad, estudios han demostrado que la reducción o inhibición reversible de esta enzima puede ser de gran ayuda para prever la formación del péptido y por ende de las placas seniles. En la actualidad el desarrollo de fármacos relacionados a esta función se encuentra en una etapa inicial; Aunque las pruebas de algunos fármacos desarrollados como el CTS-21266 (Ghosh y Osswald, 2014) o el MK-8931 (Forman *et al.*, 2012) se encuentran en etapa de desarrollo, han demostrado excelente viabilidad, de igual forma el uso de medicamentos para el tratamiento de otras afecciones han demostrado ser una opción viable para el tratamiento de este mecanismo, algunos de estos son de la familia de los tiazolidinedionas como rosiglitazona y pioglitazona (Williamson *et al.*, 2007) (Figura 1.6), las cuales son empleadas en el tratamiento de diabetes tipo 2, pero que presentan una acción de inhibición contra la secretasa- β , mediante el control del receptor-gamma activado por proliferado de peroxisoma. No obstante lo anterior, los resultados actuales demuestran que el uso de estos fármacos podría ser una causal de daño al miocardio.

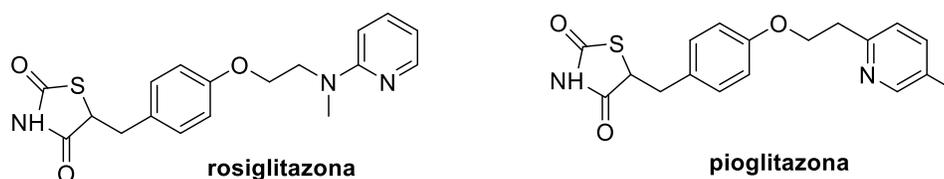


FIGURA 1. 6 Estructuras químicas de la rosiglitazona y de la pioglitazona

1.4.2. Inhibidores o moduladores de la enzima γ -secretasa (GSI)

Los inhibidores de la γ -secretasa en la actualidad presenta un reto similar al de los inhibidores de la β -secretasa, debido a que la primera presenta múltiples sustratos, por lo tanto, se busca diseñar inhibidores selectivos para la inhibición de la síntesis de β A, sin embargo, la búsqueda de inhibidores tiene como principal problema la aparición de efectos secundarios no específicos, debido a que esta enzima no es la única encargada de la producción del péptido.

En la actualidad el desarrollo de fármacos específicos para el mecanismo mencionado se encuentra en desarrollo e intensivas pruebas clínicas con la finalidad de demostrar la reducción de la formación de β A, conocidos como inhibidores de segunda generación, los cuales están actualmente en desarrollo. En el 2011, AAIC, Bristol-Myers Squibb Company (BMY) anunció los resultados de un estudio Fase-II que evaluó la seguridad y la tolerabilidad oral del GSI avagacestat (BMS-708163) (Figura 1.7) en pacientes con EA de leve a moderada. Begacestat (GSI-953) (Figura 1.7) y ELND006 (Figura 1.7) (Wood *et al.*, 2008) son nuevos GSI que se encuentran en etapa de ensayos clínicos como un posible tratamiento para la EA.

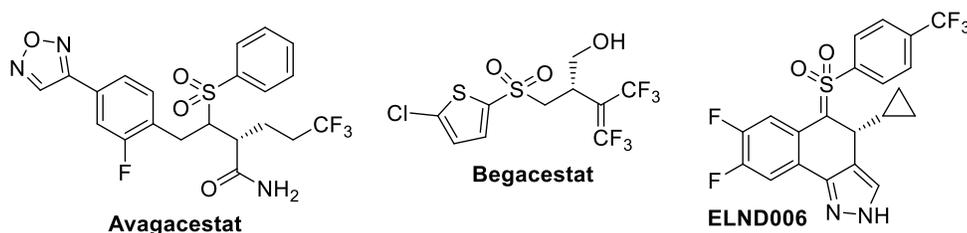


FIGURA 1. 7 Estructuras químicas de fármacos diseñadas para la inhibición de GSI

1.4.3. Terapias que promueven la eliminación del péptido β A

Uno de los tratamientos que ha demostrado ser de los más prometedores ha sido el empleo de inmunoterapias, debido potencial efecto que presentan en la producción, agregación o deposición de la formación del péptido y placas seniles, encontrando que los alcances de inmunoterapia pasiva y activa. Presenta una actividad inhibitoria de la generación de los agregados neurotóxicos, y de igual forma ayuda a su solubilidad.

1.4.3.1. Inmunoterapia pasiva

La inmunoterapia pasiva está centrada en el uso de anticuerpos monoclonales o inmunoglobinas policlonales las cuales presentan como objetivo la disociación del β A, mediante el uso anticuerpos desarrollados contra el β A pueden prevenir a la formación de oligómeros del mismo y a su vez mejorar las funciones cognitivas, en la actualidad se encuentran en pruebas algunos tratamientos de este tipo como es el caso del Solanezumab (Figura 1.8) el cual es un anticuerpo del tipo monoclonal usado en el tratamiento de EA menor a moderado que se encuentra en una etapa secundaria de desarrollo (Honig *et al.*, 2018), el uso de este tratamiento ha demostrado seguridad empleado biomarcadores, de igual forma el uso de Bapineuzamub el cual de igual forma es un anticuerpo monoclonal que actúa en el sistema nervioso que ha presentado una eficiente acción contra los mecanismos descritos con anterioridad (Kerchner y Boxer, 2010).

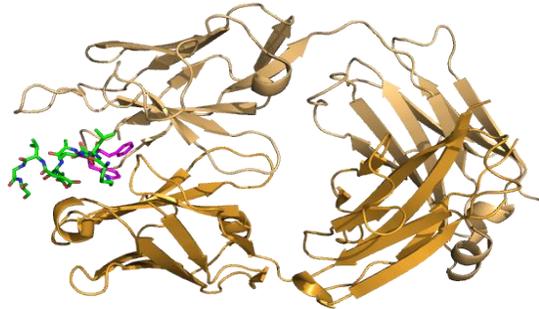


FIGURA 1. 8 Representación 3D de la unión de solanezumab al péptido β A (EMBL-EBI 2015)

1.4.3.2. Inmunoterapia activa

En el caso de la inmunoterapia activa se usan péptidos de β A o partes del mismo para inducir inmunidad del mismo mediante el sistema inmune humano para así generar la eliminación del péptido del cerebro, basando su acción en ralentizar o revertir la progresión de los agregados. En la actualidad se encuentran en desarrollo algunos tratamientos de este tipo siendo el ACC-001 uno de los cuales constituye una vacuna de segunda generación contra el péptido β A, la cual se centra en la inducción de una rápida respuesta del sistema inmune contra el β A (Pasquier *et al.*, 2016).

1.4.4. Fármacos para la prevención de la agregación de β A

La oligomerización del monómero β A en agregados de alto peso molecular está relacionada de una manera primaria con la formación de las placas neurotóxicas, por lo cual es necesario el desarrollo de moléculas que ayuden a la reducción de este mecanismo, las cuales tienen como finalidad interactuar con los iones metálicos de Hierro, Cobre y Zinc, que se encuentran en los procesos de sinapsis neuronal y que a su vez se ha demostrado que juegan un papel fundamental en la

oligomerización del péptido β A. De igual forma estudios recientes han demostrado que agentes quelantes podrían jugar un papel importante en el proceso de reversión de la agregación de las placas seniles.

El tramiprosato (Figura 1.9), es un glucosaminoglicano que fue diseñado para evitar la agregación de las placas, demostrando a través de ensayos clínicos que esta droga reduce los niveles de β A cerebral y a su vez previene la formación de fibrillas (Santa María *et al.*, 2007). Asimismo, un estereoisómero del inositol conocido como Scyllo-inositol (Figura 1.9), ha demostrado interferir con la agregación del péptido, modular el plegamiento del mismo y promover la disociación de las placas formadas (Salloway *et al.*, 2011).

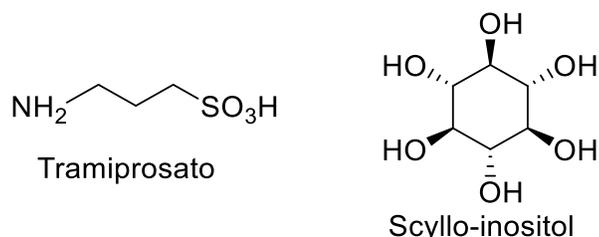


FIGURA 1. 9 Estructuras químicas de compuestos desarrollados para la prevención de la agregación del β A

1.5. Diseño de fármacos

El diseño de fármacos en la actualidad consta de un esfuerzo multidisciplinario complejo y costoso, considerando desde la evaluación de las bases biológicas así como las interacciones del ligando con el receptor convirtiéndose en un ejercicio de ensayo prueba y error, basándose en la evaluación múltiple de productos naturales o sintéticos, en la actualidad la mayoría de los medicamentos con los que se cuenta y son aplicados de manera clínica, son el resultado de años de investigación o del estudio de la actividad biológica de productos del metabolismo secundario de organismos vivos, del descubrimiento accidental de una nueva actividad o de efectos inesperados en la aplicación terapéutica en ensayos biológicos.

Lo cual con el tiempo presenta limitaciones en la diversidad de los fármacos existentes, además de que el resultado dependía solamente de aquellos compuestos que ya habían sido evaluados previamente, o que a su vez si no estaban probados existían múltiples factores que no permitía la evaluación de nuevas estructuras químicas de una manera efectiva, pero sobre todo eficiente en función del tiempo de desarrollo e implementación, sin embargo estas limitaciones han sido anuladas gracias al desarrollo de la química computacional, así como los sistemas automatizados los cuales son capaces de efectuar un ensayo biológico a escala masiva en un corto período de tiempo de igual forma.

En los últimos años, el diseño de fármacos se ha beneficiado del desarrollo de la química computacional, instaurándose el uso de bibliotecas virtuales de compuestos que permiten hacer un barrido casi instantáneo de enormes cantidades de moléculas diferentes que comparten características estructurales comunes o que tienen similitud terapéutica.

El empleo de múltiples disciplinas y herramientas han facilitado la investigación de esta área de la química médica, siendo utilizadas herramientas de computo como el diseño *in silico* el cual ha favorecido el desarrollo de nuevos fármacos, acelerando el proceso de codificación de modelos teóricos que posteriormente se probaran en una forma experimental. De igual forma el uso de esta técnica contribuye a la comprensión de mecanismos de acción de compuestos activos y a su posterior mejoramiento, mediante la reducción de efectos no deseados (Hung y Chen, 2014; Saldívar *et al.*; 2017; Prieto y Medina, 2018; Brogi, 2019).

1.5.1. Optimización estructural

La manera en que se comprenden las bases biológicas de las enfermedades, se establece como una mejora en el control de la enfermedad, y eso a su vez permite el desarrollo de nuevos compuestos de interés, mejorar la efectividad de una molécula conocida, alterar el efecto de la molécula diseñada o en su defecto reducir efectos no deseados, a este tipo de modificaciones realizadas en compuestos químicos empleados en la rama farmacéutica lleva por nombre mejora u optimización estructural, y se basa en la preparación de estructuras relacionadas mediante modificaciones químicas programadas racionalmente. Teniendo como objetivo obtener nuevas o mejores moléculas orgánicas (Patani, 1996).

Las modificaciones referidas no son realizadas de manera arbitraria siendo las principales:

- **La variación de sustituyentes** con la intención de establecer mejores interacciones compuesto-receptor, considerando la adición de grupos aromáticos o arilos, de igual manera la inclusión de compuesto aceptores o donadores de hidrógeno y modificaciones conformacionales con la finalidad de obtener una mejor interacción (Figura 1.10)

Enlaces aceptores de H

Enlaces donadores de H

Grupos aniónicos

Grupos catiónicos

Grupos hidrofóbicos

Grupos aromáticos

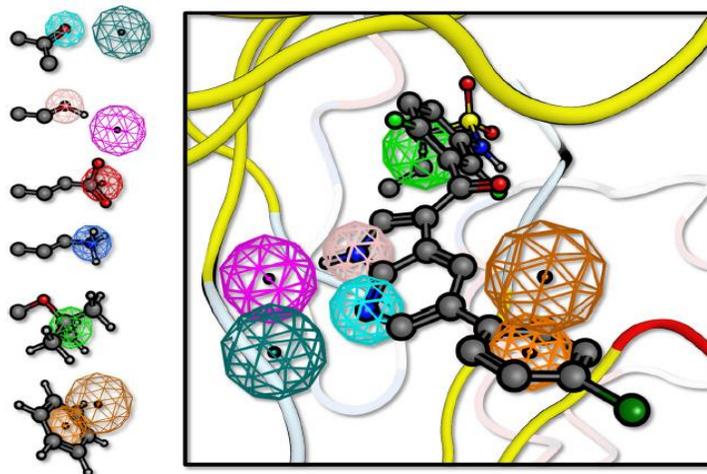


FIGURA 1. 10 Modificaciones empleadas en la variación de sustituyentes

- **Modificación de la extensión de la estructura** En este punto son consideradas la adición de grupos alquilo o arilo con la finalidad de encontrar nuevas interacciones con el receptor a partir de regiones lipofílicas, o realizar sustituciones con otros compuestos que formen enlaces de puente de hidrógeno o interacciones iónicas (Graham, 2001).
- **Modificación de la longitud de la cadena** realizando este tipo de modificaciones con la finalidad de encontrar la longitud apropiada para asegurar una correcta integración entre la molécula y la diana molecular.
- **Expansión o contracción de anillos aromáticos** el cual es empleado en la localización de átomos diferentes en posición, que afecta la interacción con el o los sitios activos del blanco molecular, empleando técnicas de alteración del tamaño del anillo aromáticos, así como la fusión de anillos con la finalidad de aumentar la interacciones con la diana molecular (Graham, 2001).

1.6. Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC)

Esta disciplina está integrada de múltiples áreas que se ven integradas con la finalidad de obtener un objetivo molecular nuevo o bien realizar modificaciones sobre un fármaco ya establecido, empleando distintos métodos computacionales con la finalidad mencionada, son utilizadas en una etapa primaria de investigación, para la comprensión de las interacciones de una estructura propuesta con la actividad biológica o farmacológica de los compuestos (Hung y Chen, 2014; Prieto y Medina, 2018; Brogi, 2019) (Figura 1.11).

Teniendo como objetivos:

- El diseño o identificación de nuevos compuestos
- Selección de los mejores candidatos
- Optimización de compuestos elegidos como líderes

Empleando las técnicas pertinentes dependiendo de la información disponible sobre el blanco biológico, tales como la información del sistema, experimental o en su defecto de los objetivos deseadas a partir de la molécula que se busca diseñar entre las cuales se encuentran:

- **Cribado virtual**, el cual se trata de un filtrado computacional en bases de datos con la finalidad de obtener la información requerida de aquellas que puedan ser las mejores candidatas para su evaluación experimental el cribado es realizado mediante la información disponible sobre el objetivo seleccionado, y a su vez estos pueden ser dividido en dos formas las cuales son el acoplamiento molecular que es sugerido en caso de que se conozca las características tales como la estructura tridimensional del receptor, en caso de desconocer esta característica para el receptor pero si de los ligandos es utilizada la variante de acoplamiento por similitud molecular , o en su defecto el conocer ambas se traduce en la búsqueda de la reducción de las propiedades fármaco cinéticas o descripción molecular (Saldívar *et al.*, 2017; Prieto y Medina, 2018)
- El **acoplamiento molecular automatizado** es una técnica de computacional que permite la simulación de las interacciones de un ligando con la molécula objetivo en un canal iónico o un receptor acoplado a proteína G, a partir de la búsqueda de la mejor posición u optima del ligando seleccionado, o en otra variable perteneciente al método involucrar dos macromoléculas como proteínas, teniendo en consideración la flexibilidad de las mismas, su número de conformaciones posibles con la finalidad de encontrar la mejor ubicación y por lo tanto un optima interacción entre ambas (Saldívar *et al.*, 2017).
- El **modelamiento del farmacóforo** está definida como el arreglo tridimensional de las características mínimas estéricas y configuracionales de las características mínimas que aseguren una interacción optima de con el blanco biológico o farmacológico, desencadenando así su respuesta o inhibición biológica (Hung y Chen, 2014; Prieto y Medina, 2018; Brogi, 2019).

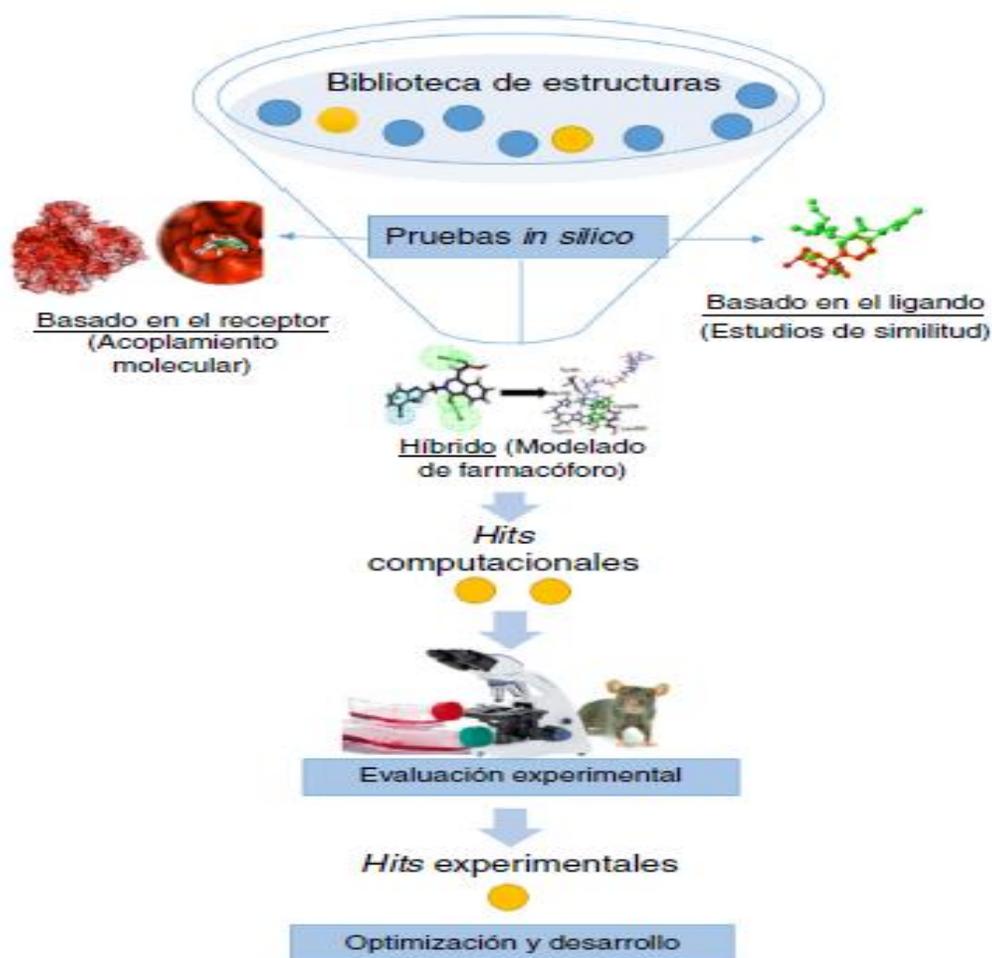


FIGURA 1. 11 Proceso del DIFAC (Saldívar *et al.*, 2017)

1.7. Uso de estrategias de DIFAC en el desarrollo de fármacos contra β A

A partir de la información obtenida en estudios sobre la amiloidogénesis se han logrado identificar algunos de los mecanismos que permiten la oligomerización del péptido, el cual forma puentes salinos entre los aminoácidos *Lys28* y *Asp23* o *Glu22* los cuales han sido encontrados como una posible causal de la oligomerización del β A, además con algunas regiones estructurales que son formadas durante la agregación, a través de esto se ha permitido el diseño de

moléculas que puedan atacar este mecanismo de la región N-terminal, el grupo hidrofóbico central entre algunos (Hernández *et al.*, 2017).

El DIFAC entre algunas cosas ha permitido:

- La selección de compuestos que presentan una mayor viabilidad para el uso contra este mecanismo de acuerdo a la información obtenida a partir de investigación en el área.
- La mejora de los compuestos orgánicos utilizados seleccionados como compuestos líderes o bien los que se encontraban ya de manera comercial para las distintas etapas de la EA.
- EL desarrollo de nuevas moléculas con una estructura óptima para el receptor mediante características farmacofóricas.

Sin embargo, en la actualidad la búsqueda de obtener nuevos compuestos con una posible antiagregación de β A, parte del diseño de una nueva molécula a partir de una base, la cual sufre modificaciones con la finalidad de adicionar posibles efectos benéficos a su estructura principal, mediante modificación de sus radicales sustituciones de grupos funcionales o adición de cadenas carbonadas (Hernández *et al.*, 2017). De igual forma se han estudiado ensamblajes moleculares del péptido para el estudio de tres principales características del β A los cuales son:

- El largo de la secuencia de β A
- El número de monómeros que conforman las placas
- La configuración tomada por las placas formadas

Con la finalidad de obtener el modelo molecular de la placa de β A y así facilitar las estrategias de diseño o estudio de las interacciones. Encontrando que el estudio de las mismas permite el desarrollo de fármacos que evite oligomerización (Hernández *et al.*, 2017).

1.7.1. Evaluación de ligandos mediante técnicas de acoplamiento molecular contra la inhibición de β A

Por su parte se han centrado los esfuerzos de la investigación en el desarrollo de moléculas a partir de ligandos, un estudio realizado por Bansode *et al.*, (2014), empleando herramientas de cribado virtual de 140 compuestos aprobados por la FDA utilizados para tratar patologías del sistema nervioso, empleando herramientas de acoplamiento molecular obteniendo que los compuestos con grupos tricíclicos de antidepresivos contra el β A, permitió seleccionar 5 compuestos para realizar estudios *in vitro*, de los cuales la protriptilina mostró una actividad multifuncional contra objetivos proteicos.

Das *et al.*, (2016) evaluó polifenoles como leutinol, miricetina y honokiol para analizar su efecto contra la agregación y toxicidad neuronal. A su vez Singh *et al.*, (2013) la evaluación *in silico* de derivados de curcumina como es el caso de la ciclocurcumina, allilcurcumina para medir la afinidad de los compuestos identificando sus interacciones hidrofóbicas y sus sitios de enlace de hidrógeno las cuales son de suma importancia para la unión a los aminoácidos *Lys16* y *Phe20*. De igual forma Hernández *et al.*, (2017), ha planteado que el uso de aminas terciarias ha presentado excelentes resultados en un anillo de cinco carbonos ha permitido establecer interacciones electrostáticas los aminoácidos *Glu22* y *Asp23*, de igual forma la presencia de un anillo aromático mejora las interacciones π - π con los aminoácidos *Phe19* y *20*, realizando sustituciones en el anillo aromático con grupos alifáticos establece interacciones importante con la cadena secundaria de metileno del aminoácido *Lys16* han presentado resultados prometedores, además de la unión con compuestos conocidos como la nicotina, melatonina y tioflavina S, los cuales presentan una carga positiva, así como compuestos contra AChE como los mencionados con anterioridad mostraron actividad contra la agregación de β A.

Partiendo de este último punto se realizó el diseño de moléculas mediante herramientas de diseño *in silico*, por un grupo de investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional (Cuerpo Académico del Área de Química Medicinal de la Maestría en ciencias de la Salud), los cuales se han enfocado en el diseño de moléculas que contengan el farmacóforo para inhibir la oligomerización del βA_{1-42} , en una conformación de α -hélice para evitar la formación de oligómeros tóxicos encontrando la estructura idónea para obtener la mayor cantidad y las mejores interacciones con el péptido βA_{1-42} encontrando que aquellos que tengan una distancia entre la interacción del amina terciaria y el anillo aromático de una distancia de 4.3-5 Å presentan una mayor afinidad por la formación α del βA (Hernández *et al.*, 2015) (Figura 1.12).

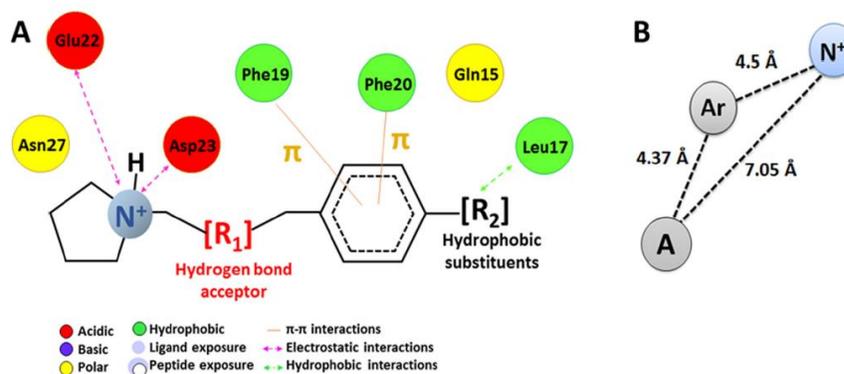
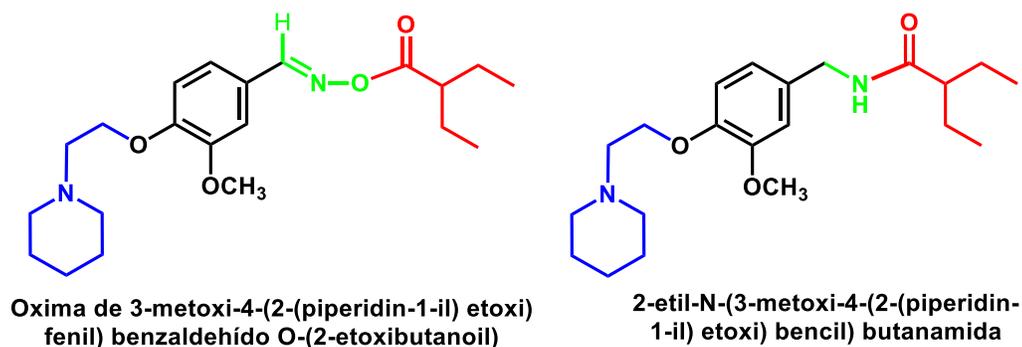


FIGURA 1.12 Estructura propuesta para asegurar las mejores interacciones con βA (Hernández *et al.*, 2015)

A partir de la premisa precedente, se propone en el presente trabajo, la síntesis de compuestos que cumplan las características estructurales de las moléculas de los farmacóforos mencionadas. Los compuestos objetivo, contendrán una cadena de β -piperidin etilo en posición *para* en un anillo bencénico respecto de un grupo oximino o amino, que a su vez contiene un residuo acilo de ácido valproico, conduciendo a los compuestos de la Figura 1.13.

FIGURA 1.13 Objetivos moleculares propuestos contra β A

1.8. Análisis retrosintético y propuesta de síntesis de los objetivos moleculares

Para la síntesis de los objetivos moleculares fue planteada una estrategia conocida como análisis retrosintético, que consiste en que, a partir del análisis de la estructura molecular, se considera la ruptura de enlaces clave en dicha estructura, que permita visualizar la última reacción considerada en su síntesis, y así se procede con el resto de los enlaces clave de los intermediarios generados hasta diseñar una ruta de síntesis, basada en la formación de enlaces C-C para la construcción del “esqueleto carbonado”. Asimismo, de manera alternativa y para construir la estructura carbonada del objetivo molecular, deben considerarse las reacciones, tanto de formación de enlaces C-C, como las de interconversión de grupos funcionales en el estado de oxidación conveniente en intermediarios y materias primas, para plantear las reacciones precedentes paso a paso, con la finalidad de establecer los intermediarios estructurales apropiados, hasta establecer la secuencia de pasos experimentales de síntesis a partir de una materia prima básica o sintón (Valerio 1985; Šunjić *et al.*, 2016).

En la Figura 1.14, se describe el análisis retrosintético para los dos objetivos moleculares propuestos, la cual conduce a intermediarios y moléculas de partida comunes.

