



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**Diseño y evaluación de derivados de la curcumina con actividad inhibitoria de la
acetilcolinesterasa**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Verónica Tello Franco



TUTOR: Dr. Manuel Soriano García

AÑO:2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Manuel Soriano García

Dra. Concepción Lozada García

Dr. Enrique García, Dr. Ricardo Reyes, Mtra. Olivia Soria

Beca para estudios de Doctorado del CONACYT 163598

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 2 de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

El presente trabajo fue presentado en:

Cartel: Diseño de derivados de la curcumina con actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa.
VIII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, Noviembre 2009.
Simposio Interno del Instituto de Química, 2009

Cartel: A pharmacophore for acetylcholinesterase inhibition using curcumin derivatives
32nd Annual National Medicinal Chemistry Symposium, ACS. Junio 2010, Universidad de
Minnesota, E.U.A.

Ponencia oral: Inhibición de la acetilcolinesterasa por curcumina y sus derivados
QuimiUNAM 2010, Noviembre 2010.
Simposio Interno del Instituto de Química, 2010

Los resultados obtenidos de este trabajo serán publicados en:

Tello-Franco V, Lozada-García MC, Soriano-García M. Experimental and Computational Studies on the Inhibition of Acetylcholinesterase by Curcumin and some of its Derivatives. *Current Computer-Aided Drug Design*. En prensa 2012.

ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterasa
AChEEe	Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i>
AChETc	Acetilcolinesterasa de <i>Torpedo californica</i>
AcPH	Aceptor de puente de hidrógeno
AcOEt	Acetato de etilo
AINE	Antiinflamatorio no esteroideos
β A	Péptido β amiloide
CCF	Cromatografía en capa fina
CI _n	Concentración a la cual se inhibe el n% de la actividad enzimática
DonPH	Donador de puente de hidrógeno
DSS	Dodecil sulfato de sodio
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
EA	Enfermedad de Alzheimer
IACE	Inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa
logP	logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua
PPA	Proteína precursora amiloide
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
rmsd	Desviación de la raíz media cuadrática, por sus siglas en inglés
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa y multifactorial. Debido a su complejidad, aún no han podido identificarse de manera definitiva sus causas ni existe una cura para la misma. Estudios recientes han demostrado que la curcumina posee diversas actividades biológicas con potencial interés terapéutico contra esta enfermedad, entre ellas la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). A fin de identificar las características químicas relevantes para la actividad inhibitoria, un conjunto de derivados de curcumina fue sintetizado y su capacidad de inhibición fue probada mediante un ensayo enzimático *in vitro*, realizándose posteriores estudios de acoplamiento molecular y la generación de un modelo farmacofórico para las moléculas con actividad inhibitoria. A partir de la información obtenida se propuso un nuevo conjunto de derivados de curcumina que incluyeron las características identificadas como relevantes: hidrofobicidad, presencia de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno, de un momento dipolar y de un nitrógeno protonable. Su posible actividad inhibitoria fue evaluada mediante estudios de acoplamiento molecular y del modelo farmacofórico.

Los derivados probados experimentalmente presentaron una actividad inhibitoria ante la AChE menor que la curcumina, indicando posibles características desfavorables tales como la ausencia de donadores de puentes de hidrógeno ya sea en la parte media o en los anillos aromáticos de las moléculas, o el aumento en la flexibilidad en los derivados de tetrahidrocurcumina. El complejo curcumina-AChE fue estudiado por métodos espectroscópicos, sugiriendo la presencia de interacciones tanto con el sitio activo como con el sitio periférico de la hendidura del sitio activo. Se elaboró un listado de inhibidores conocidos de la AChE, calculándose un conjunto de descriptores y estableciendo sus valores deseables. Se realizaron cálculos de acoplamiento molecular de los derivados de curcumina con actividad inhibitoria con el sitio activo de la AChE, analizándose la formación de puentes de hidrógeno así como otras interacciones relevantes. Se encontró que dichas moléculas pueden formar puentes de hidrógeno con los sitios cuaternario y de unión a acilo, mientras que se observaron contactos cercanos con los sitios cuaternario y periférico. A fin de explicar mejor la actividad inhibitoria, se buscó definir las características comunes entre inhibidores de acetilcolinesterasa conocidos y los derivados probados mediante la generación de un modelo de un farmacóforo. El resultado consistió de dos zonas hidrofóbicas, una aromática y un aceptor de puentes de hidrógeno. Al incorporar las características encontradas como relacionadas a la actividad inhibitoria, se diseñó un conjunto de derivados de curcumina, se calcularon sus descriptores, y se seleccionaron aquellos cuyos valores cumplieran con los rangos previamente establecidos. Para estas 31 moléculas se llevaron a cabo ensayos de acoplamiento molecular, analizándose los puentes de hidrógeno y los contactos con los aminoácidos aromáticos, así como la evaluación mediante el modelo farmacofórico previamente generado. Esto condujo a proponer 6 derivados de curcumina con potencial actividad inhibitoria contra la AChE superior a la de la curcumina.

ABSTRACT

Alzheimer's is a neurodegenerative and multifactorial disease. Due to its complexity, its causes have not yet been thoroughly identified, nor has its cure been found. Recent studies have demonstrated several biological activities of curcumin with therapeutic potential against Alzheimer's disease, among them the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). Aiming at identifying the chemical features relevant for this activity, a set of curcumin derivatives was synthesized, tested for its inhibitory activity against AChE, and molecular docking studies and pharmacophore characterization were carried out for the active molecules. A number of curcumin derivatives that incorporate desirable characteristics were then proposed, and their potential inhibitory activity was evaluated by molecular docking and pharmacophore studies.

The tested derivatives presented lower activity than curcumin, allowing for the identification of possible unfavorable characteristics, such as the absence of hydrogen bond donors either in the middle of the molecule or on the aromatic rings, or the increase in flexibility in tetrahydrocurcumin derivatives. The curcumin-AChE complex was studied by spectroscopic techniques in order to gain insight into its chemical nature. Indications of interaction with both the active and peripheral sites of the enzyme were found. A list of acetylcholinesterase inhibitors was elaborated, and a set of descriptors was calculated in order to define desirable values that would help us understand and predict their activity. The molecules were then docked to the active site of AChE, and an analysis of hydrogen bonds and close contacts to relevant aromatic amino acid residues was performed, allowing for the identification of relevant interactions. Hydrogen bonds can be formed with the quaternary and acyl sites, while close contacts are formed with both the quaternary and peripheral sites. To account for inhibitory activity, we sought to define the common structural features between known acetylcholinesterase inhibitors and the tested derivatives by generating a pharmacophore model. It consisted of two hydrophobic, one aromatic and one hydrogen bond acceptor features. Incorporating the characteristics found to be related to inhibitory activity, a group of curcumin derivatives was designed, their descriptors were calculated and those meeting the pre-established values were selected. Docking studies were performed for these 31 molecules, and hydrogen bonds and close contacts were analyzed. The molecules were also evaluated with the previously generated pharmacophore model. This allows us to propose 6 curcumin derivatives most likely to have superior activity than curcumin as acetylcholinesterase inhibitors.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	
1.1. La enfermedad de Alzheimer	
1.1.1. Patología general	1
1.1.2. La acetilcolinesterasa	2
1.1.3. Inhibición de la acetilcolinesterasa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	4
1.2. La curcumina	4
1.2.1. La curcumina y la enfermedad de Alzheimer	5
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo general	6
3.2. Objetivos específicos.....	6
4. METODOLOGÍA	
4.1. Parte Química	
4.1.1. Síntesis de curcumina y sus derivados	7
4.2. Parte Biológica	
4.2.1. Inhibición de la acetilcolinesterasa	8
4.2.2. Fluorescencia y Dicroísmo Circular	
4.2.2.1. Fluorescencia.....	10
4.2.2.2. Dicroísmo Circular	10
4.3. Parte Computacional	
4.3.1. Descriptores moleculares	11
4.3.2. Estudios de acoplamiento molecular.....	11
4.3.3. Modelo farmacofórico.....	12
4.3.4. Diseño de derivados de curcumina.....	13
4.3.5. Evaluación de derivados diseñados.....	14
5. RESULTADOS	
5.1. Parte Química	
5.1.1. Síntesis de curcumina y sus derivados	15
5.2. Parte Biológica	
5.2.1. Inhibición de la acetilcolinesterasa	15
5.2.2. Fluorescencia y Dicroísmo Circular	
5.2.2.1. Fluorescencia.....	19
5.2.2.2. Dicroísmo Circular	20
5.3. Parte Computacional	

5.3.1. Descriptores moleculares	21
5.3.2. Estudios de acoplamiento molecular.....	22
5.3.3. Modelo farmacofórico.....	28
5.3.4. Diseño y evaluación computacional de derivados de curcumina.....	33
6. CONCLUSIONES	47
7. BIBLIOGRAFÍA.....	49
8. ANEXOS	
8.1. Espectros	54
8.2 Conjuntos de entrenamiento, prueba y no IACE.....	65
8.3. Métodos computacionales	
8.3.1. Descriptores moleculares	
8.3.1.1. Cálculo de pKa	72
8.3.1.2. Cálculo de logP	73
8.3.2. Acoplamiento molecular	
8.3.2.1. Algoritmos genéticos.....	74
8.3.2.2. AutoDock4	75
8.3.2.3. GOLD.....	76
8.3.3. Modelo farmacofórico	
8.3.3.1. Generación de conformaciones	78
8.3.3.2. Generación del modelo farmacofórico	79
8.3.3.3. Búsqueda de bases de datos	80
8.3.4. Referencias	80
8.4 Copia del manuscrito aceptado.....	82

1. ANTECEDENTES

1.1. La enfermedad de Alzheimer

En México, cerca de 600 mil personas padecen de la enfermedad de Alzheimer¹ (EA), y se espera que el número aumente conforme lo haga la expectativa de vida en nuestro país. La EA fue reportada por primera vez en 1906 por Alois Alzheimer², y se describe como una enfermedad cerebral irreversible y progresiva, que destruye lentamente la memoria y las habilidades cognitivas del paciente. El diagnóstico de Alzheimer se basa en el deterioro cognitivo no atribuible a otro tipo de demencias, mientras que el diagnóstico definitivo de la enfermedad puede hacerse únicamente *post mortem*, confirmando la presencia de las lesiones características en el tejido cerebral³.

1.1.1. Patología general

Actualmente no se conocen con certeza las causas de la EA, pero se cree que se debe a una mezcla de factores genéticos, ambientales y de estilo de vida. La hipótesis amiloide es, hasta el momento, la más ampliamente aceptada para explicar el inicio y la progresión de la EA, vinculando la aparición de las dos lesiones características ya descritas por Alois Alzheimer: los ovillos neurofibrilares intraneuronales y las placas amiloides extracelulares.

La hipótesis amiloide propone que un procesamiento anormal de la proteína precursora amiloide (PPA) en la membrana neuronal, genera una mayor cantidad de péptidos de 40 ó 42 aminoácidos llamados péptidos β amiloides (β A). Al ser excretados por la célula, tienden a agregarse formando oligómeros y, posteriormente, las llamadas placas neuríticas. Su presencia genera una respuesta inflamatoria, con liberación de radicales libres, que produce daño celular y pérdida de la homeostasis. Esto promueve la pérdida de funcionalidad de la proteína τ , la cual es hiperfosforilada y se agrega formando los ovillos neurofibrilares. Esto resulta en una desestabilización de los microtúbulos, afectando el transporte celular. La conjunción de estos eventos lleva eventualmente a la muerte neuronal⁴⁻⁶.

Los estudios de las formas hereditarias de Alzheimer han indicado un vínculo entre mutaciones en ciertos genes y una mayor incidencia de la enfermedad. Por ello otras teorías proponen distintos mecanismos generadores de la enfermedad, como el incorrecto funcionamiento del complejo de la presenilina en la membrana neuronal⁷, o de la apolipoproteína

E⁸. En ambos casos la homeostasis de la membrana neuronal se vería afectada, desencadenando eventos que afectarían a la proteína τ y a la PPA, generando finalmente los mismos daños antes mencionados. Tal diversidad de posibles mecanismos involucrados implica la posibilidad de elegir entre un amplio rango de blancos o dianas terapéuticas. Por una parte, se busca influir en el procesamiento anormal de la PPA, inhibir la agregación del péptido β A o promover su mayor degradación. Otras alternativas importantes son: la estabilización de los microtúbulos, la inhibición de la agregación de la proteína τ o la regulación de su fosforilación. Finalmente, se plantea la posibilidad de ayudar a mantener la homeostasis neuronal mediante la administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), de fármacos que ayuden a modular el metabolismo del colesterol, de antioxidantes o de quelantes^{9,10}.

Todas estas alternativas se encuentran en estudio, algunas con moléculas en Fase III de pruebas clínicas¹¹. Sin embargo, actualmente se cuenta únicamente con tratamiento sintomático para la enfermedad. Tal es el caso de los inhibidores de la acetilcolinesterasa, los cuales mejoran la capacidad cognitiva del paciente al mejorar la sinapsis colinérgica.

1.1.2. La acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima que cataliza la degradación del neurotransmisor acetilcolina a colina y ácido acético¹². Pertenece a la superfamilia de las α/β hidrolasas, con un plegamiento altamente conservado y con considerable homología en sus secuencias, incluso entre insectos y mamíferos¹³. Las acetilcolinesterasas de los organismos marinos *Torpedo* y *Electrophorus* han sido las más ampliamente estudiadas, debido a la alta abundancia en sus órganos eléctricos¹². Por ello, en este trabajo se utilizará como referencia a la acetilcolinesterasa de *Torpedo californica* (AChETc), y se usará la numeración de aminoácidos de la misma.

El monómero de AChETc consiste de 537 aminoácidos, posee forma elipsoidal y dimensiones de 45 x 60 x 65 Å (Figura 1). El sitio activo, de tipo proteasa serínica, está formado por los residuos de aminoácidos Ser200, Glu327 y His440 y se encuentra en el fondo de una hendidura angosta de aproximadamente 20 Å de longitud¹⁴. La proteína posee una distribución asimétrica de carga, que genera un dipolo^a a lo largo de la cavidad del sitio activo. Se propone que la presencia de este dipolo ayuda a una difusión eficiente del sustrato a lo largo de la

^a Los autores refieren que si bien el concepto de momento dipolar se define formalmente sólo para una entidad eléctricamente neutra, es de utilidad calcular los momentos dipolares o “primeras derivadas de distribución de carga dependientes de la posición” de moléculas orientadas de manera consistente en un sistema común de coordenadas a fin de medir la homogeneidad de su distribución de cargas atómicas parciales.

hendidura¹⁵. En el fondo de la hendidura y adyacente a la triada catalítica, se localizan los aminoácidos Gly118, Gly119 y Ala201, que forman el llamado sitio oxianión. Éste estabiliza los intermediarios tetraédricos del sustrato durante el proceso de hidrólisis. Los aminoácidos Trp84, Glu199 y Phe330 forman el sitio cuaternario, el cuál estabiliza al nitrógeno cuaternario de la colina mediante interacciones tipo π -catión. Por su parte, la función acetilo del sustrato interactúa con los aminoácidos aromáticos Trp233, Phe288, Phe290 y Phe331¹⁶. Un segundo sitio para la unión transitoria del sustrato se encuentra en la parte superior de la hendidura del sitio activo y está formada por los aminoácidos aromáticos Tyr70, Tyr121 y Trp279¹⁷. Este sitio está rodeado por 10 aminoácidos de naturaleza ácida, que componen el llamado “motivo anular electrostático”¹⁵. Se postula que este sitio periférico es el responsable de las funciones no clásicas de la AChE: promoción del crecimiento de neuritas y neuromodulación¹⁸.

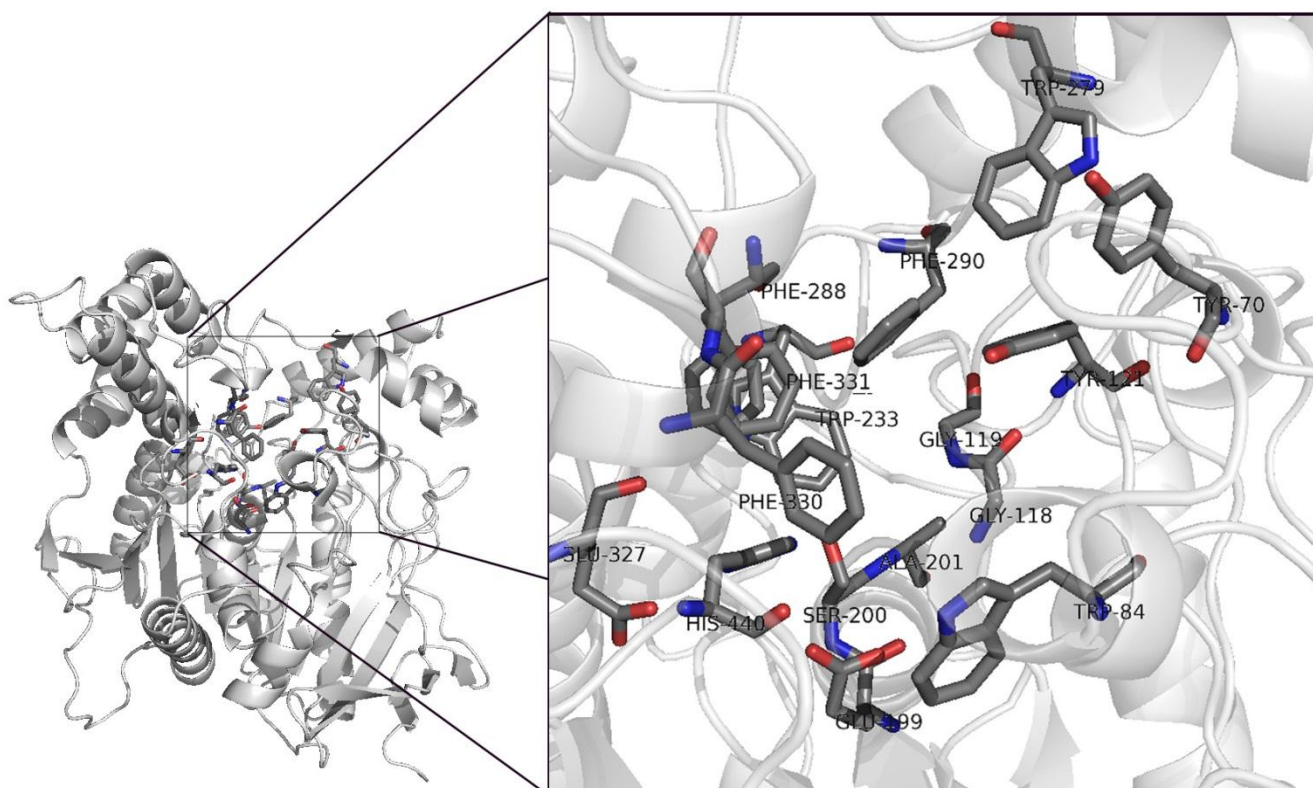


Figura 1. Estructura tridimensional de la AChETc (PDB 1EVE). Los aminoácidos relevantes se muestran en la ampliación como líneas

La AChE puede formar distintos tipos de oligómeros. El dominio catalítico es siempre constante en todas las isoformas, siendo el extremo C-terminal el que define el arreglo cuaternario de la proteína. Ésta puede encontrarse en sus formas monomérica, homodimérica y homotetramérica, y ya sea soluble o unida a membrana. La distribución de los oligómeros

depende del tejido en que ésta se exprese, pudiendo ser las neuronas colinérgicas de la unión neuromuscular o del sistema nervioso central¹⁸.

1.1.3. Inhibición de la acetilcolinesterasa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

La acetilcolinesterasa se localiza en la membrana de las neuronas postsinápticas, donde degrada al neurotransmisor acetilcolina después que este ha interactuado con sus correspondientes receptores, y termina así el impulso nervioso. La teoría colinérgica para el tratamiento de la EA se basa en la observación de la degeneración aparentemente selectiva de neuronas colinérgicas en las etapas iniciales de la enfermedad^{19,20}. Al tratar de potenciar la actividad de las neuronas colinérgicas de manera farmacológica, se busca mejorar la capacidad cognitiva de los pacientes. La disponibilidad de colina puede aumentarse mediante un incremento en su liberación, en su resorción o una disminución en su degradación²⁰. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa presentan este último mecanismo, e incluyen a tres de los cuatro fármacos aprobados actualmente por la Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU. para el tratamiento del Alzheimer³.

1.2. La curcumina

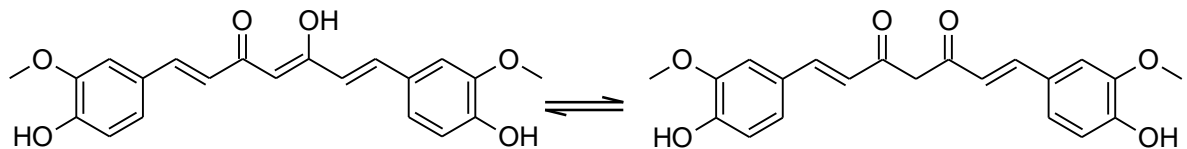


Figura 2 Equilibrio tautomérico de la curcumina

La curcumina (Figura 2) es una β -dicetona α,β -insaturada, que puede existir en su forma diceto o en la forma enólica, siendo esta última la que se presenta mayoritariamente en solución²¹. La curcumina es un metabolito secundario de *Curcuma longa*, planta que ha sido utilizada en la medicina tradicional asiática durante siglos para el tratamiento de torceduras, inflamación, dolor abdominal, desórdenes biliares y hepáticos, entre otras aplicaciones²². La curcumina es uno de los componentes principales de la cúrcuma, y responsable de su coloración amarilla²³. El consumo cotidiano de esta especia en los países asiáticos es un buen indicativo de la inocuidad de esta sustancia, la cual se ha comprobado en ensayos clínicos en los que dosis de hasta 8 g/día durante 4 meses, o de 12 g en una sola toma, no se presentan síntomas de

toxicidad²⁴. Estudios farmacológicos actuales han demostrado diversas actividades de la curcumina, como son: antiinflamatoria^{22,25}, anticancerígena^{26,27}, antioxidante²⁸, quelante²⁹, hipolipémica³⁰ y anticoagulante³¹.

1.2.1. La curcumina y la enfermedad de Alzheimer

Se ha demostrado que la curcumina protege a las células neuronales contra la toxicidad generada por el péptido βA ³², inhibe la formación de nuevas fibras y desestabiliza las ya existentes *in vitro*³³. Adicionalmente, se ha comprobado en modelos murinos de la enfermedad, que la curcumina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, inhibir la agregación de dicho péptido al tiempo que promueve su desagregación *in vivo*^{34,35}, y de disminuir el daño oxidativo e inflamatorio³⁶. Por otra parte, los derivados de pirazol e isoxazol de la curcumina inhiben a la enzima γ -secretasa, mientras que los derivados de pirazol interactúan también con la proteína τ ³⁷. Finalmente, la curcumina puede inhibir a la enzima acetilcolinesterasa y tener efectos positivos en amnesia inducida por escopolamina, si bien su afinidad por la AChE es baja³⁸. Esto revela a la curcumina como un potencial agente terapéutico contra la EA, pues su acción puede incidir en distintos factores asociados con la enfermedad tanto a niveles sintomáticos como de prevención de la enfermedad. Resulta por ello de interés el estudio de la interacción entre la curcumina y la enzima acetilcolinesterasa, a fin de identificar los factores fisicoquímicos y estructurales que guían el reconocimiento entre estas moléculas. Esta información será utilizada en el diseño de nuevos derivados de la curcumina que presenten una mayor afinidad por la enzima, buscando así potenciar su acción inhibitoria.

2. HIPÓTESIS

Mediante modificaciones estructurales a la curcumina es posible potenciar su capacidad inhibitoria para la acetilcolinesterasa.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Diseñar mediante métodos computacionales derivados de la curcumina como inhibidores potenciales de la acetilcolinesterasa. Evaluar mediante métodos computacionales y bioquímicos su posible actividad biológica.

3.2. Objetivos específicos

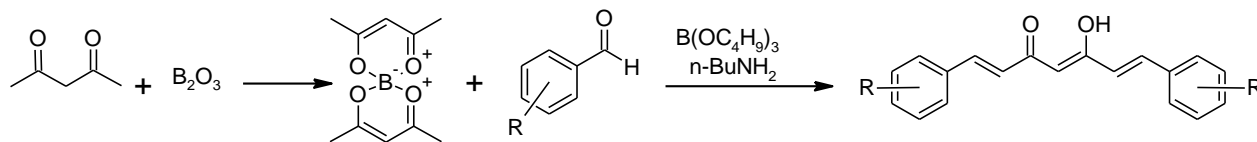
- Verificar experimentalmente el modo de unión del complejo curcumina-acetilcolinesterasa.
- Mediante ensayos bioquímicos probar la actividad inhibitoria de la curcumina y sus derivados sobre la enzima acetilcolinesterasa.
- Diseñar un conjunto de moléculas derivadas de la curcumina.
- Mediante métodos computacionales, evaluar la presencia de características fisicoquímicas deseables (momento dipolar, pKa, logP, presencia de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno) en las moléculas propuestas.
- Evaluar la posibilidad de inhibición sobre la acetilcolinesterasa de las moléculas propuestas mediante estudios de acoplamiento molecular con ligando flexible y mediante la evaluación con un modelo farmacofórico.

4. METODOLOGÍA

4.1. Parte Química

4.1.1. Síntesis de curcumina y sus derivados

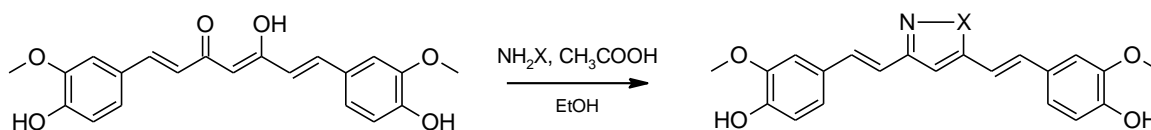
Se buscó contar con un conjunto de derivados de la curcumina con variaciones en distintos grupos funcionales: presencia y ausencia de la función hidroxilo, presencia y ausencia de la función ceto-enol, reducción de los dobles enlaces y cambio en la longitud de la molécula. La curcumina y el derivado **9** (ver Figura 3) fueron sintetizados siguiendo una metodología previamente publicada³⁹ (ver Esquema 1). En un matraz se colocaron 10 mmol de vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) o 3,4-dimetoxibenzaldehído, respectivamente, con 20 mmol de $B(OBu)_3$ en acetato de etilo seco. Por otra parte, se mezclaron 5 mmol de acetilacetona y 3.5 mmol de B_2O_3 , y se agregaron al matraz de reacción. Tras agitar a temperatura ambiente durante 20 min, se agregaron 150 μ l de butilamina gota a gota durante 30 min. La mezcla se llevó a reflujo y la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina analítica (CCF). Tras 24 h se enfrió la mezcla de reacción, se agitó con 10 mL de HCl 0.4 M durante 2 h y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó nuevamente con HCl al 20%, se trató con Na_2SO_4 y se evaporó. El residuo se recrystalizó en acetona/MeOH, se filtró al vacío y se lavó con MeOH frío. Los compuestos se identificaron por sus puntos de fusión y por sus espectros de masas y RMN de 1H y ^{13}C .



Esquema 1. Síntesis de la curcumina y del derivado **9**

Los derivados **3** y **6** se sintetizaron de acuerdo a una metodología previamente publicada⁴⁰ (ver Esquema 2). Se colocaron 2 mmol de curcumina y 2 mmol de $NH_2NH_2 \cdot H_2O$ o $NH_2OH \cdot HCl$ respectivamente en 15 mL de ácido acético y 10 mL de EtOH a reflujo durante 24 h. La reacción se monitoreó por CCF. Se agregaron 30 mL de agua y se agitó toda la noche. Tras sonicar la solución durante 12 min tres veces y filtrar el precipitado, se recrystalizó en MeOH/agua y se lavó con MeOH frío. Los compuestos se identificaron por su punto de fusión y por sus espectros de masas y RMN de 1H . Los derivados **2, 4, 5, 7, 8, 10-12** fueron facilitados por la Dra. Concepción

Lozada, del Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco, sintetizados en el Laboratorio de Síntesis Orgánica según metodologías previamente publicadas^{39,41}.



Esquema 2. Síntesis de los derivados de curcumina **3** y **6**

4.2. Parte Biológica

4.2.1. Inhibición de la acetilcolinesterasa

Se adquirió la enzima AChE de *Electrophorus electricus* (C3389) de Sigma. Se verificó su pureza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-DSS al 12%, en condiciones desnaturalizantes (6M de guanidina y 1% TCEP). El peso molecular fue calculado con el programa Quantity One de Bio-Rad. Como estándares se utilizaron los inhibidores tacrina (clorhidrato de 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina) de Sigma (A79922) y galantamina, donativo del Dr. Ricardo Reyes Chilpa del Instituto de Química, UNAM. Para la medición de inhibición enzimática se adaptó una metodología previamente publicada⁴², probándose dos condiciones distintas (ver Tabla 1). En una microplaca, se agregaron 120 μL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 8, 10 μL de solución enzimática 2.5 o 0.25 U/mL en el mismo buffer y 10 μL de los inhibidores en EtOH, MeOH o DMSO a distintas concentraciones. Tras incubar durante 30 min a temperatura ambiente se agregaron 50 μL de yoduro de acetiltiocolina 3mM (A5751 de Sigma) y 10 μL de DTNB 10 mM (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), D8130 de Sigma). Se obtuvieron los valores de absorbancia tras 2 y 10 min respectivamente en un lector ELx808 de Bio-Tek Instruments a 405 nm. Los cálculos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v. 5.04 (GraphPad Software, San Diego, EUA) ajustando la curva $\log[\text{inhibidor}]$ vs absorbancia mediante una regresión no lineal de cuatro parámetros. Se obtuvieron valores para las CI_{50} y CI_{25} y sus intervalos de confianza al 95%.

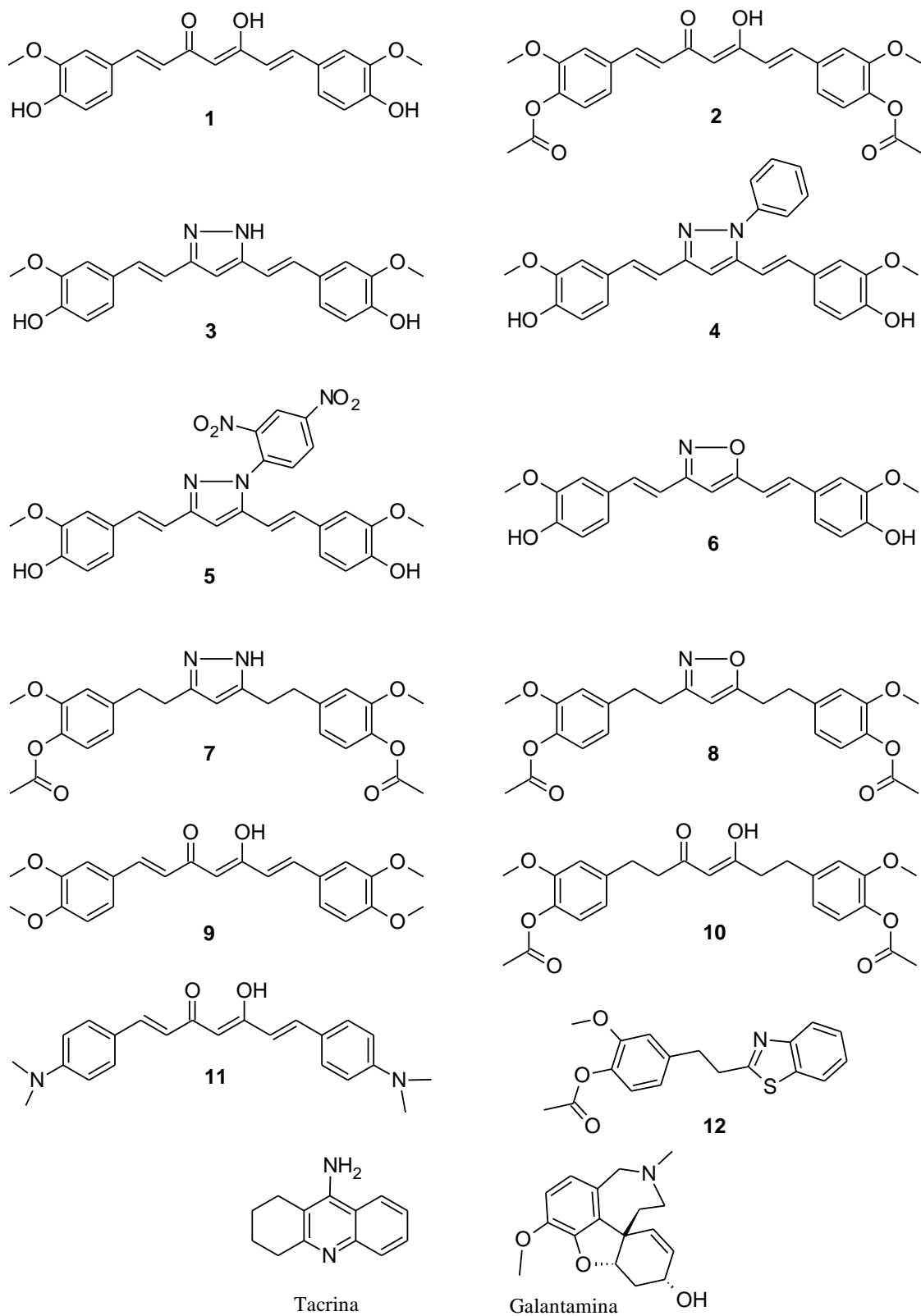


Figura 3. Estructuras de la curcumina (1), sus derivados probados, (2-12) e inhibidores de la acetilcolinesterasa usados como referencia

Tabla 1. Condiciones para el ensayo de inhibición enzimática

	I	II
AChEEe	10 µl, 2.5 U/mL	10 µl, 0.25 U/mL
Inhibidor	10 µl	10 µl
DTNB	10 µl, 10 mM	10 µl, 10 mM
Acetilcolina	50 µl, 3 mM	50 µl, 3 mM
tiempo	2 min	10 min

4.2.2. Fluorescencia y Dicroísmo Circular

4.2.2.1. Fluorescencia

Se incubaron durante 30 min alícuotas de AChEEe con los inhibidores tacrina, galantamina y curcumina a fin de obtener concentraciones finales de 17 U/mL (25 mg/L) de proteína con cantidades correspondientes a la CI_{50} previamente calculada de los inhibidores. Se monitorearon los cambios en los espectros de emisión de fluorescencia de la enzima y de la enzima en presencia de los inhibidores a dos longitudes de onda de excitación: 280 y 290 nm en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5000U a temperatura ambiente. Se agregó una segunda alícuota de los inhibidores a fin de alcanzar aproximadamente una concentración equivalente a $2CI_{50}$ y se repitieron las lecturas.

4.2.2.2. Dicroísmo Circular

Se incubaron durante 60 min alícuotas de AChEEe con los inhibidores tacrina y curcumina a fin de obtener concentraciones finales de 233 U/mL (0.34 mg/mL) de proteína y 100 µM de tacrina así como 400 µM de curcumina. Los espectros de dicroísmo circular de la enzima y de la enzima en presencia de los inhibidores se monitorearon entre 250-400 nm en un espectropolarímetro Jasco J-715 a 25 °C, a fin de observar los cambios en la señal de los aminoácidos aromáticos inducidos por la presencia de los inhibidores. La elipticidad observada fue transformada a elipticidad molar mediante la fórmula:

$$[\theta] = \frac{100\theta_{obs}}{cl}$$

donde c es la concentración molar de la enzima y l es la longitud de paso de luz en cm.

