

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA



**AVANCES EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE  
INHIBIDORES DE LA ENZIMA MONOAMINO OXIDASA B.**

Trabajo Especial de Grado presentado  
ante la Ilustre Universidad Central de  
Venezuela, por la Br. Diana Stella Pachón  
Aguirre para optar al Título de Licenciado  
en Química

Tutor: Dra. María Rodríguez.

Caracas, Mayo de 2010.





Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **AVANCES EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE INHIBIDORES DE LA ENZIMA MONOAMINO OXIDASA B**. Presentado por la Br. Diana Stella Pachón Aguirre, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Prof. María Rodríguez  
(Directora)

Prof. Andrés Escalona  
(Jurado)

Prof. Gustavo Cabrera  
(Jurado)





Yo Profesora María Rodríguez, Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**AVANCES EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE INHIBIDORES DE LA ENZIMA MONOAMINO OXIDASA B.**

Que presenta el Br. Diana Stella Pachón Aguirre, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio ó Centro de Investigación de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2007 y 2010, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Mayo de 2010

---

Prof. María Rodríguez  
(Directora)

## Agradecimientos

A Dios y a la Virgen de Fátima por darme la salud y la fortaleza para seguir adelante cuando el camino fue difícil.

Gracias a mis padres y a mi hermano por su apoyo, cariño y colaboración.

A la Prof. María Rodríguez por su paciencia y perseverancia, por ser ejemplo a seguir como docente, tutora y sobretodo como amiga. Al Prof. Freddy González – Mujica por orientarme con sus consejos en mi trabajo, mil gracias por brindarme su amistad y conocimientos. A todo el equipo del laboratorio de Productos Naturales Prof. M. Hasegawa, Jairo, Doris, Natasha, Orlando, Gabriela, Sandra Duque, Luis Canino. Gracias a Elsy por su apoyo y colaboración durante la realización del trabajo experimental, siendo amiga y maestra. A Alba por su sonrisa cálida que me brindo ánimos cuando hicieron falta.

Gracias a los jurados, Prof. Escalona y Prof. Cabrera, por su apoyo y consideración, mil gracias por sus orientaciones y su paciencia.

A todos mis amigos, que de una manera u otra permitieron que este trabajo fuese una realidad al brindarme su apoyo y comprensión. En especial a Armando por ser amigo incondicional, a Liz, Ketty, Ynes, Peggy, Diana Carrasco, Nayarik, Arantza, José C, Merlen, María Eugenia, y a todos aquellos que no alcanzo a nombrar pero guardo en mi mente y mi corazón.

Por último y no menos importante a ti Carlos David, compañero de vida y sobretodo amigo, por acompañarme durante el largo camino que he recorrido para ver este sueño hecho una realidad.



## Índice General

Índice de Figuras.....	iv
Índice de Esquemas.....	v
Índice de Gráficos.....	vi
Índice de Tablas.....	viii
Índice de Fotos.....	x
Resumen.....	xi
Introducción.....	1
Enfermedad de Parkinson.....	3
Monoamino Oxidasa (MAO).....	8
Inhibidores de la Monoamino Oxidasa (IMAOS).....	10
Alcaloides.....	13
Alcaloides y MAO.....	15
Detección cromatográfica de metabolitos secundarios activos (Antecedentes).....	18
Objetivo Principal.....	22
Objetivos Específicos.....	22
Metodología.....	23
I.-Obtención de las fracciones mitocondriales parcialmente purificadas y homogenizadas de MAO. Método Holt.....	23
II.- Cuantificación de proteínas por el Método Lowry.....	24
III.- Determinación de la actividad enzimática de MAO-B empleando bencilamina como sustrato.....	25
III.1.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad enzimática de MAO-B utilizando como sustrato bencilamina.....	25
III.2.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad inhibitoria sobre MAO-B utilizando como sustrato bencilamina.....	26

IV.- Evaluación de la actividad enzimática de MAO-B sobre CCF con diferentes colorantes empleando bencilamina como sustrato. ....	27
IV.1.- Selección del agente de coloración a utilizar en la determinación de la actividad enzimática de MAO-B. ....	27
IV.2.- Optimización de los parámetros que afectan la actividad enzimática de MAO-B en CCF.....	29
IV.3.- Validación del método cualitativo en CCF para detectar la inhibición de la actividad enzimática de MAO-B en presencia de inhibidores conocidos de la enzima. ....	31
V.- Determinación de la actividad enzimática de MAO-B utilizando dopamina como sustrato. ....	32
V.1.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad enzimática de MAO-B utilizando como sustrato dopamina. ....	32
V.2.-Evaluación de la actividad inhibitoria sobre MAO-B mediante espectrofotometría UV de una serie de análogos de cloruro de berberina, empleando dopamina como sustrato. ....	33
Resultados y Discusión .....	35
I.-Obtención de las fracciones mitocondriales parcialmente purificadas y homogenizadas de MAO. Método Holt .....	35
II.- Cuantificación de proteínas por el Método Lowry.....	35
III.- Determinación de la actividad enzimática de MAO-B empleando bencilamina como sustrato. ....	36
III.1.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad enzimática de MAO-B utilizando como sustrato bencilamina.....	36
III.2.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad inhibitoria sobre MAO-B utilizando como sustrato bencilamina.....	38
IV.- Evaluación de la actividad enzimática de MAO-B sobre CCF con diferentes colorantes empleando bencilamina como sustrato. ....	41

IV.1.- Selección del agente de coloración a utilizar en la determinación de la actividad enzimática de MAO-B. ....	41
IV.2.- Optimización de los parámetros que afectan la actividad enzimática de MAO-B en CCF.....	48
IV.3.- Validación del método cualitativo en CCF para detectar la inhibición de la actividad enzimática de MAO-B en presencia de inhibidores conocidos de la enzima. ....	51
V.- Determinación de la actividad enzimática de MAO-B utilizando dopamina como sustrato. ....	52
V.1.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad enzimática de MAO-B utilizando como sustrato dopamina. ....	52
V.2.-Evaluación de la actividad inhibitoria sobre MAO-B mediante espectrofotometría UV de análogos de berberina empleando dopamina como sustrato. ....	56
Conclusiones.....	66
Bibliografía .....	70
Apéndice .....	75

## Índice de Figuras

<i>Figura 1 Oxidación de aminas por MAO-unión FAD.</i> .....	9
<i>Figura 2 Estructura de inhibidores selectivos de MAO-A clorgilina y MAO-B selegilina.</i> .....	11
<i>Figura 3 Estructura de los alcaloides protoberberínicos sanguinarina y chelidonina.</i> .....	15
<i>Figura 4 Estructura de coptisina, inhibidor reversible de MAO-A.</i> .....	16
<i>Figura 5 Estructuras de palmartina y jatrorrhizina.</i> .....	16
<i>Figura 6 Estructuras de apomorfina y (-)- oliverolina.</i> .....	17
<i>Figura 7 Coloración de bencilamina (sustrato) y benzaldehído (producto) en presencia de diferentes agentes reveladores.</i> .....	21
<i>Figura 8 Oxidación de bencilamina a benzaldehído por acción de MAO-B.</i> .....	28
<i>Figura 9 Cambio del colorante Azul de Nilo en presencia de bencilamina y benzaldehído.</i> .....	46
<i>Figura 10 Oxidación de bencilamina por acción de MAO-B.</i> .....	53
<i>Figura 11 Vía oxidativa de la síntesis de neuromelanina a partir de la oxidación de dopamina.</i> .....	54

## Índice de Esquemas

<i>Esquema 1 Obtención de la enzima MAO-B. Método Holt.....</i>	<i>23</i>
<i>Esquema 2 Evaluación de la actividad enzimática de MAO-B mediante espectrofotometría UV empleando bencilamina como sustrato. ....</i>	<i>25</i>
<i>Esquema 3 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre MAO-B mediante espectrofotometría UV en presencia de inhibidores conocidos de la enzima, utilizando bencilamina como sustrato.....</i>	<i>26</i>
<i>Esquema 4 Evaluación de las coloraciones del sustrato bencilamina con diferentes colorantes en pozos de porcelana y en CCF. ....</i>	<i>28</i>
<i>Esquema 5 Evaluación de la actividad enzimática de MAO-B en CCF. ....</i>	<i>29</i>
<i>Esquema 6 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre MAO-B en CCF en presencia de inhibidores conocidos de la enzima. ....</i>	<i>31</i>
<i>Esquema 7 Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad enzimática de MAO-B empleando dopamina como sustrato.....</i>	<i>32</i>
<i>Esquema 8 Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad inhibitoria sobre MAO-B de análogos de berberina, empleando dopamina como sustrato. ....</i>	<i>33</i>

## Índice de Gráficos

Gráfico 1 Actividad enzimática de MAO-B empleando como sustrato bencilamina 1,5 mM. Condiciones de reacción: 30 min; 37°C, pH 7,6 y .....	37
Gráfico 2 Actividad e inhibición enzimática de MAO-B empleando como sustrato bencilamina 1,5 mM y L-deprenilo 0,003 μM como inhibidor. Condiciones de reacción: 30 min; 37°C, pH 7,6 y [proteína] = 8 +/- 1μg/μL.....	39
Gráfico 3 Actividad e inhibición enzimática de MAO-B empleando como sustrato bencilamina 1,5 mM y cloruro de berberina 98 μM como inhibidor. Condiciones de reacción: 30 min; 37°C, pH 7,6 y [proteína] = 8 +/- 1μg/μL .....	40
Gráfico 4 Actividad enzimática de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 μM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 μg/ μL. ....	55
Gráfico 5 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 μM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 μg/ μL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 μM; Cloruro de berberina 98 μM; P12 = neoxiacetonaberberina; P13 = derivado reducido neoxiacetonaberberina; P14 = derivado oxidado neoxiacetonaberberina; P12, P13 y P14 están a concentración 100 ppm.....	59
Gráfico 6 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 μM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 μg/ μL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 μM; Cloruro de berberina 98 μM; P2 = tetrahydroberberina; P5 = 8-oxoberberina; P18 = 13-metiltetrahydroberberina; P2, P5 y P18 están a concentración 100 ppm.....	60
Gráfico 7 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 μM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 μg/ μL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 μM; Cloruro de berberina 98 μM; G1 = 8-fenildihydroberberina-13-sustituida; G2 = 8-metildihydroberberina-13-sustituida; P7 = 13-oxo-8,13a-epidioxiberberina; G1, G2 y P7 están a concentración 100 ppm.....	61
Gráfico 8 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 μM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 μg/ μL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 μM; Cloruro de berberina 98 μM; P9 = N-metiltetrahydroberberina; P10 = tetrahydroberberina N-óxido; P16 = 13-hidroxitetrahydroberberina; P9, P10 y P16 están a concentración 100 ppm .....	62
Gráfico 9 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 μM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 μg/ μL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 μM; Cloruro de berberina 98 μM; P6 = 13-berberinafenolbetaína; P15 = 13-hidroxiberberina; P17 = 13-metildihydroberberina; P6, P15 y P17 están a concentración 100 ppm .....	63

*Gráfico 10 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150  $\mu$ M. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8  $\mu$ g/ $\mu$ L. Inhibidores: L-deprenilo 0,03  $\mu$ M; Cloruro de berberina 98  $\mu$ M; P19 = 13-dinitrofenildihidroberberina; P23 = 8-triclorometildihidroberberina; P19 y P23 están a concentración 100 ppm.....64*