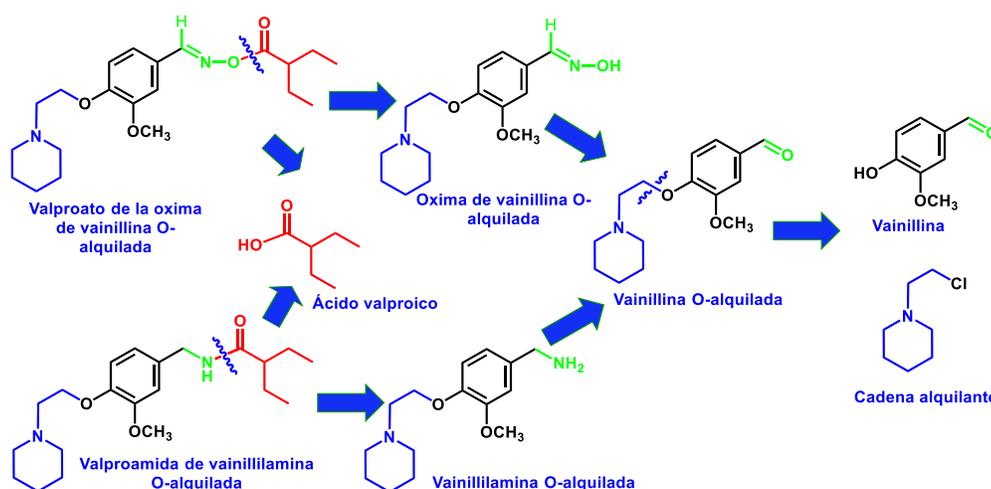


FIGURA 1.14 Análisis retrosintético de valproato de oxima de vainillina O-alquilada y valproamida de vainillilamina O-alquilada

En cuanto a la síntesis de dichos objetivos moleculares, se consideran las siguientes etapas clave (Figura 1.14):

A) Valproato de oxima O-alquilada:

- Obtención de vainillina O-alquilada
- Conversión de la vainillina O-alquilada a oxima de vainillina O-alquilada mediante una reacción de oximación clásica.
- Acilación química o enzimática de la oxima O-alquilada con un derivado del ácido valproico (el cloruro para la reacción química y el éster metílico para una posible reacción biocatalizada).

B) Valproamida de vainillilamina O-alkilada:

Se utilizaron los primeros dos pasos de la síntesis de Valproato de oxima O-alkilada, incorporando las siguientes etapas:

- Reducción química de la oxima de vainillina O-alkilada a vainillilamina O-alkilada.
- Aminólisis química o enzimática de un derivado del ácido valproico (el cloruro para la reacción química y el éster metílico para una posible reacción biocatalizada) con vainillilamina O-alkilada.

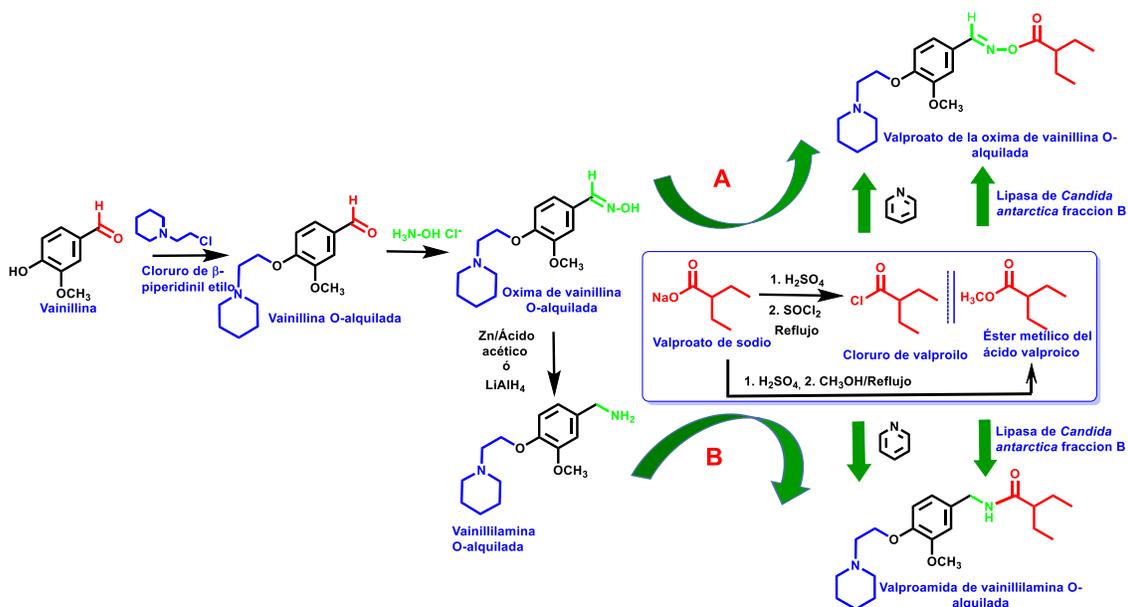


FIGURA 1.15 Ruta de síntesis propuesta para la obtención de: A) Oxima de vainillina O-alkilada; B) Valproamida de vainillilamina O-alkilada.

1.9. Las oximas

Las oximas son compuestos derivados de la hidroxilamina de gran importancia, que se obtienen mediante las reacciones de la misma con aldehídos o cetonas. Contienen un radical hidroxilo que les confiere la propiedad nucleófila, similar a la de los alcoholes, además del centro electrofílico reactivo con nucleófilos. En cuanto a su nomenclatura, las aldoximas son obtenidas a partir de un aldehído y las cetoximas de una cetona respectivamente y presentan todas las características de los compuestos hidroxiamínicos.

Las oximas intervienen en una gran gama de reacciones que pueden ser fácilmente transformadas en otros grupos funcionales tales como: grupos carbonilo (por lo que pueden considerarse grupos protectores de aldehídos o cetonas), amino, nitrilo, nitro y ciano cada uno de los cuales presentan una vasta aplicación en la síntesis química de los compuestos de interés, y que exhiben una amplia actividad biológica (Figura 1.16), por lo que es muy común que presenten grupos farmacóforos con propiedades muy diversas como: vaso dilatadoras, sedantes, analgésicas, tranquilizantes, antiinflamatorias, antimicrobianas entre otras; además de ser empleadas en la industria agrícola y de alimentos (Shih *et al.*, 2002; Jindal *et al.*, 2003; Lukevics *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Hania *et al.*, 2009). La importancia de las oximas, por cuanto a la versatilidad en los métodos para su obtención (se pueden preparar mediante métodos de la síntesis tradicional y química verde), como en sus propiedades para ser transformadas en otros grupos funcionales, queda esquematizada de manera general en la Figura 1.16.

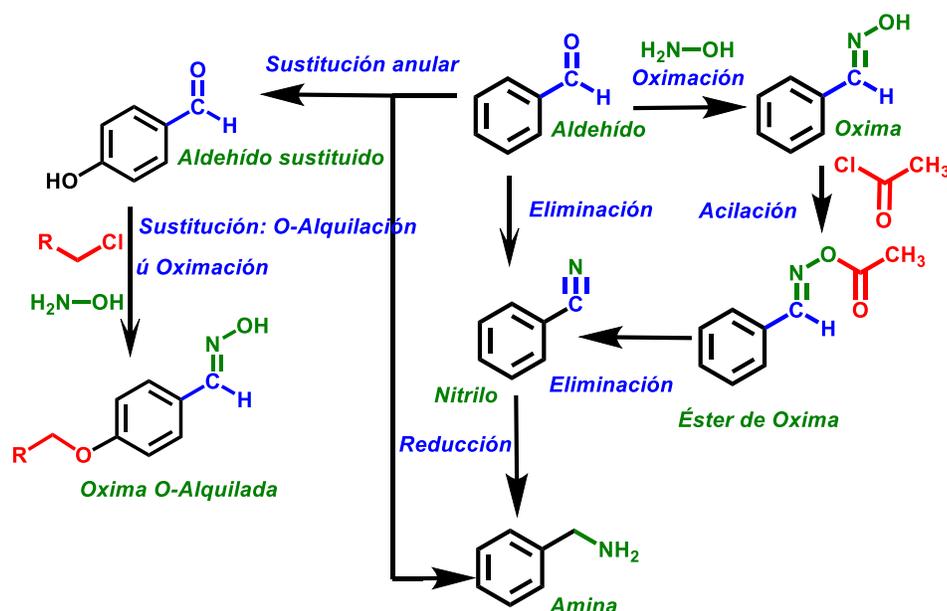


FIGURA 1. 16 Reacciones de interconversión de grupos funcionales para la síntesis de los objetivos moleculares

1.10. Reacciones de O-alquilación de vainillina

El grupo hidroxilo fenólico de la vainillina se ha alquilado con diferentes agentes alquilantes. Con cloruro de epiclorhidrina como en el caso de Coumar *et al.*, (2008) (Figura 1.17-A), la O-alquilación conduce a un intermediario, que posteriormente se utiliza en la obtención del farmacóforo de fenilpropanolamina utilizado para la hipertensión a su vez Sharma *et al.*, (2014), sometieron a la vainillina a una O-alquilación con bromuro de alilo (Figura 1.17-B), utilizado como un intermediario para la síntesis de un compuesto que es empleado control de la malaria. En ambos casos se utiliza K_2CO_3 en acetona anhidra como disolvente para neutralizar la acidez generada en la reacción de alquilación.

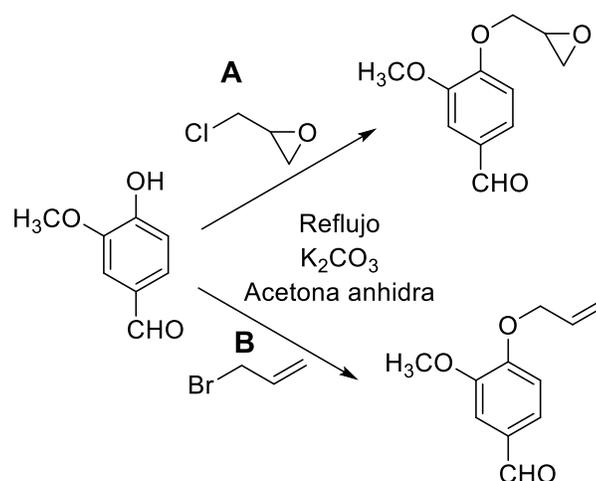


FIGURA 1. 17 O-alkilación de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído con distintos halogenuros de alquilo

En una reacción de alquilación similar Domínguez y Caritza (2006), realizaron la O-alkilación de hidroxibenzoato de metilo con monohlorhidrato de 1-(2-cloroetil) piperidina (Figura 1.18), un agente alquilante que contiene una amina terciaria y que fue propuesta como uno de los rasgos estructurales clave de las moléculas propuestas como blancos moleculares del trabajo. La alquilación se realizó en condiciones muy similares a las del trabajo precedente.

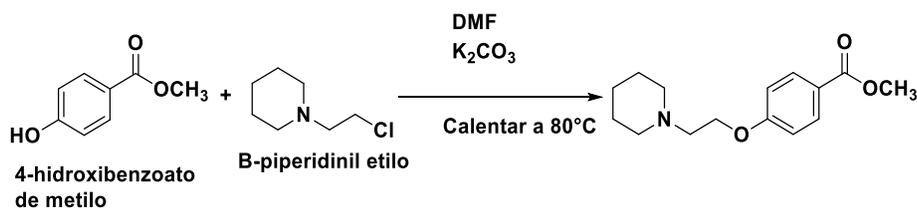


FIGURA 1. 18 O-alkilación de 4-hidroxibenzoato de metilo

1.11. Conversión de aldehídos aromáticos en oximas

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de oximas se realiza mediante la reacción de un aldehído o cetona con hidroxilamina a través de dos métodos generales: a) Método Clásico: mediante el cual se utilizan aldehídos o cetonas aromáticas e hidroxilamina como reactivo y ácido sulfúrico como catalizador (o el clorhidrato de hidroxilamina directamente), en agua o mezclas etanol-agua como disolventes más comunes (Figura 1.19).

Asimismo, se pueden utilizar otros disolventes próticos como metanol, isopropanol o disolventes no próticos como acetona, tetrahidrofurano, dioxano, acetonitrilo y dimetilformamida entre otros (Mikhaleva *et al.*, 2006). La función oxima puede ser introducida prácticamente en cualquier molécula orgánica, cualquiera que sea su estructura carbonada y su funcionalidad.

La mayoría de las oximas son anfotéricas, debido a la débil acidez del grupo hidroxilo y a la débil basicidad del nitrógeno; se disuelven en solución alcalina formando la sal sódica y se pueden redisolver mediante la adición de un ácido como el acético. La hidroxilamina como base, formará sales con los ácidos, estado en el que es más fácil de conservar y manejar; comúnmente la hidroxilamina se maneja en forma de clorhidrato, liberándose cuando se necesita, mediante la adición de una base, como los hidróxidos y (bi) carbonatos alcalinos, de sodio o de potasio, acetato de sodio, piridina, trietilamina, etc.

La reacción comienza con un ataque nucleofílico del Nitrógeno amínico de la hidroxilamina al carbono carbonílico del aldehído o la cetona; favorecido por una baja acidez, para protonar el oxígeno carbonílico. Sin embargo, la hidroxilamina también puede protonarse para formar el ion $H_3N^+OHCl^-$, que carece de electrones no compartidos y en consecuencia no reaccionará. La disolución debe ser lo suficientemente ácida como para que se protone el compuesto carbonílico, pero no tan ácida para que permita tener al grupo amino parcialmente libre para producir la adición nucleofílica al carbono carbonilo aldehídico.

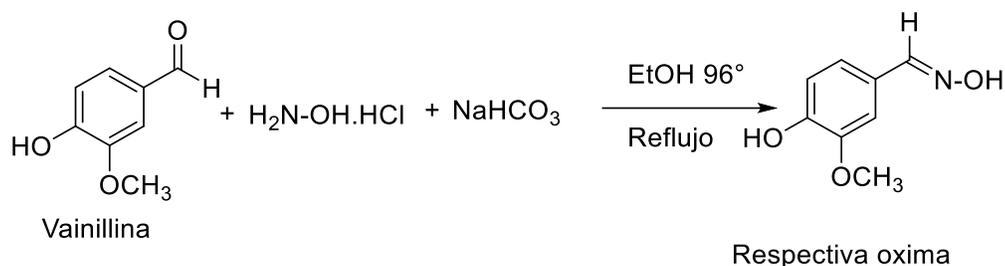


FIGURA 1. 19 Reacción de síntesis de oxima de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído por método clásico

Por otro lado, la mezcla de reacción comprende como disolvente, una mezcla de agua (para disolver el reactivo inorgánico) y etanol para disolver el compuesto carbonílico en proporciones variadas. El enfriamiento de la mezcla conduce a la cristalización de la oxima en un gran número de casos. En el caso de compuestos con funcionalidades sensibles a la humedad y disolventes próticos se emplean piridina y éteres. La piridina asegura la basicidad para liberar la hidroxilamina reactiva y asegurar que forme la oxima con el compuesto carbonílico (Dikusar *et al.*, 2008; Zhukovskaya *et al.*, 2008; Dikusar *et al.*, 2009). De igual forma Ahluwalia *et al.*, (2012) realizaron la síntesis de oximas mediante métodos similares empleando metanol y carbonato de potasio anhidro.

En el contexto de la química verde, se considera la síntesis mecanoquímica de oximas a partir de aldehídos e hidroxilamina, utilizando diversos materiales de soporte básicos, como NaHCO_3 , CaO , MgCO_3 entre otros (Figura 1.20) (Anastas y Warner, 1998; Zeynizadeh y Karimkoshteh, 2013; Albini y Protti, 2016; Zhao y Rocha 2016). Las reacciones orgánicas mecanoquímicas, libres de disolventes, exhiben ventajas con respecto a sus contrapartes en fase líquida, en términos de más altos rendimientos de producto, mejor selectividad, tiempos de reacción más cortos y un procedimiento más simple para la purificación del producto, como consecuencia de eliminar el disolvente para la reacción.

Asimismo, se usan agentes deshidratantes como el $MgSO_4 \cdot 2H_2O$. Sin duda, la característica más importante de esta nueva metodología de trabajo, está en el “descubrimiento” de reacciones químicas, sin la mediación de disolventes. Estos nuevos procesos tendrán su aplicación en la Industria química, la farmacéutica y en las ciencias de la vida en general (Melgar *et al.*, 2010; Aquino, 2017; Arthur *et al.*, 2018). De igual forma, Zeynizadeh y Karimkoshteh (2013), efectuaron la síntesis de oximas mediante molienda mecánica utilizando distintos aldehídos con hidroxilamina utilizando óxido de hierro como catalizador, análogamente el uso de ultrasonido para la obtención de las oximas obteniendo rendimientos altos con tiempos de reacción cortos.

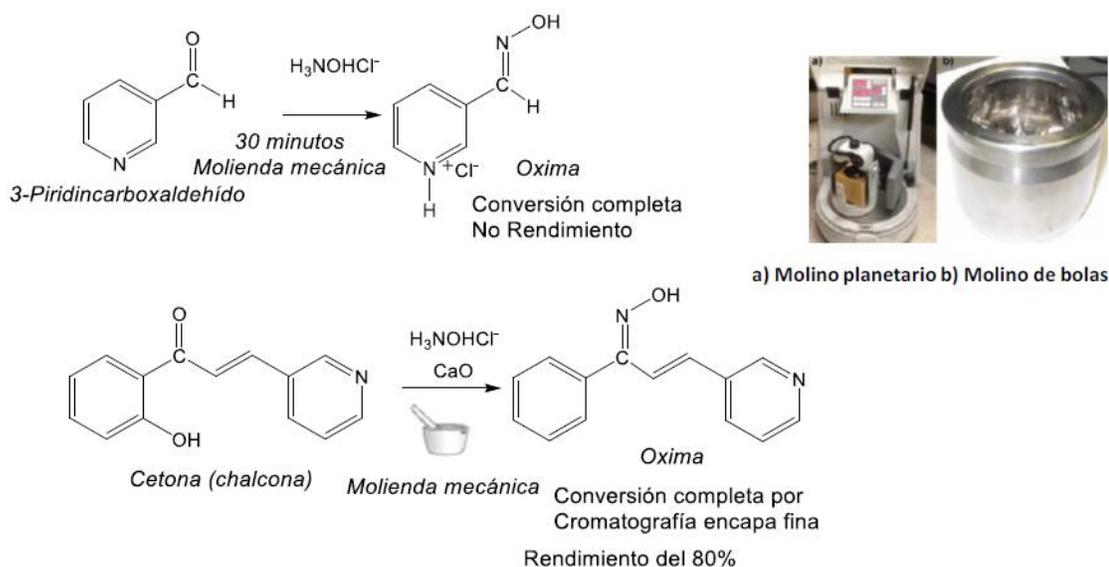


FIGURA 1. 20 Síntesis mecanoquímica de la oximas de aldehídos aromáticos

Li *et al.*, (2016) utilizaron este método para la síntesis de oximas con etanol y clorhidrato de hidroxilamina en 15 minutos con rendimientos del 90 a 97% a 25-35 °C. Además, el empleo de microondas proporciona ventajas similares a la técnica anterior, debido a que no se requieren métodos de purificación extensa de los productos de reacción, convirtiéndose en procesos limpios y seguros a diferencias de su contraparte tradicional. Kamakshi y Reddy (2005), realizaron las síntesis de oximas mediante esta técnica empleando distintos aldehídos con hidroxilamina en un tiempo de 1 a 2 minutos obteniendo altos rendimientos (90 a 93%).

1.12. Reducción química de oximas a aminas

Las oximas son compuestos anfóteros debido a que forman sales con ácidos minerales concentrados y como ácidos muy débiles se disuelven en álcalis acuosos precipitándolas el dióxido de carbono.

La reducción de una oxima a una amina primaria es considerada una reacción química con aplicaciones múltiples, y esta a su vez puede llevarse a cabo mediante el empleo de algunos metales como Zinc, como el caso de Zangol *et al.*, (2010) el cual llevo a cabo la síntesis de piridoxamina y compuestos análogos derivados de la misma mediante Zinc con ácido acético glacial (Figura 1.21).

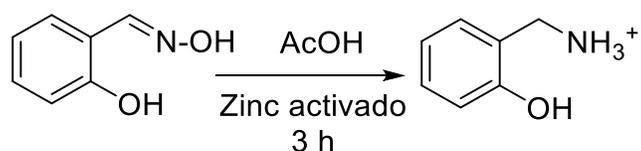


FIGURA 1. 21 Reducción química oxima de piridoxina a piridoxiamina

Conway (2008), reporta la reducción química de 3-hidroxi-4-metoxi benzonitrilo en vainillilamina mediante LiAlH_4 a vainillilamina, seguida de la aminólisis química del cloruro de nanoilo y 4-DMAP como catalizador (Figura 1.22).

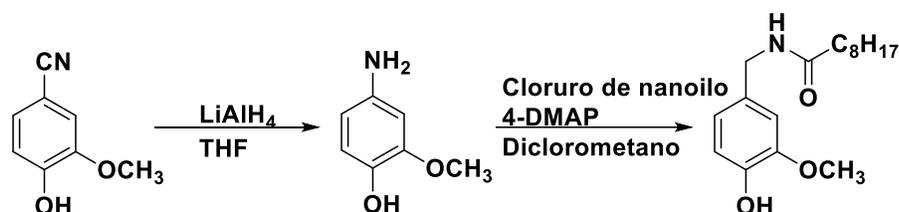


FIGURA 1. 22 Obtención de vainillilamina mediante reducción química del nitrilo de vainillina, seguida de la acilación con cloruro de ácido

Li reportó (2014) la reducción de la oxima de la Figura 1.23 con NaBH_4/I_2 disueltos en THF, reduciendo tanto la oxima en amina, como el grupo éster en alcohol.

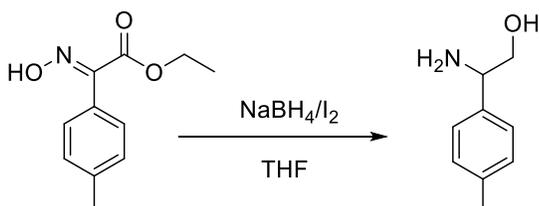


FIGURA 1. 23 Síntesis química con NaBH_4/I_2 de 2-amino-2-(p-tolil) etanol

Otra alternativa empleada en la reducción de la oxima de vainillina en vainillilamina es uso de la hidrogenación catalítica una reacción limpia y producida en un alto rendimiento, como lo reportaron Gannett *et al.*, (1988) (Figura 1.24).



FIGURA 1. 24 Síntesis de vainillilamina mediante hidrogenación catalítica

1.13. Oximólisis-acilación químico-enzimática

Las lipasas pueden catalizar diferentes reacciones de acilación de oximas, en similitud al proceso de aminólisis, de algunos ácidos y sus derivados, entre los cuales se encuentran el uso de donadores de acilo como es el caso de los ésteres de vinilo. Arthur en el (2012), realizó la síntesis de ésteres de oxima de aldehídos aromáticos empleando 5 lipasas diferentes de las cuales la que presentó los mejores rendimientos fue la lipasa de *Cándida antártica* fracción-B (CAL-B). En este caso, se utilizó acetato de vinilo como agente acetilante y acetato de etilo como disolvente. Por su parte Aquino en el (2017), realizó la síntesis nitrilos aromáticos, a partir de las oximas respectivas, mediante el protocolo de acilación-eliminación catalizada por CAL-B, bajo condiciones similares a las de la acilación para la obtención de los ésteres de oxima. La diferencia entre la obtención de ésteres y nitrilo radica en la temperatura: los ésteres se favorecen a 40°C, mientras que la reacción de eliminación que conduce a la formación de los nitrilos se favorece a 80°C (Figura 1.25).

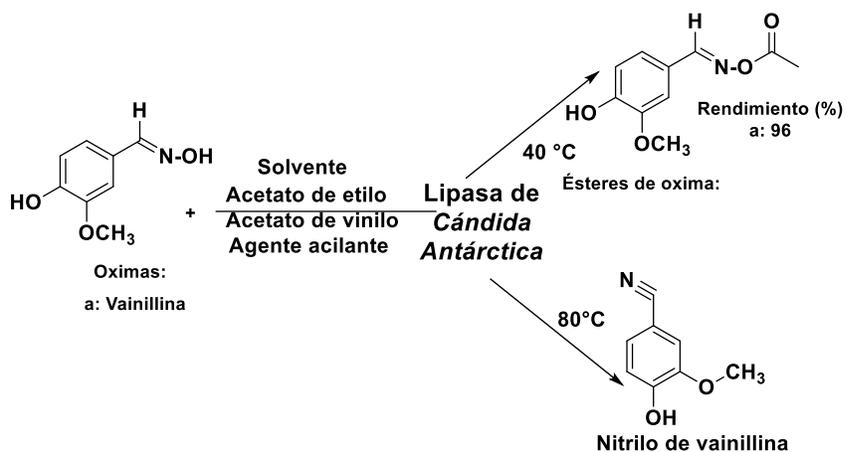


FIGURA 1. 25 Acilación enzimática de oxima de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído para obtención de nitrilos y ésteres de oxima

Asimismo, Kobata *et al.*, (2013) describen la obtención de análogos de capsaicina con una menor pungencia, empleando 17 enzimas comerciales, de las cuales CAL-B catalizó eficientemente la transesterificación de nonanoato de metilo y alcohol vainillílico, a 25°C, con un rendimiento del 86% en 20 h, en dioxano o acetona como disolvente (Figura 1.26). Otros homólogos con cadenas de acilo entre C6-C18, se obtuvieron en rendimientos del 64-86%.

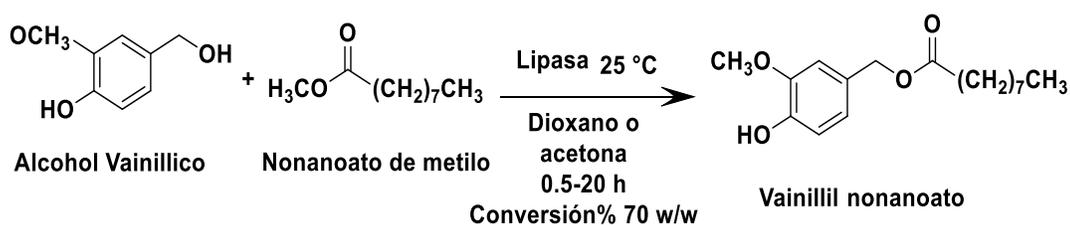


FIGURA 1. 26 Obtención de vainillil nonanoato mediante acilación enzimática

Sammaiah *et al.*, (2014), realizaron la acilación de la oxima de apocinina, con distintos agentes acilantes, los cloruros de ácidos como el ácido decanoico, octanoico, hexanoico, butírico, procediendo la síntesis de los respectivos ésteres y su posterior evaluación antimicrobiana y antioxidante. Los rendimientos de los ésteres de oxima fueron del 78-83% de rendimiento (Figura 1.27).

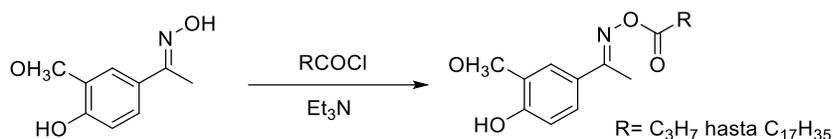


FIGURA 1. 27 Síntesis del éster de oxima de apocinina con distintos cloruros de ácidos grasos

1.14. Aminólisis químico-enzimática

El proceso biocatalítico de aminólisis, considerado en este trabajo, tiene como analogía el trabajo de Reyes *et al.*, (2002), quienes obtuvieron vainilliloleamida, mediante la reacción de aminólisis empleando distintas lipasas comerciales, entre las que CAL-B, mostró los mejores rendimientos (Figura 1.28). Por otro lado, la síntesis de N-esterarilvainillilamida (Figura 1.28), empleando ácido esteárico y esterato de etilo como agentes acilantes y DIPEA como disolvente, se probó con 5 tipos diferentes de enzimas, mostrando que la enzima de *Thermomyces lanuginosus* convirtió en su totalidad el compuesto mientras que CAL-B mostraba un rendimiento del 78%. Un ejemplo análogo, reportado por Liu (2009), describe la síntesis de N-vanillilnonanamida a partir de vainillilamina y anhídrido nonanoico, mediante catálisis enzimática en CO₂ supercrítico a 170 bar y 50 °C durante 23 horas.