4.3. Parte Computacional

4.3.1. Descriptores moleculares

Un factor importante a ser considerado en el diseño de un fármaco es su biodisponibilidad. Ésta se ve influenciada tanto por el estado de ionización como por la lipofilidad de las moléculas. Estas propiedades pueden predecirse computacionalmente mediante el cálculo de sus valores de pKa y de logP respectivamente (ver Anexo 8.3.1.). En nuestro caso, se realizó una búsqueda bibliográfica de los valores de pKa y logP determinados de manera experimental para inhibidores de acetilcolinesterasa (IACE) conocidos y para la curcumina y sus derivados. Posteriormente se realizó la predicción de ambos descriptores con 3 programas distintos para el pKa y 14 programas para el logP. Tras comparar su desempeño en términos relativos entre las series de la misma naturaleza, se seleccionaron el servidor en línea SPARC⁴³ (SPARC Performs Automated Reasoning in Chemistry, <http://archemcalc.com/sparc/>) para la predicción de pKa y el programa MlogP⁴⁴ disponible vía el servidor VCCLab⁴⁵ (Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org>) para la predicción de logP de los derivados de curcumina probados y de las moléculas diseñadas. El peso molecular, y el número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno se calcularon con el programa en línea Marvin 5.1.5, 2009 (ChemAxon <http://www.chemaxon.com>). Las moléculas fueron modeladas tridimensionalmente a partir de la estructura cristalográfica de la curcumina⁴⁶, que presenta el tautómero ceto-enólico. La geometría fue optimizada en tres pasos consecutivos con tres niveles de teoría distintos con Gaussian03⁴⁷ (Gaussian Inc., Wallingford EUA): PM3, B3LYP/3-21G y B3LYP/6-31G(d,p), tras comprobarse que esta secuencia de pasos redujo el tiempo de cómputo y permitió obtener estructuras isoenergéticas con respecto a una única optimización con el más alto nivel de teoría. De este cálculo se obtuvieron los momentos dipolares y las estructuras optimizadas, las cuales fueron utilizadas en la realización de los estudios subsecuentes.

4.3.2. Estudios de acoplamiento molecular

Se realizaron cálculos de acoplamiento molecular (docking) de la curcumina y sus derivados probados con la AChE mediante dos programas: AutoDock4.0 y GOLD 4.1.1⁴⁸, manteniendo rígido el receptor y sin restricciones en la flexibilidad de los ligandos. Las conformaciones de inicio de la curcumina y sus derivados fueron aquellas obtenidas en la sección 4.3.1. Se

seleccionó la estructura de AChE de *T. californica* con el inhibidor donepecilo⁴⁹ (PDB: 1EVE), pues en ella la Phe330 se encuentra en su conformación abierta y permite la interacción del inhibidor tanto con el sitio periférico como con el sitio activo. La numeración usada a lo largo del trabajo corresponde con dicha estructura. Se conservaron las moléculas de agua a 5 Å de los aminoácidos del sitio activo, eliminando el resto. Se agregaron y optimizaron los hidrógenos simulando un pH de 7.4 con el servidor PDB2PQR⁵⁰. En AutoDock4 se utilizaron los siguientes parámetros: algoritmo genético de Lamarck con generación de 100 conformaciones, 250,000 evaluaciones, población inicial de 50 individuos, clustering de 2.0 Å. La red se centró en Tyr121\OH con 50x50x40 puntos, con espaciado y el resto de los parámetros por defecto. Se permitió la libre rotación de todos los enlaces rotables en los ligandos. Mediante AutoDockTools 1.5.2⁵¹ se calcularon los puentes de hidrógeno y los contactos cercanos con los aminoácidos aromáticos del sitio activo para la conformación de menor energía del cluster de mayor población de cada molécula. En GOLD se utilizó un algoritmo genético con una población inicial de 100 individuos, 100,000 operaciones máximas, clustering de 2.0 Å y la posibilidad de rotar y encender/apagar las moléculas de agua. El sitio activo se centró en Tyr121\OH con un radio de 15 Å y fueron incluidas 19 aguas cristalográficas. Se utilizaron las funciones de evaluación ChemScore y GoldScore, analizando los puentes de hidrógeno y contactos cercanos de la conformación de menor energía para el clúster de mayor población de cada ligando con el programa Hermes 1.3.1. En ambos casos se definió un contacto como cercano cuando la distancia entre átomos \leq suma de sus radios de van der Waals.

4.3.3. Modelo farmacofórico

Se recopiló una base de datos de compuestos con actividad inhibitoria contra la AChEEe previamente publicada⁵²⁻⁵⁸ (ver Anexo 8.2), y diseñados para unirse tanto al sitio activo como al periférico de la AChE. Se añadieron la curcumina y los derivados **2-8** y **12**. Se calcularon los valores de pKa de los grupos protonables con el programa SPARC, y se ajustó el estado de protonación de las moléculas a un pH de 8. Se generaron las estructuras tridimensionales para todas las moléculas y se optimizaron con PM3 en Gaussian03. Se seleccionó de manera aleatoria al conjunto de entrenamiento, formado por 26 compuestos que incluyeron a la curcumina, y a los derivados **2** y **7**. Con el programa AutoDock4.0⁵⁹ se realizaron cálculos de acoplamiento molecular para el conjunto de entrenamiento. Se utilizaron los parámetros definidos en la sección 4.3.2, obteniéndose 100 conformaciones para cada molécula. Para el resto de las moléculas (el

conjunto de prueba), se generó una biblioteca de confórmeros usando el módulo “Conformational Import” en el programa MOE 2009.10 (Chemical Computing Group Inc., Montreal Canadá) con el campo de fuerza MMFF94x. Mediante el módulo “Pharmacophore Elucidator”, se obtuvo una serie de modelos farmacofóricos usando los siguientes parámetros (ver Anexo 8.3.3.2): un máximo de 5 características incluyendo hidrofóbicas, aromáticas, aceptor y donador de puente de hidrógeno, catiónicas; una cobertura 80%, actividad $-\log CI_{50} > 2.0$, espaciado de características=1.5 y agrupación de características=1.25. Con el fin de elucidar el posible efecto de la presencia de las cargas en las conformaciones obtenidas y por ende en el modelo farmacofórico final, se realizó el mismo procedimiento para el conjunto de entrenamiento con y sin el ajuste al estado de protonación. De acuerdo al número y naturaleza de características encontradas, se generaron cuatro tipos de modelos farmacofóricos. Se seleccionó el mejor modelo de cada tipo, y se verificó su desempeño contra el conjunto de prueba y con un conjunto con 11 fármacos con distintas indicaciones (moléculas no-IACE) mediante el módulo Pharmacophore Search de MOE. Adicionalmente, se realizó un análisis discriminante lineal con SPSS Statistics (IBM, Chicago IL, EUA), a fin de analizar la capacidad de cada modelo farmacofórico de reconocer la actividad (1) o falta de actividad (0) de cada molécula. Se seleccionó el modelo farmacofórico que proporcionó una descripción general de los IACE que incluyese a los derivados de curcumina y discriminase al mayor número de moléculas con distintas indicaciones terapéuticas.

4.3.4. Diseño de derivados de curcumina

De acuerdo a los resultados obtenidos, y a fin de tener mayor similitud con los IACE reportados, se planteó incorporar a la curcumina un grupo funcional de tipo amina. Las modificaciones se realizaron en dos sitios: el anillo aromático y la función β -dicetona. Se buscaron hacer sustituciones de tipo bioisostérico para la función dicetona mediante el programa BROOD 1.1.1 (OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, EUA). Se generó un listado de bases de posible interés y se seleccionaron de acuerdo a su pKa experimental, tomado de: pKa Data Compiled by R. Williams. http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa_compilation.pdf (Acceso 5 de marzo, 2012), y SciFinder Scholar 2007 (Chemical Abstracts Service, Columbus, OH, EUA). Para aquellas funciones cuyo pKa no estaba reportado, éste fue calculado con el programa SPARC. Las funciones seleccionadas fueron sustituidas en los sitios de interés del esqueleto de la curcumina.

4.3.5. Evaluación de derivados diseñados

Con los programas mencionados en la sección 5.4., se calcularon los siguientes descriptores para los derivados de curcumina propuestos: pKa, logP, peso molecular, número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, momento dipolar y distribución de carga. Se seleccionaron aquellas moléculas cuyos valores se encontraron dentro de los rangos de interés. Se llevaron a cabo cálculos de acoplamiento molecular y el análisis de contactos cercanos y puentes de hidrógeno para las moléculas elegidas, según se describe en la sección 4.3.2. Adicionalmente, las moléculas fueron evaluadas mediante el modelo farmacofórico seleccionado en la sección 4.3.3.

5. RESULTADOS

5.1. Parte Química

5.1.1. Síntesis de curcumina y sus derivados

Se realizó la síntesis de la curcumina y los derivados **3**, **6** y **9**. Las moléculas fueron purificadas por recristalización y caracterizadas por espectrometría de masas y RMN de ^1H y ^{13}C (ver Anexo 8.1). Para la curcumina, el punto de fusión fue de 185-187 °C, siendo el valor reportado de 182-184 °C⁶⁰. Los espectros de masas y RMN fueron comparados con aquellos previamente publicados^{39,61}. Para el compuesto **9** el punto de fusión fue de 130-131 °C (lit. 129-130 °C⁴⁰), de 198-200 °C (lit. 211-214 °C⁶²) para el compuesto **3**, y de 160-162 °C (lit 162 °C⁴⁰) para el compuesto **6**. Los datos espectroscópicos fueron comparados con los publicados por Amolins *et al.*⁶³.

5.2. Parte Biológica

5.2.1. Inhibición de la acetilcolinesterasa

Se verificó la pureza de la AChEEe mediante electroforesis en gel (Figura 4). Se observó una sola banda con un peso molecular de aproximadamente 65 kDa, siendo el valor reportado por Sigma de 70 kDa por subunidad. Se verificó la actividad enzimática de la AChEEe en una solución al 5% de MeOH, EtOH y DMSO en el buffer de prueba, así como la solubilidad de los compuestos **1-12** en los mismos disolventes. Se observó que la actividad enzimática en todos los casos es reproducible, y directamente proporcional a la concentración de enzima. Las moléculas **1**, **2**, **4**, **6-8** y **10-12** se disolvieron en MeOH, las moléculas **3**, **5** y **9** en DMSO y los estándares tacrina y galantamina en EtOH, de acuerdo a la literatura. La solubilidad de las moléculas **5** y **11** fue muy limitada en presencia del buffer de fosfatos, por lo que no fue posible probar su actividad inhibitoria. La curcumina y algunos de sus derivados presentan una coloración de amarilla a naranja en solución, mientras que el cromóforo resultante de la activación enzimática del DTNB es de color amarillo. Los espectros de ultravioleta de los compuestos (Figura 5) muestran que las longitudes de onda de máxima absorción de algunos inhibidores y del producto

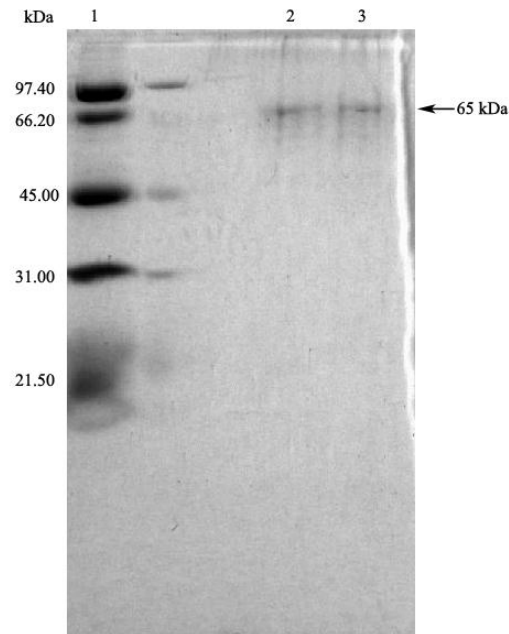


Figura 4. Gel de electroforesis en poliacrilamida-DSS, teñido con azul de Coomassie. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, mientras que la AChEE se muestra en los carriles 2 y 3

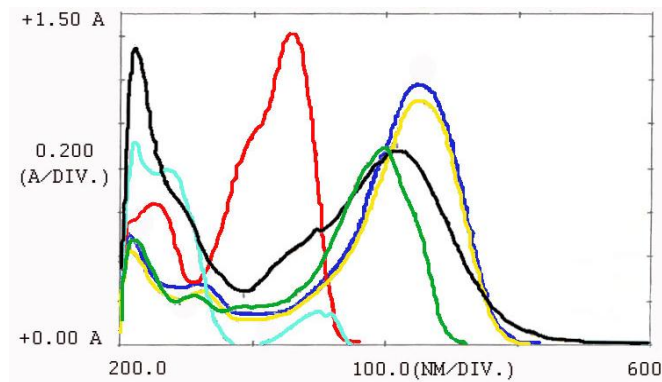


Figura 5. Espectros de absorción de ultravioleta de algunos compuestos probados. El DTNB activado se muestra en negro, la curcumina en azul, el compuesto **2** en verde, **3** en rojo, **4** en amarillo y el **8** en cian

son coincidentes, por lo que no es posible definir una longitud de onda en que no exista la interferencia del inhibidor. Al modificar las condiciones del ensayo (se redujo la concentración enzimática y se prolongó el tiempo de incubación del sustrato), se obtuvieron valores de absorbancia para el ensayo dentro del rango de linealidad de la ley de Beer. De esta manera fue posible una adecuada cuantificación de la producción del cromóforo. Para la curcumina y los inhibidores de referencia, se llevaron a cabo los ensayos en ambas condiciones, a fin de comparar los valores de CI_{50} obtenidos con los reportados en la literatura; mientras que el resto de las

sustancias fueron probadas únicamente en las condiciones II. Los valores obtenidos con las condiciones I se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Comparación de los valores de CI_{50} obtenidos y reportados en la literatura

	CI_{50} (μ M)	IC 95% ^a (μ M)	Valor Reportado
Tacrina	50 nM	35-73 nM	74 nM ⁵⁶
Galantamina	0.30	0.16-0.54	0.36 μ M ⁵⁶
1	70.30	53-92	67.69 μ M ³⁸

^a Intervalo de confianza al 95%

Las moléculas fueron probadas hasta concentraciones máximas de 500 μ M o hasta su límite de solubilidad. En este rango, **6** y **10** no presentaron actividad significativa. La absorbancia de **9** no permitió ensayar concentraciones mayores a 50 μ M, y no se observó actividad por debajo de este valor. En el caso de las moléculas **2**, **7** y **8**, las limitantes de solubilidad impidieron alcanzar la concentración en que se inhibe el 50% de la actividad enzimática, llegando únicamente al 40% de inhibición. Por ello se seleccionó el 25% de inhibición como valor comparativo de la actividad de las moléculas probadas. Los valores de CI_{25} obtenidos se muestran en la Tabla 3. La curcumina presentó mayor actividad que sus derivados probados, siendo el derivado **3** la segunda molécula más activa y el derivado **12** significativamente menos activo.

Tabla 3. Valores de CI_{25} para las moléculas probadas

	CI_{25} (μ M)	IC 95% ^a (μ M)
Tacrina	65 pM	7.8-533 pM
Galantamina	0.167	0.113-0.227
1	13.2	4.4-39
2	103	85-126
3	52	42-64
4	158	107-234
5	insoluble	
6	inactivo	
7	151	116-195
8	131	104-163
9	N.O.	
10	inactivo	
11	insoluble	
12	303	278-328

^a Intervalo de confianza al 95%
N.O.: No obtenido

El sitio activo de la AChE es mayormente hidrofóbico, con presencia de numerosos aminoácidos aromáticos. Por ello, se propone que la actividad inhibitoria baja de los derivados de curcumina puede deberse a la formación de interacciones hidrofóbicas o de tipo π - π entre los anillos aromáticos y los aminoácidos aromáticos del sitio activo. La curcumina posee tres grupos hidroxilo que pueden fungir como donadores de puentes de hidrógeno (DonPH), mientras que la función cetona puede actuar como aceptor de puentes de hidrógeno (AcPH). La curcumina es un IACE menos activo que la demetoxi y bisdemetoxicurcumina³⁸, relacionándose la presencia de los grupos metoxilo con una menor actividad inhibitoria. La acetilación de los hidroxilos en **2** disminuyó aún más la actividad, lo que puede deberse a la ausencia de los DonPH o a efectos estéricos debidos al mayor volumen del grupo acetilo. Los derivados **3**, **4**, **6**, **7**, **8** y **11** mostraron menor actividad que la curcumina. En este caso pueden distinguirse dos posibles causas. Por un lado, la presencia de grupos formadores de puentes de hidrógeno. La molécula **6** fue inactiva, mientras que la molécula **4** fue tres veces menos activa que el derivado **3**, no sustituido. Esto puede deberse a que en las moléculas **4** y **6** no puede establecerse el equilibrio tautomérico y se elimina la presencia de un DonPH, disminuyendo el número potencial de interacciones con la proteína. Se propone que el anillo aromático adicional en **4** permite la formación de más interacciones hidrofóbicas favorables, aunque el aumento en el volumen de la molécula puede afectar de manera negativa la actividad.

Por otro lado, la flexibilidad de las moléculas tiene también un efecto importante en la actividad. El aumentar la flexibilidad de las moléculas mediante la reducción de los dobles enlaces tiene un efecto negativo en la actividad. La molécula **10** no es activa, en comparación con **2**, y **7** es menos activa que **3**. La formación de un anillo de pirazol o isoxazol aumenta la rigidez de la molécula, posiblemente ayudando a recuperar la actividad inhibitoria. De manera interesante, **8** mostró actividad comparable con **7**, aun cuando **6** fue inactiva y posee ambas características identificadas como negativas: ausencia de DonPH y dobles enlaces reducidos. La molécula **12** tampoco tiene grupos DonPH, y presenta dos anillos aromáticos al igual que los derivados de curcumina, pero su longitud es de aproximadamente la mitad. Su menor actividad es indicativa de la importancia de la distancia entre los grupos aromáticos en este grupo de moléculas.

5.2.2. Fluorescencia y Dicroísmo Circular

Se realizaron ensayos de fluorescencia y dicroísmo circular de la AChEEe en presencia de curcumina y de los inhibidores de referencia, buscando obtener información respecto al modo de unión de la curcumina con el sitio activo de la proteína. De acuerdo a la estructura cristalográfica del complejo AChETc-tacrina, el inhibidor forma interacciones de apilamiento con el Trp84 y con Phe330, la cual se encuentra en su conformación “cerrada”¹⁷. Por su parte, en el complejo AChETc-galantamina, la Phe330 se encuentra en su conformación “abierta” y se observan interacciones de apilamiento entre el doble enlace del anillo de ciclohexeno y el Trp84, e interacciones hidrofóbicas con el sitio de unión a acilo⁶⁴. Se espera que, de existir la interacción de la curcumina tanto con el sitio activo como con el periférico de la AChEEe, los espectros del complejo con curcumina se semejen a los obtenidos con la galantamina al observarse un ambiente similar en el fondo de la hendidura del sitio activo, pero presenten pequeñas diferencias debidas al cambio de ambiente en los aminoácidos del sitio periférico.

5.2.2.1. Fluorescencia

Las longitudes de onda de excitación de 280 y 290 nm fueron elegidas a fin de monitorear los cambios en el ambiente de los aminoácidos aromáticos, especialmente de los residuos de triptófano de la proteína en presencia de los inhibidores, pues a 280 nm hay absorción tanto de la tirosina como del triptófano, mientras que a 290 nm se excita principalmente a los triptófanos⁶⁵. El máximo de emisión para la proteína se observó a 342 nm cuando la muestra se excitó a 280 nm y a 341 nm con excitación a 290 nm. Este máximo no se modificó en presencia de la galantamina ni de la curcumina, pero con la tacrina se observó un ligero desplazamiento hipsocrómico con la excitación a 290 nm, como se muestra en la Figura 6. Este desplazamientos pueden interpretarse como un cambio en el ambiente inmediato de los aminoácidos fluorescentes a un ambiente ligeramente más hidrofóbico⁶⁶, el cual se esperaría obtener con la conformación “cerrada” de Phe330. Por su parte, se observó un apagamiento de la señal, o quenching, de manera significativa en presencia de la curcumina, y de menor intensidad en presencia de la tacrina para ambas longitudes de onda de excitación. El apagamiento puede deberse a la formación de interacciones intermoleculares, ya sea mediante colisiones o mediante la formación de complejos no-fluorescentes⁶⁷. Debido a la diferencia de apagamiento observada entre la curcumina y la tacrina, se propone que la curcumina es capaz de formar complejos no-fluorescentes con una

mayor cantidad de aminoácidos aromáticos que la tacrina al unirse a la AChEEe. Esto apoyaría la idea que la curcumina es capaz de interactuar tanto con los residuos del sitio periférico como con los del sitio activo.

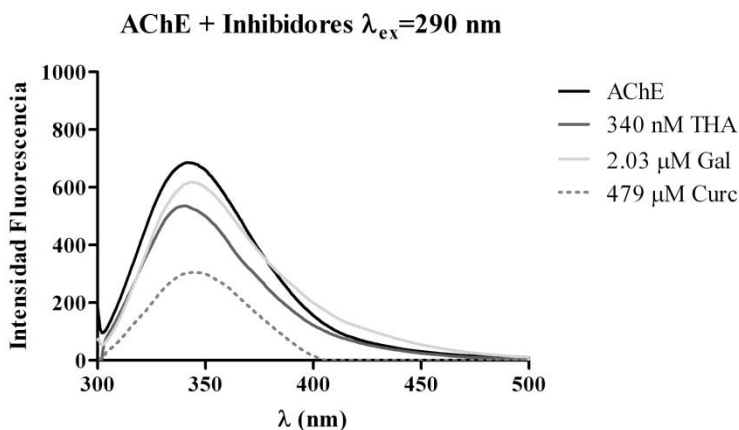


Figura 6. Espectro de emisión de fluorescencia para la AChEEe en presencia de tacrina, galantamina y curcumina

5.2.2.2. Dicroísmo Circular

Basándonos en un estudio previamente publicado⁶⁸, se buscó monitorear los cambios en el espectro de dicroísmo circular de la AChEEe en el UV-cercano (250-400 nm). En dichas longitudes de onda se observan transiciones debidas a los aminoácidos aromáticos Phe, Tyr y Trp⁶⁹, y estas responden a modificaciones en su ambiente inmediato. El ensayo se realizó diluyendo la enzima en buffer de fosfatos 0.1 M pH 8, mismas condiciones en que se realizaron las pruebas de actividad inhibitoria. En estas condiciones, no fue posible obtener resolución satisfactoria de la señal, pues la intensidad del ruido fue alta y enmascaró la señal debida a la proteína. Por ello, se concluye que en las condiciones de realización del experimento, no es posible reproducir el estudio previamente reportado ni obtener resultados significativos. Para obtener un resultado satisfactorio sería necesario realizar una serie de pruebas variando las condiciones de pH y naturaleza del buffer a fin de obtener espectros de dicroísmo circular de mejor calidad, mas estos no reflejarían el ambiente presente en los ensayos de inhibición y por lo tanto no proporcionarían información de interés para este trabajo.

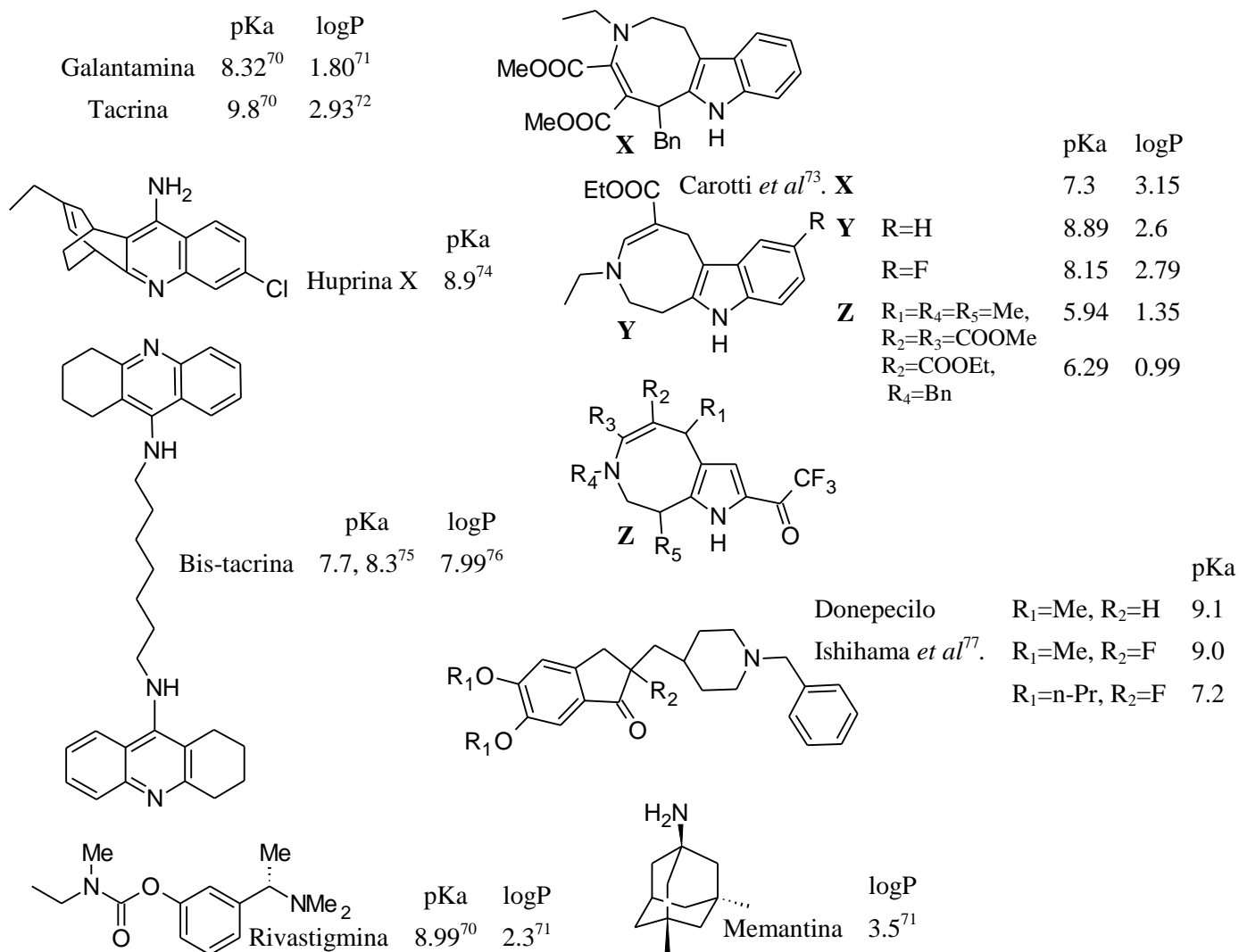
A partir de los ensayos biológicos realizados es posible concluir que la curcumina y algunos de sus derivados son capaces de inhibir a la AChE. En presencia de la curcumina, el ambiente inmediato de los aminoácidos aromáticos del sitio activo no se ve modificado sustancialmente,

mas sí se forman complejos no-fluorescentes con los mismos. Esto nos permite proponer que la curcumina, para ejercer su acción inhibitoria, se uniría a lo largo de la hendidura del sitio activo, con Phe330 en su conformación “abierta”, e interactuaría tanto con los aminoácidos del sitio cuaternario como con los del sitio periférico.

5.3. Parte computacional

5.3.1. Descriptores moleculares

En el Esquema 3 se muestran los valores reportados en la bibliografía para los IACE, a partir de los cuales se determinaron los valores óptimos: logP de 1.5-4.0, y un pKa 7.4-9.8 para la



Esquema 3. Valores de pKa y logP para inhibidores conocidos de la acetilcolinesterasa

función amina. Se propone que las moléculas, para ser activas a nivel del sistema nervioso central, deben de tener un peso molecular menor a 650 u.m.a⁷⁸ y menos de 3 DonPH y 6 AcPH⁷⁹. Adicionalmente, debido a las características del sitio activo de la AChE mencionadas en la sección 2.1.2, es recomendable que las moléculas presenten un momento dipolar. Si bien ninguno de los derivados de curcumina probados posee un nitrógeno protonable, los valores para el resto de los descriptores se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores calculados para los descriptores de los derivados de curcumina probados

	PM	Donador	Aceptor	pKa⁴³	MlogP⁴⁴	Dipolo
	<650	≤ 3	≤ 6	7-10	1.5-4.0	Debye
1	368.4	3	6	-	3.24 ⁸⁰	3.30
2	452.45	1	6	-	2.57	0.81
3	364.4	3	5	5.8 ⁸¹	1.78 ⁸¹	1.74
4	444.52	2	5	-	3.35	3.87
6	365.38	2	5	-	2.16	2.84
7	452.49	1	5	3.95	3.13	4.41
8	453.48	0	5	-	3.13	3.30
10	456.5	1	6	-	2.71	0.52
12	327.43	0	3	-	3.05	3.78

Puede observarse que el valor de los descriptores de todas las moléculas probadas queda dentro del rango establecido en cuanto a peso molecular y número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno. Lo mismo sucede con respecto a su coeficiente de partición. Cabe señalar que las moléculas con mejor actividad inhibitoria, **1** y **3**, presentan el mayor número de DonPH. Es igualmente interesante observar que **2** y **10** poseen un momento dipolar significativamente menor que **7** y **8**; lo cual, junto a su mayor flexibilidad, podría explicar la falta de actividad inhibitoria de **10**, y la menor actividad de **2** a pesar de su mayor rigidez y la presencia de un número comparable de AcPH y DonPH.

5.3.2. Estudios de acoplamiento molecular

A fin de explorar la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas probadas y aminoácidos específicos del sitio activo, se llevaron a cabo cálculos de acoplamiento molecular. Si bien la AChEEe se encuentra cristalizada⁸², la estructura obtenida es de baja resolución (4.2 Å). Por otra parte, se han resuelto numerosas estructuras de la AChETc en presencia de distintos inhibidores con resolución <2.5 Å. Ambas enzimas tienen una identidad del 60%, siendo la similitud entre ellas del 81.7% según ClustalW^{83,84}. Los aminoácidos de la hendidura del sitio

activo también se encuentran conservados. Por ello se decidió realizar los ensayos de acoplamiento molecular a partir de la estructura de la AChETc en complejo con el inhibidor donepecilo, pues se espera que la curcumina interactúe con la proteína a todo lo largo del sitio activo. Se llevó a cabo un primer ensayo de acoplamiento molecular con el donepecilo, a fin de verificar los parámetros elegidos para este ensayo, reproduciéndose la conformación cristalográfica con una rmsd de 0.92 Å en AutoDock, y de 2.6 Å en GOLD. El valor ligeramente mayor observado para el segundo programa se debe a la orientación inversa del anillo de indanona, mientras que la ubicación de los anillos de piperidina y bencilo presentó una rmsd de 0.92 Å. En ambos casos se reprodujeron los contactos con los aminoácidos aromáticos del sitio activo presentes en la estructura cristalográfica. En ella no se observan puentes de hidrógeno directos entre el donepecilo y la enzima, sino que están mediados por moléculas de agua⁴⁹. Estos puentes no fueron reproducidos por GOLD. En este resultado se incluyeron 7 moléculas de agua, 6 de las cuales son moléculas de agua altamente conservadas en las estructuras cristalográficas de AChETc, y que ocupan sitios específicos de solvatación⁸⁵ con los que el ligando no presentó interacción. La molécula de agua que forma el puente de hidrógeno entre el N del anillo de piperidina y la Tyr121 se conservó, pero la orientación del grupo hidroxilo de Tyr121 asignada por el programa no fue la adecuada para la formación de la interacción.

Se calcularon los puentes de hidrógeno y contactos cercanos con los residuos aromáticos del sitio activo para la conformación más estable del cluster de mayor abundancia de cada una de las moléculas probadas (Tabla 5). En todos los casos, las moléculas fueron ubicadas a lo largo de la hendidura del sitio activo. Esto fue indicativo que el volumen del sustituyente *N*-fenilo de **4** no representa un obstáculo para la unión, aunque este grupo tampoco presentó interacciones con los

Tabla 5. Resultados de ensayos de acoplamiento con AutoDock4 y GOLD

Molécula	Calificación			Puentes de hidrógeno											Contactos			
	AutoDock (kcal/mol)	GoldScore	ChemScore	D72	G117	Y121	S122	Y130	E199	S286	F288	R289	Y334	H440	W84	W279	F330	Y334
Donepecilo	-7.23	67.85	45.94	*														
1	-7.50	66.09	33.44															
2	-4.78	63.94	15.93															
3	-7.15	75.04	42.727				*											
4	-8.29	73.12	33.41	*														
6	-7.41	69.35	27.185		*													
7	-5.86	83.11	27.10															
8	-6.35	83.51	22.90															
10	-5.71	71.89	18.03															
12	-7.6	78.83	32.23	*														

* Puente de hidrógeno mediado por agua

0-3 frecuencia de puentes de hidrógeno

residuos aromáticos del sitio activo. Su disminución de la actividad inhibitoria con respecto a **3** puede entonces correlacionarse con la ausencia del DonPH y con una contribución poco significativa de interacciones hidrofóbicas/aromáticas por parte del *N*-fenilo. Para todas las moléculas se observan contactos cercanos con los residuos del sitio cuaternario (Trp84 y Phe330), y para la mayoría de ellas con el sitio periférico (Trp279). Las estructuras cristalográficas de la AChE en complejo con los inhibidores tacrina¹⁷ y huperzina A⁸⁶ muestran la importancia de las interacciones con los aminoácidos del sitio cuaternario, mientras que en los complejos con el donepecilo⁴⁹ y compuestos de tipo bis-tacrina⁸⁷ y bis-huperzina⁸⁸ confirman la importancia de los mismos con los residuos aromáticos del sitio periférico. En los casos antes mencionados, las funciones aromáticas poseen un nitrógeno protonable, formando interacciones de tipo π -catión además de interacciones de apilamiento (Figura 7). La molécula **12**, por su menor tamaño, interactuó únicamente con las partes media e inferior de la hendidura del sitio activo (Figura 8). Esto apoya la interpretación inicial que la distancia entre anillos aromáticos en

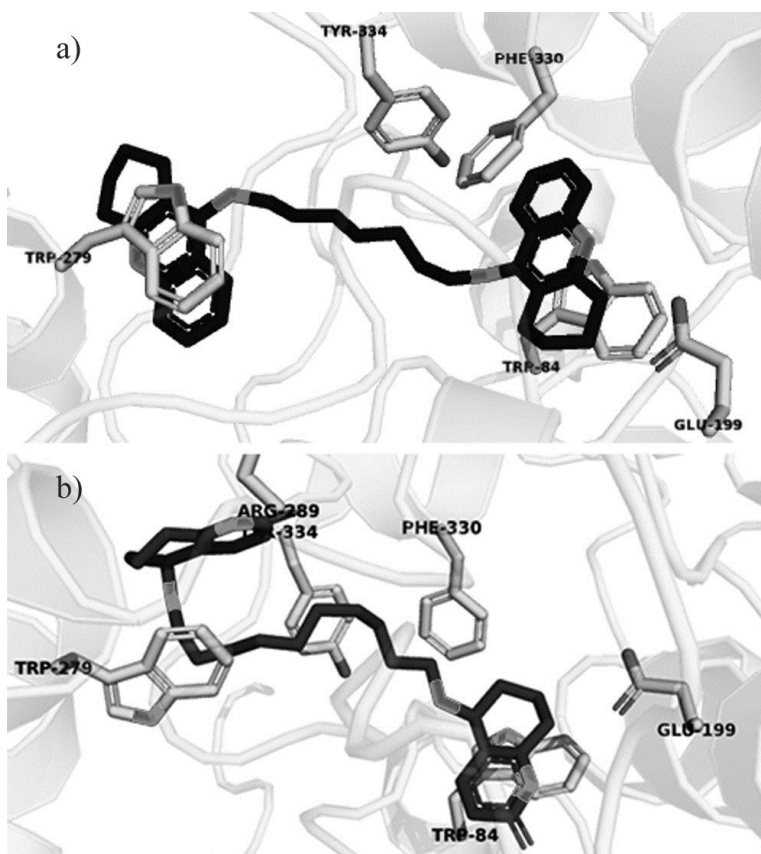


Figura 7. Estructura cristalográfica de AChETc con **a)** bis-tacrina (PDB 2CKM) y **b)** bis-huperzina (PDB 1H22)

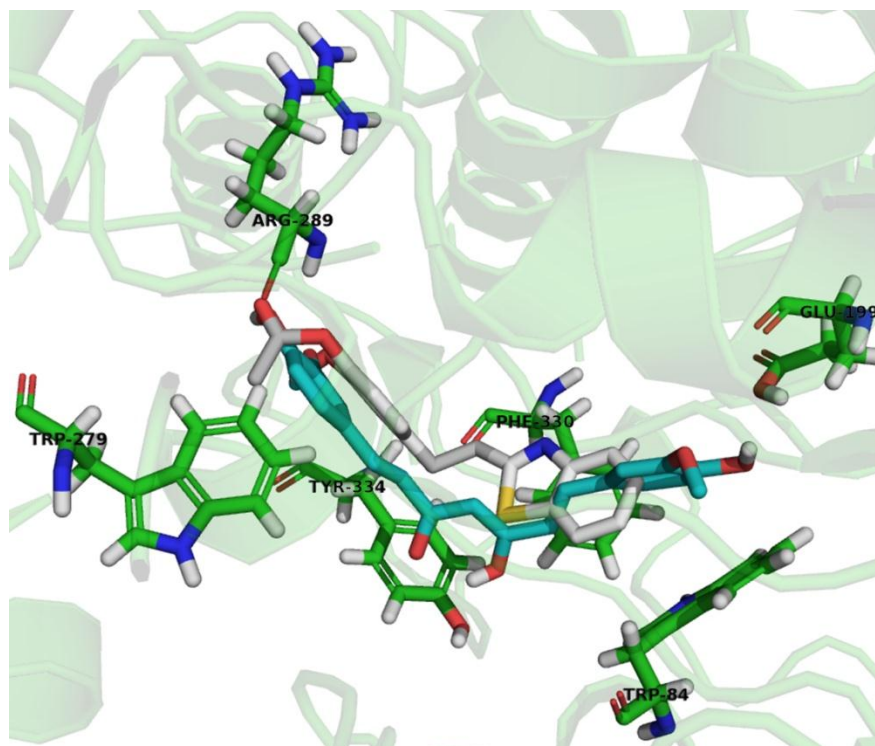


Figura 8. Conformaciones representativas del acoplamiento de la curcumina (cian) y la molécula **12** (blanco) en la AChETc (tomada de PDB 1EVE)

el esqueleto de la curcumina permitiría su interacción tanto con el sitio cuaternario como con el periférico. Al perderse una de ellas, la actividad disminuye. Se observaron igualmente de manera consistente contactos con la Tyr334 del sitio de unión a acilo.