## Índice de Tablas

<i>Tabla 1 Cuantificación de proteínas de las fracciones mitocondriales extraídas ricas en MAO-B. Condiciones: t de incubación 30 min; Temp 37 °C; pH 7,6; <math>\lambda</math> = 254 nm; [Bencilamina] 1500 <math>\mu</math>M en BF 100 mM pH 7,6; dilución de MAO (1/2) en BF 100 mM pH 7,6. ....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 2 Actividad enzimática de MAO-B. Condiciones: t de incubación 30 min; Temp 37 °C; pH 7,6; <math>\lambda</math> = 254 nm; [Bencilamina] 1500 <math>\mu</math>M en BF 100 mM pH 7,6; dilución de MAO (1/2) en BF 100 mM pH 7,6. ....</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 3 Actividad inhibitoria sobre MAO-B. Condiciones: t de incubación 30 min; Temp 37 °C; pH 7,6; <math>\lambda</math> = 254 nm; [L-deprenilo] = 0,03 <math>\mu</math>M en BF 100mM pH 7,6; [Bencilamina] 1500 <math>\mu</math>M en BF 100 mM pH 7,6; dilución de MAO (1/2) en BF 100 mM pH 7,6. ....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 4 Variación de las coloraciones del colorante fucsina. ....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 5 Coloraciones del colorante fucsina obtenidas en pozos de porcelana.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 6 Coloraciones del colorante azul de nilo obtenidas en pozos de porcelana. ....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 7 Variación de las coloraciones del colorante azul de nilo. ....</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 8 Resultados de la optimización de los parámetros que afectan la actividad enzimática de MAO-B en CCF. ...</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 9 Compuestos evaluados por espectrofotometría de UV usando dopamina como sustrato.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 10 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 <math>\mu</math>M. Condiciones de reacción: <math>\lambda</math> = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 <math>\mu</math>g/ <math>\mu</math>L. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 <math>\mu</math>M; Cloruro de berberina 98 <math>\mu</math>M; P12 = neoxiacetonaberberina; P13 = derivado reducido neoxiacetonaberberina; P14 = derivado oxidado neoxiacetonaberberina; P12, P13 y P14 están a concentración 100 ppm.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 11 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 <math>\mu</math>M. Condiciones de reacción: <math>\lambda</math> = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 <math>\mu</math>g/ <math>\mu</math>L. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 <math>\mu</math>M; Cloruro de berberina 98 <math>\mu</math>M; P2 = tetrahydroberberina; P5 = 8-oxoberberina; P18 = 13-metiltetrahydroberberina; P2, P5 y P18 están a concentración 100 ppm.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 12 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 <math>\mu</math>M. Condiciones de reacción: <math>\lambda</math> = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 <math>\mu</math>g/ <math>\mu</math>L. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 <math>\mu</math>M; Cloruro de berberina 98 <math>\mu</math>M; G1 = 8-fenildihydroberberina-13-sustituida; G2 = 8-metildihydroberberina-13-sustituida; P7 = 13-oxo-8,13a-epidioxiberberina; G1, G2 y P7 están a concentración 100 ppm.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 13 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 <math>\mu</math>M. Condiciones de reacción: <math>\lambda</math> = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 <math>\mu</math>g/ <math>\mu</math>L. Inhibidores: P9 = N-metiltetrahydroberberina; P10 = tetrahydroberberina N-óxido; P16 = 13-hidroxitetrahydroberberina; P9, P10 y P16 están a concentración 100 ppm..</i>	<i>62</i>

<i>Tabla 14 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 μM. Condiciones de reacción: λ = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 μg/μL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 μM; Cloruro de berberina 98 μM; P6 = 13-berberinafenolbetaína; P15 = 13-hidroxiberberina; P17 = 13-metildihidroberberina; P6, P15 y P17 están a concentración 100 ppm</i> .....	63
<i>Tabla 15 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 μM. Condiciones de reacción: λ = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 μg/μL. Inhibidores: P19 = 13-dinitrofenildihidroberberina; P23 = 8-triclorometildihidroberberina; P19 y P23 están a concentración 100 ppm</i> .....	64
<i>Tabla 16 Porcentajes de inhibición de los compuestos evaluados</i> .....	65

## Índice de Fotos

<i>Foto 1 Coloración del colorante fucsina en pozos de porcelana frente al sustrato bencilamina y el producto benzaldehído a diferentes concentraciones. ....</i>	<i>44</i>
<i>Foto 2 Coloración del colorante fucsina frente al sustrato bencilamina y el producto benzaldehído a diferentes concentraciones.....</i>	<i>44</i>
<i>Foto 3 Coloración de la mezcla del colorante azul de Nilo 0,54 mM con bencilamina y con benzaldehído a diferentes concentraciones en pozos de porcelana. ....</i>	<i>47</i>
<i>Foto 4 Coloración del colorante azul de Nilo 0,54 mM sobre placas de CCF empleando bencilamina y benzaldehído 0,052 M y 0,026 M respectivamente. ....</i>	<i>47</i>

## Resumen

En el presente trabajo se reporta el avance en el desarrollo y evaluación de métodos para la detección de posibles inhibidores de la enzima Monoamino Oxidasa B (MAO-B). Se desarrollo y optimizó una metodología para la determinación de la actividad enzimática de MAO-B por Cromatografía de Capa Fina (CCF), empleando bencilamina como sustrato; detectándose la catálisis enzimática a través del cambio de tonalidad del colorante Azul de Nilo el cual forma un complejo rojizo con el sustrato bencilamina, pero permanece su color azul en presencia del producto de oxidación enzimática (benzaldehído). Al no poder utilizarse este método en la detección de los posibles inhibidores de la enzima, se desarrolló una nueva metodología para la evaluación inhibitoria de 17 compuestos análogos de berberina por medio de espectrofotometría de UV empleando dopamina como sustrato. Por medio de ésta técnica se encontró que de los compuestos evaluados, 7 presentan actividad inhibitoria considerable, comparable o incluso superior a berberina.



## Introducción

Sólo un pequeño porcentaje de especies en el reino vegetal ha sido investigado fitoquímicamente y sólo un reducido número de especies se han estudiado simultáneamente por sus propiedades biológicas y farmacológicas. Por estas razones, es primordial disponer de sistemas eficaces que permitan la detección química y biológica rápida de posibles metabolitos secundarios bioactivos en extractos de plantas. Dentro de las técnicas químicas que pueden ser utilizadas para la evaluación de las plantas, la Cromatografía de Capa Fina (CCF) se presenta como el método más simple y económico.<sup>[1]</sup>

La técnica de CCF combinada con bioensayos *in situ*, ha sido utilizada en la inhibición del crecimiento de microorganismos para la detección de componentes antimicrobianos y en la detección de inhibidores enzimáticos en extractos de plantas para enzimas como la acetilcolinesterasa, butilcolinesterasa, xantina oxidasa y  $\beta$ -glucosidasa, buscando ampliarse a otras enzimas.

La enzima Monoamino oxidasa (MAO) está asociada con padecimientos como la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson; ésta última es un trastorno degenerativo, idiopático y lentamente progresivo del Sistema Nervioso Central (SNC) que es caracterizado por disminución y lentitud de los movimientos, rigidez muscular, temblor de reposo e inestabilidad postural, siendo producida por la pérdida en el organismo de la capacidad de sintetizar dopamina.

En la presente investigación, se buscó desarrollar un método para la detección y el estudio de posibles compuestos inhibidores de la enzima Monoamino oxidasa (MAO)

basado en la CCF considerando que éste método podría presentarse como una técnica versátil y rápida en el análisis de extractos de plantas.

## Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) pertenece a un grupo de enfermedades que causan trastornos del movimiento, es una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central cuya principal característica es la muerte progresiva de neuronas en una parte del cerebro denominada sustancia nigra. La consecuencia más importante de esta pérdida neuronal es una marcada disminución en la disponibilidad cerebral de dopamina, principal sustancia sintetizada por estas neuronas, originándose una disfunción en la regulación de las principales estructuras cerebrales implicadas en el control del movimiento.<sup>[2]</sup>

La EP fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson, un médico británico que publicó un artículo sobre lo que llamó "la parálisis temblorosa." En este artículo, expuso los síntomas principales de la enfermedad que posteriormente llevaría su nombre. Entre los cuatro síntomas principales se tiene temblor en reposo, o temblor en las manos, los brazos, las piernas y la mandíbula o la cabeza; rigidez, o agarrotamiento de las extremidades y el tronco; bradicinesia, o lentitud en los movimientos; e inestabilidad postural, o deterioro del equilibrio. Otras manifestaciones típicas son la inexpresividad facial, la escasez de movimientos automáticos como el parpadeo o el braceo al caminar y la inclinación de tronco hacia delante durante la marcha; conforme aumenta la duración de la enfermedad pueden aparecer algunos otros síntomas no motores como cierto grado de depresión o de disfunción automática (urgencia o incontinencia). Estos síntomas generalmente comienzan gradualmente y empeoran con el tiempo. A medida que se vuelven más pronunciados, los pacientes pueden tener dificultad para caminar, hablar o completar otras tareas sencillas.<sup>[3]</sup>

La dopamina es el mensajero químico responsable de transmitir señales entre la sustancia nigra y el cuerpo estriado para producir movimientos suaves y decididos. La pérdida de dopamina produce patrones anormales de activación nerviosa dentro del cerebro que causan deterioro del movimiento. Estudios recientes han mostrado que las personas con Parkinson también presentan pérdida de las terminaciones nerviosas que producen el neurotransmisor norepinefrina, el cual está estrechamente relacionada con la dopamina; la norepinefrina es el mensajero químico principal del sistema nervioso simpático, que es la parte del sistema nervioso que controla muchas funciones automáticas del cuerpo, como el pulso y la presión arterial.

La Enfermedad de Parkinson es a la vez crónica y progresiva pero no es contagiosa. Aunque algunos casos de Parkinson parecen ser hereditarios y otros pueden rastrearse a mutaciones genéticas específicas, la mayoría de los casos son esporádicos. Muchos investigadores consideran que la EP es consecuencia de una combinación de susceptibilidad genética y exposición a uno o más factores ambientales que la desencadenan. Aunque se reconoce cada vez más la importancia de la genética en la Enfermedad de Parkinson, la mayoría de los investigadores cree que las exposiciones ambientales aumentan el riesgo de una persona de contraer la enfermedad. Aún en los casos familiares, la exposición a toxinas u otros factores ambientales puede influir sobre cuándo aparecen los síntomas o como evoluciona la enfermedad. Hay un número de toxinas, como la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, o MPTP (encontrada en algunos tipos de heroína sintética), que puede causar síntomas Parkinsonianos en los humanos. Otros factores ambientales aún no identificados también pueden causar la enfermedad en individuos susceptibles genéticamente.<sup>[3]</sup>

La Enfermedad de Parkinson (EP) es el cuarto trastorno degenerativo más frecuente en personas de edad avanzada. Afecta aproximadamente al 1% de los

sujetos mayores de 65 años y al 0,4% de los mayores de 40 años. La edad promedio se sitúa alrededor de los 57 años, aunque puede iniciarse en la infancia o la adolescencia (parkinsonismo juvenil).<sup>[4]</sup>

En Estados Unidos y Europa se ha observado que la incidencia de la Enfermedad de Parkinson aumenta con la edad y es dos veces mayor en los varones. Los índices de mortalidad de EP en Estados Unidos, Canadá, Italia y Japón son discretamente mayores en los varones y se ha observado una mayor mortalidad en individuos de raza blanca en relación con la raza negra.<sup>[5]</sup>

En Venezuela la tasa de mortalidad de EP mostró una tendencia creciente entre 1988 y 1998, manifestando un crecimiento exponencial con la edad, en ambos géneros, siendo la tasa de mortalidad superior para los varones, con excepción del grupo comprendido entre los 55-59 años.<sup>[6]</sup>

Aunque no se conoce una cura para la EP, los tratamientos médicos buscan controlar los síntomas y mejorar la calidad de vida del paciente. La farmacoterapia empleada como tratamiento para la EP incluye el uso de la levodopa, precursor metabólico de la dopamina, el cual penetra al organismo a través de la membrana hematoencefálica, donde es descarboxilada para formar dopamina y reemplazar al neurotransmisor deficitario, mejorando algunos de los síntomas de la enfermedad. En esta terapia se hace necesaria la administración simultánea de un inhibidor de la descarboxilasa periférica, como la carbidopa, el cual reduce las dosis requeridas de levodopa mediante la disminución de su catabolismo, aminorando así los efectos colaterales (náuseas, palpitaciones, rubefacción) y permite una liberación más eficiente de levodopa en el cerebro.<sup>[4]</sup>

La selegilina, usada como tratamiento inicial, puede retrasar el inicio del tratamiento con levodopa 1 año aproximadamente. Puede potenciar la dopamina cerebral residual en los pacientes con Enfermedad de Parkinson de inicio o reducir su metabolismo oxidativo cerebral, retrasando el proceso neurodegenerativo.<sup>[4]</sup>

Los efectos secundarios derivados de la farmacoterapia utilizada en el tratamiento de la EP y los datos de mortalidad creciente, aumentan el interés en el estudio de posibles fitofármacos que presenten actividad sobre la Enfermedad de Parkinson.