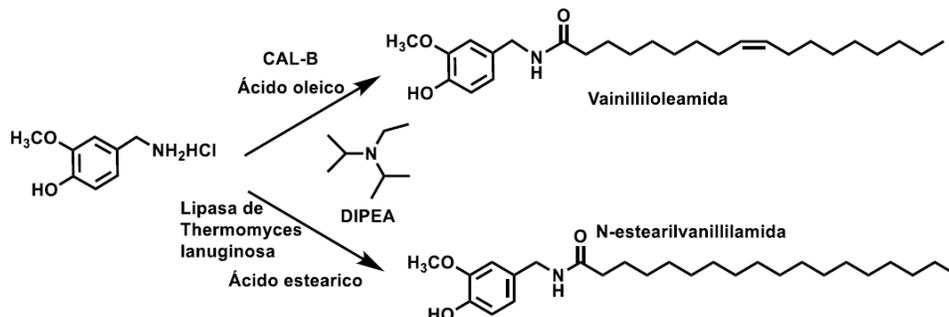


FIGURA 1. 28 Síntesis de amidas de ácidos grasos catalizada por lipasas empleando vainillilamina

1.15. Elucidación de espectrometría de masas mediante ionización por electropray

La espectrometría de masas mediante el tipo electropray o electrosprayado presenta un fundamento basado en el modelo presentado en la década de los 60 's por Dole, el cual posteriormente fue modificado por Fenn *et al.*, (1989), la cual presenta condiciones suaves de ionización por lo cual de igual forma es conocido como un método de ionización a temperatura ambiente, el cual ha presentado un amplio uso en el análisis de biomoléculas, así como una amplia ventaja en aplicaciones de ciencias bioquímicas y biomédicas, de igual forma encontrando múltiples aplicaciones en la elucidación estructural de moléculas pequeñas.

Por su parte en el proceso general de este tipo de ionización (Figura 1.29) comienza cuando la solución con el analito a analizar disuelta en una solución agua/solvente es pasada por un capilar al que se le aplica un potencial eléctrico que oscila entre las 3 a 4 kV, la cual debe proveer conductividad eléctrica mediante el adición de analitos iónicos o buffers, o en su defecto por algún tipo de disociación presentado por el solvente, a su vez el analito pasa por el capilar, aumentando su carga y forma un cono de Taylor con la finalidad de aumentar su carga hasta alcanzar su punto crítico, una vez alcanzado es liberado del capilar formando una línea fina y una posterior eclosión de la muestra formado gotas altamente cargadas

las cuales buscan adherirse a una superficie cargada de manera contraria repeliendo a las que no lo estén, finalmente el proceso termina con moléculas cargadas que pueden arrastrar moléculas de solvente por lo cual el proceso de desolvatación se repite hasta obtener las gotas que presentan la molécula protonada se incluyen en la fase gaseosa y pueden ser dirigidas al espectrómetro de masas mediante campos eléctricos, para facilitar en proceso de evaporación es usado de manera típica una corriente de gas inerte como nitrógeno y calor, presenta condiciones acidas que permite la protonación de los sitios básicos del analito, además de una alta eficiencia de ionización lo cual se traduce en alta sensibilidad de los mismos.

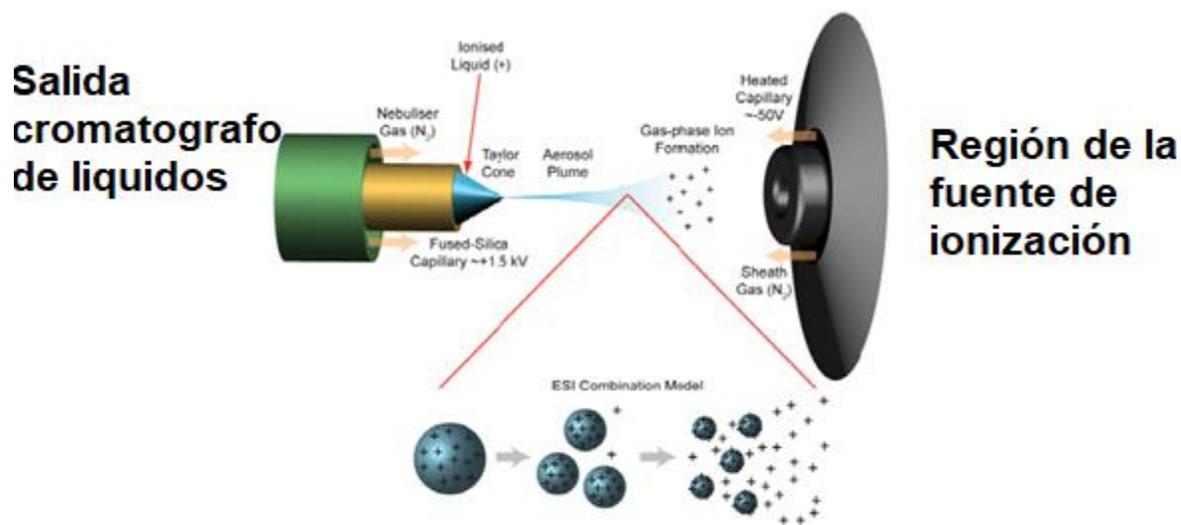


FIGURA 1. 29 Representación de la ionización mediante espectrometría ESI-MS/MS

Debido a la gran utilidad de análisis presentada por esta técnica, a partir de ella es posible conocer con exactitud el peso molecular de compuesto orgánicos, lo cual facilita en gran medida la elucidación de compuestos mediante la confirmación del peso molecular o en su defecto es útil como una herramienta para la proporción de estructuras mediante la información obtenida, adicionalmente permite el estudio de isotopos de un compuesto determinado mediante el adición de derivados del ion

molecular como lo pueden ser $M+Na$ o $M+K$, además de presentar una abundancia de iones de carga múltiples regidos mediante $[M+nH]^{n+}$ o $[M-nH]^{n-1}$ donde n puede presentar un valor de hasta 100 dependiendo de la molécula, por su parte en el caso de la detección del ion molecular es necesario considerar los iones vecinos los cuales brindan un patrón de fragmentación con señales de diferente carga, Debido a lo antes mencionada fue seleccionado como método de masas para la elucidación de las estructuras sintetizadas.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar, purificar, caracterizar y evaluar *in vitro* compuestos de derivados del ácido valproico de vainillina y oxima de vainillinas O-alquilada, diseñadas *in silico*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar una síntesis químico-enzimática de amidas de vainillina O-alquilada y ácido valproico.
2. Desarrollar una síntesis químico-enzimática de ésteres de oxima de vainillina O-alquilada y ácido valproico.
3. Purificar y elucidar las estructuras de los productos de las síntesis anteriores, mediante espectrofotometría infrarroja, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .
4. Evaluar los compuestos obtenidos como inhibidores de la agregación del βA_{1-42} mediante fluorescencia con tioflavina T, electroforesis en gel de poliacrilamida y microscopia de fuerza atómica.

3. MATERIALES Y METODOS

Materiales

Sustratos, disolventes y reactivos de uso general: fueron de grado reactivo (99% de pureza o más), de las compañías Sigma-Aldrich, Baker o Merck.

Enzimas: Lipasa de *Cándida antártica* fracción B (EC 3.1.1.3). Novozyme 435, inmovilizada en resina macroporosa, diámetro 0.3-0.9 mm, 7000 PIU/g.

Métodos

Seguimiento de las reacciones: Se utilizaron cromatofolios Merck de gel de sílice 60 F254 (espesor 0.25 mm) que incorporan revelador para luz ultravioleta. Para el revelado de las placas se utilizó luz U.V. A una longitud de onda de 254 nm.

Determinación del punto de fusión: La determinación del punto de fusión de los compuestos sólidos, se empleó un equipo Electrothermal 9100.

Espectrofotometría Infrarroja: Se determinaron con un equipo Thermo scientific, modelo Nicolet iS50, con transformada de Fourier, empleando como disolvente acetona.

Espectrofotometría de RMN de hidrógeno y carbono (RMN de ^1H y ^{13}C): Se realizaron en un equipo Varian mercury 300 (^1H 300.08, ^{13}C 75.46 MHz). Se analizaron 10 mg de los productos obtenidos, los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm respecto al TMS, usado como la referencia interna y como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y metanol deuterado (CH_3OD).

Las abreviaturas para la descripción de los espectros son las siguientes: s= singulete, d= doblete t=triplete y m= multiplete.

Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas: un equipo de cromatografía de líquidos de la marca Agilent 6546 LC/ Q-TOF, alta resolución, acoplado con una fuente de ionización Agilent jet stream dual.

Análisis de fluorescencia: Espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS- 45.

Microscopia de fuerza atómica: Para observar la morfología de los compuestos a inhibir fue empleado un equipo bioscope catalyst bruker.

3.1. Evaluación *in silico* de los compuestos

Para la evaluación de los compuestos mediante técnicas bioinformáticas fueron seleccionadas para este estudio la estructura tridimensional de tres conformaciones del βA_{1-42} en su forma monomérica obtenidos de Protein Data Bank (PDB). βA_{1-42} en una conformación de α -hélice PDB: 1Z0Q, βA_{1-42} en conformación de hoja- β PDB: 2BEG, y PDB: 1ZOQ identificado como Random Coil (RC) el cual es transición entre los mismos obtenida y reportada previamente por el grupo de trabajo de (Hernández *et al.*, 2015) mediante estudios de dinámica molecular del confórmero.

Posterior a la selección se procedió a retirar los hidrógenos no polares, moléculas de agua u otros ligandos de las moléculas y se añadieron las cargas de Kollman usando el software AutoDock 4.4. Los ligandos fueron dibujados usando ChemBioDraw Ultra 13.0, su geometría fue optimizada a nivel de mecánica molecular usando Hyperchem 6.0. Posteriormente se empleó AutoDocktools 1.5.6. Para preparar los estudios de docking molecular con una rejilla de interacción “grid box” con dimensiones de 60x 60 x 60 Å con un espaciado < 0.375 Å situando el centro de la caja en el sitio catalítico propuesto de cada proteína; Asp23 y Glu22.

Los estudios de docking molecular fueron preparados usando un algoritmo Genético Lamarckiano (AGL) con los siguiente parámetros: 100 poses del AGL, 100 de tamaño de población, 10 000 000 máximo número de evaluaciones, 100 generaciones para la peor pose individual y el resto de los valores sometidos a sus valores estándar. Los resultados se analizaron con AutoDockTools 1.5.6 y se seleccionó la conformación con mejor valor de la relación entre su energía libre y su orden de aparición dentro del cluster más poblado.

El análisis de unión e imágenes fueron obtenidas usando PyMOL 1.3 y se creó una lista de interacción de los aminoácidos de las proteína en un radio de 5 Angstroms, para posteriormente crear un patrón de interacción de cada ligando usando Discovery Studio Client 2.5 para conocer el tipo de interacciones de las cuales es dependiente su valor de energía libre obtenido.

3.2. Síntesis de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído (aldehído de vainillina O-alquilado)

En un matraz de dos bocas se pesaron 10 mmoles (1.5215 g) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido (vainillina), 15 mmoles (2.7615 g) de clorhidrato de 1-(2-cloroetil) piperidina y 20 mmoles (2.7642g) de K₂CO₃ anhidro (Carbonato de potasio). A esta mezcla se adicionaron 200 mL de acetona anhidra, para posteriormente calentarse a reflujo duran 8 horas aproximadamente. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF), una vez concluida la reacción se procedió a filtrar la mezcla mediante papel filtro para retirar los sólidos no disueltos en la muestra. El filtrado se concentró en rotavapor obteniendo un aceite color marrón con un peso de 3.2 g. Posteriormente, se procedió con la purificación del compuesto la cual fue llevada a cabo mediante cromatografía en columna usando silica gel con una fase móvil compuesta de una concentración 80/20 acetato de etilo/metanol, la cantidad de silica empleada fueron 50 g y 300 mL fase móvil recuperando 70 fracciones de 2.5 mL C/U dentro de las cuales el compuesto se obtuvo en entre la fracción 25 a 40 las fracciones que contenían el compuesto de interés fueron juntadas y se procedió con la eliminación del solvente mediante rotavapor, a su vez se obtuvo un compuesto aceitoso de color marrón, que se sometió a un proceso de secado al alto vacío (unos 50 mmHg o menos), hasta la obtención de un peso constante en el residuo de acuerdo a lo propuesto por Sharma *et al.*, (2014).

3.3. Síntesis de oxima de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído (Oxima de vainillina O-alkilada)

Para la síntesis de la oxima de vainillina alquilada se empleó una metodología similar a la reportada por Dikusar *et al.*, (2007). Modificando las proporciones, siendo las utilizadas las cantidades siguientes, para 10 mmoles (2.7835 g) de aldehído alquilado, fueron empleados 16 mmoles de clorhidrato de hidroxilamina y 17 mmoles de bicarbonato de sodio, los cuales fueron colocados en un matraz bola que contenía 10ml de etanol con agitación constante, posteriormente se llevó a cabo el calentamiento de la mezcla de reacción a reflujo, durante un tiempo estimado de 4 horas (hasta la desaparición de los sustratos). El seguimiento de la reacción se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) Cuando la reacción se concluyó, la mezcla dejando enfriar a temperatura ambiente y se le adicionó 100 mL de agua destilada. La mezcla resultante, se dejó reposar toda la noche obteniéndose un precipitado, que se recuperó mediante filtración al vacío y fue secado hasta peso constante, produjo un polvo blanco correspondiente a 1.9 g de oxima, la cual fue purificada mediante cromatografía en columna empleando 150 g de silica gel y 400 ml de fase móvil similar a la del compuesto anterior obteniendo en este caso 80 fracciones de 3 mL C/U encontrándose entre las fracciones 35 a 70 las el compuesto de interés una vez recuperadas todas las fracciones se procedió con la obtención del compuesto, eliminando el solvente de manera primaria, seguido de un secado hasta peso constante obteniendo un sólido cristalino.

3.4.Reducción química de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído mediante NaBH₄/I₂

Para el caso de la reducción química de la oxima empleando como agente reductor el NaBH₄ y como catalizador el I₂ de manera similar a lo presentado por Li *et al.*, (2014). Fueron empleados 2 mmoles de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il)etoxi) benzaldehído (Oxima de vainillina O-alkilada), disueltos en 3.3 mL de THF anhidro, en cual de igual forma se adicionaron 6 mmoles de NaBH₄ hasta su completa disolución; posteriormente la mezcla fue llevada a una temperatura de 0 a 5 °C y se adicionó gota a gota, una mezcla de 3 mmoles de iodo disueltos en 3 mL de THF anhidro. Al término de la adición, la mezcla fue llevada a reflujo durante un tiempo aproximado de 5 horas. Al final de este tiempo, el exceso del reductor fue degradado con 20 mL de metanol enfriado a 0°C, y posteriormente el disolvente fue removido con rotavapor hasta la obtención de un sólido de color café-rojizo. Posteriormente, al producto anterior se adicionó una solución acuosa de 20 mL de NaOH al 5% y nuevamente, la mezcla se llevó a reflujo durante un lapso de 5 a 10 horas realizando el monitoreo de la reacción por cromatografía en capa fina hasta observar la desaparición de los sustratos. Concluida la reacción se procedió a la separación con embudo de separación realizando un lavado con CHCl₃, (2x50mL) de igual forma se adiciono sal química para saturar la fase acuosa, seguido de la eliminación del solvente mediante rotavapor para recuperar el producto de la reacción y su posterior secado a vacío hasta peso constante, obteniendo el crudo de reacción.

3.5. Síntesis de clorhidrato de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) fenil) metanamina mediante hidrogenación catalítica

En el caso de la síntesis de este compuesto se procedió con la técnica reportada por Gannett *et al.*, (1988), se disolvieron 6.5mmoles de oxima de vainillina O-alquilada, en 162.5 ml de etanol absoluto, posteriormente se le adicionaron 325 mg de Pd/C al 10% y 9 mL de HCl concentrado, los cuales fueron llevados a hidrogenación catalítica a una presión de 70 psi durante un tiempo de 4 horas, realizando el monitoreo de la reacción mediante CCF. Observada la terminación de la reacción, se filtró la mezcla, para retirar el catalizador de la reacción, seguido de la remoción del disolvente mediante rotavapor, obteniéndose un polvo de color amarillo pálido correspondiente al clorhidrato de la amina sustituida con un peso de 1.78 gramos. El cual fue purificado mediante cromatografía en columna empleando 100g silica gel como fase estacionaria y 500 una fase móvil 50/50 acetato de etilo/metanol, recuperando 150 fracciones, de las cuales solamente las que se encontraban entre la fracción 60 a 130 contenían el compuesto procediendo con la recuperación del compuesto.

3.6. Reacción de acilación química de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído con cloruro de valproilo

En el caso, se siguió la técnica desarrollada por Li *et al.*, (2014) en el cual se disolvió 1 mmol de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído en 2 mL de CHCl_3 o MTBE como medio de reacción y 0.5 ml de piridina o trietilamina como cosolvente, bajo atmosfera inerte. Posteriormente se le adicionaron 1 mmol de cloruro de valproilo a una temperatura de 0 a 5°C; al término de la adición, la mezcla se mantuvo en agitación a la misma temperatura, por un periodo de 4 horas aproximadamente. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina. Concluida la reacción se procedió con la extracción del compuesto de interés con CHCl_3 , posteriormente, se separó la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio y finalmente se procedió a la filtración de la solución, concentración en rotavapor para obtener el producto crudo de la reacción.

3.7. Reacción de acilación química de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il)etoxi) fenil) metanamina

Para efectos de la obtención de la valproamida se emplearon métodos similares a los reportados por Bettadaiah *et al.*, (2014). En un matraz bola dos bocas de 100mL, se mezclaron 500 mg de la amina O-alquilada (1.67mmoles), 320 mg (EDCI 1.7mmoles), 260 mg de HOBt (1.7mmoles) en 75 ml de DCM seco y atmosfera inerte, posteriormente se adicionaron 235 μ L (1.8mmoles) de ácido valproico y 2.5ml de trietilamina, y se dejó la reacción en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se realizó el monitoreo de la reacción hasta observar la desaparición de los sustratos y la aparición de un producto de la reacción. Concluida la reacción, se procedió a realizar un lavado con agua a pH 10 (3x100 mL), con la finalidad de retirar los remanentes del ácido así como el excedente de los reactivos acopladores separación mediante embudo de separación empleando y seguido de una purificación mediante cromatografía en columna para 380 mg de producto crudo obtenido, empleando 300 mg de producto crudo obtenidos en la reacción 100 g de silica gel y 300 ml de fase móvil similar a la del compuesto anterior obteniendo en este caso 80 fracciones de 1.5 mL C/U encontrándose entre las fracciones 25 a 60 a las el compuesto de interés una vez recuperadas todas las fracciones se procedió con la obtención del compuesto (280 mg).

3.8. Reacción de acilación catalizada por lipasa CAL-B de oxima de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído con valproato de etilo

La reacción de acilación enzimática de la oxima de vainillina O-alquilada empleando la técnica de Arthur *et al.*, (2018), se llevó a cabo en viales de 4 mL, con tapa roscada y septa de PTFE/silicón. A cada vial se le agregaron 300 mg de mallas moleculares, 1 mmol de oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído (Oxima de vainillina O-alquilada) y 100 mg de CAL-B. La mezcla anterior se sometió a vacío (30 mmHg aproximadamente) durante 2 minutos. Posteriormente, se le suministra gas nitrógeno a través de un globo conectado a una aguja hipodérmica,

que se introdujo en el vial a través de la septa. Seguidamente, con una jeringa de vidrio se adicionaron 2 mL de MTBE y CHCl_3 (como disolvente y medio de reacción), y se agregó 2 mmol del ácido valproico previamente sintetizado como agente acilante. Durante el transcurso de la reacción, se adicionó 1 mL de piridina con cosolvente básico. Cada experimento se realizó por triplicado, a la par de la realización de una reacción testigo, que contuvo todos los reactivos y materiales, excepto la enzima. Los viales con las mezclas de reacción se agitaron a 170 rpm, a temperatura de 45, 60 y 70 °C, por cada experimento realizado por separado. El seguimiento de las reacciones se realizó a intervalos de tiempo de 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 144 horas en las que se observó la desaparición parcial o completa (de acuerdo con la temperatura) de los sustratos. Al término de la reacción, los productos de las reacciones de las síntesis enzimáticas, se procedió con el filtrado y evaporación del solvente y para obtener el producto crudo de la reacción.

3.9. Análisis de las reacciones químicas y de las biotransformaciones

Los sustratos purificados se sometieron a técnicas espectrofotométricas comunes como: espectroscopia infrarroja, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de Hidrógeno y de Carbono. En el caso de la espectroscopía infrarroja, se observaron las bandas de absorción características de cada uno de los grupos funcionales aparentes en el proceso. En cuanto a la espectrometría de masas se confirmó el Ión Molecular ($M^+ = \text{Peso Molecular}$) y la masa de los iones de Cationización, como $M+1$, $M+\text{Na}$, $M+\text{K}$, del los compuestos mediante la comparación de la masa de su forma empírica con la obtenida mediante ESI y para el caso de la RMN se procedió a la elucidación a partir de los desplazamientos químicos correspondientes a los H's y C's correspondientes a las moléculas.

3.10. Evaluación de los compuestos como inhibidores de la agregación del βA_{1-42}

Con la finalidad de evaluar la actividad de los compuestos sintetizados como inhibidores la oligomerización del péptido βA_{1-42} se procedió a realizar los ensayos *in vitro* con la finalidad de observar el efecto que presentan la adición de los ligandos al péptido por lo cual se procedió a la preparación de las muestras de acuerdo a lo siguiente:

- Se tomó un frasco con βA_{1-42} 250 μg y suspendió en 100 μL de agua miliQ obteniendo una concentración de 2.5 $\mu g/ \mu L$.
- Se tomaron 4 alícuotas de 24 μL serían aforadas a 60 μL , a manera de emplear la mayor cantidad equitativamente.
- Las muestras se encuentran compuestas por :
 - 24 μL de βA_{1-42} + 36 μL de agua miliQ
 - 24 μL de βA_{1-42} + 36 μL de agua miliQ
 - 24 μL de βA_{1-42} + 6 μL de avs (100 mM) + 30 μL de agua miliQ
 - 24 μL de βA_{1-42} + 4.5 μL de vas (100 mM) + 31.5 μL de agua miliQ
- Las siguientes muestras fueron llevada a incubación a 37°C y 45 rpm por un tiempo de 48 h.
 - 24 μL de βA_{1-42} + 36 μL de agua miliQ
 - 24 μL de βA_{1-42} + 6 μL de avs + 30 μL de agua miliQ
 - 24 μL de βA_{1-42} + 4.5 μL de vas + 31.5 μL de agua miliQ

La muestra que no se llevó a incubación fue empleada como control al tiempo 0 para los ensayos *in vitro*.
- Teóricamente se consideró que el volumen de las celdas que se encontraban en incubación se dispondrían:
 - 15 μL para fluorescencia
 - 10 μL para electroforesis
 - 2 μL para AFM

Considerando realizar duplicados

3.10.1. Análisis mediante fluorescencia con ThT

Con la finalidad de evaluar los compuestos como inhibidores de la formación de fibrillas se preparará una dilución de βA_{1-42} (Calbiochem, No. Cat. PP69) a una concentración 100 μM en agua miliQ, en presencia y ausencia de cada uno de los compuestos a una concentración de 100 μM . Cada alícuota se incubó en una celda de cuarzo a 37 °C con agitación constante durante 48 h, tomando alícuotas a las 0 y 48 h de incubación, de esta muestra se tomaron 15 μL de muestra, a los cuales se les adicionaron 25 μL de tioflavina T, fueron aforados a 600 μL y se procedió a realizar la lectura en el fluoreómetro las muestras quedaron de la siguiente manera:

25 μL ThT+ 15 μL de BA T=01 + 560 μL de agua miliQ (BA T=01)

25 μL ThT+ 15 μL de BA T=02 + 560 μL de agua miliQ (BA T=02)

25 μL ThT+ 15 μL de BA T=48-1 + 560 μL de agua miliQ (BA T=48-1)

25 μL ThT+ 15 μL de BA T=48-2 + 560 μL de agua miliQ (BA T=48-2)

25 μL ThT+ 15 μL de BA + VAS-1 + 560 μL de agua miliQ (BA+VAS-1)

25 μL ThT+ 15 μL de BA + VAS-2 + 560 μL de agua miliQ (BA+VAS-2)

25 μL ThT+ 15 μL de BA + AVS-1 + 560 μL de agua miliQ (BA+AVS-1)

25 μL ThT+ 15 μL de BA + AVS-2 + 560 μL de agua miliQ (BA+AVS-2)

25 μL ThT + 575 μL de agua miliQ (ThT)

El incremento de la fluorescencia de ThT se midió a una $\lambda_{emisión}=480$ nm y una $\lambda_{excitación}=445$ nm (Hernández *et al.*, 2014).

3.10.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para determinar si la incubación de βA_{1-42} en presencia de los compuestos diseñados favorece la formación de oligómeros de βA_{1-42} , se preparó una dilución de βA_{1-42} a una concentración de 100 μM en agua miliQ, en presencia y ausencia de los compuestos a una concentración de 100 μM , incubando a 37°C durante 24h, se realizaron geles de electroforesis al 14 % (Tabla 3.1), el experimento fue llevado a cabo de la siguiente manera:

- Se realizaron dos geles de poliacrilamida al 14% (Tabla 3.1) uno como control al tiempo inicial (0 horas) y del tiempo final (48 horas), empleando como control marcadores de peso molecular alto (250 KDa, Precisión Plus Protein; Biorad®161-0394) y bajo (38 KDa, Low-range Amersham Rainbow Marker, RPN 755E)
- En el caso de la elaboración del gel se emplearon 10 μL de las muestras debido a la pérdida de volumen de la celda durante la incubación además de que no se realizó réplica del mismo.
- A las muestras se les adiciona el buffer de laemmli 2x y fueron calentados a ebullición por un tiempo de 5 min aproximadamente.
- Realizando la corrida del gel con una corriente de 120 Volts un tiempo de 120 min.

Las muestras se sometidas a electroforesis, fueron posteriormente teñidas con azul de coomassie. (Hernández *et al.*, 2014). El peso molecular de las bandas se determinó por comparación con el marcador de peso molecular de referencia.

TABLA 3. 1 Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE al 14%

Reactivos/tipo de gel	Gel separador 14%
Agua miliQ	3 mL
Acrilamida 40%	2.8 mL
Tris base pH 8.8 (1.5 m)	2 mL
SDS 10%	80 μ L
APS 10%	80 μ L
TEMED	8 μ L

Reactivos/tipo de gel	Gel concentrador 14%
Agua miliQ	2.9 mL
Acrilamida 40%	0.75 mL
Tris base pH 6.8 (0.5 m)	1.25 mL
SDS 10%	50 μ L
APS 10%	50 μ L
TEMED	5 μ L

3.10.3. Análisis de las muestras mediante microscopia de fuerza atómica

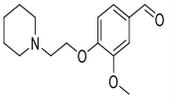
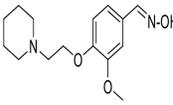
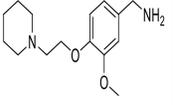
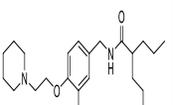
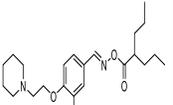
Para la determinación de las características morfológicas del βA_{1-42} en presencia y ausencia de los compuestos (100 μ M), 2 μ l de βA_{1-42} a una concentración de 100 μ M fueron incubados durante 24 h a 37°C en agitación continua, se colocaron sobre una placa de vidrio y secados a temperatura ambiente. Las imágenes fueron escaneadas en el aire utilizando el modo Scan Assist (Hernández *et al.*, 2014).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de la evaluación *in silico*

Los resultados obtenidos en función de los parámetros seleccionados para realizar el acoplamiento molecular (Docking) para la evaluación de las tres isoformas del péptido βA_{1-42} , (α -hélice, β -plegada y Random Coil), obteniendo los valores de energía libre y aminoácidos en un radio de 5 Å (Tabla 4.1), una vez obtenidos los valores y los aminoácidos de interacciones se procedió a la identificación de los enlaces y los tipos de interacciones presentes entre el ligando y las dianas.