Las conformaciones obtenidas con el programa GOLD incluyeron un promedio de 5 moléculas de agua, en su mayoría altamente conservadas. De manera similar a como se observó con el donepecilo, éstas se ubicaron en sitios en que el ligando no interactuó con la proteína. La presencia repetida de dos moléculas de agua no identificadas como conservadas (aguas 1232 y 1233 de acuerdo a la numeración de 1EVE) en la parte superior de la hendidura, confirma que la conformación más estable para la curcumina y sus derivados privilegia la formación de contactos cercanos con Trp279 sobre la formación de puentes de hidrógeno con Asp72. Si bien se observaron puentes de hidrógeno mediados por agua para cuatro de los ligandos analizados, la presencia de estos puentes de hidrógeno no influyó de manera significativa ni en la calificación otorgada ni en la ubicación en la hendidura de estas conformaciones.

La función hidroxilo en las moléculas **1** (Figura 9), **4** y **6**, que se ubica en el fondo de la hendidura, forma puentes de hidrógeno con Glu199 y/o con Tyr130 en el sitio cuaternario, mientras que en **7** el grupo acetilo correspondiente actúa como AcPH en la formación de estas

interacciones. La formación de puentes de hidrógeno con estos grupos se observa en las estructuras cristalográficas de la huperzina A⁸⁶, galantamina⁶⁴ y bis-huperzina⁸⁸. El grupo hidroxilo localizado en la parte superior de la hendidura del sitio activo, forma puentes de hidrógeno con los átomos de cadena principal de Ser286, Phe288 o Arg289 del sitio de unión a acilo, mientras que en las moléculas **2** y **8** el grupo acetilo funge como AcPH en estas interacciones. La formación de un puente de hidrógeno entre un carbonilo y el N de Phe288 se observa en la estructura cristalográfica de AChE en complejo con los derivados de bis-huperzina⁸⁸; mientras que esta misma interacción, pero mediada por una molécula de agua, está presente en el complejo con el donepecilo⁴⁹. De las tres conformaciones distintas analizadas para cada molécula probada, los puentes de hidrógeno formados por los grupos hidroxilo se observaron con mayor frecuencia, mientras que aquellos formados por los grupos acetilo se observaron únicamente una vez. Esto sugiere que el mayor volumen y movilidad del acetilo disminuye la probabilidad de alcanzar una conformación adecuada para la formación de puentes

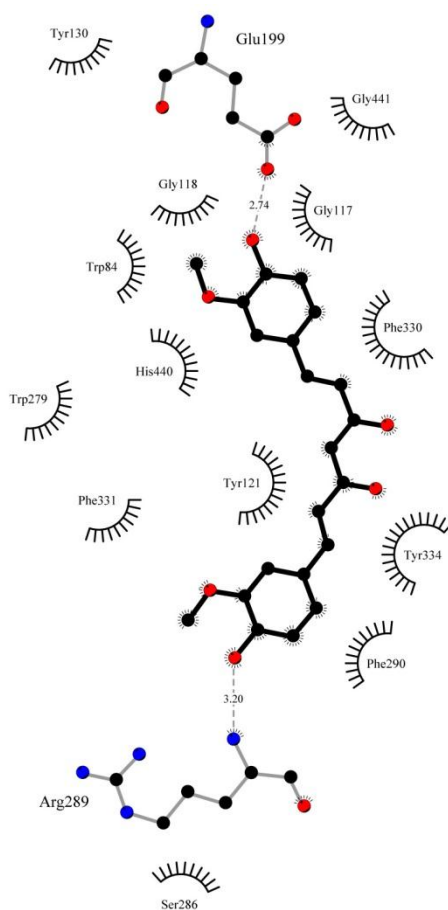


Figura 9. Interacciones entre la curcumina y los aminoácidos del sitio activo de AChETc. Los puentes de hidrógeno se representan en gris, los contactos hidrofóbicos en negro

de hidrógeno, influenciando de manera negativa la actividad inhibitoria de estas moléculas. La función ceto-enol^b y el par correspondiente de DonPH/AcPH en el anillo de pirazol interactúa, en la parte media de la hendidura del sitio activo, ya sea con los residuos de Asp72 o Tyr121 cerca del sitio periférico o con Tyr334 en el sitio de unión a acilo. No se observaron puentes de hidrógeno directos en esta área para las moléculas **4** y **6**, mientras que en **8** el oxígeno del anillo de isoxazol actúa como AcPH. La ausencia de un DonPH en la parte media de las moléculas impide la formación de una interacción estabilizante que tendría un impacto positivo en la actividad inhibitoria.

Si bien las moléculas **7**, **8** y **10** llegan a formar puentes de hidrógeno con los aminoácidos en el fondo y parte media de la hendidura del sitio activo, estos no se observan de manera consistente entre las conformaciones analizadas. Para estas moléculas, los clusters obtenidos de los ensayos de acoplamiento molecular están formados por un número significativamente menor de conformaciones con respecto a las moléculas conjugadas. La molécula **10** generó el mayor número de conformaciones distintas, observándose únicamente la posibilidad de formación de un puente de hidrógeno; mientras que las moléculas **7** y **8**, al ser ligeramente más rígidas generaron un menor número de clusters y formaron dos puentes de hidrógeno posibles, que pueden ser correlacionados con la observación de actividad inhibitoria en estas dos moléculas. El tamaño y número de los clusters apoya la observación que la mayor flexibilidad de **10** y sus derivados tiene un impacto negativo en la actividad.

Las calificaciones obtenidas no correlacionan con el orden de actividad de las moléculas para ninguna de las tres funciones de evaluación. Esto se encuentra dentro de los resultados esperados, pues numerosos estudios comparativos han demostrado que el desempeño de los programas de acoplamiento molecular en general es aceptable en cuanto a la adecuada reproducción de conformaciones de unión observadas cristalográficamente, no así para la predicción de su afinidad de unión⁸⁹⁻⁹². En particular, para GOLD y AutoDock se han obtenido hasta un 60 y 50% de reproducción adecuada de conformaciones, respectivamente⁹¹. La poca capacidad predictiva de las funciones de evaluación está relacionada, por una parte, con las limitaciones en el número y diversidad de estructuras usadas para entrenar dichas funciones, y por otra parte, en los valores relativamente pequeños que representa la energía libre de unión y las sutiles diferencias que determinan un cambio sustancial en la afinidad de una molécula^{90,92}. Finalmente, a partir de este análisis no fue posible explicar la falta de actividad de **6**, por lo que deberán de analizarse otras propiedades fisicoquímicas.

^b Para la curcumina y todos sus derivados, la función ceto-enol conservó su conformación *cis*. La representación esquemática generada puede modificar en apariencia esta conformación, por ejemplo, véase Figura 14b.

5.3.3. Modelo farmacofórico

Con el propósito de enriquecer las relaciones estructura-actividad previamente obtenidas, se identificaron las características comunes entre los derivados de curcumina probados y un conjunto de IACE conocidos. Se generaron cuatro distintos modelos farmacofóricos, incluyendo características aromáticas, hidrofóbicas, AcPH y DonPH. El modelo farmacofórico mejor evaluado de cada tipo se muestra en la Tabla 6. El modelo farmacofórico A está compuesto por tres características hidrofóbicas y un AcPH, y tiene el mejor desempeño al reconocer al 86% de los IACE del conjunto de prueba. El resto de los modelos tuvieron un menor reconocimiento, de alrededor del 65%. Para los modelos farmacofóricos A y B, la ubicación del AcPH y DonPH es adyacente, tratándose probablemente de dos descripciones distintas del mismo grupo funcional o de grupos contiguos; encontrándose también las características hidrofóbicas en ubicaciones similares. Para los modelos farmacofóricos B y C las características hidrofóbicas tienen también ubicaciones similares, lo mismo que los DonPH, lo cual podría indicar distintas conformaciones del mismo grupo funcional. En el caso del modelo farmacofórico D, la ubicación de las características AcPH y aromática fue significativamente distinta al resto de los modelos, indicando que esta fue una descripción única del conjunto de moléculas.

Tabla 6. Número y naturaleza de las características, calificación y porcentaje de reconocimiento del conjunto de prueba de los modelos farmacofóricos seleccionados

	Características				Desempeño	
	Hidrofóbica	Aromática	AcPH	DonPH	Calificación	% Conj. Prueba
A	3		1		13.44	86
B	3			1	10.58	69
C	2		1	1	9.63	63
D	2	1	1		10.45	65

A pesar de que un número significativo de los IACE incluidos en nuestra base de datos presentaron un nitrógeno protonado, los modelos farmacofóricos no incluyeron características catiónicas. La inspección visual de las conformaciones que integran el conjunto de entrenamiento reveló que la localización de la carga positiva no fue consistente para todas las moléculas, pudiéndose encontrar dentro de la proteína en la proximidad del Trp84 en el fondo de la hendidura del sitio activo, de Tyr121 en la parte media o de Trp279 en la parte superior. Al no contar con evidencia experimental acerca del estado de protonación de las moléculas del conjunto de entrenamiento en su complejo con la enzima, se generó un modelo farmacofórico con las

moléculas en su forma neutra. Los modelos farmacofóricos resultantes presentaron las mismas características y aproximadamente la misma ubicación tridimensional que los modelos farmacofóricos generados con las moléculas con carga. Una inspección visual de las conformaciones que componen el conjunto de entrenamiento indicó que las conformaciones obtenidas a partir de los cálculos de acoplamiento molecular fueron equivalentes en presencia o ausencia de carga positiva. Se confirmó que en este caso, al no existir una ubicación consistente para la característica catiónica, la descripción farmacofórica del conjunto de moléculas es independiente de su estado de protonación.

Buscando el modelo farmacofórico que mejor describa las características compartidas entre los IACE conocidos y los derivados de curcumina, se analizó el porcentaje de estos últimos reconocido por cada resultado. Igualmente se evaluaron 11 fármacos con distintas indicaciones terapéuticas (Tabla 7) a fin de identificar si dichas características son exclusivas de los IACE (Figura 10). Los resultados del análisis discriminante para el conjunto de entrenamiento, para el conjunto de validación (formado por el conjunto de prueba y el conjunto no-IACE) y para ambos

Tabla 7. Grupo de moléculas no-IACE para la evaluación del modelo farmacofórico

Fármaco	Indicación terapéutica*
Capsaicina	Analgésico
Captopril	Antihipertensivo
Cefotaxima	Antibiótico cefalosporínico
Dexametasona	Antiinflamatorio corticosteroide
Loratadina	Antihistamínico
Nabilona	Antiemético
Naproxeno	AINE
Ranitidina	Antiulceroso
Retinol	Vitamina
Tetraciclina	Antibiótico
Tolbutamida	Hipoglicémico

*PLM Diccionario de Especialidades Farmacéuticas 2011. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6 (Acceso 10 de agosto, 2011)

se muestran en la Tabla 8. El modelo farmacofórico A muestra la mejor sensibilidad, al reconocer adecuadamente el 87% de las moléculas activas, mientras que el resto de los modelos identifican adecuadamente entre el 64-70% de las mismas. Por otra parte, el modelo farmacofórico D presenta la mejor especificidad, al clasificar adecuadamente el 75% de las moléculas sin actividad en el conjunto de validación. Si bien el desempeño global del modelo farmacofórico A sería el mejor con una exactitud del 84%, el modelo farmacofórico D mostró la mejor capacidad

de discriminar los fármacos no relacionados. Esto es indicativo de que las características hidrofóbicas en A dan una descripción general de moléculas lipofílicas, y al especificar la localización de una característica aromática se obtiene una descripción más específica de los IACE. Por esta razón se eligió al modelo farmacofórico D como la mejor descripción de los derivados de curcumina con actividad inhibitoria ante la AChE. La coincidencia de las características de D con moléculas relevantes se muestra en la Figura 11.

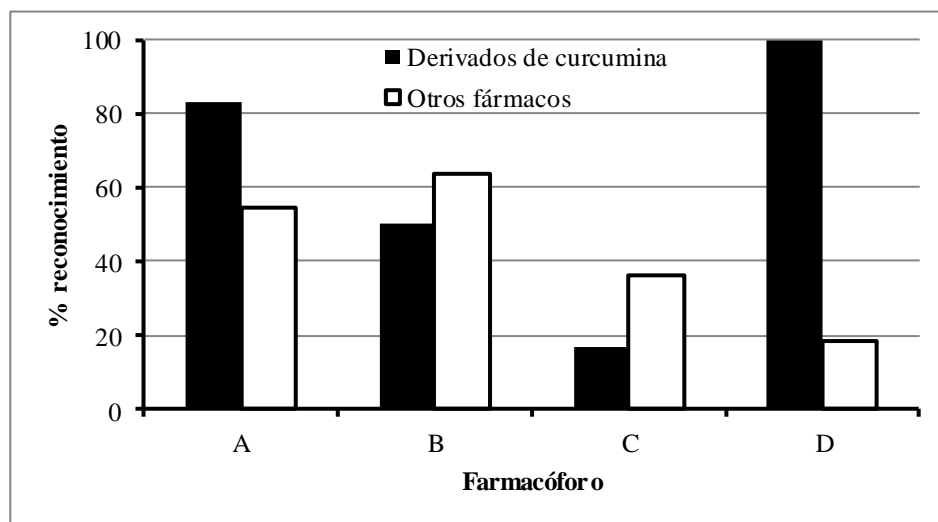


Figura 10. Porcentaje de reconocimiento de los derivados de curcumina y otros fármacos para cada modelo farmacofórico

Tabla 8. Desempeño de los modelo farmacofóricos respecto a los conjuntos de entrenamiento, validación y ambos

		Entrenamiento			Validación			Ambos		
		%	Activo	No activo	%	Activo	No activo	%	Activo	No activo
<i>Farmacóforo A</i>										
Sensibilidad	Activo	100	24	0	85.1	126	22	87.2	150	22
Especificidad	No activo	100	0	2	41.7	7	5	50	7	7
Exactitud		100			81.9			84.4		
<i>Farmacóforo B</i>										
Sensibilidad	Activo	79.2	19	5	68.9	102	46	70.3	121	51
Especificidad	No activo	0	2	0	41.7	7	5	35.7	9	5
Exactitud		73.1			66.9			67.7		
<i>Farmacóforo C</i>										
Sensibilidad	Activo	79.2	19	5	61.5	91	57	64	110	62
Especificidad	No activo	0	2	0	66.7	4	8	57.1	6	8
Exactitud		73.1			61.9			63.4		
<i>Farmacóforo D</i>										
Sensibilidad	Activo	79.2	19	5	64.2	95	53	66.3	114	58
Especificidad	No activo	50	1	1	75	3	9	71.4	4	10
Exactitud		76.9			65			66.7		

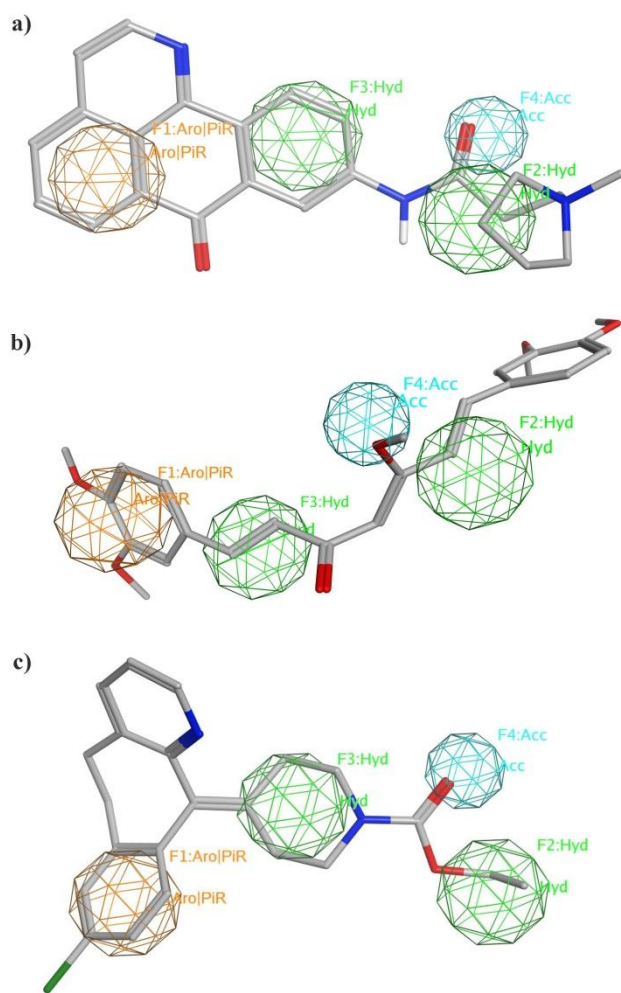


Figura 11. Correspondencia del modelo farmacofórico D con **a)** la molécula más potente del conjunto de prueba (4b de Tang, H *et al.*, 2007, $CI_{50}=1$ nM), **b)** la curcumina y **c)** el falso positivo loratadina. Las características hidrofóbicas se muestran en verde, la aromática en naranja y el AcPH en cian

Como se mencionó anteriormente, las moléculas seleccionadas para este ensayo están diseñadas para unirse tanto al sitio activo como al periférico de la AChE, por lo que la mayor parte de ellas están compuestas por dos o más grupos aromáticos o heterociclos unidos por cadenas alifáticas de distinta longitud y flexibilidad. En la Figura 11a se muestra la molécula con mejor actividad dentro del conjunto de prueba. Para esta molécula, así como para la mayor parte de las moléculas probadas, la característica aromática (F1) correspondió a uno de los grupos aromáticos; mientras que las características hidrofóbicas (F2 y F3) corresponden ya sea al segundo ciclo o parte de la cadena alifática. El AcPH (F4) correspondió en la mayor parte de los casos a un grupo carbonilo. Se observó el mismo patrón para la curcumina (Figura 11b) y sus derivados, si bien para un pequeño porcentaje de las conformaciones de **3**, **4** y **6** F1 correspondió

al anillo de pirazol, al *N*-fenilo o al isoxazol. Esto indica que dichas moléculas poseen modos alternativos de unirse a la AChE que satisficieran la descripción del modelo farmacofórico. Las moléculas **7**, **8** y **10** mostraron las mismas conformaciones que la curcumina, pero se observa que el anillo adyacente a F2 presenta diversas conformaciones distintas debido a la libre rotación de sus enlaces. Esto refuerza la idea que la flexibilidad en los derivados de curcumina afecta la habilidad de las moléculas para formar complejos estables con la AChE. Para la molécula **12**, F1 describe al anillo de benzotiazol, F2 y F3 correspondieron a la cadena y al segundo anillo aromático, mientras que F4 correspondió ya sea al acetilo o al metoxilo. Al correlacionar la ubicación de las características del modelo farmacofórico con el sitio activo de la AChE, la ubicación preferente de la función aromática corresponde al sitio periférico (en proximidad con Trp279 y Ser290, Figura 12). Las funciones hidrofóbicas se localizan cerca de la Tyr121, Phe330, Phe331 y Trp84 (en los sitios cuaternario y de unión a acilo) mientras que el AcPH se ubicó cerca de la Tyr121.

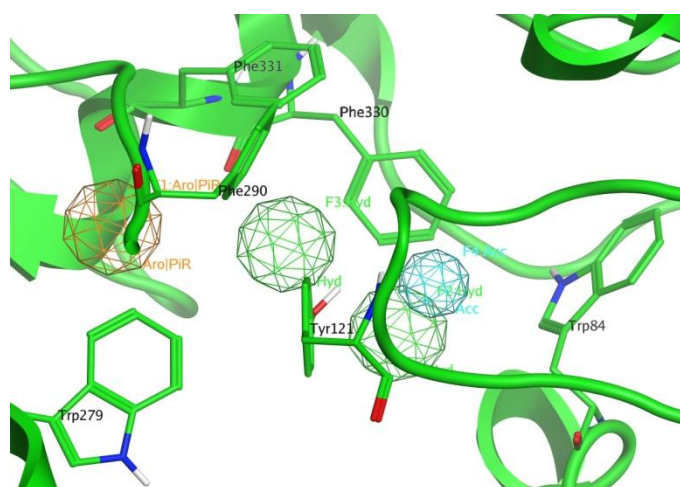


Figura 12. Correspondencia de las características del modelo farmacofórico D con el sitio activo de la AChE

De acuerdo a las características de la hendidura del sitio activo en la AChETc, el modelo farmacofórico que mejor describió a los inhibidores duales localiza a la función aromática consistentemente en el sitio periférico. La ubicación de la segunda función cíclica fue variable, debido a la distinta longitud de los IACE incluidos en este estudio, y a la posibilidad de esta segunda función de interactuar ya sea con el sitio cuaternario o con el de unión a acilo. Se observó que de manera consistente el diseño de los IACE incluye una función carbonilo que actúa como AcPH e interactuaría con la Tyr121. El esqueleto de la curcumina cumple con las características indicadas por el modelo farmacofórico, por lo que a fin de potenciar su actividad inhibitoria se plantea la inclusión de un nitrógeno protonado a pH fisiológico. El análisis de los

IACE en su forma protonada mostró que la ubicación de la carga positiva puede darse tanto en el fondo, en la parte media o en la parte superior de la hendidura del sitio activo, buscando la formación de una interacción de tipo π -catión con alguno de los aminoácidos aromáticos en los sitios correspondientes.

5.3.4. Diseño y evaluación computacional de derivados de curcumina

Se seleccionó un conjunto de grupos funcionales que permitirían la incorporación de un nitrógeno protonable ya sea en los anillos aromáticos (posición A) o en la función β -dicetona (posición B) de la curcumina. Las moléculas resultantes fueron generadas computacionalmente y los descriptores previamente definidos fueron calculados. Utilizando los siguientes criterios: MlogP 1.5-4, pKa 7-10, PM<650, ≤ 3 donadores y ≤ 6 aceptores de puente de hidrógeno; se seleccionaron las sustituciones de posible interés, generándose 17 derivados de curcumina y 14 derivados de tetrahidrocurcumina como potenciales IACE. Las sustituciones propuestas se muestran en la Figura 13, donde el nitrógeno con el pKa de interés se encuentra señalado en gris. Los valores calculados para los descriptores se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores calculados para los descriptores de los derivados de curcumina y tetrahidrocurcumina propuestos

Sustituyente	pKaExperim	Derivados de curcumina						Derivados de tetrahidrocurcumina					
		PM	Donador	Aceptor	pKa	MlogP	Dipolo	PM	Donador	Aceptor	pKa	MlogP	Dipolo
		<650	≤ 3	≤ 6	7-10	1.5-4	Debye	<650	≤ 3	≤ 6	7-10	1.5-4	Debye
C		394.46	3	6	6.2	2.18	4.26	398.5	3	6	6	2.33	2.87
D	6.86	308.33	3	6	6.7	1.52	2.89	312.37	3	6	6.5	1.67	0.48
E	9.08	408.45	3	6	7.8	1.78	5.02						
K	6.86	308.33	3	6	6.2	1.52	8.47	312.37	3	6	7	1.67	4.49
N	7.25	408.45	3	6	7.0	3.4	2.24	412.48	3	6	7.6	3.54	2.38
O	7.59	408.45	3	6	7.0	3.4	6.57	412.48	3	6	7.5	3.54	1.32
P	8.04	508.57	3	6	7.7	3.07	1.96	512.6	3	6	8.5	3.2	1.32
Q	7.99	508.57	3	6	8.7	3.07	4.63	512.6	3	6	9	3.2	4.73
R	9.44	410.43	3	8	6.2	3.1	3.13	414.46	3	8	6.8	3.24	3.68
S		410.43	3	8	6.8	1.48	3.99						
AA		367.4	4	6	9.6	1.75	5.78	371.43	4	6	9.2	1.89	3.13
AB		381.42	3	6	8.5	1.96	2.38	358.45	3	6	9	2.11	2.76
AD		368.38	3	7	6.0	2.39	1.93						
AG	9.82	396.48	3	6	8.8	1.94	3.69	400.51	3	6	9.5	2.09	5.76
AH		396.44	4	6	7.1	1.7	5.80	400.47	4	6	8	1.85	2.81
AI								357.44	2	5	9.5	2.74	3.43
AJ		354.4	3	6	10.3	2.41	6.97	358.43	3	6	10.5	2.56	7.00
AK		353.37	2	6	6.8	1.52	5.34						

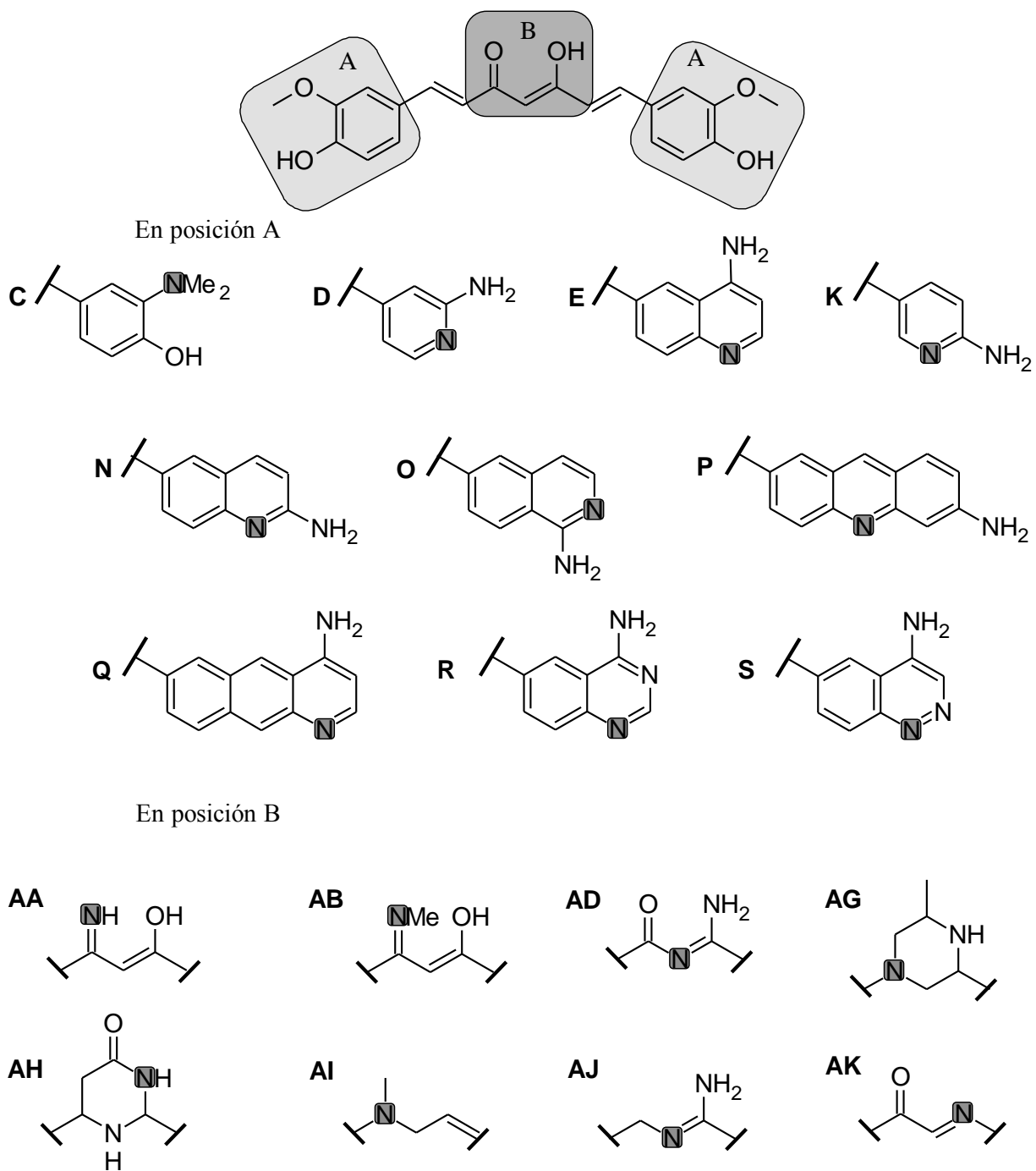


Figura 13. Sustituyentes seleccionados

Los valores para los descriptores de algunas de las moléculas elegidas se encuentran fuera de los rangos establecidos. Al representar sustituciones de interés específico, se decidió mantener dichas moléculas para su posterior evaluación computacional. Por ejemplo, la sustitución C presentó un pKa de 6.2 para el derivado de curcumina y de 6 para el derivado de tetrahydrocurcumina. Se consideró de interés el incluir esta molécula puesto que permitiría estudiar el efecto de la presencia de un grupo de mayor volumen en el anillo aromático, sin eliminar al DonPH como sucede en las moléculas acetiladas. Las sustituciones D y K permitirían analizar la importancia de la ubicación del DonPH y de la presencia de una carga positiva. Lo mismo sucede con las sustituciones E, N, O R y S, que adicionalmente presentan un anillo aromático de mayor tamaño, facilitando potencialmente la formación de interacciones de tipo aromático. Las sustituciones P y Q siguen la misma tendencia, al presentar un anillo aromático tricíclico con el DonPH en distinta ubicación. Algunas de las sustituciones en la posición B presentan otros posibles tautómeros, al igual que sucede con la curcumina. La forma tautomérica de interés, y para la que fueron calculados los descriptores, es la que se representa en la Figura 13. Únicamente en el caso de la sustitución AA, el tautómero de interés no sería el mayoritario a un pH fisiológico, de acuerdo a cálculos realizados con SPARC. Sin embargo, se decidió analizar la posible actividad de esta molécula junto con la de la sustitución AB, en las que se localiza al DonPH en posición β respecto a la carga positiva. La sustitución propuesta en AD conserva la ubicación del Ac y DonPH, ubicando la carga positiva en posición α . Mediante las sustituciones AG y AH se incluyeron ciclos, que a diferencia de los presentes en los derivados de pirazol e isoxazol, no presentan aromaticidad y modifican la ubicación de las funciones de Ac y DonPH, además de incluir una carga positiva. En los sustituyentes AI, AJ y AK, la carga positiva se incluyó sobre la cadena principal, estudiando el efecto de la carga, o de esta junto con un AcPH o un DonPH.

Siguiendo los mismos pasos descritos en la sección 4.3.1., se generaron y optimizaron las estructuras tridimensionales de las moléculas seleccionadas, asumiendo su forma protonada. La posible unión de estas moléculas con la AChE fue evaluada mediante estudios de acoplamiento molecular y mediante el modelo farmacofórico previamente seleccionado. Los resultados para ambos cálculos se muestran en la Tabla 10. Cuando la sustitución se realizó sobre el esqueleto de la curcumina la molécula se etiquetó con la inicial c y la letra asignada al sustituyente en mayúscula, mientras que para los derivados de tetrahydrocurcumina se utilizó la inicial t. En la sección 5.3.2. se concluyó que las calificaciones otorgadas por las funciones de evaluación no correlacionan con la actividad inhibitoria observada experimentalmente, por lo que estas no serán

analizadas. Se encontró una relación entre el menor tamaño y mayor número de los clusters obtenidos para las moléculas con una menor actividad biológica. En este caso para los derivados de tetrahidrocurcumina se obtuvieron clusters con un número significativamente menor de conformaciones que los derivados conjugados, incluso para tAG y tAH, indicando que la mayor flexibilidad permitiría la formación de un mayor número de complejos AChE-inhibidor, resultando probablemente en una menor actividad inhibitoria.

Tabla 10. Resultados de ensayos de acoplamiento molecular con AutoDock4 y GOLD, y evaluación con el modelo farmacofórico D

Molécula	Calificación			Puentes de hidrógeno										Contactos aromáticos					Farmacóforo	
	AutoDock (kcal/mol)	GoldScore	ChemScore	D72	G117	Y121	S122	Y130	E199	S286	F288	R289	Y334	H440	W84	W279	F330	F331		Y334
donepecilo	-7.23	67.85	45.94	*																
1	-7.50	66.09	33.44																	
3	-7.15	75.04	42.727				*													
cC	-7.32	55.45	27.29							*										o
cD	-7.45	73.45	39.54																	o
cE	-7.58	82.7	41.93							*										o
cK	-7.74	71.07	35.6																	o
cN	-8.48	77.94	38.18			*														o
cO	-8.63	91.9	41.91		*				*											o
cP	-5.92	84.77	42.07	*																o
cQ	-7.74	81.59	43.69																	o
cR	-8.58	77.26	29.47																	o
cS	-7.88	85	38.43		*				*							+				o
cAA	-8.18	79.84	40.87	*	*			*												o
cAB	-8.52	68.53	36.38																	o
cAD	-6.91	79.1	26.58	*																o
cAG	-9.04	84.02	43.29															+		o
cAH	-10.15	75.96	29.06							*										o
cAJ	-7.22	72.92	37.09		*			*												o
cAK	-7.65	73.59	32.28																+	o
tC	-7.56	62.44	22.23		*			*												o
tD	-6.3	80.16	26.99	*																o
tK	-6.67	80.16	27.32																	o
tN	-8.28	85.54	33.83																	o
tO	-8.69	94.06	31.97		*															o
tP	-7.94	90.84	41.57							*						+				o
tQ	-10.22	96.63	37.91																	o
tR	-7.12	87.13	23.78																	o
tAA	-6.27	85.81	31.08	*																o
tAB	-6.72	70.34	37.7		*			*												o
tAG	-8.28	76.6	39.98		*			*											+	o
tAH	-8.67	81.05	37.71																	o
tAI	-6.56	67.21	33.53		*			*									+			o
tAJ	-6.42	80.32	28.34																	o
				* Puente de hidrógeno mediado por agua																
				+ Interacción pi-cación																
				0-3 frecuencia de puentes de hidrógeno																

Para las moléculas diseñadas, se analizó el efecto de variar la ubicación de los Ac y DonPH y el tamaño del anillo; o de modificar la ubicación de los Ac y DonPH en la parte media de la molécula, sobre la posible formación de puentes de hidrógeno y contactos cercanos con aminoácidos aromáticos relevantes. La curcumina y el derivado **3** presentaron la mejor actividad entre las moléculas probadas. Éstas presentan la posibilidad de formar puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo ubicado en la parte inferior de la hendidura del sitio activo y Ser122 o Glu199 en el sitio cuaternario, entre el hidroxilo localizado en la parte superior de la hendidura y Phe288 y/o Arg289, y entre la función ceto-enol y Asp72 y/o Tyr334 en la parte media de la hendidura. Igualmente formaron contactos cercanos con Trp84 y/o Phe330 en el sitio cuaternario y con Trp279 en el sitio periférico. Al aumentar el volumen del AcPH en el derivado cC, se obtuvieron un mayor número de posibles conformaciones (clusters con menos individuos), entre las que se observó de manera consistente la formación de puentes de hidrógeno entre el DonPH y Glu199 en el fondo de la hendidura y con Asp72 y Tyr334 en la parte media (Figura 14a). Al aumentar la flexibilidad de la molécula esta orientación específica se pierde, pues dichos puentes de hidrógeno no fueron observados en tC, si bien los contactos con los aminoácidos aromáticos en el fondo (Trp84) y parte media (Phe330 y Tyr334) de la hendidura se mantuvieron. En base en estos resultados se esperaría que cC tenga una actividad comparable a la curcumina mientras que tC no tendría actividad de interés.

