



Universidad Autónoma de Chiriquí
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Escuela de Química

“Síntesis y modelaje molecular de derivados de Curcumina con potencial actividad contra la enfermedad de Parkinson”

Presentado por
Randy Wendel Mojica Flores
4-782-2297

Trabajo de graduación para
Optar por el título de
Licenciado en Química

Profesora Asesora
Dra. Ariadna Batista

Co-Asesores
Dr. Jagannatha Rao, INDICASAT AIP
Dra. Johant Lakey Beitia, INDICASAT AIP

David, Chiriquí, República de Panamá

2019

DEDICATORIA

“A mi mamá, mi papá, mis hermanas y familiares, que siempre me desearon lo mejor desde la distancia.”

“A mis amigos, que me apoyaron incondicionalmente en todo momento.”

“En honor a la memoria de la Dra. Viviana E. Morales V. (Q.E.P.D.); gran profesora, consejera y amiga.”

RIJT 4146

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios por permitirme completar esta nueva meta y llegar hasta donde estoy hoy en día, guiar mi camino y los logros que pude obtener.

Agradezco a mi amada familia: mi mamá **Catalina Flores**, mi papá **Esmeraldo Mojica**, y mis hermanas **Katherine E. Mojica F.** y **Johan A. Mojica F.**, por siempre estar pendientes de mí a pesar que nos separan cientos de kilómetros y desearme lo mejor para culminar este trabajo con éxito.

Mi más sincera e inmensa gratitud a mis co-asesores: al **Dr. Jagannatha Rao**, Director de INDICASAT AIP, por su apoyo incondicional, por permitirme ingresar al instituto y demostrarme que en Panamá se puede hacer ciencia de alto nivel; a la **Dra. Johant Lakey Beitia**, por todos los consejos, enseñanzas, recomendaciones y oportunidades que me brindó, por su infinita paciencia y sus correctivos para ayudarme a mejorar, y por permitirme conseguir tantos logros en tan corto tiempo.

Estoy muy agradecido con los profesores y administrativos de la Escuela de Química de la Universidad Autónoma de Chiriquí, en especial mi asesora, la **Dra. Ariadna Batista** por recibirme como su estudiante en un momento tan crucial, estar pendiente de mis avances y atender a mis dudas cuando más lo necesité; a la **Dra. Laura Patiño** por brindarme sus valiosos consejos y ayudarme durante más de la mitad de este proceso con las revisiones y correcciones del anteproyecto, así como con todo el papeleo y los apuros que conllevaron; con la **Dra. Viviana E. Morales V.** (Q.E.P.D.) por apoyarme incondicionalmente desde antes que incluso ingresará a la universidad, por aconsejarme y hacerme ver mis fortalezas y debilidades, por incentivar me a participar en distintas actividades extracurriculares que estimularon mi capacidad científica y me ayudarán a ser mejor persona, por ser un gran ejemplo a seguir con su personalidad tan carismática entre muchas otras cualidades más.

Quiero agradecer a **todo el personal profesional, administrativo y técnico de INDICASAT AIP** por recibirme con los brazos abiertos, mostrarme la mayor disposición, por permitirme vivir tantas experiencias agradables, constructivas y poder hacer ciencia en Panamá. Particularmente a todo el grupo de trabajo, que de cariño llamamos Neuroquímica: al **Dr. Jagannatha Rao**; la **Dra. Johant Lakey**; la **Dra. Marisín Pecchio** por todo el soporte y logística en los trámites administrativos; la **Ing. Andrea Burillo** por ser una excelente colaboradora, por guiarme cuando me sentía

perdido y ser un gran apoyo laboral y personal desde el día uno. También al personal del Centro de Biodiversidad y Descubrimiento de Drogas, y dentro de él al **Dr. Christopher Boya** por sus consejos y recomendaciones; al **Lic. Ricardo Santamaría**, por la logística a seguir con el manejo de las sustancias químicas; a la **M.Sc. Arelis Fuentes**, por el apoyo con los análisis de los compuestos por Espectroscopía de Infrarrojo.

No puedo terminar de mostrar mi agradecimiento a las entidades y personas que hicieron realidad esta investigación con su valioso apoyo económico: **INDICASAT AIP; Fundación Benéfica Louis y Marthe Deveaux; Proyecto FID 17-002 “Síntesis, Modelado Molecular y Evaluación Biológica de derivados de Curcumina y Tetrahidrocurcumina frente a la α -Sinucleína”** de SENACYT; así como al **Programa de Becas de Pregrado de Excelencia en Ciencias Básicas (Convocatoria 2016)** para culminar estudios de Licenciatura de **IFARHU-SENACYT**; y al Sistema Nacional de Investigación (**Johant, Rao KS**). Sin ellas, esta investigación no hubiera podido ser realidad.

Estoy muy agradecido con el **Dr. Luis Cubilla Ríos**, profesor de la Universidad de Panamá, por brindarnos un espacio en el **Laboratorio de Bioorgánica Tropical** durante varios meses para poder empezar con el entrenamiento para hacer las reacciones y para usar los equipos; así como a la **Vicerrectoría de Investigación y Posgrado** de la Universidad de Panamá y al **Lic. Daniel Torres** por sus consejos, supervisión y apoyo en el análisis de las muestras con el Espectrómetro de Masas.

Agradezco de todo corazón a mis **compañeros de la carrera, amigos y hermanos nacidos de otra madre: Annabys Rojas, Erick Pinzón, Luz Caballero, Omar Bonilla, Joceline Ospina, Roberto Samudio, Lizhelen De León, Itza Sandoya**, por poder contar con ustedes en todo momento, en especial a **Álvaro Guerra J. y su familia**, por abrirme las puertas y recibirme con amabilidad en la Ciudad de Panamá.

Finalmente, quiero agradecer a la **M.Sc. Yahaira Guerra**, educadora, que es como una segunda madre, gracias a ella fue que inició mi interés en el mundo de la química; así como a todas las personas que de alguna u otra forma han estado presentes durante esta etapa de mi vida.

A todos, ¡¡¡Muchas Gracias!!!

Randy Wendel Mojica Flores

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Justificación del Problema.....	4
1.2 Objetivos de la Investigación	5
1.2.1 Objetivo General.....	5
1.2.2 Objetivos Específicos.....	5
1.3 Cobertura	5
CAPÍTULO II	6
2. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1 Enfermedades Neurodegenerativas	7
2.2 La Enfermedad de Parkinson.....	8
2.3 Características de la Enfermedad de Parkinson: Enfoque Bioquímico	11
2.3.1 La α -sinucleína: Descripción y características.....	12
2.4 Medicamentos actuales para tratar la Enfermedad de Parkinson	14
2.5 Los productos naturales: Una novedosa alternativa para tratar la enfermedad de Parkinson	16

2.5.1	Curcumina.....	16
2.5.2	Derivados de Curcumina.....	17
2.5.3	Síntesis preliminar del Ácido Alquil-Succínico	18
2.5.4	Síntesis de Esteres Derivados de Curcumina.....	19
2.6	Química Computacional: Su rol dentro de la Investigación de la enfermedad de Parkinson	21
CAPÍTULO III.....		24
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1	Materiales	25
3.2	Reactivos Químicos.....	26
3.3	Equipos	27
3.4	Programas de Modelaje Molecular.....	28
3.5	Análisis por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (CLAR)	28
3.6	Caracterización de cada compuesto por Espectroscopía Infrarrojo (IR), y Espectrometría de Masas (MS)	28
3.7	Modelaje Molecular.....	29
3.7.1	Procedimiento General 1 (PG1) para Preparación del Receptor	29
3.7.1.1	Preparación del receptor β -Amiloide	30
3.7.1.2	Preparación del receptor α -Sinucleína	30
3.7.2	Procedimiento General 2 (PG2) para Preparación de los Ligandos	32
3.7.2.1	Preparación de los Ligandos	32
3.7.3	Procedimiento General (PG3) para Acoplamiento Molecular por AutoDock.....	34
3.7.4	Procedimiento General (PG4) para Acoplamiento Molecular por AutoDock Vina.....	35

3.7.5	Procedimiento General (PG5) para Acoplamiento Molecular por Smina ..	35
3.7.6	Acoplamiento Molecular de los programas seleccionados con el péptido β -Amiloide.....	36
3.7.7	Acoplamiento Molecular de los programas seleccionados con la proteína α -Sinucleína.....	37
3.7.8	Procedimiento General 6 (PG6) para realizar el Consenso Exponencial en el orden de las puntuaciones del Acoplamiento Molecular	37
3.7.8.1	Rank Consenso Exponencial de las puntuaciones de Acoplamiento Molecular para el péptido β -Amiloide.....	38
3.7.8.2	Rank Consenso Exponencial de las puntuaciones de Acoplamiento Molecular para la proteína α -Sinucleína.....	39
3.7.9	Procedimiento General 7 (PG7) para el Consenso en la Pose de Acoplamiento Molecular	39
3.7.9.1	Consenso en la pose de Acoplamiento Molecular con el péptido β -Amiloide.....	39
3.7.9.2	Consenso en la pose de Acoplamiento Molecular con la proteína α -Sinucleína	40
3.8	Síntesis de Derivados de Ésteres de Curcumina.....	40
3.8.1	Procedimiento General 8 (PG8) para la síntesis de ácido alquil-succínico	40
3.8.1.1	Procedimiento para la síntesis del ácido 4-(aliloxi)-4-oxobutanoico (A1)	41
3.8.1.2	Procedimiento para la síntesis del ácido 4-(benciloxi)-4-oxobutanoico (A2)	43
3.8.1.3	Procedimiento para la síntesis del ácido 4-(ciclopentiloxi)-4-oxobutanoico (A3)	45

3.8.2	Procedimiento General 9 (PG9) para la síntesis de Ésteres de Curcumina	47
3.8.2.1	Procedimiento para la síntesis del disuccinato de diallil O,O'- ((1E,3Z,6E)-3-hidroxi-5-oxohepta-1,3,6-trieno-1,7-diil)bis(2-metoxi-4,1- fenileno) (5) y del succinato de alil (4-((1E,4Z,6E)-5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3- metoxifenil)-3-oxohepta-1,4,6-trien-1-il)-2-metoxifenilo) (6)	48
3.8.2.2	Procedimiento para la síntesis del disuccinato de dibencil O,O'- ((1E,3Z,6E)-3-hidroxi-5-oxohepta-1,3,6-trieno-1,7-diil)bis(2-metoxi-4,1- fenileno) (7) y del succinato de bencil (4-((1E,4Z,6E)-5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3- metoxifenil)-3-oxohepta-1,4,6-trien-1-il)-2-metoxifenilo) (8)	51
3.8.2.3	Procedimiento para la síntesis del disuccinato de dicitlopentil O,O'- ((1E,3Z,6E)-3-hidroxi-5-oxohepta-1,3,6-trieno-1,7-diil)bis(2-metoxi-4,1- fenileno) (9)	54
CAPÍTULO IV		56
4.	RESULTADOS	57
4.1	Modelaje Molecular	57
4.2	Síntesis de Derivados de Curcumina	63
4.2.1	Síntesis de los compuestos 5 y 6	66
4.2.2	Síntesis de los compuestos 7 y 8	67
4.2.3	Síntesis del compuesto 9	68
CAPÍTULO V		69
5.	DISCUSIÓN	70
5.1	Modelaje Molecular	70
5.2	Síntesis de Derivados de Curcumina	73
5.2.1	Síntesis del Ácido Alquil-Succínico	74
5.2.2	Síntesis de Ésteres de Curcumina	75

CAPÍTULO VI.....	79
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
6.1 Conclusiones.....	80
6.2 Recomendaciones	81
REFERENCIAS.....	82
ANEXOS	99
ANEXO I.....	100
Metodología Extendida de Acoplamiento Molecular.....	100
ANEXO II	108
Cuadros de Datos Obtenidos del Acoplamiento Molecular	108
ANEXO III.....	110
Cálculo Hipotético de la Longitud de Onda de Absorbancia Máxima de la Curcumina y sus Derivados	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inestabilidad de la curcumina en condiciones fisiológicas.	3
Figura 2. Casos reportados de la Enfermedad de Parkinson en Panamá.	8
Figura 3. a) Comparación del encéfalo de persona normal en comparación con una que sufre la enfermedad de Parkinson (Blaus, 2014). b) Síntomas característicos al diagnosticar la enfermedad de Parkinson (Pinheiro, 2018).	10
Figura 4. a) Estructura proteica de la α -sinucleína en forma monomérica cristalizada en el PDB (PDB: 1XQ8). b) Isoformas de la familias de la sinucleína, α -, β -, y γ -sinucleína con 140, 134 y 127 residuos de aa, respectivamente, en orden desde arriba hacia abajo (Goedert & Spillantini, 2012). c) Secuencia de residuos de aminoácidos con estructuras secundarias de la proteína α -sinucleína (PDB: 1XQ8).	13
Figura 5. Mecanismo de formación de los cuerpos de Lewy (LB).....	14
Figura 6. Estructura química de los medicamentos empleados para tratar la enfermedad de Parkinson.	15
Figura 7. Sitios claves de reacción de la curcumina.....	16
Figura 8. a) Los glucósidos de curcumina mostraron una mayor actividad inhibitoria que la curcumina frente a la α -sinucleína. b) Los derivados de curcumina mostraron una mayor actividad inhibitoria que la curcumina frente a β -Amiloide.	18
Figura 9. Mecanismo propuesto para la formación del ácido alquil-succínico.	19
Figura 10. Mecanismo de reacción plausible para la formación de derivados de curcumina.....	21
Figura 11. Estructura tridimensional preparada del péptido A β (PDB ID: 2BEG).	30
Figura 12. Estructura tridimensional preparada de la proteína α -Sinucleína (PDB ID: 1XQ8).	31
Figura 13. Energía de Interacción (kcal/mol) de los complejos receptor–ligando para la enfermedad de Alzheimer.	36
Figura 14. Energía de Interacción (kcal/mol) de los complejos receptor–ligando para la enfermedad de Parkinson.	37
Figura 15. Preparación del ácido 4-(aliloxi)-4-oxobutanoico (compuesto A1).	41
Figura 16. Espectros de Masas e IR del compuesto A1	42
Figura 17. Preparación del ácido 4-(benciloxi)-4-oxobutanoico (compuesto A2).	43

Figura 18. Espectros de Masas e IR del compuesto A2	44
Figura 19. Preparación del ácido 4-(ciclopentiloxi)-4-oxobutanoico (compuesto A3).	45
Figura 20. Espectros de Masas e IR del compuesto A3	46
Figura 21. Preparación de compuesto 5 y 6	48
Figura 22. Espectros de Masas e IR del compuesto 5	49
Figura 23. Espectros de Masas e IR del compuesto 6	50
Figura 24. Preparación de compuesto 7 y 8	51
Figura 25. Espectros de Masas e IR del compuesto 7	52
Figura 26. Espectros de Masas e IR del compuesto 8	53
Figura 27. Preparación del compuesto 9	54
Figura 28. Espectros de Masas e IR del compuesto 9	55
Figura 29. Consenso de la conformación de Acoplamiento Molecular de los derivados de curcumina con el péptido β -Amiloide.....	59
Figura 30. Energías de Interacción en kcal/mol de los complejos receptor-ligando obtenidos con Smina para la enfermedad de Alzheimer.....	60
Figura 31. Consenso de la conformación de Acoplamiento Molecular de los derivados de curcumina con la proteína α -Sinucleína.....	61
Figura 32. Energías de Interacción (kcal/mol) de los complejos receptor-ligando obtenidas con AutoDock 4 para la enfermedad de Parkinson.	62
Figura 33. Optimización del tiempo de reacción (46 h) de la síntesis de ésteres de curcumina.....	64
Figura 34. Esquema de síntesis, purificación y caracterización de derivados de curcumina.....	65
Figura 35. A) Perfil cromatográfico del extracto crudo con esquema de fraccionamiento del extracto crudo de la reacción para obtener a los compuestos 5 (B) y 6 (C) puros.	66
Figura 36. A) Perfil cromatográfico del extracto crudo con esquema de fraccionamiento del extracto crudo de la reacción para obtener a los compuestos 7 (B) y 8 (C) puros.	67
Figura 37. A) Perfil cromatográfico del extracto crudo con esquema de fraccionamiento del extracto crudo de la reacción para obtener al compuesto 9 (B) puro.	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cristalería y Materiales del laboratorio empleados en la síntesis de los derivados de curcumina.	25
Cuadro 2. Disolventes de uso general.	26
Cuadro 3. Reactivos Químicos empleados en la síntesis de los derivados de curcumina.	26
Cuadro 4. Reactivos para Cromatografía.	27
Cuadro 5. Equipos de uso general.	27
Cuadro 6. Programas computacionales para realizar el Modelaje Molecular de los derivados de curcumina.	28
Cuadro 7. Estructura Química de curcumina y compuestos derivados.	33
Cuadro 8. Comparación de los Resultados experimentales de la Actividad Anti-Agregante de péptido A β y el Rank Consenso de los derivados de curcumina.	38
Cuadro 9. Comparación del consenso en el orden de los programas de Acoplamiento Molecular de los derivados de curcumina con la proteína α -Sinucleína.	39
Cuadro 10. Datos de la Energía de Interacción de los complejos receptor–ligando para la enfermedad de Alzheimer.	108
Cuadro 11. Datos en RMS (Å) del Consenso en la pose de Acoplamiento Molecular del Péptido β -Amiloide como Modelo de Referencia en la enfermedad de Alzheimer.	108
Cuadro 12. Datos de la Energía de Interacción de los complejos receptor–ligando para la enfermedad de Parkinson.	109
Cuadro 13. Datos en RMS (Å) del Consenso en la pose de Acoplamiento Molecular de la proteína α -Sinucleína en la enfermedad de Parkinson.	109

LISTA DE ABREVIATURAS

EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
AcOEt	Acetato de Etilo
ACS	American Chemical Society
aa	Aminoácido
ADT	AutoDock Tools
CLAR	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DIPEA	Diisopropiletilamina
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
EP	Enfermedad de Parkinson
EM	Esclerosis Múltiple
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
MS	Espectrometría de Masas
h	Horas
IR	Infrarrojo
ESI	Ionización por Electrodispersión
min	Minutos
Hx	n-Hexano
TQD	Triple Quadrupole Detector
α -Syn	α -Sinucleína
A β	β -Amiloide

RESUMEN

La enfermedad del Parkinson es un trastorno neurodegenerativo ocasionado por la deposición de agregados de la proteína α -sinucleína en el citoplasma de neuronas dopaminérgicas, donde el mal plegamiento de esta proteína conduce a la formación de complejos oligoméricos tóxicos, siendo esta la segunda mayor responsable de las defunciones a nivel mundial debido a desórdenes neurológicos, solo superado por la enfermedad de Alzheimer, de acuerdo a las proyecciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el 2030. Debido a que la formación de los agregados de α -sinucleína se ve inducida por la formación de aductos con la dopamina, conocidos como cuerpos de Lewy, esta es señalada como una de las potenciales razones por las que los tratamientos actuales de la enfermedad dejan de surtir efecto luego de un determinado periodo de tiempo. Es por ello que, se evaluó la actividad inhibitoria *in silico* de una serie de compuestos derivados de la curcumina frente a la proteína α -sinucleína, cuyos resultados se utilizaron para sintetizar los tres compuestos que resultaron con mayor potencial neuroprotector, con lo que se buscó utilizar el modelaje molecular con la proteína α -sinucleína y se determinó *in silico* las diferentes interacciones entre los derivados de Curcumina y la α -sinucleína, con lo cual se finalizó con la síntesis orgánica en el laboratorio de los tres (3) compuestos derivados de la Curcumina que presentaron un mayor potencial neuroprotector. La primera fase se realizó empleando las herramientas de modelado molecular utilizando para las optimizaciones de las estructuras el software AutoDock Tools (ADT), seguido del acoplamiento molecular trabajado con tres programas diferentes: AutoDock, AutoDock Vina y Smina; estos resultados se unificaron aplicando la metodología de Rank Consenso Exponencial. Luego de analizados los datos del modelado molecular se elaboró la síntesis de los compuestos seleccionados. Los compuestos estudiados han mostrado tener gran actividad en la desagregación de las placas amiloidales presentes en modelos de Alzheimer; sin embargo, requieren ser evaluados frente a la α -sinucleína, ya que la Curcumina reporta actividad inhibitoria de esta proteína, por lo cual se quiso conocer si los compuestos derivados de la Curcumina podrían tener una mayor actividad inhibitoria que la Curcumina.

CAPÍTULO

I

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas van en aumento debido a que el ser humano ha superado las expectativas de vida (Feigin et al., 2017; Harman, 2006). Entre ellas, la enfermedad de Parkinson (EP) afecta a más de 6 millones de personas a nivel mundial, mayormente población de edad avanzada (Dorsey et al., 2018). Panamá no escapa de esta situación donde se han reportado más de 30 mil casos (Herrera et al., 2006; Panamá América, 2018). Actualmente, las investigaciones científicas dirigen sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas moléculas en los productos naturales porque han demostrado tener propiedades neuroprotectoras (Tavakkoli et al., 2019). Es por ello que, esta investigación científica tiene interés en los productos naturales, como los polifenoles, entre ellos, se encuentran el resveratrol, EGCG, curcumina, entre otros (Rehman et al., 2019). Las investigaciones han demostrado que los polifenoles pueden inhibir la actividad de la enzima β -secretasa y la γ -secretasa que están involucradas en la formación del péptido β -amiloide ($A\beta$, en inglés) característico de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Braidy et al., 2017; Ogunraku et al., 2017). También, este tipo de compuesto ha demostrado actividad frente a la enzima α -secretasa que evita la formación del péptido $A\beta$ (L.-X. Zhao et al., 2017). Los polifenoles pueden inhibir la agregación tanto de los agregados formados por el péptido β -amiloide (Lakey-Beitia, 2017) como los formados por la proteína α -sinucleína (α -Syn, por su traducción en inglés) (Gadad et al., 2012; Narasingapa et al., 2012).

La curcumina es un producto natural perteneciente al grupo de los polifenoles (Mhillaj et al., 2019). Es el componente activo principal del rizoma *Curcuma longa*, una planta herbácea perenne (Scuto et al., 2019; D.-W. Zhang et al., 2013). Las investigaciones científicas muestran el potencial neuroprotector que tiene la curcumina, es por ello que, surge el interés de seguir estudiando este polifenol. Entre las propiedades neuroprotectoras podemos mencionar, actividad antiagregante, antioxidante, quelante de metales de transición como cobre, zinc, hierro que están involucrados en el incremento de la formación de agregados tanto de $A\beta$ como de α -Syn, entre otras propiedades (Alhusaini et al., 2019; Koroth et al., 2019; Messner et al., 2017; Simunkova et al., 2019).

La curcumina es activa frente a la EP donde inhibe la agregación de la α -Syn (Singh et al., 2013). Sin embargo, la curcumina tiene baja biodisponibilidad debido a su baja solubilidad en agua, y a su inestabilidad a pH fisiológico (7.4) que conlleva a su biotransformación en ácido ferrúlico, vainillina, dehidrozingeronona y glucurónido de curcumina, ésto no ha permitido que este producto nutracéutico pleiotrópico pueda ser un medicamento (**Figura 1**). La curcumina sufre degradación en la región cetona-enólica y en el anillo fenólico, es por ello que, se han realizado modificaciones estructurales en estas regiones con la finalidad de evitar este tipo de degradación, ya que los derivados de curcumina han mostrado mayor actividad neuroprotectora que la curcumina (Chan et al., 2016; Gadad et al., 2012; Lakey-Beitia et al., 2017).

Esta investigación se apoya de la química computacional, mediante el empleo del modelado molecular para establecer una metodología en Panamá que permita priorizar el orden de síntesis de determinados derivados de curcumina, ya que se busca implementar modificaciones de tipo ester en la estructura de la curcumina y con esto sentar los métodos de síntesis de este tipo de compuestos en nuestro país, pues según la literatura reportada pueden presentar potencial frente a enfermedades neurodegenerativas.

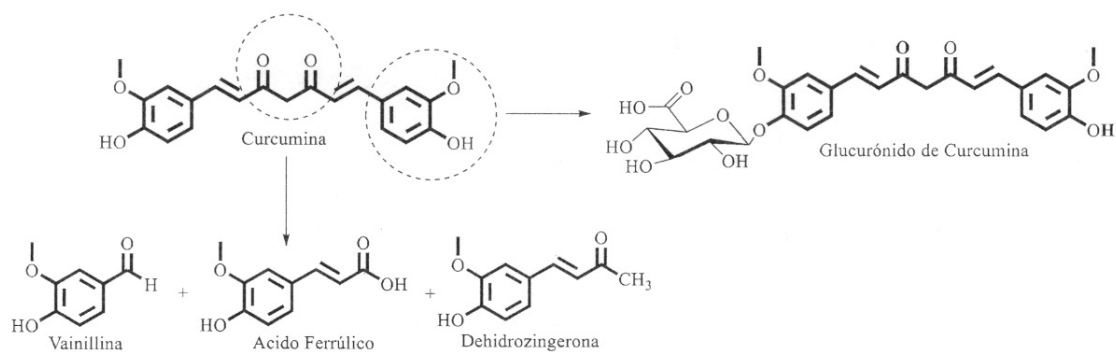


Figura 1. Inestabilidad de la curcumina en condiciones fisiológicas.

1.1 Justificación del Problema

Esta investigación parte del hecho que, la curcumina es activa frente a la EP donde inhibe la agregación de la α -Syn y disminuye la toxicidad de sus agregados oligoméricos, al mostrar una mejora significativa en la viabilidad celular del 20% - 30% en ensayos *in vitro* de citotoxicidad (Singh et al., 2013). Sin embargo, su baja biodisponibilidad e inestabilidad a pH fisiológico no han permitido que se pueda emplear para transformarlo en un medicamento (Kumar & Khanum, 2012). Aunque la literatura señala que, los glucósidos de curcumina han presentado actividad frente a la α -Syn en la EP (Kunnumakkara et al., 2017). Además, el grupo de investigación del Dr. Rao y colaboradores han sintetizado ésteres de curcumina (Lakey-Beitia et al., 2017) que han resultado activos al inhibir la agregación de la placa A β en modelos de Alzheimer, pero la actividad de estos ésteres no ha sido probada en modelos representativos de EP. Por ello buscamos dejar establecida una metodología para comprobar primero su actividad *in silico* frente a la EP, y realizar la síntesis de estos ésteres, aquí en Panamá, para poder probar su actividad en futuros bioensayos *in vitro* que modelen la EP, y así contribuir a la posible transformación de estos derivados de curcumina en potenciales fármacos.

Este trabajo de graduación buscó determinar cómo sería el comportamiento de los derivados de curcumina frente a la α -Syn donde se esperó que los derivados de curcumina presentaran una mayor actividad inhibitoria que la curcumina *in silico*. Se buscó establecer la metodología para realizar el modelaje molecular de los derivados de curcumina frente a la proteína α -sinucleína, lo cual permitirá que se pueda identificar como interactúa este compuesto con la proteína de interés. Es decir, se utilizó el modelaje molecular para modelar la interacción entre los nueve (9) derivados de curcumina por separado y el receptor α -sinucleína, lo que nos permitirá conocer la geometría, la conformación, el tipo de interacciones y los residuos de aa en el sitio de unión del receptor que interactúan con estos compuestos. Los resultados obtenidos permitirán seleccionar tres (3) derivados de curcumina para ser sintetizado (> 2 mg) de cada uno de estos compuestos. Como la síntesis de estos derivados de curcumina se realizó en la Universidad de Texas en San Antonio, Estados Unidos, se buscó establecer la metodología de síntesis de estos compuestos en el Centro de

Biodiversidad y Descubrimiento de Drogas de INDICASAT AIP. Cabe mencionar que, estos compuestos no han sido probados en presencia de la α -sinucleína, por lo que surge la interrogante que se espera responder al finalizar de esta investigación: ¿Cómo es la actividad inhibitoria de los derivados de curcumina, respecto a la curcumina, frente a la α -sinucleína en estudios *in silico*?

1.2 Objetivos de la Investigación

1.2.1 Objetivo General

Determinar la actividad inhibitoria *in silico* de los nueve derivados de curcumina frente a la proteína α -sinucleína, para la síntesis de los tres con el mayor potencial neuroprotector.

1.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Establecer la secuencia metodológica para la realización del modelaje molecular de los derivados de curcumina.
- 2) Determinar la actividad inhibitoria *in silico* de los derivados de curcumina frente a la α -sinucleína.
- 3) Sintetizar tres (3) derivados de curcumina con potencial neuroprotector, obteniendo 2 mg de cada compuesto.

1.3 Cobertura

La investigación tuvo una duración de doce (12) meses a partir de diciembre de 2018, con el apoyo del Centro de Biodiversidad y Descubrimiento de Drogas (CBDD) del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT AIP), el Laboratorio de Bioorgánica Tropical de la Universidad de Panamá (UP) y del Centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT) de la Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI).

CAPÍTULO

II

1. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Enfermedades Neurodegenerativas

El cerebro humano es un órgano complejo que siempre se mantiene activo y en constante funcionamiento, por lo que puede ser susceptible a trabajar anormalmente o lesionarse; ésto puede eventualmente desencadenar el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa (Ahmad et al., 2018). Las enfermedades neurodegenerativas alteran el normal funcionamiento de las neuronas durante un prolongado periodo de tiempo, pudiendo causar en gran medida muerte neuronal, por tanto son consideradas como un conjunto de padecimientos crónicos que ocurren a nivel neurológico (Zhang, Tang, Luo, Shi, & Xu, 2017). Estas pueden afectar el flujo de comunicación entre las neuronas en las terminales presinápticas perturbando el intercambio de neurotransmisores, los cuales están contenidos en las vesículas sinápticas, con el medio extracelular (Bae & Kim, 2017).

Las enfermedades neurodegenerativas también son conocidas como enfermedades conformacionales, ya que en su mayoría presentan como característica distintiva el cambio de las propiedades psicoquímicas de determinadas proteínas, causando así que se agreguen y depositen en las células neuronales del cerebro (Kovacs, 2016). En la actualidad, no se tiene una cantidad establecida de enfermedades neurodegenerativas pero se estima que rondan los cientos; éstas son lideradas por la enfermedad de Alzheimer (EA), seguido de la enfermedad de Parkinson (EP), la Esclerosis Múltiple (EM) y la enfermedad de Huntington (EH) (Ahmad et al., 2018; Lakey-Beitia et al., 2015). La característica principal de la EA es la deposición de placas amiloidales extracelulares con formación de neurofibrillas intracelulares de β -Amiloide (Ahmad et al., 2018; Watt et al., 2011); de la EP, la agregación de oligómeros tóxicos de α -sinucleína, con una considerable pérdida de neuronas dopaminérgicas (Eriksen et al., 2003); en la EM, un deterioro en áreas multifocales de desmielinización con pérdida de oligodendrocitos y esclerosis astrogial (Río & Montalbán, 2014); en la EH, la mutación del gen de la proteína Huntingtina, con una anormalmente alta cantidad de copias de poliglutamina en el extremo N (Ahmad et al., 2018; Bae & Kim, 2017).

Estos padecimientos neurológicos poseen algunas similitudes histológicas y patológicas, así como pueden tener un conjunto de sintomatologías en común, entre ellas: Pérdida de memoria, desórdenes de movimiento, deterioro crónico con pérdida de la autosuficiencia, hasta que eventualmente conlleva al deceso del paciente (Ahmad et al., 2018).

De acuerdo a las proyecciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecidas para el 2030, se estima que un 12.22% de las defunciones a nivel mundial serán causadas por desórdenes neurológicos; de las cuales, un 0.23% equivalentes a 19.5 millones de personas corresponderían a los fallecimientos atribuidos a la enfermedad de Parkinson (Dua et al., 2006). Según artículos publicados en fuentes locales basadas en datos de la OMS, Panamá no escapa de esta situación, ya que se estima que existen más de 30 mil casos de personas que padecen de la enfermedad de Parkinson, de acuerdo con datos reportados en 2018 (**Figura 2**) (Herrera et al., 2006; Panamá América, 2018).

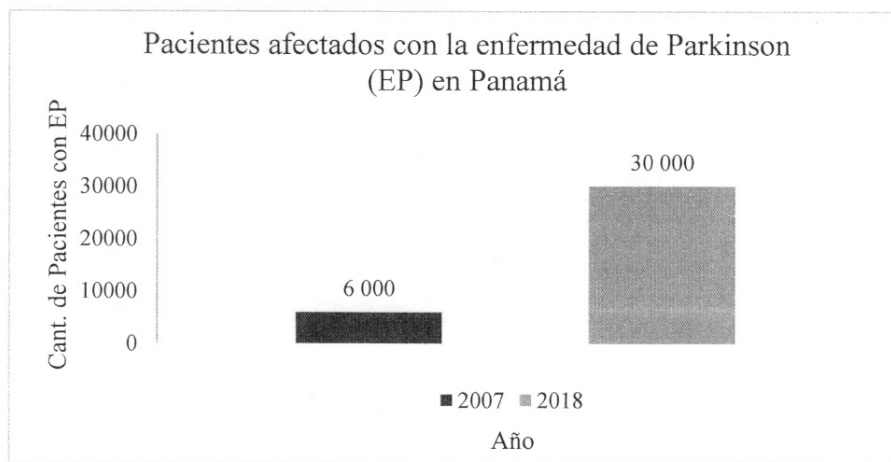


Figura 2. Casos reportados de la Enfermedad de Parkinson en Panamá.