Otras opciones de tratamiento para algunos síntomas y etapas de la Enfermedad de Parkinson incluyen las siguientes terapias:

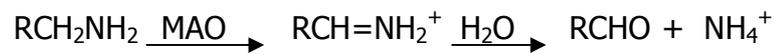
- *Agonistas de la dopamina.* Son medicamentos que imitan el papel de la dopamina en el cerebro. Pueden administrarse solos o junto con levodopa.
- *Inhibidores de la COMT (catecol-O-metiltransferasa).* La COMT es una enzima que ayuda a descomponer la dopamina, los medicamentos inhibidores de esta enzima prolongan los efectos de la levodopa evitando la descomposición de la dopamina, disminuyendo la duración de períodos de fluctuación en el paciente, y generalmente posibilitan la reducción de la dosis de levodopa administradas a los pacientes.
- *Anticolinérgicos:* son medicamentos que disminuyen la actividad del neurotransmisor acetilcolina y ayudan a reducir los temblores y la rigidez muscular. Sólo la mitad de los pacientes que reciben anticolinérgicos se benefician, generalmente durante un breve período y solamente con un 30 por ciento de mejoría.

- *Amantadina.* Es un medicamento antiviral que puede ayudar a reducir los síntomas de la Enfermedad de Parkinson y la discinesia producida por la levodopa. Frecuentemente se usa solamente en las etapas tempranas de la enfermedad. Los investigadores no están seguros de cómo funciona la amantadina en la enfermedad de Parkinson, pero es posible que aumente los efectos de la dopamina.

- *Inhibidores de la MAO-B.* Estos medicamentos inhiben la enzima monoaminooxidasa B, o MAO-B, que descompone la dopamina en el cerebro. Los inhibidores de la MAO-B hacen que la dopamina se acumule en las células nerviosas supervivientes y reducen los síntomas de Enfermedad de Parkinson. La selegilina, también llamada deprenilo, es un inhibidor de la MAO-B comúnmente usado para tratar la EP. Los estudios patrocinados por la NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) han mostrado que la selegilina puede retrasar la necesidad de terapia con levodopa hasta por un año o más. Cuando se administra selegilina con levodopa, ésta parece aumentar y prolongar la respuesta a la levodopa, reduciendo así las fluctuaciones de la disipación. Generalmente la selegilina se tolera bien, aunque los efectos secundarios son náuseas, hipotensión ortostática e insomnio. Se está estudiando otro inhibidor de la MAO-B, rasagilina, para determinar si sería útil para retardar la evolución de la enfermedad.<sup>[3]</sup>

## Monoamino Oxidasa (MAO)

La monoamino oxidasa (MAO) es una enzima perteneciente al grupo de las oxidoreductasas, responsable del catabolismo de varias monoaminas neurotransmisoras, tales como: triptamina, dopamina, norepinefrina, epinefrina y serotonina; es la responsable de catalizar la deaminación oxidativa de estas para formar aldehídos o ácidos. Asimismo, juega un papel importante en la regulación de las concentraciones intracelulares de estos neurotransmisores.<sup>[7]</sup> Esta enzima se encuentra localizada en la membrana externa de las mitocondrias, es activa en células extraneurales, nervios y órganos como corazón, riñón e hígado.<sup>[8]</sup>



Se ha encontrado que compuestos que inhiben la MAO poseen importantes propiedades farmacológicas especialmente como agentes antidepresivos<sup>[9]</sup> o agentes antiparkinsonianos<sup>[10]</sup>.

Como ya se indicó, MAO cataliza la deaminación oxidativa de muchos neurotransmisores importantes de acción lenta, que funcionan con neurotransmisores de acción rápida como el ácido glutámico y el ácido g-amino butírico (GABA) para la regulación de movimientos, emociones, conocimiento, memoria y aprendizaje.<sup>[11]</sup> Así, MAO juega un rol crítico en la actividad normal del sistema nervioso central.<sup>[12], [13], [14],</sup>

[15]

En la membrana mitocondrial, MAO existe como 2 isoenzimas MAO-A y MAO-B; estas isoformas pueden ser distinguidas por su selectividad en la oxidación de varias aminas biogénicas. La isoenzima MAO-A oxida selectivamente a norepinefrina y serotonina y su regulación esta asociada a la Enfermedad de Alzheimer y es inhibida específicamente por clorgilina (usado clínicamente como antidepresivo).<sup>[13]</sup> La isoenzima MAO-B oxida selectivamente a dopamina, bencilamina y  $\beta$ -feniletilamina, se relaciona a la Enfermedad de Parkinson y es selectivamente inhibida por L-deprenilo.<sup>[15]</sup> <sup>[13]</sup> Las formas MAO-A y MAO-B son homodímeros con subunidades de pesos moleculares de 59.700 y 58.800 respectivamente, las dos subunidades contienen en el sitio activo la coenzima Flavina Adenina Dinucleótido (FAD). <sup>[16]</sup>, <sup>[9]</sup> El sistema metabólico de ambas isoenzimas puede ser estudiado por la velocidad de la reacción de conversión de un sustrato amino a un aldehído.<sup>[17]</sup>

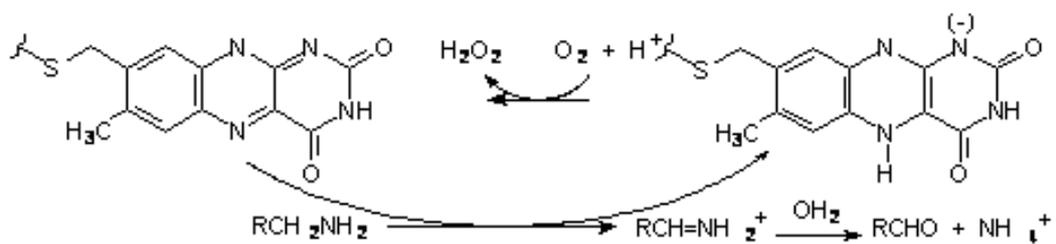


Figura 1 Oxidación de aminas por MAO-unión FAD.<sup>[17]</sup>

## **Inhibidores de la Monoamino Oxidasa (IMAOS)**

Entre los tratamientos posibles para la EP, se ha buscado aumentar los niveles de dopamina en el cerebro administrando inhibidores y inactivadores de MAO, promoviendo así el aporte de aminas neurotransmisoras necesarias al cerebro.

El primer inhibidor conocido de MAO fue la ipronazida o nialamida, usado inicialmente como una droga para el tratamiento de la tuberculosis y su efecto fue estudiado por Seller en 1952 <sup>[18]</sup>, <sup>[19]</sup>, hasta que se observó que los pacientes que la tomaban mostraban excitación y euforia.<sup>[20]</sup> Estos estudios mostraron que las concentraciones de varias aminas biogénicas en el cerebro, tales como norepinefrina, serotonina y dopamina se encontraban disminuidas en individuos con depresión crónica; observándose además una correlación directa entre el incremento en las concentraciones de estas aminas biogénicas en el cerebro y efectos antidepresivos como resultado de la inhibición de MAO.<sup>[20]</sup>

En algunos casos la administración de estos inhibidores conducía a un efecto cardiovascular paralelo que conducía a la muerte de muchos pacientes. Se determinó que todos aquellos pacientes que murieron mientras tomaban inhibidores de MAO tenían dos cosas en común, todos habían muerto por una crisis hipertensiva, y, previo a sus muertes, todos habían consumido alimentos con un alto contenido de tiramina (queso, vino, cerveza y productos con levadura). La conexión entre estas observaciones, es que la ingesta de tiramina induce la liberación de norepinefrina, un potente vasoconstrictor, elevando la presión sanguínea. Bajo condiciones normales el exceso de norepinefrina es degradado por MAO y por la catecolamina O-metiltransferasa (catecol metiltransferasa, COTM). Si MAO es inactivada, entonces la norepinefrina no se degrada rápidamente, la presión sanguínea se eleva, y esto puede

conducir a una crisis hipertensiva. Esta serie de eventos han sido llamados el “efecto del queso”. Puesto que los inhibidores de MAO no eran tóxicos, excepto cuando se consumían ciertos alimentos, se permitió su prescripción con estrictas regulaciones dietéticas.<sup>[20]</sup>

Otros inhibidores de MAO son bromocriptina, un derivado de un alcaloide del cornezuelo, la apomorfina y su homólogo N-propilnoraporfina, estos últimos alcaloides bencilisoquinolínicos.<sup>[18], [19], [21]</sup>

Actualmente, los inhibidores selectivos para las isoenzimas MAO-A y MAO-B son clorgilina y selegilina (L-deprenilo) respectivamente, ambos derivados de N-metilpropargilamina.<sup>[16], [21]</sup>

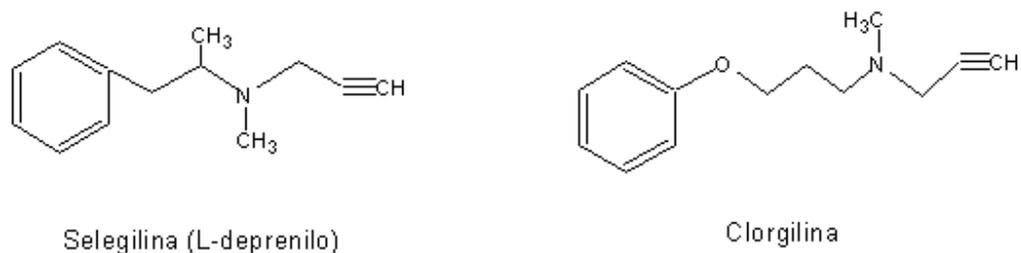


Figura 2 Estructura de inhibidores selectivos de MAO-A clorgilina y MAO-B selegilina.

El mecanismo de inhibición de estos compuestos, nombrados suicidas, puede ser representado en la reacción mostrada abajo, inicialmente se forma un complejo [Enzima-Inhibidor] reversible para luego reaccionar de forma covalentemente irreversible como un aducto [Enzima-Inhibidor]<sup>[17], [22]</sup>.



Las estructuras alcaloidales del tipo aporfínicos y berberínicos guardan gran similitud con los compuestos que hoy en día son utilizados clínicamente como inhibidores de MAO en el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson, especies orgánicas básicas, en su mayoría.

## Alcaloides

Los alcaloides son bases orgánicas que se aíslan principalmente de plantas superiores, aunque pueden ser encontrados presentes en menor proporción en microorganismos y animales.<sup>[23]</sup>

Su variedad estructural es muy grande, tanto en su esqueleto carbonado como en el tipo y número de sustituyentes. Para que una molécula sea catalogada como alcaloide debe involucrar en su estructura un átomo de nitrógeno, éste puede formar parte de una amina primaria, secundaria, terciaria, sal cuaternaria de amonio, amida y N-óxidos; puede existir más de un átomo de nitrógeno en la molécula con diferente funcionalidad. Algunos compuestos que no se pueden clasificar en la categoría de alcaloides son las aminas simples, purinas, pirimidinas y betaínas de aminoácidos. Los aminoácidos son los precursores de los alcaloides, estos sufren una serie de transformaciones que llevan a la biosíntesis de los alcaloides.