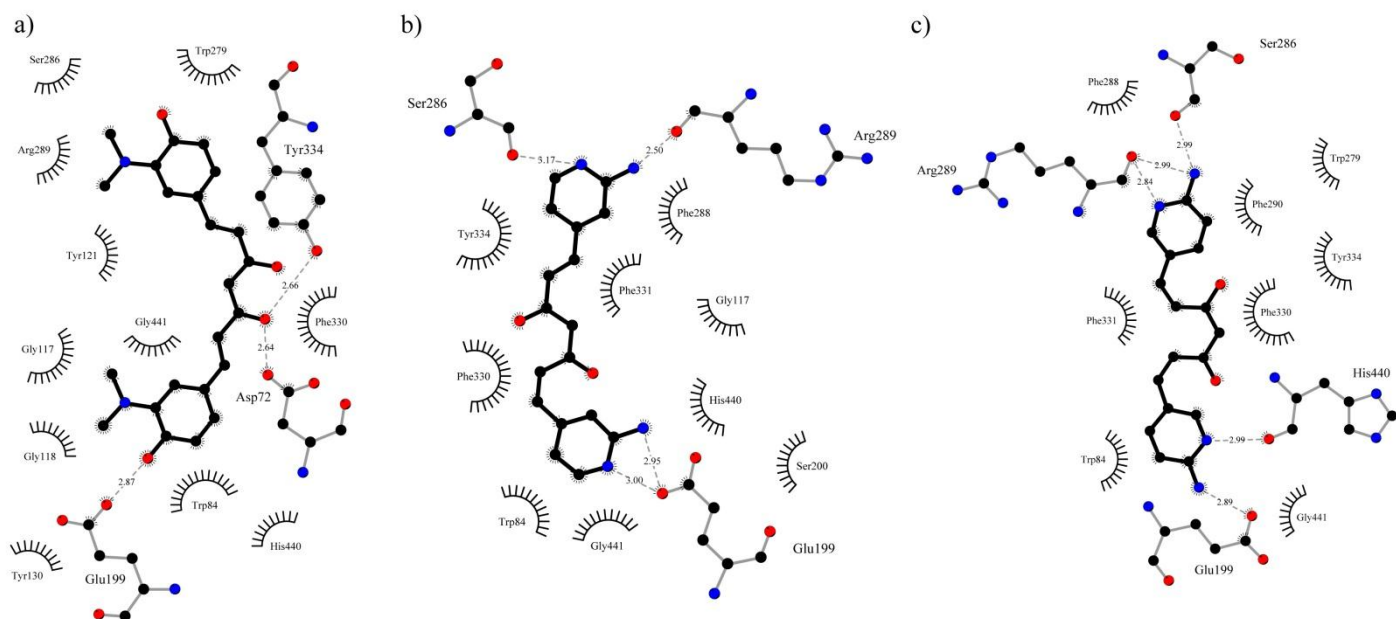


Figura 14. Interacciones entre a) cC b) cD y c) cKy los aminoácidos del sitio activo de AChETc. Los puentes de hidrógeno se representan en gris, los contactos hidrofóbicos en negro

En los derivados D y K se varió tanto la ubicación del DonPH como la de la carga positiva. Los clusters obtenidos consistieron de un número de individuos similar al obtenido para la curcumina y el resto de sus derivados, indicando una orientación preferente para los anillos aromáticos. Para el derivado cD, la ubicación del DonPH en la posición 3 permitió la formación de puentes con Ser286, mientras que el nitrógeno positivo en 4 forma una interacción potencialmente iónica con Glu199 (Figura 14b). En tD se conserva únicamente la interacción con Glu199. En ambos casos se observan contactos cercanos con los aminoácidos aromáticos de la parte inferior y media de la hendidura, más no en la parte superior. En el derivado cK el DonPH se ubica en la posición 4, al igual que en cC, y forma puentes de hidrógeno con Glu199 y Arg289 en los extremos y con Tyr334 en la parte media (Figura 14c). Por otra parte, el DonPH del derivado tK formó puentes con Ser286 y la carga positiva ubicada en 3 formó posibles interacciones iónicas con Arg289 en la parte superior. En ambos casos se forman contactos con los residuos aromáticos de las partes media e inferior, pero no en la parte superior. De acuerdo a estos resultados, el ubicar el nitrógeno protonable en la posición 4 permitiría la formación de interacciones de tipo iónico con Glu199 del sitio cuaternario de la AChE, generando un complejo potencialmente más estable con cD que con la curcumina.

Para los derivados E y N se modificó la ubicación del DonPH, conservando la ubicación de la carga positiva sobre el anillo de quinolina, que está unida al esqueleto de la curcumina en la posición 6. Para el derivado cN los clusters obtenidos consisten de un número menor de individuos, lo cuál podría ser indicativo de menor actividad. En el derivado cE, el DonPH se localiza en la posición 4 y puede formar puentes de hidrógeno con Ser286, Phe288 o Arg289 en la parte superior de la hendidura mientras que el nitrógeno positivo puede formar interacciones de tipo iónico con Tyr130 o Glu199 en la parte inferior (Figura 15a). La ubicación de los anillos aromáticos es variable, aunque en la parte superior se encuentra consistentemente formando contactos con Trp279. En el derivado cN, el DonPH ubicado en la posición 2 puede también formar puentes de hidrógeno con Ser286 o Arg289 en la parte superior o con Gly117 o Tyr130 en la parte inferior, mientras que el N⁺ no mostró interacciones (Figura 15b). El anillo aromático formó contactos con el Trp279 en la parte superior al igual que en cE, mas la ubicación del grupo amino es menos favorecedora para la formación de puentes de hidrógeno. En el caso del derivado tN el grupo amino forma puentes de hidrogeno con Tyr130 y Glu199 en la parte inferior, y con Ser286 o Arg289 en la parte superior de manera similar al derivado conjugado, mas la mayor flexibilidad le permite formar contactos tanto con Trp84 como con Trp279 (Figura 15c). Las tres moléculas pueden formar puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la función ceto-enol y

Asp72, Tyr121 o Tyr334 en la parte media de la molécula. En este caso, puede concluirse que la ubicación del DonPH en posición 4 permitiría las interacciones más favorables entre la carga positiva y el Glu199. Al igual que con el derivado cD, la ubicación de la carga positiva define las interacciones más importantes, indicando una posible actividad inhibitoria mejor a la de la curcumina. Adicionalmente, sería de interés el estudiar el equilibrio entre la mayor flexibilidad de tN y su mayor capacidad de formar interacciones estabilizantes con respecto a cN.

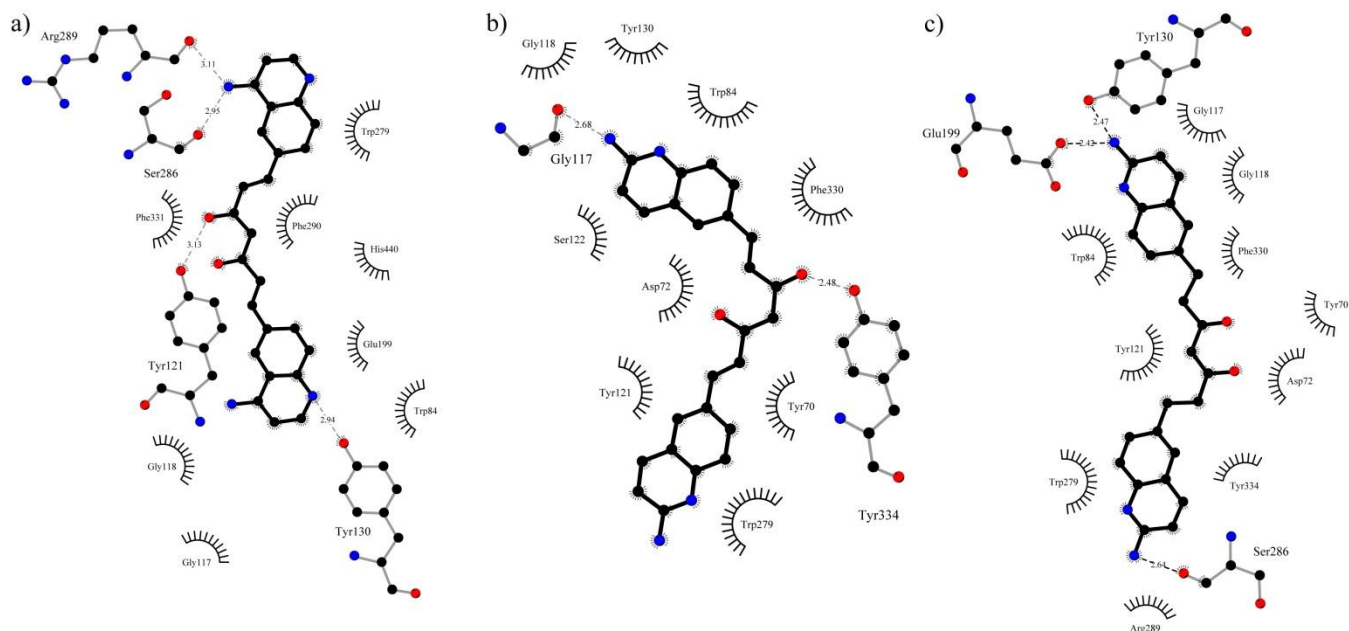


Figura 15. Interacciones entre a) cE b) cN y c) tN y los aminoácidos del sitio activo de AChETc. Los puentes de hidrógeno se representan en gris, los contactos hidrofóbicos en negro

Los derivados R y S poseen, al igual que el derivado E de quinolina, la carga en la posición 1 y el DonPH en 4. El anillo contiene un AcPH ya sea en la posición 2 (cS) o en 3 (cR). El AcPH, al ubicarse en la posición 2, forma un posible puente de hidrógeno con Tyr130; mientras que al ubicarse en la posición 3 puede interactuar tanto con Tyr130 como con Phe288. En ambos casos, el nitrógeno cargado y el grupo amino presentan prácticamente la misma ubicación en la parte inferior de la hendidura, formando puentes de hidrógeno con Gly117 y una interacción iónica con Glu199; mientras que en la parte superior la ubicación del nitrógeno positivo es distinta, formando una potencial interacción π -catión con Trp279 y puentes entre la función amino y Ser286 y Arg289 para el derivado cS (Figura 16a y Figura 16c). El derivado tR forma pocas interacciones, pues la ubicación de los anillos es significativamente distinta. Se observa la formación de una interacción iónica entre el nitrógeno positivo y Tyr130 en la parte inferior de la hendidura, y contactos aromáticos con los residuos en la parte media y superior (Figura 16b). Para estos derivados, además de la formación de una interacción iónica con Glu199 en el fondo

de la hendidura, la inclusión de un AcPH permitió la formación de mejores interacciones con Tyr130, siendo estas más consistentes en la posición 2. Adicionalmente, para cS se observó la posibilidad de formar un mayor número de interacciones en la parte superior de la hendidura, lo que indicaría que cS, con tres elementos de interés sobre el anillo aromático, representaría a la molécula con mejor actividad entre aquellas con el esqueleto de quinolina.

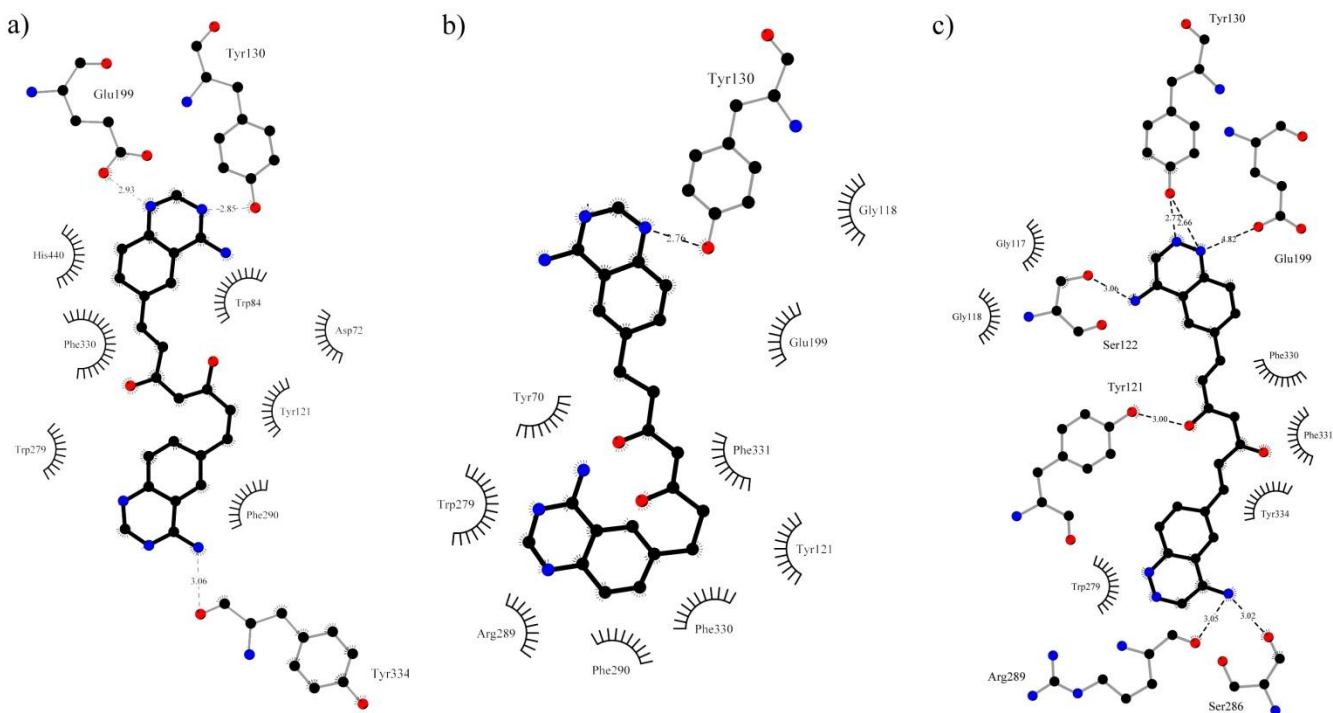


Figura 16. Interacciones entre a) cR b) tR y c) cS y los aminoácidos del sitio activo de AChEtc. Los puentes de hidrógeno se representan en gris, los contactos hidrofóbicos en negro

En el derivado O se propuso un anillo de isoquinolina unido en la posición 6 al esqueleto de la curcumina, modificando así la ubicación de la carga positiva y localizando al DonPH en la posición 1. La carga positiva forma posibles interacciones iónicas con Ser286 al tiempo que el DonPH forma puentes con Arg289 en la parte superior, mientras que en la parte inferior se observan puentes de hidrógeno con Glu199 y Gly117, y posibles interacciones iónicas con Tyr130. La ubicación del anillo en la parte superior de la hendidura no permitió la formación de contactos cercanos con residuos aromáticos, mas estos se observan tanto en la parte inferior como media, donde adicionalmente se forman puentes de hidrógeno entre la función ceto-enol y Asp72 y Tyr334. Los clusters observados para el derivado tO están formados por un número de individuos por arriba del promedio para los derivados de tetrahydrocurcumina, lo cual podría ser indicativo de una mejor actividad biológica con respecto a los mismos. En este caso nuevamente se observa la posible interacción iónica con Ser286, mas puede también formarse con Glu199, al

tiempo que se forman posibles puentes de hidrógeno entre el DonPH y Tyr130 o Arg289. Al igual que en el caso de cN, la mayor flexibilidad del derivado de tetrahidrocurcumina con respecto al conjugado le permite formar contactos cercanos con los residuos de la parte inferior, media y superior de la hendidura. La ubicación de la carga positiva sobre un anillo de isoquinolina con respecto a los derivados de quinolina con sólo un DonPH podría ser más adecuada en el caso que el ambiente de la hendidura y la distancia con la carga positiva influyeran sobre el pKa de estos aminoácidos⁹³ a modo de facilitar la desprotonación de la Tyr130 o de la Ser286, permitiendo la formación de interacciones iónicas tanto en la parte inferior como en el sitio periférico de la hendidura. Un siguiente paso en el diseño de estos derivados sería el añadir un AcPH al anillo de isoquinolina, a fin de examinar si esto podría mejorar la formación de puentes de hidrógeno en este tipo de compuestos como ocurrió con los derivados de quinolina.

Se analizó el efecto de incorporar anillos aromáticos de mayor tamaño en la posición A de la curcumina, variando la ubicación de la función amino y de la carga positiva. El derivado cP, basado en un anillo de acridina unido al esqueleto de la curcumina en la posición 7, presenta la carga en el anillo medio y el DonPH en la posición 3. Este puede formar puentes de hidrógeno con Tyr130 y con Glu199. El anillo de mayor tamaño forma un contacto cercano con el Trp279 en el sitio periférico, pero no permite la formación de puentes de hidrógeno en esta zona (Figura 17a). Al aumentar la flexibilidad de la molécula, tP forma contactos cercanos con Trp84 además de los puentes de hidrógeno con Tyr130 y Glu199; mientras que en el sitio periférico la orientación del anillo permitiría la presencia de una interacción de tipo π -catión con Trp279 (Figura 17b). El derivado cQ consiste de un anillo de benzo[g]quinolina unido al esqueleto de la curcumina en la posición 7, en que la carga positiva se localiza en la posición 1 y el DonPH en 4. En este caso es el nitrógeno positivo el que interactúa con Tyr130, mientras que el DonPH no forma interacción alguna (Figura 17c). Al igual que en cP, se forman contactos aromáticos únicamente en la parte media y superior de la hendidura del sitio activo. A diferencia de tP, tQ no formo puentes de hidrógeno, aunque si contactos cercanos a lo largo de la hendidura. A partir de las conformaciones obtenidas para estas moléculas, puede concluirse que el tamaño de los anillos tuvo un impacto negativo sobre la capacidad de las moléculas de optimizar la formación de puentes de hidrógeno. Si bien la cavidad del sitio activo de la AChE posee un volumen suficiente para permitir la unión de inhibidores con dos anillos de acridina, como se observa en la estructura cristalográfica de los derivados de bis-tacrina⁸⁷, la unión de estos anillos en la posición 7 en vez de 9 al esqueleto de la curcumina impidió a la molécula adoptar la conformación necesaria. Por

ello, no se espera observar una actividad inhibitoria significativa para estas moléculas.

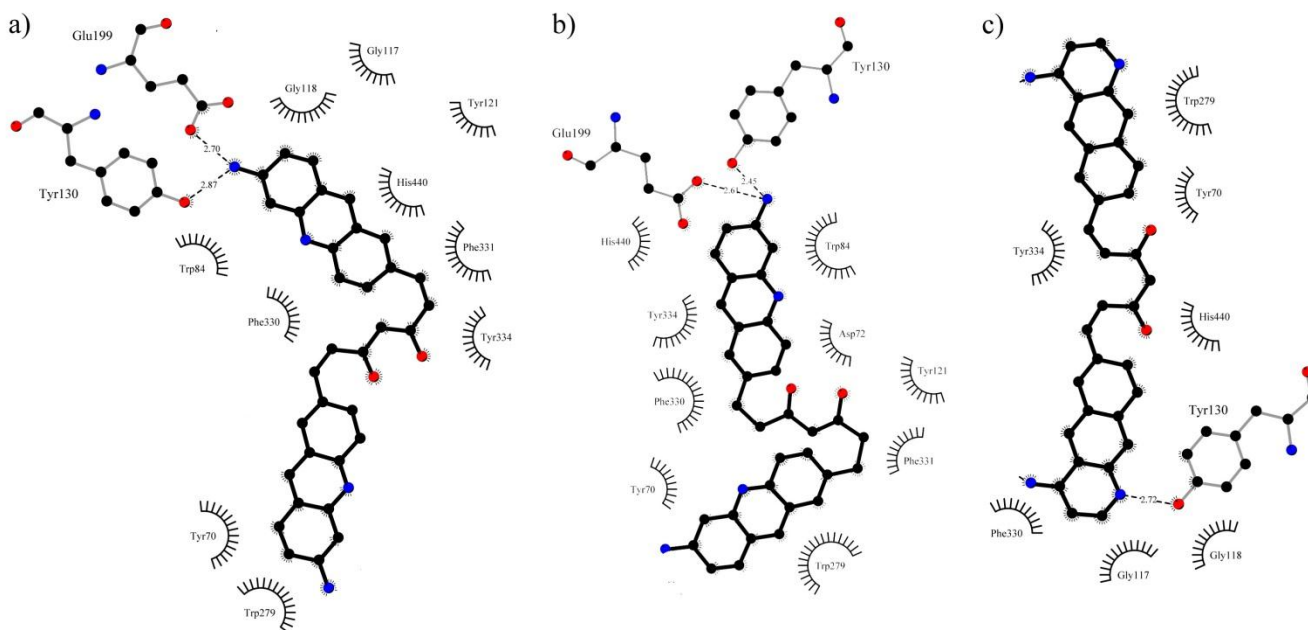


Figura 17. Interacciones entre a) cP b) tP y c) cQ y los aminoácidos del sitio activo de AChETc. Los puentes de hidrógeno se representan en gris, los contactos hidrofóbicos en negro

Por otra parte, se realizaron modificaciones a la función ceto-enol en la parte media de la curcumina, buscando igualmente incorporar una carga positiva. Para los derivados cAA, cAB y cAD se conservó la ubicación del DonPH esperando repetir la formación de los puentes de hidrógeno con Asp72 o Tyr334 observados para **1** y **3**. En el caso de cAA se observa la formación de puentes de hidrógeno mediados por agua e interacciones iónicas con Asp72. Es posible la formación de puentes de hidrógeno en la parte inferior de la hendidura con Gly117, Tyr130 o Glu199, además de la formación de contactos cercanos con Trp84 y con Phe330. Adicionalmente se forman puentes de hidrógeno entre el hidroxilo de la parte superior y Phe288 y Arg289 (Figura 18a). El derivado tAA formó puentes de hidrógeno mediados por agua con Asp72 en la parte media, así como contactos cercanos con Tyr334. En los extremos de la hendidura la función hidroxilo puede interactuar con Glu199, Phe288 o Arg289, mas la flexibilidad de la molécula genera poca consistencia en estas interacciones. El derivado cAB también puede formar interacciones con Asp72, tanto con la función hidroxilo como con el nitrógeno cargado. Adicionalmente forma posibles interacciones iónicas con Tyr334. De manera similar a cAA, la molécula forma puentes de hidrógeno con Gly117, Tyr130, Glu199, Phe288 y Arg289, además de formar puentes con Ser286 y contactos cercanos con Trp84 y Tyr334 (Figura 18b). En tAB se observa también la posibilidad de interacciones por parte del hidroxilo y del nitrógeno cargado con Asp72, y de formación de puentes de hidrógeno en los extremos de la

hendidura del sitio activo, si bien estos tienen poca frecuencia de aparición. En este caso se forman además contactos cercanos con Trp279 en el sitio periférico. Por otra parte en cAD se conservó además la presencia del AcPH, incorporando una carga positiva entre ellos. El DonPH formó interacciones con Asp72 y con Tyr334 en la parte media de la hendidura, mientras que la carga positiva no presentó interacción con residuo alguno. Adicionalmente, se observaron puentes de hidrógeno con Tyr130 y Glu199, Phe288 y Arg289 en los extremos de la hendidura, además de contactos cercanos con Trp84, Phe330 y Tyr334 (Figura 18c). En estos tres casos, la formación de puentes de hidrógeno y contactos cercanos con los aminoácidos aromáticos de interés siguió un patrón similar. En ninguno de los compuestos se observó la formación de interacciones de tipo π -catión; mas en AA y AB la ubicación de la carga positiva permitió la formación de interacciones iónicas con Asp72, observándose esta con mayor consistencia para cAB, donde además interactúa con Tyr334. Esto puede deberse a que el mayor volumen del N-metilo ayudaría a orientar dicha interacción. Por ello se propone que cAB tendrá una potencial actividad inhibitoria superior a la de la curcumina.

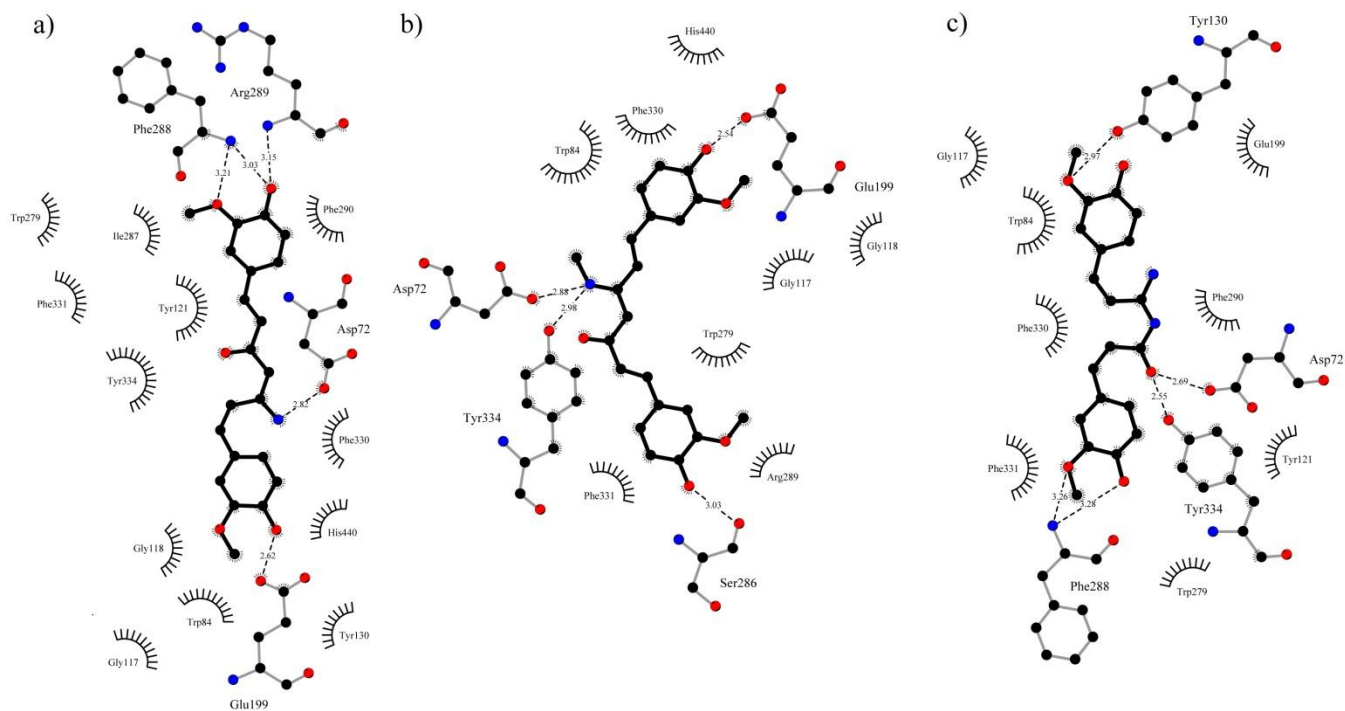


Figura 18. Interacciones entre a)cAA b) cAB y c) cAD y los aminoácidos del sitio activo de AChETc. Los puentes de hidrógeno se representan en gris, los contactos hidrofóbicos en negro

En el caso del derivado cAG, en que se incorporó una función cíclica, se observan distintas conformaciones. En una de ellas la carga positiva forma una interacción iónica con Tyr121, mientras que en la otra se observa una interacción de tipo π -catión con Phe330 mientras que la

función amino forma un puente de hidrógeno con Tyr121 en la parte media de la hendidura del sitio activo. Adicionalmente se forman puentes de hidrógeno con Tyr130, Glu199, Ser286, Phe288 o Arg289 y contactos con Trp84 y Tyr334 (Figura 19a). Para el derivado tAG la carga positiva puede ubicarse ya sea formando una interacción iónica con Asp72 o una interacción tipo π -catión con Phe331, además de la posible formación de puentes de hidrógeno en los extremos de la hendidura (Figura 19b). Por otra parte, para el derivado cAH, el cual además tiene un AcPH, la ubicación de la carga positiva y del AcPH no permiten que estos grupos formen interacción alguna, mientras que el DonPH forma puentes con Asp72. Se observan puentes de hidrógeno con Glu199 y Phe288 en los extremos y contactos cercanos en las partes inferior, media y superior (Figura 19c). Al ser más flexible, la carga positiva en tAH puede interactuar con Asp72 mientras que ni el Ac ni el DonPH forman interacciones. Además se forman puentes y contactos con los residuos de la parte superior. Para estas moléculas se obtuvieron conformaciones que formaron interacciones en la parte media de la hendidura con mayor consistencia que lo observado para **3**, logrando incluso la formación de una interacción de tipo π -catión en cAG. Gracias a ello, y a la formación de puentes de hidrogeno en los extremos de la hendidura, se esperaría que la actividad inhibitoria de cAG sea mayor que la de **3**, y que la actividad de tAG sea mejor que la de **7**.

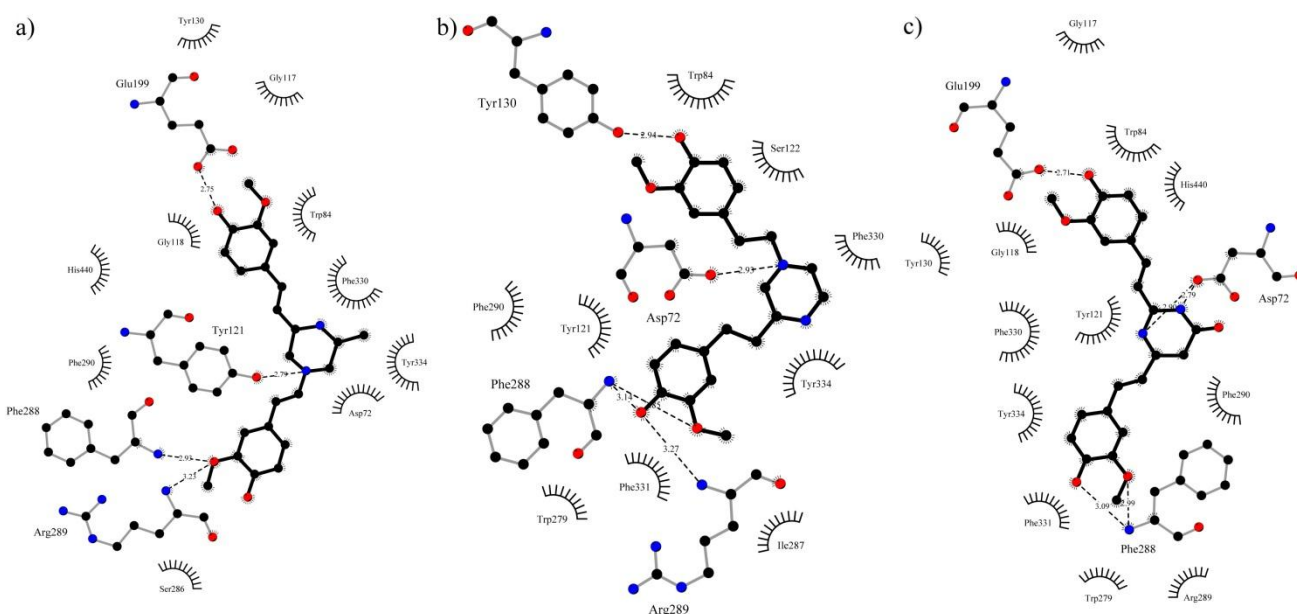


Figura 19. Interacciones entre a)cAG b) tAG y c) cAH y los aminoácidos del sitio activo de AChETc. Los puentes de hidrógeno se representan en gris, los contactos hidrofóbicos en negro

En el caso del derivado tAI se eliminó la presencia de los Ac y DonPH dejando únicamente una carga positiva. La carga positiva formó posibles interacciones π -catión con Phe330, además de puentes de hidrógeno principalmente en la parte inferior de la hendidura y contactos

aromáticos en las partes media y superior (Figura 20a). Para las moléculas en que se combina la presencia de una carga positiva con un DonPH o AcPH se observó que la carga positiva en cAJ no formó interacción alguna, mientras que el grupo DonPH puede formar puentes con Asp72. Los grupos hidroxilo en los extremos forman puentes con Gly117, Tyr130, Glu199, Phe288 o Arg289, además que se observan contactos cercanos con los aminoácidos de las partes media e inferior (Figura 20b). Por su parte tAJ forma una posible interacción iónica con Asp72, si bien esta se observa con menor frecuencia que en cAJ. Adicionalmente se observan puentes de hidrógeno con Glu199, Phe288 y Arg289, además de contactos cercanos con Trp84, Phe330 y Trp279. En estos casos la ubicación de la carga y el grupo amino fue muy variable. El derivado cAK forma una posible interacción iónica entre el nitrógeno positivo y Asp72, mientras que el AcPH forma un posible puente de hidrógeno con Tyr334. Adicionalmente se forman puentes de hidrógeno con Glu199 en la parte inferior y Phe288 y Arg289 en la parte superior, además de la formación de contactos con Trp84, Phe330, Trp279 y una posible interacción π -catión con Tyr334 (Figura 20c). En estos casos, la presencia de la carga positiva en posición β respecto a un AcPH brinda la posibilidad de formar interacciones de tipo iónico, mientras que la ubicación de la carga en posición α a un DonPH no permitió la formación de interacciones por parte de la carga positiva. El mismo resultado se observó para cAD, en que la carga positiva se ubicó en posición α entre el Don y el AcPH. Es además interesante mencionar que únicamente para los derivados de AJ las moléculas no fueron reconocidas como potenciales IACE, pues en este caso la ubicación de las funciones no permite la localización correcta de todas las características correspondientes en el modelo farmacofórico.