2.2 La Enfermedad de Parkinson

En 1817, James Parkinson, quien era miembro del Colegio Real de Cirujanos del Reino Unido, describió por primera vez en su ensayo “Shaking Palsy” un desorden neurológico al cual separó de otros trastornos neurológicos conocidos en la época,

como la esclerosis múltiple y desórdenes análogos que involucraban temblor en las extremidades (Goetz, 2011; Parkinson, 1817). En este ensayo J. Parkinson se refirió brevemente a este trastorno como:

“Un movimiento tembloroso involuntario con disminución de la potencia muscular, en partes que no están en acción e incluso cuando están apoyadas; con una propensión a inclinar el tronco hacia adelante, y evitar caminar a un ritmo de carrera: los sentidos y el intelecto permanecen intactos” (Parkinson, 1817).

Pero, no fue hasta 1862, cuando Jean Martin Charcot nombró este padecimiento como la enfermedad de Parkinson (Pirkevi et al., 2009).

Con el pasar de los años, el avance de la tecnología ha permitido comprender mejor este padecimiento, y se han descubierto otras características de esta enfermedad, permitiendo ampliar el significado de esta enfermedad neurodegenerativa (Mhyre et al., 2012). La enfermedad de Parkinson inicialmente era conocida por la condición neurológica que producía debilidad muscular; después de 100 años, era considerada una condición neurológica cuyas características físicas eran denominadas “parkinsonismo”. Además de tener inclusiones neuronales señaladas como cuerpos de Lewy; hasta la actualidad, más de 200 años después de su primera descripción, se considera como una condición multisistémica con parkinsonismo, presencia de cuerpos de Lewy, pérdida neuronal en la sustancia negra, déficit de neurotransmisores, factores de riesgo genéticos, y que responde a tratamientos con sustancias dopaminérgicas (Rodríguez-Violante et al., 2017).

Esta enfermedad afecta drásticamente al sistema nervioso central de la población de edad media y avanzada; está tipificada por un progresivo desorden del movimiento caracterizado por la producción de bradiquinesia, temblores, rigidez y descoordinación de los reflejos posturales; además, el historial médico del individuo es un factor determinante en el desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa (**Figura 3**) (Clarke, 2007; Mhyre et al., 2012). La bradiquinesia se caracteriza por un paulatino aumento de la rigidez muscular donde la persona afectada presenta una lentitud motriz y una incapacidad para realizar movimientos específicos y coordinados, afectando drásticamente el habla (Berardelli et al., 2001).

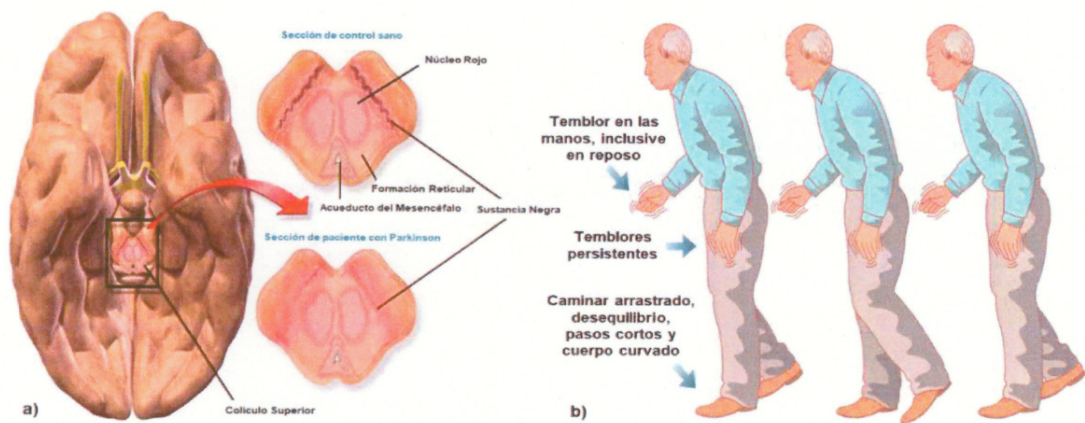


Figura 3. a) Comparación del encéfalo de persona normal en comparación con una que sufre la enfermedad de Parkinson (Blaus, 2014). b) Síntomas característicos al diagnosticar la enfermedad de Parkinson (Pinheiro, 2018).

No obstante, varias de estas características son compartidas por desórdenes similares que se agrupan clínicamente como parkinsonismo, estos son: La enfermedad de Parkinson, la Atrofia de Sistemas Múltiples, la Parálisis Progresiva Supranuclear, la Degeneración Corticobasal, la Demencia Frontotemporal, entre otros desórdenes neurológicos (Meles et al., 2016). Dentro de ellas, la enfermedad de Parkinson se produce con mayor frecuencia, y a los demás desórdenes se les conoce como Parkinsonismo Atípico (Pirker et al., 2002).

Extensas investigaciones en modelos animales y en pacientes que sufrían de la enfermedad de Parkinson, mostraron que más del 90% de los casos eran esporádicos o idiopáticos, mientras que el resto eran casos familiares o hereditarios (Polymeropoulos et al., 1997). Esto se atribuye a la incidencia de factores ambientales y genéticos, por lo que se considera como una patología de carácter multifocal o multifactorial (Papapetropoulos et al., 2007; Sveinbjornsdottir, 2016).

Para poder detectar las posibles alteraciones relacionadas con la patofisiología próxima de una enfermedad se hace necesario el empleo de biomarcadores que puedan reflejar estos cambios (Mollenhauer et al., 2014); pero no existen biomarcadores que permitan diagnosticar por completo esta enfermedad (Miller & O'Callaghan, 2015); salvo que, diversas investigaciones recientes muestran numerosas técnicas con potencial

aplicación para señalar aspectos puntuales que permitan diferenciar estos padecimientos (Fullard et al., 2017). A pesar del aumento del conocimiento sobre los eventos neuropatológicos y neuroquímicos, aún no existe una cura definitiva para la enfermedad de Parkinson (Pirkevi et al., 2009).

2.3 Características de la Enfermedad de Parkinson: Enfoque Bioquímico

La principal característica de esta Enfermedad es la deposición de agregados de la proteína α -sinucleína conocidos como cuerpos de Lewy en el citoplasma de neuronas dopaminérgicas, por lo cual se afecta la parte motora del individuo con EP que está relacionado con el deterioro de las neuronas ubicadas en la región crítica del cerebro, y que están involucradas con la producción del movimiento de la Sustancia Negra (pars compacta) del cerebro (Kalia & Lang, 2015; Miotto et al., 2014).

El mal plegamiento de la proteína α -sinucleína conlleva a la formación de estructuras oligoméricas tóxicas (Giasson, 2003). Investigaciones señalan que, la formación de aductos entre la dopamina y la α -sinucleína promueven la formación de cuerpos de Lewy, siendo una potencial razón de porque los tratamientos actuales dejan de surtir efectos después de un determinado periodo de tiempo (Berrocal et al., 2015; Eriksen et al., 2003). Investigaciones sugieren que la acumulación de estos agregados, posiblemente, pueden estar involucrados en la acumulación de metales pro-oxidantes como el hierro (Fe) en el tejido cerebral, acompañado de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), y daños en el ADN, otra característica de esta enfermedad neurodegenerativa. Estudios sugieren que la interacción entre proteínas como la Superóxido Dismutasa (SOD) con metales pro-oxidantes como cobre (Cu), Fe y cinc (Zn), favorece el mal plegamiento de las proteínas y posiblemente promueven la oxidación de aminoácidos (aa) como triptófano, cisteína, tirosina, y serina (Binolfi et al., 2016; Gao et al., 2008; Garcia-Garcia et al., 2012; Miotto et al., 2014; Mitra et al., 2014). Es probable que estas interacciones contribuyan a generar estrés oxidativo que está asociado con el desarrollo de ROS, tales como el radical hidroxilo (OH \cdot) a través de reacciones de Fenton, que se producen al reaccionar el peróxido de

hidrógeno con metales de transición, generalmente, hierro (Hegde et al., 2011; Perron & Brumaghim, 2009; Vasquez et al., 2017).

2.3.1 La α -sinucleína: Descripción y características

La familia de la proteína sinucleína humana está conformada por la α -, β -, y γ -sinucleína, y poseen una longitud de 140, 134 y 127 residuos de aa (**Figura 4**), respectivamente y tienen entre 55-62% de similitud en su secuencia (Goedert & Spillantini, 2012; Hegde et al., 2010). Las isoformas α - y β -sinucleína están involucradas en funciones sinápticas y se encuentran en el tejido cerebral. La γ -sinucleína se caracteriza por ser una molécula señalizadora y su expresión en tumores mamarios es considerado como un marcador de la progresión del cáncer; se encuentra principalmente en el sistema nervioso periférico y en la retina (Guerrero et al., 2013; Hegde et al., 2010).

La proteína α -sinucleína está involucrada en la neuropatología de la enfermedad de Parkinson, pero no hay evidencia que sugiera la participación de los otros miembros de la familia de sinucleína (β -, γ -) en el proceso de neurodegeneración. Todas las sinucleínas tienen una secuencia de aa altamente conservada en el extremo N-terminal, teniendo una similitud conformacional en la hélice A2, enlazante de lípidos. La diferencia entre α -Syn y β -Syn es la presencia de 12 residuos de aa (71-VTGVTAVAQKTV-82) en la región central hidrofóbica requerida para la oligomerización y fibrilización de α -Syn (Auluck et al., 2010; Guerrero et al., 2013; Uversky et al., 2002). Esto indica que la β -Syn tiene una secuencia diferente, y por ello, no se encuentra involucrada en los procesos de neurodegeneración característicos de la Enfermedad de Parkinson.

Dentro de los tres miembros de la familia de la sinucleína, la α -Syn es considerada una diana terapéutica en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson ya que evidencias científicas sugieren que la agregación de esta proteína puede estar ligada con el desarrollo progresivo de esta enfermedad neurodegenerativa (Eriksen et al., 2003; Guerrero et al., 2013).

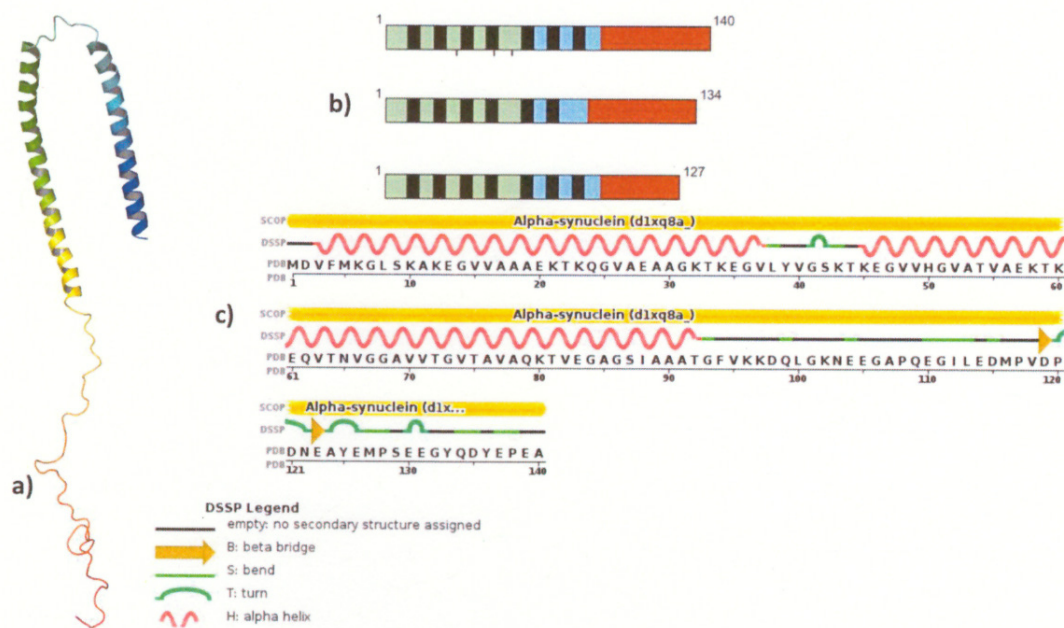


Figura 4. a) Estructura proteica de la α -sinucleína en forma monomérica cristalizada en el PDB (PDB: 1XQ8). b) Isoformas de la familias de la sinucleína, α -, β -, y γ -sinucleína con 140, 134 y 127 residuos de aa, respectivamente, en orden desde arriba hacia abajo (Goedert & Spillantini, 2012). c) Secuencia de residuos de aminoácidos con estructuras secundarias de la proteína α -sinucleína (PDB: 1XQ8).

La agregación de la α -Syn (**Figura 5**) inicia con la formación de monómeros de esta proteína, seguido de oligómeros hasta formar las fibrillas de α -Syn (Singh et al., 2013). Estos monómeros tienen poca compactación, hay ausencia de formas globulares, bajo contenido de estructuras secundarias y alta flexibilidad (Corti et al., 2019). Los oligómeros y las protofibrillas pueden tener forma de anillo, estela o pueden tener forma esférica. Donde los oligómeros son considerados especies tóxicas en las sinucleopatías. Investigaciones sugieren que una elevada concentración de proteínas, aglomeraciones moleculares, mutaciones, interacciones con metales de transición y otras pequeñas moléculas pueden contribuir a la formación de agregados de la α -Syn (oligómeros y fibrillas) (Eliezer et al., 2001; Gadad et al., 2011; Guerrero et al., 2013; Uversky et al., 2002; Weinreb et al., 1996).

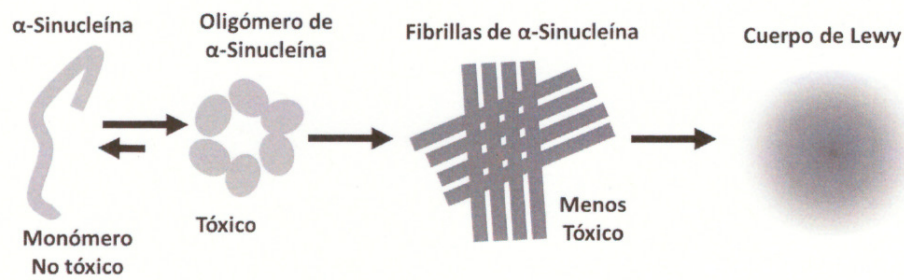


Figura 5. Mecanismo de formación de los cuerpos de Lewy (LB).

2.4 Medicamentos actuales para tratar la Enfermedad de Parkinson

Actualmente, existen diversos medicamentos para tratar la Enfermedad de Parkinson, pero es necesario seguir buscando nuevos medicamentos como una posible alternativa para retardar o detener el progreso de esta enfermedad neurodegenerativa crónica, que afecta no solo a las personas que lo padecen, sino también a quien los cuida (Giasson, 2003; Pirker et al., 2002; Reichmann, 2017).

Diversas estrategias con drogas aprobadas por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (**Figura 6**) han sido planteadas para el tratamiento de la EP (Faulkner, 2014), dentro de las que se pueden mencionar:

- Carbidopa: Por su estructura química similar a la levodopa inhibe la acción de la enzima dopa-descarboxilasa y previene la conversión por rutas periféricas de levodopa a dopamina (Faulkner, 2014).
- Levodopa: Es un pro-fármaco de la dopamina suplementado en conjunto con carbidopa, de forma exógena, para mejorar su paso por la barrera hematoencefálica; sin embargo, posee como efecto secundario la aparición de disquinesias con hipersensibilización de los receptores de dopamina en tratamientos a largo plazo (Jankovic & Stacy, 2007).
- Rotigotina, Ropinirol y Pramipexol: Se tratan de agonistas de dopamina no-ergolínicos (cuya estructura base es distinta del alcaloide ergolina), de los cuales dos poseen subestructuras con heterociclos sulfurados, que estimulan directamente los receptores dopaminérgicos al mimetizar los efectos de la dopamina en el

cerebro. Estos agonistas muestran menos efectos de disquinesias respecto a la levodopa, a cambio de ser menos robustos (Faulkner, 2014; Stowe et al., 2008).

- Rasagilina y Selegilina: Son inhibidores selectivos e irreversibles de la monoamino oxidasa de tipo B (MAO-B) que interrumpen la degradación de la dopamina y suelen utilizarse como paliativos a la terapia con levodopa, cuando esta empieza a dejar de surtir efecto (Keating et al., 2012; Sridhar et al., 2018).
- Entacapona y Tolcapona: Inhiben reversiblemente y de forma selectiva la catecol-O-metiltransferasa (COMT), con lo que previenen el metabolismo de la levodopa, por lo que suelen administrarse en conjunto con este último para potenciar sus efectos al poder mantenerse más tiempo libre en el plasma (Jankovic & Stacy, 2007).
- Benzotropina y Trihexifenidilo: Corresponden a drogas anticolinérgicas que antagonizan a los receptores muscarínicos de acetilcolina y permiten corregir el desbalance entre la dopamina y la acetilcolina propio de la enfermedad de Parkinson, por lo que también son consideradas como agentes antidisquinésicos (Faulkner, 2014; Lees, 2005).

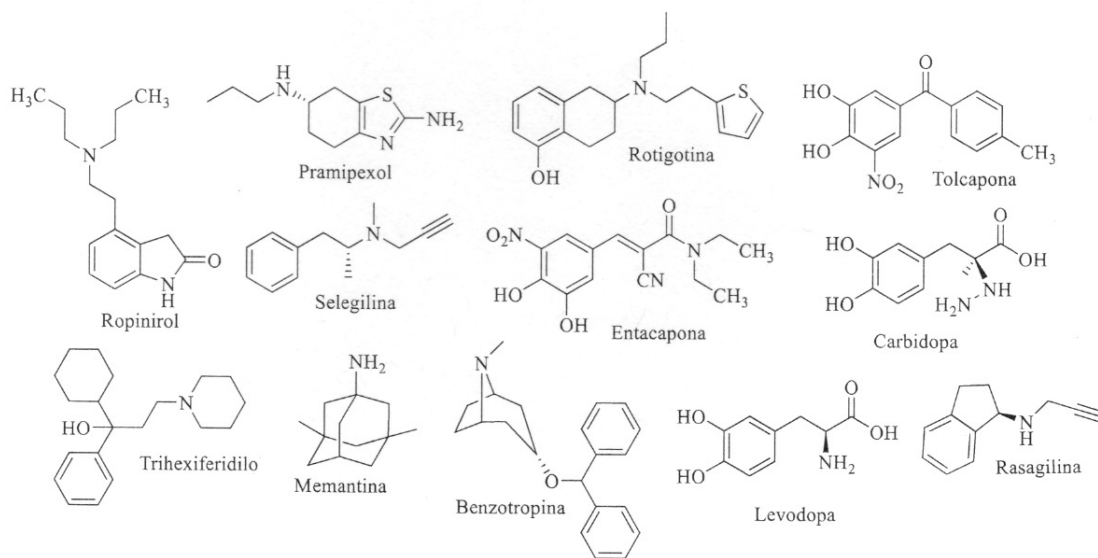


Figura 6. Estructura química de los medicamentos empleados para tratar la enfermedad de Parkinson.

2.5 Los productos naturales: Una novedosa alternativa para tratar la enfermedad de Parkinson

Las investigaciones apuntan a los productos naturales como potencial fuente de nuevos medicamentos contra esta enfermedad neurodegenerativa. La naturaleza ofrece una gama exuberante de compuestos que poseen propiedades neuroprotectoras (Kumar & Khanum, 2012). Dentro de los productos naturales, se encuentran los polifenoles que son una familia grande de aproximadamente 8000 compuestos (Lakey-Beitia et al., 2015); como por ejemplo, el resveratrol, el EGCG, la curcumina, que han demostrado poseer propiedades neuroprotectoras contra la enfermedad de Parkinson.

2.5.1 Curcumina

La curcumina (**Figura 7**) se encuentra en el rizoma de *Curcuma longa* y es considerada un producto nutraceutico (Gao et al., 2008; Giasson, 2003). La curcumina es un polifenol con múltiples propiedades terapéuticas entre ellas, ha presentado actividad neuroprotectora (Garcia-Garcia et al., 2012; Gomes et al., 2002; Guerrero et al., 2013), anti-cáncer (He et al., 2015), anti-oxidante (Hegde, 2014), anti-inflamatorio (Hegde et al., 2011) y anti-bacterial (Ingelsson, 2016; Jayaraj et al., 2014; Machacante et al., 2008). Investigaciones han demostrado que la curcumina puede modular la agregación de la α -sinucleína, característica de la enfermedad de Parkinson (Jin et al., 2014). La estructura química de la curcumina está conformada por dos sitios claves para su modificación estructural, como lo son, la región asimétrica con tautomería ceto-enol, y los dos anillos fenólicos (Kalia & Lang, 2015). Sin embargo, la dificultad de estos compuestos en convertirse en medicamento se debe a su baja biodisponibilidad en el organismo (Feng et al., 2015).

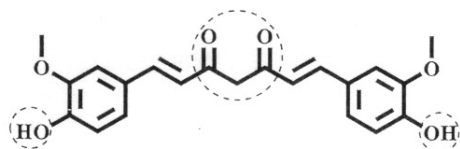


Figura 7. Sitios claves de reacción de la curcumina

2.5.2 Derivados de Curcumina

La modificación estructural de la curcumina ha demostrado mejorar su actividad biológica, y evitar la pérdida de su estabilidad mejorando su biodisponibilidad (Gao et al., 2008; Lakey-Beitia et al., 2017). La curcumina es una molécula fascinante que ha reportado actividades biológicas de consideración, por ello, el alto interés de seguir estudiando sus derivados con la finalidad de encontrar los compuestos de mayor actividad que prevenga su inestabilidad y baja biodisponibilidad, lo que no permite que la curcumina pueda ser utilizada como un medicamento. A pesar de las numerosas publicaciones y patentes reportadas, son pocos los derivados de curcumina que se han sintetizado con miras a hacerle frente a los problemas neurodegenerativos, como lo es la enfermedad de Parkinson (Gadad et al., 2012). Rao y colaboradores realizaron la síntesis de glucósidos de curcumina (**Figura 8a**), que presentaron actividad frente a la α -Sinucleína en la enfermedad de Parkinson (Gadad et al., 2012). Posteriormente, el grupo establece colaboraciones con la Universidad de San Antonio en Texas, Estados Unidos, y modificaron la estructura de la curcumina en los anillos fenólicos para sintetizar novedosos éteres y ésteres, de los cuales varios de ellos presentaron mayor actividad anti-inflamatoria y anti-agregante del péptido β -Amiloide en la enfermedad de Alzheimer, en comparación con la curcumina sin modificar (Lakey-Beitia et al., 2017). Con esto como punto de partida, se buscó establecer los métodos de síntesis de estos derivados de curcumina (**Figura 8b**) en Panamá, puesto que no se habían realizado en este País.

Para ello, la síntesis se dividió en dos etapas: primero, la unión del alcohol de partida a un conector de anhídrido succínico para formar un ácido alquil-succínico; y segundo, el acoplamiento del ácido alquil-succínico con la curcumina por medio de un activador y base.

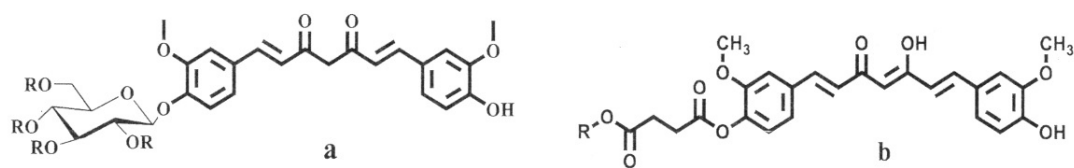


Figura 8. a) Los glucósidos de curcumina mostraron una mayor actividad inhibitoria que la curcumina frente a la α -sinucleína. b) Los derivados de curcumina mostraron una mayor actividad inhibitoria que la curcumina frente a β -Amiloide.

2.5.3 Síntesis preliminar del Ácido Alquil-Succínico

Investigaciones señalan que, la acilación de alcoholes con un anhídrido de ácido puede ser catalizada por el 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (Lakey-Beitia, 2017; Sakakura et al., 2007).

El mecanismo propuesto para esta reacción está basado en la acetilación de ter-butanol, realizada por Zipse y colaboradores, respaldada por estudios cinéticos y computacionales de alto nivel (Xu et al., 2005).

La acilación del alcohol comienza cuando se añade el anhídrido succínico y el DMAP a la reacción, donde se da el ataque nucleofílico del nitrógeno aromático del DMAP al carbono electrofílico del anhídrido succínico, formando el grupo acil-piridinio dándose la apertura del anillo. Después, de forma concertada, el grupo carboxilato formado desprotona al alcohol generando un alcóxido que ataca al grupo acil-piridinio formando el compuesto de interés (Xu et al., 2005). En esta reacción, la *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), también conocida como base de Hünig, actúa como base auxiliar no nucleofílica que permite regenerar el DMAP así como puede incrementar el carácter nucleofílico del alcohol (Baumgartner et al., 2017; Bromidge et al., 1993; Grossman, 2003; Reed et al., 2009; Zajac & Peters, 2007) (**Figura 9**).

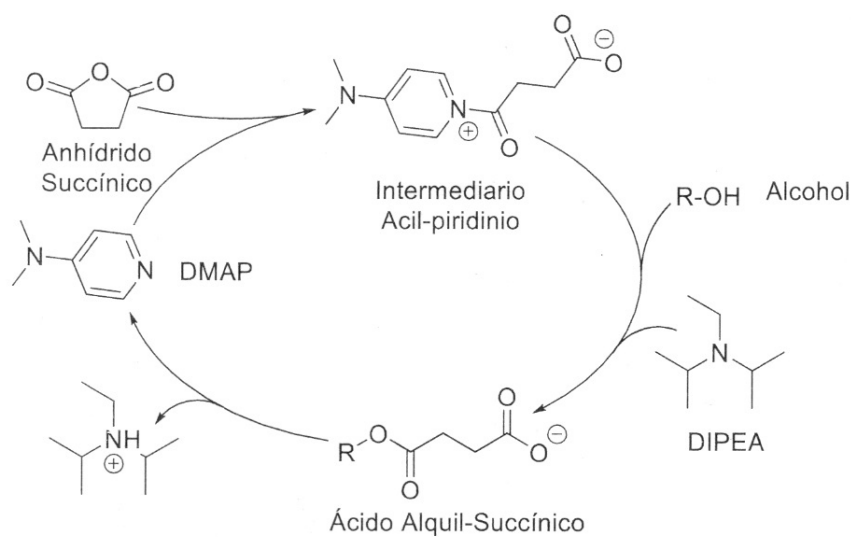


Figura 9. Mecanismo propuesto para la formación del ácido alquil-succínico.

2.5.4 Síntesis de Esteres Derivados de Curcumina

La literatura señala que la formación de ésteres a partir de alcoholes o fenoles con ácidos carboxílicos suele realizarse con la ayuda de activadores como las carbodiimidas (Greenwald et al., 2003). El mecanismo de reacción planteado se basa en diversas investigaciones sobre la acilación de alcoholes catalizada con DMAP por esterificación de Steglich (Cox & Chan, 2007; Neises & Steglich, 1978; Ragnarsson & Grehn, 1998; Sakakura et al., 2007; Xu et al., 2005).

La reacción (**Figura 10**) inicia con la activación del clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDCI) por medio de la abstracción del protón del ácido alquil-succínico, incrementando la electrofilicidad del carbono de la carbodiimida lo suficiente como para ser atacado por el grupo carboxilato generado, formando la *O*-Acilisourea. Chan y colaboradores señalan que la rapidez con la que se forma la *O*-Acilisourea dependerá de que el EDCI se encuentre doblemente protonado, por tanto se trata del paso determinante de la reacción, siguiendo una cinética de segundo orden (Cox & Chan, 2007). El nitrógeno libre de la *O*-Acilisourea desprotona otra molécula de Ácido Alquil-Succínico, formando un carboxilato que ataca el grupo carbonilo próximo a la *O*-Acilisourea por un ataque nucleofílico, facilitando la salida del sub-producto 1-(3-(dimetilamino) propil)-3-etilurea, y generando un anhídrido

simétrico como intermediario. Este último, es inmediatamente atacado por una molécula de DMAP, formando el intermediario activado (Xu et al., 2005). Este intermediario acil-piridinio altamente reactivo es fácilmente atacable por nucleófilos como el hidroxilo fenólico de la curcumina. El carboxilato formado desprotona al grupo hidroxilo del grupo fenólico de la curcumina, y este último, ataca al intermediario acil-piridinio para formar el derivado de curcumina, que puede ser monofuncional o difuncional (Lakey-Beitia, 2017). Tsakos y colaboradores mencionan que la *O*-Acilisourea podría tener diversas reacciones que involucren varias etapas con formación de intermediarios derivados del ácido carboxílico, con el Ester deseado como producto final (Tsakos et al., 2015). En paralelo, el hidroxilo fenólico libre del Ester Monofuncional de curcumina es capaz de reaccionar con otra unidad del intermediario Acil-piridinio, siguiendo el mismo mecanismo antes descrito, para formar el Ester Difuncional de curcumina con regeneración de otra unidad de DMAP (**Figura 10**). Los subproductos no deseados son eliminados durante el tratamiento ácido en medio acuoso debido a su alta solubilidad en agua.

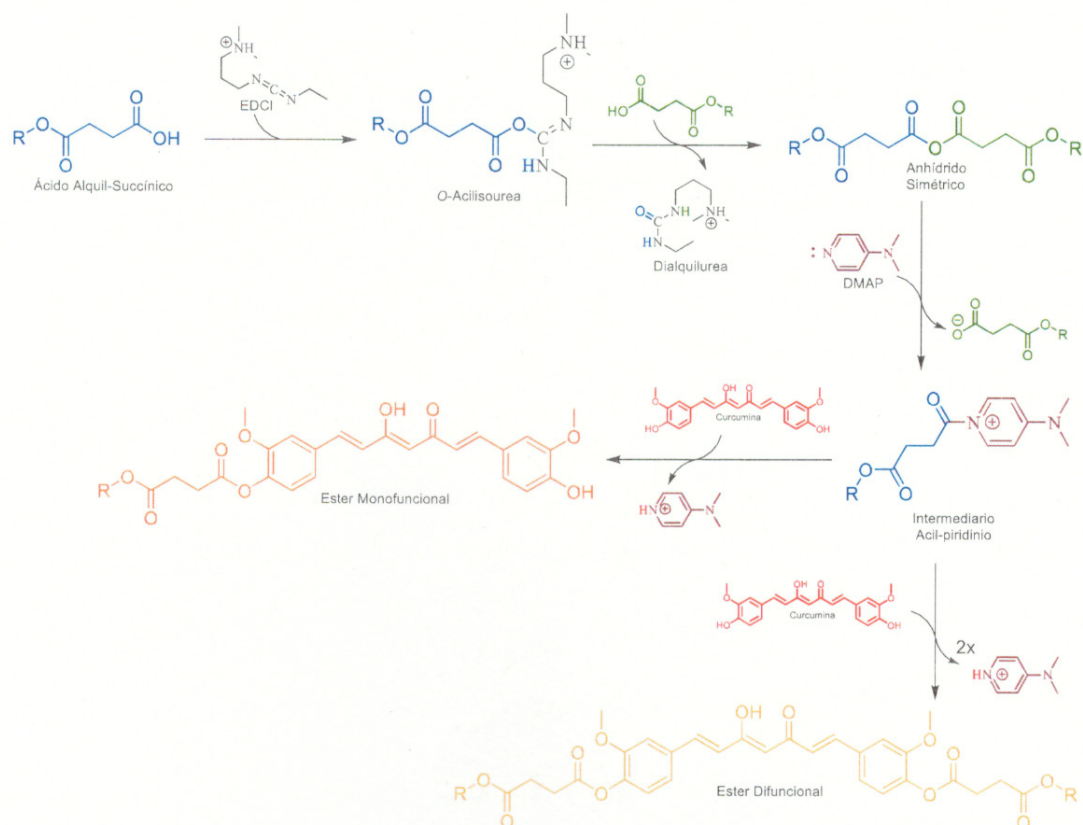


Figura 10. Mecanismo de reacción plausible para la formación de derivados de curcumina.

2.6 Química Computacional: Su rol dentro de la Investigación de la enfermedad de Parkinson

Esta investigación utilizará la herramienta de química computacional, para evaluar por medio del modelaje molecular la potencial actividad inhibitoria *in silico* de los derivados de curcumina frente a la proteína α -sinucleína. Esta herramienta computacional nos permite visualizar la interacción entre una molécula pequeña y una proteína, a nivel atómico. Esto nos permite caracterizar el comportamiento de pequeñas moléculas en el sitio de unión, simular como el ligando se une a una proteína, y conocer las posibles interacciones presentes que permiten formar un complejo estable. A través de esta herramienta se pueden identificar pequeños cambios en la conformación del ligando que conducen a grandes diferencias en las geometrías (Pagadala et al., 2017).

El Acoplamiento Molecular entre receptor y ligando se ha visto incrementado en los últimos años para realizar la búsqueda virtual de compuestos activos (Mellini et al., 2019). Existe una gran variedad de programas de acceso libre y con licencia que permiten realizarlo, pero nos enfocaremos en tres programas de acceso libre ampliamente conocidos, como lo son: AutoDock, AutoDock Vina y Smina.

- AutoDock permite realizar una búsqueda basada en una cuadrícula dando una rápida puntuación de la energía de interacción en conformaciones de prueba por medio del algoritmo genético Lamarckiano (Morris et al., 1998), y posee un campo de fuerza semi-empírico para predecir la energía de interacción de moléculas pequeñas (Morris et al., 2009).
- AutoDock Vina posee un algoritmo empírico basado en un optimizador global de búsqueda repetitiva local que permite explorar el espacio conformacional con todos los procesadores disponibles siguiendo un método de muestreo de Monte Carlo cuasi-Newtoniano, realizando una búsqueda rápida que elimina la necesidad de preparar mapas de cuadrícula y de agrupar los resultados en un solo archivo. La función de puntuación está inspirada en la función X-score y usa parámetros ponderados empíricamente para determinar la energía de interacción (Trott & Olson, 2010).
- Smina es una bifurcación de AutoDock Vina. Su algoritmo de búsqueda, para realizar el muestreo del espacio conformacional, provee un soporte mejorado para la minimización y la puntuación de compuestos pequeños (Koes et al., 2013). Se empleó la función de puntuación empírica Vinardo. Los creadores de este programa reportaron que al tomar de base la función de Vina y eliminar componentes estéricos con poco sentido físico, así como modificar el parámetro de radio atómico, entre otros ajustes a los demás valores ponderantes de la función, mejoró considerablemente el rendimiento del acoplamiento molecular y el posicionamiento de los resultados durante el análisis virtual respecto a AutoDock Vina (Quiroga & Villarreal, 2016).