La utilidad de los alcaloides en los organismos que los producen no está aún clara; se cree que pueden actuar como mecanismos de defensa debido a su sabor amargo y a su actividad biológica, se ha propuesto también que pueden servir como reserva de nitrógeno en el vegetal e incluso para fijar ciertos metales debido a su poder quelante. Debido a su actividad fisiológica, sobretodo a nivel del sistema nervioso, se desarrollaron las primeras investigaciones en productos naturales. Algunos alcaloides son altamente tóxicos, pero otros en las dosis adecuadas son comúnmente usados en el campo de la medicina.

Para la clasificación de un compuesto pueden considerarse sus propiedades químicas, farmacológicas y botánicas; la agrupación en base a sus núcleos estructurales, representa en cierta forma su origen biogenético, es decir su precursor químico. Entre la variedad de alcaloides que pueden encontrarse se tiene: piperidínicos, pirrolizidínicos, pirrolidínicos, indolizidínicos, quinolizidínicos, de carbazol, de imidazol, de tropano, indólicos, esteroidales, terpenoidales, betalainas y los derivados de las feniletilaminas.<sup>[23]</sup>

Entre los aminoácidos precursores para la bioformación de alcaloides se encuentran la ornitina y lisina para alcaloides alifáticos, triptófano, fenilalanina y tirosina para alcaloides aromáticos.

#### *Alcaloides derivados de la feniletilamina.*

Los alcaloides derivados de la feniletilamina son los más ampliamente distribuidos; en general son estructuras sencillas conocidas como catecolaminas, algunas de ellas: dopamina, norepinefrina, trimetoxifeniletilamina, efedrina, amfetamina, entre otras.<sup>[23]</sup>

Las isoquinolínas son los alcaloides derivados de feniletilamina más abundantes, esto debido a su variedad estructural y a su distribución. Son los precursores de 19 derivados entre ellos: las cularinas, bencilisoquinolinas, bisbencilisoquinolinas, pavininas e isopavininas, berberinas y tetrahidroprotoberberinas, secoberberinas, benzofenantridinas, aporfinas, dímeros de aporfinas-bencilioquinolinas, sus productos de oxidación: oxoaporfinas y dioxoaporfinas, entre otros.<sup>[23]</sup> Debido a la semejanza estructural entre estos alcaloides y el neurotransmisor dopamina, esto resulta de especial interés para el estudio de posibles inhibidores de la monoamino oxidasa.

### Alcaloides y MAO

Los alcaloides isoquinolínicos se encuentran entre los tipos de compuestos que presentan inhibición sobre la enzima MAO-A y MAO-B.<sup>[8]</sup> Se ha detectado tetrahydroberberina en la orina de pacientes que han recibido levodopa como tratamiento para la Enfermedad de Parkinson. Asimismo, los alcaloides protoberberínicos han sido estudiados como posibles inhibidores de MAO-B.<sup>[24]</sup>

Se han realizado estudios de algunos alcaloides bencilisoquinolínicos con posible actividad sobre MAO, entre los trabajos más recientes reportados en la literatura se encuentra el realizado por Lagidina y col. (2003), quienes aislaron alcaloides del tipo protoberberínicos tales como berberina, sanguinarina y chelidonina, y probaron su efecto inhibitorio sobre la enzima MAO aislada de hígado de ratones; encontrando que todos los alcaloides evaluados mostraron ser inhibidores irreversibles de la enzima cuando se utilizaba tiramina y serotonina como sustrato.<sup>[25]</sup>

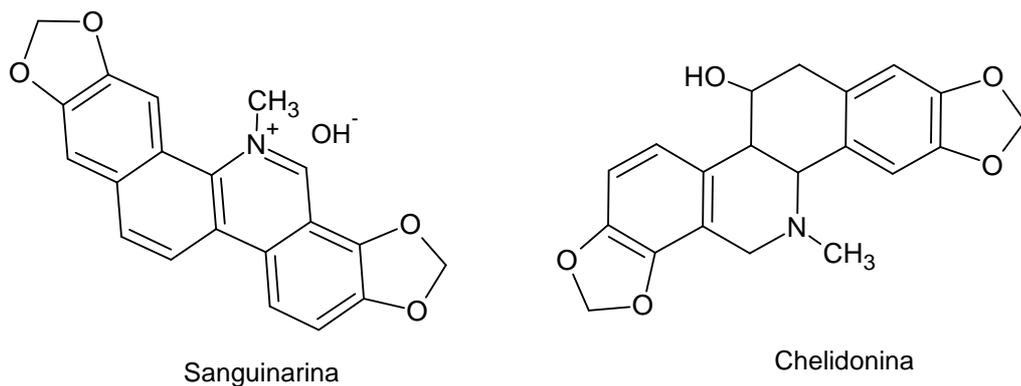


Figura 3 Estructura de los alcaloides protoberberínicos sanguinarina y chelidonina. [25]

En 2001 Ro y col., evaluaron el efecto inhibitorio de coptisina, un alcaloide protoberberínico, sobre las isoenzimas MAO-A y B, aisladas de cerebro de ratones,

encontrando que este alcaloide mostraba tener un efecto inhibitorio del tipo reversible competitivo sobre la actividad de MAO-A, cuando se usaba como sustrato kynuramina, mientras que no mostró una actividad inhibitoria apreciable sobre MAO-B.<sup>[26]</sup>

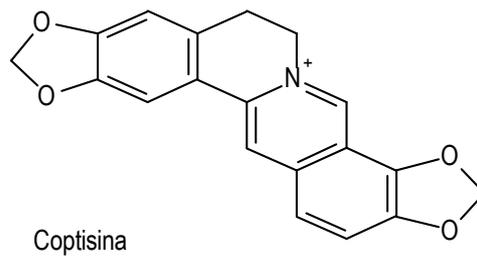


Figura 4 Estructura de coptisina, inhibidor reversible de MAO-A [26]

Kong y col. en 2001, probaron el efecto de compuestos del tipo protoberberínicos sobre la enzima MAO utilizando feniletilamina como sustrato. Berberina, palmatina y jatrorrhizina, fueron aislados del extracto metanólico de los rizomas de *Coptis chinensis*. En sus investigaciones encontraron que jatrorrhizina, inhibió de manera no competitiva a ambas isoenzimas (MAO-A y MAO-B). Por su parte, berberina sólo mostró inhibición del tipo competitiva sobre MAO-A, mientras que palmatina no inhibió ninguna de las isoenzimas.<sup>[24]</sup>

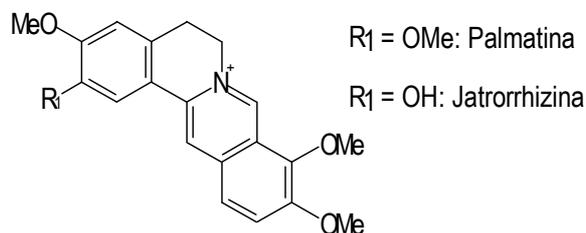


Figura 5 Estructuras de palmatina y jatrorrhizina. [24]

Otro alcaloide, la apomorfina, es un estimulante del sistema dopaminérgico en el cerebro y es utilizado en el tratamiento de la EP. [27] Otro alcaloide aporfínico que mostró también actividad antiparkinsoniana fue la (-)-Oliverolina.[28]

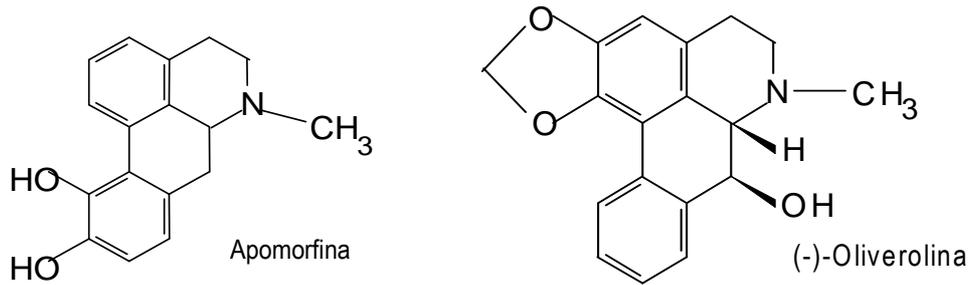


Figura 6 Estructuras de apomorfina y (-)-oliverolina. [27] y [28]

## **Detección cromatográfica de metabolitos secundarios activos (Antecedentes)**

La Cromatografía de Capa Fina (CCF) es una de las técnicas de separación más simple, económica, sensible y eficiente. Es esencialmente útil cuando se quiere determinar el número de componentes de una mezcla o identificar los compuestos existentes en la misma.<sup>[29]</sup>

La CCF está basada en la preparación de una capa uniforme de un adsorbente soportado sobre una placa de vidrio, aluminio o plástico. Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos tales como cromatografía en columna o en papel; debido a que el material empleado para la misma es el más simple; el tiempo requerido para el análisis de las muestras es mucho menor comparado con la cromatografía de columna clásica y bajo las condiciones adecuadas de trabajo se pueden obtener buenas separaciones. Además permite el empleo de reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. Por ser un método sencillo y sus resultados ser fácilmente reproducibles, resulta un método adecuado para fines analíticos.<sup>[30]</sup>

La CCF es también empleada para la detección y el estudio de compuestos en extractos de plantas por presentarse como la técnica más simple y económica.<sup>[4]</sup> Cuando se hace necesario el uso de procedimientos simples, rápidos y reproducibles que permitan la realización de pruebas biológicas sobre un gran número de extractos, la CCF se presenta como la técnica ideal para la vigilancia biológica.

Para realizar con eficacia la investigación y el fraccionamiento de los extractos de una planta, se hace necesario el uso de análisis que permitan detectar los compuestos activos presentes en matrices complejas de la planta. Estos análisis son particularmente importantes pues evitan la pérdida de tiempo y de reactivos, optimizando la identificación de aquellas sustancias que presentan la actividad deseada.<sup>[31]</sup>

La técnica bioautográfica combina CCF con un bioensayo *in situ* y permite la localización de compuestos biológicamente activos en una matriz compleja. La actividad de antimicóticos, antibacterianos y plaguicidas pueden ser investigadas por CCF bioautográfica. Estos y otros bioensayos son rápidos y simples de realizar y proporcionan métodos eficaces para determinar la posible actividad biológica y farmacológica en el aislamiento de productos naturales.<sup>[31]</sup>

Tradicionalmente, los métodos bioautográficos han utilizado la inhibición del crecimiento de microorganismos para detectar componentes antimicrobianos de los extractos separados en una placa de CCF. Se ha considerado esta metodología como el análisis más eficaz para la detección de compuestos antimicrobianos (Rahalison y col., 1991; Saxena y col., 1995).<sup>[32], [33]</sup> Más recientemente, la introducción de microorganismos genéticamente modificados permitió el uso de la bioautografía para explorar diversas actividades biológicas (Annis y col., 2000; Müller y col., 2004).<sup>[34], [35]</sup> Últimamente, el alcance del método bioautográfico se ha ampliado con el desarrollo de los análisis en los cuales la ausencia de la actividad enzimática se utiliza como indicativo de la presencia de inhibidores enzimáticos en extractos de plantas (Rhee y col., 2001; Marston y col., 2002; Ramallo y col., 2006).<sup>[36], [37], [38]</sup>