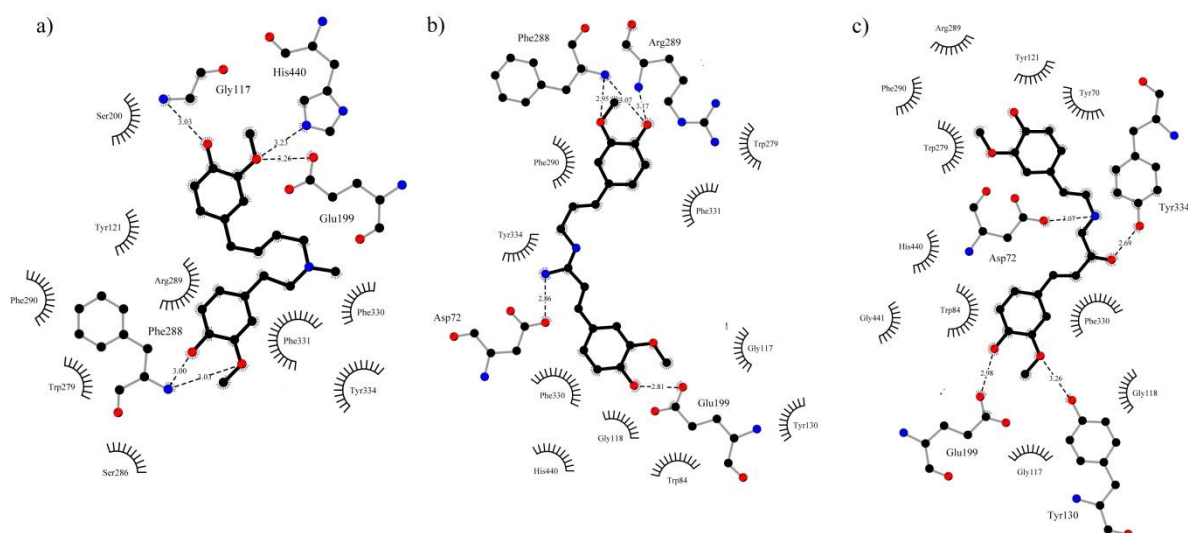


Figura 20. Interacciones entre a)tAJ b) cAJ y c) cAK y los aminoácidos del sitio activo de AChETc. Los puentes de hidrógeno se representan en gris, los contactos hidrofóbicos en negro

De acuerdo al análisis computacional llevado a cabo con los derivados de curcumina diseñados, se propone que los derivados cD, cE, cS, cAB, cAG y cAK presentarían actividad inhibitoria contra la AChE superior a la observada para la curcumina. Esto se lograría al incluir una carga positiva en los anillos aromáticos, permitiendo la formación de interacciones iónicas con el Glu199 del sitio cuaternario e interacciones tipo π -catión con el Trp279 en el sitio periférico, además de los puentes de hidrógeno previamente calculados para la curcumina. Otra alternativa sería incluir una carga positiva en la parte media de la molécula, en las posiciones equivalentes a la función ceto-enol de la curcumina, de modo que puedan formarse interacciones iónicas con el Asp72 del sitio periférico o de tipo π -catión con Phe330 o con Tyr334, al tiempo que se conservan los puentes de hidrógeno calculados en la parte inferior y superior de la hendidura del sitio activo de la AChE.

6. CONCLUSIONES

A partir del trabajo de síntesis, evaluación enzimática y cálculos computacionales realizados se desprenden las siguientes conclusiones:

- Basados en la observación de la actividad inhibitoria de la curcumina, y de su modificación en la intensidad de fluorescencia del complejo con la acetilcolinesterasa, se concluye que ésta interactúa con el triptófano del sitio periférico.
- La acetilación de los grupos hidroxilo, el aumento en la flexibilidad de las moléculas, la disminución de la longitud de las moléculas y la eliminación del donador de puentes de hidrógeno en la parte media de la molécula tienen un impacto negativo en la actividad inhibitoria *in vitro* de los derivados de curcumina
- El nitrógeno protonable presente en los inhibidores de acetilcolinesterasa debe tener un pKa entre 7.4 y 9.8, mientras que los valores de logP deben estar entre 1.5 y 4.0.
- La curcumina y sus derivados **2-4**, **7**, **8**, y **12** presentarían buena biodisponibilidad a nivel del sistema nervioso central en base a sus características de liposolubilidad, peso molecular y número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno.
- La presencia de donadores de puentes de hidrogeno en la curcumina y sus derivados es importante para la formación de los complejos con la acetilcolinesterasa.
- La distancia entre los anillos aromáticos en la curcumina y sus derivados es adecuada para la interacción con los residuos aromáticos tanto del sitio cuaternario como del periférico.
- La mejor descripción farmacofórica para los inhibidores de acetilcolinesterasa que incluye a la curcumina y los derivados **2-4**, **7**, **8**, y **12**, consiste de una característica aromática, un aceptor de puente de hidrógeno y dos características hidrofóbicas.
- Los 31 derivados de curcumina propuestos como inhibidores de la acetilcolinesterasa tendrían buena biodisponibilidad a nivel sistema nervioso central de acuerdo a su liposolubilidad, peso molecular y número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno.

- Se seleccionaron, de entre las 31 moléculas diseñadas, los 6 derivados de curcumina capaces de formar el mayor número de puentes de hidrógeno e interacciones iónicas o de tipo π -catión con la acetilcolinesterasa.
- La hipótesis inicial fue confirmada, pues las características incorporadas en estas 6 moléculas permite la formación de complejos más estables con la acetilcolinesterasa, generando así derivados de curcumina con mejor capacidad inhibitoria que la curcumina.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Secretaria de Salud, M. *México Sano* **2010**, 3.
- (2) Strassnig Martin; Ganguli, M. *Psychiatry* **2005**, 2, 30–33.
- (3) Alzheimer's Disease Education & Referral Center, N. I. of H. *Alzheimer's disease. Fact Sheet*; 2011; Vol. 7, p. 8.
- (4) Selkoe, D. J. *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 741–766.
- (5) Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, 297, 353–356.
- (6) Skovronsky, D. M.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q. *Annu. Rev. Pathol.: Mech. Dis.* **2006**, 1, 151–170.
- (7) Sambamurti, K.; Suram, A.; Venugopal, C.; Prakasam, A.; Zhou, Y.; Lahiri, D. K.; Greig, N. H. *Curr. Alzheimer Res.* **2006**, 3, 81–90.
- (8) Small, S.; Duff, K. *Neuron* **2008**, 60, 534–542.
- (9) Castro, A.; Conde, S.; Rodríguez-Franco, M. I.; Martínez, A. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2002**, 2, 37–50.
- (10) Hüll, M.; Berger, M.; Heneka, M. *Drugs* **2006**, 66, 2075–2093.
- (11) Carter, M. D.; Simms, G. a; Weaver, D. F. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, 88, 475–486.
- (12) Nachmansohn, D.; Wilson, I. B. *Method. Enzymol.* **1955**, 1, 642–651.
- (13) Cygler, M.; Schrag, J. D.; Sussman, J. L.; Harel, M.; Silman, I.; Gentry, M. K.; Doctor, B. P. *Protein Sci.* **1993**, 2, 366–382.
- (14) Sussman, J. I.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. *Science* **1991**, 253, 872–879.
- (15) Felder, C. E.; Botti, S. A.; Lifson, S.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Mol. Graphics Modell.* **1997**, 15, 318–327.
- (16) Harel, M.; Quinn, D. M.; Nair, H. K.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2340–2346.
- (17) Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 9031–9035.
- (18) Zimmerman, G.; Soreq, H. *Cell Tissue Res.* **2006**, 326, 655–669.
- (19) Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Beer, B.; Lippa, a S. *Science* **1982**, 217, 408–417.
- (20) Camps, P.; Muñoz-Torrero, D. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2002**, 2, 11–25.
- (21) Tønnesen, H. H. In *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health I. Analysis, Occurrence, and Chemistry*; Ho, C.-T.; Lee, C. Y.; Huang, M.-T., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, 1992; Vol. 506, pp. 143–153.
- (22) Ammon, H. P.; Wahl, M. A. *Planta Med.* **1991**, 57, 1–7.

- (23) Chattopadhyay, I.; Biswas, K.; Bandyopadhyay, U.; Banerjee, R. K. *Curr. Sci.* **2004**, *87*, 44–53.
- (24) Hsu, C.-H.; Cheng, A.-L. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *595*, 471–480.
- (25) Lin, J.-K. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *595*, 227–243.
- (26) Thangapazham, R. L.; Sharma, A.; Maheshwari, R. K. *AAPS J.* **2006**, *8*, E443–E449.
- (27) Osawa, T.; Sugiyama, Y.; Inayoshi, M.; Kawakishi, S. In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II: Teas, Spices and Herbs*; Ho, C. T.; Osawa, T.; Huang, M. T.; Rosen, R. T., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, 1994; Vol. 547, pp. 183–193.
- (28) Sharma, O. P. *Biochem. Pharmacol.* **1976**, *25*, 1811–1812.
- (29) Jiao, Y.; Wilkinson, J. I.; Pietsch, E. C.; Buss, J. L.; Wang, W.; Planalp, R.; Torti, F. M.; Torti, S. V. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 1152–1160.
- (30) Kempaiah, R. K.; Srinivasan, K. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, *17*, 471–478.
- (31) Liu, Y. In *Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties*; Risch, S. J.; Ho, C. T., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, 1997; pp. 199–205.
- (32) Park, S. Y.; Kim, D. S. H. L. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1227–1231.
- (33) Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *75*, 742–750.
- (34) Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5892–5901.
- (35) Garcia-Alloza, M.; Borrelli, L. A.; Rozkalne, A.; Hyman, B. T.; Bacskai, B. J. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1095–1104.
- (36) Lim, G. P.; Chu, T.; Yang, F.; Beech, W.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8370–8377.
- (37) Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberger, S.; K, B.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen, S.; Mandelkow, E.; Schmidt, B. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 165–172.
- (38) Ahmed, T.; Gilani, A.-H. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2009**, *91*, 554–559.
- (39) Feng, J.-Y.; Liu, Z.-Q. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11041–11046.
- (40) Mishra, S.; Karmodiya, K.; Surolia, N.; Surolia, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2894–2902.
- (41) Lozada, M. C.; Enríquez, R. G.; Lobato, C. E.; Ortiz, B.; Soriano, M.; Gnecco, D.; Reynolds, W. F. *Heterocycles* **2005**, *65*, 49–58.
- (42) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–90.
- (43) Hilal, S. H.; Karickhoff, S. W.; Carreira, L. A. *Quant. Struct. Act. Relat.* **1995**, *14*, 348–355.
- (44) Moriguchi, I.; Hirono, S.; Nakagome, I.; Hirano, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 976–978.

- (45) Tetko, I. V.; Gasteiger, J.; Todeschini, R.; Mauri, A.; Livingstone, D.; Ertl, P.; Palyulin, V. a; Radchenko, E. V.; Zefirov, N. S.; Makarenko, A. S.; Tanchuk, V. Y.; Prokopenko, V. V. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2005**, *19*, 453–463.
- (46) Parimita, S. P.; Ramshankar, Y. V.; Suresh, S.; Guru Row, T. N. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2007**, *63*, o860–o862.
- (47) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03, Revision E.01.
- (48) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43–53.
- (49) Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Structure* **1999**, *7*, 297–307.
- (50) Dolinsky, T. J.; Nielsen, J. E.; McCammon, J. A.; Baker, N. A. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W665–7.
- (51) Sanner, M. F. *J. Mol. Graphics Mod.* **1999**, *17*, 57–61.
- (52) Anderani, A.; Cavalli, A.; Granaiola, M.; Guardigli, M.; Leoni, A.; Locatelli, A.; Morigi, R.; Rambaldi, M.; Recanatini, M.; Roda, A. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4011–4014.
- (53) Contreras, J. M.; Parrot, I.; Sippi, W.; Rival, Y. M.; Wermuch, C. F. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2707–2718.
- (54) Guillou, C.; Mary, A.; Renko, D. Z.; Gras, E.; Thal, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *10*, 637–639.
- (55) Mary, A.; Renko, D. Z.; Guillou, C.; Thal, C. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1835–1850.
- (56) Sauvaitre, T.; Barlier, M.; Herlem, D.; Gresh, N.; Chiaroni, A.; Guenard, D.; Guillou, C. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5311–5323.
- (57) Tang, H.; Ning, F.-X.; Wei, Y.-B.; Huang, S.-L.; Huang, Z.-S.; Chan, A. S.-C.; Gu, L.-Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3765–3768.
- (58) Zhou, X.; Wang, X.-B.; Wang, T.; Kong, L.-Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8011–8021.
- (59) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (60) Babu, K.; Rajasekharan, K. *OPPI Briefs* **1994**, *26*, 674–677.

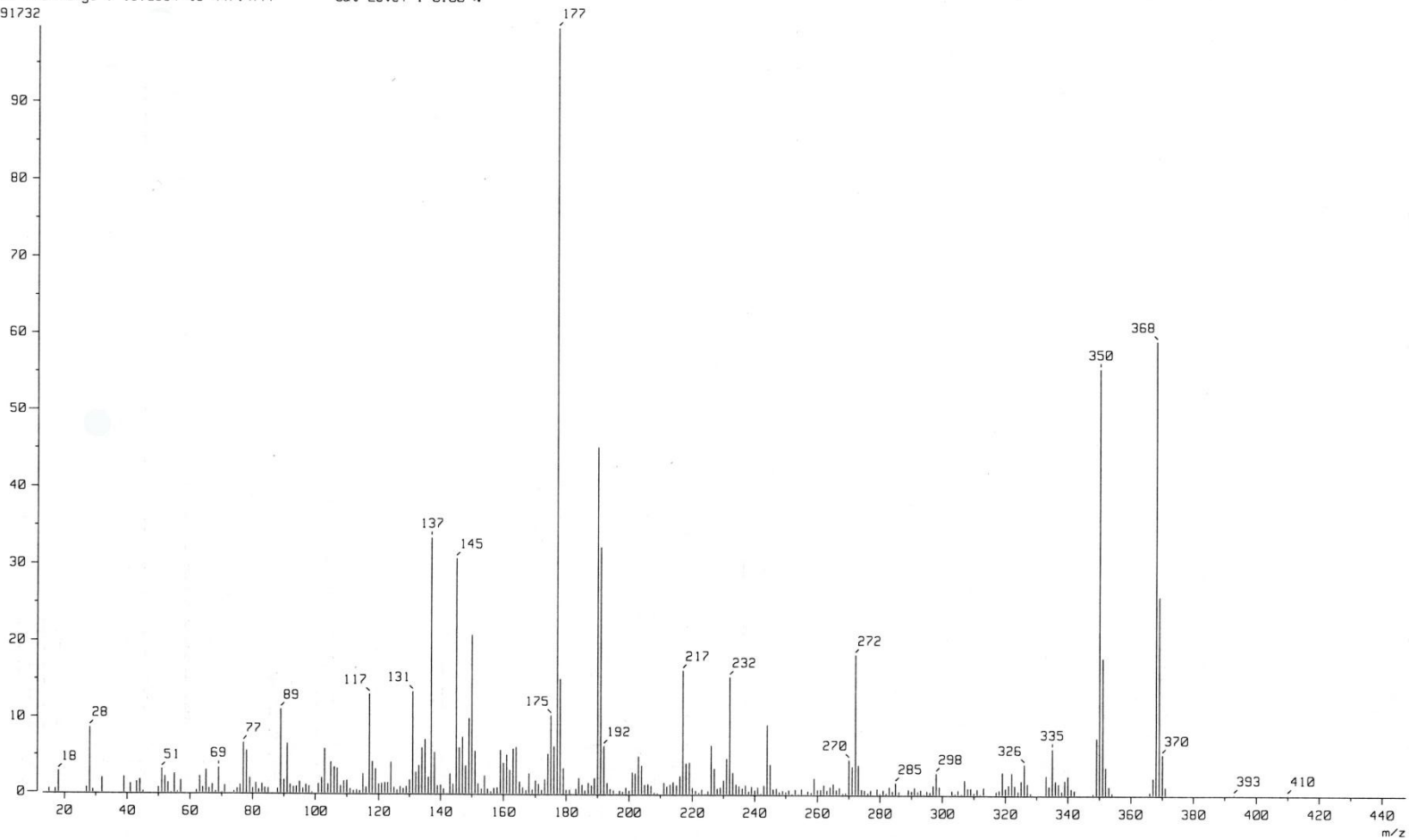
- (61) Venkateswarlu, S.; Ramachandra, M. S.; Subbaraju, G. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6374–80.
- (62) Flynn, D. L.; Belliotti, T. R.; Boctor, A. M.; Connor, D. T.; Kostlan, C. R.; Nies, D. E.; Ortwine, D. F.; Schrier, D. J.; Sircar, J. C. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 518–525.
- (63) Amolins, M. W.; Peterson, L. B.; Blagg, B. S. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 360–367.
- (64) Greenblatt, H. M.; Kryger, G.; Lewis, T.; Silman, I.; Sussman, J. L. *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 321–326.
- (65) Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*; Springer Verlag: Boston, Massachusetts, 2006; pp. 529–575.
- (66) Szabo, A. G. In *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry*; Gore, M. G., Ed.; Oxford University Press: New York, 2000; pp. 33–68.
- (67) Royer, A. In *Methods Mol. Biol.*; 1995; Vol. 40, pp. 65–89.
- (68) Wu, C.; Yang, J. *Mol. Pharmacol.* **1989**, *35*, 85–92.
- (69) Rodger, A.; Ismail, M. In *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry*; Gore, M., Ed.; Oxford University Press: New York, 2000; pp. 99–139.
- (70) Lombardo, F.; Obach, R. S.; Shalaeva, M. Y.; Gao, F. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1242–1250.
- (71) Wishart, D. S.; Knox, C.; Guo, A. C.; Cheng, D.; Shrivastava, S.; Tzur, D.; Gautam, B.; Hassanali, M. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D901–D906.
- (72) Correa-Basurto, J.; Espinosa-Raya, J.; Vázquez-Alcántara, I.; Flores-Sandoval, C. A.; Trujillo-Ferrara, J. *Chem.-Biol. Interact.* **2005**, *157-158*, 368–369.
- (73) Carotti, A.; de Candia, M.; Catto, M.; Borisova, T. N.; Varlamov, A. V.; Méndez-Alvarez, E.; Soto-Otero, R.; Voskressensky, L. G.; Altomare, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7205–7212.
- (74) Camps, P.; Cusack, B.; Mallender, W. D.; Achab, R. E. L.; Morral, J.; Noz-torrero, D. M. U.; Rosenberry, T. L. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 409–417.
- (75) Patani, G. a; Pang, Y. P.; Chien, Y. W. *Pharm. Dev. Technol.* **2005**, *10*, 525–538.
- (76) Tripathi, R. P.; Verma, S. S.; Pandey, J.; Agarwal, K. C.; Chaturvedi, V.; Manju, Y. K.; Srivastva, a K.; Gaikwad, A.; Sinha, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5144–5147.
- (77) Ishihama, Y.; Nakamura, M.; Miwa, T.; Kajima, T.; Asakawa, N. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 933–942.
- (78) Nogrady, T.; Weaver, D. F. *Medicinal Chemistry: a Molecular and Biochemical Approach*; 3^o ed.; Oxford University Press: New York, 2005; p. 649.
- (79) Silverman, R. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; 2nd ed.; Elsevier: Burlington, 2004; p. 617.
- (80) Ligeret, H.; Barthélémy, S.; Bouchard Doulakas, G.; Carrupt, P.-A.; Tillement, J.-P.; Labidalle, S.; Morin, D. *FEBS Lett.* **2004**, *569*, 37–42.

- (81) Rathore, R.; Jain, J. P.; Srivastava, A.; Jachak, S. M.; Kumar, N. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *46*, 374–380.
- (82) Bourne, Y.; Grassi, J.; Bougis, P. E.; Marchot, P. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30370–30376.
- (83) Larkin, M. a; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. a; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2007**, *23*, 2947–2948.
- (84) Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W695–W699.
- (85) Koellner, G.; Kryger, G.; Millard, C. B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Steiner, T. *J. Biol. Chem.* **2000**, *296*, 713–735.
- (86) Raves, M.; Harel, M.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Kozikowski, A. P.; Sussman, J. L. *Nature Str. Biol.* **1997**, *4*, 57–63.
- (87) Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M.; Shaya, D.; Williams, L. D.; Carlier, P. R.; Pang, Y.-P.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491–5500.
- (88) Wong, D. M.; Greenblatt, H. M.; Dvir, H.; Carlier, P. R.; Han, Y. F.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 363–373.
- (89) Cross, J. B.; Thompson, D. C.; Rai, B. K.; Baber, J. C.; Fan, K. Y.; Hu, Y.; Humblet, C. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1455–1474.
- (90) Leach, A. R.; Shoichet, B. K.; Peishoff, C. E. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5851–5855.
- (91) Plewczynski, D.; Łażniewski, M.; Augustyniak, R.; Ginalski, K. *J. Comp. Chem.* **2011**, *32*, 742–755.
- (92) Warren, G. L.; Andrews, C. W.; Capelli, A.-M.; Clarke, B.; LaLonde, J.; Lambert, M. H.; Lindvall, M.; Nevins, N.; Semus, S. F.; Senger, S.; Tedesco, G.; Wall, I. D.; Woolven, J. M.; Peishoff, C. E.; Head, M. S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5912–31.
- (93) Harris, T.; Turner, G. *IUBMB Life* **2002**, *53*, 85–98.

8. ANEXOS

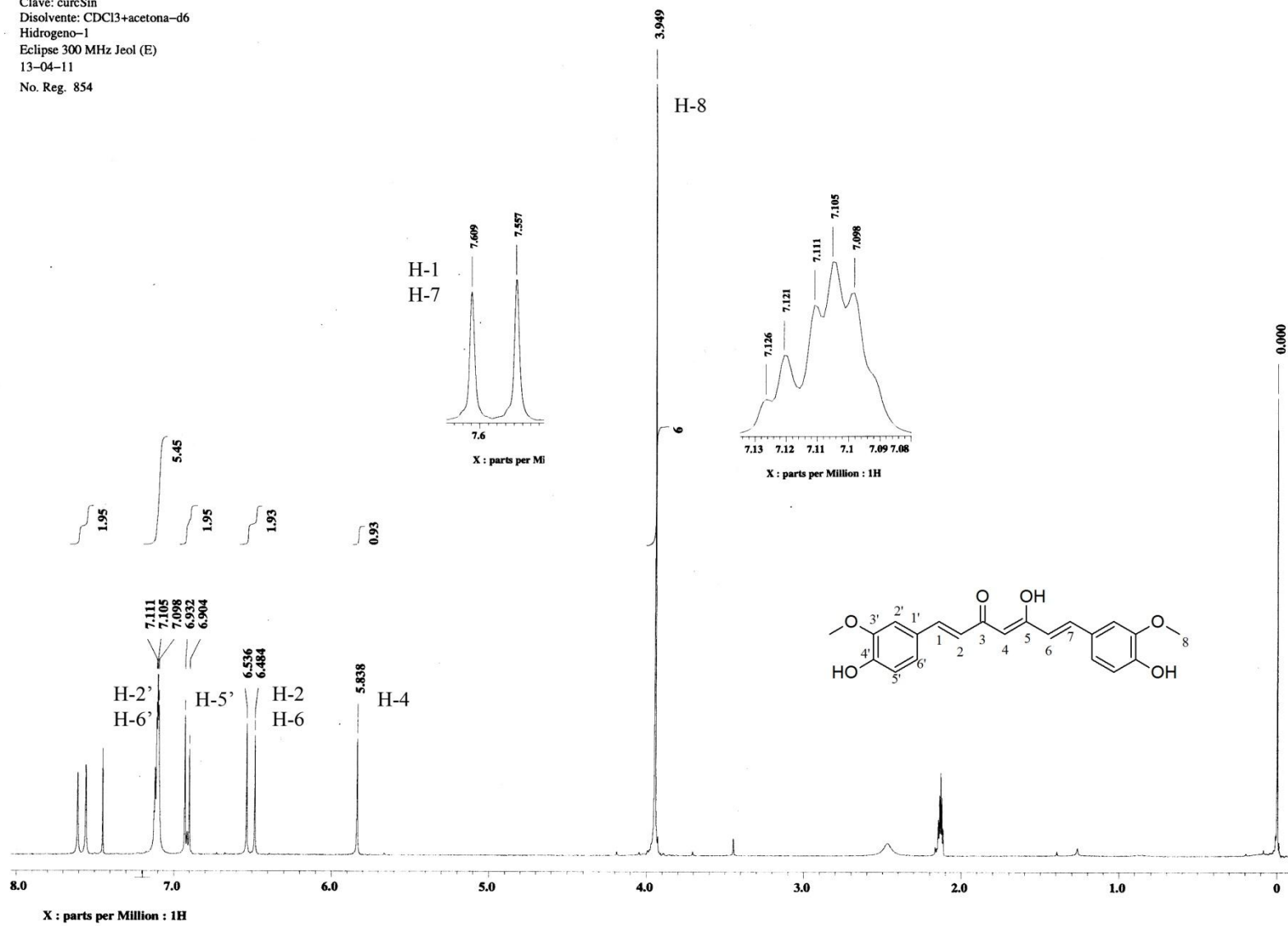
8.1. Espectros

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Soriano-Manuel-055 Date : 07-Apr-2011 12:54
Sample: 792 cureSin IE3 Jeol FX505HR
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 2.80 min Scan# : (82,185)
BP : m/z 177.0000 Int. : 381.79
Output m/z range : 13.0564 to 447.4777 Cut Level : 0.00 %
3991732



Espectro1. Espectro de masas de la curcunina

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, app
 Dr. Manuel Soriano
 Clave: curSin
 Disolvente: CDCl3+acetona-d6
 Hidrogeno-1
 Eclipse 300 MHz Jeol (E)
 13-04-11
 No. Reg. 854



Espectro 2. Espectro de RMN de ¹H de la curcumina

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA. apg

Dr. Manuel Soriano / Veronica Tello

Clave: curcSin

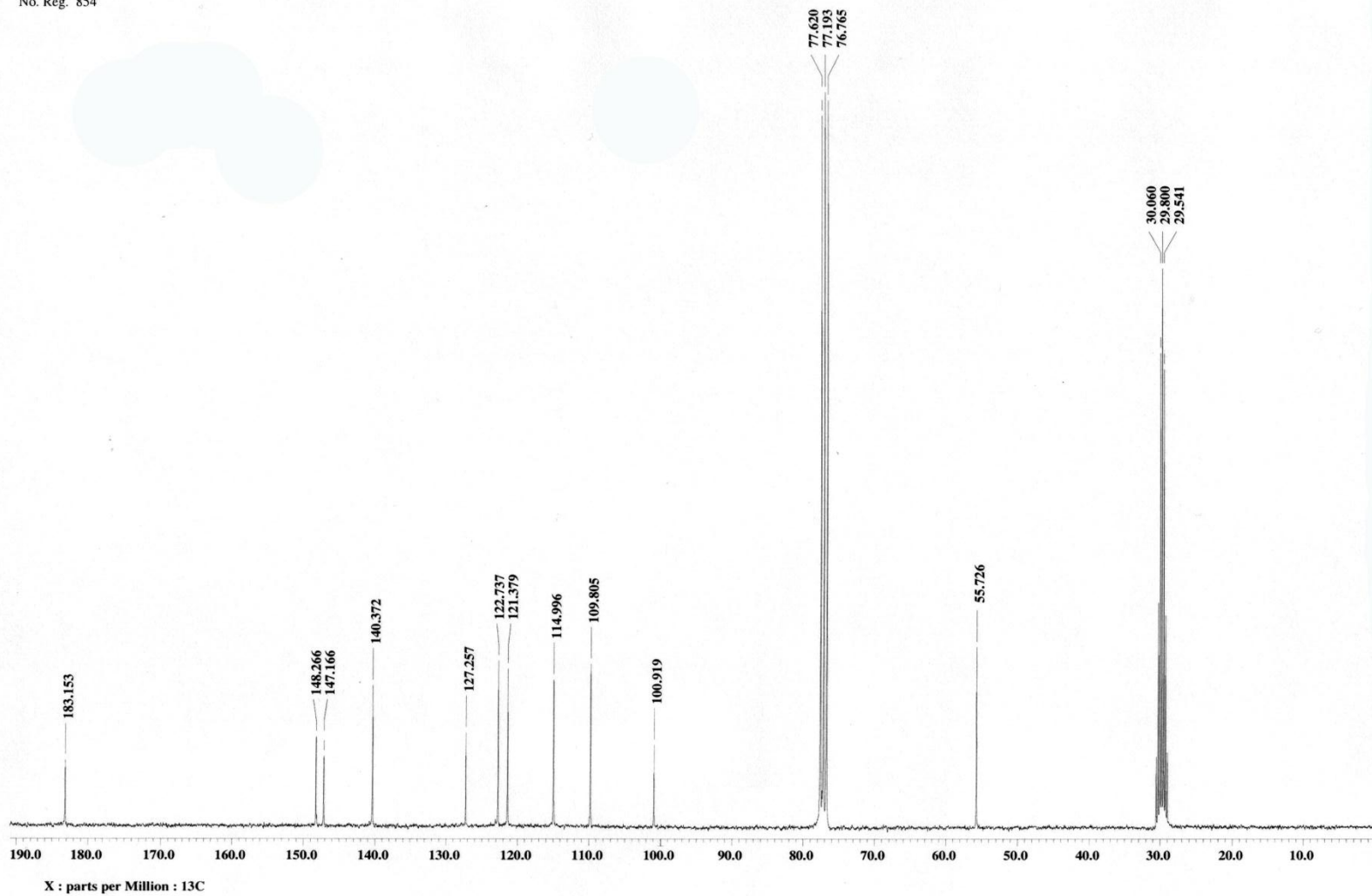
Disolvente: CDCl₃+acetona-d₆

Carbono-13

Eclipse 75 MHz Jeol (E)

14-04-11

No. Reg. 854



Espectro 3. Espectro de RMN de ¹³C de la curcuminina

[Mass Spectrum]

Data : Dr-Soriano-Manuel-087 Date : 13-Oct-2010 11:31

Sample: 1804 DiMeOcurc 9IE JeolFX505HA

Note : Javier-Perez

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

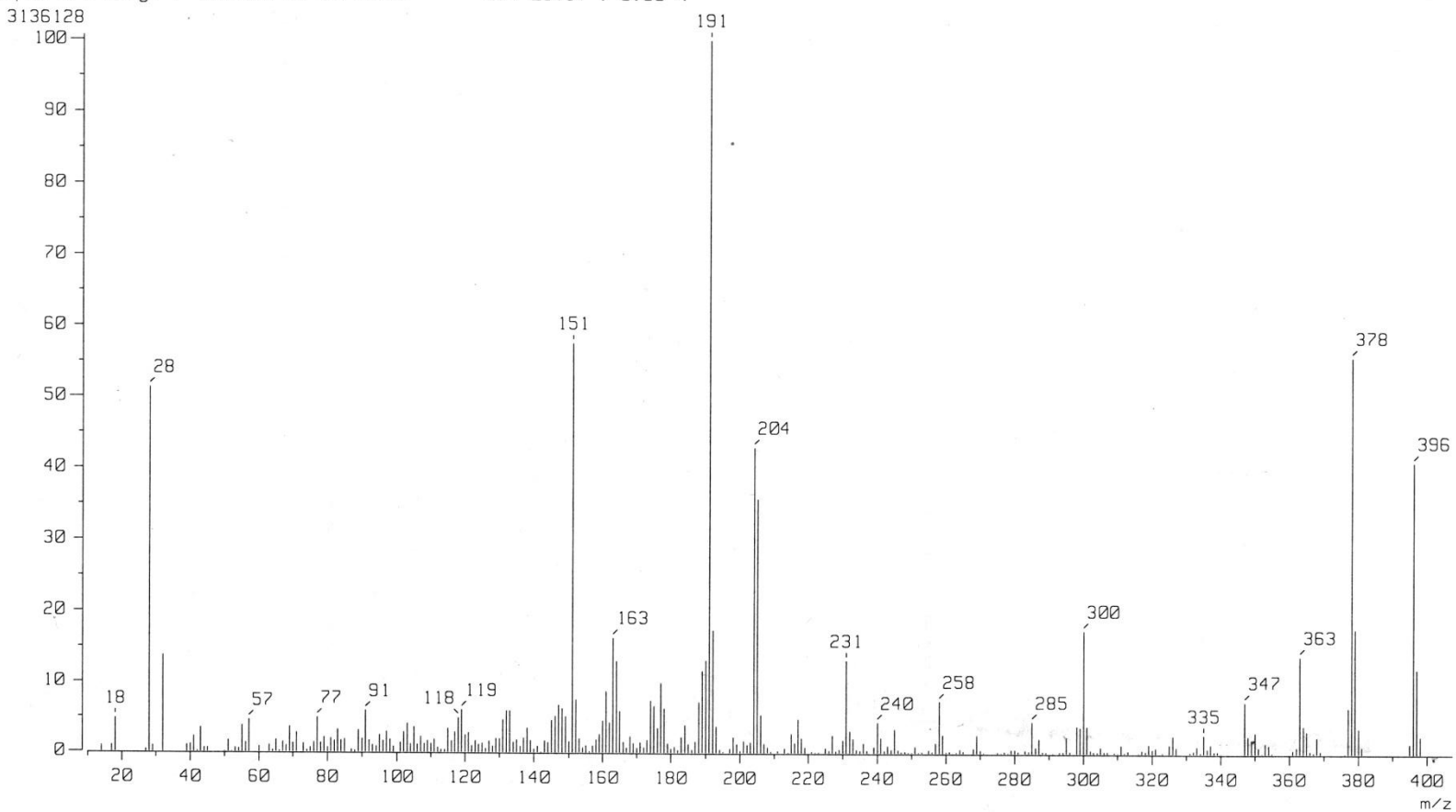
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 1.03 min Scan# : (22,33)