Los programas de acoplamiento molecular tienden a ser bastante buenos prediciendo el orden (ranking) de los ligandos analizados o encontrando la mejor conformación de

cada uno de ellos. Sin embargo, no suelen desempeñarse bien en ambas características. Estos programas suelen ser probados contra bases de datos para demostrar su eficacia, lo que limita la confiabilidad de los resultados obtenidos fuera de esos conjuntos de sistemas en específico. Por otro lado, la función de puntuación de estos programas suele estar basada en principios diferentes: parámetros tomados del conocimiento como los campos de fuerza físicos, parámetros empíricos o una mezcla de ambos. Esto no permite la comparación directa entre los resultados obtenidos por distintas funciones de puntuación aunque parezca que se refieren a la energía de interacción. Diversas investigaciones han planteado varias estrategias, basadas en el puntaje (score) o en orden (rank) de los resultados, para poder remediar este inconveniente, como: el Rank por Número (RbN), el Rank por Voto (RbV), el Rank por Rank (RbR), el promedio de puntuaciones auto-escaladas (AASS), Z-score, entre otras. No obstante, cada una presenta sus propias limitantes. Es por ello que, investigadores del Grupo Tándem Max Planck de Biofísica de Enfermedades Tropicales en la Universidad de Antioquía en Colombia propusieron realizar un consenso exponencial del orden de las puntuaciones dadas por cada programa para cada ligando respecto al conjunto global de los ligandos analizados. Esto permite comparar distintos programas de acoplamiento molecular, mejorando la capacidad de ordenar los resultados obtenidos (Palacio-Rodríguez et al., 2019).

CAPÍTULO

III

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Cuadro 1. Cristalería y Materiales del laboratorio empleados en la síntesis de los derivados de curcumina.

Material	Capacidad	Marca
Balón con forma de pera	100 mL	Chemglass [®]
Balones de fondo redondo 14/20 y 24/40	100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL	Chemglass [®]
Bandeja de contención	14" x 14" x 2"	Chemglass [®]
Barra agitadora magnética	2 mm	Chemglass [®]
Bloques de reacción para diferentes viales	21x16 mL y 17 x 20 mL	Chemglass [®]
Botellas para soluciones acuosas	1000 mL	---
Embudos de separación	60 mL y 250 mL	Chemglass [®]
Espátulas	---	Chemglass [®]
Etiquetas MSDS	2 x 2 pulgadas	National Marker Comp [®]
Guantes de nitrilo	---	---
Jeringa con cierre de metal Luer	2 mL	Perfectum [®]
Mangueras de alto vacío	1 cm diámetro externo	Thomas Scientific [®]
Matraces Erlenmeyer	50 mL, 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL	Chemglass [®]
Papel de pesar	74 x 74 mm	Daigger [®]
Papel Parafilm [®]	4 pulgadas x 125 pies	Heathrow Scientific [®]
Pipetas Pasteur cortas	2 mL	Chemglass [®]
Propipetas	2 mL	Bel Art [®]
Sistema de filtración de disolventes	300 mL	Chemglass [®]
Soportes Universales	---	---
Vasos químicos	150 mL, 250 mL, 1000 mL	Chemglass [®]
Viales para reacción	16 mL y 20 mL	DWK Life Scientific [®]

3.2 Reactivos Químicos

Cuadro 2. Disolventes de uso general.

Disolvente	Grado / Pureza / Concentración	Marca
Acetato de etilo	ACS	Tedia [®] / Merk [®]
Acetona	ACS	Tedia [®]
Ácido Acético Glacial	99%	Sigma-Aldrich [®]
Ácido Clorhídrico	36.5-38.0%, ACS	EM Science [®]
Agua Desionizada	----	----
Argón	Grado 5, UHP	Airgas [®]
Diclorometano	HPLC/Espectro	Tedia [®]
Etanol desnaturalizado	95%	PROLUXSA [®]
Alcohol Isopropílico	ACS	---
Metanol	HPLC/Espectro	Tedia [®] / Merk [®]
n-Hexano	ACS	Tedia [®] / Merk [®]
Piridina	99%	BeanTown Chemical [®]

Cuadro 3. Reactivos Químicos empleados en la síntesis de los derivados de curcumina.

Reactivo	Grado / Pureza	Marca
4-dimetilaminopiridina	≥99%	Sigma-Aldrich [®]
Alcohol alílico	≥99%	Sigma-Aldrich [®]
Alcohol bencílico	≥99%	Honeywell [®]
Anhídrido succínico	≥99%	Sigma-Aldrich [®]
Carbonato de Sodio	≥99.9%	VWR Chemicals [™]
Ciclopentanol	99%	Sigma-Aldrich [®]
Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida	≥99.0%	Sigma-Aldrich ^{®s}
Cloruro de sodio	ACS	Merk [®] / PanReac AppliChem [®]
Curcumina	95%	Alfa Aesar [®]
<i>N, N</i> -diisopropiletilamina	99.5%	Sigma-Aldrich [®]
Sulfato de Sodio Anhidro	ACS	Merk [®] / PanReac AppliChem [®]
Tamices Moleculares	3Å	Sigma-Aldrich [®]

Cuadro 4. Reactivos para Cromatografía.

Reactivo	Especificaciones	Marca
Columna de fase normal	Luna [®] 5 µm Sílica (2) 100 Å 250 x 10 mm	Phenomenex [®]
Gel de Sílice	60 Å 230-400 Mesh	Sigma-Aldrich [®]
Placa para cromatografía en capa delgada	Gel de Sílice 60 Å F254	Sigma-Aldrich [®]
Vainillina	Revelador Químico para CCD	Sigma-Aldrich [®]

3.3 Equipos

Cuadro 5. Equipos de uso general.

Equipo	Marca	Modelo
Balanza Analítica	Ohaus [®]	Analytical Plus
Baño Ultrasónico	BRANSONIC [®]	CPX3800H
Bomba de Vacío	Welch	DOA-P704A-AA
Cámara de Extracción de gases	Labconco [®]	---
Computadora Portátil	Acer [®]	Aspire 3 A315-51-30PB
Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (CLAR)	Agilent [®]	1260 Infinity II
Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (CLAR)	Waters [®]	600
Espectrómetro de Infrarrojo (IR)	Brucker [®]	Platinum ATR Alpha
Espectrómetro de Masas (EM)	Waters [®]	Xevo TQD
Evaporador Rotario a Presión Reducida	Büchi [®]	R-300
Evaporador Rotario a Presión Reducida	Heindolph	LABOROTA 4002
Horno	Lindber/Blue M	Gravity Oven
Lámpara ultravioleta	Spectroline [®]	ENF-240C
Liofilizador	Labconco [®]	FreeZone 12
Micropipetas	Eppendorf [®]	---
Plato calentador	Chemglass [®]	---
Vortex	Scientific Industries, Inc.	Genie 2 G-560

3.4 Programas de Modelaje Molecular

Cuadro 6. Programas computacionales para realizar el Modelaje Molecular de los derivados de curcumina.

Programa	Institución	Versión
AutoDock 4	The Scripps Research Institute	4.2.6
AutoDock Vina	The Scripps Research Institute	1.1.2
AutoGrid 4	The Scripps Research Institute	4.2.6
ChemBio 3D	Perkin Elmer	13.0
ChemBio Draw Ultra	Perkin Elmer	13.0
MGLTools	The Scripps Research Institute	1.5.6 R3
Open Babel	Unieversity of Pittsburgh	2.3.1
PyMol	Schrödinger	2.3.3
Sistema Operativo Linux – Distribución Ubuntu	Canonical Ltd.	18.04.3 LTS
Smina	Unieversity of Pittsburgh	1.0

3.5 Análisis por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (CLAR)

Cada reacción fue analizada por cromatografía líquida de alto rendimiento con detector de arreglo de diodos (CLAR-DAD). Para obtener el perfil cromatográfico de los compuestos, se empleó un modelo Agilent 1260 Infinity II CLAR-DAD (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos) equipado con una bomba cuaternaria y una columna semi-preparativa de gel de sílice de fase normal (Luna[®] 5 µm Sílica (2) 100 Å LC Column 250 x 10 mm, Phenomenex[®], Torrance, CA, Estados Unidos) con un sistema en gradiente de n-Hexano (Hx) a AcOEt en 20 min a 2 mL/min. Para purificar los compuestos, se realizó con el mismo equipo de CLAR-DAD y la misma columna en un sistema isocrático de Hx:AcOEt (1:1, v:v) a 2 mL/min.

3.6 Caracterización de cada compuesto por Espectroscopía Infrarrojo (IR), y Espectrometría de Masas (MS)

La espectroscopía infrarrojo fue desarrollada para determinar los grupos funcionales del compuesto de interés. Las medidas IR fueron llevadas a cabo en un instrumento Platinum ATR Alpha (Bruker, Billerica, MA, Estados Unidos). La espectrometría de masas fue realizada para determinar la masa molar de cada compuesto, la cual se realizó en el Laboratorio de Bioorgánica Tropical de la Universidad de Panamá en un espectrómetro de masas Xevo TQD (Waters, Milford, MA, Estados Unidos) con

Ionización por Electrodispersión de iones positivos y negativos a 4 kV con analizador de triplecuadrupolo (ESI-TQD-MS).

3.7 Modelaje Molecular

En el **ANEXO I** se detalla paso a paso el procedimiento completo empleado para realizar el modelaje molecular.

3.7.1 Procedimiento General 1 (PG1) para Preparación del Receptor

1) Inspección Visual del Receptor:

- Se descargó la estructura del péptido (β -Amiloide, A β_{17-42} , PDB: 2BEG) y la proteína de interés (α -Sinucleína, α -Syn $_{1-140}$, PDB: 1XQ8) de la Base de Datos de Proteínas (Protein Data Bank, PDB) <https://www.rcsb.org>.
- Se guardó el péptido y la proteína de interés en la carpeta de trabajo.
- Se abrió la línea de comando de Linux.
- Se crearon las carpetas para los receptores.
- Se extrajo la cadena del péptido y la proteína de interés.
- Se predijo el pKa de los residuos de aa del receptor con PROPKA.
- Se abrió el archivo receptor.pdb con PyMol.
- Se inspeccionó visualmente que el péptido y la proteína que cumplieran con lo siguiente:
 - a) Estructura elucidada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN):
 - Secuencia completa de residuos de aa.
 - Residuos de aa sin átomos faltantes.
 - Estado de protonación de los residuos de aa His, Lis, Glu, Asp, Arg correcto a pH = 7.
 - b) Estructura elucidada por Rayos X:
 - Secuencia completa de residuos de aa.
 - Residuos de aa sin átomos faltantes.
 - Estado de protonación adecuado a pH = 7 de los residuos de aa His, Lis, Glu, Asp, Arg y orientación correcta de los residuos Gln y Asn, priorizando la formación de puentes de Hidrógeno a una distancia $\leq 3.5 \text{ \AA}$ y un ángulo $> 90^\circ$.

- Resolución $\leq 2.5 \text{ \AA}$.

- 2) Se corrigieron los residuos de aa incompletos del receptor con CHARMM-GUI.
- 3) Se transformó el archivo de receptor.pdb a receptor.pdbqt con AutoDockTools (ADT).

3.7.1.1 Preparación del receptor β -Amiloide

Aplicando el **PG1** para la preparación del receptor, se corrigió y protonó a $\text{pH} = 7$ la estructura tridimensional del péptido $\text{A}\beta$ (**Figura 11**), se empleó como Modelo de Referencia en la EA (PDB ID: 2BEG) y elucidada por RMN (Lührs et al., 2005).

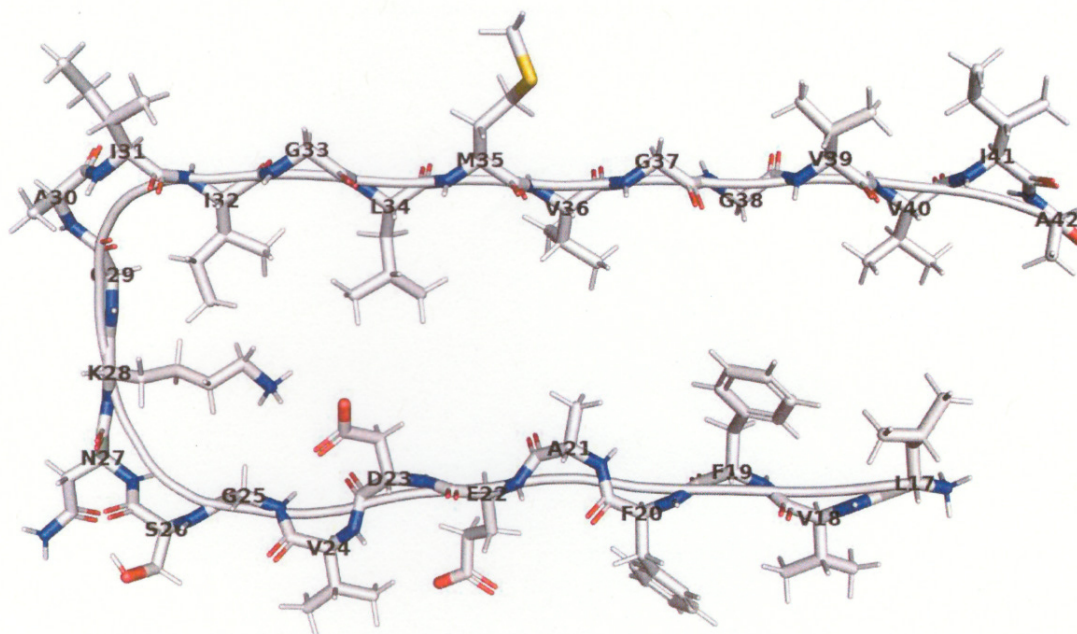


Figura 11. Estructura tridimensional preparada del péptido $\text{A}\beta$ (PDB ID: 2BEG).

3.7.1.2 Preparación del receptor α -Sinucleína

Aplicando el **PG1** para la preparación del receptor, se corrigió y protonó a $\text{pH} = 7$ la estructura tridimensional de la proteína α -Sinucleína (**Figura 12**) como Modelo de la EP (PDB ID: 1XQ8) y elucidada por RMN (Ulmer et al., 2005).



Figura 12. Estructura tridimensional preparada de la proteína α -Sinucleína (PDB ID: 1XQ8).

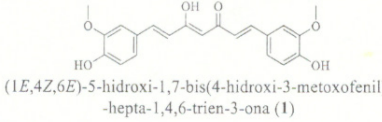
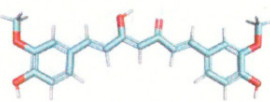
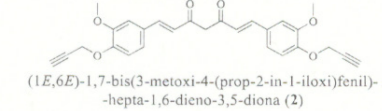
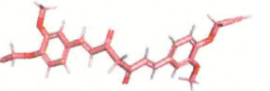
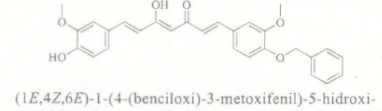
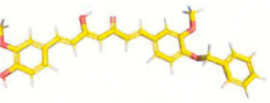
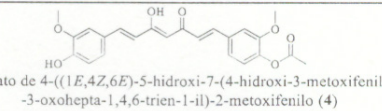
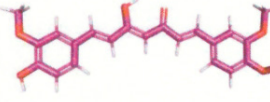
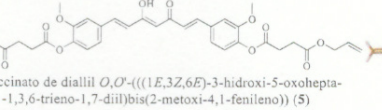
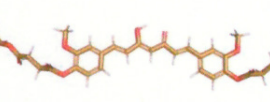
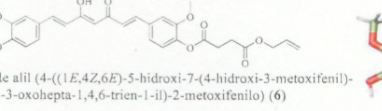
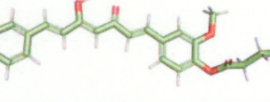
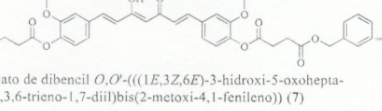
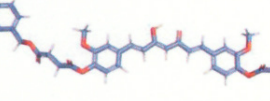
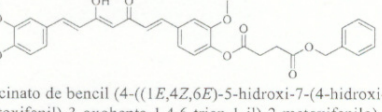
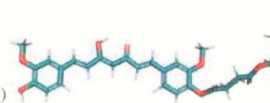
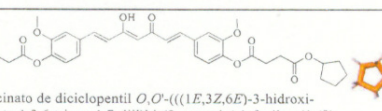
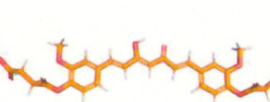
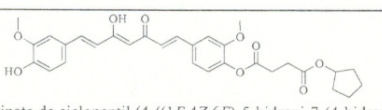
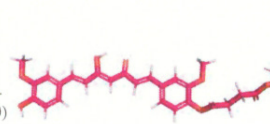
3.7.2 Procedimiento General 2 (PG2) para Preparación de los Ligandos

- Se creó la carpeta “Ligands” para guardar las estructuras de los ligandos.
- Se ingresó a la carpeta “Ligands”.
- Se utilizó ChemDraw para dibujar, corregir y guardar el ligando N (N representa la enumeración dada a cada ligando).
- Se minimizó y se guardó la estructura del ligando con Chem3D.
- Se transformó el archivo de Ligand N .pdb a Ligand N .pdbqt con ADT.
- Se verificó visualmente que la estructura química del Ligand N .pdbqt con PyMol.
- Se corrigió manualmente las torsiones de los archivos.
- Se repitieron los pasos del PG2 para generar todos los ligandos $_N$.

3.7.2.1 Preparación de los Ligandos

Aplicando el **PG2** se realizó la preparación de los ligandos, como se muestra a en el **Cuadro 7** donde se presenta la estructura química en tres dimensiones minimizada con el campo de fuerza MM2 (*Minimización: 0.1*) de Chem3D, y a lado se encuentra dibujada en dos dimensiones con ChemDraw con su respectivo nombre IUPAC.

Cuadro 7. Estructura Química de curcumina y compuestos derivados.

Código	Estructura Química (2D, 3D) de los compuestos derivados de curcumina
Curcumina, Ligando 1	 <chem>Oc1ccc(OC)cc1/C=C/C(O)/C=C/C(=O)/C=C/c2ccc(O)c(OC)c2</chem> (1 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-5-hidroxi-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,4,6-trien-3-ona (1) 
Ligando 2	 <chem>C#CCc1ccc(OC)cc1/C=C/C(=O)C(=O)/C=C/c2ccc(OC)cc2C#C</chem> (1 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-1,7-bis(3-metoxi-4-(prop-2-in-1-ilo)fenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona (2) 
Ligando 3	 <chem>Oc1ccc(OC)cc1/C=C/C(O)/C=C/C(=O)/C=C/c2ccc(OC)cc2COC3=CC=CC=C3</chem> (1 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-1-(4-(benciloxi)-3-metoxifenil)-5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,4,6-trien-3-ona (3) 
Ligando 4	 <chem>COc1ccc(OC)cc1/C=C/C(O)/C=C/C(=O)/C=C/c2ccc(OC)cc2COC3=CC=CC=C3</chem> Acetato de 4-((1 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxohepta-1,4,6-trien-1-il)-2-metoxifenilo (4) 
Ligando 5	 <chem>COc1ccc(OC)cc1/C=C/C(O)/C=C/C(=O)/C=C/c2ccc(OC)cc2COC3=CC=CC=C3</chem> Disuccinato de dialil <i>O,O'</i> -(((1 <i>E</i> ,3 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-3-hidroxi-5-oxohepta-1,3,6-trieno-1,7-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenileno)) (5) 
Ligando 6	 <chem>COc1ccc(OC)cc1/C=C/C(O)/C=C/C(=O)/C=C/c2ccc(OC)cc2COC3=CC=CC=C3</chem> Succinato de alil (4-((1 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxohepta-1,4,6-trien-1-il)-2-metoxifenilo) (6) 
Ligando 7	 <chem>COc1ccc(OC)cc1/C=C/C(O)/C=C/C(=O)/C=C/c2ccc(OC)cc2COC3=CC=CC=C3</chem> Disuccinato de dibencil <i>O,O'</i> -(((1 <i>E</i> ,3 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-3-hidroxi-5-oxohepta-1,3,6-trieno-1,7-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenileno)) (7) 
Ligando 8	 <chem>COc1ccc(OC)cc1/C=C/C(O)/C=C/C(=O)/C=C/c2ccc(OC)cc2COC3=CC=CC=C3</chem> Succinato de bencil (4-((1 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxohepta-1,4,6-trien-1-il)-2-metoxifenilo) (8) 
Ligando 9	 <chem>COc1ccc(OC)cc1/C=C/C(O)/C=C/C(=O)/C=C/c2ccc(OC)cc2COC3=CC=CC=C3</chem> Disuccinato de dicitlopentil <i>O,O'</i> -(((1 <i>E</i> ,3 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-3-hidroxi-5-oxohepta-1,3,6-trieno-1,7-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenileno)) (9) 
Ligando 10	 <chem>COc1ccc(OC)cc1/C=C/C(O)/C=C/C(=O)/C=C/c2ccc(OC)cc2COC3=CC=CC=C3</chem> Succinato de ciclopentil (4-((1 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxohepta-1,4,6-trien-1-il)-2-metoxifenilo) (10) 

3.7.3 Procedimiento General (PG3) para Acoplamiento Molecular por AutoDock

- Se creó la carpeta “Docking AutoDock” para guardar los resultados del Acoplamiento Molecular con AutoDock.
- Se ingresó a la carpeta “Docking AutoDock”.
- Se generó el Archivo de Parámetros de Celda (Grid Parameter File, en inglés).
- Se establecieron las dimensiones y coordenadas de la caja de cuadrícula con ADT.
 - Se ejecutó ADT.
 - Se adaptó el tamaño de la caja.
 - Se anotaron los números de puntos en las dimensiones x, y, z; y las coordenadas de centrado de la caja de cuadrícula en el archivo de la sección siguiente.
- Se modificaron los parámetros de la caja de cuadrícula en el archivo receptor.gpf.
- Se ejecutó AutoGrid4.
- Se generó el Archivo de Parámetros de Acoplamiento (Docking Parameter File).
- Se modificó el Archivo de Parámetros de Acoplamiento “LigandN_receptor.dpf”.
- Se ejecutó AutoDock4.
- Se obtuvieron las coordenadas de los modelos con ADT.
- Se transformó el archivo LigandN_out.pdbqt a LigandN_out.pdb con Open Babel.
- Se repitieron los pasos del **PG3** para producir el Acoplamiento Molecular con AutoDock de todos los ligandos con el receptor.

3.7.4 Procedimiento General (PG4) para Acoplamiento Molecular por AutoDock Vina

- Se creó la carpeta “Docking AutoDock Vina” para guardar los resultados del Acoplamiento Molecular con AutoDock Vina.
- Se ingresó a la carpeta “Docking AutoDock Vina”.
- Se creó un archivo de configuración.
- Se ejecutó AutoDock Vina.
- Se transformó el archivo LigandN_out.pdbqt a LigandN_out.pdb con Open Babel.
- Se repitieron los pasos del **PG4** para producir el Acoplamiento Molecular con AutoDock Vina de todos los ligandos con el receptor.

3.7.5 Procedimiento General (PG5) para Acoplamiento Molecular por Smina

- Se creó la carpeta “Docking Smina” para alojar los resultados del Acoplamiento Molecular con Smina.
- Se ingresó a la carpeta “Docking Smina”.
- Se creó un archivo de configuración.
- Se ejecutó Smina.
- Se transformó el archivo LigandN_out.pdbqt a LigandN_out.pdb con Open Babel.
- Se repitieron los pasos del **PG5** para producir el Acoplamiento Molecular con Smina de todos los ligandos con el receptor.

3.7.6 Acoplamiento Molecular de los programas seleccionados con el péptido β -Amiloide

Aplicando el PG3, PG4 y PG5, se realizó el acoplamiento molecular del péptido A β con los derivados de curcumina empleando los programas seleccionados: AutoDock 4, AutoDock Vina y Smina y se obtuvieron las energías de interacción receptor – ligando para cada uno (Figura 13).

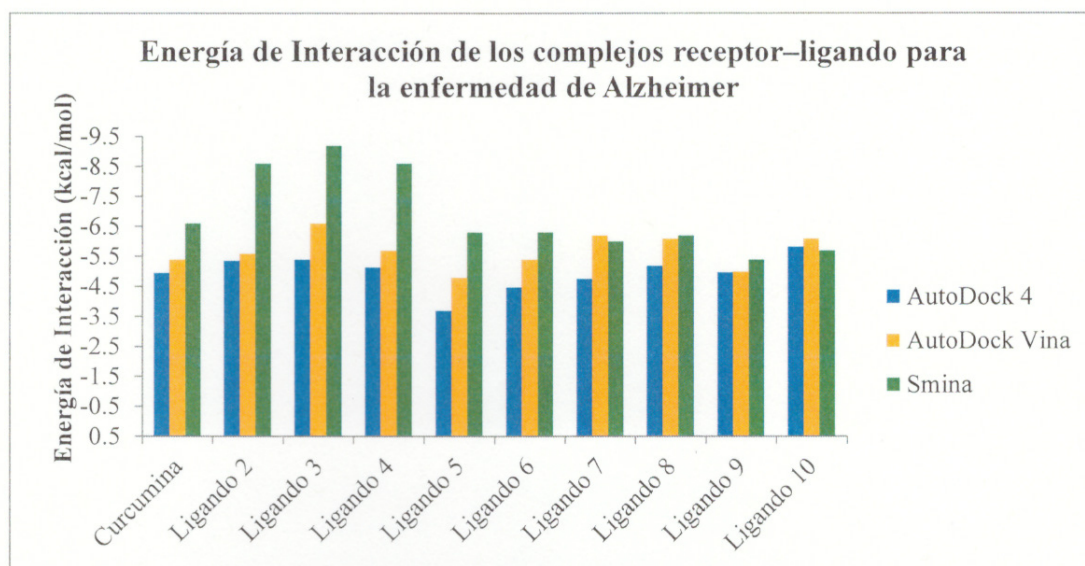


Figura 13. Energía de Interacción (kcal/mol) de los complejos receptor-ligando para la enfermedad de Alzheimer.

3.7.7 Acoplamiento Molecular de los programas seleccionados con la proteína α -Sinucleína

Aplicando el PG3, PG4 y PG5, se realizó el acoplamiento molecular de la proteína α -Syn con los derivados de curcumina empleando los programas seleccionados: AutoDock 4, AutoDock Vina y Smina y se obtuvieron las energías de interacción receptor – ligando para cada uno (Figura 14).

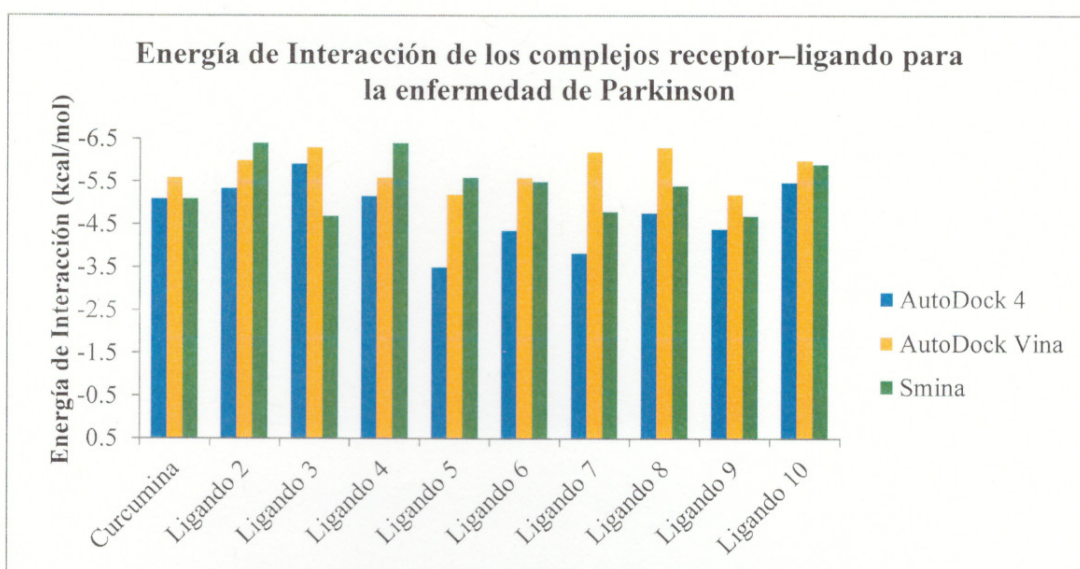


Figura 14. Energía de Interacción (kcal/mol) de los complejos receptor–ligando para la enfermedad de Parkinson.

3.7.8 Procedimiento General 6 (PG6) para realizar el Consenso Exponencial en el orden de las puntuaciones del Acoplamiento Molecular

- Se abrió una hoja de cálculo
- Se escribieron los resultados de las energías de interacción obtenidas por cada programa de acoplamiento Molecular.
- Se ordenaron los resultados de menor a mayor energía con la función “=RANK (Valor; Conjunto de datos; 1)”
- Se escribió aplicó el Rank Consenso Exponencial (ECR).

3.7.8.1 Rank Consenso Exponencial de las puntuaciones de Acoplamiento Molecular para el péptido β -Amiloide

Aplicando el **PG6**, se realizó el Rank Consenso Exponencial de las puntuaciones de acoplamiento molecular del péptido $A\beta$ con los derivados de curcumina y su comparación contra los resultados de referencia de anti-agregación del péptido $A\beta$, como se muestra en el **Cuadro 8**. La codificación por colores muestra a las mejores puntuaciones en verde y el cambio gradual hasta las puntuaciones desfavorables en rojo, respectivamente. Los resultados del Rank Consenso Exponencial muestran el orden obtenido para los Ligandos con el receptor de $A\beta$ y sombreados en gris los compuestos que no reportaron actividad Anti-Agregante.

El Rank es considerado como el listado de los resultados obtenidos por consenso exponencial de las puntuaciones asignadas a las energías de interacción de los complejos receptor-ligando (Krovat et al., 2005; Palacio-Rodríguez et al., 2019).

Cuadro 8. Comparación de los Resultados experimentales de la Actividad Anti-Agregante de péptido $A\beta$ y el Rank Consenso de los derivados de curcumina.

Código del Ligando	Actividad Anti-Agregante $A\beta$ IC_{50} (μM)	Rank	Rank Consenso Exponencial	Rank
Curcumina	1.49±0.9	2	0.166	7
Ligando 2	N.A.	S.P.	0.211	2
Ligando 3	2.05±0.1	6	0.263	1
Ligando 4	1.32±0.7	1	0.203	4
Ligando 5	1.96±0.7	4	0.134	9
Ligando 6	1.77±0.9	3	0.151	8
Ligando 7	N.A.	S.P.	0.172	6
Ligando 8	N.A.	S.P.	0.191	5
Ligando 9	N.A.	S.P.	0.132	10
Ligando 10	2.04±0.7	5	0.205	3

N.A.: No mostró actividad; S.P.: Sin Posición

3.7.8.2 Rank Consenso Exponencial de las puntuaciones de Acoplamiento Molecular para la proteína α -Sinucleína

Aplicando el PG6, se realizó el Rank Consenso Exponencial de las puntuaciones de acoplamiento molecular de la proteína α -Sinucleína con los derivados de curcumina, como se muestra en el Cuadro 9. La codificación por colores muestra a las mejores puntuaciones en verde y el cambio gradual hasta las puntuaciones desfavorables en rojo, respectivamente.

Cuadro 9. Comparación del consenso en el orden de los programas de Acoplamiento Molecular de los derivados de curcumina con la proteína α -Sinucleína.

Código del Ligando	Rank Consenso Exponencial	Rank
Curcumina	0.197	4
Ligando 2	0.215	2
Ligando 3	0.271	1
Ligando 4	0.189	6
Ligando 5	0.132	9
Ligando 6	0.145	8
Ligando 7	0.175	7
Ligando 8	0.200	3
Ligando 9	0.127	10
Ligando 10	0.190	5

3.7.9 Procedimiento General 7 (PG7) para el Consenso en la Pose de Acoplamiento Molecular

- Se colocaron en otra carpeta las mejores poses de cada Ligando.
- Se calculó la Desviación Cuadrática Media (RMS, en inglés) con ADT.
- Se graficaron los resultados obtenidos.

3.7.9.1 Consenso en la pose de Acoplamiento Molecular con el péptido β -Amiloide

Aplicando el PG7, se realizó el Consenso en la pose de Acoplamiento Molecular de los ligandos derivados de curcumina con el péptido β -Amiloide.

3.7.9.2 Consenso en la pose de Acoplamiento Molecular con la proteína α -Sinucleína

Aplicando el **PG7**, se realizó el Consenso en la pose de Acoplamiento Molecular de los ligandos derivados de curcumina con la proteína α -Sinucleína.