Marston y col. (2002) ampliaron el alcance de la técnica bioautográfica para determinar posibles inhibidores de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa y de la butirilcolinesterasa en extractos de plantas, la actividad enzimática fue detectada por

la conversión de acetato de naftil a naftol y la formación de la correspondiente sal de diazonio con Fast Blue B. En la metodología empleada por estos investigadores, la solución de enzima es rociada sobre la placa de CCF en la cual se ha realizado la separación del extracto de planta, y luego de transcurrido el tiempo de incubación se rocía la solución del colorante.<sup>[37]</sup>

Ramallo y col. (2006), emplearon el método bioautográfico en CCF para la localización de inhibidores de la enzima xantinoxidasa presentes en una matriz compleja de extractos de plantas, detectando la actividad enzimática por la reacción de los radicales superóxidos formados con azul de tetrazolium.<sup>[38]</sup> De igual forma, Salazar y col., (2007), desarrollaron un método bioautográfico para la detección de inhibidores de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en extractos de plantas usando como sustrato esculin que se transforma en esculetin y forma un complejo marrón con una solución de cloruro férrico. En ambas investigaciones se introdujo el uso de la inmovilización de la enzima en una trampa de gel para aumentar la estabilidad enzimática en la placa de CCF. Dado que muchas enzimas han logrado ser inmovilizadas por la trampa de gel, se considera que la introducción de esta técnica como método alternativo de depositar la enzima sobre capas del CCF podría ampliar la gama de las enzimas que se pueden utilizar para este tipo de análisis.<sup>[31]</sup>

La técnica bioautográfica ha sido empleada también en el estudio de una serie de alcaloides del tipo isoquinolínicos como posibles inhibidores de la enzima Monoamino Oxidasa (MAO), desarrollando un método cualitativo sobre placas de CCF para evaluar la capacidad inhibitoria de los alcaloides antes mencionados. En esa investigación el sustrato bencilamina es oxidado por MAO-B a benzaldehído (producto) diferenciándose entre el producto y el sustrato usando Fucsina y Azul de Nilo como agentes de coloración.<sup>[8]</sup>

Harrison y col. (2005), evaluaron posibles reveladores que permitieran evidenciar la reacción de oxidación, además de determinar los parámetros que afectan la actividad enzimática de MAO-B, tales como temperatura, tiempo, concentración de enzima y sustrato. Adicionalmente, probaron el orden y la manera adecuada de adición de cada uno de los componentes que conforman la reacción. Además, realizó la evaluación de veinte compuestos alcaloidales para determinar su posible actividad inhibitoria evaluando el límite de detección del método utilizando como patrón el L-deprenilo, conocido inhibidor de MAO-B. [8]

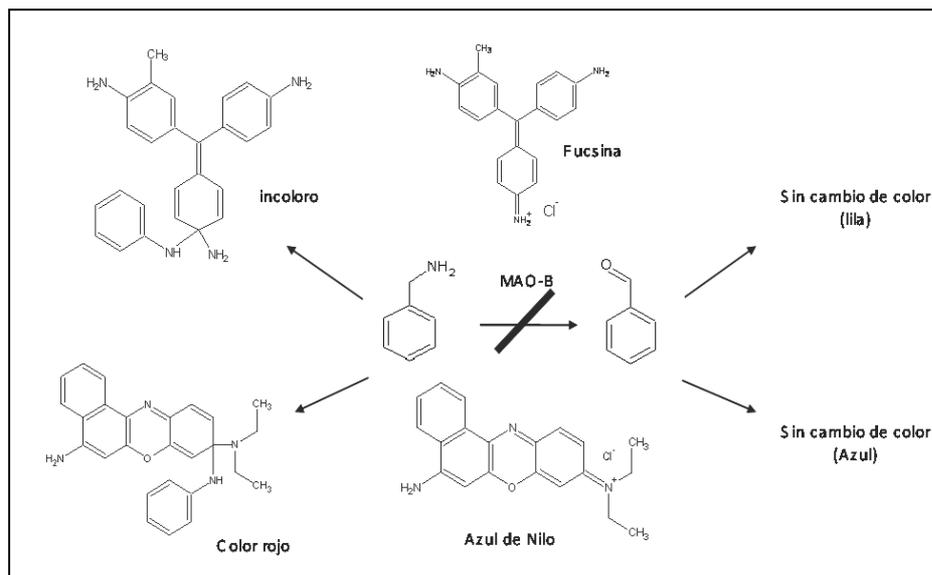


Figura 7 Coloración de bencilamina (sustrato) y benzaldehído (producto) en presencia de diferentes agentes reveladores.

## **Objetivo Principal**

Desarrollar y evaluar métodos para el estudio de la posible capacidad inhibitoria sobre MAO-B.

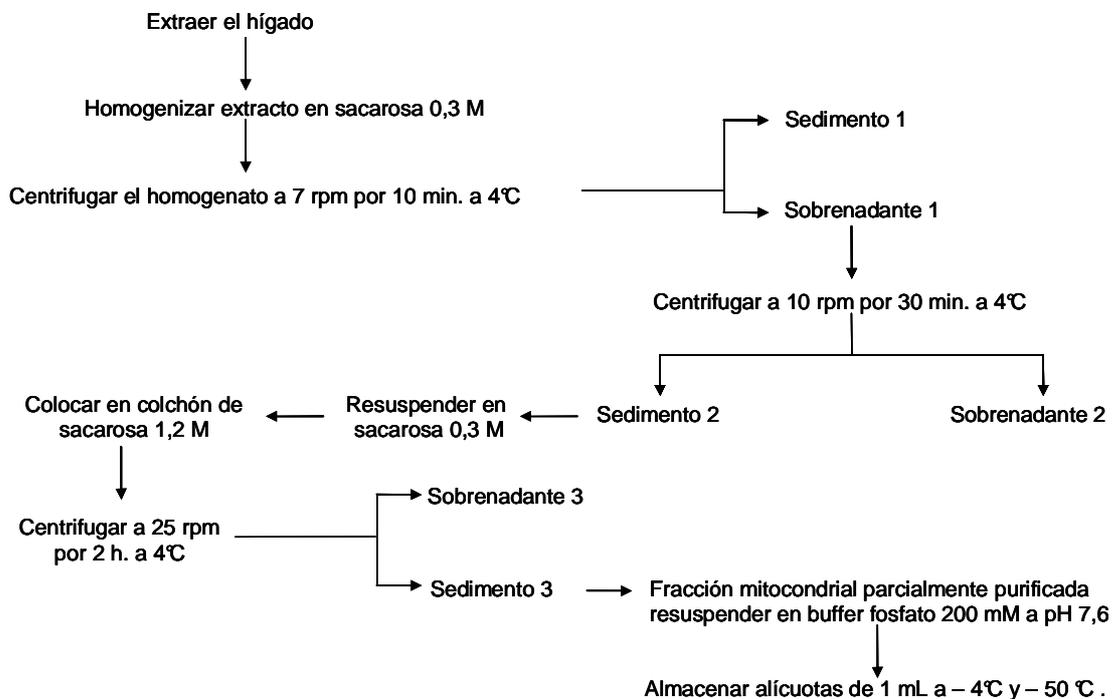
## **Objetivos Específicos**

Desarrollar y evaluar un método cualitativo sobre placas de CCF para la estudio de posibles inhibidores de MAO-B.

Desarrollar y evaluar un método cuantitativo para determinación de inhibidores de MAO-B por espectrofotometría de UV utilizando dopamina como sustrato.

## Metodología

### *I.-Obtención de las fracciones mitocondriales parcialmente purificadas y homogenizadas de MAO. Método Holt. (1997)<sup>[39]</sup> (Modificado)*



Esquema 1 Obtención de la enzima MAO-B. Método Holt y col.

- Extracción del hígado de ratas macho Sprague – Dawley, 250 – 300 g de peso.
- Homogenizar el extracto en sacarosa 0,3 M (relación 1/40 p/v).
- Centrifugar del homogenato a 1000 x g por 10 min a 4 °C.
- Centrifugar del sobrenadante 1 a 10000 x g por 30 min a 4 °C.
- Resuspender el sedimento 2 en sacarosa 0,3 M y se coloca sobre un colchón de sacarosa 1,2 M (relación 1/6 v/v).

- f) Centrifugar a 53000 x g por 2 horas a 4 °C.
- g) El sedimento **3** (correspondiente a la fracción mitocondrial parcialmente purificada), se resuspende en buffer fosfato 200 mM, a pH 7,6.
- h) Almacenar alícuotas de 1 mL a – 4°C y – 50 °C para su uso como fuente de MAO.

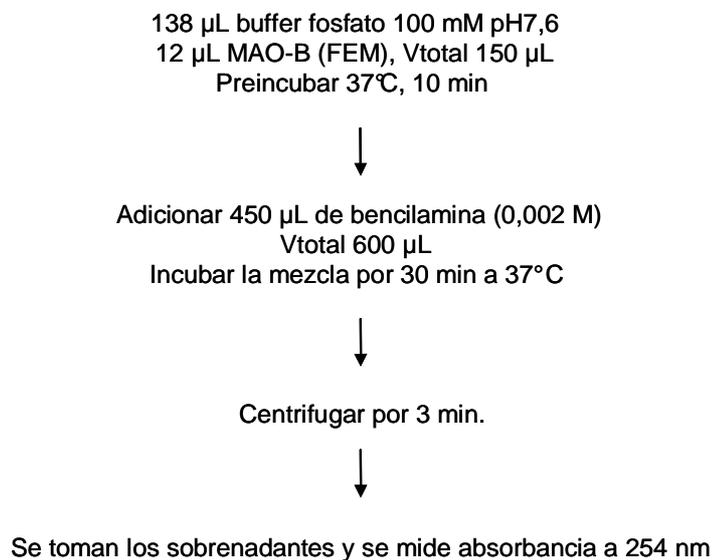
### ***II.- Cuantificación de proteínas por el Método Lowry.***

- a) Elaborar una curva de calibración con albúmina sérica de bovino (500 µg/mL) en un rango de concentración entre 25 y 100 µg/mL (alícuotas de 25, 50, 75 y 100 µg/mL) llevando a un volumen final de 500 µg/mL con agua bidestilada.
- b) Preparar soluciones de la enzima 1, 4 y 8 µL por duplicado igual que el patrón.
- c) Añadir a las soluciones de albúmina y MAO-B 1,5 mL del reactivo de Lowry y dejar reposar por 10 min a temperatura ambiente.
- d) Añadir 150 µL del reactivo de Folin-Ciocalten (disuelto en agua 1:1), dejar en reposo a temperatura ambiente por 40 min.
- e) Determinar la absorbancia a  $\lambda$  660 nm, usar como blanco agua bidestilada.

**III.- Determinación de la actividad enzimática de MAO-B empleando bencilamina como sustrato.**

III.1.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad enzimática de MAO-B utilizando como sustrato bencilamina.

Método Yamazaki y col <sup>[41]</sup>, 1988; Ma y col. <sup>[15]</sup>, 2004; Hubálek y col. <sup>[13]</sup>, 2004.

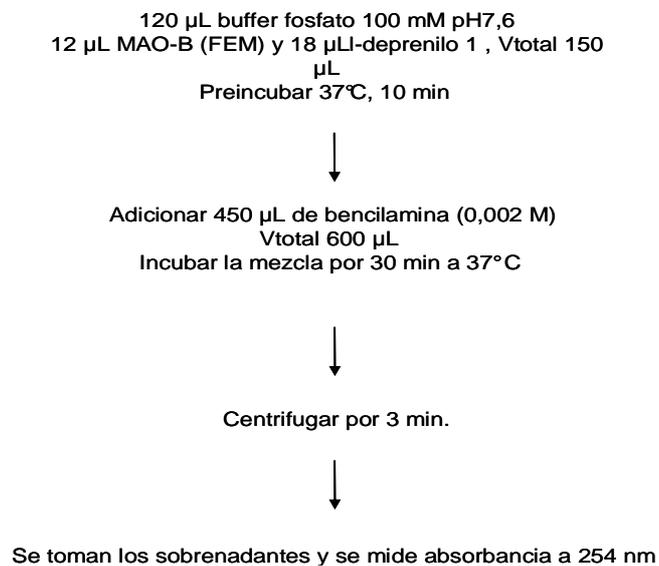


Esquema 2 Evaluación de la actividad enzimática de MAO-B mediante espectrofotometría UV empleando bencilamina como sustrato.