TABLA 4. 1 Energía libre (Kcal/ mol) de cada compuesto obtenido y aa de interacción en un radio de 5 Å obtenidos de los estudios de Docking con el βA_{1-42} en conformación α -hélice, hoja- β y Random Coil (RC)

Energía Libre (kcal/mol) / A.A de interacción en un radio de 5 Å						
ligando	α -hélice.		β -plegada		Random Coil (RC)	
	-5.24	<i>His 14, Gln 15, Val 18, Phe 19, Glu 22, Asp 23</i>	-4.83	<i>Asp 23, Val 24, Gly 25, Lys 28, Ile 32, Gly 33, Leu 34, Met 35</i>	-4.28	<i>Glu 22, Asp 23, Val 24, Ser 26, Asn 27, Lys 28</i>
	-5.53	<i>Glu 11, Val 12, His 14, Gln 15, Val 18, Phe 19, Glu 22, Asp 23, Asn 27</i>	-5.58	<i>Asp 23, Val 24, Gly 25, Ser 26, Lys 28, Ile 32, Gly 33, Leu 34, Met 35</i>	-5.32	<i>Glu 22, Asp 23, Val 24, Gly 25, Ser 26, Asn 27, Lys 28</i>
	-6.84	<i>Glu 11, His 14, Gln 15, Val 18, Phe 19, Glu 22, Asp 23, Asn 27</i>	-5.57	<i>Ala 21, Glu 22, Asp 23, Ile 32, Gly 33, Leu 34, Met 35, Val 36</i>	-4.9	<i>Phe 19, Asp 23, Val 24, Ser 26, Asn 27, Lys 28</i>
	-5.35	<i>Glu 11, Gln 15, Val 18, Phe 19, Phe 20, Glu 22, Asp 23</i>	-5.87	<i>Phe 19, Phe 20, Ala 21, Glu 22, Asp 23, Gly 25, Ile 32, Leu 34, Val 36, Gly 37</i>	-5.56	<i>Leu 17, Val 18, Phe 20, Ala 21, Glu 22, Gly 25, Ser 26, LYS 28, Gly 29, Ala 30, Ile 31, Ile 32</i>
	-6.27	<i>Glu 11, His 14, Gln 15, Val 18, Phe 19, Phe 20, Glu 22, Asp 23</i>	-5.03	<i>Phe 19, Ala 21, Glu 22, Asp 23, Val 24, Gly 25, Ile 32, Leu 34, Val 36, Gly 37, Gly 38</i>	-4.34	<i>Leu 17, Ala 21, Glu 22, Gly 25, Ser 26, Lys 28, Gly 29, Ala 30, Ile 31, Gly 33</i>

4.1.1. Análisis de las interacciones de la conformación α -hélice

Una vez obtenidos los aminoácidos con los que interacciona el ligando en el rango seleccionado, procedió con el análisis de las interacciones realizadas con esta isoforma, en el caso del compuesto vainillina O-alquilada (Figura 4.1), se observa que interacción con los aminoácidos, en el caso de *His* 14 presenta un enlace de hidrógeno con la cadena lateral cargada positivamente en el área del oxígeno del carbonilo aldehídico a una distancia de 2.2 Å, de igual forma con *Gln* 15 para este aminoácido se forma un enlace de hidrógeno con la amina heterocíclica la cual se protonó a aun pH fisiológico, además interaccionan mediante cargas electrostáticas con *Phe* 19, de igual forma presenta interacciones de Van der Waals con los aminoácidos encontrados en el radio de 5 Å, *Glu* 11, *Val*, 18, *Glu* 22, *Asp* 23.

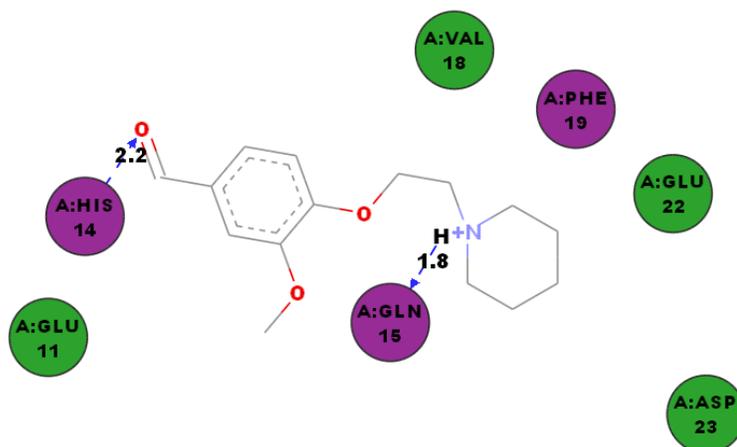


FIGURA 4. 1 Interacciones de vainillina O-alquilada con la isoforma α -hélice

De igual forma para la oxima de vainillina O-alquilado (Figura 4.2), presenta enlaces H-H con la cadena principal de *Glu* 11 al cual le cedió un protón directamente desde el grupo oximino a una distancia de 2.1 Å. A su vez la introducción del grupo funcional oxima presenta enlaces H-H con la cadena principal de *Gln* 16 a una distancia de 2.4 Å específicamente con el Nitrógeno del grupo, además de interaccionar de manera H-H con la cadena lateral de este aminoácido

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

con el oxígeno del metoxilo presente en la molécula, una doble interacción con *Glu* 22 en la amina heterocíclica la cual presenta interacciones electrostáticas con la amina, la cual es protonada a pH fisiológico y a su vez cede el protón ganado formando un enlace H-H con la cadena lateral del mismo aminoácido, interacciones de carga con *Val* 12, *Asp* 23 y *Asn* 27, así como interacciones de Van der Waals con *His* 14, *Val* 18 y *Phe* 18.

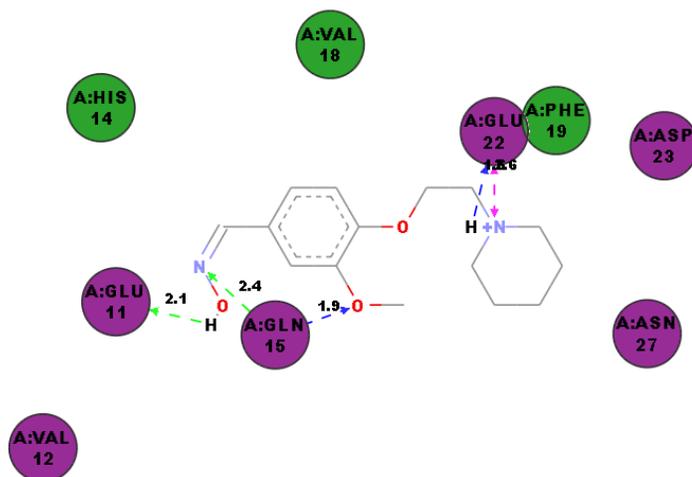


FIGURA 4. 2 Interacciones de oxima de vainillina O-alquilada con la isoforma α -hélice

Vainillilamina O-alquilada presenta interacciones el grupo NH_2 con las cadenas laterales de *Glu* 22 y *Asp* 23 formando enlaces H-H a una distancia de 1.7 Å, además de puentes de hidrogeno con *Gln* 15 a una distancia de 2.1 Å en el grupo metoxilo, además de interacciones electrostáticas con *Glu* 11, *Phe* 19 y *Asn* 27, por ultimo presenta interacciones de Van der Waals con *His* 14 y *Val* 18.

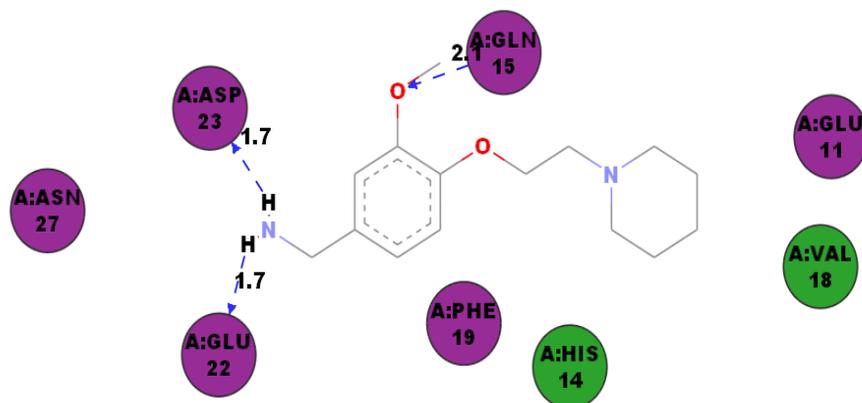


FIGURA 4. 3 Interacciones de vainillilamina O-alquilada con la isoforma α -hélice

La valproamida de vainillilamina O-alquilada (Figura 4.4) presenta interacciones de Van der Waals con *Glu* 11, *Val* 18, *Phe* 20 y *Asp* 23, además de una doble interacción π - σ con *Phe* 19, una con el benceno integrado al ligando a 3.3 Å y la otra con el anillo aromático del aminoácido con una fracción alifática de la fracción del ácido valproico acoplado a la molécula a 3.7 Å, además de una doble interacción con *Gln* 15, el cual interacciona con un enlace de hidrogeno con la cadena secundaria del aminoácido a una distancia de 2.5 Å, el cual a su vez forma enlaces H-H con el metoxilo a una distancia de 1.8 Å.

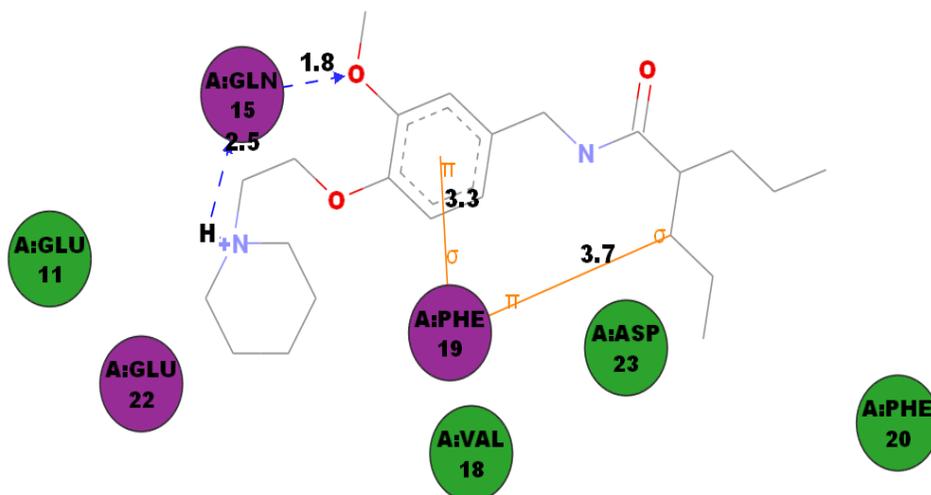


FIGURA 4. 4 Interacciones de la valproamida de vainillilamina O-alquilada con la isoforma α -hélice

Para el valproato de la oxima de vainillina O-Alquilada (Figura 4.5) la cual presenta múltiples interacciones en la amina heterocíclica, siendo las principales interacciones del tipo π donde predominan las interacciones del tipo π -catión con *Phe* 19 y 20 directamente con el N del compuesto heterocíclico, además de que *Phe* 19 presenta una interacción π - σ con el CH_2 adyacente al nitrógeno del halogenuro, además de presentar enlaces H-H con la cadena principal de *Phe* 19, de igual forma presenta interacciones electrostáticas entre Asp 23 y el anillo de piperidina, además de interacciones de Van der Waals con *Glu* 22, *Val* 18, *His* 14, *Glu* 11 (Verdes).

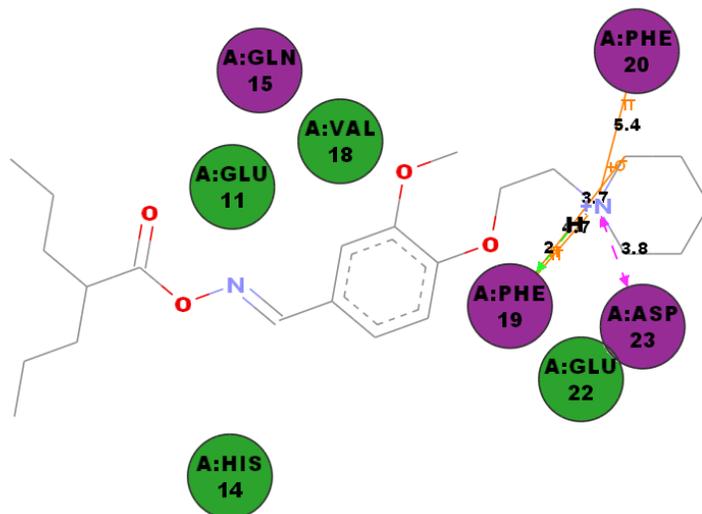


FIGURA 4. 5 Interacciones del valproato de oxima de vainillina O-alquilada con la isoforma α -hélice

4.1.2. Análisis de las interacciones de la conformación β -plegada

Las interacciones presentadas por la vainillina O-alquilada con esta conformación del péptido β A (Figura 4.6), mostraron una doble interacción con *Asp* 23 y la amina terciaria siendo la primera una interacción electrostática debido a la carga del aminoácido. Además de que el nitrógeno del compuesto heterocíclico presenta una protonación a un pH fisiológico, el protón interacciona de igual forma con las cadena lateral de *Asp* 23, por su parte el oxígeno del extremo carbonilo presenta una interacción con *Met* 35 el cual forma un enlace H-H con el aminoácido aceptando un protón, de igual forma presenta interacciones de Van der Waals con los aminoácidos cercanos tales como, *Ile* 32, *Leu* 34, *Lys* 28 y *Val* 24.

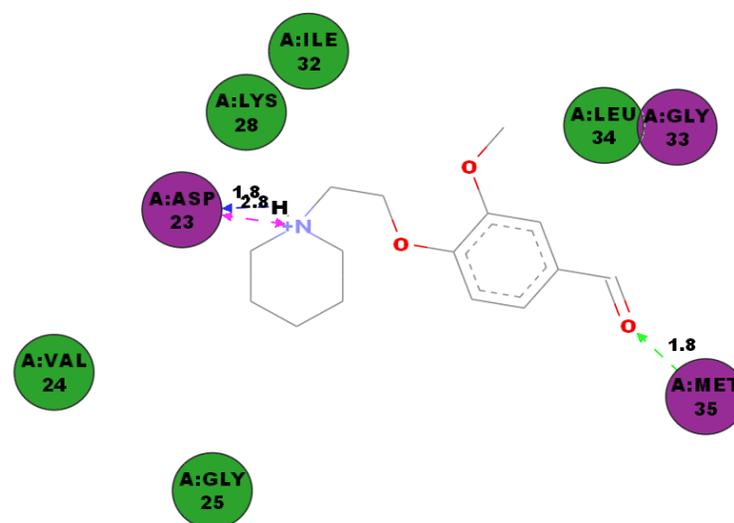


FIGURA 4. 6 Interacciones de vainillina O-alkilada con la isoforma β -plegada

A su vez las interacciones mostradas por la oxima (Figura 4.7) se destacan por la presencia de una doble interacción similar a la del compuesto anterior con el aminoácido *Asp* 23, además de enlace H-H con las la cadena lateral del *Gly* 33 y el radical OH del grupo oxima, así como una doble interacción con *Met* 34 formando enlaces de hidrogeno con cadena lateral del mismo en dos puntos siendo en esta caso particular con el nitrógeno y oxígeno del grupo funcional oxima, además un enlace π - σ a una distancia de 3.7 Å con *Leu* 34, además de presentar interacciones por fuerza de Van der Waals con *Val* 24, *Ser* 26, *Gly* 25, *Lys* 28 y *Ile* 32.

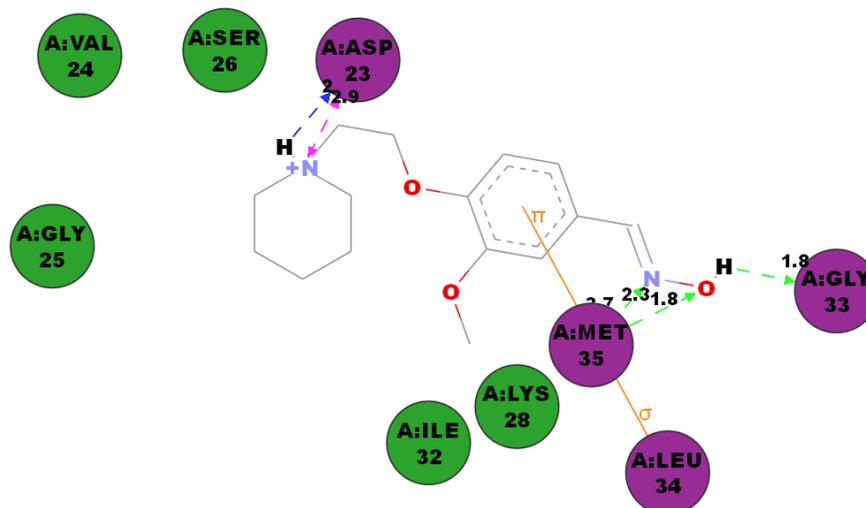


FIGURA 4. 7 Interacciones de la oxima de vainillina O-alkilada con la isoforma β -plegada

Por su parte la vainillilamina O-alkilada (Figura 4.8), presenta interacciones con Asp 23 en el extremo del amina primaria siendo una doble enlace H-H con la cadena lateral del aminoácido los cuales comprende una distancia de 1.9 y 2.1 Å y un enlace H-H entre el oxígeno del radical metoxilo y la cadena principal del aminoácido Met 35 y enlaces por fuerzas de Van der Waals con Val 36, Glu 22, Ala 21, Leu 33 e Ile 32.

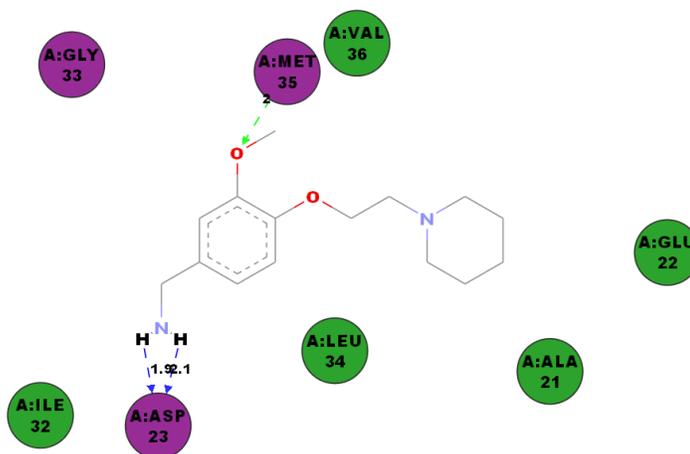


FIGURA 4. 8 Interacciones de la vainillilamina O-alkilada con la isoforma β -plegada

Asimismo las interacciones presentadas por la valporamida de vainillilamina O-alquilada (Figura 4.9), muestran un enlace triple con *Asp 23* en donde entran en función fuerzas electrostáticas así como interacciones en dos puntos del ligando, siendo un punto de interacción la sección del amina heterocíclica con forma un enlace de hidrógeno con la cadena primaria del aminoácido, así como con el oxígeno del éter formado entre la amina y el compuesto aromático, a su vez muestra in interacción del tipo π - σ con *Glu 22* a una distancia de 3.7 Å, de igual forma con *Ala 21* y su cadena lateral formando un doble enlace a través de un intercambio protónico entre el grupo NH del ligando el cual cede un protón al aminoácido, que a su vez cede un protón al carbonilo del amida, no obstante presenta de igual forma interacciones del tipo Van der Waals con *Leu 34*, *Gly 25*, *Gly 37*, *Phe 20* y *Val 36*.

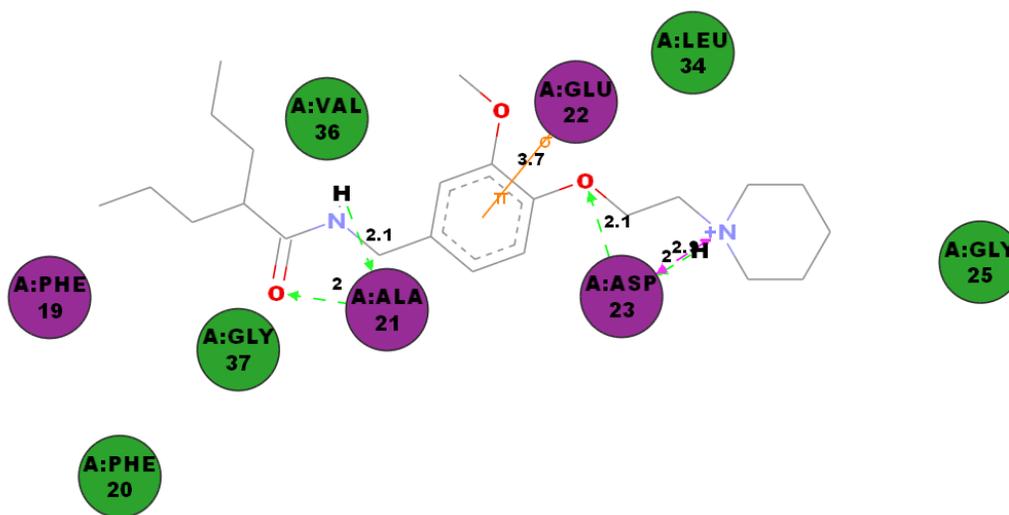


FIGURA 4. 9 Interacciones de la valporamida de vainillilamina O-alquilada con la isoforma β -plegada

Finalmente las interacciones presentadas por el valproato de oxima de vainillina O-alkilada las cuales mostraron interacción electrostática con la fracción del amina heterocíclica y Asp 23, de igual forma con la cadena principal del mismo y la amina protonada la cual forma un enlace H-H con el protón ganado en un pH fisiológico e interacciona a su vez por fuerzas de Van der Waals con los aminoácidos restantes.

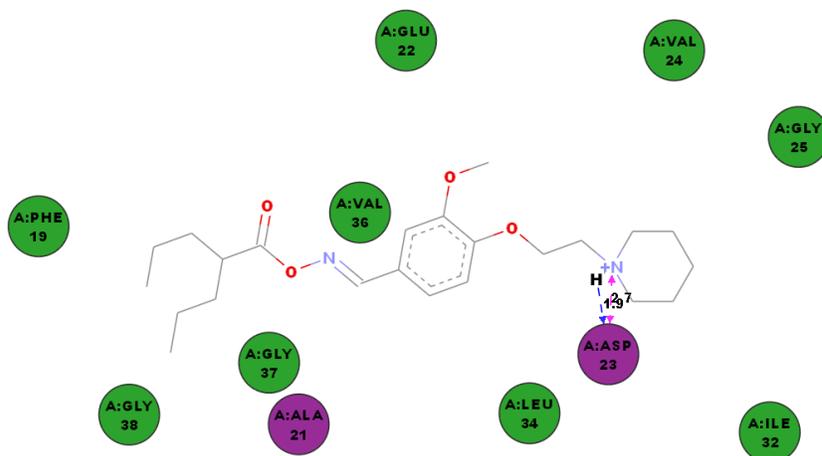


FIGURA 4. 10 Interacciones del valproato de oxima de vainillilamina O-alkilada con la isoforma β -plegada

4.1.3. Análisis de las interacciones de la conformación Random Coil (RC)

De igual forma los ligandos fueron evaluados para la conformación aleatoria formada durante la transición del cambio entre isoformas, evaluando las interacciones presentadas por los ligandos como en el caso de la vainillina O-alkilada la cual presenta interacciones electrostáticas con los aminoácidos *Glu* 22 y *Asp* 23 formadas a una distancia de 3.9 y 2.7 Å consecutivamente, además de interaccionar con la cadena primaria de *Asp* 23 formando un puente de hidrogeno a una distancia de 1.8 Å, por su parte la cadena lateral de *Ser* 26 presenta una interacción H-H con el oxígeno del metoxilo cediendo un H, de igual forma *Lys* 28 forma un enlace H-H con el oxígeno carbonílico de aldehído al situarse a una distancia de 2.1 Å.

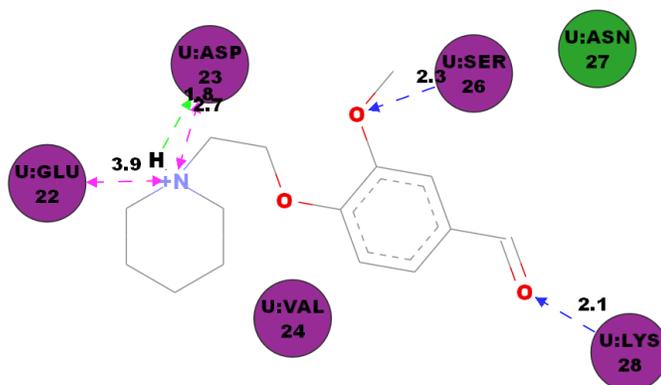


FIGURA 4. 11 Interacciones de vainillina O-alkilada con la isoforma Random Coil (RC)

Por otra parte la oxima de vainillina O-alkilada (Figura 4.12), muestra múltiples enlaces en el grupo oxima siendo que forma interacciones con las cadenas principales del *Lys* 28 la cual forma enlaces H-H con el nitrógeno y oxígeno del grupo carbonilo, de igual forma con *Val* 24 el cual acepta un protón en su cadena primaria formando un enlace con el radical OH de la oxima, además de formar un enlace del tipo π - σ a una distancia de 3.8 Å. Por su parte *Asn* 27 interacciona con el oxígeno del grupo oximino de igual forma que *Lys* 28, por su parte en la fracción de la amina heterocíclica presenta interacción electrostática con *Asp* 23 y a su vez con la cadena secundaria del mismo.

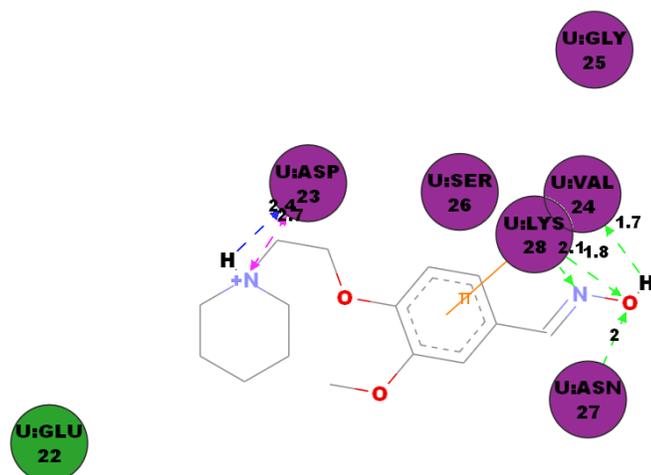


FIGURA 4. 12 Interacciones de la oxima de vainillina O-alquilada con la isoforma Random Coil (RC)

La vainillilamina O-alquilada presenta interacciones con la cadena lateral del Lys 28 la cual cede un protón para formar un enlace H-H y con Asp 23 el cual interactúa con el grupo amino del ligando y su cadena secundaria formando enlaces del tipo H-H en una distancia de 1.8 Å, además de encontrarse formando enlaces por fuerza de Van der Waals con *Phe* 19, *Val* 24, *Ser* 26 y *Asn* 27.