3.8 Síntesis de Derivados de Ésteres de Curcumina

3.8.1 Procedimiento General 8 (PG8) para la síntesis de ácido alquil-succínico

En un vial de reacción de 20 mL cargado con tamices moleculares de 3Å, se secó en un horno a 110 °C por 3 horas (h) y luego fue purgado con argón. Después, se le agregó 2 mL de disolvente (diclorometano) seguido de 4.62 mmol de alcohol y 6.94 mmol de base (DIPEA) agitándose por espacio de 2 h. Luego, se añadió 6.94 mmol de anhídrido succínico y 6.94 mmol de DMAP a la mezcla de reacción, y se dejó reaccionar por espacio de 48 h a 25 °C. Posteriormente, se evaporó el disolvente de la reacción en el evaporador rotatorio a presión reducida con el baño térmico a 35 °C. Después, se añadió 3 mL de agua fría y HCl 1M hasta llegar a $\text{pH} \leq 3$, y se procedió a realizar una extracción líquido-líquido con AcOEt (3×10 mL), y se le agregó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) a la fase orgánica, la cual se evaporó y se liofilizó para determinar la cantidad de producto (Lakey-Beitia et al., 2017).

3.8.1.1 Procedimiento para la síntesis del ácido 4-(aliloxi)-4-oxobutanoico (A1)

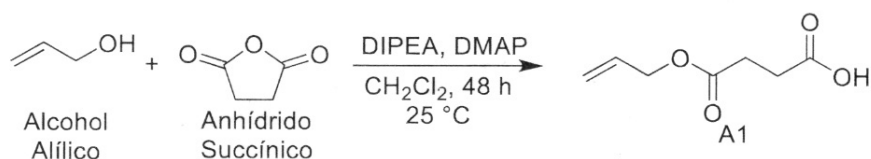
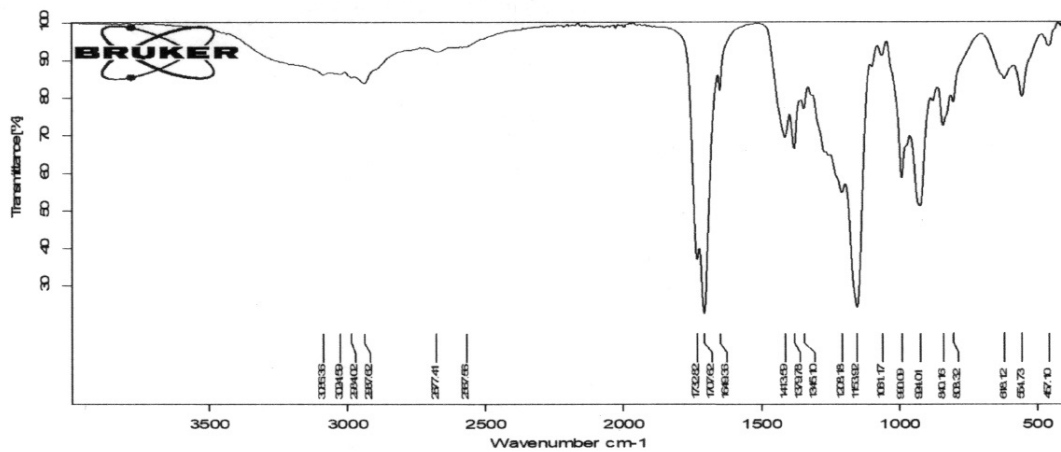
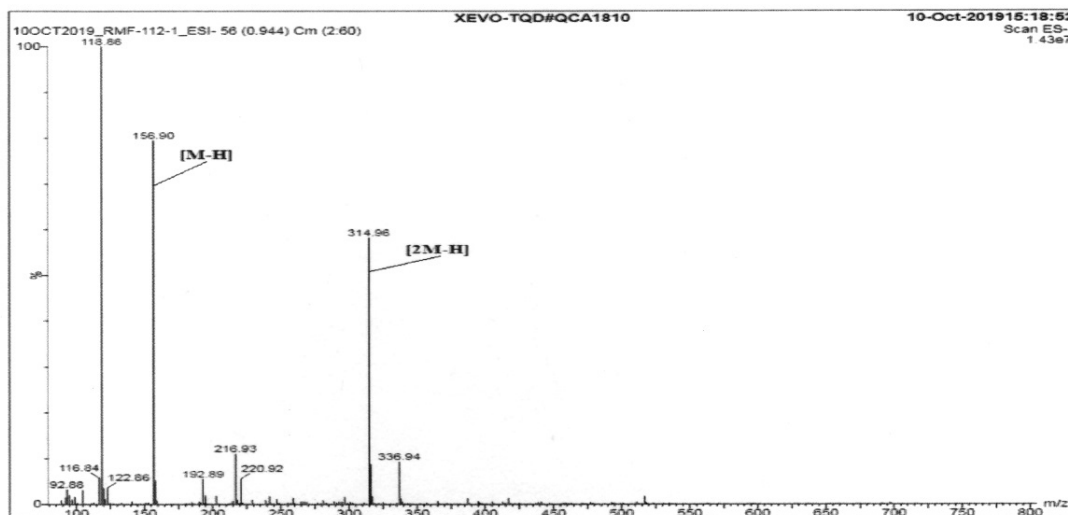
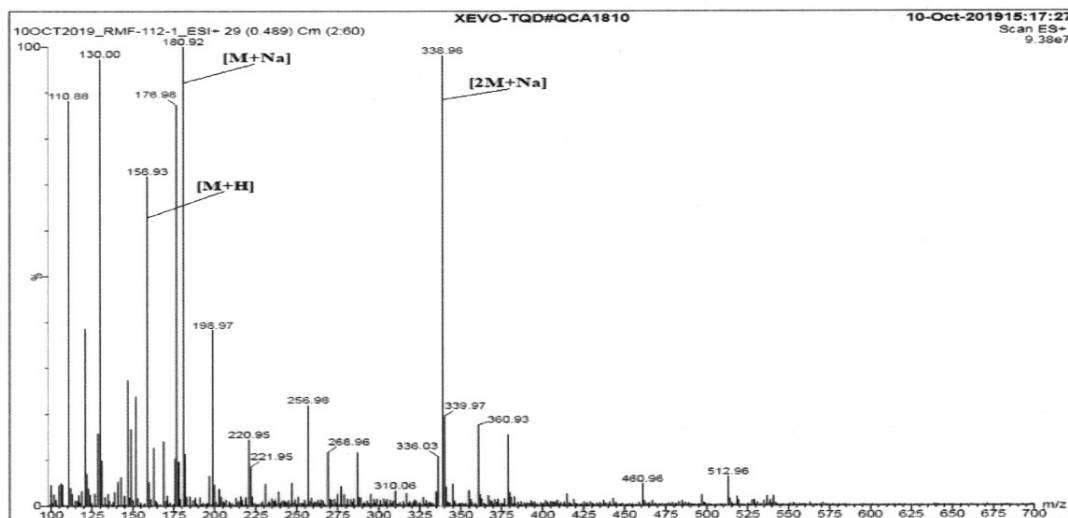


Figura 15. Preparación del ácido 4-(aliloxi)-4-oxobutanoico (compuesto **A1**).

Aplicando el **PG8**, en un vial de reacción se agregó 2 mL diclorometano seguido de 3.45 mmol de alcohol alílico y 5.17 mmol de DIPEA agitándose por espacio de 2 h. Luego, se añadió 5.17 mmol de anhídrido succínico y 5.17 mmol de DMAP a la mezcla de reacción, y se dejó reaccionar por espacio de 48 h a 25 °C. Se obtuvo 722.86 mg de **A1**, y se utilizó para la siguiente reacción sin purificar. ESI-(+)-TQD-MS (m/z) calculado para C₇H₁₀NaO₄: 181.05 y el encontrado, 180.92 [M+Na⁺]; el calculado para C₇H₁₁O₄: 159.07 y el encontrado: 158.93 [M+H⁺]. ESI-(-)-TQD-MS (m/z) calculado para C₇H₉O₄: 157.05 y el encontrado: 156.90 [M-H⁻]. ATR-FTIR: 924.01, 1153.92, 1379.78, 1707.62, 1732.82, 2937.62.



C:\OPUS_7.2.139.1294\Meas\RMF-112-1.0 RMF-112-1 Instrument type and / or accessory 11/20/2019

Figura 16. Espectros de Masas e IR del compuesto A1.

3.8.1.2 Procedimiento para la síntesis del ácido 4-(benciloxi)-4-oxobutanoico (A2)

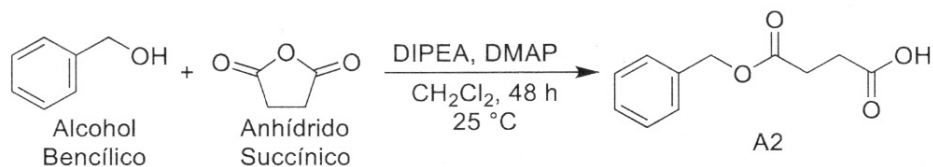
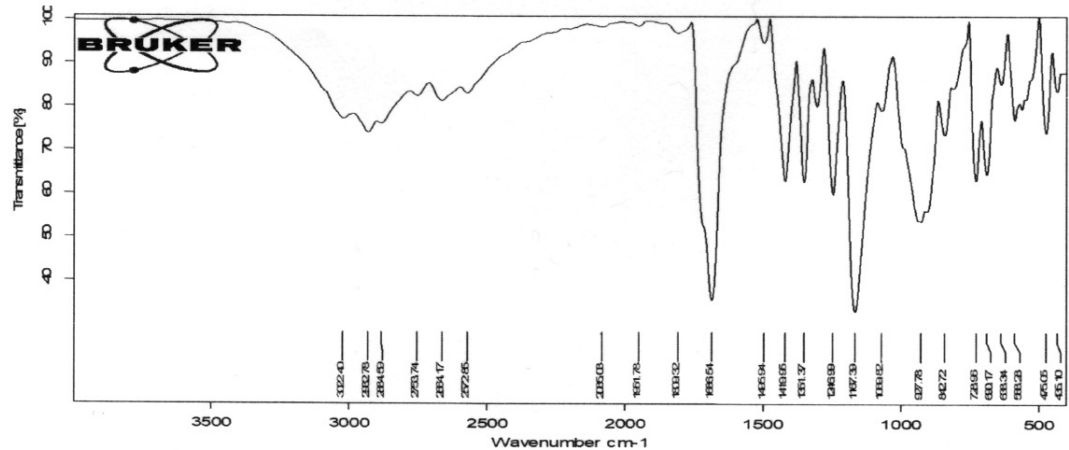
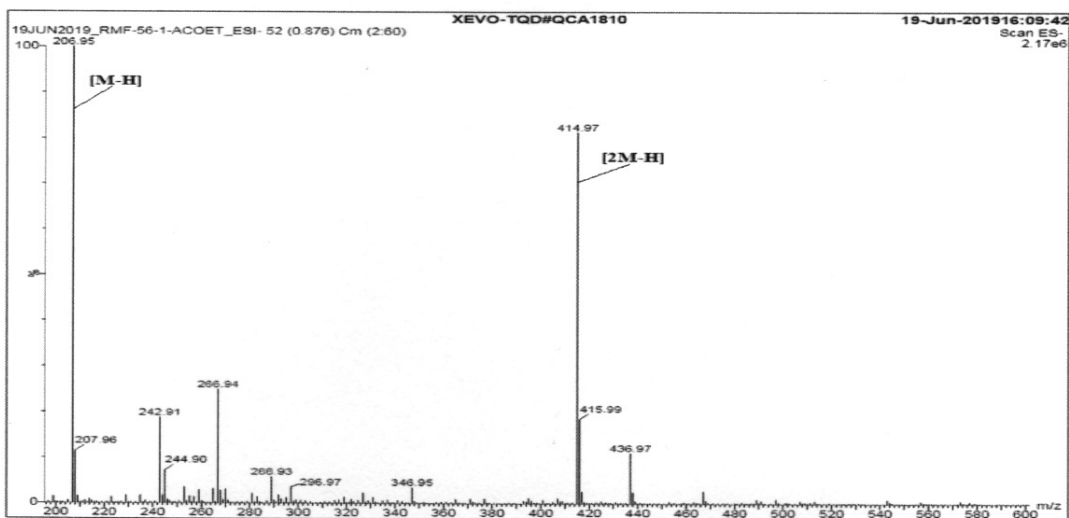
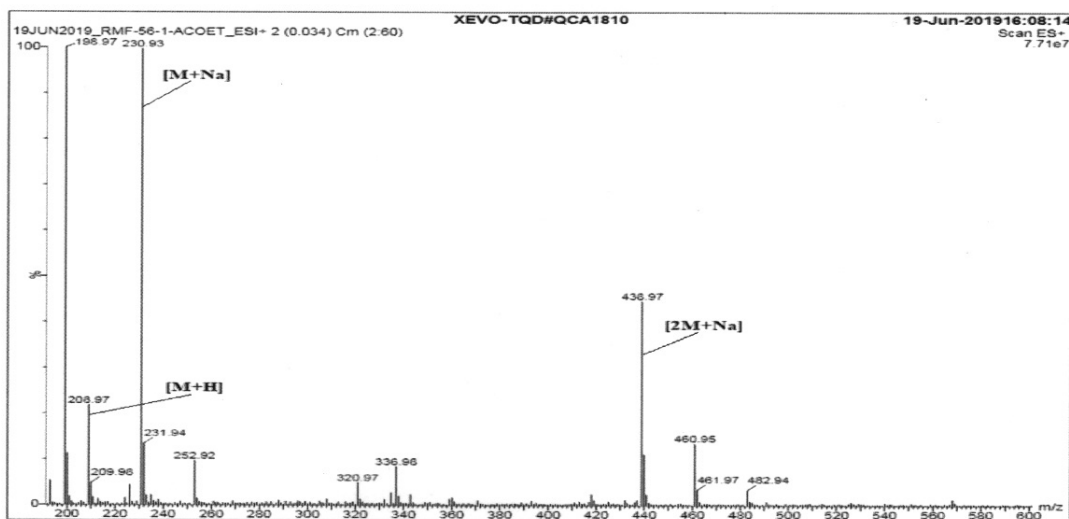


Figura 17. Preparación del ácido 4-(benciloxi)-4-oxobutanoico (compuesto **A2**).

Aplicando el **PG8**, en un vial de reacción se agregó 2 mL diclorometano seguido de 4.62 mmol de alcohol bencílico y 6.94 mmol de DIPEA agitándose por espacio de 2 h. Luego, se añadió 6.94 mmol de anhídrido succínico y 6.94 mmol de DMAP a la mezcla de reacción, y se dejó reaccionar por espacio de 48 h a 25 °C. Se obtuvo 1.06 g de **A2**, y se utilizó para la siguiente reacción sin purificar. LRMS-ESI modo positivo (m/z) calculado para C₁₁H₁₂NaO₄: 231.06 y el encontrado: 230.93 [M+Na⁺]; el calculado para C₁₁H₁₃O₄: 209.08 y el encontrado: 208.97 [M+H⁺]. ESI-TQD-MS modo negativo (m/z) calculado para C₁₁H₁₁O₄: 207.07 y el encontrado: 206.95 [M-H⁻]. ATR-FTIR: 927.78, 1167.39, 1419.95, 1686.54, 2884.59, 2932.78, 3022.40.



C:\OPUS_7.2.139.1294\MEAS\RMF-56-2-AcOEt.0 RMF-56-2-AcOEt Instrument type and / or accessory 11/20/2019

Figura 18. Espectros de Masas e IR del compuesto A2.

3.8.1.3 Procedimiento para la síntesis del ácido 4-(ciclopentiloxi)-4-oxobutanoico (A3)

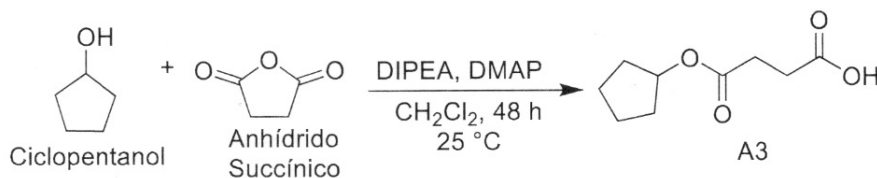
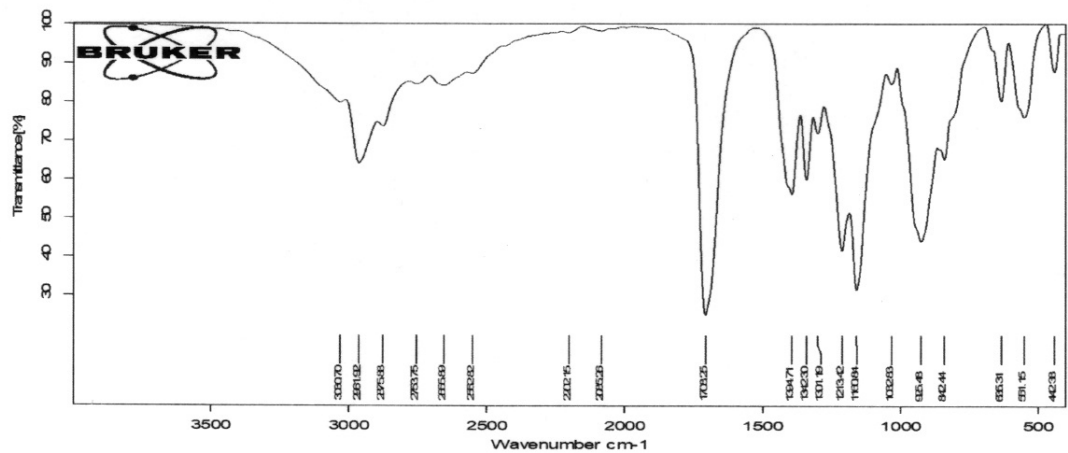
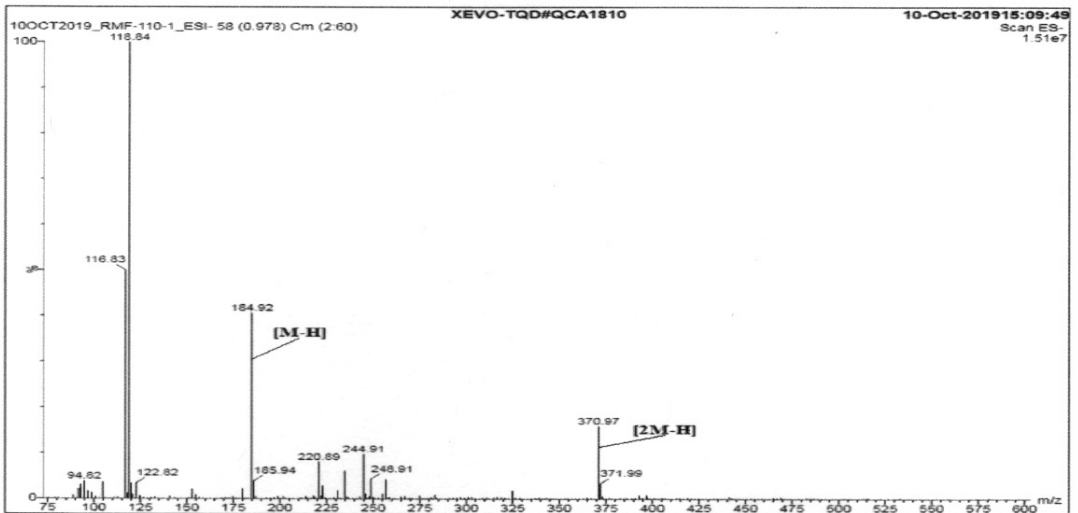
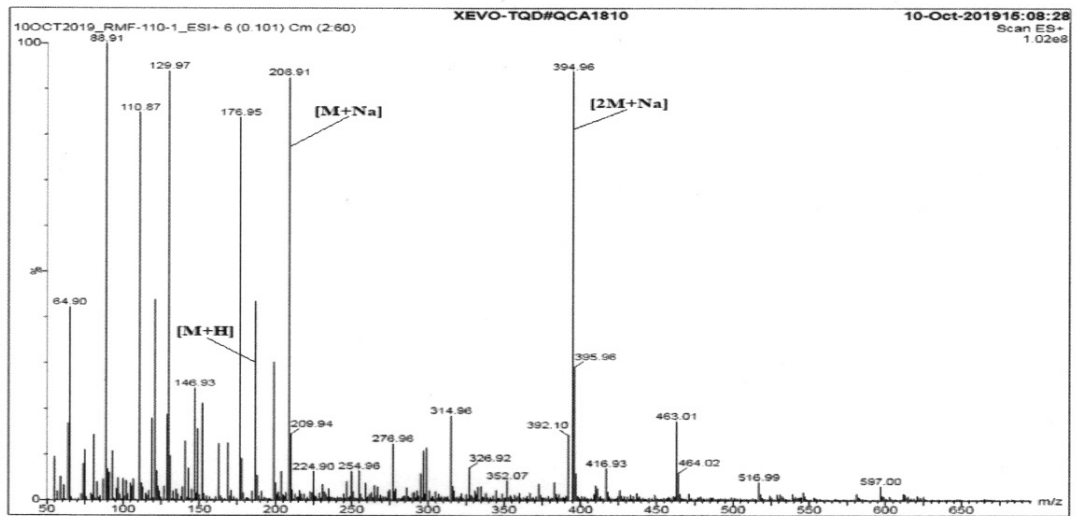


Figura 19. Preparación del ácido 4-(ciclopentiloxi)-4-oxobutanoico (compuesto **A3**).

Aplicando el **PG8**, en un vial de reacción se agregó 2 mL diclorometano seguido de 2.32 mmol de ciclopentanol y 3.48 mmol de DIPEA agitándose por espacio de 2 h. Luego, se añadió 3.48 mmol de anhídrido succínico y 3.48 mmol de DMAP a la mezcla de reacción, y se dejó reaccionar por espacio de 48 h a 25 °C. Se obtuvo 450.91 mg de **A3**, y se utilizó para la siguiente reacción sin purificar. ESI-(+)-TQD-MS (m/z) calculado para C₉H₁₄NaO₄: 209.08 y el encontrado: 208.91 [M+Na⁺]; el calculado para C₉H₁₅O₄: 187.10 y el encontrado: 186.98 [M+H⁺]. ESI-(-)-TQD-MS (m/z) calculado para C₉H₁₁O₄: 185.08 y el encontrado, 184.92 [M-H⁻]. ATR-FTIR: 925.48, 1160.84, 1213.42, 1394.71, 1708.25, 2875.88, 2961.92, 3030.70.



C:\OPUS_7.2.139\MEAS\RMF-110-1.0 RMF-110-1 Instrument type and / or accessory 11/20/2019

Figura 20. Espectros de Masas e IR del compuesto A3.

3.8.2 Procedimiento General 9 (PG9) para la síntesis de Ésteres de Curcumina

En un vial de reacción de 16 mL cargado con tamices moleculares de 3Å, se secó en un horno a 110 °C por 3 h y luego fue purgado con argón. Seguido, se añadió 0.24 mmol de ácido alquil-succínico preparado con el **PG8** seguido de 0.07 mmol de Curcumina, 0.08 mmol de DMAP y 2 mL de disolvente (piridina). Se agitó por 10 minutos (min) a 25 °C, y luego el vial de la reacción se colocó en baño de hielo por 10 min. Posteriormente, se adicionó 0.39 mmol de clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDCI) y se agitó por 10 min a 0 °C. La reacción se dejó agitando en un plato agitador magnético por 46 h a 25 °C. Pasado este tiempo, a la reacción se le agregó una disolución acuosa de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1M y disolución salina saturada (1:1, v:v, 6 mL), se agregó HCl 1M (2 × 15 mL), y se realizó una extracción líquido-líquido con AcOEt (2 × 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó en un evaporador rotatorio a presión reducida con el baño térmico a 35 °C. El extracto crudo fue purificado por CLAR-DAD (Lakey-Beitia, González, et al., 2017).

3.8.2.1 Procedimiento para la síntesis del disuccinato de dialil *O,O'*-((1E,3Z,6E)-3-hidroxi-5-oxohepta-1,3,6-trieno-1,7-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenileno) (5) y del succinato de alil (4-((1E,4Z,6E)-5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxohepta-1,4,6-trien-1-il)-2-metoxifenilo) (6)

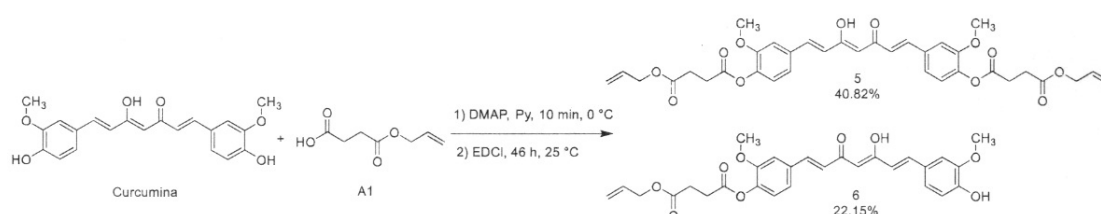
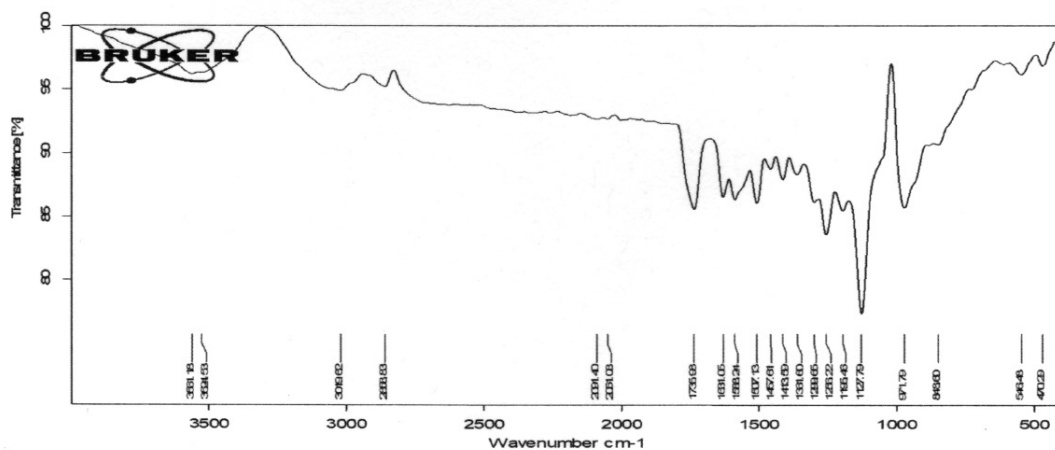
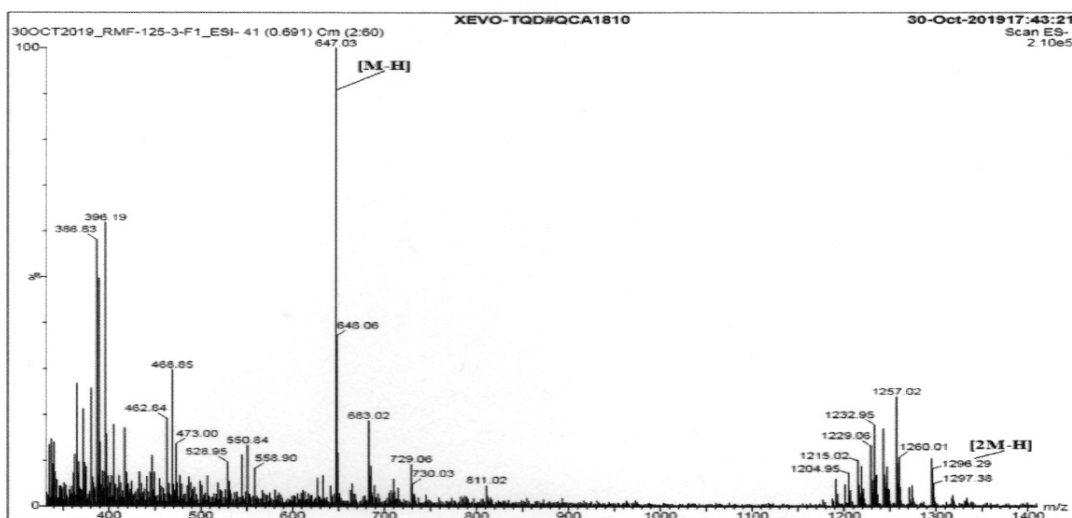
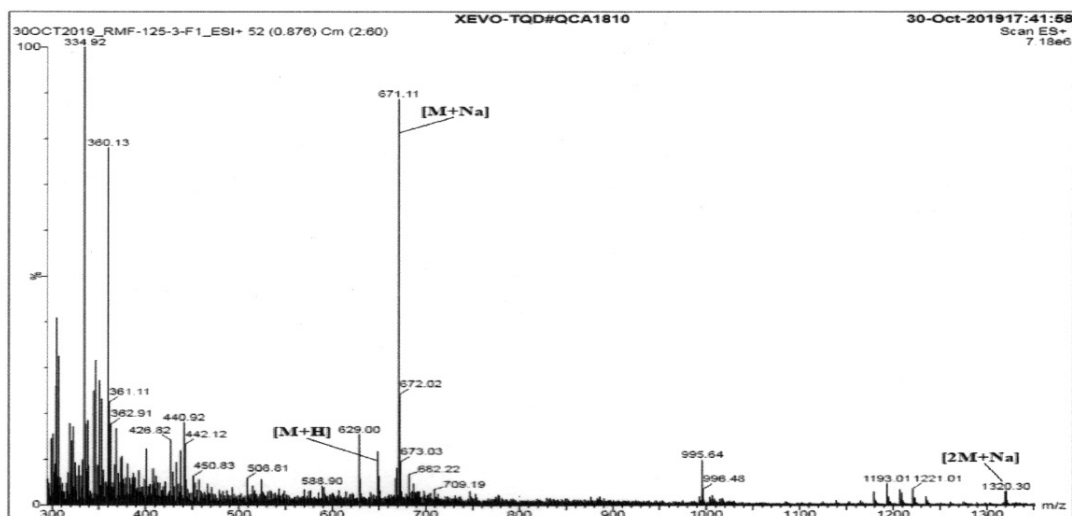


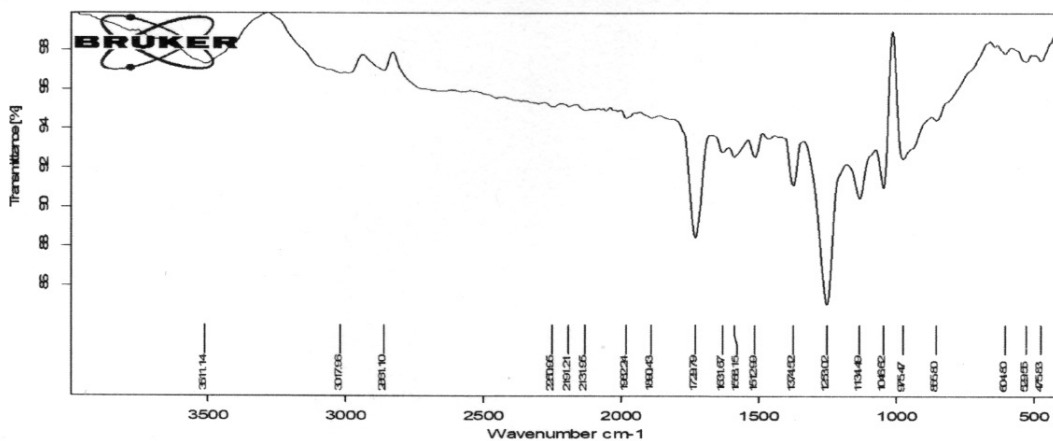
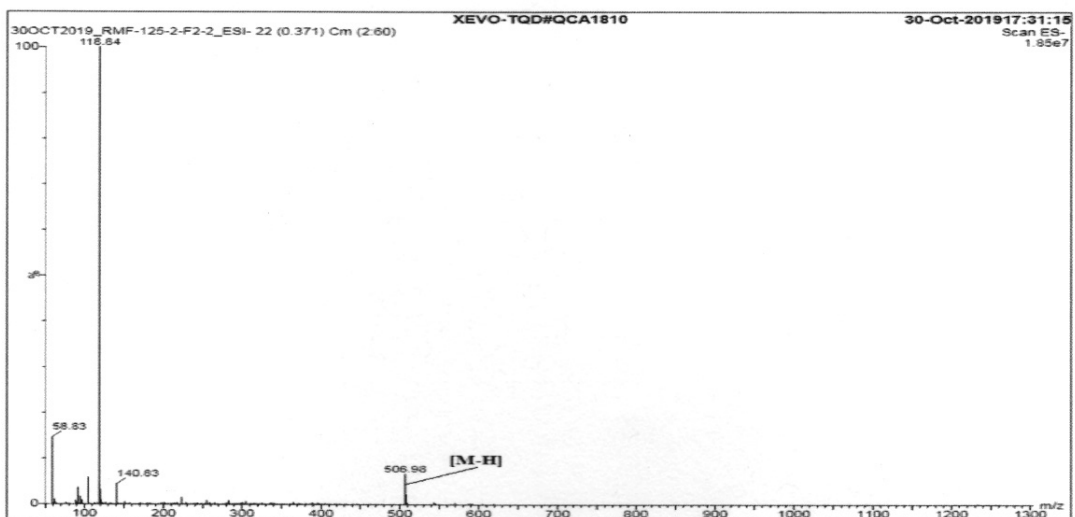
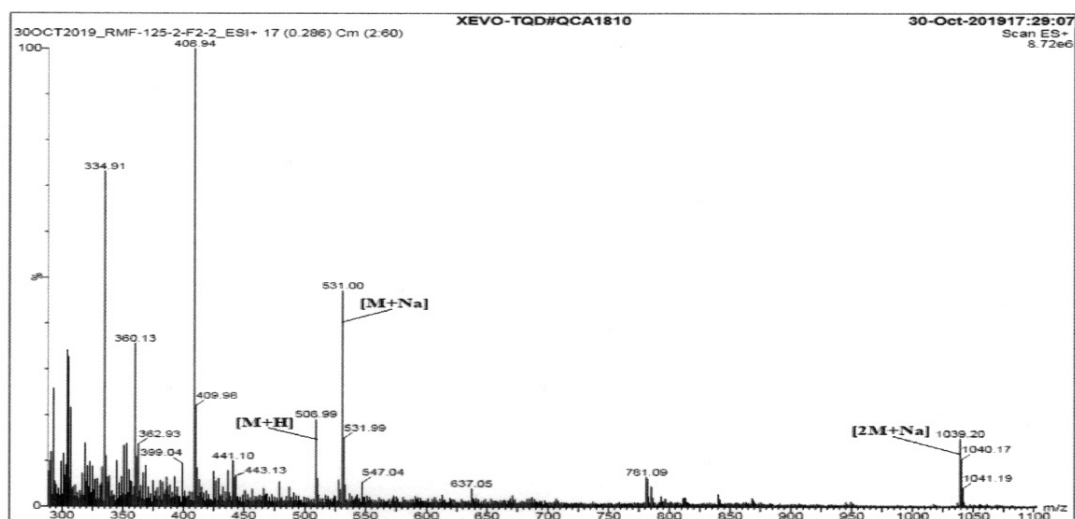
Figura 21. Preparación de compuesto 5 y 6.