- a) Preincubar a 37 °C por 10min una solución de 138 µL de buffer fosfato, adicionar 12 µL de la solución MAO-B (FEM) obtenida en la centrifugación diferencial.
- b) Añadir 450 µL de bencilamina 0,002 M ( $V_{total}$  600 µL, concentración final 1,5 mM) y se incuba la mezcla durante 30 min a 37 °C.
- c) Centrifugar por 3 min para detener la reacción.
- d) Medir la absorbancia de los sobrenadantes a 254 nm (máximo de absorción del benzaldehído).

III.2.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad inhibitoria sobre MAO-B utilizando como sustrato bencilamina.

Método Yamazaki y col.<sup>[41]</sup>, 1988; Ma y col.<sup>[15]</sup>, 2004; Hubálek y col.<sup>[13]</sup>, 2004.



Esquema 3 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre MAO-B mediante espectrofotometría UV en presencia de inhibidores conocidos de la enzima, utilizando bencilamina como sustrato.

- a) Preincubar a 37 °C por 10min una solución de 120 µL de buffer fosfato, adicionar 12 µL de la solución MAO-B (FEM) obtenida en la centrifugación diferencial y 18 µL del inhibidor.
- b) Añadir 450 µL de bencilamina 0,002 M ( $V_{total}$  600 µL, concentración final 1,5 mM) y se incuba la mezcla durante 30 min a 37 °C.
- c) Centrifugar por 3 min para detener la reacción.
- d) Medir la absorbancia de los sobrenadantes a 254 nm (máximo de absorción del benzaldehído).

El Porcentaje de inhibición de la enzima se determina por la ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = ((A-B)/A) \times 100$$

A = Actividad de MAO en ausencia del inhibidor.

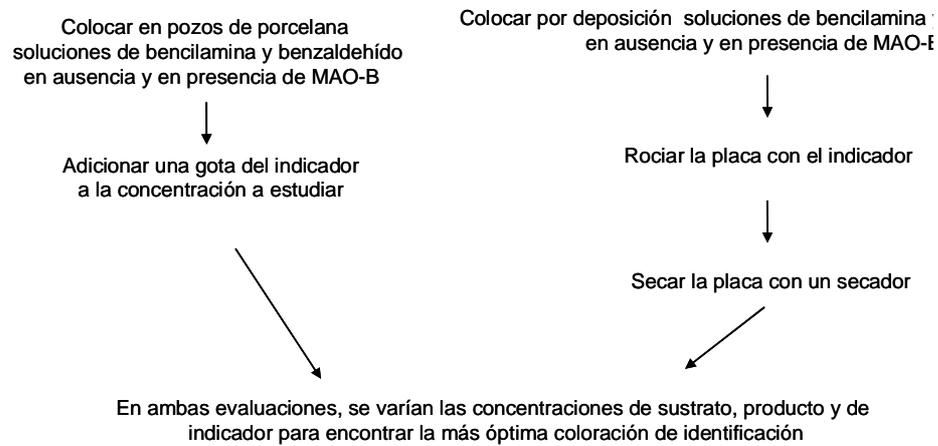
B = Actividad remanente de MAO en presencia del inhibidor.

#### **IV.- Evaluación de la actividad enzimática de MAO-B sobre CCF con diferentes colorantes empleando bencilamina como sustrato.**

IV.1.- Selección del agente de coloración a utilizar en la determinación de la actividad enzimática de MAO-B.

Se realizaron pruebas de coloración sobre el sustrato bencilamina y su producto de oxidación benzaldehído empleando Fucsina y Azul de Nilo; estos colorantes permiten una clara discriminación de colores entre el bencilamina y benzaldehído, permitiendo así la diferenciación de estos como sustrato y producto en las placas de CCF.

El colorante Fucsina pasa de incoloro en presencia de bencilamina a lila en presencia de benzaldehído, mientras que el Azul de Nilo presenta una coloración roja para bencilamina y azul aguamarina para benzaldehído<sup>[8]</sup>, estas pruebas se realizaron para diferentes concentraciones tanto de los sustratos como de los colorantes evaluados. La evaluación se realizó inicialmente en pozos de porcelana y posteriormente sobre placas cromatográficas.



Esquema 4 Evaluación de las coloraciones del sustrato bencilamina con diferentes colorantes en pozos de porcelana y en CCF [8].

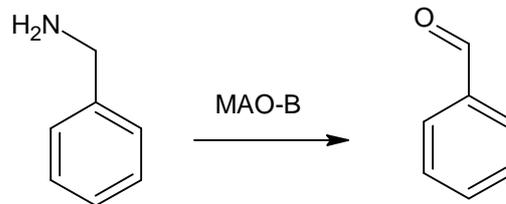
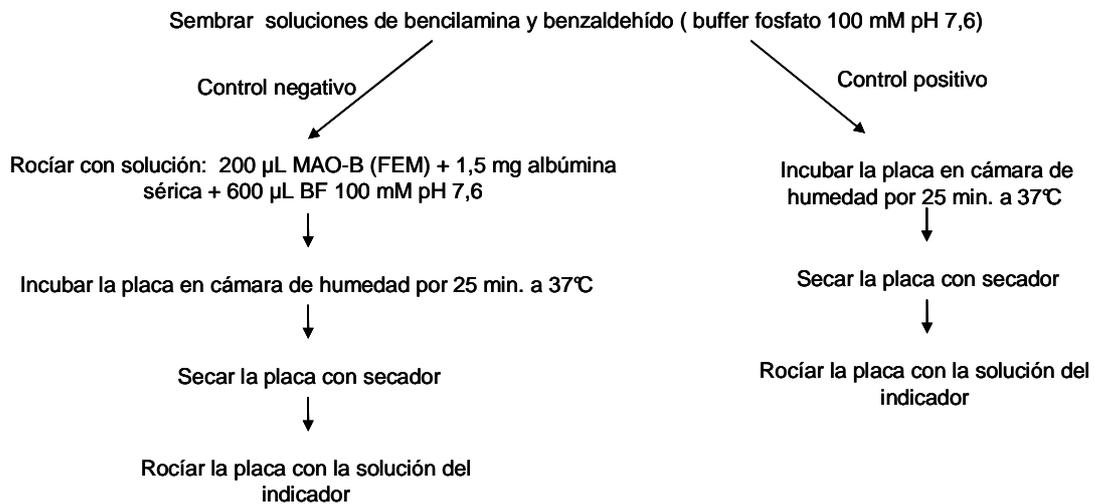


Figura 8 Oxidación de bencilamina a benzaldehído por acción de MAO-B.

Se utilizó como control positivo (inhibición) la presencia de la amina, y como control negativo (ausencia de inhibición) la formación del aldehído; para ello se emplearon como colorantes Fucsina y Azul de Nilo. El procedimiento empleado fue el siguiente:



Esquema 5 Evaluación de la actividad enzimática de MAO-B en CCF [8].

- a) Sobre una placa de CCF colocar aproximadamente 10  $\mu$ L (1 gota) de las soluciones de bencilamina y benzaldehído por separado, en ausencia y presencia de MAO.
- b) Incubar la placa en cámara de humedad por 25 min a 37  $^{\circ}$ C.
- c) Transcurrido el tiempo de reacción frente a la enzima, secar la placa con un secador y rociár con el respectivo indicador.
- d) Para la evaluación de la reacción de bencilamina y benzaldehído en ausencia de MAO-B, se rocía el colorante luego del secado de la placa.

IV.2.- Optimización de los parámetros que afectan la actividad enzimática de MAO-B en CCF.

Para la optimización de los factores que afectan la actividad enzimática de MAO-B cada parámetro fue evaluado por separado y empleando el control positivo y negativo como se indico en el aparte anterior.

- a) Sobre una placa de CCF colocar aproximadamente 10  $\mu$ L (1 gota) de las soluciones de bencilamina y benzaldehído por separado.
- b) Rocíar con la solución de la fracción enriquecida de MAO-B (FEM)
- c) Incubar la placa en cámara de humedad por 25 min a 37 °C, bajo las condiciones a evaluar.
- d) Transcurrido el tiempo de reacción frente a la enzima, secar la placa con un secador y rocíar con el respectivo indicador.
- e) Para la evaluación de la reacción de bencilamina y benzaldehído en ausencia de MAO-B, se rocía el colorante luego del secado de la placa.

Este procedimiento se realizará para cada uno de los indicadores, y los parámetros a evaluar serán:

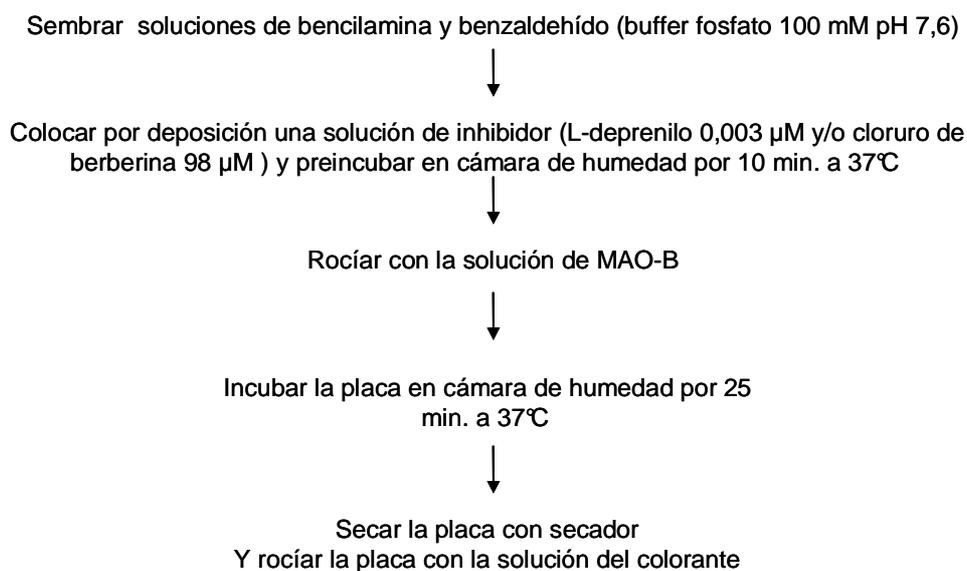
- a) Tiempo de incubación: 10, 20 y 30 minutos.
- b) Concentración de enzima (en relación a la cantidad de proteínas totales): fracción sin diluir y fracciones diluidas a  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$  y  $\frac{1}{16}$ .
- c) Concentración de sustrato: 2; 2,67; 4 y 8 mM.
- d) Temperatura de incubación: 25 °C y 37 °C.
- e) Adición de albúmina sérica bovina: 0,5; 0,8 y 1 mg.

Estos parámetros fueron los reportados por Harrison <sup>[8]</sup>, el procedimiento se realizó para cada uno de los colorantes.

IV.3.- Validación del método cualitativo en CCF para detectar la inhibición de la actividad enzimática de MAO-B en presencia de inhibidores conocidos de la enzima.

Se empleó el método utilizado por Harrison <sup>[8]</sup>, para estudiar la actividad inhibitoria sobre MAO-B utilizándose L-deprenilo y cloruro de berberina, como control positivo. <sup>[13], [15]</sup>.