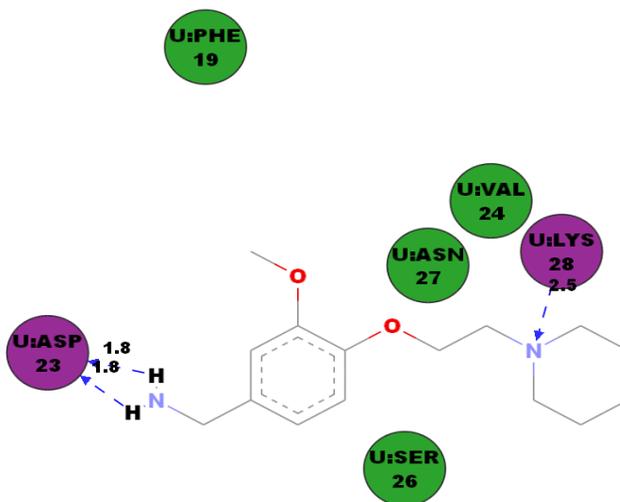


FIGURA 4. 13 Interacciones de la vainillilamina O-alquilada con la isoforma Random Coil (RC)

En el caso de la valproamida de vainillilamina O-alquilada (Figura 4.14), la cual presento interacciones electrostáticas con *Glu 22* y con la cadena secundaria en la sección del amina terciaria del ligando, a su vez en enlace NH del grupo amida con la *Ala 21* y su cadena primaria como también con *Ala 30* y el oxígeno del carbonilo del amida, además de interacciones de Van der Waals con los aminoácidos restantes.

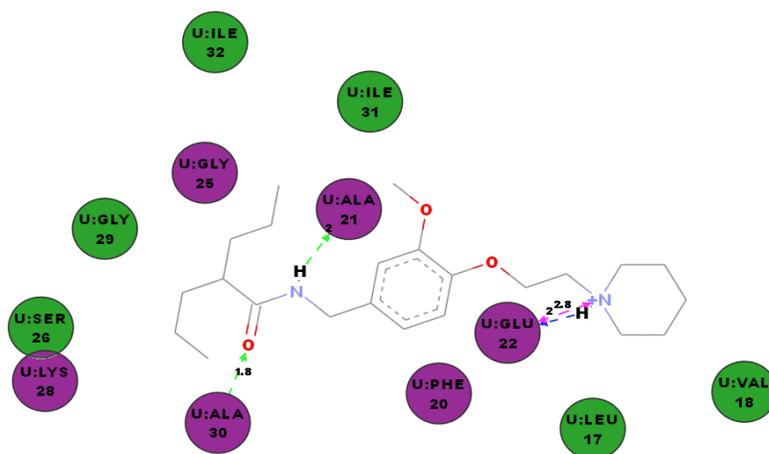


FIGURA 4. 14 Interacciones de la valproamida de vainillilamina O-alquilada con la isoforma Random Coil (RC)

En el caso del valproato de oxima de vainillilamina O-alquilada (Figura 4.15), el cual presento interacción en la fracción del amina terciaria con *Glu 22* de manera electrostática y enlace de hidrógeno con la cadena secundaria del aminoácido, así como con *Ala 30* mediante una interacción por puente de hidrógeno con la cadena primaria del mismo y a su vez con aminoácidos tales como *Leu 17*, *Ala 21* y *Ile 31* enlace por carga, además de interacciones por fuerzas de Van der Waals con *Ile 32*, *Gly 33*, *Gly 29*, y *Lys 28*.

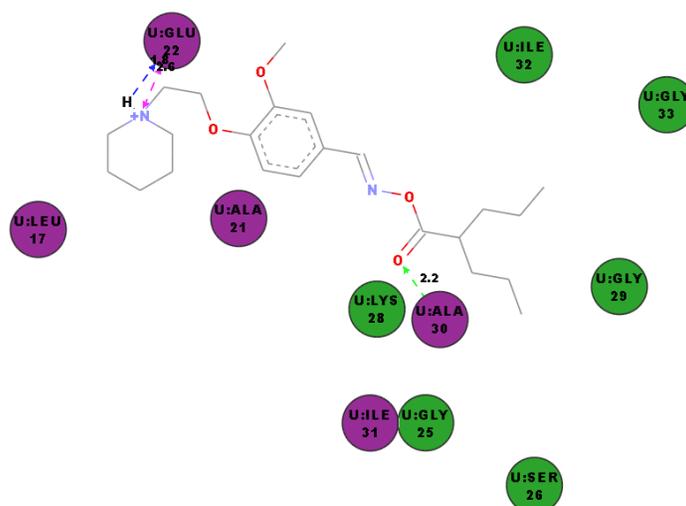


FIGURA 4. 15 Interacciones del valproato de oxima de vainillilamina O-alkilada con la isoforma Random Coil (RC)

4.2. Obtención de los sustratos de interés

Para la síntesis de los sustratos no asequibles de manera comercial se procedió a la síntesis de los mismos mediante técnicas reportadas en la literatura o realizando adaptaciones a las mismas.

4.2.1. Resultados de la síntesis de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il)etoxi) benzaldehído (Vainillina O-alkilada)

Para la síntesis de este compuesto se siguió la metodología de Sharma *et al.*, (2014) el cual realizó la sustitución en el radical hidroxilo de compuesto 3-metoxi-4-hidroxi-benzaldehído (vainillina), con bromuro de alilo. De acuerdo a los resultados obtenidos por este autor, se procedió a replicar las condiciones de reacción, mediante la sustitución del agente alquilante de la literatura (bromuro de alilo), por el que se considera como radical en nuestras moléculas objetivo: 2-(piperidin-1-il) etilo, el cual se siguió de acuerdo a la técnica correspondiente a este apartado donde se realizó el seguimiento de la reacción mediante CCF (Figura 4.16) en donde se observa una señal con diferente desplazamiento al mostrado por el compuesto sin alquilación.

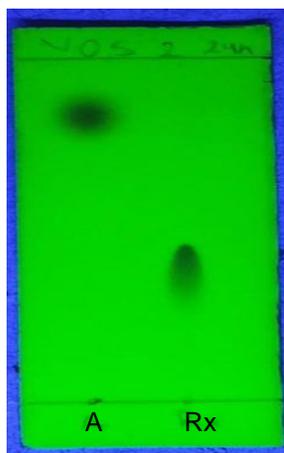


FIGURA 4. 16 Cromatografía en capa fina de la reacción de alquilación de la vainillina donde A= aldehído de vainillina y Rx= corresponde a la de la Vainillina O-alquilada obtenida.

4.2.2. Elucidación estructural de compuesto 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1- il) etoxi) benzaldehído (Vainillina O-alquilada)

El análisis mediante espectrofotometría infrarroja realizado para las moléculas de interés es basado en tablas de correlación de Infrarrojo (Figura 4.17), presentado por Hesse *et al.*, (1995) con la finalidad de elucidar la estructura mediante las flexiones y estiramientos propios de cada grupo funcional.

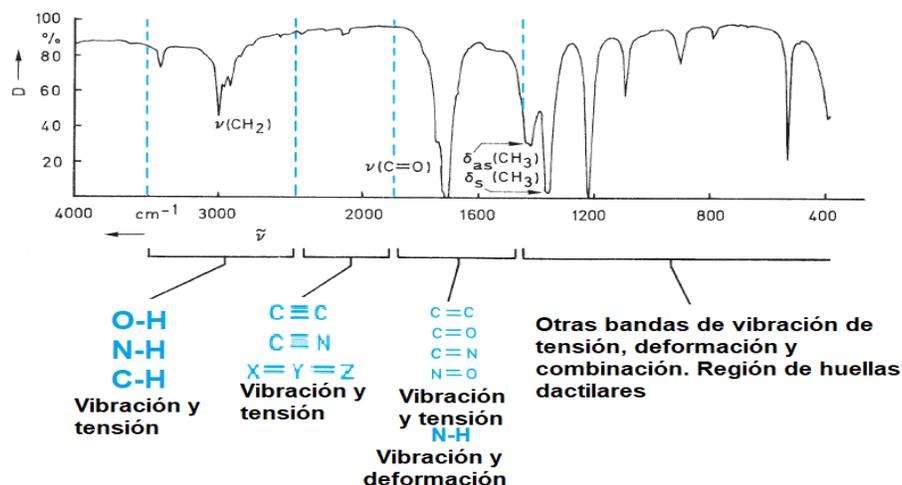


FIGURA 4. 17 Diagrama de regiones de absorción de espectroscopia infrarroja (Hesse et al., 1995)

La muestra de la Vainillina O-alkilada, mostró en su espectro IR la desaparición de la absorbancia característica del grupo OH fenólico en el rango de 3162 cm^{-1} , debido a la alquilación, para la obtención de la vainillina O-alkilada. Y siendo una de las características principales la transformación del grupo -OH, en el grupo -O-alkilo.

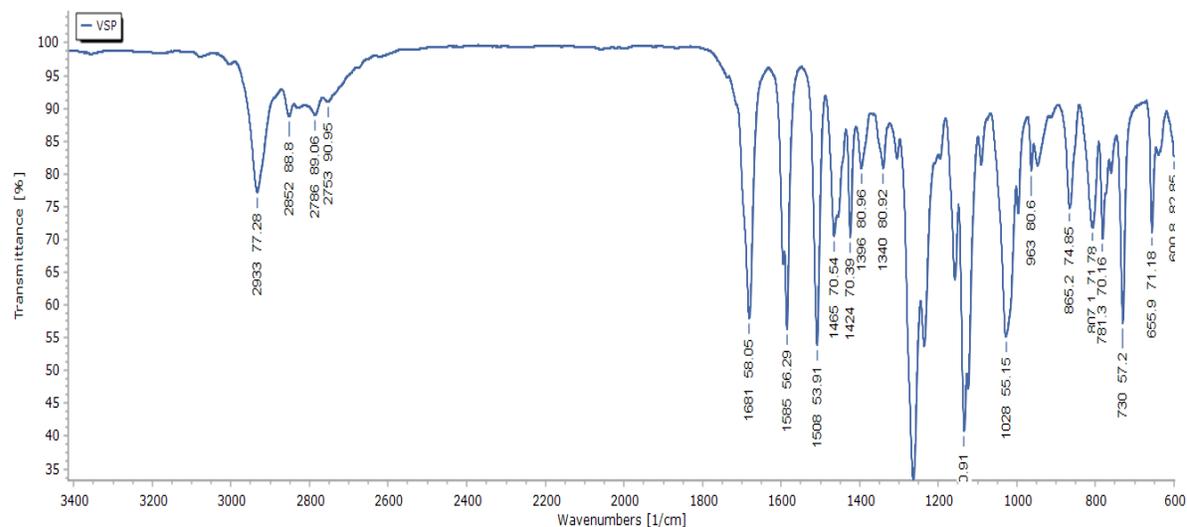


FIGURA 4. 18 Espectro de Infrarrojo de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído

Continuando con el análisis del espectro infrarrojo de la Vainillina O-alkilada (Figura 4.18), la cual no mostró bandas de absorción entre los $3200\text{ a }3400\text{ cm}^{-1}$ en lo cual se deduce la ausencia de la flexión del enlace O-H, lo cual se traduce en la formación del enlace C-O-Alquilo del producto de interés. Se observan el resto de las bandas características, como la del grupo carbonilo, la frecuencia de estiramiento a 1680 cm^{-1} en el producto (1663 cm^{-1} en el compuesto precursor), que corresponde al estiramiento del grupo carbonilo del aldehído tal cual se muestra mediante la tabla de correlación (Figura 4.17). La diferencia en las frecuencias máximas de absorción para este grupo carbonilo, residen en que en el sustrato, el OH fenólico introduce electrones por resonancia al anillo aromático, que refleja la conjugación hasta el grupo carbonilo, disminuyendo su carácter pi, y así su constante de fuerza, respecto

a un grupo carbonilo característico, el cual exhibe un máximo de absorción en $1715(\pm 10) \text{ cm}^{-1}$. Lo mismo sucede en el producto con el efecto resonante del grupo O-alquilo en para respecto del aldehído, solo que el efecto liberador de electrones, que disminuye el carácter carbonilo del carbonilo, es ligeramente menor al del grupo OH, lo cual se refleja una absorción en la frecuencia ligeramente mayor de 1680 cm^{-1} .

En el análisis mediante espectrometría de masas ESI de 3- metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído (Figura 4.19).

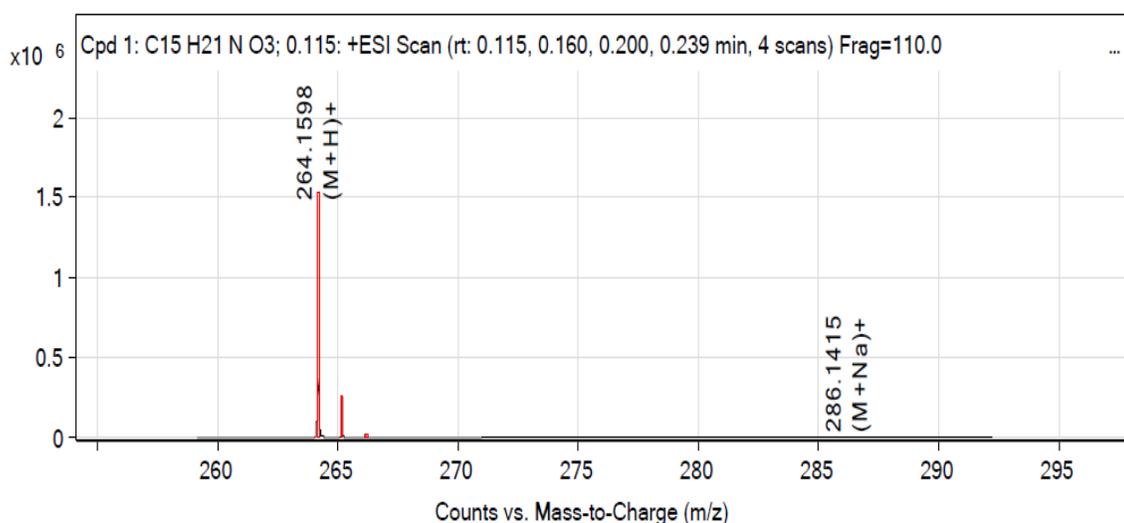


FIGURA 4. 19 Espectro de Masas (ESI) de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído

Se observa la aparición de iones moleculares $M+1=264$, empleando distintas fuentes de colisión las cuales son de 15,20 y 30 eV. El ion molecular en el espectro de masas para un compuesto con un número impar de N, da un ión molecular de masa impar, que en esta caso debería ser igual a 263, pero el ión observado de masa par igual a 264.16, corresponde a la suma de la masa de ión molecular más la masa de un protón correspondiendo al ión $M+1$ (Figura 4.19).

En el caso de la resonancia magnética nuclear se emplearon tablas de correlación para la elucidación de las señales presentadas en los espectros, debido a

la naturaleza del compuesto y la falta de antecedentes de síntesis y caracterización previos del mismo, las cuales fueron asignadas de acuerdo a su desplazamiento químico protónico (Figura 4.20).

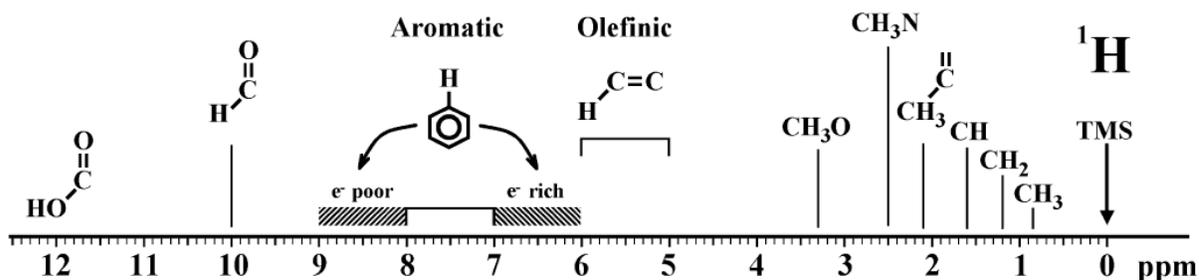


FIGURA 4. 20 Rangos aproximados de desplazamiento químico de ^1H para carbono en compuestos orgánicos (Jacobsen, 2017)

La caracterización mediante resonancia magnética nuclear (Figura 4.21) arrojó los siguientes resultados: $^1\text{H-NMR}$ (300.08 MHz, CDCl_3 , 25°C): 1.41 (c, 2H, CH_2 - $(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2\text{-N}$), 1.58 (q, 4H, CH_2 - $(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2\text{-N}$), 2.5 (t, 2H, CH_2 - $(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2\text{-N}$), las señales encontradas en el rango de 1.4 a 2.5 son representativas de los desplazamientos químicos de CH_2 saturados que componen la amina heterocíclica, de igual forma en el caso de 2.82 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$) el cual corresponde a el CH_2 de la cadena alifática adyacente al anillo de piperidina, 4.20 (t, 1H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), señal perteneciente al CH_2 alifático unido al oxígeno del grupo alquilo 3.87 (s, 3H, OCH_3), siendo esta señal correspondiente para el compuesto metoxilo presente, por su parte las señales de 6.94 (d, 1H, CH_{Ar}), 7.36 (d, 1H, CH_{Ar}), 7.40 (d, 1H, CH_{Ar}) son representativas del anillo aromático tri-sustituido y 9.79 (s, 1H, CHO), carbonilo de aldehído; resaltando en este punto la aparición de las señales representativas del anillo de piperidina en un rango de 1.41 a 4.20 ppm lo cual a su vez, la interpretación de las señales en el espectro obtenido, corresponde con la estructura del producto de la vainillina O-alquilada encontrando concordancia en los desplazamientos químicos dentro de los rangos mostrados en la (Figura 4.20) por lo cual se consideró la obtención del producto de acuerdo a Jacobsen (2017).

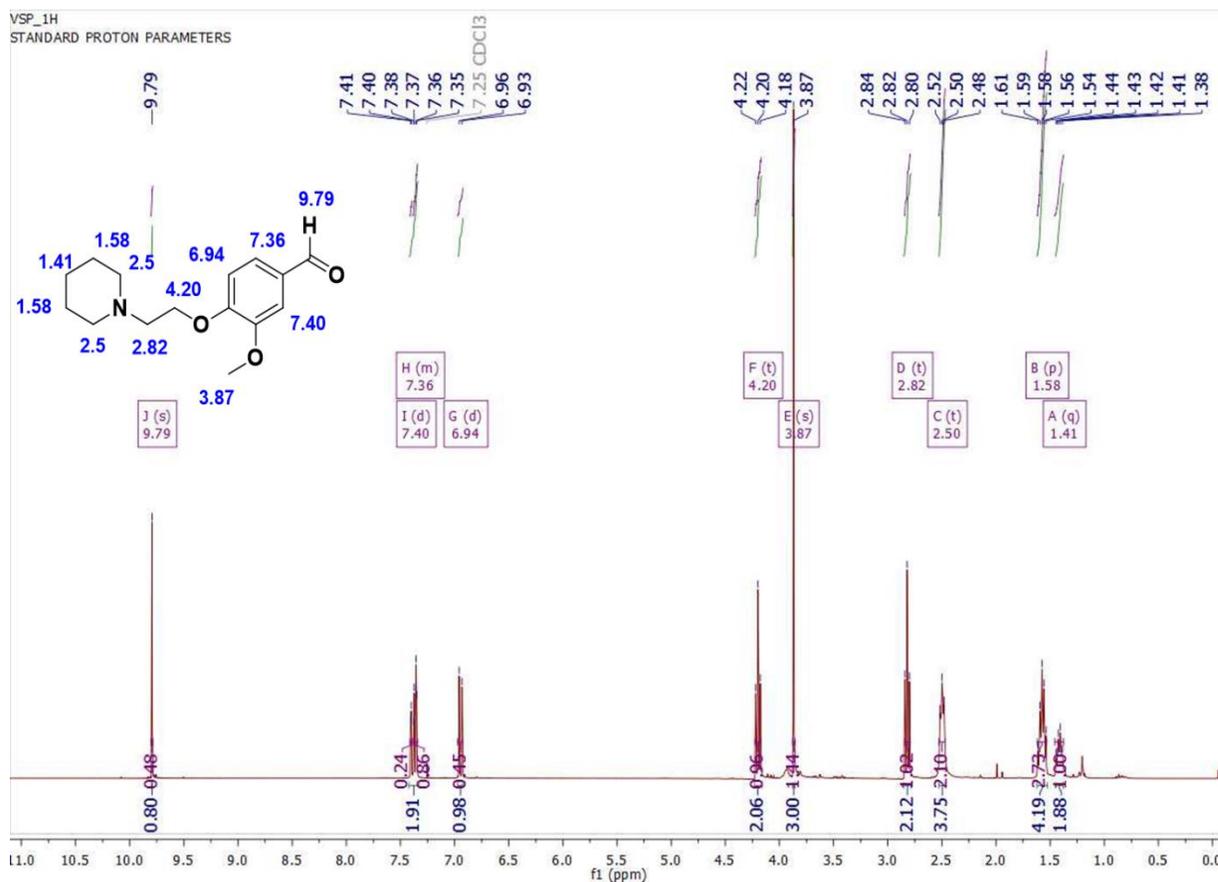


FIGURA 4. 21 Espectro de RMN de¹H de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído obtenido experimentalmente

De igual forma se procedió con la caracterización mediante resonancia magnética nuclear de carbono empleando de igual forma tablas de correlación (Figura 4.22) con la finalidad de identificar plenamente la estructura carbonada de la molécula.

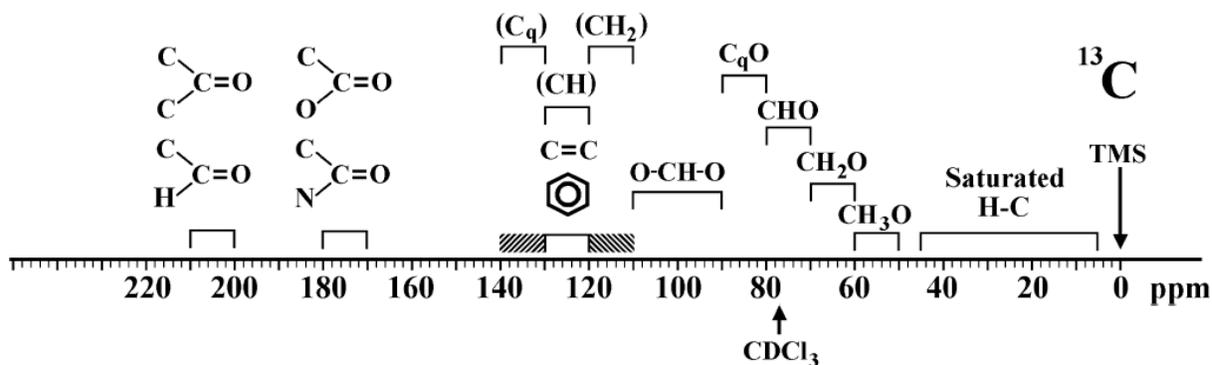


FIGURA 4. 22 Rangos aproximados de Desplazamiento químico de ^{13}C para carbono en compuestos orgánicos (Jacobsen, 2017)

Y su vez clasificarlos para confirmar la estructura esperada (Figura 4.23): ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ_c ppm = 25.70 ($\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_2\text{-N}$), 27.32 ($\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_2\text{-N}$), 56.51 ($\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_2\text{-N}$), siendo estas señales las pertenecientes a los CH_2 insaturados pertenecientes al amina heterocíclica en la posición donde se encontraba el radical hidroxilo de la materia prima, en el caso de los desplazamientos en 57.54 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 67.98 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), los cuales son pertenecientes a la cadena alifática del halogenuro O-alkilante, $\delta=59.02$ (OCH_3), siendo el metilo del grupo metoxilo presente dentro de la estructura del compuesto sintetizado, a su vez las señales de 110.83, 113.06, 128.43, 131.64, 151.25, y 155.38 (6 CHAr) las cuales se encuentran en el rango de desplazamiento químico correspondiente para aromáticos, por ultimo encontrando las señal del carbono del grupo carbonilo en una desplazamiento químico de 192.52 ppm, encontrándose en los desplazamientos descritos por Jacobsen (2017) mostrados en la Figura 4.19.

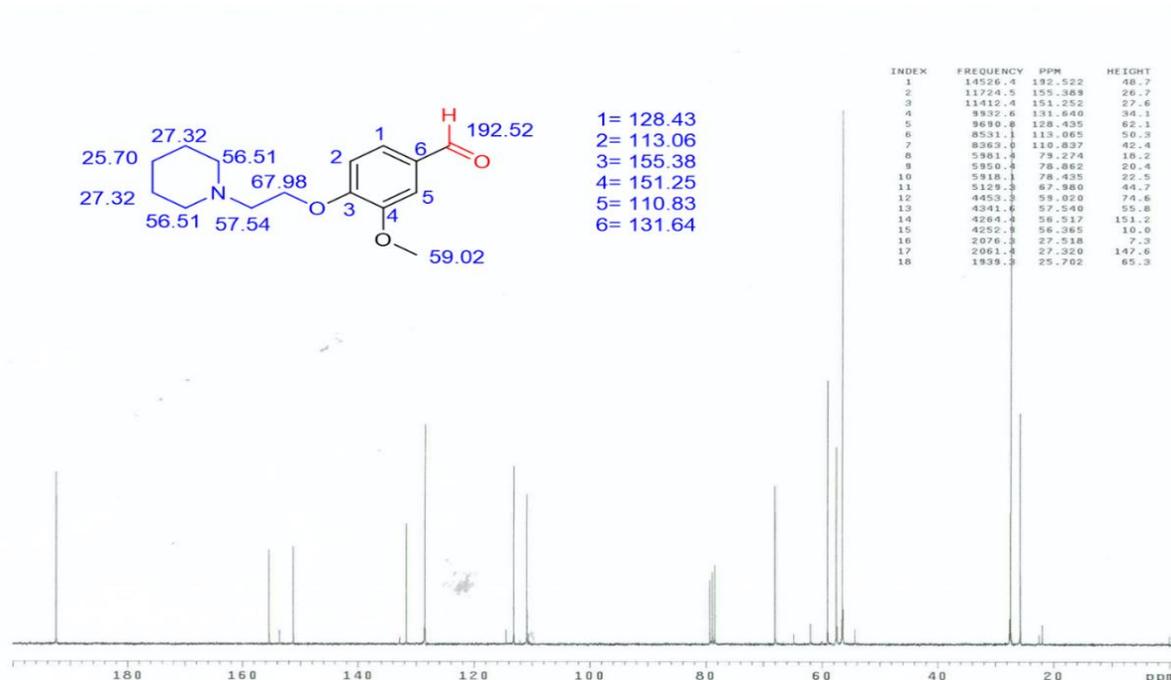


FIGURA 4. 23 Espectro de RMN de ¹³C de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído obtenido experimentalmente.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante la interpretación de los espectros mostrados se considera cumplida la obtención del compuesto de interés en un rendimiento del 65%.

4.2.3. Síntesis de oxima de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído

En el caso de la síntesis de este compuesto, se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Dikusar *et al.*, (2007) y Arthur, (2012) con las siguientes variantes experimentales: se adicionó un exceso molar de NH₂-OH-HCl y NaHCO₃, así como un incremento en el tiempo de reacción debido a que la vainillina O-alquilada tiene un mayor peso molecular, debido a la introducción de un radical alquilo que a su vez aumenta la basicidad por la introducción de una amina terciaria, en consecuencia la velocidad de la reacción se esperaba fuera más lenta que la vainillina sin el halogenuro de alquilo correspondiente. Mediante cromatografía en capa fina, se determinó que el tiempo requerido para que se llevara a cabo la reacción hasta la

desaparición completa del sustrato que fue de 4 horas, (Figura 4.24). Como puede observarse en esta figura, la oxima de vainillina O-alquilada, presenta una mayor retención en la fase estacionaria, respecto del precursor aldehídico, vainillina O-alquilada, debido a su mayor polaridad.

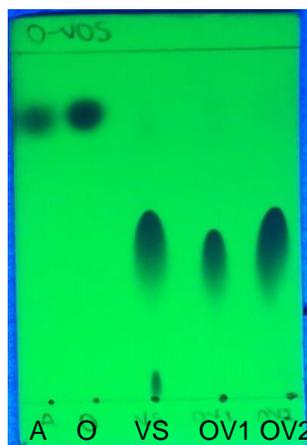


FIGURA 4. 24 CCF de la reacción de síntesis de oxima de vainillina alquilada, donde A=Vainillina, O=Oxima de vainillina, Vs=Aldehído O-alquilado, Ov1 y 2= oxima de vainillina O-alquilada 1 y 2

Los rendimientos obtenidos de 5 reacciones, se encuentran de manera similar a los obtenidos por Arthur, (2012) para vainillina, que caen en un rango entre el 55 a 60% de rendimiento.