Aplicando el **PG9**, en un vial de reacción se añadió 0.62 mmol de **A1** seguido de 0.14 mmol de Curcumina, 0.16 mmol de DMAP y 2 mL de piridina y se hizo reaccionar por 10 min a 0 °C. Posteriormente, se adicionó 0.78 mmol de EDCl y se dejó reaccionar por 46 h a 25 °C. El extracto crudo fue purificado por CLAR-DAD obteniéndose 20.40 mg (40.82%) del compuesto **5** y 7.63 mg (22.15%) del compuesto **6**. ESI-(+)-TQD-MS (m/z) calculado para el compuesto **5**: $C_{35}H_{36}NaO_{12}$: 671.21 y el encontrado: 671.11 $[M+Na^+]$; el calculado para $C_{35}H_{37}O_{12}$: 649.23 y el encontrado: 649.23 $[M+H^+]$. ESI-(-)-TQD-MS (m/z) calculado para $C_{35}H_{35}O_{12}$: 647.21 y el encontrado: 647.03 $[M-H^-]$. ATR-FTIR: 971.79, 1127.79, 1256.22, 1413.59, 1507.13, 1588.24, 1631.05, 1735.98. ESI-(+)-TQD-MS (m/z) calculado para el compuesto **6**: $C_{28}H_{28}NaO_9$: 531.16 y el encontrado: 531.00 $[M+Na^+]$; el calculado para $C_{28}H_{29}O_9$: 509.18 y el encontrado: 508.99 $[M+H^+]$. ESI-(-)-TQD-MS (m/z) calculado para $C_{28}H_{27}O_9$: 507.17 y el encontrado: 506.98 $[M-H^-]$. ATR-FTIR: 975.47, 1046.62, 1134.49, 1253.02, 1374.52, 1512.99, 1588.15, 1631.67, 1729.79.



C:\OPUS_7.2.139\1294\MEAS\RMF-125-3-F1.0 RMF-125-3-F1 Instrument type and / or accessory 11/20/2019

Figura 22. Espectros de Masas e IR del compuesto 5.



C:\OPUS_7.2.139.1294\MEAS\RMF-124-1-F2-2.0 RMF-124-1-F2-2 Instrument type and / or accessory 11/20/2019

Figura 23. Espectros de Masas e IR del compuesto 6.

3.8.2.2 Procedimiento para la síntesis del disuccinato de dibencil *O,O'*-((1E,3Z,6E)-3-hidroxi-5-oxohepta-1,3,6-trieno-1,7-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenileno) (7) y del succinato de bencil (4-((1E,4Z,6E)-5-hidroxi-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxohepta-1,4,6-trien-1-il)-2-metoxifenilo) (8)

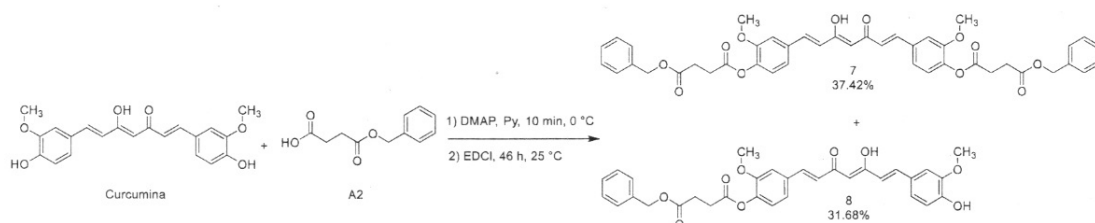
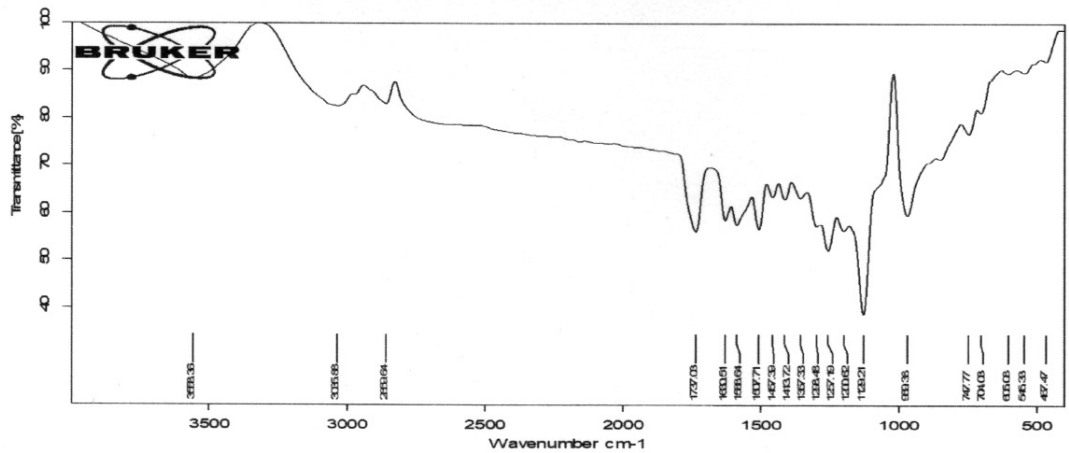
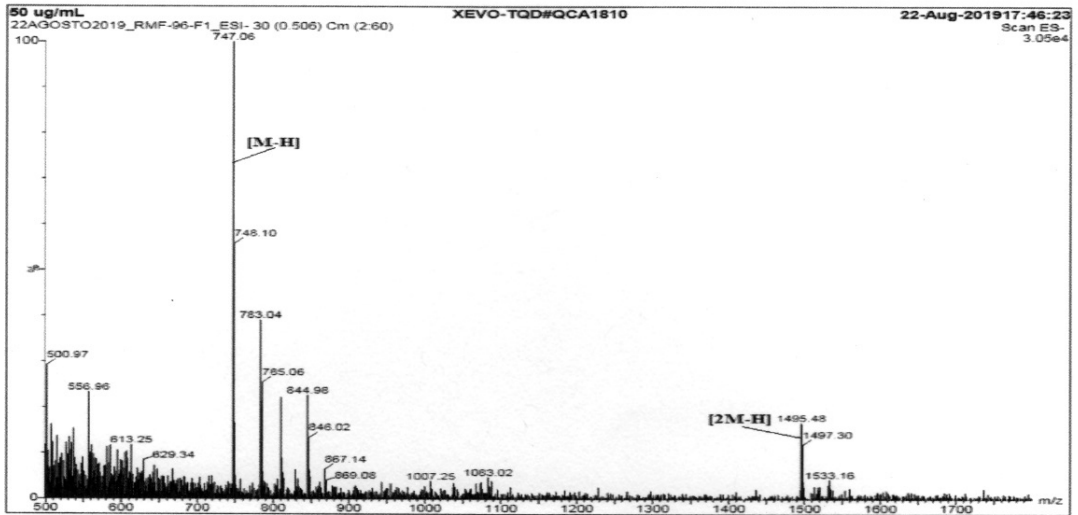
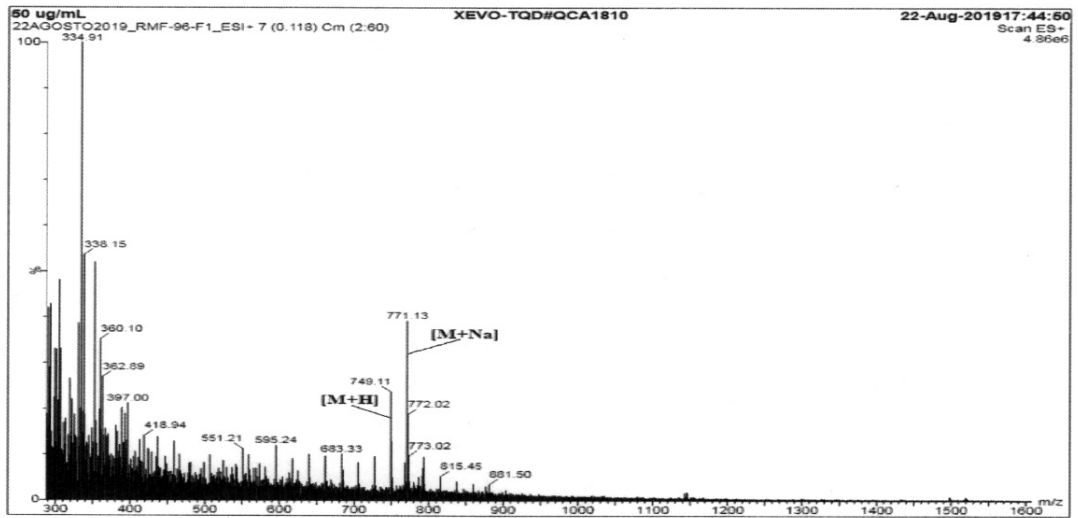


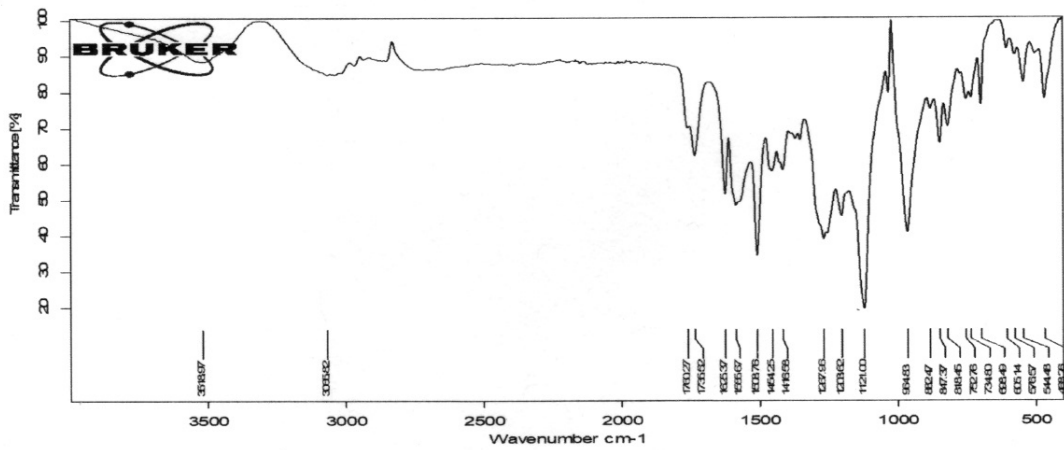
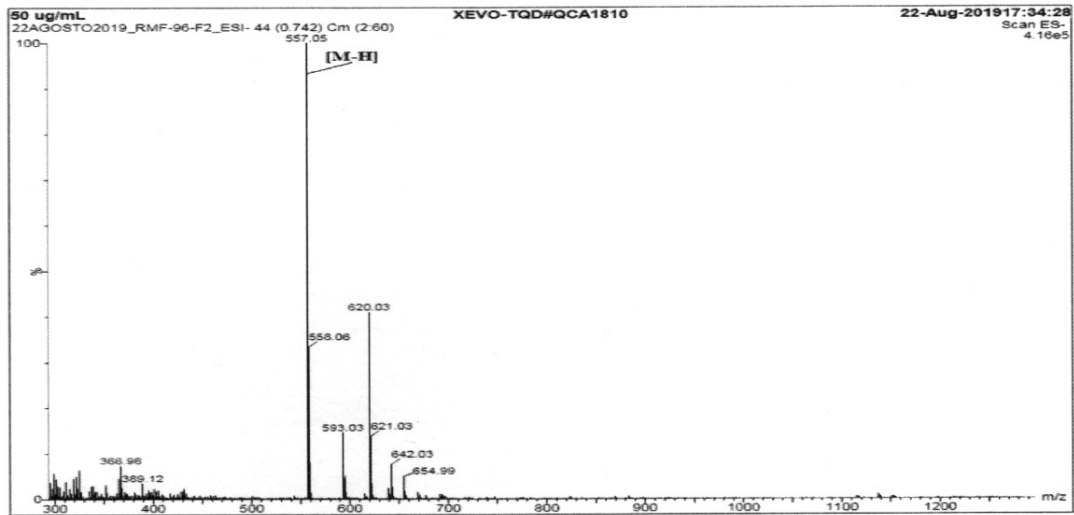
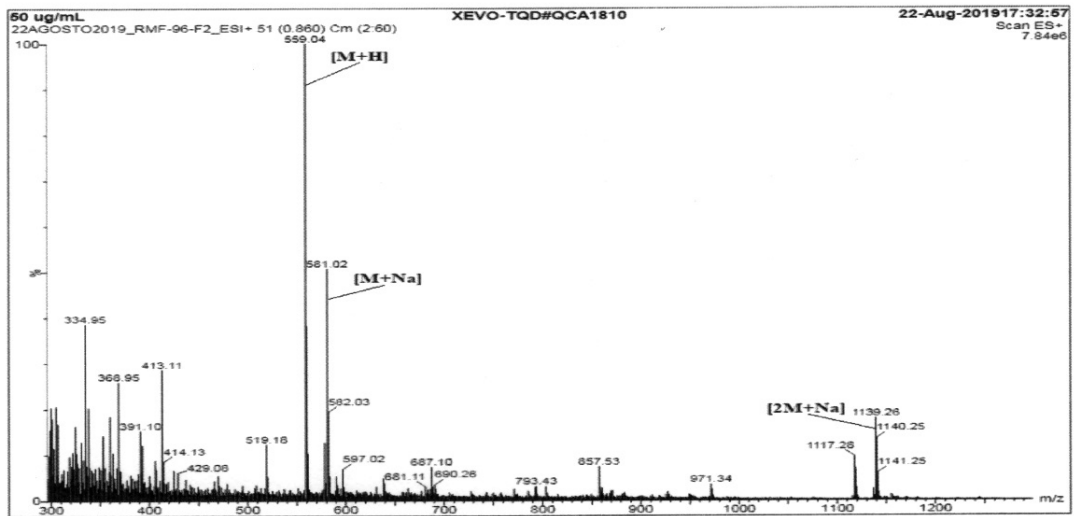
Figura 24. Preparación de compuesto 7 y 8.

Aplicando el **PG9**, en un vial de reacción se añadió 0.24 mmol de **A2** seguido de 0.07 mmol de Curcumina, 0.08 mmol de DMAP y 2 mL piridina y se hizo reaccionar por 10 min a 0 °C. Posteriormente, se adicionó 0.39 mmol de EDCI y se dejó reaccionar por 46 h a 25 °C. El extracto crudo fue purificado por CLAR-DAD obteniéndose 9.5 mg (37.42%) del compuesto **7** y 6.0 mg (31.68%) del compuesto **8**. ESI-(+)-TQD-MS (m/z) calculado para el compuesto **7**: $C_{43}H_{40}NaO_{12}$: 771.24 y el encontrado: 771.13 $[M+Na^+]$; el calculado para $C_{43}H_{41}O_{12}$: 749.26 y el encontrado: 749.11 $[M+H^+]$. ESI-(-)-TQD-MS (m/z) calculado para $C_{43}H_{39}O_{12}$: 747.24 y el encontrado: 747.06 $[M-H^-]$. ATR-FTIR: 969.38, 1129.21, 1200.62, 1257.19, 1357.33, 1507.71, 1588.64, 1630.51, 1737.03, 2859.64. ESI-(+)-TQD-MS (m/z) calculado para el compuesto **8**: $C_{32}H_{30}NaO_9$: 581.18 y el encontrado: 581.02 $[M+Na^+]$; el calculado para $C_{32}H_{31}O_9$: 559.20 y el encontrado: 559.04 $[M+H^+]$. ESI-(-)-TQD-MS (m/z) calculado para $C_{32}H_{29}O_9$: 557.18 y el encontrado: 557.05 $[M-H^-]$. ATR-FTIR: 964.33, 1121.00, 1203.62, 1267.96, 1416.58, 1454.25, 1508.76, 1625.37, 1735.52, 1760.27.



C:\OPUS_7.2.139.1294\MEAS\RMF-96-1-F1.1 RMF-96-1-F1 Instrument type and / or accessory 11/20/2019

Figura 25. Espectros de Masas e IR del compuesto 7.



C:\OPUS_7.2.139.1294\Meas\RMF-96-1-F2.1 RMF-96-1-F2 Instrument type and / or accessory 11/20/2019

Figura 26. Espectros de Masas e IR del compuesto 8.

3.8.2.3 Procedimiento para la síntesis del disuccinato de dicitlopentil *O,O'*-((1*E*,3*Z*,6*E*)-3-hidroxi-5-oxohepta-1,3,6-trieno-1,7-diil)bis(2-metoxi-4,1-fenileno) (**9**)

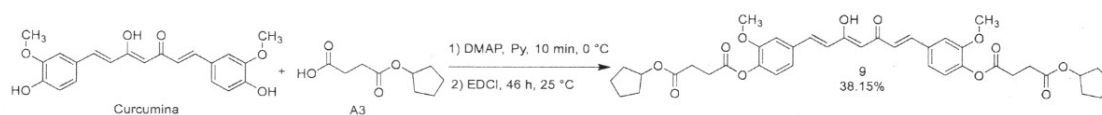
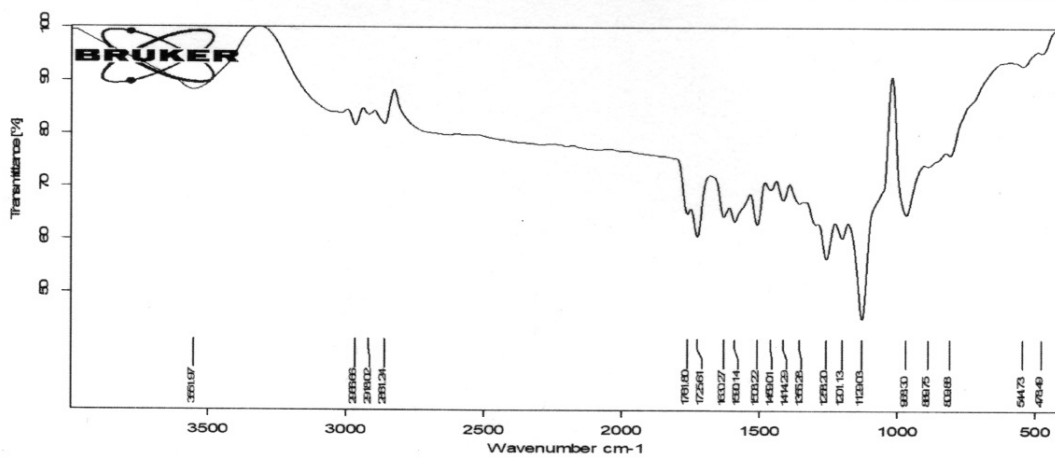
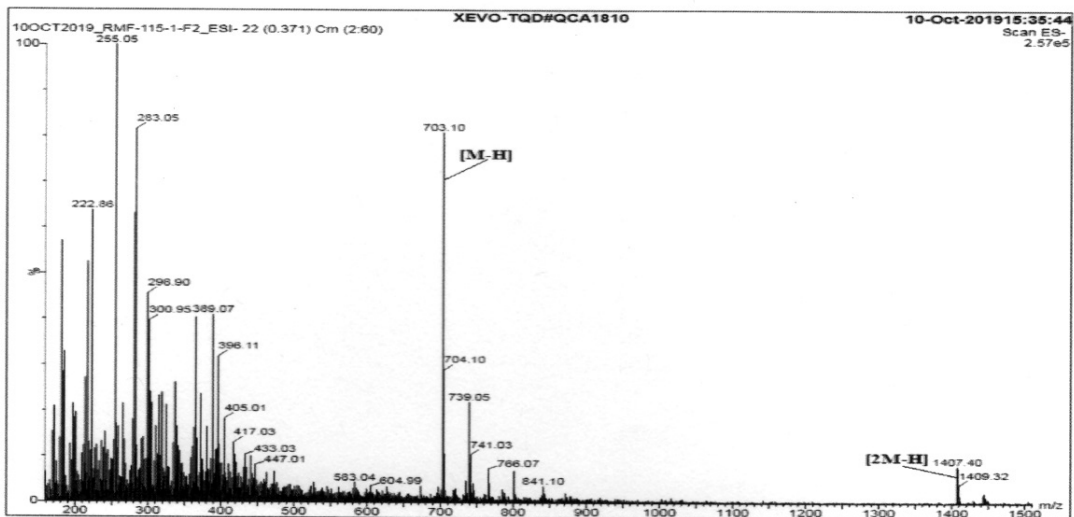
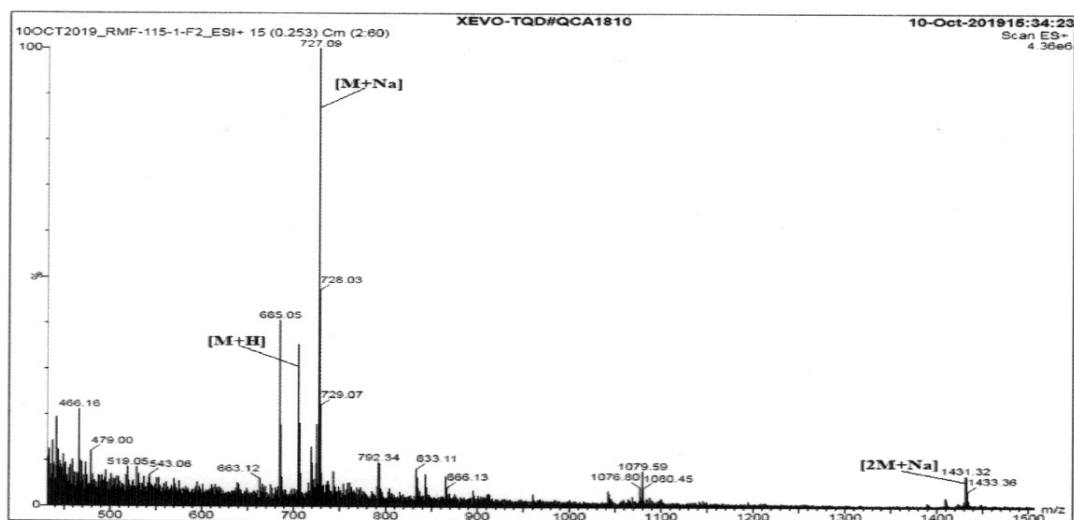


Figura 27. Preparación del compuesto **9**.

Aplicando el **PG9**, en un vial de reacción se añadió 0.54 mmol de **A3** seguido de 0.14 mmol de Curcumina, 0.16 mmol de DMAP y 2 mL de piridina y se hizo reaccionar por 10 min a 0 °C. Posteriormente, se adicionó 0.78 mmol de EDCl y se dejó reaccionar por 46 h a 25 °C. El extracto crudo fue purificado por CLAR-DAD obteniéndose 18.23 mg (38.15%) del compuesto **9**. ESI-(+)-TQD-MS (m/z) calculado para el compuesto **9**: C₃₉H₄₄NaO₁₂: 727.27 y el encontrado: 727.09 [M+Na⁺]; el calculado para C₃₉H₄₅O₁₂: 705.29 y el encontrado: 705.14 [M+H⁺]. ESI-(-)-TQD-MS (m/z) calculado para C₃₉H₄₃O₁₂: 703.28 y el encontrado: 703.10 [M-H⁻]. ATR-FTIR: 968.30, 1129.03, 1201.13, 1414.29, 1508.22, 1590.14, 1630.27, 1725.61, 1761.80.



C:\OPUS_7.2.139.1294\Meas\RMF-115-F2(3).0 RMF-115-F2(3) Instrument type and / or accessory 11/20/2019

Figura 28. Espectros de Masas e IR del compuesto 9.

CAPÍTULO

IV

4. RESULTADOS

4.1 Modelaje Molecular

La búsqueda de compuestos biológicamente activos convencionalmente se ha realizado por proyecciones de alto impacto (High-Throughput Screening, en inglés) probando compuestos contra dianas de interés por medio de ensayo y error en el laboratorio (Kaur et al., 2016; Ung et al., 2018). Pero, esto involucra un conjunto de técnicas que para analizar grandes cantidades de compuestos es una inversión muy costosa tanto en tiempo como en dinero (Kaur et al., 2016). Investigaciones recientes reportan que, la búsqueda virtual de compuestos activos disminuye considerablemente el costo y tiempo que implica encontrar potenciales candidatos a fármacos (Mellini et al., 2019). En Panamá existen varios grupos de investigación que están trabajando en el área de la química computacional donde las herramientas más utilizadas son el acoplamiento molecular de un receptor con diferentes ligandos (González et al., 2018; Lakey-Beitia et al., 2017, 2019; Olmedo et al., 2017).

En esta investigación se estableció un procedimiento para realizar el acoplamiento molecular de derivados de curcumina con la proteína α -sinucleína (α -Syn). Previo a ello, se realizó el acoplamiento molecular con el péptido β -Amiloide ($A\beta$) por tres procedimientos diferentes para estandarizar esta metodología, ya que, se tienen datos experimentales de referencia que permiten comparar con resultados *in silico*.

Para realizar el acoplamiento molecular, se prepararon los receptores $A\beta$ y α -Syn, realizando una inspección visual con PyMol y corrigiendo las estructuras con CHARMM-GUI en los extremos amino y carboxilo terminal del péptido $A\beta$ (**Figura 11**) y cambiando el estado de protonación en la His50 de la α -Syn (**Figura 12**) para que fuese adecuado a pH = 7.

Después, se dibujaron los ligandos en dos dimensiones con ChemDraw; se generaron coordenadas en tres dimensiones para cada uno de los átomos de los ligandos, se minimizó la energía potencial y se optimizó su geometría con el campo de fuerza MM2 integrado en Chem3D; y se convirtieron los archivos resultantes a los formatos *.pdb y *.pdbqt. Se verificó visualmente que las estructuras tuvieran sentido químico.

Se corrigieron las torsiones y los enlaces del esqueleto de la curcumina para mantener la planaridad (**Cuadro 7**).

Para el acoplamiento molecular de los derivados de curcumina con el péptido A β se calculó la energía de interacción, en kcal/mol, empleando tres programas con funciones de puntuación o “scoring functions” diferentes: AutoDock (AD), AutoDock Vina (ADV) y Smina (S) (**Figura 13**). El orden o “Ranking” de los resultados obtenidos por los tres programas se unificó aplicando la metodología de Rank Consenso Exponencial (Palacio-Rodríguez et al., 2019) con una hoja de cálculo de Microsoft Excel[®]; ésto se comparó con los valores reportados por Lakey-Beitia y colaboradores (2017). Se obtuvo que los ligandos mejor posicionados luego de compararlos con los derivados de curcumina que mostraron actividad anti-agregante de la placa β -Amiloide (Lakey-Beitia et al., 2017) correspondieron al Ligando 3, 10 y 4, con poca diferencia en la posición de estos dos últimos (aprox. 0.002 unidades) (**Cuadro 8**).

La mejor conformación calculada para los ligandos más sobresalientes se determinó analizando la diferencia en la desviación cuadrática media (RMS, en inglés) entre las distribuciones de las coordenadas geométricas para cada átomo de la conformación del ligando calculada por cada programa de acoplamiento molecular. El valor de parámetro, RMS, es mejor cuanto más próximo se encuentre a cero. Se obtuvo que para los Ligandos 3, 4 y 10, las mejores distribuciones espaciales o conformaciones fueron las calculadas por el programa Smina (S), y seguido de AutoDock (AD) (**Figura 29**).

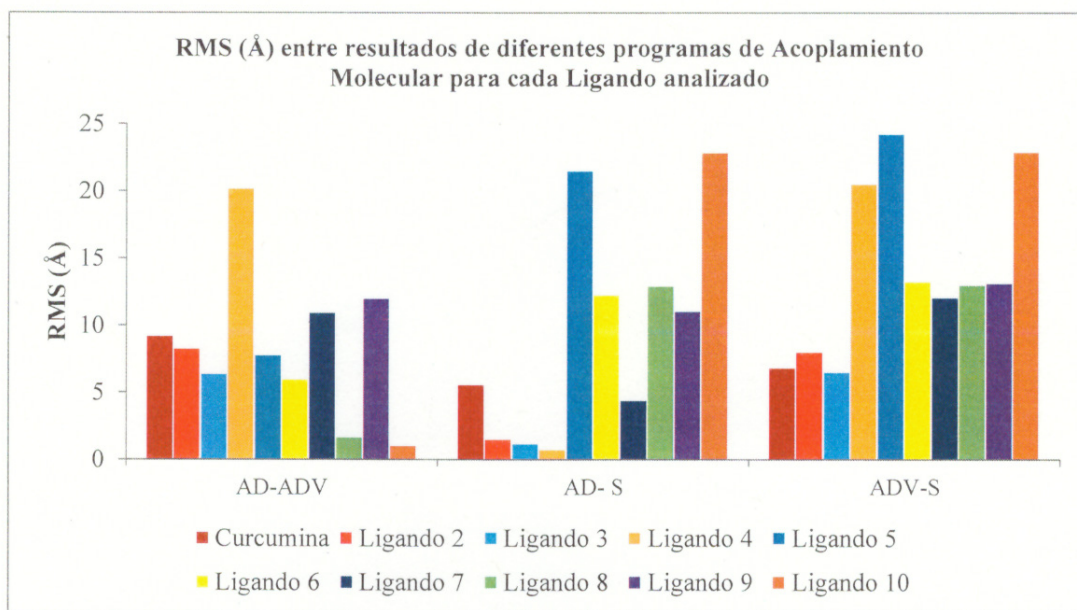
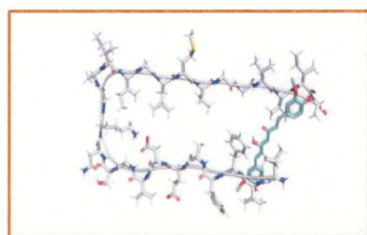
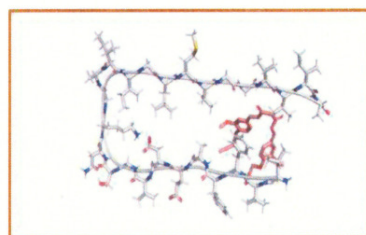


Figura 29. Consenso de la conformación de Acoplamiento Molecular de los derivados de curcumina con el péptido β -Amiloide.

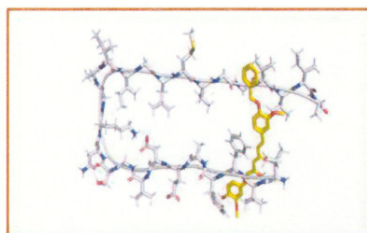
A continuación, se muestran las energías de interacción y conformaciones adoptadas por cada uno de los ligandos con el péptido $A\beta$, utilizando el programa Smina (**Figura 30**).



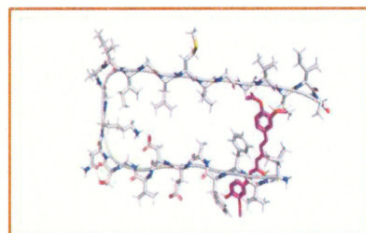
Curcumina Smina: -6.60



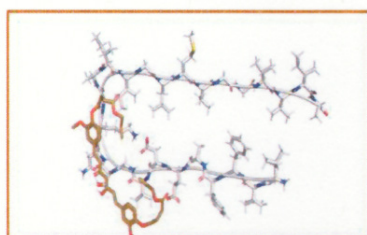
Ligando 2 Smina: -8.60



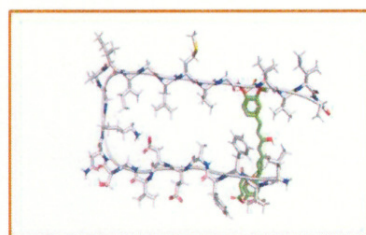
Ligando 3 Smina: -9.20



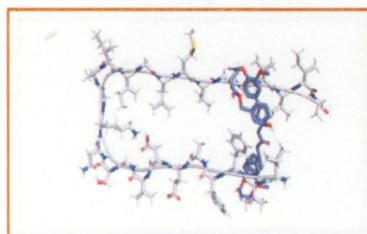
Ligando 4 Smina: -8.60



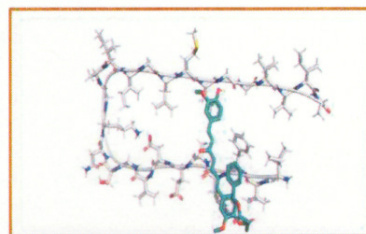
Ligando 5 Smina: -6.30



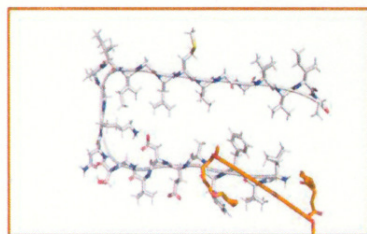
Ligando 6 Smina: -6.30



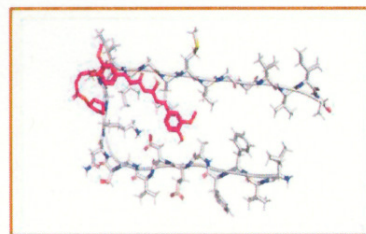
Ligando 7 Smina: -6.00



Ligando 8 Smina: -6.20



Ligando 9 Smina: -5.40



Ligando 10 Smina: -5.70

Figura 30. Energías de Interacción en kcal/mol de los complejos receptor-ligando obtenidos con Smina para la enfermedad de Alzheimer.