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de los inhibidores sobre MAO-B se empleo el siguiente procedimiento:

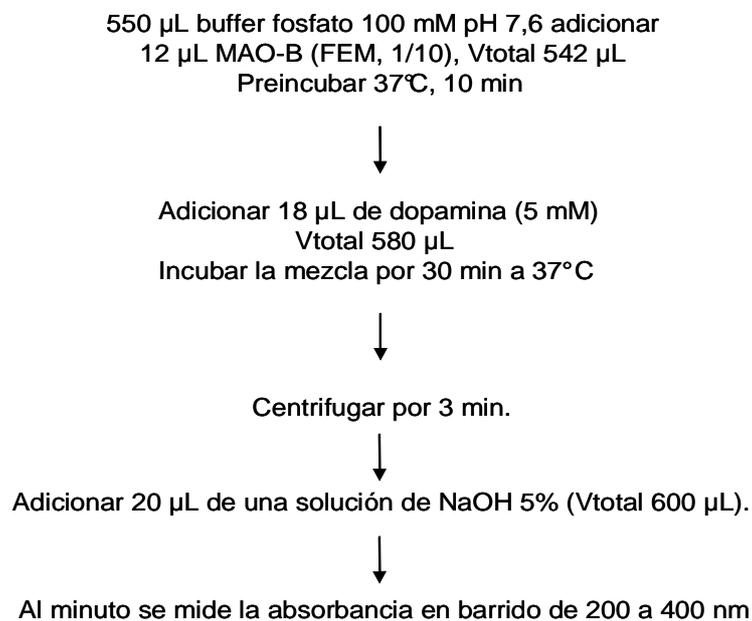


Esquema 6 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre MAO-B en CCF en presencia de inhibidores conocidos de la enzima. [37], [8]

Se realizó además la evaluación de la actividad inhibitoria de una serie de 17 compuestos puros obtenidos por Canino L. mediante modificaciones estructurales del cloruro de berberina, para ello, se siguió el procedimiento indicado.

**V.- Determinación de la actividad enzimática de MAO-B utilizando dopamina como sustrato.**

V.1.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad enzimática de MAO-B utilizando como sustrato dopamina.



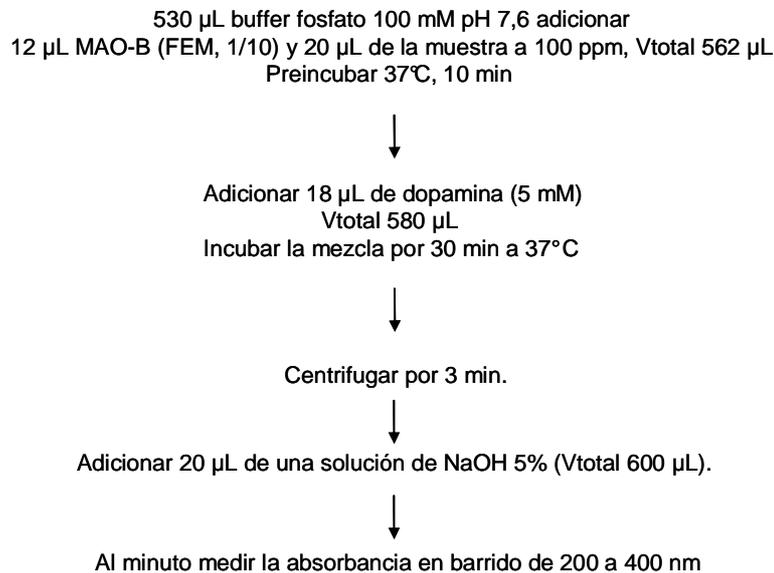
Esquema 7 Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad enzimática de MAO-B empleando dopamina como sustrato.

- a) Preincubar a 37 °C por 10 min una solución de 550 µL de buffer fosfato 100 mM pH 7,6; adicionar 12 µL de una solución MAO-B (FEM) 1/10 de la obtenida en la centrifugación diferencial.
- b) Añadir 18 µL de dopamina 5 mM ( $V_{total}$  580 µL) y se incuba la mezcla durante 30 min a 37 °C.

- c) Centrifugar por 3 min y adicionar 20  $\mu\text{L}$  de una solución de NaOH 5% ( $V_{\text{total}}$  562  $\mu\text{L}$ ).
- d) Medir la absorbancia un minuto después de adicionar el hidróxido de sodio, en un barrido desde 200 a 400 nm.

V.2.-Evaluación de la actividad inhibitoria sobre MAO-B mediante espectrofotometría UV de una serie de análogos de cloruro de berberina, empleando dopamina como sustrato.

Se realizó la determinación de la actividad inhibitoria sobre la enzima MAO-B empleando cloruro de berberina y 17 análogos sintetizados a partir de la modificación del cloruro de berberina <sup>[44]</sup>



Esquema 8 Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad inhibitoria sobre MAO-B de análogos de berberina, empleando dopamina como sustrato.

- a) Preincubar a 37 °C por 10 min una solución de 530 µL de buffer fosfato 100 mM pH 7,6; adicionar 12 µL de una solución MAO-B (FEM) 1/10 de la obtenida en la centrifugación diferencial y 20 µL de la muestra a 100 ppm.
- b) Añadir 18 µL de dopamina 5 mM ( $V_{\text{total}}$  580 µL) y se incuba la mezcla durante 30 min a 37 °C.
- c) Centrifugar por 3 min y adicionar 20 µL de una solución de NaOH 5% ( $V_{\text{total}}$  600 µL).
- d) Medir la absorbancia un minuto después de adicionar el hidróxido de sodio, en un barrido desde 200 a 400 nm.

## Resultados y Discusión

### *I.-Obtención de las fracciones mitocondriales parcialmente purificadas y homogenizadas de MAO. Método Holt. (1997)<sup>[39]</sup> (Modificado)*

### *II.- Cuantificación de proteínas por el Método Lowry.*

Se realizó la obtención de las fracciones mitocondriales parcialmente purificadas enriquecidas en MAO según lo descrito en la metodología experimental; a las mismas se les realizó la cuantificación de proteínas según el Método de Lowry<sup>[40]</sup>.

Durante el desarrollo de la investigación se realizó el aislamiento de la enzima en varias oportunidades, apreciándose que la actividad de la enzima obtenida está relacionada al tamaño y peso de la rata empleada, así como a su régimen alimenticio; en las oportunidades en las que se realizó aislamiento de la enzima luego de un breve periodo de receso vacacional se encontró que la cuantificación de proteínas era menor a lo esperado.

# Ensayo	µg/µL Proteína	mg Proteína
1	5,6 +/- 0,2	0,067 +/- 0,003
2	10 +/- 2	0,1080 +/- 0,0004
3	9 +/- 1	0,11 +/- 0,01
4	8 +/- 1	0,0960 +/- 0,0002

Tabla 1 Cuantificación de proteínas de las fracciones mitocondriales extraídas ricas en MAO-B. Condiciones: t de incubación 30 min; Temp 37 °C; pH 7,6;  $\lambda = 254$  nm; [Bencilamina] 1500 µM en BF 100 mM pH 7,6; dilución de MAO (1/2) en BF 100 mM pH 7,6.

**III.- Determinación de la actividad enzimática de MAO-B empleando bencilamina como sustrato.**

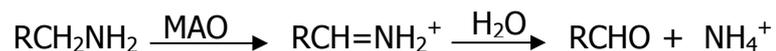
III.1.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad enzimática de MAO-B utilizando como sustrato bencilamina.

Método Yamazaki y col.<sup>[41]</sup>, 1988; Ma y col.<sup>[15]</sup>, 2004; Hubálek y col.<sup>[13]</sup>, 2004.

Empleando como referencia el trabajo realizado por Yamazaki y col. (1988)<sup>[41]</sup>, se evaluó mediante espectrofotometría UV la actividad enzimática de MAO-B en las fracciones subcelulares obtenidas de la centrifugación diferencial.

Para cada ensayo realizado se determinó la actividad enzimática de MAO-B a través de este método; esto permitió hacer seguimiento de la integridad de la misma, además de poder verificar el estado de oxidación de los sustratos empleados.

En el gráfico 1 puede observarse a 254 nm el incremento en la banda de absorción debida al aumento en la concentración de benzaldehído durante la deaminación oxidativa. Este gráfico corresponde al ensayo 4 (ver tabla 2), se observan las curvas de absorción correspondientes a las tres replicas de la transformación de bencilamina a benzaldehído (MAO C1, C2 y C3) en un tiempo de 30 min de incubación a 37°C, obteniéndose un actividad enzimática de  $V = 1531,3 \pm 0,2 \text{ nmol/h*mg}$ .



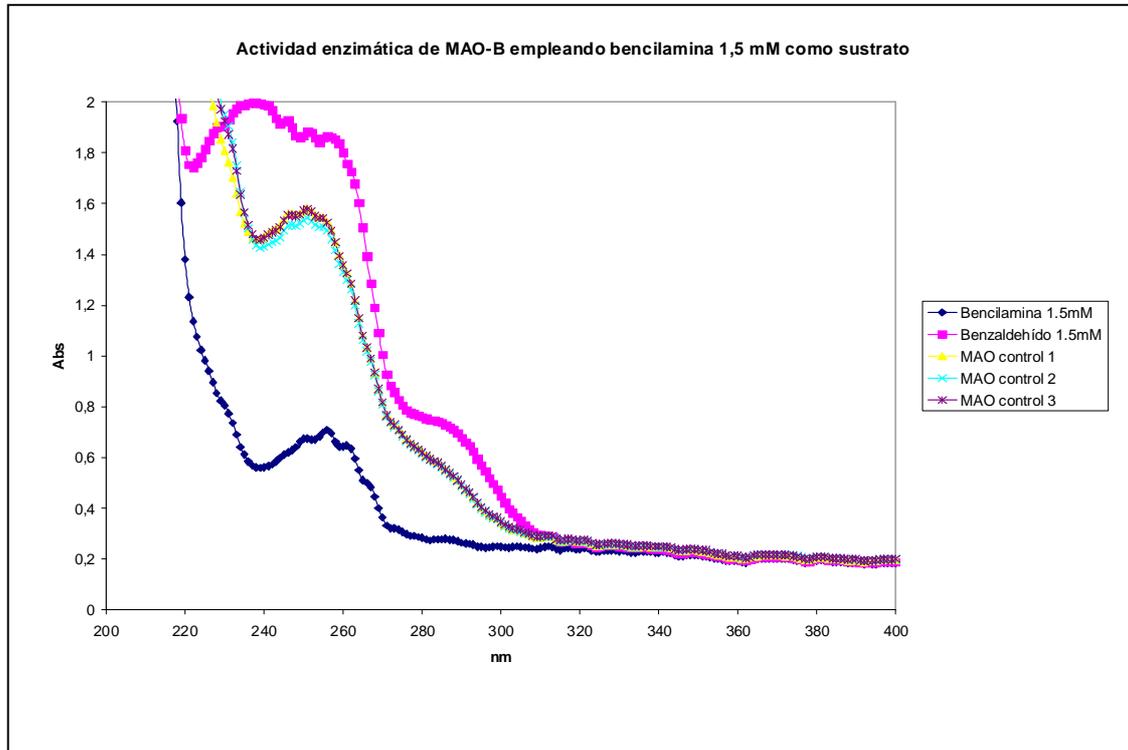


Gráfico 1 Actividad enzimática de MAO-B empleando como sustrato bencilamina 1,5 mM. Condiciones de reacción: 30 min; 37°C, pH 7,6 y

[proteína] = 8 +/- 1 µg/µL

# Ensayo	mg Proteína	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Promedio Abs	V nmol/h*mg
1	0,067 +/- 0,003	0,830	0,939	0,848	1,004	0,91 +/- 0,08	1301,0 +/- 0,2
2	0,1080 +/- 0,0004	1,608	1,560	1,729	1,633	1,63 +/- 0,07	1356,7 +/- 0,2
3	0,11 +/- 0,01	1,473	1,401	--	--	1,44 +/- 0,05	1339,3 +/- 0,1
4	0,0960 +/- 0,0002	1,545	1,507	1,542	--	1,53 +/- 0,02	1531,3 +/- 0,2

Tabla 2 Actividad enzimática de MAO-B. Condiciones: t de incubación 30 min; Temp 37 °C; pH 7,6; λ = 254 nm; [Bencilamina] 1500 µM en BF 100 mM pH 7,6; dilución de MAO (1/2) en BF 100 mM pH 7,6.