4.2.4. Elucidación estructural de la oxima 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il)etoxi) benzaldehído

La determinación del punto de fusión de las oxima de vainillina alquilada sintetizada por triplicado, se encontró en un intervalo de punto de fusión promedio de $120\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

La caracterización de la oxima de vainillina O-alquilada mediante IR, ESI MS/MS y RMN de ^1H y ^{13}C . Primeramente en el espectro de IR que la absorción del grupo carbonilo del aldehído en 1680 cm^{-1} , característica del sustrato que

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

desaparece en este producto, que a cambio muestra las señales propias del estiramiento de la oxima en 1507 y 1583 cm^{-1} en la oxima sustituida, sin embargo el resto de la estructura no muestra un cambio debido a la condensación del carbonilo del aldehído con la hidroxilamina, resultando en el cambio de grupo funcional del carbonilo de aldehído por el grupo oxima (Figura 4.25) lo cual presenta concordancia con la tabla de correlación IR de Hesse *et al.*, (1995).

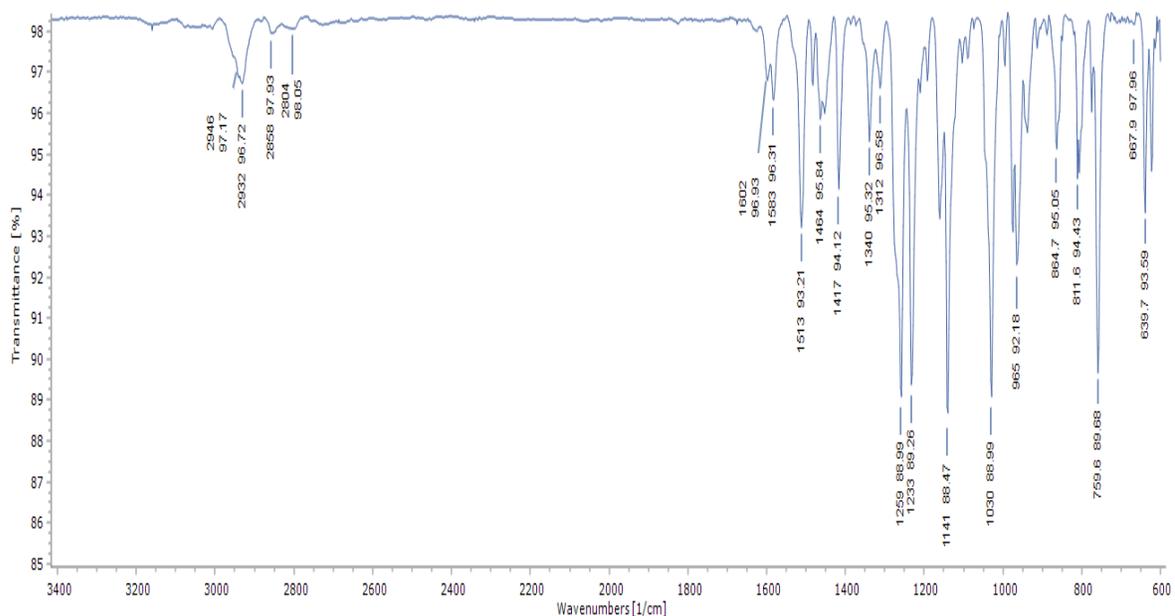


FIGURA 4. 25 Espectro de Infrarrojo de oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído

Para la caracterización por espectrometría de masas (Figura 4.26) se observaron los iones $M+1=279.17$ correspondiente a la protonación de la molécula, lo cual nos confirma el peso molecular del compuesto igual a 278 (que aplicando la regla del nitrógeno, es de masa par por contener dos átomos de nitrógeno) sumado a la masa de un H, confirmando así la obtención del compuesto de interés. El ión de masa observado de 301.15 es el resultado de la cationización del compuesto con ion sodio, así como con potasio, al observarse el ion $M+K=317.13$.

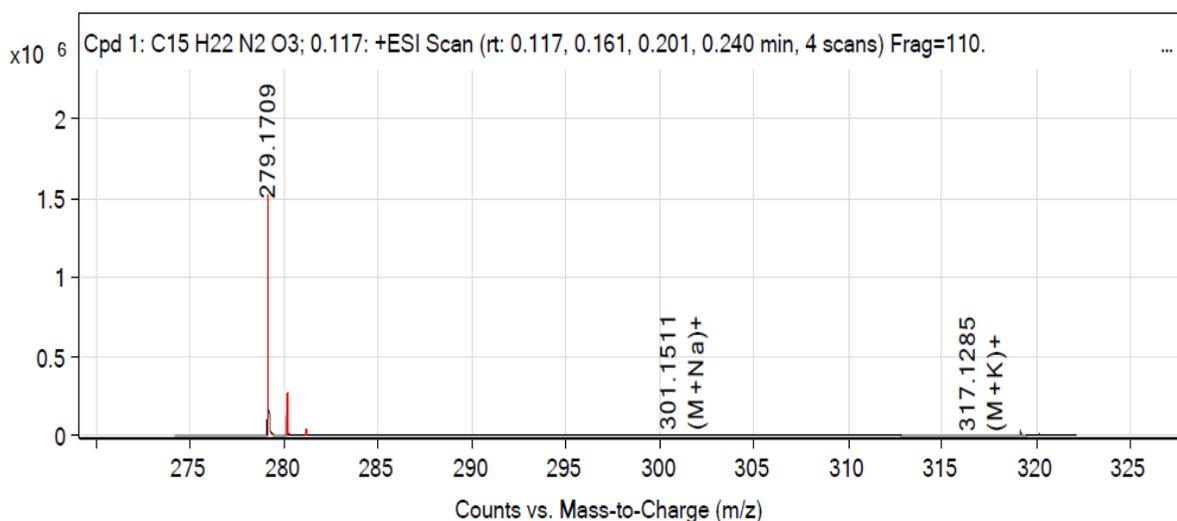


FIGURA 4. 26 Espectro de masas de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il)etoxi) benzaldehído

En el caso de la determinación de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C. Similarmente al compuesto anterior se emplearon tablas de correlación de desplazamiento para confirmar la estructura. Procediendo a la interpretación del espectro de ¹H (Figura 4.27). El tipo de señales, su multiplicidad y su desplazamiento químico son **¹H-NMR (300.08 MHz, CDCl₃, 25°C)**: 1.43 (c, 2H, **CH₂-(CH₂-CH₂)₂-N**), 1.63 (q, 4H, **CH₂-(CH₂-CH₂)₂-N**), 2.58 (t, 2H, **CH₂-(CH₂-CH₂)₂-N**), 2.85 (t, 2H, **N-CH₂-CH₂-O**), 4.29 (t, 1H, **N-CH₂-CH₂-O**), los cuales son correspondientes al halogenuro O-alkilante los cuales presentan un desplazamiento similar al obtenido en el compuesto anterior (Figura 4.20), se encuentra igual el desplazamiento de 3.78 (s, 3H, **OCH₃**), correspondiente al CH₃ del grupo metoxilo en la posición *meta*, de igual forma se observan los desplazamiento en 6.85 (d, 1H, CH_{Ar}), 6.95 (d, 1H, CH_{Ar}), los cuales corresponden a los hidrógenos de tipo aromáticos siendo que en este caso la posiciones *orto* y *meta* adyacentes no alquiladas presentan, 8.00 (s, 1H **CH=NOH**), el cual corresponde al hidrógeno unido al carbono adyacente a el grupo oxima el cual es desplazado a campos más bajo debido a la introducción del compuesto oxima y por último la señal correspondiente a 10.77, la cual está asignada al grupo **-OH** de la oxima (s.1H, **NOH**). El cual confirma la formación del grupo oxima mediante la

sustitución de la señal de del aldehído en la posición de 9.79 ppm, recalcando la aparición de las dos señales: la de 8.0 y a 10.77 ppm característicos de la oxima, y que son diferentes en desplazamiento químico a la del aldehído precursor (Figura 4.19), lo cual constituye la prueba más importante hasta ahora del cambio de grupo funcional observado de acuerdo a lo propuesto por Jacobsen (2017).

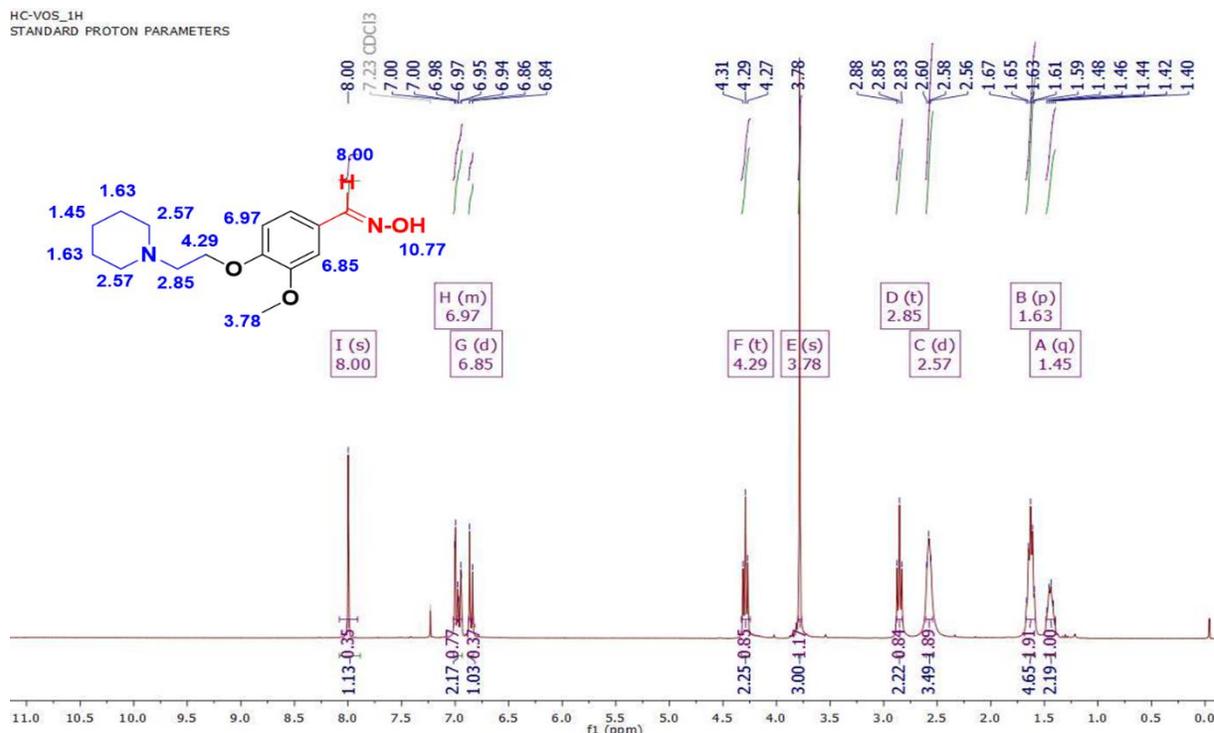


FIGURA 4. 27 Espectro de RMN de ^1H experimental de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il)etoxi) benzaldehído

De la misma manera que en el caso de la resonancia magnética protónica, se llevó a cabo la interpretación del espectro de ^{13}C obtenido experimentalmente (Figura 4.28), se corresponde a ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ_c ppm =24.09 (CH_2 -(CH_2 - CH_2) $_2$ -N), 25.48 (CH_2 -(CH_2 - CH_2) $_2$ -N), 55.29 (CH_2 -(CH_2 - CH_2) $_2$ -N), 57.56 (N- CH_2 - CH_2 -O), 66.81 (N- CH_2 - CH_2 -O), siendo los desplazamientos correspondientes al amina terciaria, δ =56.03 (OCH_3), para el carbono del metilo del grupo metoxilo y por ultimo 109.81, 113.24, 120.26, 126,24, 148,95, 149.53 (6 Ar) sientos los desplazamientos característicos de las señales de C's aromáticos, siendo una característica sobre

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

saliente la aparición de la señal en 149.41 ppm la cual corresponde al grupo oxima (**CH-NOH**), las cuales se correlacionan en el desplazamiento químico de las señales, y son idénticas en el número de señales para carbonos alifáticos, aromáticos y el del grupo funcional oximino. De acuerdo con esta información, las señales en el espectro obtenido experimentalmente, se corresponden con la estructura del producto: la oxima de la vainillina O-alkilada. De manera muy importante y como se señaló en el análisis e interpretación de la espectrometría de RMN de ^1H ; las señales RMN de ^{13}C en 149.41 ppm (**CH-NOH**) característico de la oxima, es de diferente desplazamiento químico a la del aldehído precursor (**CH=O**), observado a 192.52 ppm (Figura 4.22), constituye una prueba confirmativa del cambio de grupo funcional observado en comparación con las tablas de correlación de desplazamiento químico presentada por Jacobsen (2017).

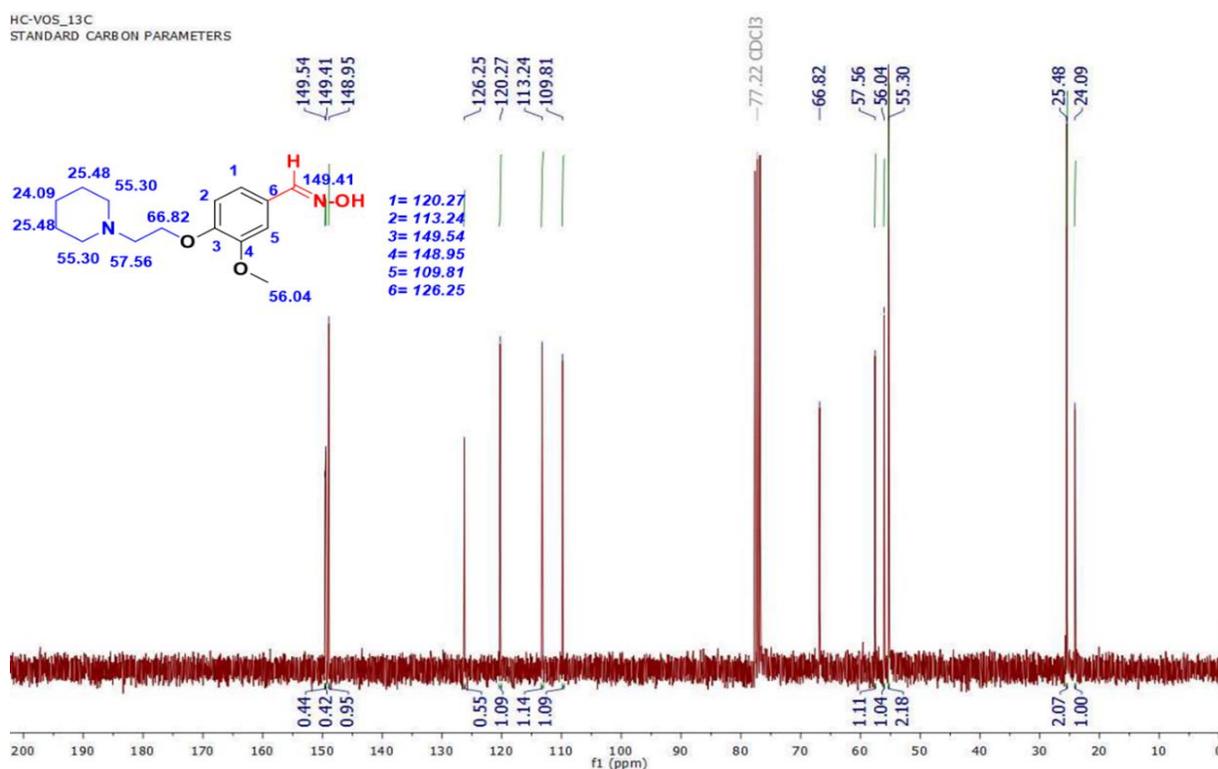


FIGURA 4. 28 Espectro de RMN de C13 obtenido experimentalmente de la oxima de 3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído.

4.2.5. Síntesis del compuesto (3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina mediante el sistema de NaBH_4/I_2

En el caso de la síntesis de este compuesto se ha realizado la reducción de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) benzaldehído mediante el procedimiento presentado por Li *et al*, (2014) empleando el sistema de NaBH_4/I_2 en THF, se realizó el seguimiento de la reacción mediante CCF sin embargo no se observó cambio, además de obtener un rendimiento bajo del crudo de reacción (20%) por lo cual se descartó esta reacción (Figura 4.29).



FIGURA 4. 29 CCF de la reacción de reducción química con NaBH_4/I_2 donde As=Aldehído O-alquilado, Os=Oxima O-alquilada, Rx= Reacción de reducción

4.2.6. Síntesis de clorhidrato de (3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina mediante hidrogenación catalítica.

Siguiendo la técnica repostada por Gannett, (1988), que reportó la síntesis de la vainillilamina que en el proceso de hidrogenación produce el clorhidrato, realizando el seguimiento de la reacción mediante CCF (Figura 4.30) en un intervalo de 4 horas, donde se observó un cambio en el R_f del producto respecto del compuesto de partida, suponiendo la transformación completa, dando por terminada la reacción. Se procedió a la purificación del compuesto, obteniéndose un polvo amarillo pálido con un rendimiento del 94%.



FIGURA 4. 30 CCF de la reacción de hidrogenación catalítica donde VOS=Oxima de vainillina O-alkilada y Rx 1,2 y 3 = amina de vainillina O-alkilada

4.2.7. Elucidación estructural del compuesto clorhidrato de (3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina

El punto de fusión del compuesto que fue obtenido por hidrogenación catalítica obtenido por triplicado, fue de $230\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$.

En el espectro de IR del compuesto (Figura 4.31), no se observan las bandas características del grupo funcional amina en este caso una amina primaria la cual corresponde una absorción en 3200 cm^{-1} ; sin embargo debido al método de obtención del mismo, el cual es obtenido en forma de clorhidrato por lo cual se observan un desplazamiento de la señales características de grupo funcional de 3200 cm^{-1} a 2640 cm^{-1} , más bien características de una sal de $-\text{NH}_3$ y una sobre posición de señales en donde se observan los estiramientos C-H de aromáticos y alifáticos $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ encontrando lo que se conoce como banda de amonio, el cual a su vez es característico de sales de amonio o aminas protonadas de acuerdo a lo presentado por Wade, (2011) que describe en cambio de las señales de los tipos de aminas y sus respectivos desplazamiento, de igual forma los presentes para los hidroclouros de amina confirmando la presencia de la metanamina en su forma de clorhidrato.

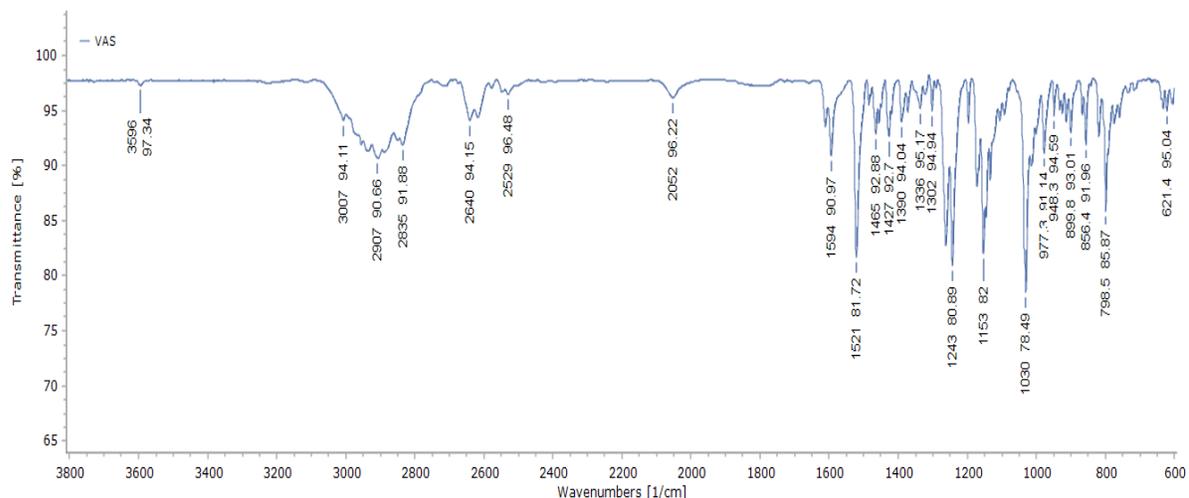


FIGURA 4. 31 Espectro de Infrarrojo de 3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il- etoxi) fenil) metanamina.

En el caso del análisis de Espectrometría de Masas del compuesto, (Figura 4.32) se empleó el método ESI-MS/MS el cual muestra los siguientes iones $M+1=265.19$, $M+Na= 287.17$, característicos de la cationización de la molécula del compuesto con iones de H y Na, respectivamente, por lo que el peso molecular del compuesto es 264.

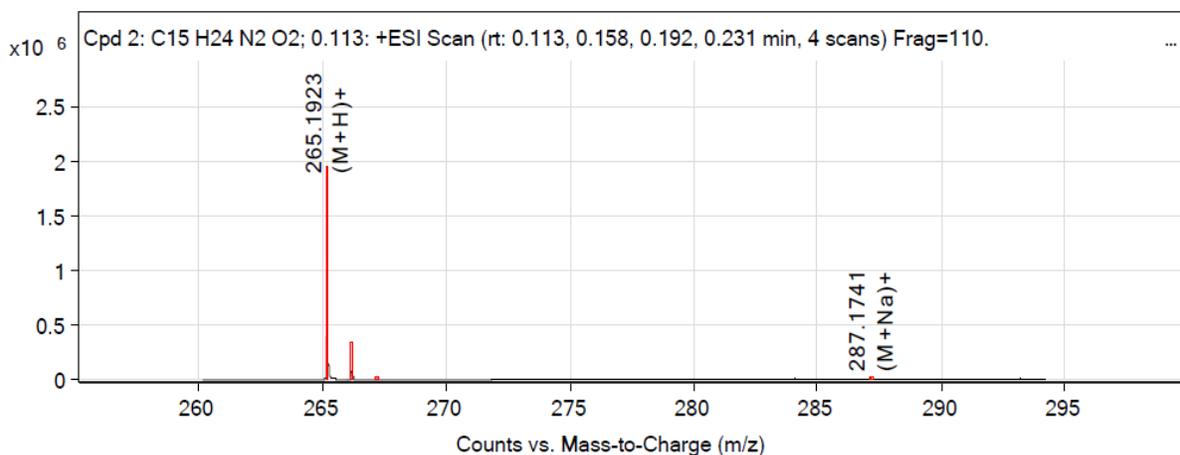


FIGURA 4. 32 Espectro de Masas de 3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.

Al igual que en los compuestos anteriores se caracterizó mediante RMN protónica y carbono. En el caso del espectro de RMN de ^1H fueron empleadas tablas de correlación (Figura 4.20) para realizar la caracterización del espectro obtenido experimentalmente (Figura 4.33), $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , 25°C) δ_{H} ppm = 1.64 (c, 2H, $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_2\text{-N}$), 1.84 (q, 4H, $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_2\text{-N}$), 3.18 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_2\text{-N}$), 3.36 (t, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 4.33 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), al igual que los compuestos anteriores se encuentran las señales del halogenuro de alquilo introducido a la estructura correspondiendo al desplazamiento presentado en la FIGURA 4.19 , 3.91 (s, 3H, OCH_3), señal del metoxilo, 4.08 (t, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH}_2$), el cual es un señal principal en la interpretación de este espectro debido al cambio en la estructura de la molécula debido a la reducción del doble enlace adyacente de la oxima desplazándola a campos más altos debido a la introducción del grupo funcional amina colocándola en esta posición el cual corresponde a un CH_2 alifático presentado en la metanamina sintetizada, la señal presentada en 4.97 (s, 3H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH}_3^+\text{Cl}$), la cual es correspondiente al compuesto obtenido confirmando la síntesis de la amina en su forma de clorhidrato por lo cual se puede observar con una intensidad similar al metoxilo, por su parte las señales de 7.06 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.20 (d, 1H, CH_{Ar}). Se observa que el grupo amino al encontrarse en su forma de clorhidrato se ve más desprotegido por lo cual la señal se desplaza a campos más bajos en la sección de las señales aromáticas por lo cual se integra en un singulete y de igual forma el metileno adyacente al grupo amino protegido es desplazado a campos más bajos, debido al efecto desprotector del grupo R-NH_3^+ , de igual forma se nota la ausencia de las señales de su compuesto predecesor la oxima de vainillina O-alquilada (FIGURA 4.27) la cual presenta sus señales características en 8.00 ppm y 10.77 correspondientes a la estructura propia del compuesto mencionado, a su vez se observa la integración de la señal del grupo amino el cual se integra para tres hidrógenos correspondiendo a él clorhidrato de la amina encontrando concordancia a lo propuesto por Wade, (2011) y Jacobsen (2017).

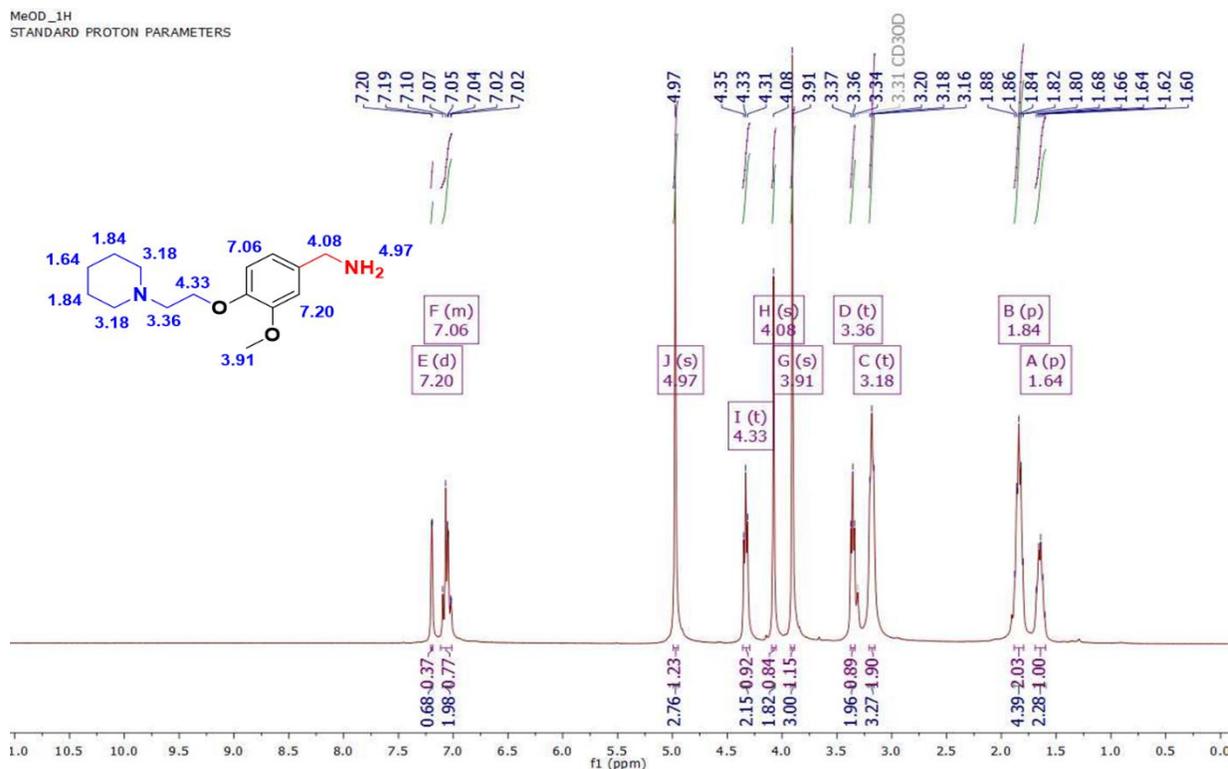


FIGURA 4. 33 Espectro de RMN de ^1H , obtenido experimentalmente, de 3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi)fenil)metanamina.