Para realizar el acoplamiento molecular de los derivados de curcumina con la proteína α -Syn se le aplicó la metodología estandarizada con el péptido A β . Al complejo receptor-ligando se le calculó la energía de interacción, en kcal/mol, empleando tres programas con funciones de puntuación diferentes: AutoDock (AD), AutoDock Vina (ADV) y Smina (S) (**Figura 14**). El orden de los resultados obtenidos por los tres programas se unificó aplicando la metodología de Rank Consenso Exponencial (Palacio-Rodríguez et al., 2019) con una hoja de cálculo de Microsoft Excel[®]. Ésto permitió obtener que los derivados de curcumina que fueron mejor posicionados correspondieron a los Ligandos **3, 2 y 8** (**Cuadro 9**).

La mejor conformación calculada para los ligandos más sobresalientes se determinó analizando la diferencia en RMS entre las distribuciones de las coordenadas geométricas para cada átomo de la conformación del ligando, calculada por cada programa de acoplamiento molecular. Se obtuvo que para los Ligandos **3, 2 y 8**, las mejores conformaciones fueron las calculadas por el programa AutoDock (AD).

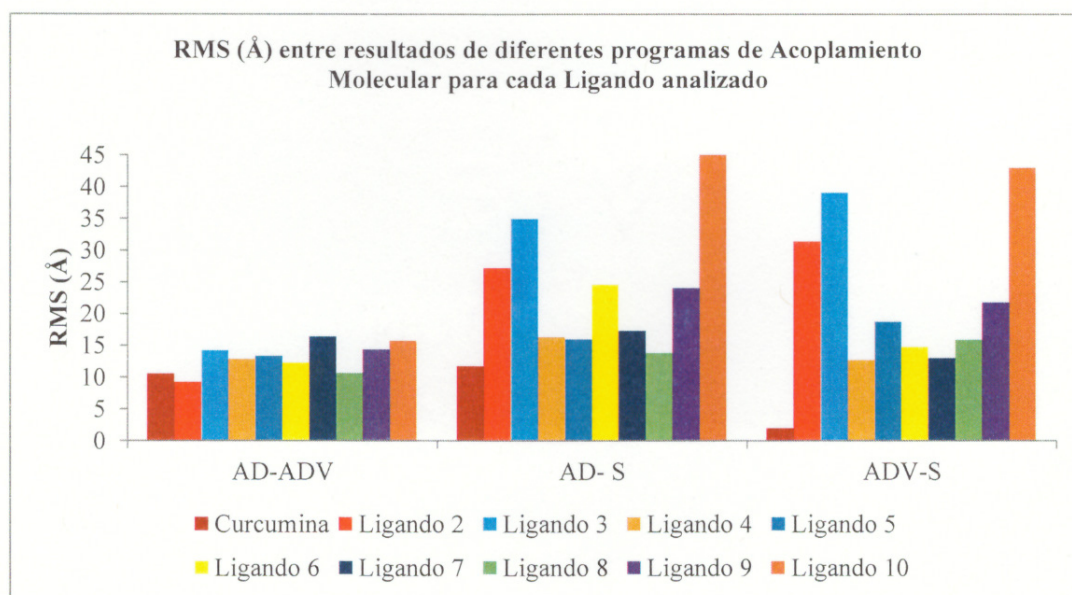
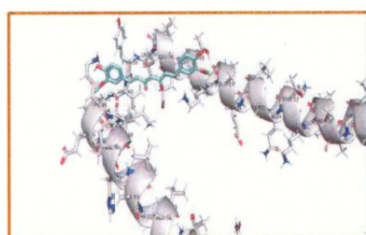
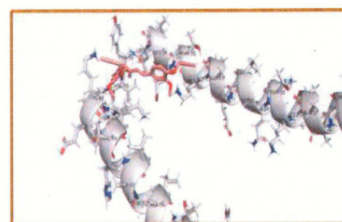


Figura 31. Consenso de la conformación de Acoplamiento Molecular de los derivados de curcumina con la proteína α -Sinucleína.

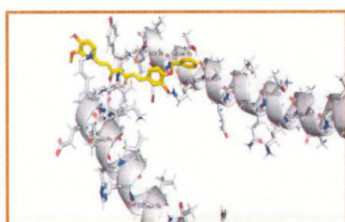
A continuación, se muestran las energías de interacción y conformaciones adoptadas por cada uno de los ligandos con la proteína α -Syn, utilizando el programa AutoDock 4 (**Figura 32**).



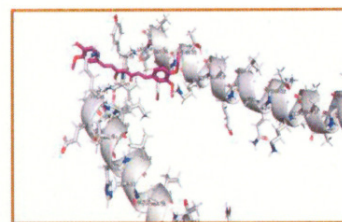
Curcumina AutoDock 4: -5.10



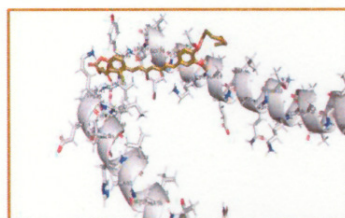
Ligando 2 AutoDock 4: -5.34



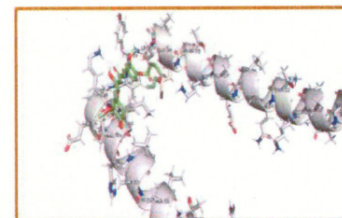
Ligando 3 AutoDock 4: -5.92



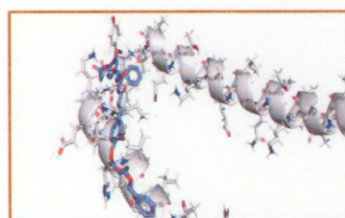
Ligando 4 AutoDock 4: -5.16



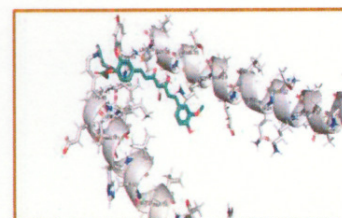
Ligando 5 AutoDock 4: -3.51



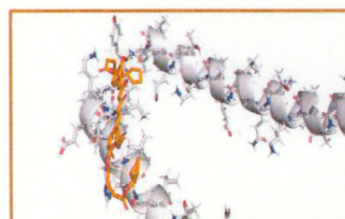
Ligando 6 AutoDock 4: -4.36



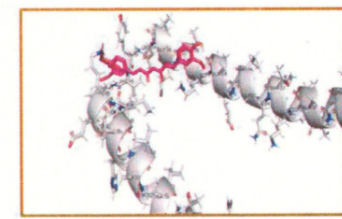
Ligando 7 AutoDock 4: -3.83



Ligando 8 AutoDock 4: -4.77



Ligando 9 AutoDock 4: -4.39



Ligando 10 AutoDock 4: -5.48

Figura 32. Energías de Interacción (kcal/mol) de los complejos receptor-ligando obtenidas con AutoDock 4 para la enfermedad de Parkinson.

4.2 Síntesis de Derivados de Curcumina

La literatura señala que, la curcumina es un compuesto pleiotrópico que posee propiedades neuroprotectoras. Pero, su baja biodisponibilidad no ha permitido que pueda ser utilizada. Investigaciones científicas han demostrado que, las diversas modificaciones estructurales (la formación de glucósidos, éteres, ésteres entre otros análogos) en la curcumina incrementa su actividad (S. Zhao et al., 2019). En esta investigación nos enfocamos en la modificación de los anillos fenólicos, a través de la síntesis de ésteres de curcumina empleando un alcohol unido a un conector por medio de un activador.

Previo a la síntesis de los ésteres de curcumina se prepararon tres ácidos alquil-succínicos (**A1**, **A2**, **A3**) a partir de la acilación del alcohol alílico, bencílico y ciclopentanol con el anhídrido succínico, respectivamente, en presencia de DMAP y DIPEA en CH_2Cl_2 . Estos compuestos produjeron 722.86 mg de **A1**, 1.06 g de **A2** y 450.91 mg de **A3**. Se demostró su formación por las técnicas de caracterización por espectrometría de masas y espectroscopia de infrarrojo (**Figura 15-Figura 20**), y para la siguiente reacción se usaron sin purificar. Luego, cada ácido alquil-succínico se unió con la curcumina y se obtuvo cinco ésteres de curcumina (**5**, **6**, **7**, **8**, **9**). Ésto demostró que la metodología de síntesis de derivados de curcumina se logró implementar en Panamá, específicamente en INDICASAT AIP.

Durante el establecimiento de esta metodología, se varió el tiempo de reacción para determinar a qué tiempo había una mayor producción de los compuestos de interés. Para ello, se realizaron reacciones consecutivas donde se comprobó el avance de la reacción realizando perfiles cromatográficos de los extractos crudos para apreciar la formación de **7** y **8** por CLAR-DAD a $\lambda = 420 \text{ nm}$ con el equipo Waters 600 del Laboratorio de Bioorgánica Tropical en la Universidad de Panamá y donde se determinó que el tiempo de reacción adecuada para este tipo de compuestos es 46 horas (**Figura 33**).

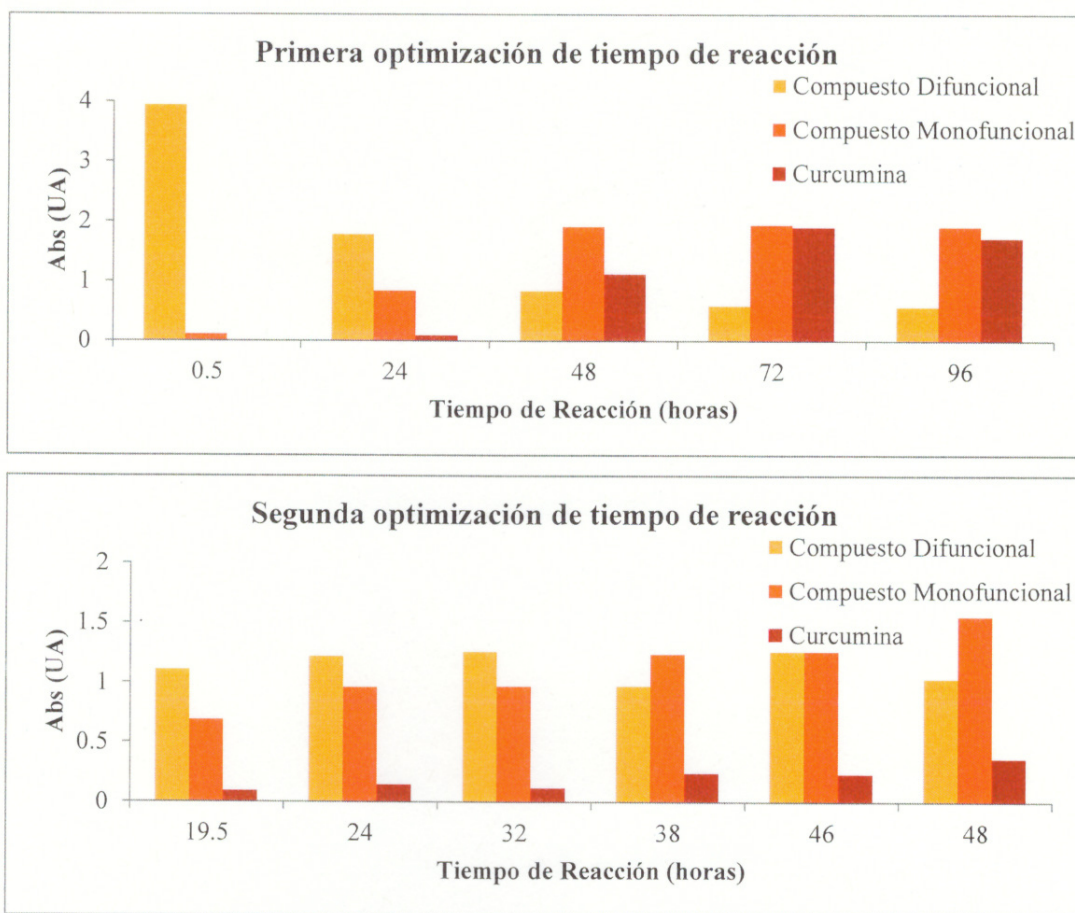


Figura 33. Optimización del tiempo de reacción (46 h) de la síntesis de ésteres de curcumina.

En la **Figura 34**, se muestra un esquema general del proceso de la reacción de la síntesis de ácidos alquil-succínicos y la síntesis de derivados de curcumina.

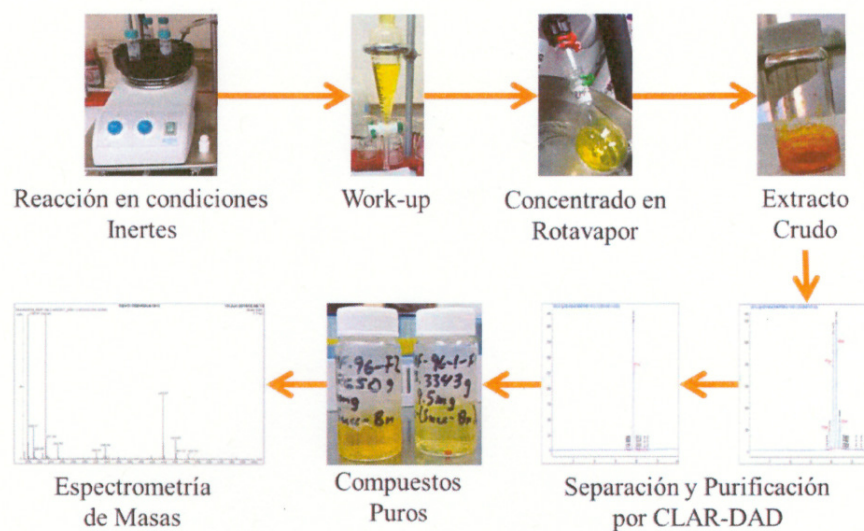


Figura 34. Esquema de síntesis, purificación y caracterización de derivados de curcumina.

La purificación de cada compuesto se realizó por CLAR-DAD (**Figura 35-Figura 37**) y la caracterización se efectuó por ESI-TQD-MS e IR (**Figura 21-Figura 28**).

4.2.1 Síntesis de los compuestos 5 y 6

La reacción de esterificación de **A1** con curcumina, DMAP, EDC y piridina (**Figura 21**) permitió la formación del compuesto **5** en 40.8% y el compuesto **6** en 22.1%.

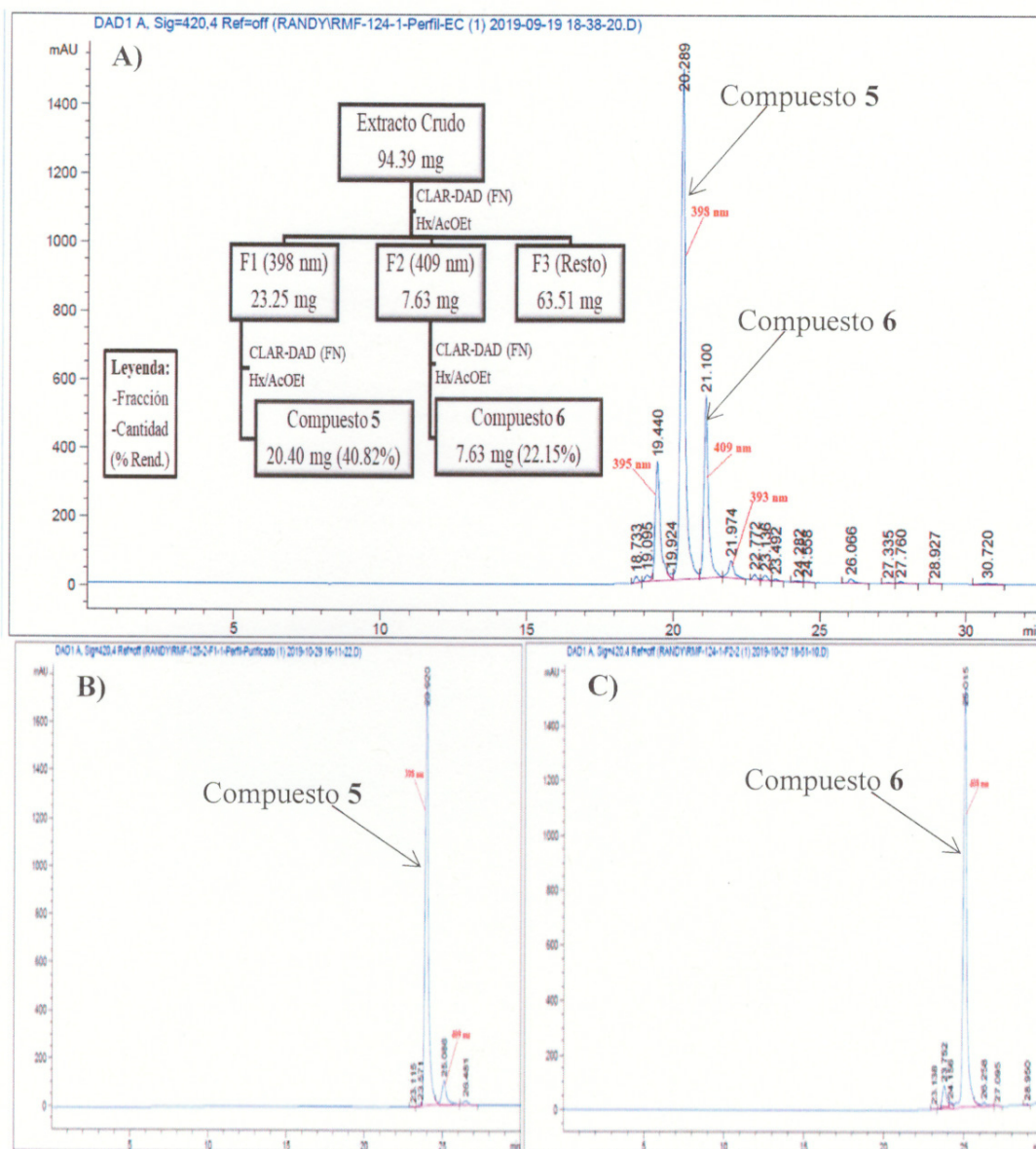


Figura 35. A) Perfil cromatográfico del extracto crudo con esquema de fraccionamiento del extracto crudo de la reacción para obtener a los compuestos **5** (B) y **6** (C) puros.

4.2.2 Síntesis de los compuestos 7 y 8

Se procedió a realizar la reacción de la curcumina con **A2**, DMAP, EDC en piridina (**Figura 24**), formando el compuesto **7** en 37.4% y del compuesto **8** en 31.7%.

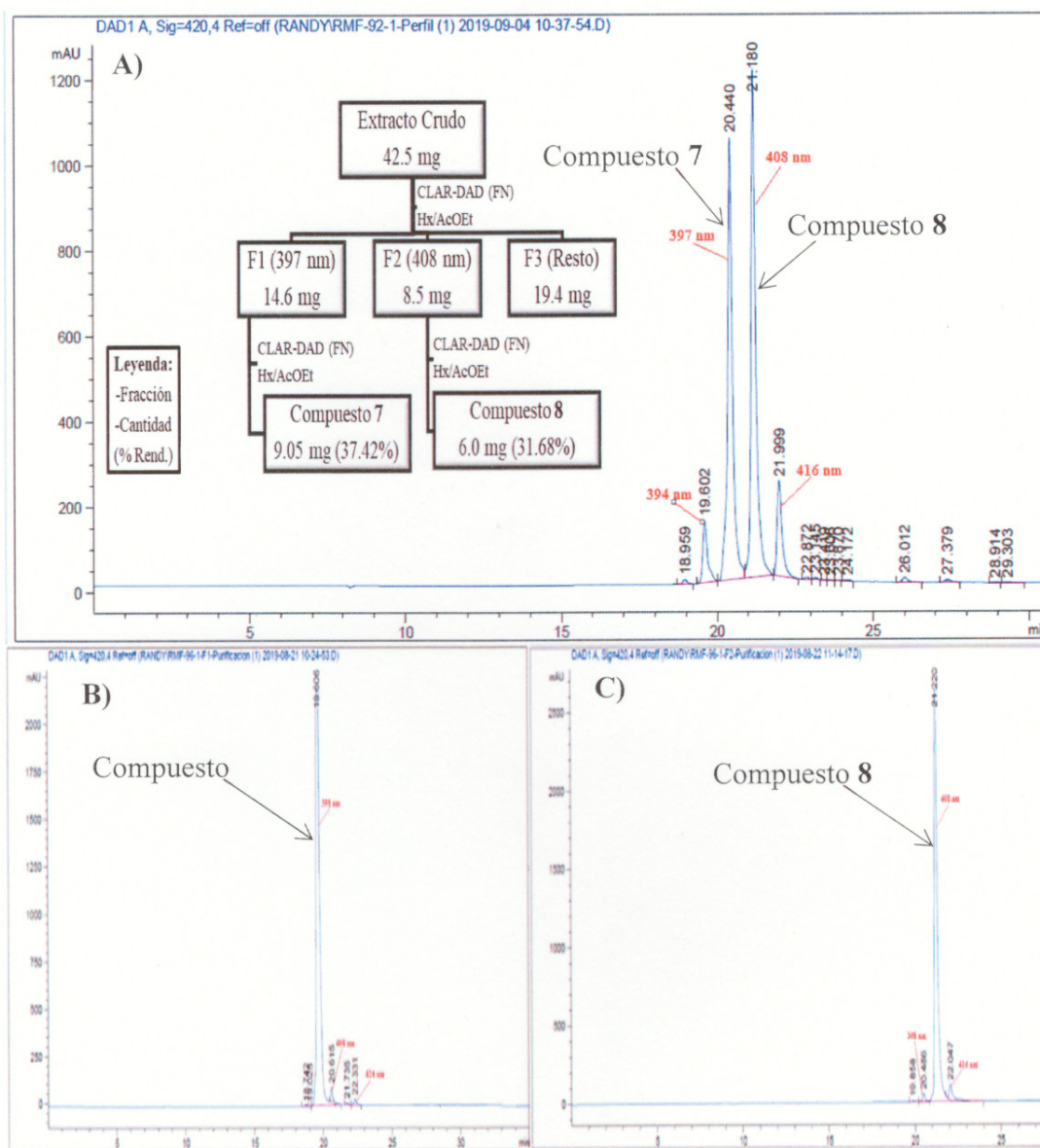


Figura 36. A) Perfil cromatográfico del extracto crudo con esquema de fraccionamiento del extracto crudo de la reacción para obtener a los compuestos 7 (B) y 8 (C) puros.

4.2.3 Síntesis del compuesto 9

Se preparó la reacción de **A3** con la curcumina en presencia de EDC, DMAP y piridina (**Figura 27**), pero por espectrometría de masas se encontró solo la formación del ester difuncional **9** en 38.1%.

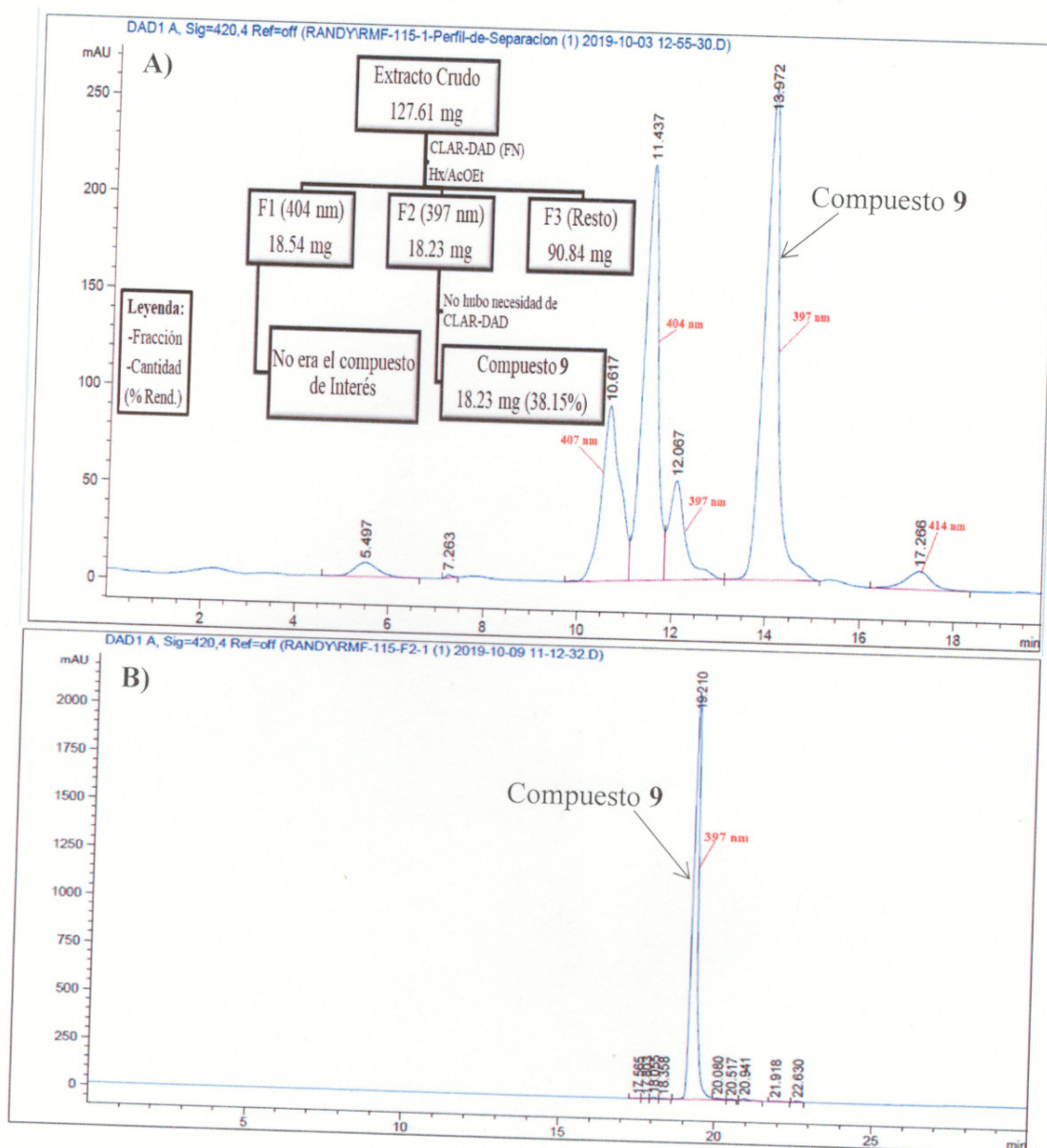


Figura 37. A) Perfil cromatográfico del extracto crudo con esquema de fraccionamiento del extracto crudo de la reacción para obtener al compuesto **9** (B) puro.

CAPÍTULO

V

5. DISCUSIÓN

5.1 Modelaje Molecular

Investigaciones recientes señalan que el modelaje molecular provee de métodos versátiles que permiten profundizar la comprensión de sistemas biológicos de interés, desde detalles atomísticos hasta niveles microscópicos (Ryazantsev et al., 2019).

En tiempos recientes, la búsqueda virtual de compuestos activos se ha vuelto atractiva para los investigadores por la capacidad de analizar grandes librerías de compuestos, permitiendo disminuir considerablemente la inversión necesaria en recursos y tiempo. Dentro de ellos, el acoplamiento molecular es un método computacionalmente económico que permite enfocar la búsqueda, reduciendo la librería a cantidades más manejables que pueden ser analizadas por métodos con mayor nivel computacional, como las dinámicas moleculares, para encontrar las interacciones responsables de la unión receptor-ligando.

Esta etapa se inició con la preparación de los receptores A β y α -Syn. Se eliminaron todos los errores que suelen estar asociados a las estructuras de proteínas cargadas en bases de datos como el Banco de Datos de Proteínas, como puede ser la presencia de residuos de aa con átomos faltantes, estados de protonación incorrectos, presencia de ligandos co-cristalizados o de moléculas de solvente que no participan de la actividad catalítica, incongruencias geométricas en estructuras de baja resolución (elucidadas por Rayos X con resolución superior a 3 Å), entre otras (Berman et al., 2000; Burley et al., 2019). Es una inversión grande en tiempo, pero es necesario para asegurar que se hayan realizado todas las revisiones y correcciones necesarias, y así tener una mayor confianza en que los resultados obtenidos sean representativos del sistema que estamos modelando. Todas estas consideraciones fueron tomadas durante la etapa de inspección visual.

La inspección visual de la estructura del péptido A β (PDB ID: 2BEG) (Lührs et al., 2005) y de la proteína α -Syn (PDB ID: 1XQ8) (Ulmer et al., 2005) se realizó con PyMol (Schrödinger LLC., 2019) y la predicción del pKa para los residuos de aa, con PROPKA (Olsson et al., 2011). Encontramos que el extremo C terminal y N terminal del péptido A β estaban incompletos (con átomos faltantes); que la His50 de la proteína

α -Syn estaba mal protonada. Ambas estructuras fueron elucidadas por RMN en solución, haciendo posible la transferencia de protones intercambiables y por ende el cambio en el estado de protonación de algunos residuos de aa; a diferencia de las estructuras que son resueltas por medio de cristalografía de rayos X. Estas correcciones se realizaron con la herramienta en línea CHARMM-GUI (Jo et al., 2008, 2014). El archivo del receptor se transformó del formato *.pdb al formato *.pdbqt, que incluye las cargas parciales Gasteiger de todos los tipos de átomos presentes excepto de los hidrógenos no polares, con la herramienta prepare_receptor4.py de AutoDockTools (ADT) (Morris et al., 2009). Con lo cual quedaron preparadas las estructuras del A β (**Figura 11**) y de la α -Syn (**Figura 12**).

Los ligandos empleados fueron los derivados de curcumina. Estos compuestos fueron publicados recientemente por Lakey-Beitia y colaboradores (2017). Se dibujaron las estructuras en dos dimensiones con las herramientas integradas de ChemDraw, y luego se transformaron a un formato tridimensional donde Chem3D generó las coordenadas espaciales para cada uno de los átomos que conforma al ligando. Se realizó una minimización con el campo de fuerza de superficie de energía potencial MM2 (Kolossváry & Guida, 1993) integrado en Chem3D hasta que la desviación asociada al cambio conformacional del ligando durante la optimización (RMS) fuese menor o igual a 0.010; así los átomos de cada ligando adoptaron una distribución espacial de enlaces y torsiones estable en un mínimo de energía local (Pappu et al., 1998). La preparación final de los ligandos se realizó con la herramienta prepare_ligand4.py incluida en ADT para convertir el archivo del formato *.pdb al formato *.pdbqt, el cual incluye las cargas parciales Gasteiger de cada tipo de átomo y las torsiones de los enlaces. El **Cuadro 7** contiene representaciones de las estructuras tridimensionales minimizadas de los ligandos derivados de curcumina analizados.

El Acoplamiento Molecular entre receptor y ligando se realizó con tres programas diferentes: AutoDock, AutoDock Vina y Smina. Estos programas fueron elegidos porque presentan algoritmos de exploración del espacio conformacional diferentes, así como funciones de puntuación distintas, por lo que el orden de los resultados obtenidos serían independientes de las desviaciones asociadas a las propias funciones

de puntuación de cada programa. Para unificar estos resultados se aplicó el Rank Consenso Exponencial (Palacio-Rodríguez et al., 2019). Esta es una herramienta que permite hacer un consenso basado en el condicional lógico “o” de la posición adoptada por un ligando, respecto al conjunto total de compuestos analizados; lo cual permite contrastar resultados arrojados por diversas funciones de puntuación de programas de acoplamiento molecular diferentes. A partir de estos datos, se obtuvo que para el sistema de referencia con A β , los mejores ligandos fueron el **3**, **4** y **10**, lo cual es consistente al compararlos con los derivados de curcumina que mostraron actividad anti-agregante de la placa β -Amiloide y tomando en cuenta el solapamiento de la desviación estándar de los mismos.

Además, considerando las puntuaciones obtenidas por los demás ligandos (**Cuadro 8**), se puede notar que los derivados de curcumina bifuncionalizados, es decir aquellos que se encuentran sustituidos en ambos anillos fenólicos, mostraron una tendencia a estar peor valorados en términos del Rank Consenso Exponencial respecto a aquellos que solo estaban sustituidos de un solo lado; lo cual podría indicar que los ligandos monofuncionalizados son potencialmente más activos que aquellos bifuncionalizados, por adoptar una mejor conformación espacial con el receptor A β . Esta anotación también fue planteada por (Lakey-Beitia, 2017) estableciendo una relación estructura actividad (SAR) que indicaba que los ésteres de curcumina monofuncionalizados tenían mayor actividad anti-agregante del péptido β -Amiloide. Pudimos corroborar al observar como aquellos ligandos con sustituciones más extensas terminaban adoptando conformaciones que tendían a presentar un mayor grado de libertad, incrementando el plegamiento de la estructura e interviniendo en la interacción de los grupos funcionales donadores de densidad electrónica del derivado de curcumina con los residuos de aa del receptor, lo que disminuía en gran medida la energía de unión calculada por cada programa de acoplamiento molecular; así también se observó cómo disminuía su puntuación global luego de realizado el consenso exponencial.