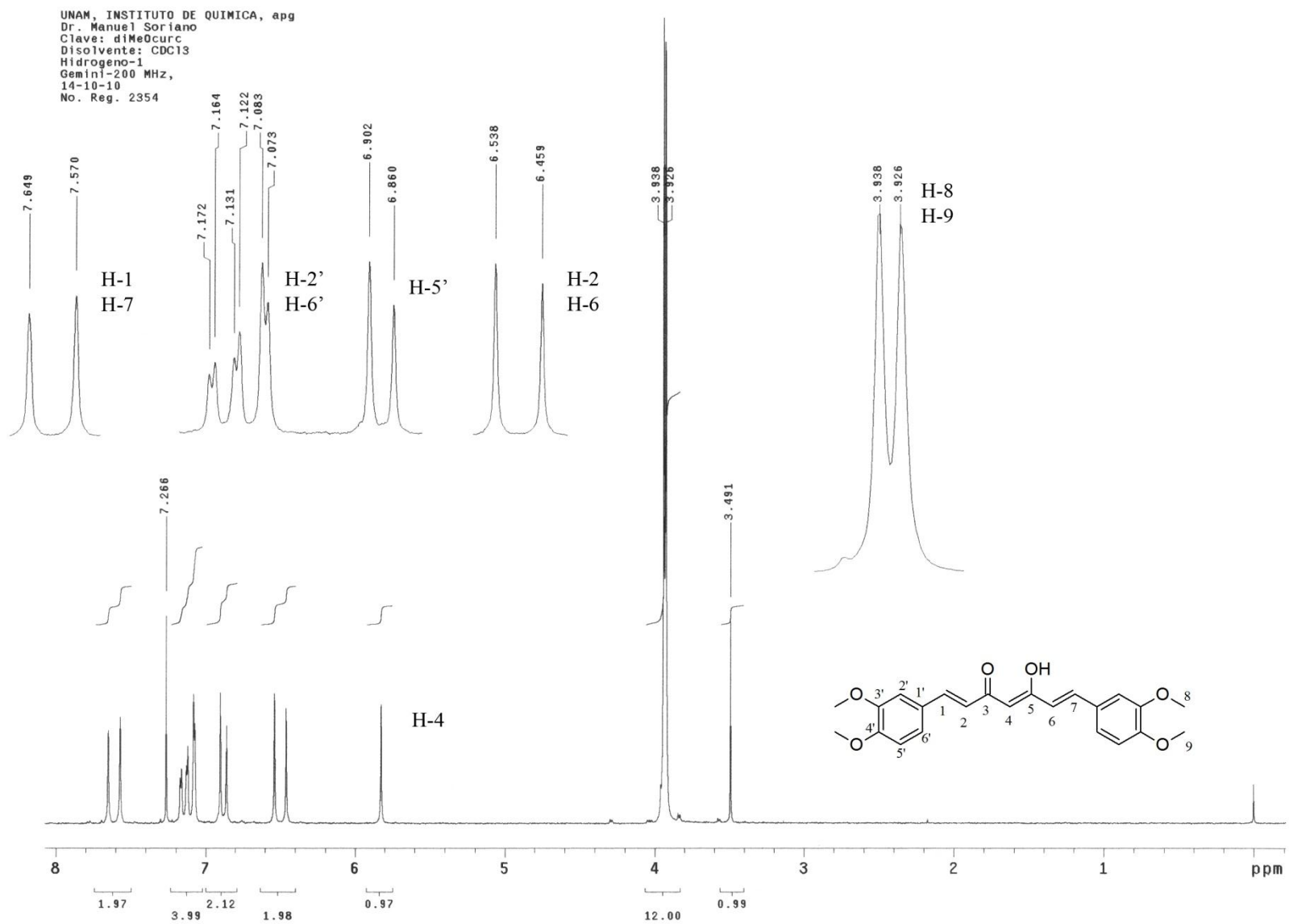
BP : m/z 191.0000 Int. : 297.37

Output m/z range : 10.0000 to 407.3442

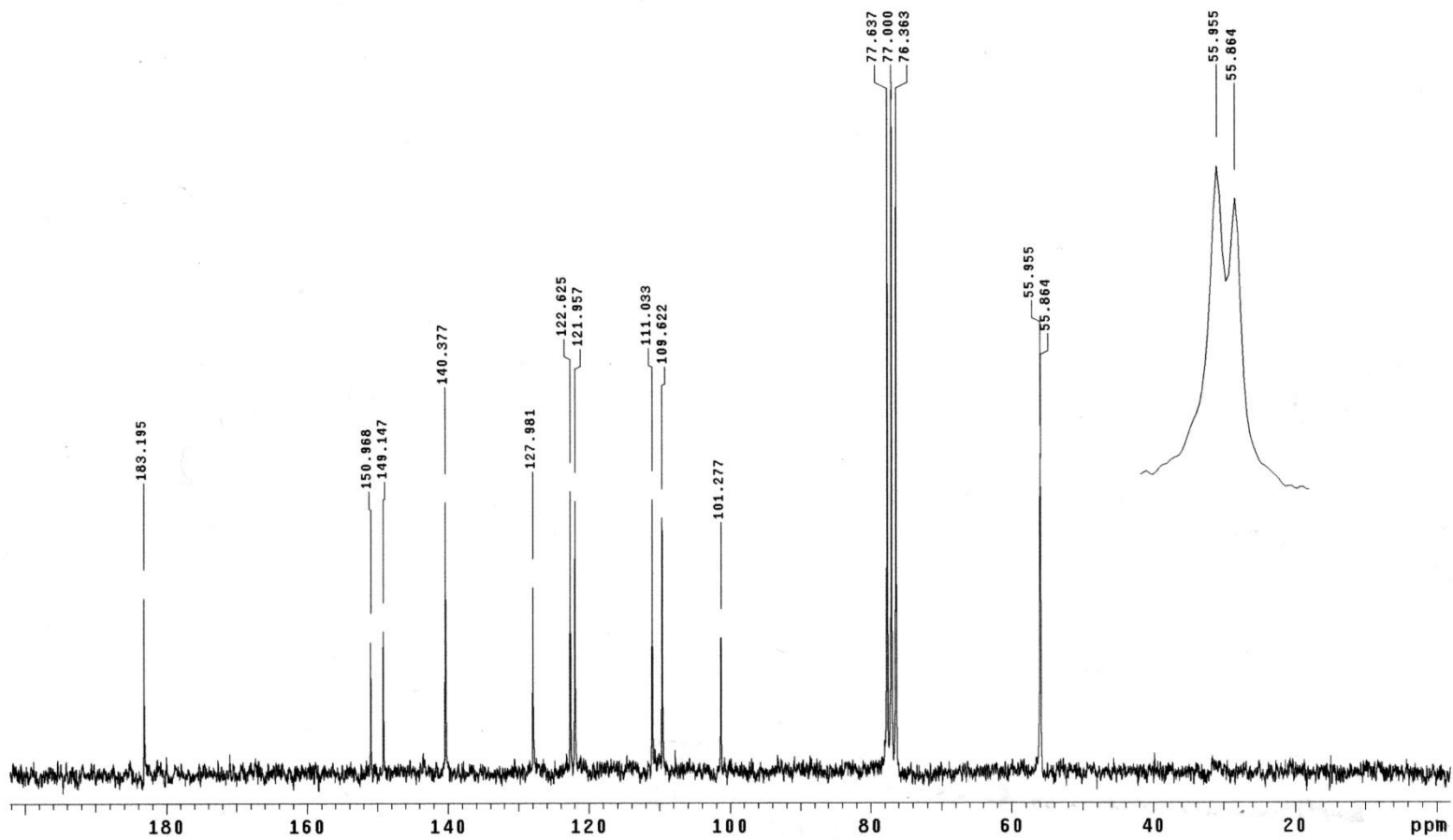
Cut Level : 0.00 %



Espectro 4. Espectro de masas del compuesto 9

Espectro 5. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **9**

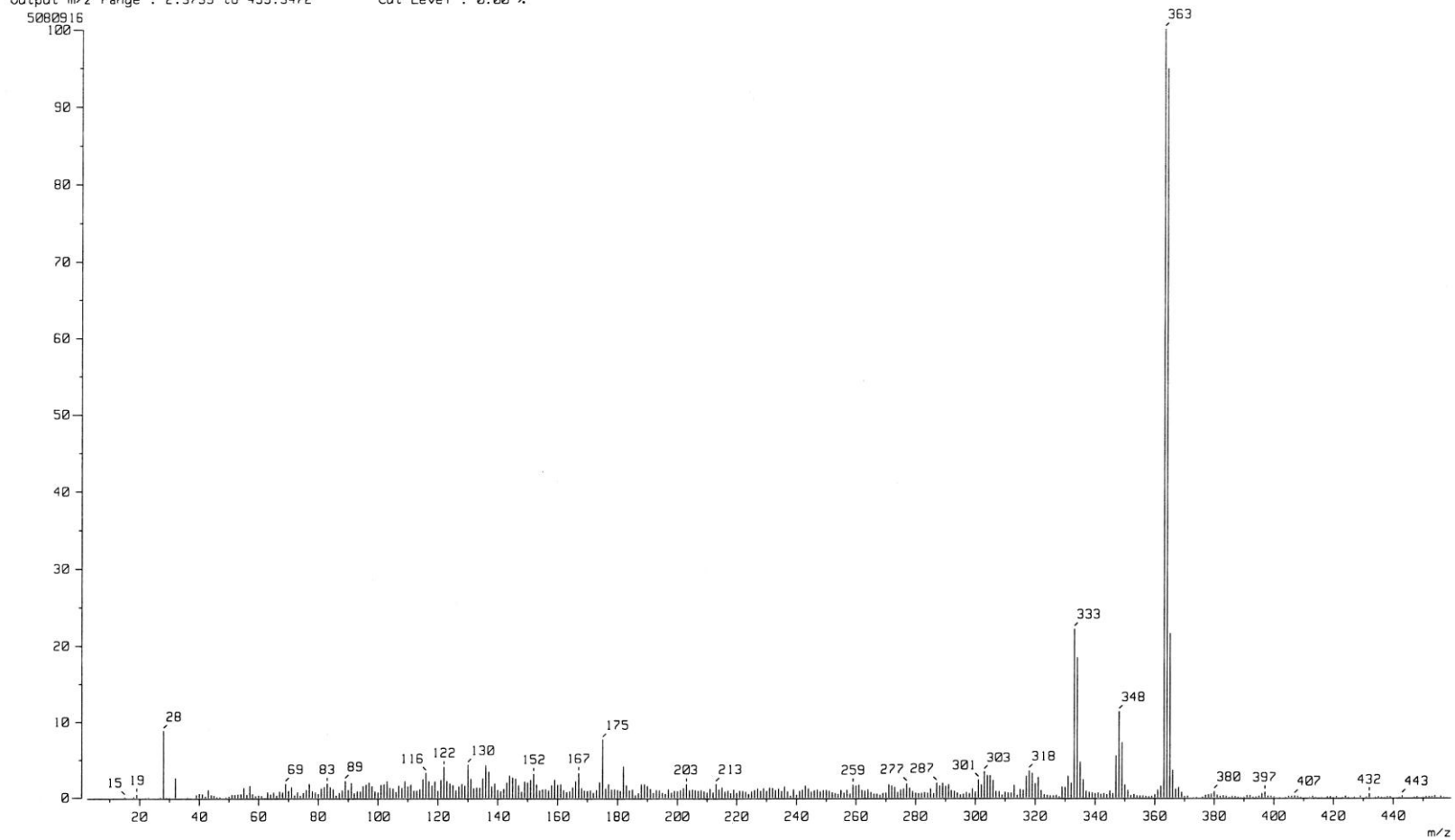
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM, APG
Dr. Manuel Soriano
Clave: d1Me0curc
Disolvente: CDCl₃
Carbono-13
Gemini 50 MHz Varian (B)
14-10-10
No. Reg. 2354



Espectro 6. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 9

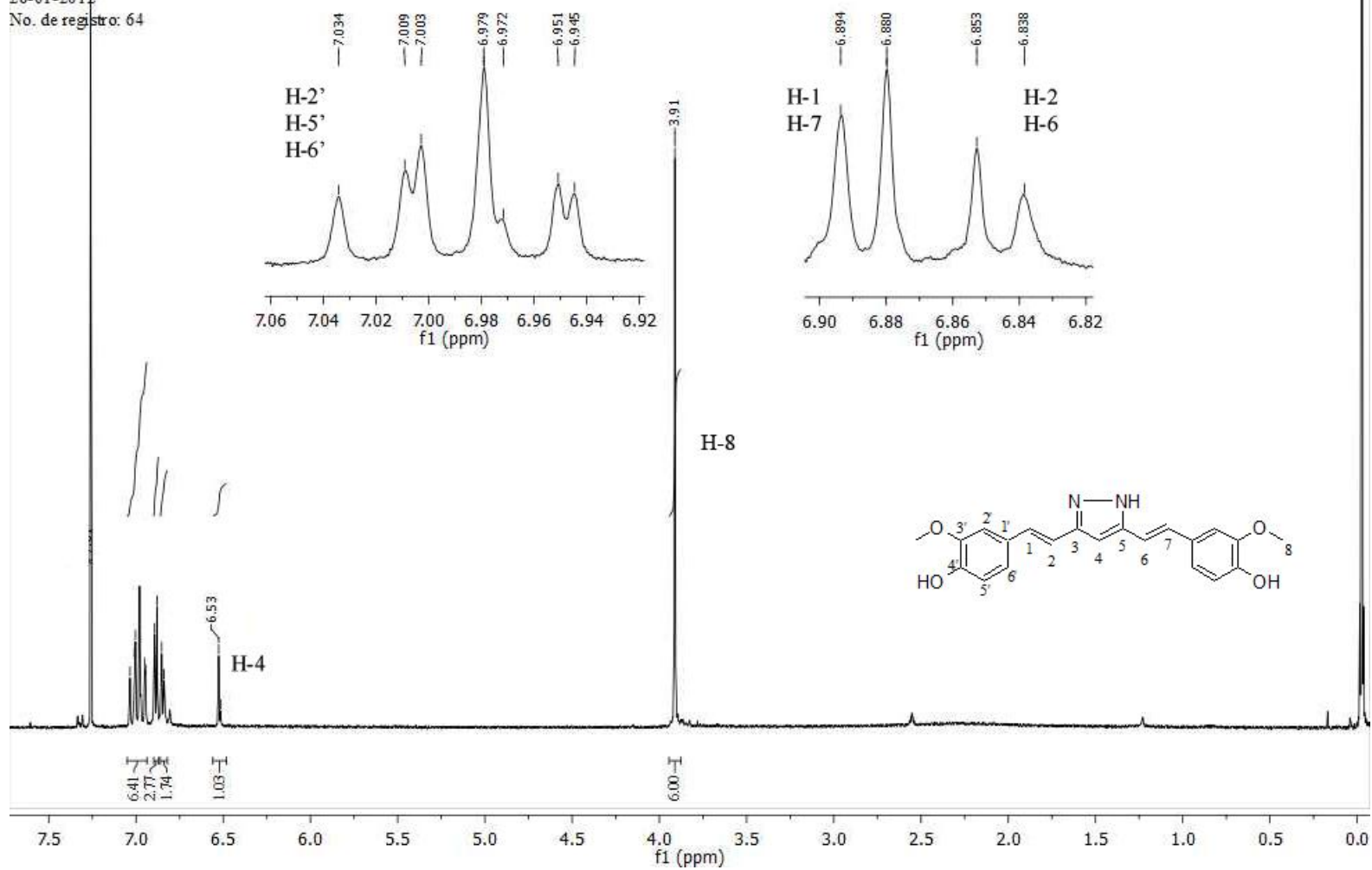
Espectro 7. Espectro de masas del compuesto 3

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Soriano-Manuel-041 Date : 20-Jan-2012 09:18
Sample: 84 cpir IE14 JeolFX505HR
Note : Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 1.74 min Scan# : (34,48)
BP : m/z 363.0000 Int. : 484.55
Output m/z range : 2.3739 to 459.3472 Cut Level : 0.00 %

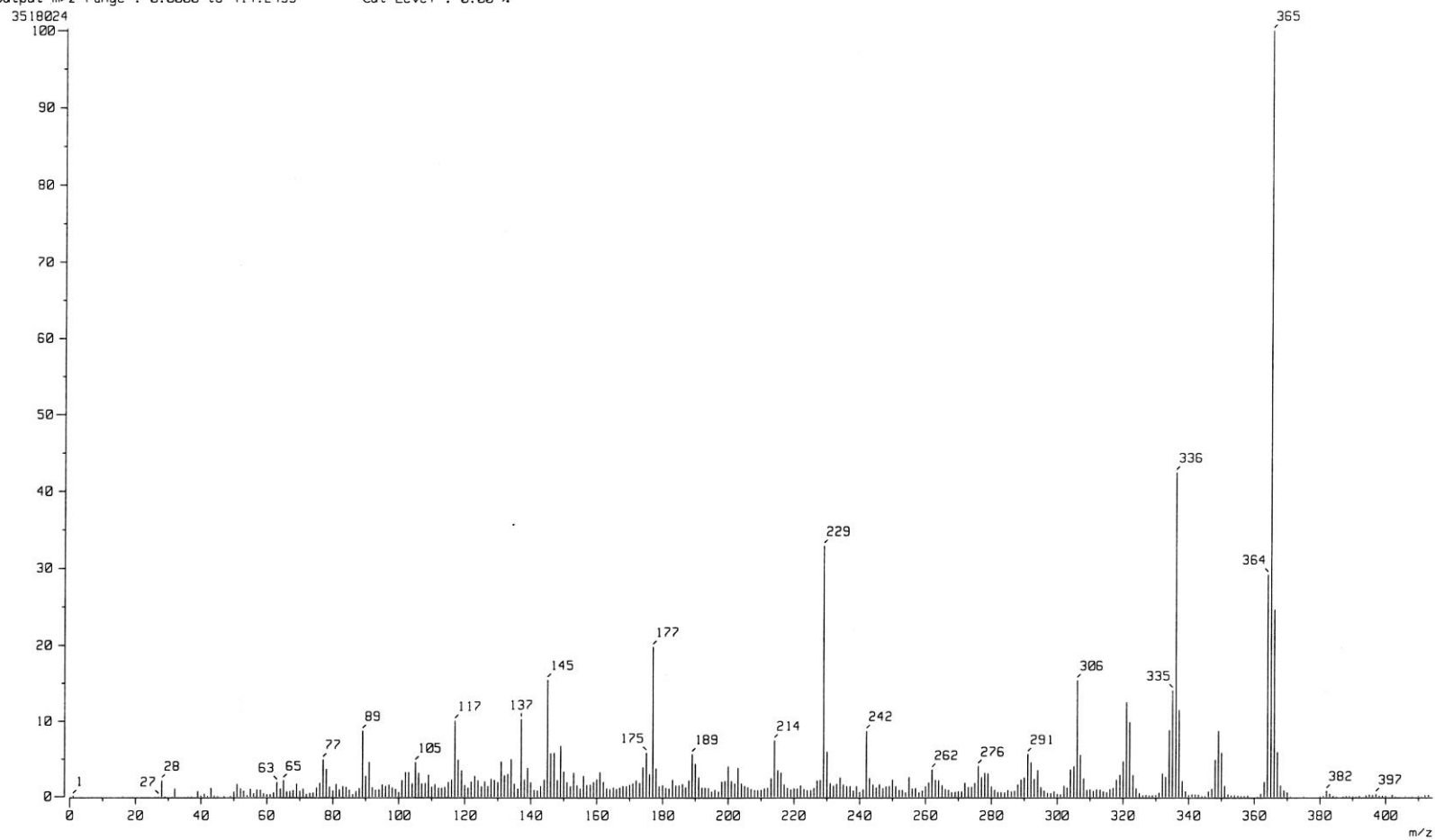


64.H-12
 INSTITUTO DE QUIMICA/E. Huerta
 Dr. M. Soriano/Veronica T.
 Clave: cpir
 Disolvente: CDCl₃ + DMSO-d₆
 Hidrogeno-1
 Varian Unity 300 MHz (D)
 26-01-2012
 No. de registro: 64

Espectro 8. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 3

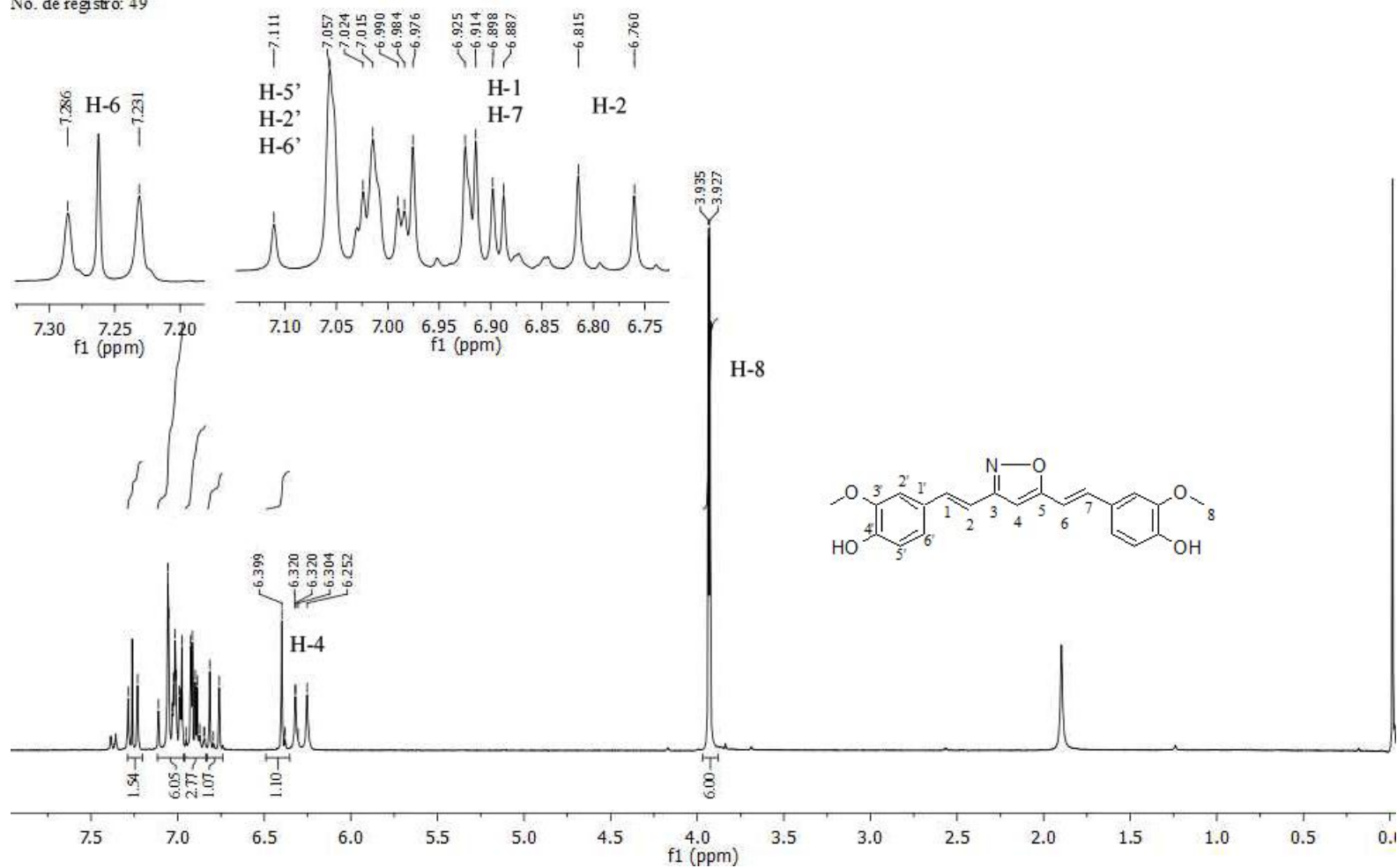


[Mass Spectrum]
Data : Dr-Soriano-Manuel-040 Date : 20-Jan-2012 09:12
Sample: 83 ciso IE14 JeolRX505HA
Note : Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 1.70 min Scan# : (28,52)
BP : m/z 365.0000 Int. : 334.54
Output m/z range : 0.0000 to 414.2433 Cut Level : 0.00 %



Espectro 9. Espectro de masas del compuesto **6**

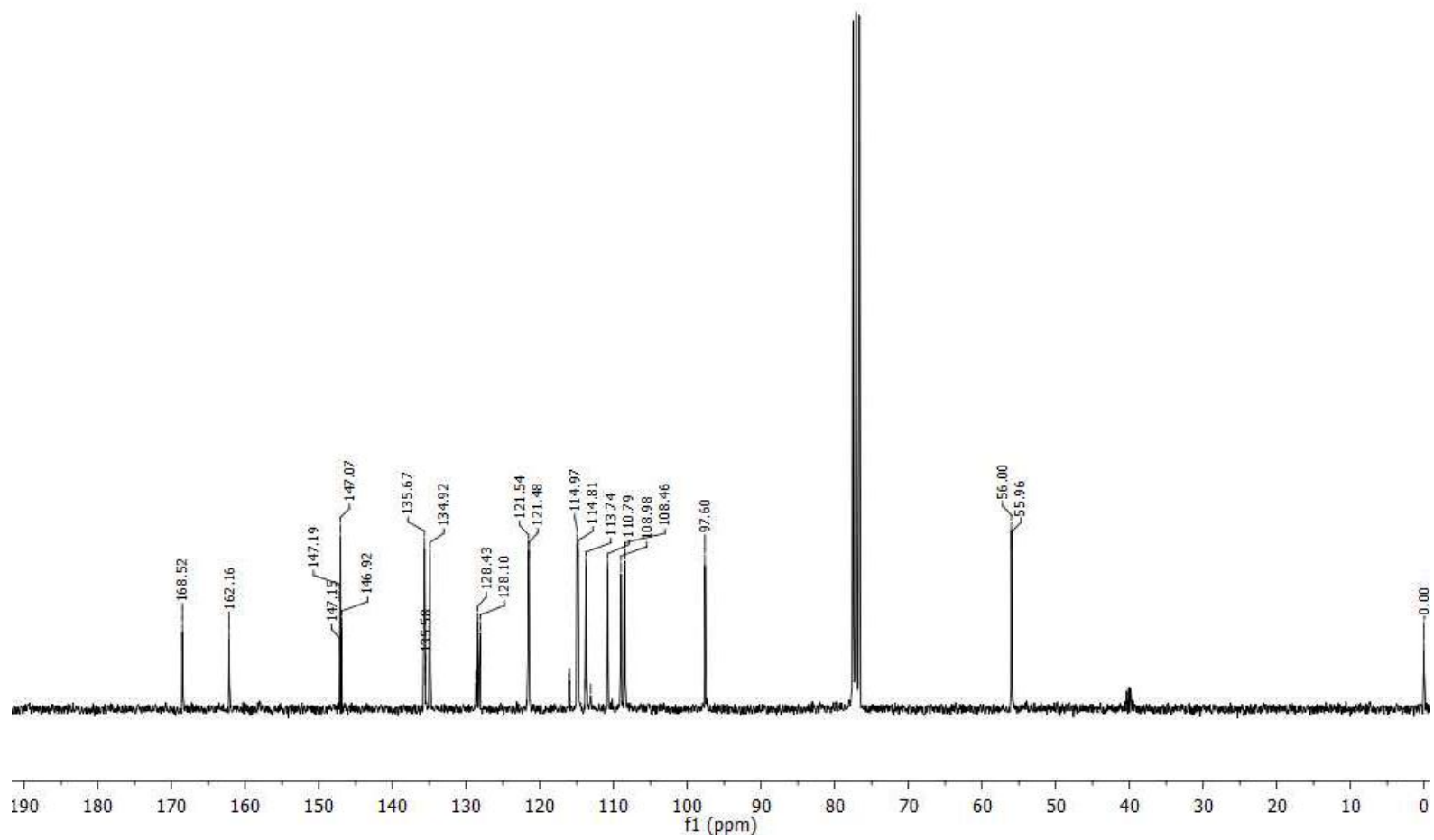
49.H_12
 INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM E. Huerta
 Dr. M. Soriano/Veronica Tello
 Clave: ci so
 Disolvente: CDCl3 + DMSO-d6
 Hidrogeno-1
 Varian Unity 300 MHz (D)
 24-01-12
 No. de registro: 49



Espectro 10. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 6

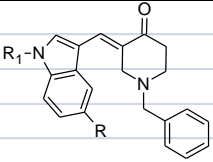
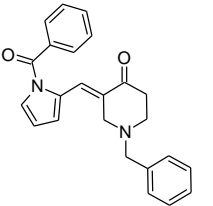
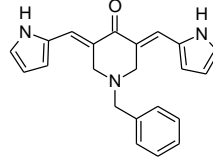
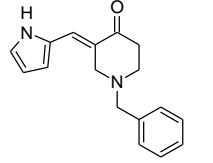
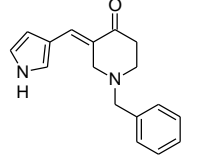
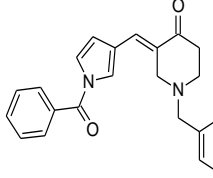
49.C_12
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/E. Huerta
Dr. M. Soriano/Veronica Tello
Clave: ciso
Disolvente: CDCl₃ + DMSO-d₆
Carbono-13
Varian Unity 300 MHz (D)
24-01-12
No. de registro: 49

Espectro 11. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto **6**



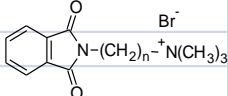
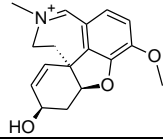
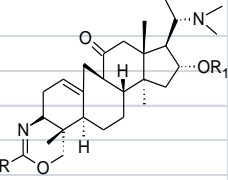
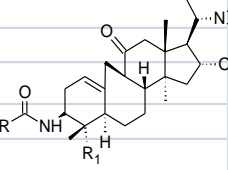
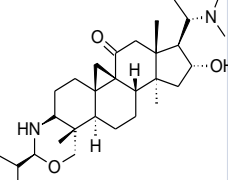
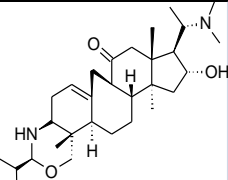
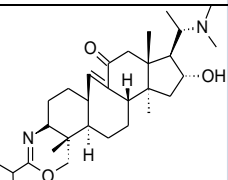
8.2. Conjuntos de entrenamiento, prueba y no-IACE

Tabla 8.2.1. Estructura y pCI₅₀ de los IACE de los conjuntos de entrenamiento y prueba

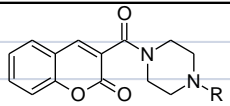
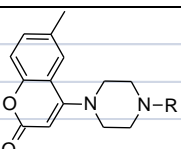
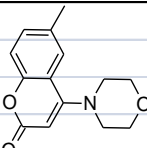
Estructura	R	R ₁	Compuesto	pCI ₅₀ ^a	Referencia
	H	H	4a	5.10	51
	OMe	H	4b	5.22	51
	OCH ₂ Ph	H	4c	4.60	51
	H	PhCH ₂	5a	4.00	51
	H	PhCO	5b	4.15	51
	H	4-F-Ph-CO	5c	4.22	51
	H	4-Cl-Ph-CO	5d	4.30	51
	H	4-MeO-Ph-CO	5e	4.15	51
	H	4-NO ₂ -Ph-CO	5f	4.30	51
	H	4-CN-Ph-CO	5g	4.70	51
	H	COOt-Bu	5i	4.52	51
	H	COMe	5j ^b	4.96	51
	OMe	COPh	5k	4.10	51
			8 ^b	4.52	51
			9	4.74	51
			10	4.96	51
			11	5.22	51
			12	4.52	51

Estructura				Compuesto	pCl ₅₀ ^a	Referencia
				14	5.22	51
				17 ^b	4.52	51
	R	R₁	R₂			
	Ph	H	H	1	6.92	52
	Ph	H	Me	4a	6.49	52
	Ph	H	i-Pr	4b ^b	6.37	52
	Ph	Me	H	4c	7.68	52
	Ph	Et	H	4d	7.57	52
	Ph	Pr	H	4e	7.21	52
	Ph			4f	6.36	52
	H	H	H	4k	6.62	52
	Cl	H	H	5	7.14	52
	2-Me-Ph	H	H	6a	7.05	52
	2-Et-Ph	H	H	6b	7.06	52
	2,4,6-(Me) ₃ -Ph	H	H	6c	5.52	52
	2-MeO-Ph	H	H	6d	6.96	52
	2-Cl-Ph	H	H	6e	7.10	52
	3,5-(CF ₃) ₂ -Ph	H	H	6f	7.25	52
	2-naftil	H	H	6g	7.25	52
	3-AcNH-Ph	H	H	6h	7.24	52
	3-Ac-Ph	H	H	6i	7.27	52
	3,4-OCH ₂ O-Ph	H	H	6j	7.14	52
	4-CN-Ph	H	H	6k	7.00	52
	4-F-Ph	H	H	6l	6.46	52
	4-(NMe ₂)-Ph	H	H	6m	6.68	52
	2-tiofenil	H	H	6n	7.01	52
	3-piridinil	H	H	6o	7.24	52
	MeO	H	H	7 ^b	6.66	52
		1		4g	8.00	52
		2		4h	7.41	52
				4i	7.66	52
		3		4j	7.66	52
			OCH ₂ CH ₂	10	6.85	52
			SCH ₂ CH ₂	12	7.20	52
			NHCOCH ₂	14a	5.38	52

Estructura	n	X	Compuesto	pCl ₅₀ ^a	Referencia
		NHCOCH ₂	14b	4.77	52
		NHCH ₂ CH ₂	16a ^b	5.82	52
		NHCH ₂ CO	18a	4.82	52
		NHCOCH ₂	14c	4.74	52
		NHCH ₂ CH ₂	16b	4.62	52
		NHCH ₂ CO	18b	3.92	52
	6		3a	6.35	53
	8		3b	6.64	53
	10		3c ^b	6.25	53
	6		6a ^b	7.17	53
	8		6b	7.66	53
	10		6c	7.92	53
	4		3b	5.70	54
	6		3c	6.00	54
	8		3d	6.55	54
	10		3e	6.48	54
	12		3f	5.85	54
	4		4b	6.33	54
	6		4c	7.40	54
	8		4d	8.00	54
	10		4e	7.70	54
	12		4f	6.89	54
	3		5a	4.91	54
	6		5c	5.77	54
	8		5d	6.51	54
	12		5f	7.10	54
	4		7b	4.79	54
	8		7d	5.60	54
	10		7e	5.40	54
	12		7f	5.34	54
	4		8b	5.64	54
	8		8d	7.15	54
	10		8e ^b	7.30	54
	12		8f	6.49	54
	8		9d	5.01	54
	10		9e	5.39	54
	12		9f	5.89	54

Estructura				Compuesto	pCl ₅₀ ^a	Referencia
		n	X			
		8		13d	6.05	54
		10		13e	5.28	54
		12		13f	5.52	54
				14 ^b	6.85	54
		X	R	R₁		
		i-Pr	H	1	7.51	55
		Me	H	9a	6.17	55
		Et	H	9b	6.22	55
		t-Bu	H	9c	6.65	55
		(S)-MeCHEt	H	9d	7.89	55
		Et ₂ CH	H	9f	6.99	55
		Ph	H	9g	5.12	55
		C ₆ H ₁₁	H	9h	6.40	55
		PhCH ₂	H	9i ^b	5.38	55
		i-Pr	COMe	15	6.42	55
		i-Pr	CH ₂ OH	4	5.03	55
		(S)-MeCHEt	CH ₂ OH	8d	6.98	55
		Et ₂ CH	CH ₂ OH	8f	5.49	55
		(S)-MeCHEt	CHNBz	30	6.11	55
		(S)-MeCHEt	CH ₂ NH ₂	32	6.43	55
				10	6.09	55
				12	5.62	55
				14	6.96	55

Estructura	X	R	R ₁	Compuesto	pCl ₅₀ ^a	Referencia
	OH	i-Pr	H	18	6.96	55
	NH ₂	i-Pr	Me	25a	6.54	55
	NH ₂	(S)-MeCHEt	Me	25b	5.87	55
	O	i-Pr	H	19	6.97	55
	NH	(S)-MeCHEt	Me	33	7.55	55
		i-Pr		26a	7.74	55
		(S)-MeCHEt		26b	7.85	55
	n	R ₁	R ₂			
	1			3a	8.21	56
	2			3b ^b	8.61	56
	3			3c	7.92	56
	1	Me	Me	3d	7.02	56
	2	Me	Me	3e	7.47	56
	3	Me	Me	3f	7.52	56
	2	Et	Et	3g ^b	7.94	56
	2	(CH ₂) ₂ NMe ₂	H	3h	6.92	56
	2	(CH ₂) ₂ OH	H	3i	7.26	56
	1			4a	8.97	56
	2			4b	8.97	56
	3			4c	8.60	56
	1	Me	Me	4d	7.83	56
	2	Me	Me	4e	8.32	56
	3	Me	Me	4f	8.32	56
	2	Et	Et	4g ^b	8.58	56
		Ph	OCH ₃	9	1 ^c	57
		COPh	OCH ₃	13 ^b	1 ^c	57
		Ph	Cl	14	4.72	57
		4-MeO-Ph	Cl	18 ^b	1 ^c	57
				26	4.00	57

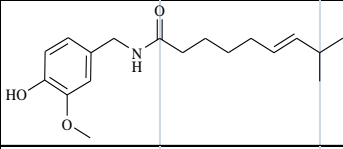
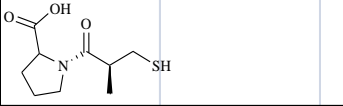
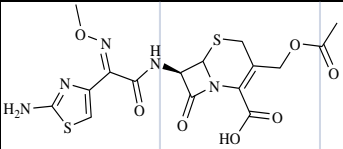
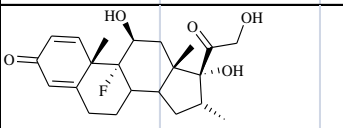
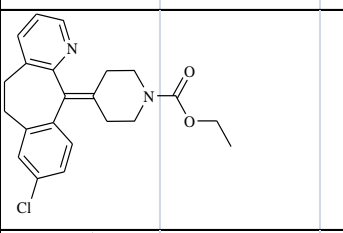
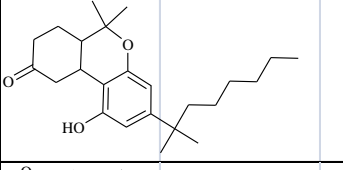
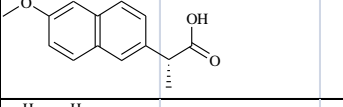
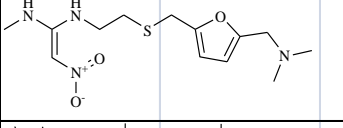
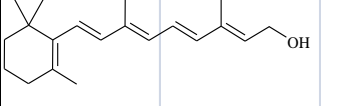
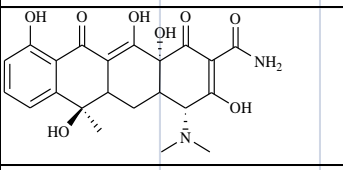
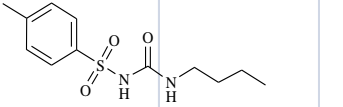
Estructura	R	X	Compuesto	pCI ₅₀ ^a	Referencia
	Ph		24 ^b	5.04	57
	Me		25	4.01	57
	2-Me-Ph		27	5.17	57
	4-MeO-Ph		28	5.12	57
	2-MeO-Ph		29	4.96	57
	4-Cl-Ph		30	4.01	57
	4-Me-Ph		31	5.12	57
	2,5-Cl ₂ -Ph		32	4.85	57
	4-Me-Ph-CO		33	4.74	57
	Ph-CO		34	4.82	57
	4-Cl-Ph-CO		35	4.68	57
	2-Cl-Ph-CO		36 ^b	4.59	57
	4-NO ₂ -Ph-CO		37	4.47	57
	2-MeO-Ph		38	3.60	57
	4-MeO-Ph		39	4.74	57
	4-Me-Ph		40	4.21	57
	2-Me-Ph		41	5.10	57
	4-Cl-Ph		42	3.09	57
	Me		43	3.05	57
	Ph		45	5.35	57
	2,5-Cl ₂ -Ph		46	3.08	57
	4-Me-Ph-CO		47	5.28	57
	Ph-CO		48 ^b	5.13	57
	4-Cl-Ph-CO		49	4.80	57
	2-Cl-Ph-CO		50	4.68	57
	44			3.06	57
					

^a -logCI₅₀

^b molécula del conjunto de entrenamiento

^c compuesto inactivo

Tabla 8.2.2. Estructura y actividad de las moléculas del conjunto no-IACE

Estructura	Compuesto	Actividad terapéutica	Referencia
	capsaicina	analgésico	1
	captopril	antihipertensivo	1
	cefotaxima	antibiótico cefalosporínico	1
	dexametasona	antiinflamatorio corticosteroide	1
	loratadina	antihistaminico	1
	nabilona	antiemético	1
	naproxeno	antiinflamatorio no esteroideo	1
	ranitidina	antiulceroso	1
	retinol	vitamina	1
	tetraciclina	antibiótico	1
	tolbutamida	hipoglicémico	1

1. PLM Diccionario de Especialidades Farmacéuticas 2011. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6 (Acceso 10 agosto, 2011)

8.3. Métodos computacionales

8.3.1. Descriptores moleculares

8.3.1.1. Cálculo de pKa

El programa SPARC divide las moléculas en unidades funcionales más pequeñas, para las que ciertas propiedades químicas son conocidas. Los centros de reacción, ya sean ácidos o bases son identificados, y se cuantifica el impacto de las unidades funcionales adyacentes (llamadas perturbadores (P)) sobre la reactividad del centro (C) mediante teoría de perturbaciones. En ella el estado final es considerado un estado inicial perturbado, y se calcula la diferencia entre ambos al cuantificar la perturbación. En este caso, la perturbación sobre el estado de protonación está compuesta por diferencias electrostáticas, de resonancia, solvatación y puentes de hidrógeno:

$$pKa = (pKa)_C + \delta_{ele}(pKa)_C + \delta_{res}(pKa)_C + \delta_{solv}(pKa)_C + \delta_{puenteH}(pKa)_C$$

Un sustituyente que genera perturbaciones S está unido a C mediante un conector R, que conduce la perturbación. Una perturbación puede describirse mediante los siguientes factores:

1. El potencial de S para generar un cierto efecto
2. Las propiedades de R de conducir dicho efecto
3. La susceptibilidad de C para responder a este efecto

Las contribuciones de cada componente se cuantifican de manera independiente para cada tipo de efecto, y dependerá de su naturaleza química.