Por su parte los desplazamientos químicos de los mismos carbonos en el espectro de ^{13}C , obtenido experimentalmente (Figura 4.34), δ_c ppm = 23.28 (CH_2 - $(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{-N}$), 24.85 (CH_2 - $(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{-N}$), 44.19 ($\text{Ar-CH}_2\text{-NH}_2$), 55.23 (CH_2 - $(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{-N}$), $\delta=56.61$ (OCH_3) y 57.67 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 65.87 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 113.98, 115.95, 122.90, 128.83, 149.29, y 151.32 (6 CHAr). De las cuales la señal de principal importancia es la correspondiente al carbono del metileno unido al grupo amino el cual presenta un desplazamiento a campos más bajos, al efecto electronegativo de este grupo funcional en su forma más bien protonada, grupo R-NH_3^+ , a diferencia de la señal mostrada en la figura 4.28 correspondiente a espectro de carbono de la oxima O-alkilada la cual muestra una señal en 149.41 ppm correspondiente a el metino (CH) unido al grupo oxima, confirmando de esta forma la presencia de la metanamina sintetiza en su forma de sal iónica de acuerdo a lo mostrado por Wade, (2011) y Jacobson, (2017).

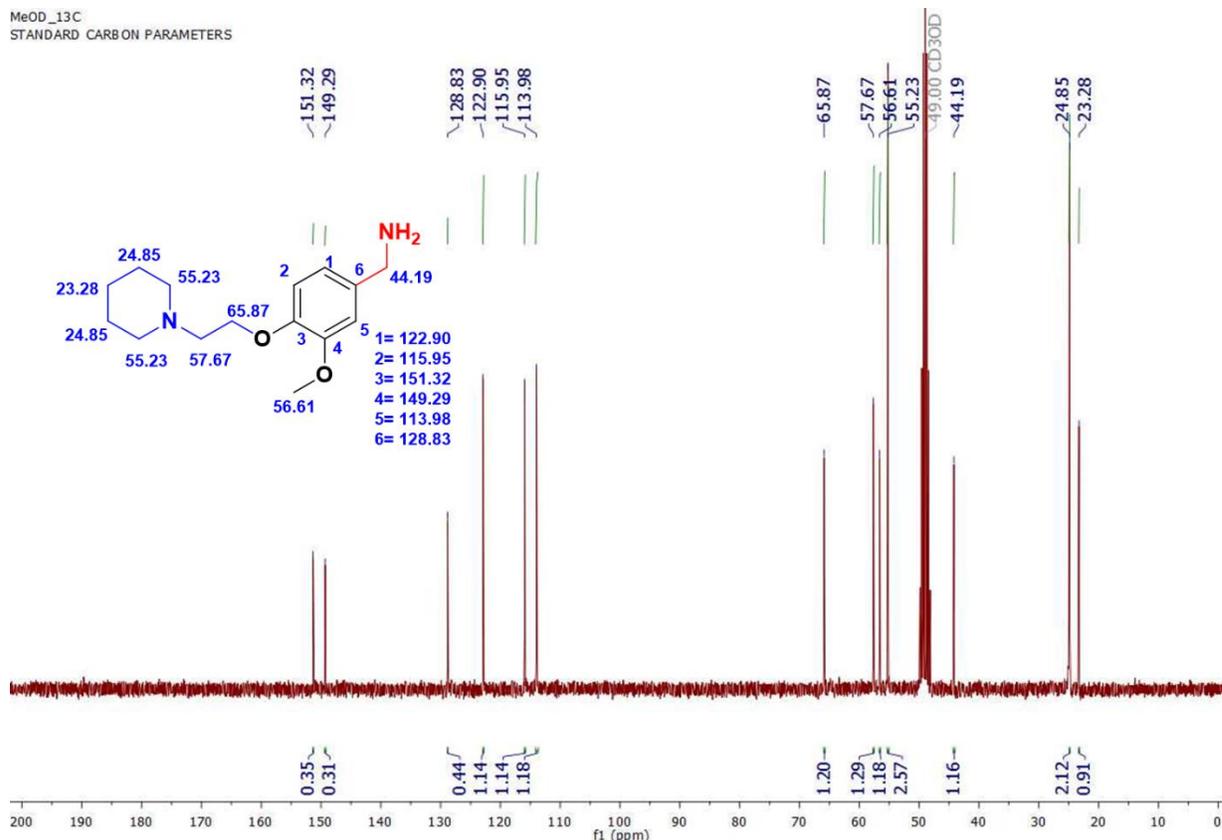


FIGURA 4. 34 Espectro de RMN de ¹³C, obtenido experimentalmente, de 3-metoxi-4(-2-(peridin-1-il-etoxi)fenil)metanamina.

De acuerdo con la información obtenida mostrada con anterioridad, las señales en el espectros obtenidos experimentalmente, corresponden con la estructura del producto: de 3-metoxi-4(-2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.

4.2.8. Síntesis de la valproamida de (3-metoxi-4(-2-(peridin-1-il-etoxi)fenil) metanamina.

En el caso de esta síntesis llevada a cabo mediante reactivos de acoplamiento se realizó el monitoreo de la reacción primeramente a un tiempo de 4 horas mediante CCF, ante la baja conversión se dejó durante la noche y de acuerdo a un nuevo monitoreo nuevamente mostró que la reacción no había progresado suficientemente por lo cual se prosiguió con los lavados de agua a pH alcalino y se continuo con la extracción y la remoción del disolvente de la fase orgánica para obtener el producto

sin purificar. El rendimiento obtenido fue muy bajo (7%), por lo cual se procedió a modificar los cálculos observando que era necesario mejorar la desprotonación de la amina tal cual lo presenta Reyes *et al.*, (2002), mediante una analogía presentada de manera enzimática, empleando un agente básico, puesto que el producto se encontraba en su forma de clorhidrato. Se procedió a emplear una cantidad en exceso de TEA como base. El rendimiento de la reacción mejoró de manera significativa con la cantidad en exceso de la amina, con lo que el rendimiento aumentó a un 54%, lo cual facilitó su purificación mediante cromatografía en columna, empleando silica gel y como la fase móvil una mezcla de acetato de etilo-metanol 50/50.

4.2.9. Elucidación estructural de la valproamida de (3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.

El punto de fusión determinado por triplicado para este compuesto fue de 97°C. Para la elucidación estructural del compuesto obtenido: la valproamida de 3-metoxi -4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina (Figura 4.35), mediante acoplamiento químico, se procedió a la caracterización bajo el mismo esquema seguido en la elucidación de los compuestos anteriores partiendo del análisis de espectro de infrarrojo, en el cual se observa la banda de absorción en la región de estiramientos N-H en 3204.94 cm^{-1} el cual corresponde al grupo funcional amida, además la señal del grupo carbonilo de la amida en 1639 cm^{-1} , lo que nos muestra la formación del grupo funcional de interés del producto, encontrando cambios con la metanamina (Figura 4.31) predecesora la cual mostraba las señales correspondientes a la formación del banda de amonio en un rango de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$. Así como cambios en la región de huellas dactilares encontrando un desplazamiento de la señal del compuesto predecesor en 1594.90 a 1639.84 cm^{-1} debido al cambio del grupo funcional característico de este compuesto el cual se encuentra entre los rangos presentados por Hesse *et al.*, (1995), Wade, (2011) y Jacobson, (2017).

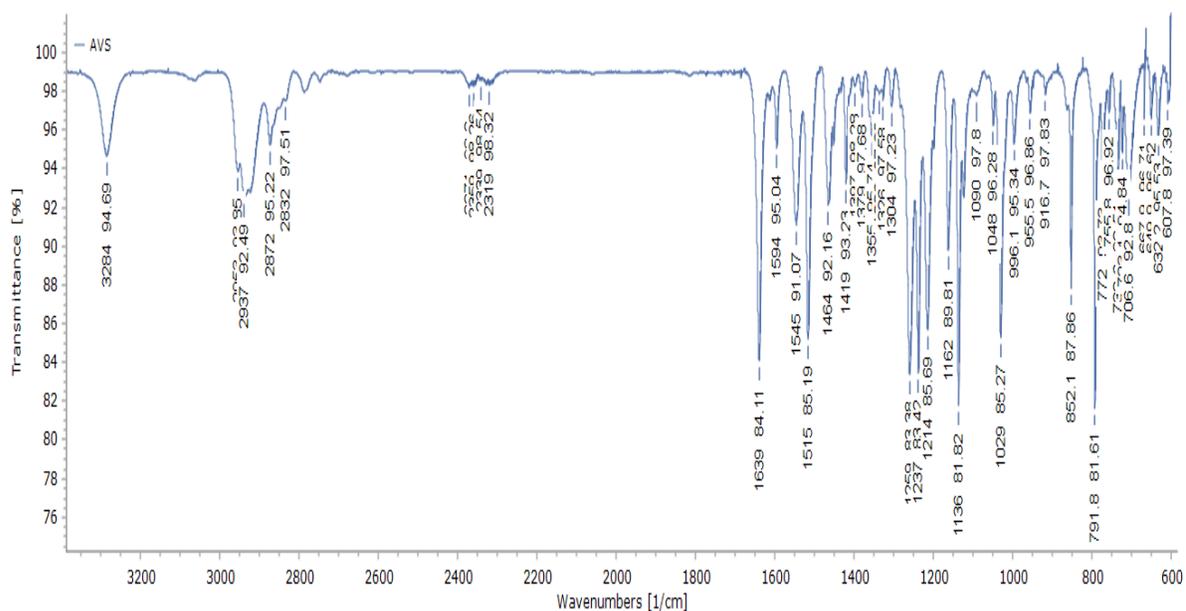


FIGURA 4. 35 Espectro infrarrojo de 3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi)fenil) metanamina.

En el caso del análisis de Espectrometría de Masas del compuesto, (Figura 4.36) se empleó la técnica ESI-MS/MS, que muestra los siguientes iones M+H, M+Na de masas 391.3 y 413.26 respectivamente, por lo que el peso molecular es de 390, que satisface la regla del nitrógeno de masa par, para un compuesto que contiene un número par de Nitrógenos.

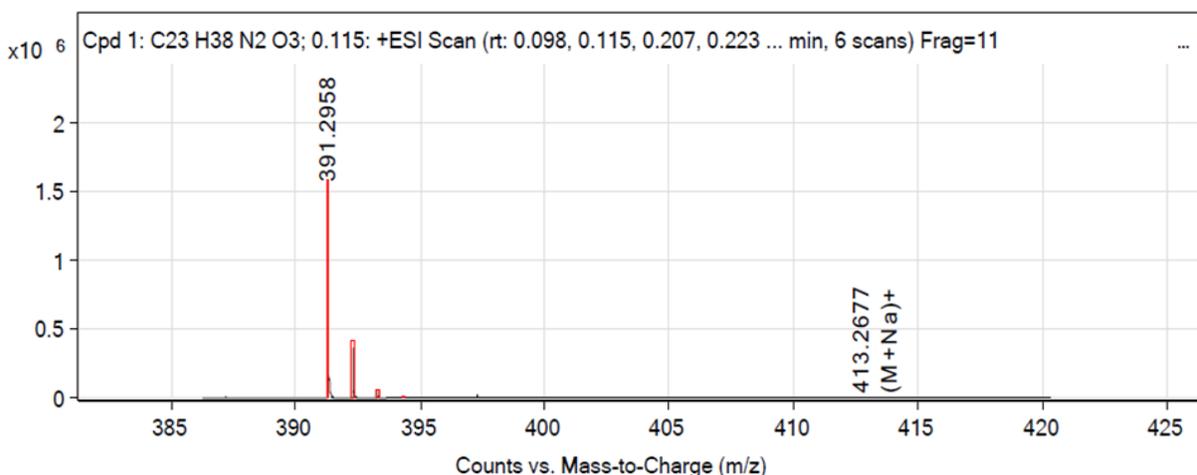


FIGURA 4. 36 Espectro de masas de valproamida de 3-metoxi-4(-2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.

En la caracterización mediante resonancia magnética nuclear protónica (Figura 4.37) se obtuvieron los siguientes desplazamientos químicos $^1\text{H-NMR}$ (**300 MHz, CDCl_3 , 25°C**) δ_{H} ppm= 0.86 (t, 6H, ($\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}$)), señales correspondientes a los radicales CH_3 del ácido valproico, 1.32 (m, 4H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}$), 1.32 (m, 2H, ($\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{N}$)), 1.32 (m, 4H, ($\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}$)), las señales anteriores son representativas de los desplazamientos químicos de las señales del halogenuro de alquilo sin embargo se observan igual una sobreposición de las señales presentadas por el acilante introducido en la estructura de la molécula de interés, debido a este característica se observa un mutiplete en 1.32 ppm, 1.59 (t, 4H, ($\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{N}$)), 2.51 (t, 4H, ($\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{N}$)), conformando los tripletes correspondientes a las señales de metilenos correspondientes a la amina heterocíclica, 2.00 (q, 1H, ($\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}$)), metino de la cadena de ácido valproico, 2.80 (t, 2H, ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$)), 4.12 (t, 2H, ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$)), alifáticos del halogenuro de alquilo, 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.36 (d, 2H, ($\text{CH}_2\text{-NH}$)), 5.72 (t, 1H, ($\text{CH}_2\text{-NH}$)), 6,77 (m, **C-H Ar**). Acoplamiento de las señales de aromáticos, lo cual se correlación de manera directa con lo mostrado en la figura 4.20 de esta sección, encontrado como puntos clave la desaparición de la señales del grupo R-NH_3^+ en 4.97 ppm, encontrando en su lugar la señal de 5.72 perteneciente el enlace del grupo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

amida mono sustituido (CO-NH-R), obviando la aparición de las señales pertenecientes al acilante introducido, lo cual a su vez presenta similitud a lo mostrado en la Figura 4.20 y lo descrito por Wade, (2011) y Jacobson, (2017).

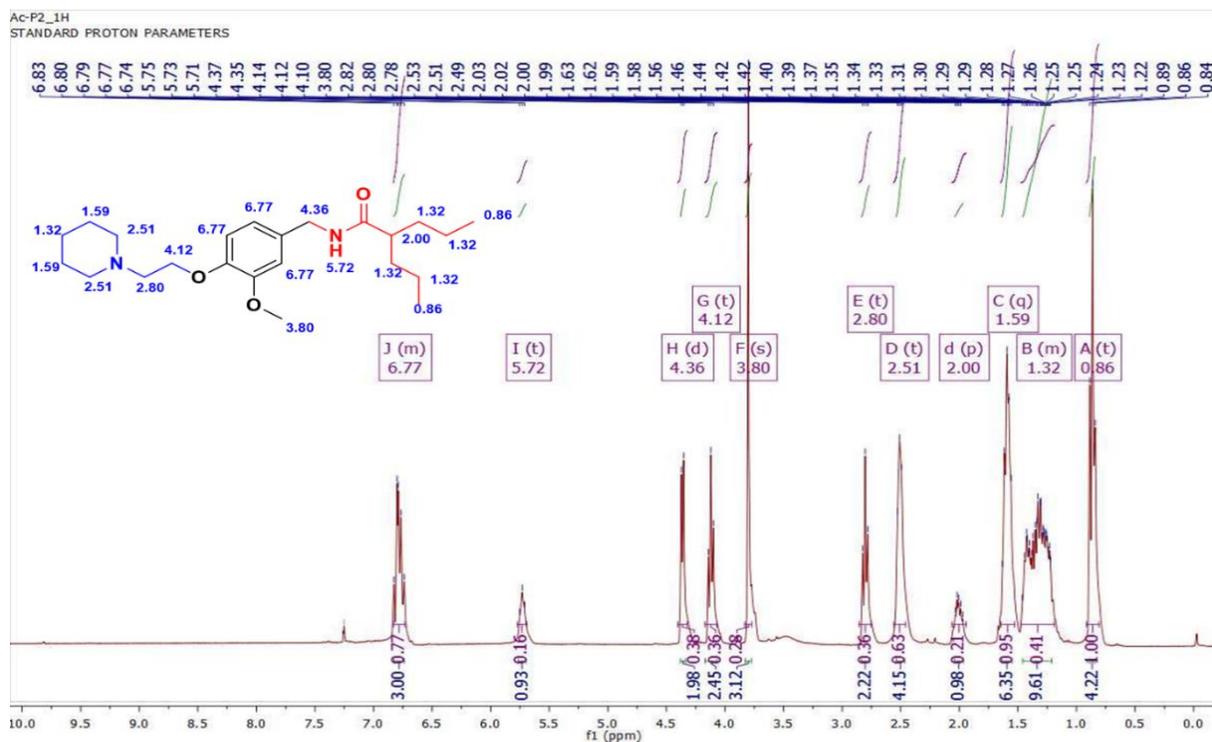


FIGURA 4. 37 Espectro de RMN de ^1H de la valproamida de 3-metoxi-4-(-2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.

Para la caracterización mediante la resonancia de carbono se obtuvieron los siguientes desplazamientos químicos (Figura 4.38), ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ_c ppm = 13.83 ($(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}$), 20.59 ($(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH})_2$), 23.78 ($(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N})_2$), 25.48 ($(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}$), 35.00 ($(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}$), 42.81 ($(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}$), 47.51 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 54.49 (OCH_3), 55.49 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N})_2$), 57.34 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 66.38 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 111.08, 112.80, 119.70, 131.33, 147.26, 149.24 (C-HAr), 175.0 (C=O). Observado al igual que en su variante protónica la presencia de señales correspondientes a ácido valproico las cuales presentan un desplazamiento similar a los carbonos del halogenuro del alquilo empleado, a su vez se observa en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

175 ppm la señal propia del carbonilo (C=O) del amida, el cual no se encontraba presente en la molécula predecesora (Figura 4.34), así como la presencia de metilos (CH₃) introducidos en 0.86 ppm representativos del acilante introducido, lo cual es presenta similitud a lo mostrado en la figura 4.22 de esta sección correspondiente a los desplazamientos mostrados por Jacobson, (2017).

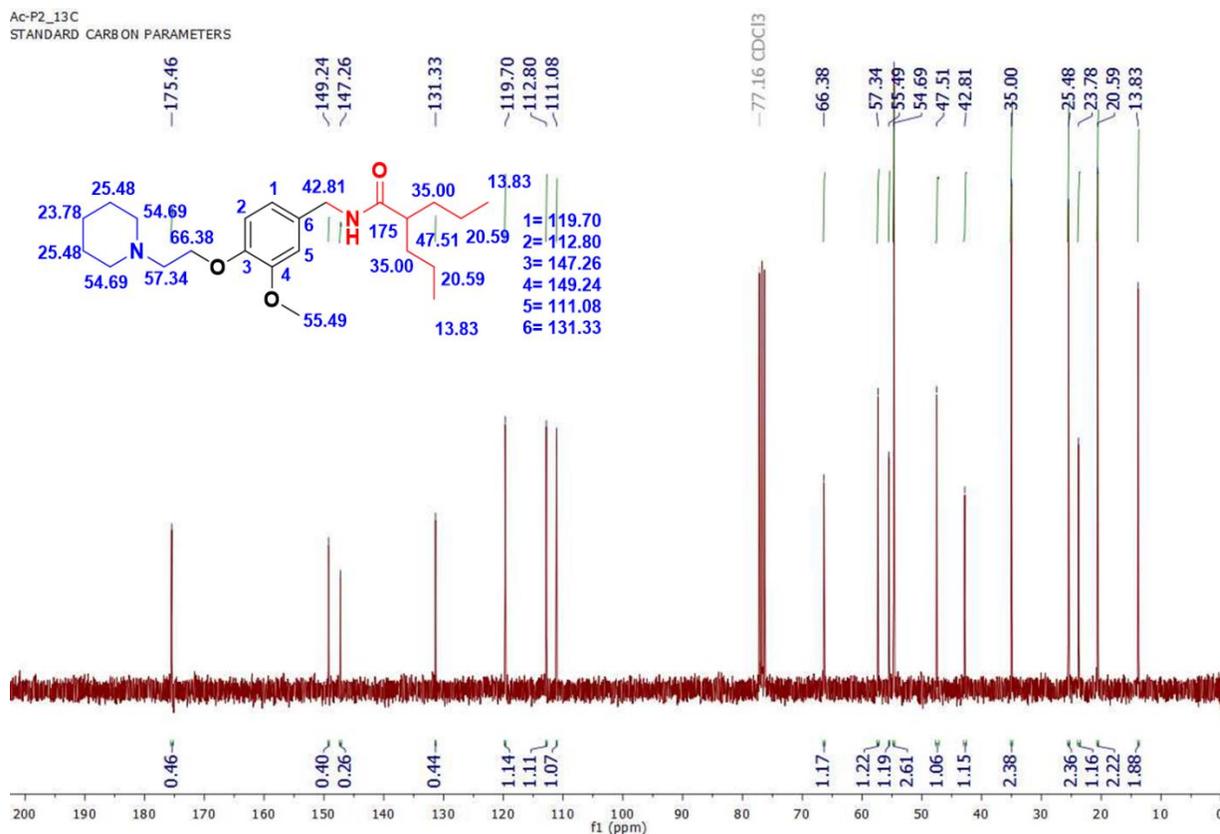


FIGURA 4. 38 Espectro de RMN de ¹³C de la valproamida de 3-metoxi-4(-2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina.

4.2.10. Síntesis químico-enzimática de (3-metoxi-4-(2-(piperidin-1-il) etoxi) fenil) benzaldehído O-(2-etoxibutanoil) oxima (Valproato de oxima de vainillina O-alquilada)

De acuerdo a los resultados obtenidos en ambas reacciones no se logró ver un cambio en CCF (Figura 4.39), lo cual es traducido en que las reacciones no fueron llevadas a cabo por lo mediante las condiciones propuestas por lo tanto se descartó la obtención de este compuesto mediante las metodologías químico-enzimáticas propuestas.

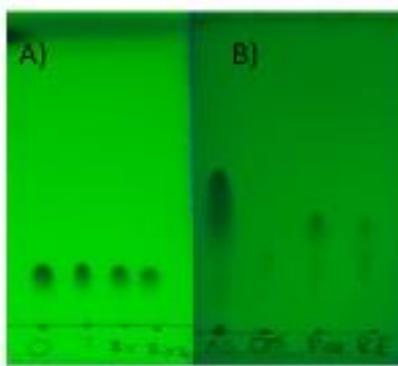


FIGURA 4. 39 A) CCF de la reacción de transesterificación de la oxima de vainillina alquilada, O=Oxima de vainillina alquilada T=testigo de la reacción RX1= reacción 1 Rx2=reacción 2; B) CCF de la reacción de acilación de la oxima de vainillina alquilada a temperatura ambiente (TA) donde As= vainillina alquilada, Os=Oxima alquilada, RQ= Reacción química RE= Reacción enzimática

4.3. Resultados de los ensayos biológicos

De acuerdo a los resultados obtenidos en el diseño y síntesis de los compuestos fueron seleccionados aquellos que presentaran las mejores interacciones con el péptido y que a su vez fue posible obtenerlas mediante las técnicas mostradas por lo cual se procedió a la evaluación del clorhidrato de vainillilamina O-alquilada la cual mostró una buena energía libre para las conformaciones propuestas del péptido, a su vez la valproamida de vainillilamina O-alquilada de igual forma fue propuesta por motivos similares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el ensayo de fluorescencia el cual fue realizado por duplicado se observa una reducción en el aumento de la fluorescencia en un tiempo de 48 horas, tomando como control el péptido β A comercial nuevo, el cual fue usado en dos diferentes tiempos 0 y 48 horas empleando solo el compuesto solo y a su vez se tomaron dos muestras más a las cuales se les adicionaron los compuestos a una concentración 100 μ M los compuestos utilizados en los ensayos *in vitro* fueron el clorhidrato de (3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina (Clorhidrato de vainillilamina O-alquilada) (VAS) y la valproamida de 3-metoxi-4-(2-(peridin-1-il-etoxi) fenil) metanamina (Amida de vainillilamina o-alquilada) (AVS).

De acuerdo a los resultados obtenidos de las lecturas realizadas se observa una reducción en la fluorescencia a la adición de los compuestos encontrado el máximo de absorción en la longitud de onda de 483 nm de acuerdo a lo presentado por Hernández *et al.*, (2015) (Figura 4.40), procediendo a comparar la inhibición en este punto.

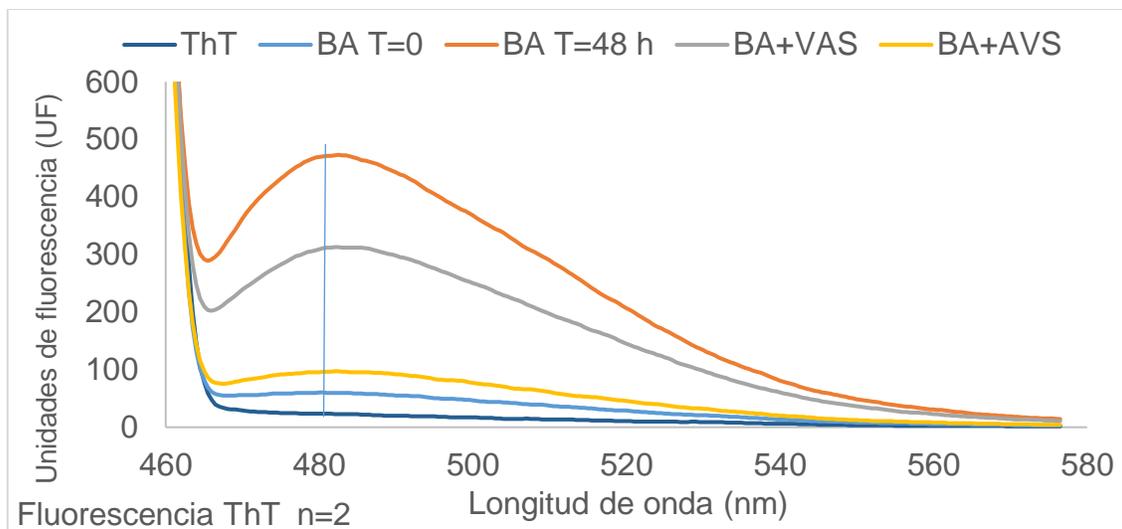


FIGURA 4. 40 Espectro de fluorescencia ThT de los compuestos inhibitorios

A partir de la comparación realizada en función de la reducción de la fluorescencia se traduce en la reducción de la agregación del péptido encontrado una reducción significativa de agregación especialmente en la valproamida O-alquilada a diferencia el clorhidrato de la amina (Figura 4.41). Obteniendo un rendimiento mejor que el presentado por Hernández *Et al.*, (2015), la cual reporta un rendimiento del 53 al 73 % en los compuestos empleados.

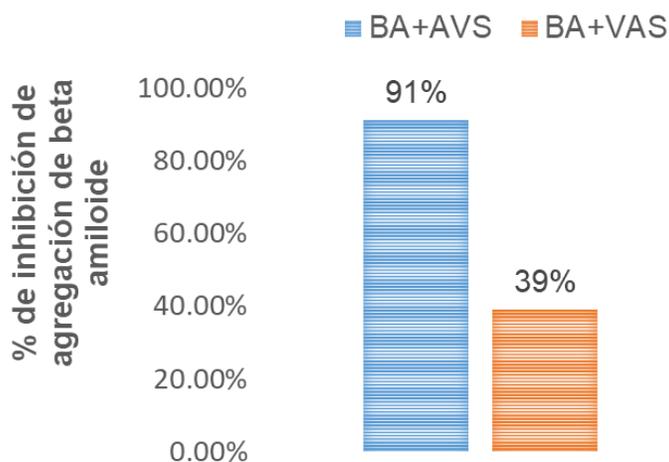


FIGURA 4. 41 Porcentaje de inhibición de la agregación de los compuestos

Al término del procedimiento de elaboración de los geles de electroforesis se procedió con la tinción y posterior caracterización se observa en el caso del gel a tiempo inicial (Figura 4.42) la presencia de una banda en la zona inferior del gel, encontrándose en el rango de 10 a 3.8 KDa de acuerdo a los marcadores moleculares lo cual corresponde a la presencia del péptido en su forma monomérica o bien comenzando su oligomerización en un dímero encontrando concordancia con lo presentado por Hernández *et al.*, (2014) y Hernández *et al.*, (2015) de acuerdo a las condiciones presentadas.