En adición, para evaluar cuál programa produjo la mejor conformación de los ligandos con mayor energía de interacción, se realizó un consenso en las disposiciones geométricas de los átomos comparando por medio del RMS la diferencia entre la

distribución geométrica espacial adoptada por cada uno de los ligandos: entre mayor sea el RMS, mayor es la diferencia conformacional de los ligandos y por ende peor es la conformación calculada. Como se observa en la **Figura 29**, Smina, seguido de AutoDock proveen el menor RMS para los Ligandos **3**, **4** y **10**. En este trabajo de grado solo se mostrará la síntesis de los Ligandos **5 – 10**, mientras que, los Ligandos del **2 – 4** por ser una metodología diferente a los compuestos anteriores se realizará en un futuro cercano, pero no para esta investigación.

Con la metodología de acoplamiento molecular ya establecida, procedimos a aplicar este procedimiento con la proteína α -Syn. Se muestra en el **Cuadro 9** que nuevamente el Ligando **3** mostró la mayor energía de interacción receptor-ligando, seguido del Ligando **2** y del Ligando **8**; además, también se mantuvo el mismo comportamiento de los derivados de curcumina pequeños y monosustituídos presentando mayor puntuación para la energía de interacción respecto a aquellos más voluminosos y disustituídos. Sin embargo, AutoDock produjo las mejores disposiciones geométricas para estos Ligandos (**Figura 32**), precedido por Smina (**Figura 31**).

5.2 Síntesis de Derivados de Curcumina

La literatura muestra que la curcumina es un compuesto orgánico pequeño que presenta potente actividad biológica pleiotrópica en modelos *in vitro* (Gupta et al., 2012; Khor et al., 2019). Sin embargo, su baja solubilidad en medio acuoso, su pobre estabilidad en condiciones fisiológicas y su alta tasa metabólica dentro del organismo ha dificultado su uso como posible agente terapéutico (Toden & Goel, 2017). Es por ello que, la formación de compuestos análogos a la curcumina ha sido una de las múltiples estrategias empleadas para mejorar la biodisponibilidad de la curcumina (Noureddin et al., 2019).

La metodología de síntesis de ésteres derivados de la curcumina propuesta por Lakey-Beitia y colaboradores (2017) fue establecida por primera vez en nuestro país. No obstante, de los éteres y ésteres de curcumina publicados, se priorizó la síntesis de los ésteres sobre los éteres por diversas razones, dentro de las que podemos mencionar:

- Menor riesgo asociado con la manipulación y exposición a los reactivos necesarios para la formación de los ésteres.
- Disponibilidad inmediata de los reactivos para la formación de los ésteres.
- La formación de los ésteres requiere de un mayor énfasis en las condiciones anhidras.

Por tales motivos, procedimos a sintetizar el producto intermediario ácido alquil-succínico necesario para posteriormente formar los ésteres derivados de curcumina.

5.2.1 Síntesis del Ácido Alquil-Succínico

Estas reacciones se basan en el principio de la acilación de alcoholes, donde el alcohol alílico, el alcohol bencílico y ciclopentanol, se unen al anhídrido succínico catalizados en presencia de DMAP y DIPEA en CH_2Cl_2 , para dar con la formación de los ácidos alquil-succínicos **A1**, **A2** y **A3**, respectivamente, bajo condiciones de reacción suaves a temperatura ambiente. Se realizaron en condiciones anhidras, ya que, el intermediario acil-piridinio formado *in situ* es lo suficientemente reactivo para ser atacado por nucleófilos débiles (Xu et al., 2005) como el agua, lo cual podría afectar la formación de los productos deseados.

Se observó que, los productos finales poseían una coloración que variaba desde crema hasta chocolate oscuro cuando eran extraídos en Metanol; por ello, se cambió el disolvente de extracción a AcOEt, con el cuál se mejoró considerablemente la coloración de los productos. Esto pudo deberse a la formación de sub-productos no deseados que presentaban una afinidad considerable por disolventes polares próticos como el MeOH y como consecuencia se veían extraídos por este. Por esta misma razón, al cambiar el disolvente de extracción por uno de polaridad intermedia como el AcOEt, se podría dar el caso que una buena parte de tales subproductos se quedasen en la fase acuosa y por lo cual la fase con AcOEt extrajera al ácido alquil-succínico en cuestión y menor medida otros productos secundarios.

Se obtuvo que la reacción entre el alcohol alílico con anhídrido succínico formó 722.86 mg de **A1**. La reacción entre el alcohol bencílico y el anhídrido succínico

produjo 1063.6 mg de **A2**. De la reacción entre el Ciclopentanol y el anhídrido succínico se obtuvo 450.91 mg de **A3**. La formación de los tres ácidos alquil-succínico fueron caracterizados por espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo e ionización por Electrodispersión de iones (ESI-TQD-MS) en modo positivo y negativo al corroborar la presencia de las señales calculadas para los iones $[M+H]$, $[M+Na]$ y $[M-H]$ en los espectros de masas correspondientes a cada uno de los compuestos **A1**, **A2** y **A3**, con una diferencia menor o igual a 0.1 unidades de m/z . Además, en ninguno de los tres espectros IR de cada compuesto aparece la banda ancha y fuerte característica del estiramiento O-H los alcoholes en la región de $3400 - 3300 \text{ cm}^{-1}$, lo que indica que no quedan residuos de los alcoholes de partida; sin embargo, sí aparecen en los tres espectros IR la banda fuerte de estiramiento del grupo carbonilo C=O en la región $1710-1695 \text{ cm}^{-1}$, la banda ancha por la gran presencia de dímeros formando puentes de Hidrógeno para los estiramientos O-H en la región $3090 - 2950 \text{ cm}^{-1}$ para los ácidos carboxílicos; así como las dos o más bandas, una más fuerte que la otra, de los estiramientos del grupo C-O que aparecen en la región $1300 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ característica de los enlaces éster (**Figura 16, Figura 18, Figura 20**) (Pavia et al., 2015).

5.2.2 Síntesis de Ésteres de Curcumina

El establecimiento de la metodología de síntesis de los ésteres de curcumina se realizó en el Laboratorio de Bioorgánica Tropical de la Universidad de Panamá y la síntesis de los derivados de curcumina se realizó en las instalaciones de INDICASAT AIP. Se emplearon compuestos de referencia brindados por la Dra. Johant Lakey para determinar por CLAR-DAD las longitudes de onda de absorbancia máxima (λ_{MAX}) de cada compuesto y así poder distinguir las señales correspondientes a los derivados monofuncionales, de los bifuncionales y de la curcumina. Las longitudes de onda para el compuesto monofuncional tenían una $\lambda_{MAX} \sim 408 \text{ nm}$; mientras que el compuesto bifuncional era de $\lambda_{MAX} \sim 397 \text{ nm}$; y el de la curcumina, de $\lambda_{MAX} \sim 415 \text{ nm}$. Esta divergencia significativa en las λ_{MAX} se debe que hay diferencias importantes en la estructura química de cada tipo de compuesto (Pavia et al., 2015).

Con base a la literatura descrita por Pavia y colaboradores (2015), se planteó como hipótesis plausible el que la estructura base de la curcumina se podría describir como un sistema conjugado, cuyos grupos auxóchromos serían los grupos metoxilos e hidroxilos fenólicos y estos donarían densidad electrónica a los anillos aromáticos y al sistema de dobles enlaces conjugados, estabilizándolo por medio de múltiples híbridos de resonancia, manifestando así un efecto batocrómico cuyo $\lambda_{MAX} \sim 415 \text{ nm}$. Sin embargo, al darse la primera sustitución en los derivados monofuncionales de curcumina, el aporte de densidad electrónica que proporcionaba el hidroxilo fenólico al sistema conjugado se ve reducido al tener que compartirla con el grupo ester que actuaría como sustractor de densidad electrónica, lo que ocasiona que la estructura global muestre un efecto hipsocrómico con una $\lambda_{MAX} \sim 408 \text{ nm}$. De igual forma, este efecto hipsocrómico se vería incrementado en los derivados bifuncionales de curcumina puesto que ambos hidroxilos fenólicos se encuentran sustituidos y por tanto la λ_{MAX} se desplaza hasta $\sim 397 \text{ nm}$ (Ver **ANEXO III**).

Por otro lado, las reacciones de esterificación de la curcumina con ácido alquil-succínico en presencia de EDCI y DMAP tienden a generar dos productos: un ester monofuncional y uno bifuncional (Lakey-Beitia, 2017). Es por ello que, se realizó una optimización del tiempo de reacción para encontrar el punto en donde las cantidades relativas del éster monofuncional y del éster bifuncional fuesen similares. Esto se hizo con la finalidad de disminuir los costos que implicaría montar reacciones individualmente para obtener cada producto, entre ellos: tiempo de reacción, uso de equipo, reactivos, insumos, disolventes, desechos generados.

Se realizaron varias reacciones consecutivas entre la curcumina y el compuesto **A2** para monitorear por CLAR-DAD a $\lambda = 420 \text{ nm}$ el avance de la reacción a través del tiempo.

La primera serie de reacciones (**Figura 33**, arriba) muestra cómo se forma rápida y mayoritariamente el ester bifuncional transcurrida media hora, pero conforme pasa el tiempo disminuye considerablemente la cantidad de este compuesto. Simultáneamente, el éster monofuncional se forma a un menor ritmo hasta que se mantiene aparentemente estable después de las 48 horas de reacción. No obstante, se puede

apreciar que hay un cambio desde una mayoría del compuesto bifuncional a las 24 h hasta una mayoría del compuesto monofuncional a las 48 h. Preliminarmente, se podría decir que el éster bifuncional de curcumina sea el producto cinético por su rápida formación y el éster monofuncional de curcumina, el producto termodinámico, siguiendo lo planteado por Grossman (2013).

Por lo antes mencionado, se realizó una segunda serie de experimentos dentro del rango de las 24 a 48 h. Observamos en la **Figura 33** (abajo) que, a 46 horas las cantidades relativas del compuesto **7** y **8** fueron similares. Con lo cual, se decidió que el tiempo de reacción sería de 46 h. Luego, se procedió a separar y purificar el extracto crudo de la reacción a 46 h, así como, a montar las reacciones de la curcumina con el compuesto **A1** y con **A3**. Siguiendo el esquema de fraccionamiento en la **Figura 35**, se formaron 20.40 mg (40.8%) del compuesto **5** puro y 7.63 mg (22.1%) del compuesto **6** puro. Por otra parte, el esquema de fraccionamiento de la **Figura 36** muestra que se produjeron 9.5 mg (37.4%) del compuesto **7** y 6.0 mg (31.7%) del compuesto **8**. Para finalizar, a partir de la fracción F2 en la **Figura 37** se obtuvo 18.23 mg (38.1%) del compuesto **9** puro. Sin embargo, no se observó la formación del compuesto monofuncional **10**.

La formación de estos cinco ésteres de curcumina fue confirmada por medio de análisis de espectrometría de masas donde se corroboró la presencia de las señales calculadas para los iones $[M+H]$, $[M+Na]$ y $[M-H]$ en todos los espectros de masas correspondientes a cada uno de los esteres derivados de la curcumina: el compuesto **5** (**Figura 22**), el compuesto **6** (**Figura 23**), el compuesto **7** (**Figura 25**), el compuesto **8** (**Figura 26**) y el compuesto **9** (**Figura 28**), con una diferencia menor o igual a 0.1 unidades de m/z . Además, aparecen en los cinco espectros IR la banda característica del estiramiento del grupo carbonilo $C=O$ en la región $1740-1730\text{ cm}^{-1}$ desplazada hacia la segmento donde aparecen los ésteres; así como las dos o más bandas, una más fuerte que la otra, de los estiramientos del grupo $C-O$ del enlace ester que aparecen en la región $1300 - 1100\text{ cm}^{-1}$. En adición, aparecen de forma moderada las señales de estiramiento $C=C$ para los dobles enlaces conjugados en la región $1660 - 1600\text{ cm}^{-1}$, al

mismo tiempo que las señales fuera de plano del =C-H para dobles enlaces en configuración trans alrededor de los 970 cm^{-1} .

A pesar de lo dicho, las bandas que se esperarían para los estiramientos O-H fenólicos en los derivados monofuncionales presentaron dificultad para mostrarse debido a la poca cantidad de muestra que al disolverla quedaba en una concentración muy baja como para apreciar bien las señales; aun así, hubo inconvenientes a la hora de restar el efecto del disolvente (MeOH); así mismo, aparecieron unos picos invertidos los cuales de acuerdo con la literatura se deben a inconvenientes al momento de sustraer el efecto de dióxido de carbono atmosférico durante la realización del experimento con espectroscopio IR (Pavia et al., 2015).

CAPÍTULO

VI

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- ✓ Se logró establecer un modelo de método para realizar el acoplamiento molecular de ligandos derivados de curcumina con dos receptores, β -Amiloide y α -Sinucleína, por medio del consenso exponencial de tres programas diferentes, AutoDock, AutoDock Vina y Smina, para lograr visualizar las energías de las interacciones entre receptor y ligando.
- ✓ Se sintetizaron y purificaron al menos 7.5 mg de los cinco ésteres derivados de curcumina: Ligando 5, Ligando 6, Ligando 7, Ligando 8, y Ligando 9, reportados previamente en la literatura, de los cuales dos presentaban actividad anti-agregante del péptido β -Amiloide.
- ✓ Los métodos de síntesis de ésteres de curcumina pudieron aplicarse satisfactoriamente en Panamá.
- ✓ Se demostró *in silico* que el Ligando 3 posee mejor potencial neuroprotector que el Ligando 2, el Ligando 8, y por último la Curcumina frente a la α -sinucleína.

6.2 Recomendaciones

- ✓ Los métodos computacionales empleados para realizar el acoplamiento molecular con tres (3) programas diferentes ayuda a disminuir la desviación asociada a las características propias de cada función de puntuación; sin embargo, se recomienda incrementar para futuras investigaciones la cantidad de programas empleados y así tener una muestra más amplia de las conformaciones o poses de los ligandos.
- ✓ Los estudios computacionales realizados, sobre acoplamiento molecular, están limitados a explorar el espacio conformacional del ligando con el receptor rígido, por lo que se recomienda realizar estudios de dinámica molecular para que las interacciones receptor-ligando sean representativas del sistema a través del tiempo.
- ✓ Para futuras investigaciones se recomienda realizar experimentos en los que se pruebe si el orden de adición de los reactivos influye en el rendimiento final de los derivados de curcumina.
- ✓ Es importante acoplar técnicas con mayor capacidad determinante como experimentos mono y bidimensionales de resonancia magnética nuclear (RMN) al conjunto de técnicas instrumentales para caracterizar y elucidar la estructura química de los compuestos formados.

REFERENCIAS

- Ahmad, K., Baig, M. H., Mushtaq, G., Kamal, M. A., Greig, N. H., & Choi, I. (2018). Commonalities in Biological Pathways, Genetics, and Cellular Mechanism between Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Diseases: An In Silico-Updated Overview. *Current Alzheimer Research*, *14*(11), 1190–1197. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170203141151>.Commonalities
- Alhusaini, A., Fadda, L., Hasan, I. H., Zakaria, E., Alenazi, A. M., & Mahmoud, A. M. (2019). Curcumin Ameliorates Lead-Induced Hepatotoxicity by Suppressing Oxidative Stress and Inflammation, and Modulating Akt/GSK-3 β Signaling Pathway. *Biomolecules*, *9*(11), 703–720. <https://doi.org/10.3390/biom9110703>
- Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010). α -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *26*(1), 211–233. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113313>
- Bae, J. R., & Kim, S. H. (2017). Synapses in neurodegenerative diseases. *BMB Reports*, *50*(5), 237–246. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.5.038>
- Baumgartner, B., Svirikova, A., Bintinger, J., Hametner, C., Marchetti-Deschmann, M., & Unterlass, M. M. (2017). Green and highly efficient synthesis of perylene and naphthalene bisimides in nothing but water. *Chemical Communications*, *53*(7), 1203–1328. <https://doi.org/10.1039/c6cc06567h>
- Berardelli, A., Rothwell, J. C., Thompson, P. D., & Hallett, M. (2001). Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain*, *124*(11), 2131–2146. <https://doi.org/10.1093/brain/124.11.2131>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Berrocal, R., Vasquez, V., Rao, K. S., Gadad, B. S., & Rao, K. S. (2015). α -Synuclein Misfolding Versus Aggregation Relevance to Parkinson's Disease: Critical

Assessment and Modeling. *Molecular Neurobiology*, 51(3), 1417–1431.

<https://doi.org/10.1007/s12035-014-8818-2>

Binolfi, A., Limatola, A., Verzini, S., Kosten, J., Theillet, F.-X., Rose, H. M., Bekei, B., Stuiver, M., van Rossum, M., & Selenko, P. (2016). Intracellular repair of oxidation-damaged α -synuclein fails to target C-terminal modification sites. *Nature Communications*, 7(1), 10251. <https://doi.org/10.1038/ncomms10251>

Braidy, N., Jugder, B.-E., Poljak, A., Jayasena, T., Nabavi, S. M., Sachdev, P., & Grant, R. (2017). Molecular Targets of Tannic Acid in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 14(8).

<https://doi.org/10.2174/1567205014666170206163158>

Bromidge, S. M., Orlek, B. S., Entwistle, D. A., & Goldstein, J. (1993). A convenient synthesis of masked β -ketoaldehydes by the controlled addition of nucleophiles to (trimethylsilyl)ethynyl ketones. *Synthetic Communications*, 23(4), 487–494. <https://doi.org/10.1080/00397919308009803>

Burley, S. K., Berman, H. M., Bhikadiya, C., Bi, C., Chen, L., Di Costanzo, L., Christie, C., Dalenberg, K., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Ghosh, S., Goodsell, D. S., Green, R. K., Guranović, V., Guzenko, D., Hudson, B. P., Kalro, T., Liang, Y., ... Zardecki, C. (2019). RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D464–D474.

<https://doi.org/10.1093/nar/gky1004>

Chan, S., Kantham, S., Rao, V. M., Palanivelu, M. K., Pham, H. L., Shaw, P. N., McGeary, R. P., & Ross, B. P. (2016). Metal chelation, radical scavenging and inhibition of A β 42 fibrillation by food constituents in relation to Alzheimer's disease. *Food Chemistry*, 199, 14–24.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.118>

Clarke, C. E. (2007). Parkinson's disease. *BMJ*, 335(7617), 441–445.

<https://doi.org/10.1136/bmj.39289.437454.AD>

- Corti, R., Marrano, C. A., Salerno, D., Brocca, S., Natalello, A., Santambrogio, C., Legname, G., Mantegazza, F., Grandori, R., & Cassina, V. (2019). Depicting Conformational Ensembles of α -Synuclein by Single Molecule Force Spectroscopy and Native Mass Spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(20), 5181–5194. <https://doi.org/10.3390/ijms20205181>
- Cox, B. G., & Chan, L. C. (2007). Kinetics of amide formation through carbodiimide/N-hydroxybenzotriazole (HOBt) couplings. *Journal of Organic Chemistry*, *72*(23), 8863–8869. <https://doi.org/10.1021/jo701558y>
- Dorsey, E. R., Elbaz, A., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Adsuar, J. C., Ansha, M. G., Brayne, C., Choi, J.-Y. J., Collado-Mateo, D., Dahodwala, N., Do, H. P., Edessa, D., Endres, M., Fereshtehnejad, S.-M., Foreman, K. J., Gankpe, F. G., Gupta, R., Hankey, G. J., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, *17*(11), 939–953. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3)
- Dua, T., Garrido-Cumbrera, M., Mathers, C., & Saxena, S. (2006). Global burden of neurological disorders: estimates and projections. En J. A. Aarli, G. Avanzini, J. M. Bertolote, H. de Boer, H. Breivik, T. Dua, N. Graham, A. Janca, J. Kesselring, C. Mathers, A. Muscetta, L. Prilipko, B. Saraceno, S. Saxena, & T. J. Steiner (Eds.), *Neurological Disorders: Public Health Challenges* (pp. 27–39). World Health Organization. https://www.who.int/mental_health/neurology/chapter_2_neuro_disorders_public_h_challenges.pdf?ua=1
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., & Browne, G. (2001). Conformational properties of α -Synuclein in its free and lipid-associated states. *Journal of Molecular Biology*, *307*(4), 1061–1073. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2001.4538>
- Eriksen, J. L., Dawson, T. M., Dickson, D. W., & Petrucelli, L. (2003). Caught in the act: α -synuclein is the culprit in Parkinson's disease. *Neuron*, *40*(3), 453–456. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00684-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00684-6)

- Faulkner, M. A. (2014). Safety overview of FDA-approved medications for the treatment of the motor symptoms of Parkinson's disease. *Expert Opinion on Drug Safety*, 13(8), 1055–1069. <https://doi.org/10.1517/14740338.2014.931369>
- Feigin, V. L., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abd-Allah, F., Abdulle, A. M., Abera, S. F., Abyu, G. Y., Ahmed, M. B., Aichour, A. N., Aichour, I., Aichour, M. T. E., Akinyemi, R. O., Alabed, S., Al-Raddadi, R., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Ansari, H., Anwari, P., Ärnlöv, J., ... Vos, T. (2017). Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Neurology*, 16(11), 877–897. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30299-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30299-5)
- Feng, L., Li, Y., Song, Z.-F., Li, H.-J., & Huai, Q.-Y. (2015). Synthesis and biological evaluation of curcuminoid derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63(11), 873–881. <https://doi.org/10.1248/cpb.c15-00470>
- Fullard, M. E., Morley, J. F., & Duda, J. E. (2017). Olfactory Dysfunction as an Early Biomarker in Parkinson's Disease. *Neuroscience Bulletin*, 33(5), 515–525. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0170-x>
- Gadad, B. S., Britton, G. B., & Rao, K. S. (2011). Targeting Oligomers in Neurodegenerative Disorders: Lessons from α -Synuclein, Tau, and Amyloid- β Peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(s2), 223–232. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110182>
- Gadad, B. S., Subramanya, P. K., Pullabhatla, S., Shantharam, I. S., & Rao, K. S. (2012). Curcumin-glucoside, A Novel Synthetic Derivative of Curcumin, Inhibits α -Synuclein Oligomer Formation: Relevance to Parkinson's Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 18(1), 76–84. <https://doi.org/10.2174/138161212798919093>
- Gao, H.-M., Kotzbauer, P. T., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2008). Neuroinflammation and Oxidation/Nitration of α -Synuclein Linked to Dopaminergic Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 28(30), 7687–7698. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0143-07.2008>

- Garcia-Garcia, A., Zavala-Flores, L., Rodriguez-Rocha, H., & Franco, R. (2012). Thiol-redox signaling, dopaminergic cell death, and Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, *17*(12), 1764–1784.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.4501>
- Giasson, B. I. (2003). Initiation and Synergistic Fibrillization of Tau and Alpha-Synuclein. *Science*, *300*(5619), 636–640. <https://doi.org/10.1126/science.1082324>
- Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2012). Synucleinopathies and Tauopathies. En S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. Albers, & D. L. Price (Eds.), *Basic Neurochemistry* (8a ed., pp. 829–843). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00047-X>
- Goetz, C. G. (2011). The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *1*(1), a008862. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>
- Gomes, D. D. C. F., Alegrio, L. V., Freire de Lima, M. E., Leon, L. L., & Araújo, C. A. C. (2002). Synthetic derivatives of curcumin and their activity against *Leishmania amazonensis*. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, *52*(2), 120–124.
<https://doi.org/10.1055/s-0031-1299867>
- González, Y., Doens, D., Cruz, H., Santamaría, R., Gutiérrez, M., Llanes, A., & Fernández, P. L. (2018). A marine diterpenoid modulates the proteasome activity in murine macrophages stimulated with LPS. *Biomolecules*, *8*(109), 4–18.
<https://doi.org/10.3390/biom8040109>
- Greenwald, R. B., Choe, Y. H., & Wu, D. (2003). Selective phenolic acylation of 10-hydroxycamptothecin using poly (ethylene glycol) carboxylic acid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *13*(3), 577–580.
[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00926-5](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00926-5)
- Grossman, R. B. (2003). The Basics. En *The Art of Writing Reasonable Organic Reaction Mechanisms* (2a ed., pp. 1–49). Springer New York.
https://doi.org/10.1007/0-387-21545-X_1

- Guerrero, E., Vasudevaraju, P., Hegde, M. L., Britton, G. B., & Rao, K. S. (2013). Recent advances in α -Synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, *47*(2), 525–536. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8328-z>
- Gupta, S. C., Patchva, S., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *39*(3), 283–299. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x>
- Harman, D. (2006). Free radical theory of aging: An update - Increasing the functional life span. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1067*(1), 10–21. <https://doi.org/10.1196/annals.1354.003>
- He, Y., Yue, Y., Zheng, X., Zhang, K., Chen, S., & Du, Z. (2015). Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked? *Molecules*, *20*, 9183–9213. <https://doi.org/10.3390/molecules20059183>
- Hegde, M. L. (2014). Molecular characterization of neuroprotective activities of plant based products could revive their utilization and lead discovery of new drug candidates for brain diseases. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *6*(2), 63–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24741271>
- Hegde, M. L., Hegde, P. M., Rao, K. S., & Mitra, S. (2011). Oxidative genome damage and its repair in neurodegenerative diseases: function of transition metals as a double-edged sword. *Journal Alzheimer's Disease*, *24*, 183–198. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110281>
- Hegde, M. L., Vasudevaraju, P., & Rao, K. J. (2010). DNA induced folding/fibrillation of alpha-synuclein: new insights in Parkinson's disease. *Frontiers in Bioscience*, *15*(1), 418–436. <https://doi.org/10.2741/3628>
- Herrera, J., de Roach, F., Aparicio, V., & Saxena, S. (2006). Informe sobre el sistema de salud mental en Panamá. En *IESM-OMS*.
- Ingelsson, M. (2016). Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in

- Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 10(408), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00408>
- Jankovic, J., & Stacy, M. (2007). Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs*, 21(8), 677–692. <https://doi.org/10.2165/00023210-200721080-00005>
- Jayaraj, R. L., Elangovan, N., Manigandan, K., Singh, S., & Shukla, S. (2014). CNB-001 a Novel Curcumin Derivative, Guards Dopamine Neurons in MPTP Model of Parkinson's Disease. *BioMed Research International*, 2014(236182), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/236182>
- Jin, H., Kanthasamy, A., Ghosh, A., Anantharam, V., Kalyanaraman, B., & Kanthasamy, A. G. (2014). Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: Preclinical and clinical outcomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1282–1294. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.007>
- Jo, S., Cheng, X., Islam, S. M., Huang, L., Rui, H., Zhu, A., Lee, H. S., Qi, Y., Han, W., Vanommeslaeghe, K., MacKerell, A. D., Roux, B., & Im, W. (2014). CHARMM-GUI PDB Manipulator for Advanced Modeling and Simulations of Proteins Containing Nonstandard Residues. En T. Karabencheva-Christova (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 96, pp. 235–265). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.06.002>
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kaur, H., Ahmad, M., & Scaria, V. (2016). Computational Analysis and In silico Predictive Modeling for Inhibitors of PhoP Regulon in *S. typhi* on High-Throughput Screening Bioassay Dataset. *Interdisciplinary Sciences:*

- Computational Life Sciences*, 8(1), 95–101.
<https://doi.org/10.1007/s12539-015-0273-x>
- Keating, G. M., Lyseng-Williamson, K. A., & Hoy, S. M. (2012). Rasagiline: A guide to its use in Parkinson's disease. *CNS Drugs*, 26(9), 781–785.
<https://doi.org/10.2165/11207570-000000000-00000>
- Khor, P. Y., Mohd Aluwi, M. F. F., Rullah, K., & Lam, K. W. (2019). Insights on the synthesis of asymmetric curcumin derivatives and their biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 183, 111704.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111704>
- Koes, D. R., Baumgartner, M. P., & Camacho, C. J. (2013). Lessons learned in empirical scoring with smina from the CSAR 2011 benchmarking exercise. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(8), 1893–1904.
<https://doi.org/10.1021/ci300604z>
- Kolossváry, I., & Guida, W. C. (1993). Comprehensive Conformational Analysis of the Four- to Twelve-Membered Ring Cycloalkanes: Identification of the Complete Set of Interconversion Pathways on the MM2 Potential Energy Hypersurface. *Journal of the American Chemical Society*, 115(6), 2107–2119.
<https://doi.org/10.1021/ja00059a003>
- Koroth, J., Nirgude, S., Tiwari, S., Gopalakrishnan, V., Mahadeva, R., Kumar, S., Karki, S. S., & Choudhary, B. (2019). Investigation of anti-cancer and migrastatic properties of novel curcumin derivatives on breast and ovarian cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 273–289.
<https://doi.org/10.1186/s12906-019-2685-3>
- Kovacs, G. (2016). Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 189–222. <https://doi.org/10.3390/ijms17020189>
- Krovat, E., Steindl, T., & Langer, T. (2005). Recent Advances in Docking and Scoring. *Current Computer Aided-Drug Design*, 1(1), 93–102.

<https://doi.org/10.2174/1573409052952314>

- Kumar, G. P., & Khanum, F. (2012). Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacognosy reviews*, 6(12), 81–90. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.99898>
- Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Padmavathi, G., Monisha, J., Roy, N. K., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2017). Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1325–1348. <https://doi.org/10.1111/bph.13621>
- Lakey-Beitia, J. (2017). *Studies on the Evaluation of Anti-inflammatory and Neuroprotective Activities of Novel Curcumin Derivatives and Carotenoids with 6-oxo-k-End Group*. Acharya Nagarjuna University.
- Lakey-Beitia, J., Berrocal, R., Rao, K. S., & Durant, A. A. (2015). Polyphenols as Therapeutic Molecules in Alzheimer's Disease Through Modulating Amyloid Pathways. *Molecular Neurobiology*, 51(2), 466–479. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8722-9>
- Lakey-Beitia, J., González, Y., Doens, D., Stephens, D. E., Santamaría, R., Murillo, E., Gutiérrez, M., Fernández, P. L., Rao, K. S., Larionov, O. V., & Durant-Archibold, A. A. (2017). Assessment of Novel Curcumin Derivatives as Potent Inhibitors of Inflammation and Amyloid- β Aggregation in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(s1), S59–S68. <https://doi.org/10.3233/JAD-170071>
- Lakey-Beitia, J., Kumar D., J., Hegde, M. L., & Rao, K. S. (2019). Carotenoids as Novel Therapeutic Molecules Against Neurodegenerative Disorders: Chemistry and Molecular Docking Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5553. <https://doi.org/10.3390/ijms20225553>
- Lees, A. (2005). Alternatives to levodopa in the initial treatment of early Parkinson's disease. *Drugs and Aging*, 22(9), 731–740. <https://doi.org/10.2165/00002512-200522090-00002>
- Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., & Riek, R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid- (1-42) fibrils.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(48), 17342–17347.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0506723102>

- Machacante, C., Aparicio, V., & Saxena, S. (2008). Informe sobre el sistema de salud mental en Costa Rica. En *IESM-OMS*.
- Meles, S. K., Teune, L. K., de Jong, B. M., Dierckx, R. A., & Leenders, K. L. (2016). Metabolic Imaging in Parkinson Disease. *Journal of Nuclear Medicine*, 58(1), 23–28. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.183152>
- Mellini, M., Di Muzio, E., D'Angelo, F., Baldelli, V., Ferrillo, S., Visca, P., Leoni, L., Polticelli, F., & Rampioni, G. (2019). In silico Selection and Experimental Validation of FDA-Approved Drugs as Anti-quorum Sensing Agents. *Frontiers in Microbiology*, 10(2355), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02355>
- Messner, D. J., Surrago, C., Fiordalisi, C., Chung, W. Y., & Kowdley, K. V. (2017). Isolation and characterization of iron chelators from turmeric (*Curcuma longa*): selective metal binding by curcuminoids. *Biometals*, 30(5), 699–708. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0038-6>
- Mhillaj, E., Tarozzi, A., Pruccoli, L., Cuomo, V., Trabace, L., & Mancuso, C. (2019). Curcumin and heme oxygenase: Neuroprotection and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms20102419>
- Mhyre, T. R., Boyd, J. T., Hamill, R. W., & Maguire-Zeiss, K. A. (2012). Parkinson's Disease. *Subcellular Biochemistry*, 65, 389–455. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_16
- Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2015). Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 64(3 Suppl 1), S40–S46. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.030>
- Miotto, M. C., Rodriguez, E. E., Valiente-Gabioud, A. A., Torres-Monserrat, V., Binolfi, A., Quintanar, L., Zweckstetter, M., Griesinger, C., & Fernández, C. O. (2014). Site-specific copper-catalyzed oxidation of α -synuclein: Tightening the

- link between metal binding and protein oxidative damage in Parkinson's disease. *Inorganic Chemistry*, 53(9), 4350–4358. <https://doi.org/10.1021/ic4031377>
- Mitra, J., Guerrero, E. N., Hegde, P. M., Wang, H., Boldogh, I., Rao, K. S., Mitra, S., & Hegde, M. L. (2014). New Perspectives on Oxidized Genome Damage and Repair Inhibition by Pro-Oxidant Metals in Neurological Diseases. *Biomolecules*, 4, 678–703. <https://doi.org/10.3390/biom4030678>
- Mollenhauer, B., Rochester, L., Chen-Plotkin, A., & Brooks, D. (2014). What can biomarkers tell us about cognition in Parkinson's disease? *Movement Disorders*, 29(5), 622–633. <https://doi.org/10.1002/mds.25846>
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Narasingapa, R. B., Jargaval, M. R., Pullabhatla, S., Htut, H., Rao, J. K. S., Hernandez, J., Govitrapong, P., & Vincent, B. (2012). Activation of α -secretase by curcumin-aminoacid conjugates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(4), 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.010>
- Neises, B., & Steglich, W. (1978). Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17(7), 522–524. <https://doi.org/10.1002/anie.197805221>
- Noureddin, S. A., El-Shishtawy, R. M., & Al-Footy, K. O. (2019). Curcumin analogues and their hybrid molecules as multifunctional drugs. *European Journal*

of Medicinal Chemistry, 182, 111631.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111631>