Las interacciones electrostáticas derivan de la interacción de los dipolos locales o cargas en S a través de R con las cargas o dipolos en C. Se incluyen tanto efectos de campo como efectos mesoméricos y de inducción tipo sigma. El efecto de campo tiene la forma:

$$\delta_{campo}(pKa)_C = \frac{\delta q_C q_S}{r_{CS} D_C} + \frac{\delta q_C \mu_S \cos \Theta_{CS}}{r_{CS}^2 D_C} + \dots \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde q_S y μ_S son la carga y el dipolo del sustituyente respectivamente, δq_C es el cambio de carga en C, Θ_{CS} da la orientación del dipolo de S respecto a C, r representa la distancia entre ambos grupos y D_C es la constante dieléctrica efectiva del medio. La implementación de esta ecuación se realiza resolviendo cada término de esta ecuación en las contribuciones de S, R y C:

$$\delta_{campo}(pKa)_C = \rho_C \sigma_R F_S \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde ρ_C es la susceptibilidad de C a efectos de campo, σ_R describe la capacidad de conducción de R y F_S caracteriza la magnitud de la carga o dipolo en S. Estos parámetros tienen valores

obtenidos experimentalmente cuando están disponibles, o ajustados a partir de datos experimentales. El efecto mesomérico es considerado como un conjunto de cargas discretas q_R , cuya contribución se describe de acuerdo a la ecuación 1, y que al definir en términos de las contribuciones toma la forma:

$$\delta_{CM}(pKa) = \rho_{elec} M_F \sum_k \frac{q_{ik}}{r_{kC}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde M_F es la habilidad de S de inducir un campo en R_π , q_{ik} es la carga inducida en el átomo k y r_{kC} es la distancia de la carga a C. Por su parte, el efecto inductivo depende de la diferencia de electronegatividades entre C y S. Se calcula como:

$$\delta_{sig}(pKa)_C = \rho_{ele} d\chi_{CS} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde ρ_{ele} es la susceptibilidad de C a efectos de campo y $d\chi_{CS}$ es la diferencia entre las electronegatividades de C y S.

La interacción de resonancia describe el cambio en la deslocalización de los electrones π de C en los estados protonados y no protonados provocado por P. Los electrones pueden interactuar ya sea con S o con unidades $R-\pi$. La perturbación se calcula como:

$$\delta(pKa)_{res} = \rho_{res}(\Delta q)_C \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde $(\Delta q)_C$ es la pérdida de carga de C y ρ_{res} es la habilidad de los dos estados de C de donar electrones. Los efectos de solvatación miden el bloqueo estérico de acceso del solvente a C entre sus dos estados de protonación. Este dependerá del número de sustituyentes hidrofóbicos o de la presencia de sustituyentes hidrofóbicos en *orto* o *peri*. La contribución de puentes de hidrógeno, por su parte, deriva de la posible diferencia en el grado de formación de puentes de hidrógeno intramoleculares entre los elementos de P y C en los dos estados de protonación. En todos los casos, cada efecto se describe mediante las contribuciones de S, R y C. Estos parámetros poseen valores asignados de acuerdo a cada tipo de grupo funcional, ya sea a partir de datos experimentales o mediante un ajuste de los mismos; y permiten realizar la predicción de propiedades de moléculas que no estuvieron incluidas en el conjunto de entrenamiento^{1,2}.

8.3.1.2. Cálculo de logP

El coeficiente de partición de una molécula entre 1-octanol y agua es un descriptor frecuentemente utilizado en la elaboración de relaciones estructura-actividad cuantitativas para incorporar la hidrofobicidad de las moléculas. En la mayor parte de los casos, el coeficiente de partición es calculado como la suma de las contribuciones individuales de los fragmentos que

componen a una molécula, más un factor de corrección³. Los resultados obtenidos dependerán de la definición de los fragmentos hecha por cada programa, y del conjunto de moléculas usada para definir el factor de corrección. El programa MlogP consiste de una ecuación de 13 parámetros estructurales: número de átomos de C y halógenos como medida de contribución hidrofóbica, número de átomos de N y O como contribución hidrofílica, proximidad entre N y O, número de enlaces insaturados, presencia de puentes de hidrógeno intramoleculares, número de sustituyentes polares sobre un anillo aromático, número de grupos funcionales anfotéricos, presencia de hidrocarburos con 0 o 1 doble enlace, presencia de anillos excepto el benceno, número de nitrógenos cuaternarios, número de grupos nitro, número de tiocianatos e isotiocianatos, y finalmente, presencia de anillos de beta lactama. Los coeficientes de la ecuación se obtuvieron al realizar una regresión múltiple de un conjunto de entrenamiento de 1230 moléculas orgánicas, cuyos valores de logP habían sido determinados experimentalmente⁴.

8.3.2. Acoplamiento molecular

A través de los cálculos de acoplamiento molecular se busca predecir la estructura del complejo intermolecular formado por dos o más moléculas. En el caso de los estudios realizados en este trabajo, se buscó predecir, para cada una de las moléculas, la conformación que formaría el complejo más estable con el sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa. La estructura de la enzima (el receptor) permaneció rígida, mientras que se estudiaron las posibles conformaciones de la curcumina y sus derivados (los ligandos). La exploración de dicho espacio conformacional se llevó a cabo mediante algoritmos genéticos, y la evaluación de cada estructura resultante se llevó a cabo con las funciones de evaluación propias de los programas utilizados.

8.3.2.1. Algoritmos genéticos

De manera general, un algoritmo genético se basa en conceptos evolutivos para generar una posible población de soluciones a un problema. Los miembros de la población son calificados mediante una función de evaluación para medir que tan “aptos” son. De manera inicial, se genera una población de μ soluciones posibles, siendo éstas conformaciones generadas de manera aleatoria. Cada individuo está codificado por un cromosoma, el cual posee la información sobre la translación, orientación y ángulos de torsión de las moléculas a modo de genes. Cada individuo es calificado, y una nueva población es generada al combinar los cromosomas de $\mu/2$ pares de

padres. Los pares son elegidos de manera aleatoria, pero incorporando una cierta tendencia a incluir los individuos mejor calificados, este es el proceso de selección. Posteriormente se aplican los operadores genéticos de recombinación y mutación. El primero consiste en intercambiar la información de los cromosomas de los padres al combinarse los genes de ambos. Esta operación se realiza con una probabilidad asignada, que generalmente es alta. El segundo operador consiste en modificar un gen de un individuo seleccionado con una probabilidad asignada, generalmente baja, en una cantidad aleatoria. De esta manera se genera una nueva población que será evaluada y el ciclo se reiniciará hasta alcanzar un número determinado de iteraciones o cumplir un criterio de convergencia³.

8.3.2.2. AutoDock4

El programa AutoDock4 utiliza una variante llamada algoritmo genético de Lamarck, en el cual se combinan las reglas de la herencia del algoritmo genético con la realización de una búsqueda local para la optimización de geometrías. En este caso, cada cromosoma está compuesto de genes con valores reales que indican: tres coordenadas cartesianas, cuatro variables que definen la orientación del ligando, y un valor para cada torsión posible. La población inicial es generada de manera aleatoria, y sigue el proceso de mapeo, evaluación, selección, recombinación, mutación y selección elitista hasta completar el máximo número de generaciones. La selección es calculada mediante la fórmula: $n_0 = \frac{f_w - f_i}{f_w - \langle f \rangle}$ $f_w \neq \langle f \rangle$, donde n_0 indica el número de descendientes asignados al individuo, f_i es la calificación del individuo, f_w es la calificación del peor individuo en las últimas N generaciones y $\langle f \rangle$ es la calificación media de la población. La recombinación en dos puntos ocurre entre genes completos, y los hijos reemplazan a los padres, manteniendo constante el tamaño de la población. A continuación se realiza la mutación, al añadir un número aleatorio dentro de una distribución de Cauchy a la variable elegida. Posteriormente la selección elitista permite al usuario definir el número de individuos con altas calificaciones que pasarán automáticamente a la siguiente generación. En cada generación es posible asignar una fracción de la población a que realice una búsqueda local, asignando un tamaño del paso distinto a cada tipo de gen. De encontrar una conformación con una mejor calificación, esta información se codifica en un nuevo cromosoma correspondiente a un hijo⁵.

La función de evaluación utilizada por el programa AutoDock4 tiene la forma general propia de un campo de fuerza, mas incluye términos de desolvatación. Se propone que la energía libre

de unión es igual a la diferencia entre la energía tanto del ligando (L) como de la proteína (P) en su estado libre y la energía del complejo ligando-proteína:

$$\Delta G = (V_{unido}^{L-L} - V_{libre}^{L-L}) + (V_{unido}^{P-P} - V_{libre}^{P-P}) + (V_{unido}^{P-L} - V_{libre}^{P-L} + \Delta S_{conf})$$

donde las evaluaciones de pares de átomos contienen los siguientes términos:

$$V = W_{vdw} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hunido} \sum_{ij} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{ij} (S_i V_j + S_j V_i) e^{-r_{ij}^2 / 2\sigma^2}$$

W son las constantes de proporcionalidad empíricamente calibradas, el primer término representa un potencial de tipo Lennard-Jones 6/12 para interacciones de dispersión/repulsión, el segundo término representa un puente de hidrógeno direccional dependiente del ángulo t , el tercer término representa las interacciones electrostáticas mediante un potencial coulombico apantallado, y el cuarto término es un potencial de desolvatación basado en el volumen V de los átomos que rodean a un átomo dado, multiplicado por un parámetro de solvatación S y un término exponencial basado en la distancia. La pérdida de entropía de torsión al darse la unión proteína-ligando es calculada mediante $\Delta S_{conf} = W_{conf} N_{tors}$, donde N_{tors} representa el número de enlaces rotables en la molécula⁶.

8.3.2.3. GOLD

GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) es un programa que permite generar acoplamientos entre proteínas y un ligando flexible mediante un algoritmo genético. Este programa se caracteriza por permitir la inclusión de moléculas de agua en el receptor, pudiéndose especificar las aguas que serán incluidas en el cálculo y definir si estas pueden ser manipuladas (rotar y desplazarse). También es posible dejar que el programa decida automáticamente si las aguas estarán o no unidas al sitio activo. Esto se logra mediante el cálculo del costo energético de transferir una molécula de agua desde el solvente hasta el sitio de unión de la proteína, mediante la fórmula $\Delta G_b(w) = \Delta G_p(w) + \Delta G_i(w)$, donde el primer término representa la contribución debida a la pérdida de entropía por la unión de la molécula y el segundo término incluye las contribuciones debidas a las interacciones de la molécula de agua tanto con el ligando como con el receptor. $\Delta G_p(w)$ se considera constante y la forma de $\Delta G_i(w)$ depende de la función de evaluación utilizada⁷.

El algoritmo genético utilizado por este programa incluye dos cromosomas para cada individuo, uno para el ligando y otro para la proteína. Se genera una población inicial de manera aleatoria, que es calificada por la función de evaluación elegida. Se utiliza un procedimiento de

selección aleatoria con una tendencia hacia los individuos mejor calificados llamada selección de ruleta, en el cuál los individuos estarían representados en la ruleta mediante un área proporcional a su calificación. Los padres seleccionados son sujetos a los operadores de recombinación y mutación, generándose nuevos individuos. Estas conformaciones son optimizadas mediante el método de mínimos cuadrados buscando formar el mayor número de puentes de hidrógeno con el receptor. De obtenerse un individuo con una mejor calificación, este reemplazará a aquel peor calificado de la población. Los operadores también son seleccionados mediante selección de ruleta de acuerdo a pesos asignados inicialmente. El proceso se repite hasta alcanzar el criterio de convergencia seleccionado⁸.

Se utilizaron dos funciones de evaluación: GoldScore y ChemScore. La primera consiste de cuatro contribuciones energéticas: puentes de hidrógeno proteína-ligando, interacciones de van der Waals proteína-ligando, energía interna del ligando y energía de torsión del ligando. La primera depende de la distancia d entre el hidrógeno del donador y el aceptor, y del ángulo θ entre los mismos. El segundo término se determina mediante un potencial de Lennard-Jones con la forma $E_{ij} = \left(\frac{A}{d_{ij}^8} - \frac{B}{d_{ij}^4} \right)$, donde d_{ij} es la distancia entre los átomos i y j y los parámetros A y B dependen de cada tipo de átomo para que el potencial utilizado tenga el mismo mínimo que un potencial de Lennard-Jones de tipo 6/12. El tercer término se calcula mediante un potencial de Lennard-Jones de tipo 6/12 similar al anterior, mientras que el último término tiene la forma $E_{ijkl} = \frac{1}{2} V_{ijkl} \left[1 + \frac{n_{ijkl}}{|n_{ijkl}|} \cos(|n_{ijkl}| \cdot \omega_{ijkl}) \right]^2$, donde E_{ijkl} es la energía de torsión asociada a cuatro átomos unidos de manera consecutiva, ω es el ángulo de torsión, n representa la periodicidad y V a la barrera energética de rotación. La calificación final se determina como la suma de todos los términos, cada uno multiplicado por una constante de proporcionalidad determinada empíricamente^{8,9}.

ChemScore calcula el cambio en energía libre por la unión del ligando como la suma de las contribuciones por: puentes de hidrógeno proteína-ligando, que incluye las interacciones mediadas por moléculas de agua, enlaces entre un metal en la proteína y su aceptor en el ligando, energía de interacción lipofílica y la pérdida de entropía de un enlace rotatable al quedar rígido ante su unión con la proteína. La función tiene la siguiente forma:

$$\Delta G_{unión} = \Delta G_0 + \Delta G_{puenteh} \sum_{il} g_1(\Delta r) g_2(\Delta \alpha) + \Delta G_{metal} \sum_{aM} f(r_{aM}) + \Delta G_{lipo} \sum_{lL} f(r_{lL}) + \Delta G_{rot} H_{rot}$$

Los coeficientes para cada término ΔG se calibraron de manera empírica. El término de puentes de hidrógeno se calcula para todas los posibles pares de átomos entre ligando y receptor, y depende de las diferencias de distancia (Δr) y de ángulo ($\Delta \alpha$) respecto a sus valores ideales. El

término relacionado al metal depende del contacto entre átomos, lo mismo que el término lipofílico. La penalización de un enlace flexible al quedar inmovilizado es calculado mediante la fórmula: $H_{rot} = 1 + (1 - 1/N_{rot}) \sum_r (P_{nl}(r) + P'_{nl}(r))/2$, donde N_{rot} es el número de enlaces inmovilizados, la sumatoria se realiza sobre los enlaces inmovilizados y $P_{nl}(r)$ y $P'_{nl}(r)$ son los porcentajes de átomos no-lipofílicos en cada lado del enlace rotatable¹⁰. La calificación final se obtiene al sumar una penalización por choques entre los átomos del receptor y del ligando, y los términos de tensión interna del ligando. Este último incluye un término para los choques intramoleculares y uno para los ángulos de torsión del ligando¹¹.

8.3.3. Modelo farmacofórico

Un farmacóforo puede definirse como un conjunto de características comunes a un grupo de moléculas con una cierta actividad biológica. Se propone que dichas características estarán relacionadas con el reconocimiento del ligando por su receptor mediante la formación de interacciones moleculares comunes. Ejemplos de estas características son donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, grupos con cargas positiva o negativa, regiones hidrofóbicas o anillos aromáticos. Una representación tridimensional de un farmacóforo proporcionará además, información sobre la relación espacial entre estas características. De obtenerse una descripción farmacofórica de un grupo de moléculas, será posible utilizar dicha descripción para hallar o sugerir nuevas moléculas con la misma actividad. Existen dos puntos principales a considerar al desarrollar un modelo farmacofórico: como considerar la flexibilidad de las moléculas, y el modo de determinar la combinación de características comunes a todas las moléculas³.

8.3.3.1. Generación de conformaciones

En este trabajo se utilizó el programa MOE 2009.10. Este programa posee la opción de generar una base de datos de conformaciones para las moléculas de interés mediante el módulo “Conformation Import”. Dicho módulo busca generar una serie de conformaciones de baja energía para cada grupo de moléculas. El algoritmo inicia dividiendo cada molécula en fragmentos superponibles, en los que los átomos en la intersección de los fragmentos quedan fijos. Posteriormente se determinan distintas conformaciones para cada fragmento mediante una búsqueda conformacional estocástica. En dicha búsqueda se asignan de manera aleatoria valores para los ángulos de torsión, y se minimiza su energía. El fragmento es rechazado si la

conformación obtenida es muy similar a una ya existente, se viola una restricción de quiralidad, o si la longitud de algún enlace se modificó excesivamente. A continuación los fragmentos son ensamblados para generar la molécula completa, y las conformaciones que presenten contactos de van der Waals inadecuados son rechazadas. Finalmente, se calcula una energía de tensión para cada conformación, las cuales se guardan como una base de datos de conformaciones¹².

8.3.3.2. Generación del modelo farmacofórico

Una vez que se tienen la base de datos de conformaciones de interés, puede generarse un modelo farmacofórico mediante el módulo “Pharmacophore Elucidator”. Cada molécula debe incluir su información de actividad, a fin de distinguir las moléculas activas de las inactivas. El programa buscará generar modelo farmacofóricos que coincidan con un porcentaje específico de moléculas activas (cobertura). Inicialmente, el programa genera anotaciones para cada ligando. Esos son puntos en el espacio que reflejan la presencia o ausencia de una característica dada en dicha ubicación. Los tipos de anotaciones generadas dependen de la selección del usuario, y pueden consistir de un solo punto referente a un átomo, de un centroide (referente a anillos o regiones), o de proyecciones que indicarían la presencia de un grupo complementario (como puede ser un aceptor de puente de hidrógeno)¹².

En un primer paso, para cada conformación de cada molécula activa se calculan todos los pares posibles de anotaciones y la distancia d entre ellos. En esta etapa se generan los modelos farmacofóricos con los mismos pares en que el espacio entre características sea $d \pm$ el valor de la variable de espaciado de características h . Se eliminan los modelos farmacofóricos cuya cobertura sea menor a lo establecido, es decir, que están presentes en un porcentaje de las moléculas menor al especificado. A continuación se calculan los tríos de anotaciones y los modelos farmacofóricos con los tríos de características y con las distancias $d+h\{-1,0,1\}$. Se eliminan los tríos si no están compuestos por una combinación de los modelos farmacofóricos determinados en el paso anterior, y si no cumplen con la cobertura. Posteriormente se calculan los cuartetos de anotaciones y los modelos farmacofóricos con los cuartetos de características de la misma manera. Se eliminan los cuartetos no formados por combinaciones de tríos del paso anterior, y aquellos que no cumplen la cobertura. A los modelos farmacofóricos generados se les asignan coordenadas cartesianas, y posteriormente se agrupan de acuerdo a un valor de rmsd especificado (en Å), para generar un modelo farmacofórico promedio en que las distancias ya no son múltiplos de h . Se evalúa la cobertura y se eliminan modelos farmacofóricos que no cumplen

el requisito. Pueden a continuación generarse modelos farmacofóricos con 5 características o más mediante la concatenación de aquellos con 4 características y geometrías compatibles. Estas se seleccionan si cumplen el criterio de cobertura¹².

De estar presentes moléculas inactivas, se evalúa la capacidad de discriminación entre moléculas activas e inactivas, reportándose la significancia estadística mediante un valor de chi cuadrada. También se evalúan aquellas conformaciones que coinciden con cada modelo farmacofórico, generándose así un alineamiento de las moléculas. Este alineamiento es calificado de acuerdo a la superposición atómica. La forma de cada conformación es modelada mediante una suma de densidades Gaussianas, y se realiza una búsqueda estocástica a fin de encontrar el mejor alineamiento entre las conformaciones coincidentes¹².

8.3.3.3. Búsqueda de bases de datos

Los modelos farmacofóricos generados pueden ser a continuación utilizados para filtrar bases de datos de conformaciones tridimensionales. El programa cuenta con el módulo “Pharmacophore Search”. En él, se generan anotaciones para cada conformación en la base de datos, y se evalúa su coincidencia con las características del modelo farmacofórico. Para cada posible resultado se evalúa la coincidencia con las características del modelo farmacofórico, la distancia entre dichas características y las restricciones adicionales impuestas por el usuario. Posteriormente se superponen las anotaciones a con sus correspondientes características mediante superposición de cuerpo rígido, considerando el radio de tolerancia especificado para cada característica. A continuación se superponen los átomos del ligando al modelo farmacofórico de acuerdo a la transformación calculada en el paso anterior. Son rechazadas las conformaciones que violen las restricciones de volumen del modelo farmacofórico. Las conformaciones aprobadas se almacenan en una base de datos¹².

8.3.4. Referencias

- (1) Karickhoff, S.; McDaniel, V.; Melton, C.; Vellino, A.; Nute, D.; Carreira, L. *Environ. Toxicol. Chem.* **1991**, *10*, 1405–1416.
- (2) Hilal, S. H.; Karickhoff, S. W.; Carreira, L. A. *Quant. Struct. Act. Relat.* **1995**, *14*, 348–355.
- (3) Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*; 2° ed.; Prentice Hall: Harlow, 2001; p. 744.

- (4) Moriguchi, I.; Hinoro, S.; Liu, Q.; Nakagome, I.; Matsushita, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 127–130.
- (5) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (6) Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 1145–1152.
- (7) Verdonk, M. L.; Chessari, G.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Nissink, J. W. M.; Taylor, R. D.; Taylor, R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6504–15.
- (8) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43–53.
- (9) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
- (10) Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425–445.
- (11) Baxter, C. A.; Murray, C. W.; Clark, D. E.; Westhead, D. R.; Eldridge, M. D. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1998**, *33*, 367–82.
- (12) Molecular Operating Environment, versión 2009.10, **2009**, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canadá.

Experimental and Computational Studies on the Inhibition of Acetylcholinesterase by Curcumin and Some of its Derivatives.

Verónica Tello-Franco¹, María Concepción Lozada-García², Manuel Soriano-García*¹

¹ *Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria. 04360, México D.F., México.*

² *Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco. México D.F., México*

*Corresponding author: soriano@servidor.unam.mx, Tel. (52)55-56224569. Fax (52)55-56162203

Running title: Acetylcholinesterase inhibition by curcumin and some of its derivatives

Abstract

Recent studies have demonstrated several biological activities of curcumin with therapeutic potential against Alzheimer's disease, among them the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). Aiming at identifying the chemical features relevant for this activity, the inhibition of curcumin and a set of 7 derivatives against AChE of *E. electricus* was measured. These derivatives presented lower activity than curcumin, allowing for the identification of possible unfavorable enzyme-inhibitor interactions. Our computational approach was to dock the molecules to the active site of AChE, followed by an analysis of hydrogen bonds and close contacts to relevant aromatic amino acid residues. To account for inhibitory activity, we sought to define the common structural features between known acetylcholinesterase inhibitors and the tested derivatives. A pharmacophore model was generated, which consisted of two hydrophobic, one aromatic and one hydrogen bond acceptor features. We conclude that the presence of two aromatic rings and the distance between them, allows curcumin and its derivatives to favorably interact with both the quaternary and peripheral sites of AChE. Hydrogen bonds can be formed with the quaternary and acyl sites, which should further stabilize the complex. The acylation of the hydroxyl groups and the reduction of the conjugated double bonds lowered the inhibitory activity, pointing to the modification of the keto-enol moiety as the best alternative for the design of more potent curcumin derivatives as acetylcholinesterase inhibitors.

Keywords: acetylcholinesterase, acetylcholinesterase inhibition, Alzheimer's disease, curcumin, curcumin derivatives, docking, pharmacophore, tetrahydrocurcumin, Torpedo californica

Introduction

As life expectancy all over the world is increasing, Alzheimer's disease (AD) is becoming a public health issue [1]. Alzheimer's is a neurodegenerative disease characterized by the presence of two lesions: amyloid plaques and neurofibrillary tangles. They are generated by the abnormal aggregation of the β -amyloid (β A) peptide and the tau protein, respectively. Their formation is accompanied by an inflammatory process, which causes oxidative stress and further neuronal damage [2]. Several strategies are being developed for the treatment and prevention of AD [3-5], but nowadays only symptomatic treatments have been approved. Among them, the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, improves the cognitive capacity of the patient by aiding cholinergic synapses whereas the use of an NMDA (N-methyl-D-aspartate) antagonist helps regulate glutamate activity [6]. The use of nonsteroidal anti-inflammatories (NSAI) and antioxidants is recommended in order to reduce the toxic effects of the amyloid peptide [7].

Acetylcholinesterase (AChE) is a protein that belongs to the cholinesterases family, which have high homology both in sequence and in tertiary structure [8]. The enzyme degrades the neurotransmitter acetylcholine at the postsynaptic neuron, ending the nervous impulse [9]. The AChE of *Torpedo californica* has been extensively studied, due to the abundance of the protein on the electric organs of this organism [10]. The tridimensional structure of AChE reveals that the active site is located at the bottom of a deep gorge formed by the catalytic triad S200, E327 and H440 [11]. Adjacent to the catalytic triad are the oxyanion site, which stabilizes the transition state of the substrate [12], and the quaternary site, which stabilizes the quaternary nitrogen of the substrate by interactions with the amino acid residues W84, E199 and F330. The latter has been crystallized in two different conformations which optimize aromatic interactions with the corresponding inhibitors [13]. Amino acid residues F288, F290, F331 and W233, form the acyl binding site which helps stabilize the hydrophobic groups of the substrate [12]. Finally, the peripheral site is located in the upper part of the active site gorge and is formed by the residues Y70, Y121 and W279. It is believed that these residues transiently bind the substrate facilitating its diffusion along the gorge [14, 15].

The extract of *Curcuma longa* has been used for years in Asian traditional medicine for the treatment of several illnesses [16]. One of its most important constituents, curcumin (**1**), is a beta-diketone which displays antiinflammatory [16-18], hipolypemic [19], antimicrobial [20], anticarcinogenic [21, 22], anticoagulant [23] and antioxidant activities [24,25]. The molecule shows a tautomeric equilibrium between the beta-diketone and the keto-enol forms, existing mostly in the latter in solution [26]. Curcumin possesses several characteristics that make this molecule of great interest for the treatment of AD. Besides its anti-inflammatory and antioxidant effects, curcumin has been proven to protect neurons against the toxicity generated by the β A peptide [27, 28], to inhibit its aggregation while promoting its disaggregation both *in vitro* [29] and *in vivo* [30, 31], and to down regulate its production [32, 33]. Curcumin also inhibits the enzyme AChE and enhances memory in scopolamine-induced amnesia [34] and in AD murine models [35]. Additionally, pyrazole (**3**) and isoxazole (**5**) derivatives of curcumin can inhibit γ -secretase [36], an enzyme complex involved in the generation of β A from the amyloid precursor protein (APP) [37]. Both derivatives were found to have affinity for β A, while the pyrazole derivatives inhibit tau aggregation and promote disaggregation *in vitro* [36].

We tested the ability of a set of curcumin derivatives (Figure 1), including pyrazole and isoxazole derivatives to inhibit AChE, searching to correlate the presence of certain chemical features with the activity. To further explore this relationship, molecules **1-9** were docked to the active site of AChE, and the formation of hydrogen bonds and close contacts with relevant amino acids of the active site were analyzed. Numerous acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) with varied chemical scaffolds have been reported. In order to identify the features common between known AChEI and the tested curcumin derivatives, a pharmacophore was generated. This approach allowed to distinguish between chemical motifs with positive influence on the biological activity and those with a negative impact.

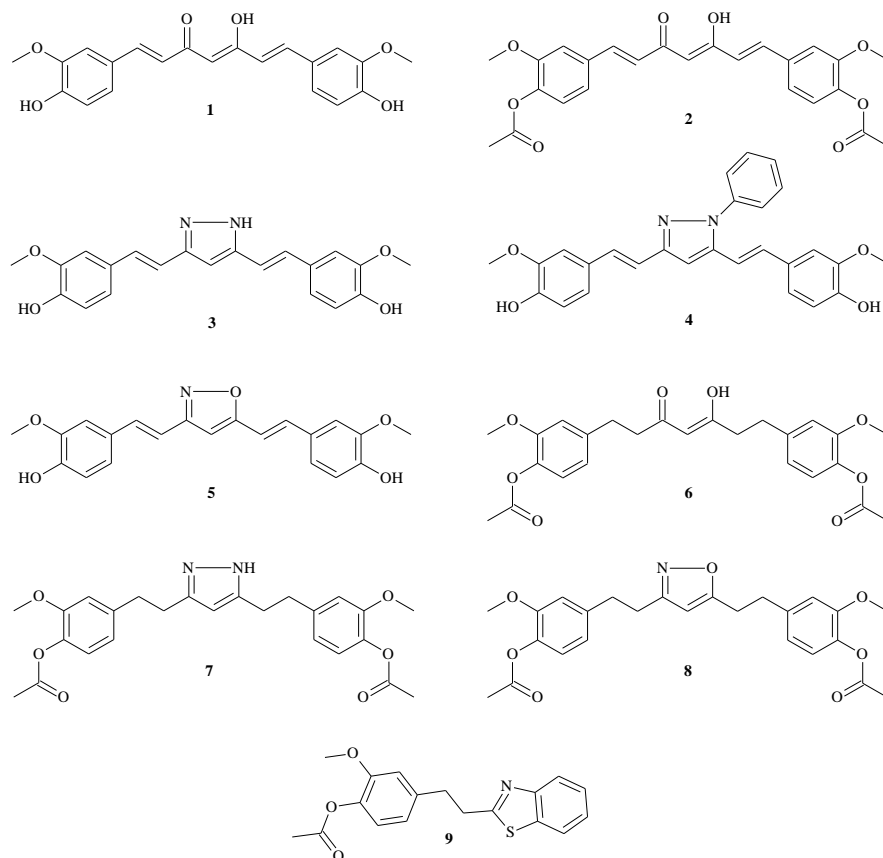


Figure 1 Chemical structures of the analyzed compounds

Methods

Synthesis of curcumin and derivatives

Curcumin [1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] (**1**) was synthesized as previously reported [38], and purified by recrystallization. Acetylated curcumin [1,7-bis(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] (**2**), acetylated tetrahydrocurcumin [1,7-bis(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)hepta-3,5-dione] (**6**), the pyrazole [3,5-bis(β -[4-acetoxy-3-methoxyphenyl] ethyl)pyrazole] (**7**) and isoxazole [3,5-bis(β -[4-acetoxy-3-methoxyphenyl]ethyl) isoxazole] (**8**) derivatives of tetrahydrocurcumin and the benzothiazole derivative [2-(2-[4-acetoxy-3-methoxyphenyl] ethyl)benzothiazole] (**9**) were synthesized as previously published by Lozada *et al.*[39]; whereas the pyrazole [4,4'-(1H-pyrazole-3,5-diyl)di-2,1-ethenediyl]bis(2-methoxyphenol)] (**3**), the isoxazole [4,4'-(3,5-isoxazolidiyl)di-2,1-ethenediyl]bis(2-methoxyphenol)] (**5**), and the phenyl-pyrazole [4,4'-([1-phenyl-1H-pyrazole-3,4-diyl]di-2,1-ethenediyl)bis(2-methoxyphenol)] (**4**) derivatives, were synthesized as previously reported by Mishra *et al.* [40].

In vitro acetylcholinesterase inhibition

Inhibition was measured by a modification of Ellman's method [41]. AChE from *E. electricus* (426 U/mg) was purchased from Sigma Chemical Co. Purity was verified by 12% SDS-PAGE, displaying a single band. 10 μ L of 0.25 U/mL *EeAChE* in 0.1 M pH 8 phosphate buffer, 120 μ L of buffer and 10 μ L of the inhibitors in MeOH or DMSO were added on each well of a 96-well microplate. After 30 min incubation at room temperature, 50 μ L of 3mM acetylcholine iodide and 10 μ L of 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Ellman's reagent) were added, and the plate was read after 10 minutes at 405 nm in a ELx808 Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instruments) at

room temperature. Each inhibitor was evaluated by triplicate, and for each concentration a well with no enzyme added was used as blank. Molecules showing no inhibitory activity at concentrations as high as 400 μM were considered inactive. Tacrine (Sigma Chemical Co.) and galanthamine (kindly provided to us by Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Instituto de Química, UNAM) were included as reference compounds. Data were analyzed with GraphPad Prism v. 5.04 (GraphPad Software, San Diego CA USA), adjusting by a four parameter nonlinear regression, which provided an IC_{25} value and the 95% confidence interval.

Docking

We studied the possible binding conformations of curcumin and the derivatives on the active site of AChE. The crystal structure of AChE from *T.californica* in the open conformation was chosen (PDB: 1EVE) [42]. Water molecules within 5 Å of the amino acid residues comprising the active site gorge were retained, the rest were removed and hydrogens were added according to a pH of 7.4 with the PROPKA server [43], which also optimized the positions of the hydrogen atoms. Curcumin and derivatives were modeled from the crystal structure of curcumin [44]. The geometry was optimized with the program Gaussian03 (Gaussian Inc., Wallingford CT USA) [45], at a DFT level (B3LYP/6-31G(d, p)). The chosen protein crystallographic structure had the inhibitor donepezil [(*R,S*)-1-benzyl-4-[5,6-dimethoxy-1-indanon-2-yl]methyl-piperidine] bound to both the active and peripheral sites. This molecule was re-docked for the purpose of validating the used methodology and of comparing the docking scores. The molecules were docked using AutoDock 4.0 [46], using the default values of the Lamarckian genetic algorithm with 250,000 evaluations, generating 100 conformations with a starting population of 50 individuals. Centering the grid on the oxygen atom of the hydroxyl group of Y121 with a 50x50x40 points box allowed us to include both the active and the peripheral site of the enzyme. Results were clustered with a rms deviation of 2.0 Å, and the lowest energy conformation for the most populated cluster was chosen for further analysis. Hydrogen bonds and close contacts between hydrophobic groups were calculated using AutoDockTools 1.5.2 [47].