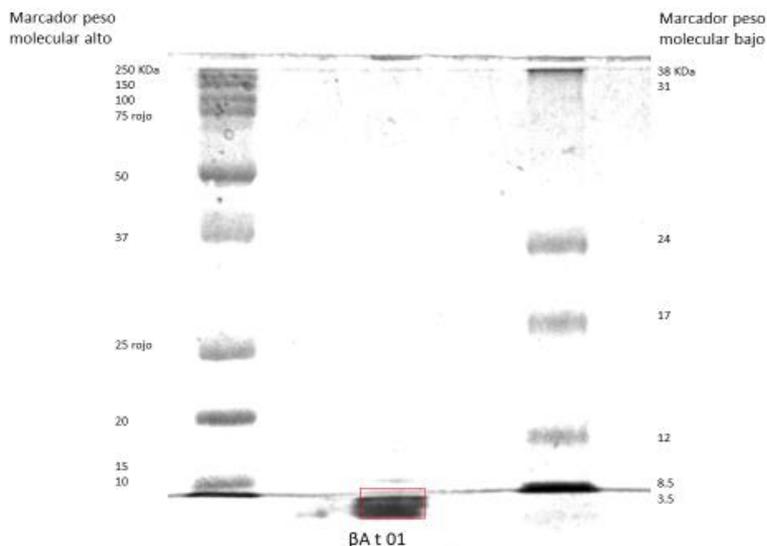


FIGURA 4. 42 Gel de electroforesis al 14% tiempo inicial (0 horas)

Sin embargo, en el caso del gel de 48 horas (Figura 4.43) no se observó un cambio en el desplazamiento de las bandas del control de βA , así como en las muestras con compuestos inhibidores, encontrando diferencias a lo descrito por Hernández et al.,(2014), el cual presenta una metodología similar sin embargo el tiempo de incubación es diferente, adema del uso de tinción de plata la cual presenta una mayor sensibilidad de detección de las bandas, debido a esto no fue permitió conocer las especies de agregación formadas durante el tiempo de incubación, así como las formadas con presencia de los inhibidores o en su defecto poder observar la inhibición del mismo restando validez a esta técnica.

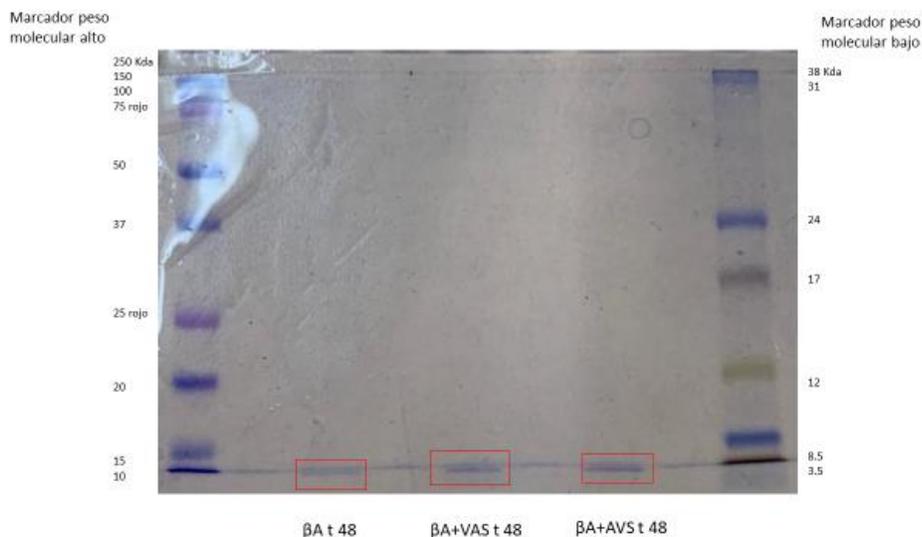


FIGURA 4. 43 Gel de electroforesis 14% tiempo final (48 horas) con compuestos inhibidores

Por último se procedió a la observación de la morfología presentada por el péptido en la presencia y ausencia de los ligandos como inhibidores mediante microscopia de fuerza atómica bajo los parámetros presentados por, donde se en observo el caso del control de βA en el tiempo de 48 horas la formación de agregados fibrilares del péptido, con unas dimensiones de 100 a 300 nm de ancho y una altura de 5 nm hasta 27 nm, difiriendo a lo reportado por Hernández *et al.*, (2015) la cual reporta para la conformación fibrilar de 30 nm de ancho y 20 de alto, lo cual podría ser debido al tiempo de incubación empleando el cual es el doble a utilizado por el autor.

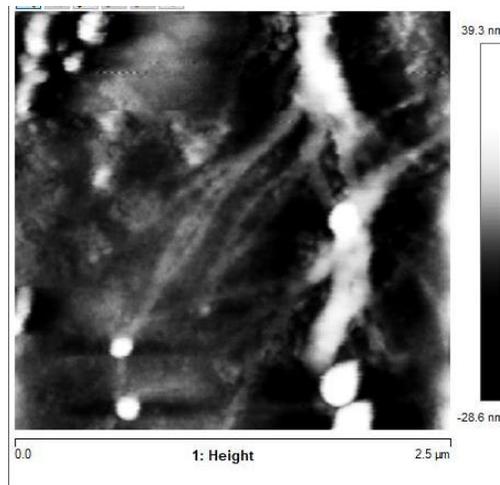


FIGURA 4. 44 Micrografía control de β A tiempo final (48 horas)

Por su parte la morfología presentada por el péptido más la valproamida de vainillilamina O-alkilada, no presenta una conformación fibrilar sin embargo se observan agregados con un ancho que va desde los 20 a 50 nm de ancho, así como de 2 a 7 nm, presentado un comportamiento similar en a lo presentado por Hernández *et al.*,(2015), la cual reporta la formación de oligómeros esféricos característicos del péptido, no obstante el tamaño de los mismos era mayor a los reportados (10-30 nm) debido posiblemente al tiempo de incubación empleado, sin embargo la imagen presenta distorsión la cual es propia de este tipo de muestras las cuales tienden a cargarse electrostáticamente en el ambiente.

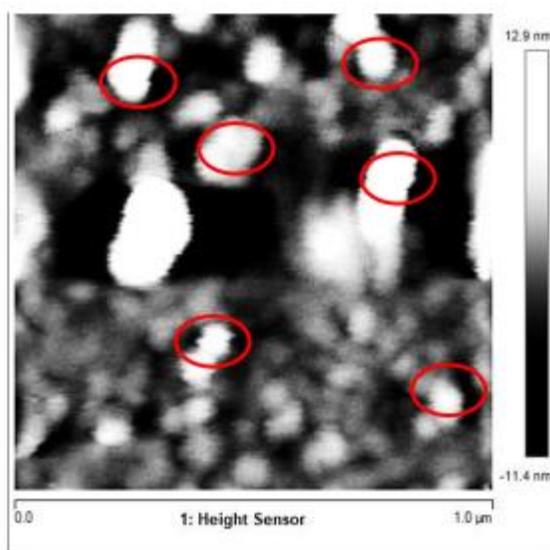


FIGURA 4. 45 Micrografía de β A + valproamida de vainillilamina O-alquilada tiempo final (48 horas)

De igual forma se observó un comportamiento similar al anterior en el caso de la micrografía del β A mas el clorhidrato de vainillilamina O-alquilada, el cual no muestra conformaciones fibrilares, en su lugar se observaron conformaciones amorfas de 20 a 40 nm de ancho, así como de 2 hasta 5 nm de alto, lo cual coincide en el tamaño presentado por Hernández *et al.*,(2015) (10-30 nm) lo cual demuestra una reducción de la fibrilación en el caso de ambos compuestos inhibidores, sin embargo la presencia de las distorsión en la imágenes provoca una incertidumbre sobre en análisis de las micrografías por lo cual es recomendable realizar réplicas de las micrografías.

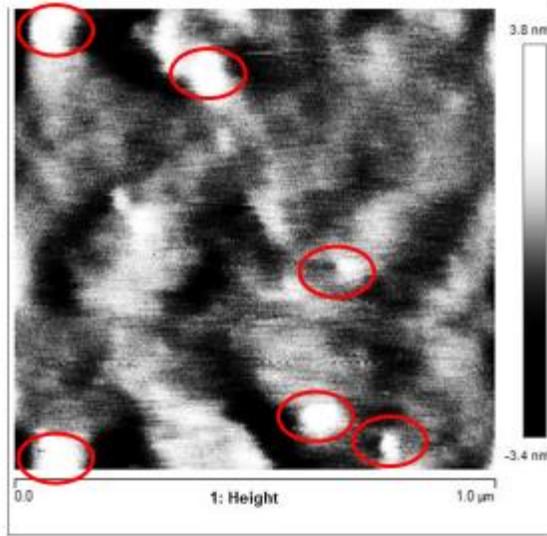


FIGURA 4. 46 Micrografía de βA + vainillilamina O-alquilada tiempo final (48 horas)

CONCLUSIONES

Se obtuvieron cuatro de los cinco objetivos moleculares propuestos los cuales fueron: el aldehído, oxima, amina y amida en rendimientos similares a los presentados por la literatura, sin embargo el resultado presentado en el valproato no fue satisfactorio, debido a que no logro ser obtenido mediante los métodos presentado en la literatura consultada.

Se caracterizaron, elucidaron y confirmaron las estructuras de los compuestos obtenidos, mediante técnicas Instrumentales propuestas (FT-IR, RMN de ^1H y ^{13}C , ESI-MS/MS), además de su determinación de punto de fusión.

Los compuestos empleados en las pruebas *in vitro* demostraron una efectividad alta en la reducción de la oligomerización mediante la técnica de espectroscopia de fluorescencia con tioflavina T, siendo del 91% en el caso de la valproamida, la cual presento una reducción en la oligomerización bastante significativa.

Los resultados de electroforesis no mostraron el desplazamiento de las bandas propias del péptido, así como de los compuestos con inhibición, lo cual no permitió conocer la especie de agregación formada con los compuestos inhibidores.

Los resultados de microscopia de fuerza atómica mostraron concordancia con los reportados en la literatura, sin embargo es necesario replicar el ensayo mejorando las condiciones de almacenaje y de esta forma evitar sesgos de cualquier tipo.

REFERENCIAS

Albini, A. y Protti, S. 2016. Paradigms in Green Chemistry and Technology 123; Springer Briefs in Green Chemistry for Sustainability. Pp 25-61.

Anastas, P. T. y Warner, J.C. 1998. Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford: Oxford University Press. pp 120-165.

Ahluwalia, V., Garg, N., Kumar, B., Walia, S., y Sati, O. P. 2012. Synthesis, Antifungal Activity and Structure-Activity Relationships of Vanillin Oxime-N-O-Alkanoates. *Nat. Prod. Commun.* **7(12)**:1635-1638.

Aquino, J. 2017. Estudio de las reacciones de isomerización, acilación y eliminación de oximas de aldehídos aromáticos catalizadas por lipasas de *Candida antarctica* (Novozyme435). Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, Mexico.

Arthur, M. A. 2012. Obtención de fragancias (ésteres de oximas) mediante el uso de lipasas. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, Mexico.

Arthur, M. A., Oliart, R. M., Sánchez, M. G., y Valerio, G. 2018. Mechanochemo-enzymatic Synthesis of Aromatic Aldehyde Oxime Esters. *Nat. Prod. Commun.* **13(7)**: 875-878

Bansode, S. B., Jana, A. K., Batkulwar, K. B., Warkad, S. D., Joshi, R. S., Sengupta, N., y Kulkarni, M. J. 2014. Molecular Investigations of Protriptyline as a Multi-Target Directed Ligand in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, **9(8)**: 1-14.

Bettadaiah, B., Santosh Kumar, S., Vijendra Kumar, N., y Srinivas, P. 2014. A Convenient Practical Synthesis of Alkyl and Aryl Oxime Esters. *Synthesis*. **46(14)**: 1847–1852.

Blazer, L. L., y Neubig, R. R. 2008. Small Molecule Protein–Protein Interaction Inhibitors as CNS Therapeutic Agents: Current Progress and Future Hurdles. *Neuropsychopharmacology Reviews*, **34(1)**:126–141.

Braak, H., y Braak, E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, **82(4)**:239–259.

Broggi, S. 2019. Computational Approaches for Drug Discovery. *Molecules*, **24(17)**: 1-6.

Citron, M. 2010. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9(5)**:387–398.

Coumar, M.S., Jindal, D.P., Bruni, G., Massarelli, P., Singh, R., Sharma, A.K., Nandakumar, K., y Bodhankar, S.L., 2008, Synthesis, β -adrenergic receptor binding and antihypertensive potential of vanillin-derived phenoxypropanolamines, *Ind. J. Chem. - Section B Organic and Medicinal Chemistry*. **47(6)**: 903-909.

Conway, S. J. 2008. TRPping the switch on pain: an introduction to the chemistry and biology of capsaicin and TRPV1. *Chem. Soc. Rev.* **37(8)**: 1530-1545.

Chanquia, S. N., Boscaro, N., Alché, L., Baldessari, A., y Liñares, G. G. 2017. An Efficient Lipase-Catalyzed Synthesis of Fatty Acid Derivatives of Vanillylamine with Antiherpetic Activity in Acyclovir-Resistant Strains. *ChemistrySelect*. **2(4)**:1537–1543.

Das, S., Stark, L., Musgrave, I. F., Pukala, T., y Smid, S. D. 2016. Bioactive polyphenol interactions with β amyloid: a comparison of binding modelling, effects on fibril and aggregate formation and neuroprotective capacity. *Food & Function*. **7(2)**: 1138–1146.

Deane, R., Bell, R., Sagare, A., y Zlokovic, B. 2009. Clearance of Amyloid- β Peptide Across the Blood-Brain Barrier: Implication for Therapies in Alzheimers Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. **8(1)**:16–30.

Devine, P. N., Howard, R. M., Kumar, R., Thompson, M. P., Truppo, M. D., & Turner, N. J. 2018. Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development. *Nat. Rev. Chem.* **(2)**:409–421.

Dikumar, E. A., Zhukovskaya, N. A., Moiseichuk, K. L., Zalesskaya, E. G., Vyglazov, O. G., y Kurman, P. V. 2008. Synthesis and structure—aroma correlation of citral oxime esters. *Chem. Nat. Comp.* **44(1)**:81–83.

Dikumar, E. A., Zhukovskaya, N. A., Moiseichuk, K. L., Zalesskaya, E. G., Kurman, P. V., y Vyglazov, O. G. 2008. Preparative synthesis of veratraldehyde and citral oxime esters. *Russian J. Appl. Chem.* **81(4)**:643–646.

Domínguez, J. y Caritza, L. 2006. Nueva y conveniente síntesis de raloxifeno. Datos no publicados. Universidad central de Venezuela.

Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S., y Whitehouse, C. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. **246(4926)**:64–71.

Forman, M., Tseng, J., Palcza, J., Leempoels, J., Ramael, S., Krishna, G., Ma, L., Wagner, J. y Troyer, M. 2012. The Novel BACE Inhibitor MK-8931 Dramatically Lowers CSF A β Peptides in Healthy Subjects: Results from a Rising Single Dose Study (PL02.004). *Neurology* **78 (1)**.

Fuentes, G. P., y Slachevsky, Ch. A. 2005. Enfermedad de Alzheimer: Actualización en terapia farmacológica. *Revista Médica de Chile*, **133(2)**:224-230.

Gannett, P. M., Nagel, D. L., Reilly, P. J., Lawson, T., Sharpe, J., y Toth, B. 1988. Capsaicinoids: their separation, synthesis, and mutagenicity. *The Journal of Organic Chemistry*, **53(5)**:1064–1071.

Gervais, F., Paquette, J., Morissette, C., Krzywkowski, P., Yu, M., Azzi, M., y Tremblay, P. 2007. Targeting soluble A β peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiology of Aging*, **28(4)**:537–547.

Ghosh, A. K., & Osswald, H. L. 2014. BACE1 (β -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.*, **43(19)**:6765–6813.

Glennner, G. G. y Wong, C. W. 1984. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **120(3)**:885–890.

Hania, M. M. 2009. Synthesis and antibacterial activity of some transition metalcomplexes of oxime, semicarbazone and phenylhydrazone. *J. Chem.* **6(1)**:508-514.

Hesse, M., Meier, H. y Zeeh, B. 1995. Metodos espectroscópicos en química organica, 5^a Ed. Editorial Sintesis, Villahermoso, 34, 28015, Madrid. pp 230-285.

Hernández, M., Correa, J., Martínez, F., Padilla, I. I., Benítez, C. G., Mera, E., y Rosales, M. C. 2014. Design of Multi-Target Compounds as AChE, BACE1, and Amyloid- β 1-42 Oligomerization Inhibitors: *In Silico* and *In Vitro* Studies. *J. Alz. Dis.* **41(4)**, 1073–1085.

Hernández, M., Correa, J., Nicolás, M. I., Miranda, R., Benítez, C. G., Reséndiz, A. A. y Rosales, M. C. 2015. Virtual and *In Vitro* Screens Reveal a Potential Pharmacophore that Avoids the Fibrillization of A β 1–42. *PLOS ONE*. **10(7)**: 1-22.

Hernández, M., Morales, L. G., Basurto, J., y Rosales, M. C. 2017. Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation to Evaluate Compounds That Avoid the Amyloid Beta 1-42 Aggregation. En *Computational Modeling of Drugs Against Alzheimer's Disease*. pp 229–248.

Honig, L. S., Vellas, B., Woodward, M., Boada, M., Bullock, R., Borrie, M., y Siemers, E. 2018. Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *N. Eng. J. Med.* **378(4)**:321–330.

Hung, C. L., y Chen, C. C. 2014. Computational Approaches for Drug Discovery. *Drug Development Research*, **75(6)**:412–418.

Jindal, D. P., Chattopadhaya, R., Guleria, S., y Gupta, R. 2003. Synthesis and antineoplastic activity of 2-alkylaminoethyl derivatives of various steroidal oximes. *Eur. J. Med. Chem.* **38(12)**:1025-1034.

Jacobsen, N.E. 2017. NMR data interpretation explained. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. pp 150-220.

Kamakshi, R., y Reddy, B. S. R. 2005. Solventless Rapid Synthesis of Oxime, Semicarbazone, and Phenylhydrazone Derivatives from Carbonyl Compounds under Microwave Conditions. *Aust. J. Chem.* **58(8)**:603-606.

Karthikeyan, P., Aswar, S. A., Muskawar, P. N., Sythana, S. K., Bhagat, P. R., Kumar, S. S., y Satvat, P. S. 2016. A novel l-amino acid ionic liquid for quick and highly efficient synthesis of oxime derivatives – An environmental benign approach. *Arabian J. Chem.* **(9)**: 1036–1039.

Kerchner, G. A., y Boxer, A. L. 2010. Bapineuzumab. *Exp Opin. Biol. Ther.* **10(7)**: 1121–1130.

Kobata, K., Sugawara, M., Mimura, M., Yazawa, S., y Watanabe, T. 2013. Potent Production of Capsaicinoids and Capsinoids by Capsicum Peppers. *J. Agric. Food Chem.* **61(46)**, 11127–11132.

Korabecny, J., Zemek, F., Soukup, O., Spilovska, K., Musilek, K., Jun, D. y Kuca, K. 2014. Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease: Current State and Future Perspectives. pp 2-39. En Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease. (Ed. Atta- ur-Rahman). Editorial elsevier. Hradec Kralove, Czech Republic.

Krishna, S. H., y Karanth, N. G. 2002. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews.* **44(4)**: 499–591.

Kumar, A., Singh, A., y Ekavali. 2015. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports.* **67(2)**: 195–203.

Li, Q., Huang, X., Li, S., Ma, J., Lv, M., y Xu, H. 2016. Semisynthesis of Esters of Fraxinellone C4/10-Oxime and Their Pesticidal Activities. *J. Agric. Food Chem.* **64(27)**: 5472–5478.

Liu, X. H., Cui, P., Song, B. A., Bhadury, P. S., Zhu, H. L., y Wang, S. F. 2008. Synthesis, structure and antibacterial activity of novel 1-(5-substituted-3-substituted-4,5-dihydropyrazol-1-yl)ethanone oxime ester derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **16(7)**:4075-4082.

Liu, K.J. 2009. Lipase-catalyzed synthesis and antibacterial activity of N-vanillylnonanamide. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **58(1-4)**:181–186

Melgar, Á., Enríquez, C., Mendoza, G., Fernández, L., y Elorza, M. E. 2010. Un clásico de Química Orgánica en microescala y con fricción: la reacción de Cannizzaro. *Educación química.* **21(2)**:178-182.

Mikhaleva, A. I., Zaitsev, A. B., y Trofimov, B. A. 2006. Oximes as reagents. *Russian Chem. Rev.* **75(9)**:797–823.

Olivares, D., Deshpande, V.K., Shi, Y., Lahiri, D. K., Greig, N. H., Rogers, J. T., y Huang, X. 2012. N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine Treatment for Alzheimer's Disease, Vascular Dementia and Parkinson's Disease. *Curr. Alz. Res.* **9(6)**:746- 758.

OMS (Producer). (2017, Diciembre 12). Organización Mundial de la Salud. Retrieved from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.

Panda, G., Parai, M. K., Srivastava, A. K., Chaturvedi, V., Manju, Y. K., y Sinha, S. 2009. ChemInform Abstract: Design, Synthesis and Antitubercular Activity of Compounds Containing Aryl and Heteroaryl Groups with Alkylaminoethyl Chains. *ChemInform.* **40(52)**:1121-1127.

Pasquier, F., Sadowsky, C., Holstein, A., Leterme Gle, P., Peng, Y., Jackson, N. 2016. Two Phase 2 Multiple Ascending-Dose Studies of Vanutide Cridificar (ACC-001) and QS-21 Adjuvant in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *J. Alz. Dis.* **51(4)**:1131-1143.

Patani, G. A., y LaVoie, E. J. 1996. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chemical Reviews.* **96(8)**:3147–3176.

Peña, F., Gutiérrez, A.I., Quiroz, R., y Arias, C. 2006. The Role of B-Amyloid Protein in Synaptic Function: Implications for Alzheimer's Disease Therapy. *Current Neuropharmacology.* **(4)**:149-163.

Prieto, F. D., y Medina, J.L. 2018. Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *Revista Especializada en Ciencias Químico- Biológicas.* **21(2)**:124-134.

Qing, H., He, G., Ly, P. T. T., Fox, C. J., Staufenbiel, M., Cai, F. y Song, W. 2008. Valproic acid inhibits A β production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J. Exp. Med.* **205(12)**:2781–2789.

Rafii, M. S., y Aisen, P. S. 2009. Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics. *BMC Medicine.* **7(1)**.

Reyes, D., Castillo, E., Martínez, R., y López, A. 2002. Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. *Biotechnology Letters.* **(24)**: 2057–2061.

Roberson, E. D., y Mucke, L. 2006. 100 Years and Counting: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease. *Science*, **314(5800)**: 781–784.

Sánchez, G., y Salcedo, R. 2008. Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa. *REB.* **27(2)**:44-51.

Saikia, L., Baruah, J., y Thakur, A. 2011. A rapid, convenient, solventless green approach for the synthesis of oximes using grindstone chemistry. *Org. Med. Chem. Lett.* **1(1)**:12.

Santa Maria, I., Hernández, F., Del Rio, J., Moreno, F. J., y Avila, J. 2007. Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. *Molecular Neurodegeneration*, **2(1)**:17.

Sammaiah, A., Kaki, S. S., Manoj, G. N. V. T. S., Poornachandra, Y., Kumar, C. G., y Prasad, R. B. N. 2014. Novel fatty acid esters of apocynin oxime exhibit antimicrobial and antioxidant activities. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **117(5)**: 692–700.

Saldívar, F., Prieto, F. D., y Medina, J. L. 2017. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*. **28(1)**:51–58.

Salloway, S., Mintzer, J., Weiner, M. F., y Cummings, J. L. 2008. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. **4(2)** 65–79.

Salloway, S., Sperling, R., Keren, R., Porsteinsson, A. P., van Dyck, C. H. y Tariot, P. N. 2011. A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, **77(13)**:1253–1262.

Sharma, N., Mohanakrishnan, D., Sharma, U. K., Kumar, R., Richa, Sinha, A. K., & Sahal, D. 2014. Design, economical synthesis and antiplasmodial evaluation of vanillin derived allylated chalcones and their marked synergism with artemisinin against chloroquine resistant strains of Plasmodium falciparum. *Eur. J. Med. Chem.* **(79)**:350–368.

Singh, D. B., Gupta, M. K., Kesharwani, R. K., & Misra, K. 2013. Comparative docking and ADMET study of some curcumin derivatives and herbal congeners targeting β -amyloid. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*. **2(1)**:13–27.

Shih, N.-Y., Albanese, M., Anthes, J. C., Carruthers, N. I., Grice, C. A., Lin, L., Seidl, V. 2002. Synthesis and structure–activity relationships of oxime neurokinin antagonists: discovery of potent arylamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12(2)**:141-145.

Stoothoff, W. H., & Johnson, G. V. W. 2005. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1739(2-3)**:280-297.

Šunjić, V., y Petrović P., V. 2016. Organic Chemistry from Retrosynthesis to Asymmetric Synthesis. Springer International Publishing, Switzerland, pp 155-171.

Valerio, G. 1985. Introduccción al Diseño de Síntesis en Química Orgánica. Tesis de Licenciatura para la obtención del Grado de Químico-Industrial. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana. Veracruz, Mexico.

Wade, L.G. Jr., 1993. Química Orgánica, 7ª. Edición, México, Ed. Prentice Hall Hispanoamericana. Pp- 510-611.

Wang, D. S., Dickson, D. W., y Malter, J. S. 2006. β -Amyloid Degradation and Alzheimer's Disease. *J. Biomed. Biotechnol.* **(2006)**:1-12.

Williamson, J. D., Miller, M. E., Bryan, R. N., Lazar, R. M., Coker, L. H., Johnson, J., Launer, L. J. 2007. The Actio1n to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Memory in Diabetes Study (ACCORD-MIND): Rationale, Design, and Methods. *Ame. J. Card.* **99(12)**:112-122.

Wilson, D., Peters, R., Ritchie, K., y Ritchie, C. W. 2011. Latest advances on interventions that may prevent, delay or ameliorate dementia. *Ther. Adv. Chronic Dis.* **2(3)**:161–173.

Wolfe, M. S. 2016. Targets and Strategies Toward the Development of Alzheimer Therapeutics. En *Alzheimer's Disease (II)*, pp 1–25. (Ed Michael S. Wolfe). Springer International Publishing, Switzerland.

Wood, K. M., Lanz, T. A., Coffman, K. J., Becker, S. L., van Deusen, J., Nolan, C. E. y Tate, B. 2008. P2-375: Efficacy of the novel γ -secretase inhibitor, PF-3084014, in reducing A β in brain, CSF, and plasma in guinea pigs and Tg2576 mice. *Alzheimer's & Dementia.* **4(4)**:482–483.

Zagol, I., Amarnath, V., Bala, M., Roberts, L. J., Oates, J. A., y Boutaud, O. 2010. Characterization of Scavengers of γ -Ketoaldehydes That Do Not Inhibit Prostaglandin Biosynthesis. *Chem. Res. Toxicol.* **23(1)**:240–250.

Zeynizadeh, B., y Karimkoshteh, M. (2013). Magnetic Fe₃O₄ nanoparticles as recovery catalyst for preparation of oximes under solvent-free condition. *Journal of Nanostructure in Chemistry.* **3(1)**: 57.

Zhukovskaya, N.A., Dikusar, E.A., y Vyglazov, O.G. 2008 Preparative Synthesis of Veratraldehyde oxime Esters. *Chem. Nat. Comp.* **(44)**.

Zhukovskaya, N.A., Dikusar, E.A., Potkin, V.I. y Vyglazov, O.G. 2009. Synthesis and structure aroma correlation of anisaldehyde oxime esters. *Chem. Nat. Comp.* **(45)**.

Zhao, Y., Rocha, S. V., y Swager, T. M. 2016. Mechanochemical Synthesis of Extended Iptycenes. *J. Ame. Chem. Soc.* **138(42)**:13834–13837.