- Ogunraku, O. O., Oboh, G., Passamonti, S., Trammer, F., & Boligon, A. A. (2017). Capsicum annum var. grossum (Bell Pepper) Inhibits β -Secretase Activity and β -Amyloid1-40 Aggregation. *Journal of Medicinal Food*, 20(2), 124–130. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0077>
- Olmedo, D. A., González-Medina, M., Gupta, M. P., & Medina-Franco, J. L. (2017). Cheminformatic characterization of natural products from Panama. *Molecular Diversity*, 21(4), 779–789. <https://doi.org/10.1007/s11030-017-9781-4>
- Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(2), 525–537. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91–102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>
- Palacio-Rodríguez, K., Lans, I., Cavasotto, C. N., & Cossio, P. (2019). Exponential consensus ranking improves the outcome in docking and receptor ensemble docking. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41594-3>
- Panamá América. (2018, julio 2). *Estimulación cerebral para el Párkinson*. 1. <https://www.panamaamerica.com.pa/variedades/estimulacion-cerebral-para-el-parkinson-1109674>
- Papapetropoulos, S., Adi, N., Ellul, J., Argyriou, A. A., & Chroni, E. (2007). A prospective study of familial versus sporadic Parkinson's disease. *Neurodegenerative Diseases*, 4(6), 424–427. <https://doi.org/10.1159/000107702>
- Pappu, R. V., Hart, R. K., & Ponder, J. W. (1998). Analysis and application of potential energy smoothing and search methods for global optimization. *Journal*

- of *Physical Chemistry B*, 102(48), 9725–9742. <https://doi.org/10.1021/jp982255t>
- Parkinson, J. (1817). An Essay on the Shaking Palsy. En *London: Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely, and Jones*. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kris, G. S., & Vyvyan, J. R. (2015). Infrared Spectroscopy. En *Introduction to Spectroscopy* (5a ed., pp. 14–106). Cengage Learning.
- Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>
- Pirker, W., Djamshidian, S., Asenbaum, S., Gerschlager, W., Tribl, G., Hoffmann, M., & Brücke, T. (2002). Progression of dopaminergic degeneration in Parkinson's disease and atypical parkinsonism: A longitudinal β -CIT SPECT study. *Movement Disorders*, 17(1), 45–53. <https://doi.org/10.1002/mds.1265>
- Pirkevi, C., Lesage, S., Brice, A., & Başak, A. N. (2009). From genes to proteins in Mendelian Parkinson's disease: An overview. *Anatomical Record*, 292(12), 1893–1901. <https://doi.org/10.1002/ar.20968>
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α -Synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Quiroga, R., & Villarreal, M. A. (2016). Vinardo: A Scoring Function Based on Autodock Vina Improves Scoring, Docking, and Virtual Screening. *PLoS ONE*, 11(5), e0155183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155183>
- Ragnarsson, U., & Grehn, L. (1998). Novel Amine Chemistry Based on DMAP-Catalyzed Acylation. *Accounts of Chemical Research*, 31(8), 494–501. <https://doi.org/10.1021/ar980001k>

- Reed, S. A., Mazzotti, A. R., & White, M. C. (2009). A catalytic, Brønsted base strategy for intermolecular allylic C-H amination. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(33), 11701–11706. <https://doi.org/10.1021/ja903939k>
- Rehman, M. U., Wali, A. F., Ahmad, A., Shakeel, S., Rasool, S., Ali, R., Rashid, S. M., Madkhali, H., Ganaie, M. A., & Khan, R. (2019). Neuroprotective Strategies for Neurological Disorders by Natural Products: An update. *Current Neuropharmacology*, *17*(3), 247–267. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180911124605>
- Reichmann, H. (2017). Premotor Diagnosis of Parkinson's Disease. *Neuroscience Bulletin*, *33*(5), 526–534. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0159-5>
- Río, J., & Montalbán, X. (2014). Descripción actual de la esclerosis múltiple. *Medicina Clínica*, *143*, 3–6. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(15\)30002-6](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(15)30002-6)
- Rodríguez-Violante, M., Cervantes-Arriaga, A., Fahn, S., & Tolosa, E. (2017). Two-hundred years later: Is Parkinson's disease a single defined entity? *Revista de Investigacion Clinica*, *69*(6), 308–313. <https://doi.org/10.24875/RIC.17002291>
- Ryazantsev, M. N., Nikolaev, D. M., Struts, A. V., & Brown, M. F. (2019). Quantum Mechanical and Molecular Mechanics Modeling of Membrane-Embedded Rhodopsins. *The Journal of Membrane Biology*, *252*(4–5), 425–449. <https://doi.org/10.1007/s00232-019-00095-0>
- Sakakura, A., Kawajiri, K., Ohkubo, T., Kosugi, Y., & Ishihara, K. (2007). Widely Useful DMAP-Catalyzed Esterification under Auxiliary Base- and Solvent-Free Conditions. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(47), 14775–14779. <https://doi.org/10.1021/ja075824w>
- Schrödinger LLC. (2019). *The PyMOL Molecular Graphics System* (Version 2.3.2). Schrödinger, LLC. <https://pymol.org/>
- Scuto, M. C., Mancuso, C., Tomasello, B., Ontario, M. L., Cavallaro, A., Frasca, F., Maiolino, L., Salinaro, A. T., Calabrese, E. J., & Calabrese, V. (2019). Curcumin, Hormesis and the Nervous System. *Nutrients*, *11*(2417), 1–17.

<https://doi.org/10.3390/nu11102417>

- Simunkova, M., Alwasel, S. H., Alhazza, I. M., Jomova, K., Kollar, V., Rusko, M., & Valko, M. (2019). Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. *Archives of Toxicology*, *93*(9), 2491–2513.
<https://doi.org/10.1007/s00204-019-02538-y>
- Singh, P. K., Kotia, V., Ghosh, D., Mohite, G. M., Kumar, A., & Maji, S. K. (2013). Curcumin Modulates α -Synuclein Aggregation and Toxicity. *ACS Chemical Neuroscience*, *4*(3), 393–407. <https://doi.org/10.1021/cn3001203>
- Sridhar, V., Gaud, R., Bajaj, A., & Wairkar, S. (2018). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intranasally administered selegiline nanoparticles with improved brain delivery in Parkinson's disease. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *14*(8), 2609–2618.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.08.004>
- Stowe, R. L., Ives, N. J., Clarke, C. E., van Hilten, J., Ferreira, J., Hawker, R. J., Shah, L., Wheatley, K., & Gray, R. (2008). Dopamine agonist therapy in early Parkinson's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2*, 1–89.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD006564.pub2>
- Sveinbjornsdottir, S. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 318–324. <https://doi.org/10.1111/jnc.13691>
- Tavakkoli, A., Iranshahi, M., Hasheminezhad, S. H., Hayes, A. W., & Karimi, G. (2019). The neuroprotective activities of natural products through the Nrf2 upregulation. *Phytotherapy Research*, *33*(9), 2256–2273.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6427>
- Toden, S., & Goel, A. (2017). The Holy Grail of Curcumin and its Efficacy in Various Diseases: Is Bioavailability Truly a Big Concern? *Journal of Restorative Medicine*, *6*(1), 27–36. <https://doi.org/10.14200/jrm.2017.6.0101>
- Trott, O., & Olson, A. (2010). Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(2), 455–461.

<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.AutoDock

- Tsakos, M., Schaffert, E. S., Clement, L. L., Villadsen, N. L., & Poulsen, T. B. (2015). Ester coupling reactions - an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products. *Natural Product Reports*, 32(4), 605–632. <https://doi.org/10.1039/c4np00106k>
- Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., & Nussbaum, R. L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9595–9603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411805200>
- Ung, Y. T., Ong, C. E., & Pan, Y. (2018). Current High-Throughput Approaches of Screening Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 (CYP) Enzymes. *High-Throughput*, 7(29), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ht7040029>
- Uversky, V. N., Li, J., Souillac, P., Millett, I. S., Doniach, S., Jakes, R., Goedert, M., & Fink, A. L. (2002). Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of α -synuclein assembly by β - and γ -synucleins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 11970–11978. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109541200>
- Vasquez, V., Mitra, J., Hegde, P. M., Pandey, A., Sengupta, S., Mitra, S., Rao, K. S., & Hegde, M. L. (2017). Chromatin-Bound Oxidized α -Synuclein Causes Strand Breaks in Neuronal Genomes in in vitro Models of Parkinson's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(s1), S133–S150. <https://doi.org/10.3233/JAD-170342>
- Watt, N. T., Whitehouse, I. J., & Hooper, N. M. (2011). The role of Zinc in Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.4061/2011/971021>
- Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., & Lansbury, P. T. (1996). NACP, A protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*, 35(43), 13709–13715. <https://doi.org/10.1021/bi961799n>
- Xu, S., Held, I., Kempf, B., Mayr, H., Steglich, W., & Zipse, H. (2005). The DMAP-catalyzed acetylation of alcohols - A mechanistic study (DMAP = 4-

- (dimethylamino)pyridine). *Chemistry - A European Journal*, 11(16), 4751–4757.
<https://doi.org/10.1002/chem.200500398>
- Zajac, M., & Peters, R. (2007). Catalytic asymmetric formation of β -sultams. *Organic Letters*, 9(10), 2007–2010. <https://doi.org/10.1021/ol070644c>
- Zhang, D.-W., Fu, M., Gao, S. H., & Liu, J. L. (2013). Curcumin and diabetes: A systematic review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/636053>
- Zhang, S., Tang, M.-B., Luo, H.-Y., Shi, C.-H., & Xu, Y.-M. (2017). Necroptosis in neurodegenerative diseases: A potential therapeutic target. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2905. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.286>
- Zhao, L.-X., Wang, Y., Liu, T., Wang, Y. X., Chen, H. Z., Xu, J. R., & Qiu, Y. (2017). α -Mangostin decreases β -amyloid peptides production via modulation of amyloidogenic pathway. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 23(6), 526–534. <https://doi.org/10.1111/cns.12699>
- Zhao, S., Pi, C., Ye, Y., Zhao, L., & Wei, Y. (2019). Recent advances of analogues of curcumin for treatment of cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 180, 524–535. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.034>

ANEXOS

ANEXO I

Metodología Extendida de Acoplamiento Molecular

A. Preparación del Receptor:

1) Inspección Visual del Receptor:

- Se descargó estructura del péptido/proteína de interés (β -Amiloide, β A, PDB: 2BEG; α -Sinucleína, α -Syn, PDB: 1XQ8) de la Base de Datos de Proteínas (Protein Data Bank, PDB) <https://www.rcsb.org>.
- Se guardó el péptido/proteína en la carpeta de trabajo.
- Se abrió la línea de comando de Linux.
- Se crearon las carpetas para los receptores.
 - a) “mkdir beta-amyloid”.
 - b) “mkdir alpha-synuclein”.
- Se cambió la ubicación a la carpeta de trabajo.
 - “cd /colocar/la/ubicación/de/la/carpeta/de/trabajo/” y presionar enter.
 - Ej1: cd /home/neurochem/Tesis/Etapa-I/beta-amyloid/
 - Ej2: cd /home/neurochem/Tesis/Etapa-I/alpha-synuclein/
- Se eligió y extrajo la cadena de interés de la proteína/péptido, de tener varias cadenas, que presente la conformación más representativa de toda la estructura.
 - a) Opción 1 – Línea de Comando (los espacios son necesarios):
 - “grep ‘ATOM’ (nombre-del-archivo).pdb | grep ‘cadena-elegida ‘ > receptor.pdb”.
 - Ej: grep ‘ATOM’ 2BEG.pdb | grep ‘A ‘ > receptor.pdb
 - b) Opción 2 – Interfaz gráfica de PyMol:
 - Se abrió el archivo de la proteína/péptido con PyMol.
 - Se presionó S en la parte inferior derecha.
 - Visualización [Display].
 - Modo de Secuencia [Sequence Mode].
 - Identificadores de Cadenas [Chain Identifiers].
 - Se seleccionó la cadena de interés.
 - Archivo [File].
 - Exportar Molécula... [Export Molecule]...
 - Guardar... [Save...]
 - Se escribió el nombre del archivo.
 - Nombre: receptor.pdb
 - Se eligió el tipo del archivo.
 - Tipo: PDB (*.pdb *.pdb.gz).
 - Se buscó la carpeta de trabajo.
 - Se presionó Guardar.
- Se predijo el pKa de los residuos de aminoácidos del receptor con la herramienta en línea PROPKA.
 - Se ingresó al sitio web http://nbc222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/.
 - Se seleccionó la opción cargar [upload] a PDB file
 - Se cargó el archivo receptor.pdb con la opción Seleccionar archivo.
 - Enviar [Submit].
 - Clic en el archivo de salida receptor.propka

- Se abrió el archivo receptor.pdb con PyMol.
 - Se inspeccionó visualmente que el péptido/proteína cumpla con lo siguiente.
 - a) Estructura elucidada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN):
 - Secuencia completa de residuos de aminoácidos.
 - Residuos de aminoácidos sin átomos faltantes.
 - Estado de protonación de los residuos de aminoácidos HIS, LIS, GLU, ASP, ARG correcto a pH = 7.
 - b) Estructura elucidada por Rayos X (RX):
 - Secuencia completa de residuos de aminoácidos.
 - Residuos de aminoácidos sin átomos faltantes.
 - Estado de protonación adecuado a pH = 7 de los residuos de aminoácidos HIS, LIS, GLU, ASP, ARG y orientación correcta de los residuos GLN y ASN, priorizando la formación de puentes de Hidrógeno a una distancia menor o igual a 3.5 Å y un ángulo mayor a 90°.
 - Resolución menor o igual a 2.5 Å.
- 2) Se corrigieron los residuos de aminoácidos incompletos del receptor con CHARMM-GUI.
- Se ingresó a la página web <http://www.charmm-gui.org/>.
 - Generador de entrada [Input Generator].
 - Seleccionar archivo.
 - Se cargó el archivo receptor.pdb.
 - Se marcó la opción Formato PDB [PDB Format]: PDB.
 - Siguiendo Paso: Seleccionar Modelo/Cadena [Next Step: Select Model/Chain].
 - Siguiendo Paso: Manipular PDB [Next Step: Manipulate PDB].
 - Se marcó la opción Parcheo de grupos terminales [Terminal group patching].
 - Siguiendo Paso: Generar PDB [Next Step: Generate PDB].
 - Se seleccionó la opción Salida de CHARMM [CHARMM Output]: step1_pdbreader.pdb.
 - Se movió el archivo generado a la carpeta de trabajo.
 - Ej: `“mv step1_pdbreader.pdb /home/neurochem/Tesis/Etapa-I/beta-amyloid/receptor.pdb”`
- 3) Se transformó el archivo de receptor.pdb a receptor.pdbqt con AutoDockTools (ADT)
- `“prepare_receptor4.py -r receptor.pdb -o receptor.pdbqt”`
- Nota:** Para ejecutar `prepare_receptor4.py` y todos los programas relacionados directamente, se necesita haber añadido la dirección de la carpeta donde se encuentran estos programas a la variable de ambiente `bashrc`. Esto se puede hacer escribiendo en la línea de comando `“nano .bashrc”`, se abrirá la ventana `“.bashrc”`, nos vamos hasta el final y añadimos: (Ej.): `export PATH="/home/neurochem/MGLTools-1.5.6/mgltools_x86_64Linux2_1.5.6/MGLToolsPkgs/AutoDockTools/Utilities24:$PATH`. Presionamos `Ctrl + O` para guardar, luego `enter`, y `Ctrl + X` para salir.

B. Preparación de los Ligandos:

- Se creó la carpeta “Ligands” para alojar las estructuras de los ligandos.
 - “mkdir Ligands”.
- Se ingresó a la carpeta “Ligands”.
 - “cd Ligands/”
- Se ejecutó ChemDraw.
- Se dibujó la estructura del ligando.
- Se limpió la estructura del ligando.
 - Se seleccionó la herramienta de lazo (Panel Izquierdo).
 - Se encerró estructura.
 - Clic derecho.
 - Clic en Molécula [Molecule].
 - Clic en limpiar estructura [Clean Structure] Ctrl + Shift + K.
- Se guardó el Ligando.
 - Archivo [File].
 - Guardar como [Save as].
 - Se buscó la carpeta de trabajo.
 - Se escribió el nombre del archivo.
 - Nombre: LigandN.cdx (“N” representa el número asignado a cada ligando).
 - Se eligió el tipo del archivo.
 - Tipo: ChemDraw (*.cdx).
 - Se presionó Guardar.
- Se minimizó la estructura del ligando.
 - Se ejecutó ChemBio 3D.
 - Abrir... [Open...].
 - Se buscó al ligando en la carpeta de trabajo.
 - Calculaciones [Calculations].
 - MM2.
 - Minimizar Energía [Minimize Energy].
 - RMS = 0.010.
 - Correr [Run].
- Se guardó la estructura minimizada del ligando.
 - Archivo [File].
 - Guardar Como [Save As...].
 - Se buscó la carpeta de trabajo.
 - Se escribió el nombre del archivo.
 - Nombre: LigandN.pdb (“N” representa el número asignado a cada ligando).
 - Se eligió el tipo del archivo.
 - Tipo: Banco de Datos de Proteínas (*.pdb) [Protein Data Bank (*.pdb)].
 - Se presionó en Guardar.
- Se transformó el archivo de LigandN.pdb a LigandN.pdbqt con AutoDockTools (ADT).
 - “prepare_ligand4.py -l LigandN.pdb -o LigandN.pdbqt”
- Se verificó que la estructura química del ligando generado (LigandN.pdbqt y) fuese correcta, con PyMol.

- Se corrigieron las torsiones de los archivos, manualmente, por medio de la línea de comando.
 - “vi LigandN.pdbqt”.
 - Se presionó enter.
 - Se presionó “i” para editar el archivo.
 - Se realizaron las correcciones pertinentes.
 - Se presionó ESC.
 - Se escribió “:wq!”
- Se repitieron los pasos de la parte B para generar todos los ligandos.

C. Acoplamiento Molecular con AutoDock:

- Se creó la carpeta “Docking AutoDock” para alojar los resultados del Acoplamiento Molecular con AutoDock.
 - “mkdir Docking\ AutoDock”.
- Se ingresó a la carpeta “Docking AutoDock”.
 - “cd Docking\ AutoDock/”
- Se generó el Archivo de Parámetros de Celda (Grid Parameter File).
 - “prepare_gpf4.py -l ../../Ligands/LigandN.pdbqt -r ../receptor.pdbqt -o receptor.gpf”.
- Se establecieron las dimensiones y coordenadas de la caja de cuadrícula con AutoDockTools (ADT).
 - Se ejecutó AutoDockTools.
 - Archivo [File].
 - Leer Molécula [Read Molecule].
 - Se buscó la carpeta de trabajo.
 - Clic en receptor.pdb.
 - Abrir.
 - Cuadrícula [Grid].
 - Caja de Cuadrícula [Grid Box...].
 - Se adaptó el tamaño de la caja.
 - Se ajustó el Espaciado [Spacing] (angstrom), de ser necesario.
 - Se ajustó el número de puntos en la dimensión x [number of points in x-dimension].
 - Se ajustó el número de puntos en la dimensión y [number of points in y-dimension].
 - Se ajustó el número de puntos en la dimensión z [number of points in z-dimension].
 - Se corrigieron las coordenadas de Centrado de la Caja de Cuadrícula: [Center Grid Box:] para ajustarla al receptor.
 - Se anotaron los datos de los números de puntos en las dimensiones x,y,z y las coordenadas de centrado de la caja de cuadrícula en el archivo de la sección siguiente.
- Se modificaron los parámetros de la caja de cuadrícula en el archivo receptor.gpf (Ej. βA).
 - “vi receptor.gpf”

- Se presionó enter.
- Se presionó “i” para editar el archivo.
- Se reemplazaron los valores del parámetro npts de “45 40 40” por “126 100 64”. “78 40 50” por “126 100 126” para la α S.
- Se reemplazó el parámetro gridcenter de “auto” por “0.0 0.0 0.0”. “auto” por “237.710 79.513 -12.961” para la α S.
- Se reemplazó el parámetro receptor de “receptor.pdbqt” por “../receptor.pdbqt”.
- Se presionó ESC.
- Se escribió “:wq!”.
- Se ejecutó AutoGrid4.
 - “autogrid4 -p receptor.gpf -l receptor.glg”
- Se generó el Archivo de Parámetros de Acoplamiento (Docking Parameter File).
 - “prepare_dpf42.py -l ../Ligands/LigandN.pdbqt -r ../receptor.pdbqt -o LigandN_receptor.dpf”
- Se modificó el Archivo de Parámetros de Acoplamiento “LigandN_receptor.dpf”.
 - “vi LigandN_receptor.dpf”
 - Se presionó enter.
 - Se presionó “i” para editar el archivo.
 - Se reemplazó el parámetro move (small molecule) de “LigandN.pdbqt” por “../Ligands/LigandN.pdbqt”.
 - Se presionó ESC.
 - Se escribió “:wq!”
- Se ejecutó AutoDock4.
 - “autodock4 -p LigandN_receptor.dpf -l LigandN_receptor.dlg”
 - Se presionó enter.
- Se obtuvieron las coordenadas de los modelos con AutoDockTools (ADT).
 - “write_lowest_energy_ligand.py -f LigandN_receptor.dlg -o bestposeAD_LigandN_receptor.pdbqt”
- Se transformó el archivo LigandN_out.pdbqt a LigandN_out.pdb con Open Babel.
 - “babel LigandN_out.pdbqt LigandN_out.pdb”.
- Se repitieron los pasos de la parte C para producir el Acoplamiento Molecular con AutoDock de todos los ligandos con el receptor.

D. Acoplamiento Molecular con AutoDock Vina:

- Se creó la carpeta “Docking AutoDock Vina” para alojar los resultados del Acoplamiento Molecular con AutoDock Vina.
 - “mkdir Docking\ AutoDock\ Vina”.
- Se ingresó a la carpeta “Docking AutoDock Vina”.
 - “cd Docking\ AutoDock\ Vina/”
- Se creó un archivo de configuración.
 - Se escribió en la línea de comando: “vi config.inp”.
 - Se presionó enter.

- Se presionó “i” para editar el archivo.
- Se escribieron los parámetros (Ej. βA):
 - receptor = ../receptor.pdbqt
 - ligand = ../Ligands/LigandN.pdbqt
 - center_x = 0.0
 - center_y = 0.0
 - center_z = 0.0
 - size_x = 126
 - size_y = 100
 - size_z = 64
 - out = LigandN_out.pdbqt
 - energy_range = 4
- Se presionó ESC.
- Se escribió “:wq!”
- Se ejecutó AutoDock Vina: “vina --config config.inp --log LigandN_.log”
- Se presionó enter.
- Se transformó el archivo LigandN_out.pdbqt a LigandN_out.pdb con Open Babel.
 - “babel LigandN_out.pdbqt LigandN_out.pdb”.
- Se extrajo la mejor conformación del archivo con PyMol.
 - Se abrió PyMol.
 - Se cargó LigandN_out.pdb.
 - Archivo [File].
 - Exportar Molécula... [Export Molecule...].
 - Estado 1 [State 1].
 - Guardar... [Save...]
 - Se escribió el nombre del archivo.
 - Nombre: bestposeADV_LigandN_receptor.pdb
 - Se eligió el tipo del archivo.
 - Tipo: PDB (*.pdb *.pdb.gz).
 - Se buscó la carpeta de trabajo.
 - Se presionó Guardar.
- Se repitieron los pasos de la parte D para producir el Acoplamiento Molecular con AutoDock Vina de todos los ligandos con el receptor.

E. Acoplamiento Molecular con Smina:

- Se creó la carpeta “Docking Smina” para alojar los resultados del Acoplamiento Molecular con Smina.
 - “mkdir Docking\Smina”.
- Se ingresó a la carpeta “Docking Smina”.
 - “cd Docking\Smina”
- Se creó un archivo de configuración.
 - Se escribió en la línea de comando: “vi config.inp”.
 - Se presionó enter.
 - Se presionó “i” para editar el archivo.
 - Se escribieron los parámetros (Ej. βA):

```

receptor = ../receptor.pdbqt
ligand = ../Ligands/LigandN.pdbqt
center_x = 0.0
center_y = 0.0
center_z = 0.0
size_x = 126
size_y = 100
size_z = 64
out = LigandN_out.pdbqt
exhaustiveness = 8
num_modes = 9
energy_range = 4
scoring = vinardo

```

- Se presionó ESC.
- Se escribió “:wq!”
- Se ejecutó Smina: “./smina.static --config config.inp --log LigandN_.log”
- Se presionó enter.
- Se transformó el archivo LigandN_out.pdbqt a LigandN_out.pdb con Open Babel.
 - “babel LigandN_out.pdbqt LigandN_out.pdb”.
- Se extrajo la mejor conformación del archive con PyMol.
 - Se abrió PyMol.
 - Se cargó LigandN_out.pdb.
 - Archivo [File].
 - Exportar Molécula... [Export Molecule...].
 - Estado 1 [State 1].
 - Guardar... [Save...]
 - Se escribió el nombre del archivo.
 - Nombre: bestposeSmina_LigandN_receptor.pdb
 - Se eligió el tipo del archivo.
 - Tipo: PDB (*.pdb *.pdb.gz).
 - Se buscó la carpeta de trabajo.
 - Se presionó Guardar.
- Se repitieron los pasos de la parte E para producir el Acoplamiento Molecular con Smina de todos los ligandos con el receptor.

F. Consenso Exponencial en el Orden de los resultados

- Se abrió una hoja de cálculo (Ej. Microsoft Excel).
- Se escribieron los resultados de las energías de interacción obtenidas por cada programa de acoplamiento Molecular.
- Se ordenaron los resultados de menor a mayor energía con la función “=RANK (Valor; Conjunto de datos; 1)”
 - Ej.: “=RANK(C3;C\$3:C\$12;1)”.
- Se escribió la fórmula para aplicar el Rank Consenso Exponencial (ECR):

$$P(i) = \sum_j \frac{e^{-\frac{r_i^j}{\sigma}}}{\sigma} r_i^j = \text{posición obtenida por el ligando } i \text{ con el programa } j; \sigma =$$

cantidad total de Ligandos a analizar; $P(i)$ =Rank consenso calculado para el ligando i .

- Ej.: “ $W3=(EXP(-(F3/COUNT(F\$3:F\$12))))/COUNT(F\$3:F\$12)$ ”.
- “ $ECR=SUM(W3:Y3)$ ”.

G. Consenso en la Pose de Acoplamiento Molecular

- Se movieron las mejores poses de cada Ligando por cada programa a una carpeta aparte.
- Se calculó el RMS con ADT.
 - “`compute_rms_between Conformations.py -f bestposeAD_Ligand${i}_receptor.pdb -s bestPoseADV_Ligand${i}_receptor.pdb`”
 - `compute_rms_between Conformations.py -f bestposeAD_Ligand${i}_receptor.pdb -s BestPoseSmina_Ligand${i}_receptor.pdb`
 - `compute_rms_between Conformations.py -f BestPoseADV_Ligand${i}_receptor.pdb -s BestPoseSmina_Ligand${i}_receptor.pdb`
- Se graficaron los resultados obtenidos.

ANEXO II

Cuadros de Datos Obtenidos del Acoplamiento Molecular

La codificación por colores muestra a las mejores puntuaciones receptor-ligando en verde y el cambio gradual hasta las desfavorables puntuaciones en rojo, respectivamente

Cuadro 10. Datos de la Energía de Interacción de los complejos receptor-ligando para la enfermedad de Alzheimer.

Código del Ligando	AutoDock 4 (kcal/mol)	AutoDock Vina (kcal/mol)	Smina (kcal/mol)
Curcumina	-4.95	-5.40	-6.60
Ligando 2	-5.36	-5.60	-8.60
Ligando 3	-5.40	-6.60	-9.20
Ligando 4	-5.14	-5.70	-8.60
Ligando 5	-3.70	-4.80	-6.30
Ligando 6	-4.48	-5.40	-6.30
Ligando 7	-4.76	-6.20	-6.00
Ligando 8	-5.19	-6.10	-6.20
Ligando 9	-4.98	-5.00	-5.40
Ligando 10	-5.83	-6.10	-5.70

Cuadro 11. Datos en RMS (Å) del Consenso en la pose de Acoplamiento Molecular del Péptido β -Amiloide como Modelo de Referencia en la enfermedad de Alzheimer.

Código del Ligando	AD-ADV (Å)	AD- S (Å)	ADV-S (Å)
Curcumina	9.22	5.58	6.85
Ligando 2	8.27	1.53	8.03
Ligando 3	6.40	1.22	6.54
Ligando 4	20.21	0.78	20.54
Ligando 5	7.78	21.52	24.26
Ligando 6	5.99	12.29	13.29
Ligando 7	10.96	4.42	12.11
Ligando 8	1.69	12.95	13.03
Ligando 9	12.02	11.07	13.17
Ligando 10	1.06	22.88	22.92

Cuadro 12. Datos de la Energía de Interacción de los complejos receptor–ligando para la enfermedad de Parkinson.

Código del Ligando	AutoDock 4 (kcal/mol)	AutoDock Vina (kcal/mol)	Smina (kcal/mol)
Curcumina	-5.10	-5.60	-5.10
Ligando 2	-5.34	-6.00	-6.40
Ligando 3	-5.92	-6.30	-4.70
Ligando 4	-5.16	-5.60	-6.40
Ligando 5	-3.51	-5.20	-5.60
Ligando 6	-4.36	-5.60	-5.50
Ligando 7	-3.83	-6.20	-4.80
Ligando 8	-4.77	-6.30	-5.40
Ligando 9	-4.39	-5.20	-4.70
Ligando 10	-5.48	-6.00	-5.90

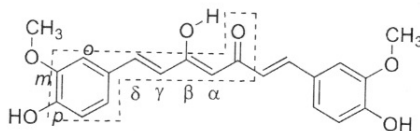
Cuadro 13. Datos en RMS (Å) del Consenso en la pose de Acoplamiento Molecular de la proteína α -Sinucleína en la enfermedad de Parkinson.

Código del Ligando	AD-ADV (Å)	AD- S (Å)	ADV-S (Å)
Curcumina	10.57	11.78	2.02
Ligando 2	9.28	27.21	31.39
Ligando 3	14.27	35.00	39.11
Ligando 4	12.89	16.36	12.76
Ligando 5	13.36	16.05	18.79
Ligando 6	12.30	24.65	14.82
Ligando 7	16.44	17.36	13.02
Ligando 8	10.70	13.87	15.92
Ligando 9	14.43	24.11	21.79
Ligando 10	15.79	46.77	43.00

ANEXO III

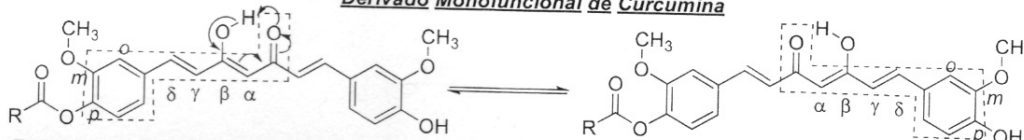
Cálculo Hipotético de la Longitud de Onda de Absorbancia Máxima de la Curcumina y sus Derivados

Curcumina



Base: Enona acíclica $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada	215 nm
Incrementos:	
-OH (β x1)	+30 nm
->C=C< extiende conjugación ($\gamma=\delta$ x1)	+30 nm
- Ph extiende conjugación (δ x1)	+60 nm
-O-Alquil ($\delta+$ <i>m-Ph</i> x1)	+31 nm
-OH ($\delta+$ <i>p-Ph</i> x1)	+50 nm
Total (calculado)	416 nm
λ_{MAX} (observado)	415 nm

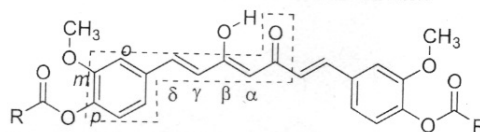
Derivado Monofuncional de Curcumina



Base: Enona acíclica $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada	215 nm	Base: Enona acíclica $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada	215 nm
Incrementos:		Incrementos:	
-OH (β x1)	+30 nm	-OH (β x1)	+30 nm
->C=C< extiende conjugación ($\gamma=\delta$ x1)	+30 nm	->C=C< extiende conjugación ($\gamma=\delta$ x1)	+30 nm
- Ph extiende conjugación (δ x1)	+60 nm	- Ph extiende conjugación (δ x1)	+60 nm
-O-Alquil ($\delta+$ <i>m-Ph</i> x1)	+31 nm	-O-Alquil ($\delta+$ <i>m-Ph</i> x1)	+31 nm
-O-Alquil ($\delta+$ <i>p-Ph</i> x1)	+31 nm	-OH ($\delta+$ <i>p-Ph</i> x1)	+50 nm
Total (calculado)	397 nm	Total (calculado)	416 nm
λ_{MAX} (observado)	408 nm	λ_{MAX} (observado)	408 nm

Observación: El promedio de las λ_{MAX} calculadas para 397 nm y 416 nm es 406.5 nm por lo que, tomando en cuenta el efecto de la tautomería del centro ceto-enólico, se podría considerar que la λ observada sea un valor intermedio a la predicción calculada para las dos estructuras por la rápida interconversión que hay entre ellas.

Derivado Bifuncional de Curcumina



Base: Enona acíclica $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada	215 nm
Incrementos:	
-OH (β x1)	+30 nm
->C=C< extiende conjugación ($\gamma=\delta$ x1)	+30 nm
- Ph extiende conjugación (δ x1)	+60 nm
-O-Alquil ($\delta+$ <i>m-Ph</i> x1)	+31 nm
-O-Alquil ($\delta+$ <i>p-Ph</i> x1)	+31 nm
Total (calculado)	397 nm
λ_{MAX} (observado)	397 nm