The molecules were also docked using the program GOLD 4.1.1 [48], which allowed us to include 19 crystallographic waters within the active site. The binding site was centered again on the oxygen atom of the Y121 with a 15Å radius. Default settings for the genetic algorithm were used, with a starting population size of 100, a preset number of 100,000 operations and the possibility of spinning and toggling waters on and off. Results were clustered with an rms deviation of 2.0Å and scored with both GoldScore and ChemScore. The highest scoring conformation for the most populated cluster was chosen for hydrogen bond and close contact analysis, which was done with the program Hermes 1.3.1.

Pharmacophore

A database of 166 compounds with published biological activity against AChE from *E.electricus* was compiled. This set of AChEI were designed to bind to both the active and peripheral sites of the enzyme [49-55] (see Table S1, Supplementary Material). We included curcumin and derivatives **2-8** on this database, as the keto-enol tautomers. The tridimensional structures were optimized with Gaussian03 employing the semiempirical method PM3. The SPARC on-line server [56] was used to calculate the pKa values of the relevant functional groups, and the protonation state of the molecules was adjusted according to a pH of 8. For the training set, 26 compounds were randomly selected (including curcumin and derivatives **2** and **7**). Due to the considerable flexibility (up to 12 rotatable bonds) of some of these compounds, the training set was docked to *TcAChE* with AutoDock 4.0 as previously described, in order to produce a starting alignment for the molecules. A hundred conformations were generated for each molecule. A general pharmacophore for AChEIs was generated with the Pharmacophore Elucidator module in MOE 2009.10 (Chemical Computing Group Inc, Montreal Canada). The following parameters were specified: maximum of 5 features including hydrophobic, aromatic, hydrogen bond donor or acceptor, cationic; 80% coverage with 1.5 query spacing and 1.25 query cluster. Eleven drugs with therapeutic indications other than AChE inhibition and containing either polycyclic structures or cycles bound to aliphatic chains were randomly cherry-picked (see Table S2, Supplementary Material) to form a set of nonactive molecules. For both the test and

nonactive sets, a conformer library was produced with the Conformation Import module in MOE using the MMFF94x general purpose force field. The best ranked queries were selected and tested with Pharmacophore Search against the validation sets. A linear discriminant analysis (LDA) was performed over these results with SPSS Statistics 20.0 (IBM, Chicago IL USA), analyzing whether each query recognized each molecule as active (1) or nonactive (0).

Results and discussion

In vitro acetylcholinesterase inhibition

Curcumin and its conjugated derivatives have a characteristic orange-yellow coloration, absorbing at 405 nm and causing a reading interference with DTNB. For example, the λ_{\max} of compound **2** in MeOH is 398 nm. This problem was overcome by reducing the concentration of the enzyme and incubating for a longer period, thus obtaining absorbance readings within the scope of linearity of Beer's law. The tested molecules also present limited aqueous solubility at the pH of the assay. Hence, concentrations above 500 μM were not always achievable and prevented us from obtaining the highest points of the inhibition curve. Statistically significant regressions were obtained in all cases, but we chose to compare the inhibitor concentration at which enzyme activity decreased by 25% (IC_{25}) instead of the more frequently used 50% (IC_{50}), since these values were reached experimentally for every molecule tested and are therefore not extrapolated. For example, the highest tested concentration for molecule **8** accounted for 40% inhibition. Two known AChEI, tacrine and galanthamine were used as reference compounds. The calculated IC_{25} for the tested compounds are shown in Table 1.

Table 1. Inhibition of *E. electricus* acetylcholinesterase by curcumin and its derivatives.

	IC_{25} (μM) ^a	95% CI ^b (μM)
Tacrine	65 pM	7.8-533 pM
Galanthamine	0.167	0.113-0.227
1	13.2	4.4-39
2	103	85-126
3	52	42-64
4	158	107-234
5	NO ^c	
6	NO ^c	
7	151	116-195
8	131	104-163
9	303	278-328

^a 10 μL 0.25 U/mL *EeAChE*, 120 μL PBS 0.1 M pH 8, 10 μL of the inhibitors, 50 μL of 3mM acetylcholine iodide and 10 μL of DTNB read after 10 min

^b 95% confidence interval

^c Not observed

The active site gorge of AChE is mostly hydrophobic and is lined with numerous aromatic amino acid residues. It is therefore probable that the aromatic rings of curcumin form hydrophobic or π - π interactions with the aromatic residues on the active site, thus allowing for a low inhibitory activity. Curcumin has three hydroxyl groups which can

act as hydrogen bond donors (HBD), the hydroxyl groups of the phenyl moieties and that of the keto-enol moiety. The ketone group from the latter can also serve as a hydrogen bond acceptor (HBA). Previous reports indicate that curcumin is a less potent AChEI than the demethoxy and bisdemethoxy curcuminoids, and related the presence of the methoxy groups with lower activity [34]. The acetylation of the 4-hydroxy groups in **2** further lowered the activity of curcumin. This may be due to the absence of the HBDs, or to the bulk of the acetyl group causing unfavorable steric effects.

Derivatives **3-8** showed lower activity than curcumin and two separate effects can be distinguished. Regarding the hydrogen bond-forming groups, no tautomeric equilibrium between an HBD and HBA can be achieved in molecules **4** or **5**, diminishing the potential number of protein-inhibitor interactions. Molecule **5** was found to be inactive, while the IC_{25} of **4** was 3 times higher than that of the unsubstituted derivative **3**, which presents the aforementioned tautomerism. Derivative **4** lacks the HBD function, presenting instead an additional aromatic group that might improve hydrophobic interactions but represents an unfavorable increase in the volume of the molecule. The second effect to analyze is the flexibility of the molecules. Increasing the flexibility of the molecule by reducing the double bonds has a detrimental effect on inhibitory activity. Molecule **6** showed no activity compared with **2**, while **7** displayed lower activity than **3**. Interestingly, **8** exhibits activity comparable to **7**, even though it displays both activity-reducing features: reduced double bonds and absence of all three HBD. The formation of a pyrazole or isoxazole rings somewhat increases the rigidity of the molecules, possibly helping restore inhibitory activity. Molecule **9** has two aromatic rings but with a shorter distance among them, having a length of approximately half the curcumin molecule and no HBD. It presented the lowest activity among all tested molecules, thus indicating the importance of the distance between the aromatic features. In order to further explore the possibility of hydrogen bonding with specific residues of the AChE active site, docking studies were performed.

Docking

The highest scoring conformation for the most populated cluster of each molecule was analyzed. Docking scores, hydrogen bonds and close contacts with the aromatic residues are shown in Table 2. In both AutoDock and GOLD programs, the crystallographic conformation of donepezil was accurately reproduced, with a rmsd of 0.92 Å for AutoDock and of 2.6 Å for GOLD. The larger value for the GOLD result was caused by the inverse orientation of the indanone ring, since for the phenyl and piperidine moieties the rmsd was 0.92 Å. The contacts with the aromatic amino acids present in the crystallographic structure were reproduced, while the water mediated hydrogen bonds were not. For both donepezil and curcumin derivatives, an average of 5 water molecules were included. These are mostly highly conserved waters [57] located at specific solvation sites with which the ligands do not interact. The presence of such water molecules did not significantly influence either the docked scores or the obtained conformations.

Curcumin and all derivatives could be placed inside the active site gorge. This indicates that the volume of the phenyl ring in **4** does not represent a hindrance to binding, but neither did this group interact with the aromatic residues of the active site. The decrease in activity with respect to **3** can be assigned to the lack of the HBD and to the phenyl group not contributing significantly though hydrophobic/aromatic interactions. Close contacts with aromatic residues were observed for all the molecules with the quaternary site residues (W84 and F330), and for most molecules with the peripheral site (W279) as well (Figure 2). X-ray structures of AChE in complex with tacrine [13] and huperzine A [58] demonstrate the importance of the interactions with the quaternary site residues, while the complexes with donepezil [42] and bis huperzine-like compounds⁸⁸[59] show the importance of the interactions with the peripheral site aminoacids. In these cases, the aromatic moieties interacting with the aromatic residues possess a possibly charged amino group, thus forming cation- π interactions as well as π - π interactions. Molecule **9** interacted only with the outermost part of the active site due to its smaller size. This supports the interpretation that the distance in the curcumin scaffold could allow for the interaction of the aromatic rings with both the quaternary and peripheral sites, and when one of these interactions is lost, activity decreases. Close contacts were also consistently observed at the acyl site with Y334.

Table 2. Docking scores, hydrogen bonds and aromatic contacts for selected conformations.

Molecule	Docking Scores			Hydrogen Bonds											Close Contacts			
	AutoDock (kcal/mol)	GoldScore	ChemScore	D72	G117	Y121	S122	Y130	E199	S286	F288	R289	Y334	H440	W84	W279	F330	Y334
Donepezil	-7.23	67.85	45.94	•														
1	-7.50	66.09	33.44						■			■			■	■	■	■
2	-4.78	63.94	15.93			■									■	■	■	■
3	-7.15	75.04	42.73				•											
4	-8.29	73.12	33.41	•					■	■	■							
5	-7.41	69.35	27.18		•			■	■									
6	-5.71	71.89	18.03															
7	-5.86	83.11	27.10														■	■
8	-6.35	83.51	22.90														■	■
9	-7.60	78.83	32.23	•													■	■

• Water-mediated hydrogen bond
 0-3 frequency of hydrogen bonds

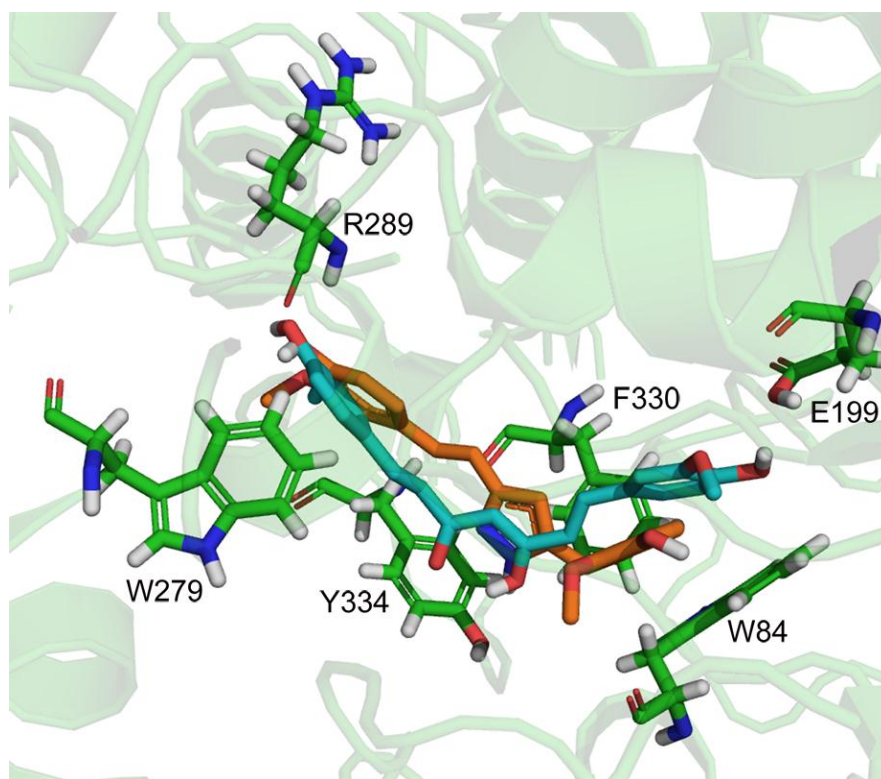


Figure 2 Representative docking modes of curcumin (cyan) and molecule 3 (orange) in AChE

The hydroxyl group in molecules **1**, **3-5** located at the bottom of the gorge, formed hydrogen bonds with E199 and/or Y130 at the quaternary site, while in **7** the corresponding acetyl group served as an HBA in these interactions. For molecules **1**, **3-5**, the hydroxyl groups at the upper part of the active site hydrogen bonded with backbone atoms of S286, F288 or R289 at the acyl site, while in molecules **2** and **8** the acetyl served as HBA in these interactions. The formation of hydrogen bonds with Y130 at the quaternary site, and with the backbone N of F288 is observed in the crystal structure of the bis-hupA compounds [59]. Of the three conformations analyzed for each molecule, hydrogen bonds formed by the hydroxyl groups were observed consistently, while those formed by the acetyl groups were only observed once. This suggests that the bulk and mobility of the acetyl groups diminishes the probability of reaching a correct conformation where the hydrogen bonds can be formed, thus having a negative impact on activity. The keto-enol moiety and the corresponding HBD/HBA pair of the pyrazole ring interacted with residues D72 or Y121 near the peripheral quaternary site or with Y334 at the acyl site, all of them located at the middle part of the gorge. Molecules **4** and **5** formed no hydrogen bonds in this area, whereas in **8** the oxygen of the isoxazole ring serves as an HBA. The absence of an HBD function at the middle part of the molecules prevents the formation of a stabilizing interaction which positively contributes to activity.

Although molecules **6-8** formed hydrogen bonds with residues at the bottom and middle of the active site gorge, these interactions were not observed consistently among the analyzed conformations. The clusters obtained from the docking results for these molecules were significantly smaller than those of their conjugated partners. The largest number of clusters were obtained for tetrahydrocurcumin, and only one hydrogen bond was found; while for the slightly more rigid pyrazole and isoxazole derivatives, two hydrogen bond possibilities and a smaller number of clusters were found, which correlate with the observation of biological activity in those molecules. This indicates that the greater flexibility of tetrahydrocurcumin and its derivatives negatively impacts activity. The docking scores obtained do not reflect the order of activity of the molecules, which may be due to the fact that the force fields used do not calculate π - π interactions differently from simple hydrophobic interactions [60-62]. The lack of activity of **5** could not be explained by the hydrogen bond and close contact analysis, so its physicochemical properties such as logP, pKa or stability of the ring at pH 8 should be analyzed in a future study.

Pharmacophore

Having analyzed the characteristics of the curcumin derivatives that affect the inhibitory AChE activity, we sought to identify those features common to known AChEI and our set of tested molecules. Four types of pharmacophores were generated, which included hydrophobic, aromatic, HBD and HBA features. The number and nature of the features of the best scored query of each kind are shown in Table 3. The generated queries were then tested against our evaluation set, composed of both active and nonactive molecules. After a referee's suggestion, a LDA was performed on these results, to test the queries' capacity to discriminate between both types of molecules, as is done with QSAR models [63, 64]. Results are shown in Table 4. Query A, comprised of 3 hydrophobic and one HBA features, had the best performance recognizing 85% of the AChEI on the validation set. The rest of the queries had lower recognition capacity, around 60% of the test set. Queries A and B displayed a poor capacity to discriminate nonactive molecules, while query D correctly identified 75% of them. For queries A and B, the location of the HBA and HBD was contiguous, probably two different descriptions of the same functional group or adjacent groups; and the hydrophobic features are also found in similar locations. For queries B and C, the location of the HBD and hydrophobic features is also adjacent, which could indicate different conformations of the same functional group. For queries A and D, the location of the HBA and aromatic features differs significantly from the rest of the queries, pointing to a unique description of the molecules.

Although a significant number of the AChEI in our database include a quaternary nitrogen or a functional group protonated at physiological pH, no cationic features were found in the pharmacophores. Visual inspection of the training set conformations reveal that the location of the positive charge is not consistent, and in the context of the

protein the charge can be found interacting with W84 at the bottom, Y121 in the middle or with W279 at the upper part of the gorge. It is known that the presence of a positive nitrogen enhances biological activity by allowing the molecule to interact with the protein's dipole [65], facilitating diffusion down the gorge [66] and by forming π -cation interactions [67]. Yet, we found that the location of the feature can vary due to the multiple aromatic residues of the active site.

Table 3. Selected pharmacophore queries. Number, nature of their features and score.

	Features				Score
	Hydrophobic	Aromatic	HBA	HBD	
A	3		1		13.44
B	3			1	10.58
C	2		1	1	9.63
D	2	1	1		10.45

Table 4. Performance of pharmacophore queries in training, validation and overall data sets.

		Training			Validation			Both		
		%	Active	Nonactive	%	Active	Nonactive	%	Active	Nonactive
Query A										
Sensitivity	Active	100	24	0	85.1	126	22	87.2	150	22
Specificity	Nonactive	100	0	2	41.7	7	5	50	7	7
Accuracy		100			81.9			84.4		
Query B										
Sensitivity	Active	79.2	19	5	68.9	102	46	70.3	121	51
Specificity	Nonactive	0	2	0	41.7	7	5	35.7	9	5
Accuracy		73.1			66.9			67.7		
Query C										
Sensitivity	Active	79.2	19	5	61.5	91	57	64	110	62
Specificity	Nonactive	0	2	0	66.7	4	8	57.1	6	8
Accuracy		73.1			61.9			63.4		
Query D										
Sensitivity	Active	79.2	19	5	64.2	95	53	66.3	114	58
Specificity	Nonactive	50	1	1	75	3	9	71.4	4	10
Accuracy		76.9			65			66.7		

We examined the percentage of the tested curcumin derivatives recognized by each query, for we search to establish common features between them and known AChEI. Results are shown in Figure 3. Queries A and D recognized the highest percentage of curcumin derivatives, while query D showed the best capacity to discriminate nonactive molecules. This indicates that the hydrophobic features in query A provide a rather general description, and that by specifying the location of an aromatic feature the discrimination percentage is substantially increased.

For that reason query D was selected as the best pharmacophoric description for curcumin derivatives with AChEI activity. Mapping of relevant molecules into query D is shown in Figure 4. As stated before, the molecules selected for the test set were designed to bind to both the peripheral and quaternary sites of AChE. Therefore, most of them are comprised of two or more different aromatic or cyclic groups bound with chains of varying length and degrees of freedom. Figure 4a shows the structure of the most active compound on the test set. For this molecule as for most of the test set, one of the aromatic moieties is mapped to the aromatic feature, while the hydrophobic features map to other groups of either the connecting chain or the second cyclic group. The HBA corresponded mostly to a carbonyl

group. Previous studies of pharmacophores generated for dual binding site AChEI consist mainly of either hydrophobic [68, 69] or both hydrophobic and aromatic [70] features combined with HBD and HBA features. Although the location of the hydrogen bond-forming features varies between the models, the location of hydrophobic/aromatic features in those pharmacophores as well as in ours privilege the interaction of the molecules with the aromatic residues in both the quaternary and peripheral sites.

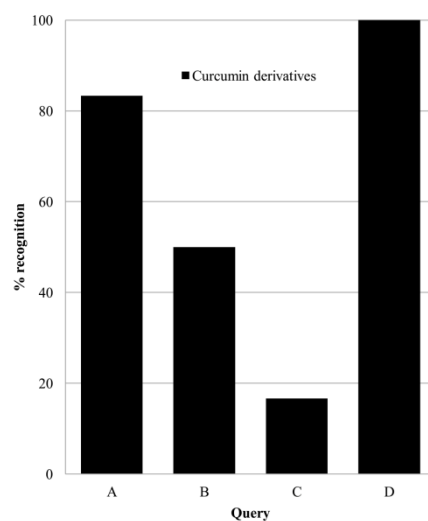


Figure 3 Percent recognition of curcumin derivatives for each selected query

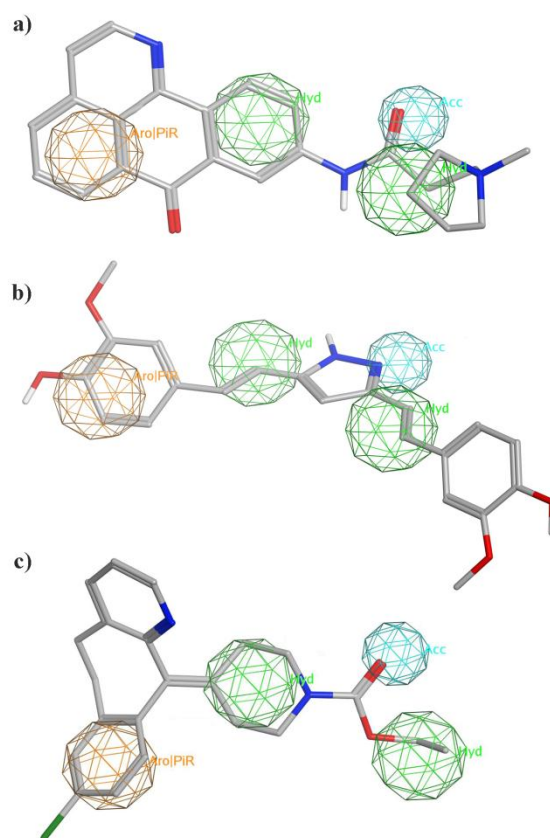


Figure 4 Query D mapped on **a)** the most potent molecule in the test set (4b from [54], $IC_{50}=1$ nM), **b)** molecule 3 and **c)** loratadine. Hydrophobic features are shown in green, aromatic in orange and hydrogen bond acceptor in cyan

For curcumin and its derivatives, the aromatic feature corresponds to one of the aromatic rings while the hydrophobic features were mapped along the connecting chain and corresponded to the double bonds for compounds **1-5** (Figure 4b). However, for a small percentage of the conformations of **3-5**, the aromatic feature mapped to either the phenyl, isoxazole or pyrazole ring, while the HBA feature mapped to the hydroxyl group on the phenyl ring. This indicates that these molecules have alternative ways of binding to AChE that satisfy our description. Reduced molecules **6-8** mapped in basically the same conformations as shown in 3b, but it can be observed that the ring adjacent to the hydrophobic feature has several different possible conformations due to the free rotation of the bond. This confirms the idea that flexibility hinders the ability to stably bind to the active site. For molecule **9**, the aromatic feature mapped to the benzothiazole ring, the hydrophobic features mapped to the chain and the second aromatic ring and the HBA coincides with either the acetyl or the methoxy substituents.

The pharmacophore thus obtained highlights the common characteristics of all tested derivatives. The number and nature of the pharmacophoric features suggest a large role of hydrophobic interactions, with participation of hydrogen bonding as traits necessary for inhibitory activity.

Conclusion

A set of curcumin derivatives was tested for acetylcholinesterase inhibition, 6 of them displaying the desired activity. In order to distinguish the features relevant to this activity, we conducted a computational study of the molecules. We first analyzed the presence of hydrogen bonds and close contacts with the aromatic amino acid residues of the active site in the docked complexes of our molecules. It was observed that all molecules formed an important number of close contacts with the aromatic residues of the active site gorge. The presence of the aromatic rings and the distance between them proved essential to the activity of the molecules, allowing them to interact with both the quaternary and peripheral sites. The different activity of the molecules might depend on the geometry of the interactions, thus forming more energetically favorable stacking interactions. The presence of hydrogen bond forming groups in the molecule also had a positive contribution, especially in the quaternary and acyl sites. The reduction of the conjugated double bonds conferred more flexibility to the molecule and lowered its activity, although the presence of the aforementioned functional groups still rendered the molecules active. A pharmacophore for acetylcholinesterase inhibitors capable of recognizing active curcumin and curcumin derivatives was also obtained. The best description consisted of one aromatic, two hydrophobic and one hydrogen bond acceptor features. The hydrogen bond acceptor was mapped to the corresponding features in the keto-enol or pyrazole or isoxazole ring, thus indicating the importance of this interaction for activity. The nature of the hydrogen bond donors and acceptors in the aromatic ring and in the keto-enol moiety could be modified in order to explore their contribution to activity and aid in the design of more potent curcumin derivatives as acetylcholinesterase inhibitors.

Acknowledgments

We thank Ricardo Reyes Chilpa (Instituto de Química, UNAM) for kindly providing the galanthamine sample. Funding for this project was provided by CONACYT-Mexico (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Supplementary Material

Table **S1**. Structure and pIC₅₀ of acetylcholinesterase inhibitors used in pharmacophore generation and evaluation.

Table **S2**. Nonactive molecules of pharmacophore validation set.

References

- [1] Vas, C. J.; Rajkumar, S.; Tanyakitpisal, P.; Chandra, V. *Alzheimer's Disease: The brain killer*; World Health Organization. Regional Office for South-East Asia, **2001**.
- [2] McGeer, P. L.; McGeer, E. G. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.*, **1995**, *21*, 195-218.
- [3] Castro, A.; Conde, S.; Rodríguez-Franco, M. I.; Martinez, A. Non-cholinergic pharmacotherapy approaches to the future treatment of Alzheimer's disease. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2002**, *2*, 37-50.
- [4] Silva, K. A. Da; Aubert, I.; McLaurin, J. Vaccine development for Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.*, **2006**, *12*, 4283-4293.
- [5] Hüll, M.; Berger, M.; Heneka, M. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease: how far have we come? *Drugs*, **2006**, *66*, 2075-2093.
- [6] Rogawski, M. A.; Wenk, G. L. The Neuropharmacological basis for the use of Memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.*, **2003**, *9*, 275-308.
- [7] Skovronsky, D. M.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative Diseases: New concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pathol.: Mech. Dis.*, **2006**, *1*, 151-170.
- [8] Cygler, M.; Schrag, J. D.; Sussman, J. L.; Harel, M.; Silman, I.; Gentry, M. K.; Doctor, B. P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci.*, **1993**, *2*, 366-382.
- [9] Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*; 4th ed.; Garland Science: New York, **2002**.
- [10] Nachmansohn, D.; Wilson, I. B. Acetylcholinesterase. *Method. Enzymol.*, **1955**, *1*, 642-651.
- [11] Sussman, J. I.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, **1991**, *253*, 872-879.
- [12] Harel, M.; Quinn, D. M.; Nair, H. K.; Silman, I.; Sussman, J. L. The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origin of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 2340-2346.
- [13] Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, *90*, 9031-9035.
- [14] Bourne, Y.; Taylor, P.; Radi, Z.; Marchot, P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *EMBO J.*, **2003**, *22*, 1-12.
- [15] Greenblatt, H. M.; Dvir, H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.*, **2003**, *20*, 369-383.
- [16] Ammon, H. P.; Wahl, M. A. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.*, **1991**, *57*, 1-7.
- [17] Masuda, T. In *Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties*; Risch, S. J.; Ho, C. T., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, **1997**; Vol. 660, pp. 219-233.
- [18] Kohli, K.; Ali, J.; Ansari, M. J.; Raheman, Z. Curcumin: a natural antiinflammatory agent. *Indian J. Pharmacol.*, **2005**, *37*, 141-147.
- [19] Kempaiah, R. K.; Srinivasan, K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. *J. Nutr. Biochem.*, **2006**, *17*, 471-478.
- [20] Roth, G. N.; Chandra, A.; Nair, M. G. Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents. *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 542-545.

- [21] Thangapazham, R. L.; Sharma, A.; Maheshwari, R. K. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J.*, **2006**, *8*, E443-E449.
- [22] Lin, J.-K. Molecular targets of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2007**, *595*, 227-243.
- [23] Liu, Y. In *Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties*; Risch, S. J.; Ho, C. T., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, **1997**; Vol. *660*, pp. 199-205.
- [24] Sharma, O. P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem. Pharmacol.*, **1976**, *25*, 1811-1812.
- [25] Osawa, T.; Sugiyama, Y.; Inayoshi, M.; Kawakishi, S. In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II: Teas, Spices and Herbs*; Ho, C. T.; Osawa, T.; Huang, M. T.; Rosen, R. T., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, **1994**; Vol. *547*, pp. 183-193.
- [26] Tønnesen, H. H. In *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health I. Analysis, Occurrence, and Chemistry*; Ho, C.-T.; Lee, C. Y.; Huang, M.-T., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, **1992**; Vol. **506**, pp. 143-153.
- [27] Park, S. Y.; Kim, D. S. H. L. Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1227-1231.
- [28] Ahmed, T.; Gilani, A.-H. A comparative study of curcuminoids to measure their effect on inflammatory and apoptotic gene expression in an A β plus ibotenic acid-infused rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res.*, **2011**, *1400*, 1-18.
- [29] Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res.*, **2004**, *75*, 742-750.
- [30] Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaque, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 5892-5901.
- [31] Garcia-Alloza, M.; Borrelli, L. A.; Rozkalne, A.; Hyman, B. T.; Bacskai, B. J. Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J. Neurochem.*, **2007**, *102*, 1095-1104.
- [32] Shimmyo, Y.; Kihara, T.; Akaïke, A.; Niidome, T.; Sugimoto, H. Epigallocatechin-3-gallate and curcumin suppress amyloid beta-induced beta-site APP cleaving enzyme-1 upregulation. *Neuroreport*, **2008**, *19*, 1329-33.
- [33] Liu, H.; Li, Z.; Qiu, D.; Gu, Q.; Lei, Q.; Mao, L. The inhibitory effects of different curcuminoids on beta-amyloid protein, beta-amyloid precursor protein and beta -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in swAPP HEK293 cells. *Neurosci. Lett.*, **2010**, *485*, 83-88.
- [34] Ahmed, T.; Gilani, A.-H. Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **2009**, *91*, 554-559.
- [35] Ahmed, T.; Enam, S. A.; Gilani, A. H. Curcuminoids enhance memory in an amyloid-infused rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, **2010**, *169*, 1296-306.
- [36] Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberger, S.; K, B.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen, S.; Mandelkow, E.; Schmidt, B. Curcumin-derived pyrazoles and isoxazoles: Swiss army knives or blunt tools for Alzheimer's disease? *ChemMedChem*, **2008**, *3*, 165-172.
- [37] Selkoe, D. J. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol. Rev.*, **2001**, *81*, 741-766.
- [38] Feng, J.-Y.; Liu, Z.-Q. Phenolic and Enolic Hydroxyl Groups in Curcumin: Which Plays the Major Role in Scavenging Radicals? *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 11041-11046.
- [39] Lozada, M. C.; Enríquez, R. G.; Lobato, C. E.; Ortiz, B.; Soriano, M.; Gnecco, D.; Reynolds, W. F. Synthesis and structure of new heterocyclic derivatives of curcumin. *Heterocycles*, **2005**, *65*, 49-58.
- [40] Mishra, S.; Karmodiya, K.; Surolia, N.; Surolia, A. Synthesis and exploration of novel curcumin analogues as anti-malarial agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 2894-2902.

- [41] Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, *7*, 88-90.
- [42] Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 [Aricept]: implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, **1999**, *7*, 297-307.
- [43] Li, H.; Robertson, A. D.; Jensen, J. H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins*, **2005**, *61*, 704-721.
- [44] Tønnesen, H. H.; Karlsen, J.; Mostad, A.; Samuelsson, B.; Enzell, C. R.; Berg, J.-E. Structural Studies of Curcuminoids. I. The Crystal Structure of Curcumin. *Acta Chemica Scandinavica*, **1982**, *36b*, 475-479.
- [45] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03, Revision E.01.
- [46] Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, **1998**, *19*, 1639-1662.
- [47] Sanner, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graphics Mod.*, **1999**, *17*, 57-61.
- [48] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.*, **1995**, *245*, 43-53.
- [49] Anderani, A.; Cavalli, A.; Granaiola, M.; Guardigli, M.; Leoni, A.; Locatelli, A.; Morigi, R.; Rambaldi, M.; Recanatini, M.; Roda, A. Synthesis and screening for acetylcholinesterase activity of [1-benzyl-4-oxopiperidin-3-ylidene]methylindoles and -pyrroles related to donepezil. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 4011-4014.
- [50] Contreras, J. M.; Parrot, I.; Sippi, W.; Rival, Y. M.; Wermuch, C. F. Design, synthesis, and structure-activity relationships of a series of 3-[2-[1-benzylpiperidin-4-yl]ethylamino] pyridazine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 2707-2718.
- [51] Guillou, C.; Mary, A.; Renko, D. Z.; Gras, E.; Thal, C. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine-galanthaminium salts. *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *10*, 637-639.
- [52] Mary, A.; Renko, D. Z.; Guillou, C.; Thal, C. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationship of bis-interacting ligands in the galantamine series. *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, *6*, 1835-1850.
- [53] Sauvaitre, T.; Barlier, M.; Herlem, D.; Gresh, N.; Chiaroni, A.; Guenard, D.; Guillou, C. New potent acetylcholinesterase inhibitors in the tetracyclic triterpene series. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 5311-5323.
- [54] Tang, H.; Ning, F.-X.; Wei, Y.-B.; Huang, S.-L.; Huang, Z.-S.; Chan, A. S.-C.; Gu, L.-Q. Derivatives of oxoisoaporphine alkaloids: A novel class of selective acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 3765-3768.
- [55] Zhou, X.; Wang, X.-B.; Wang, T.; Kong, L.-Y. Design, synthesis, and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 8011-8021.
- [56] Hilal, S. H.; Karickhoff, S. W.; Carreira, L. A. A Rigorous Test for SPARC's Chemical Reactivity Models: Estimation of More Than 4300 Ionization pKas. *Quant. Struct. Act. Relat.*, **1995**, *14*, 348-355.

- [57] Koellner, G.; Kryger, G.; Millard, C. B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Steiner, T. Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *296*, 713-735.
- [58] Raves, M.; Harel, M.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Kozikowski, A. P.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, [-]-huperzine A. *Nature Str. Biol.*, **1997**, *4*, 57-63.
- [59] Wong, D. M.; Greenblatt, H. M.; Dvir, H.; Carlier, P. R.; Han, Y. F.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase complexed with bivalent ligands related to huperzine A: experimental evidence for species-dependent protein-ligand complementarity. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 363-373.
- [60] Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.*, **2007**, *28*, 1145-1152.
- [61] Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **1997**, *11*, 425-445.
- [62] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.*, **1997**, *267*, 727-748.
- [63] Agüero-Chapin, G.; Varona-Santos, J.; Riva, G. A. de la; Antunes, A.; González-Villa, T.; Uriarte, E.; González-Díaz, H. Alignment-free prediction of polygalacturonases with pseudofolding topological indices: experimental isolation from *Coffea arabica* and prediction of a new sequence. *J. Proteome Res.*, **2009**, *8*, 2122-2128.
- [64] Santana, L.; González-Díaz, H.; Quezada, E.; Uriarte, E.; Yáñez, M.; Viña, D.; Orallo, F. Quantitative structure-activity relationship and complex network approach to monoamine oxidase A and B inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 6740-51.
- [65] Felder, C. E.; Botti, S. A.; Lifson, S.; Silman, I.; Sussman, J. L. External and internal electrostatic potentials of cholinesterase models. *J. Mol. Graphics Mod.*, **1997**, *15*, 318-27, 335-7.
- [66] Antosiewicz, J.; Wlodek, S. T.; McCammon, J. A. Acetylcholinesterase: Role of the enzyme's charge distribution in steering charged ligands toward the active site. *Biopolymers*, **1996**, *39*, 85-94.
- [67] Ma, J. C.; Dougherty, D. A. The Cation- π Interaction. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1303-1324.
- [68] Gupta, S.; Fallarero, A.; Järvinen, P.; Karlsson, D.; Johnson, M. S.; Vuorela, P. M.; Mohan, C. G. Discovery of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors identified by pharmacophore modeling and sequential virtual screening techniques. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 1105-12.
- [69] Lu, S.-H.; Wu, J. W.; Liu, H.-L.; Zhao, J.-H.; Liu, K.-T.; Chuang, C.-K.; Lin, H.-Y.; Tsai, W.-B.; Ho, Y. The discovery of potential acetylcholinesterase inhibitors: a combination of pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies. *J. Biomed. Sci.*, **2011**, *18*, 1-13.
- [70] Chen, Y.; Fang, L.; Peng, S.; Liao, H.; Lehmann, J.; Zhang, Y. Discovery of a novel acetylcholinesterase inhibitor by structure-based virtual screening techniques. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.046>.