En la tabla 2 pueden apreciarse los datos correspondientes a los valores de actividad enzimática (V) en diferentes ensayos. Los resultados muestran que la máxima

actividad de la enzima está relacionada con la concentración de proteínas, es de recordar que esta concentración es afectada por el tamaño y peso de la rata empleada.

III.2.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad inhibitoria sobre MAO-B utilizando como sustrato bencilamina.

Método Yamazaki y col <sup>[41]</sup>, 1988; Ma y col. <sup>[15]</sup>, 2004; Hubálek y col. <sup>[13]</sup>, 2004.

En el gráfico 2 se observan los espectros de absorción correspondientes a la actividad enzimática de MAO-B empleando bencilamina 1,5 mM, así como los espectros correspondientes a la inhibición de L-deprenilo a 0,003  $\mu$ M. Los curvas de absorción muestran las tres replicas correspondientes a la transformación de bencilamina a benzaldehído (MAO C1, C2 y C3) en un tiempo de 30 min de incubación a 37°C con una actividad enzimática de  $V = 1531,3 \pm 0,2$  nmol/h\*mg; se observan también los espectros correspondientes a la inhibición con L-deprenilo (LD 1, LD 2 y LD 3) con un porcentaje de inhibición de  $32,82 \pm 0,02$  %. Este porcentaje de inhibición se encuentra dentro del rango reportado como necesario para producir una inhibición del 50 % a la enzima MAO-B por L-deprenilo (0,02 – 0,04  $\mu$ M). <sup>[42]</sup> En la tabla 3 se observan los valores de porcentaje de inhibición correspondientes a los demás ensayos.

Actividad e inhibición de MAO-B con L-Deprenilo 0,03  $\mu$ M empleando bencilamina 1,5 mM como sustrato

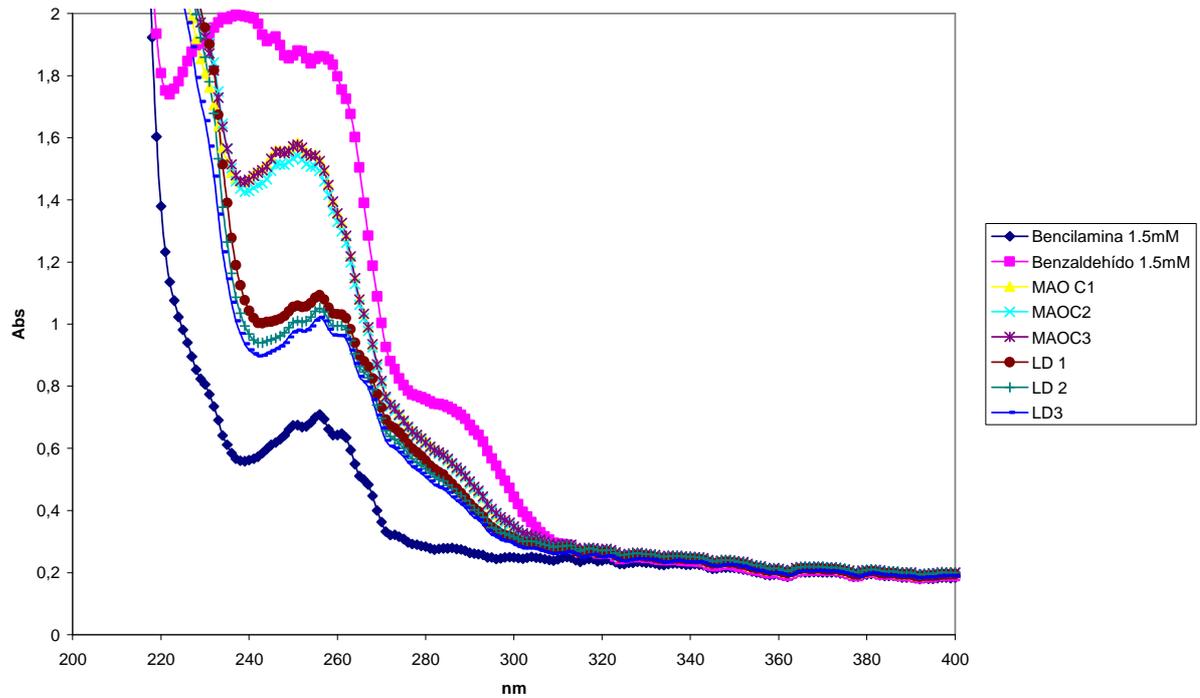


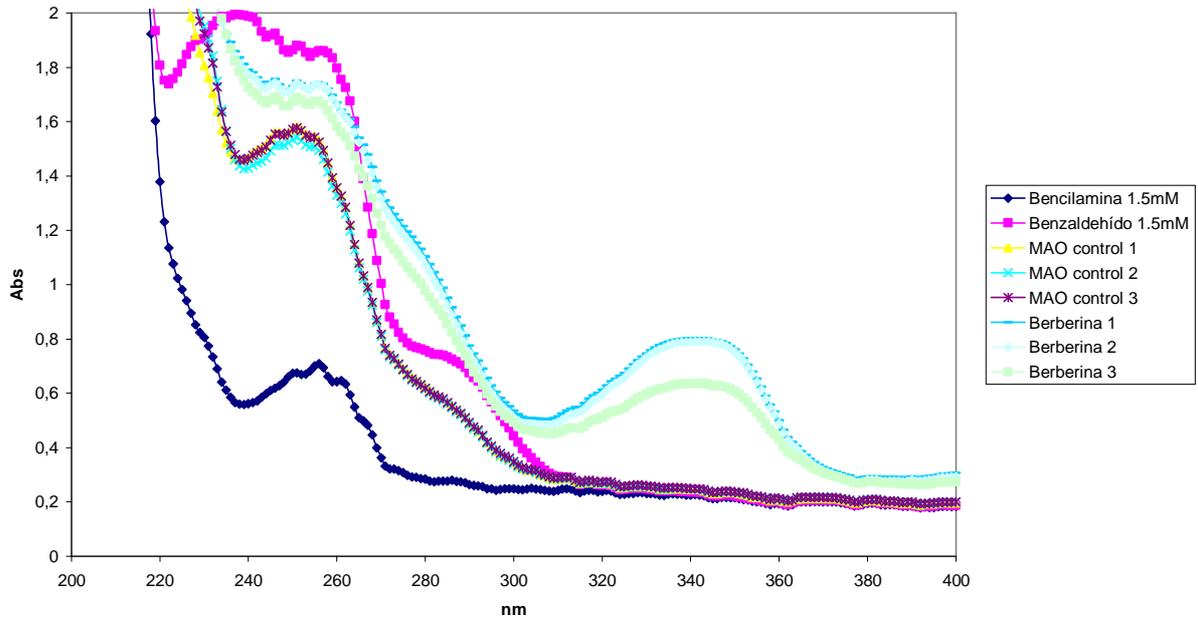
Gráfico 2 Actividad e inhibición enzimática de MAO-B empleando como sustrato bencilamina 1,5 mM y L-deprenilo 0,003  $\mu$ M como inhibidor.

Condiciones de reacción: 30 min; 37°C, pH 7,6 y [pr oteína] = 8 +/- 1  $\mu$ g/ $\mu$ L

# ensayo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio Abs L-deprenilo	Promedio Abs control	% Inhibición
2	1,204	1,258	---	1,23 $\pm$ 0,04	1,63 +/- 0,07	24,60 $\pm$ 0,01
3	1,110	1,151	---	1,13 $\pm$ 0,03	1,44 +/- 0,05	21,34 $\pm$ 0,01
4	1,068	1,023	0,994	1,03 $\pm$ 0,04	1,53 +/- 0,02	32,82 $\pm$ 0,02

Tabla 3 Actividad inhibitoria sobre MAO-B. Condiciones: t de incubación 30 min; Temp 37 °C; pH 7,6;  $\lambda$  = 254 nm; [L-deprenilo] = 0,03  $\mu$ M en BF 100mM pH 7,6; [Bencilamina] 1500  $\mu$ M en BF 100 mM pH 7,6; dilución de MAO (1/2) en BF 100 mM pH 7,6.

**Actividad e inhibición de MAO-B con cloruro de berberina 98  $\mu$ M empleando bencilamina 1,5 mM como sustrato**



**Gráfico 3** Actividad e inhibición enzimática de MAO-B empleando como sustrato bencilamina 1,5 mM y cloruro de berberina 98  $\mu$ M como inhibidor.

Condiciones de reacción: 30 min; 37°C, pH 7,6 y [pr oteína] = 8 +/- 1 $\mu$ g/ $\mu$ L

El gráfico 3 muestra la interferencia producida por las soluciones de cloruro de berberina (sólido amarillo brillante que produce coloraciones intensas en agua), puede observarse que el máximo obtenido para la inhibición con este compuesto se ubica casi por encima del espectro obtenido para la actividad enzimática, por esta razón no es posible utilizar este compuesto o sus análogos como inhibidores en ésta metodología.

#### **IV.- Evaluación de la actividad enzimática de MAO-B sobre CCF con diferentes colorantes empleando bencilamina como sustrato.**

IV.1.- Selección del agente de coloración a utilizar en la determinación de la actividad enzimática de MAO-B.

Se realizaron inicialmente pruebas de coloración en pozos de porcelana empleando como colorante fucsina. En este caso, se probaron dos métodos de preparación del colorante; el primero de ellos es el indicado por Harrison y col.<sup>[8]</sup> donde el colorante es disuelto en agua destilada y empleado directamente. En el segundo método, el colorante es preparado empleando una modificación del procedimiento indicado por Cheronis<sup>[43]</sup>, aquí el sólido recibe un tratamiento químico antes de ser empleado.

Se disolvieron 250 mg de clorhidrato de p-rosanilina (fucsina) en 50 mL de agua destilada caliente, se permitió enfriar y se adicionaron 4 mL de una solución saturada de bisulfito de sodio. Se deja reposar por 1 hora la mezcla y se adicionaron 2 mL de HCl concentrado.

Se evaluó un grupo de soluciones del colorante a diferentes concentraciones para probar su coloración frente al sustrato bencilamina y su producto de oxidación benzaldehído, comparándose la sensibilidad del colorante preparado por los métodos antes descritos.

En la siguiente tabla se muestra una serie de coloraciones similares a las observadas en pozos de porcelana y en placas de CCF empleando fucsina como colorante.

0								8
Bencilamina	1	2	3	4	5	6	7	Benzaldehído

Tabla 4 Variación de las coloraciones del colorante fucsina.

Coloración observada en pozos de porcelana		
[Bencilamina] (M)	Fucsina en agua	Fucsina preparada
0,832	1	0
0,632	3	0
0,432	3	0
0,232	3	0
0,132	3	0
[Benzaldehído] (M)		
0,832	8	8
0,632	7	7
0,432	7	6
0,232	6	6
0,132	6	4

Tabla 5 Coloraciones del colorante fucsina obtenidas en pozos de porcelana.

Se observó que en pozos de porcelana el colorante muestra una mayor sensibilidad al cambio con la concentración de producto cuando es preparado según Cheronis <sup>[43]</sup>, pudiéndose detectar diferencias entre bencilamina y benzaldehído a concentraciones de 4 mM, empleando el colorante preparado por tratamiento a 0,75 mM. Al realizar los ensayos sobre placas de CCF se encuentra que el colorante a la concentración mencionada permite distinguir la coloración entre bencilamina y benzaldehído a concentraciones de 1,5 mM.

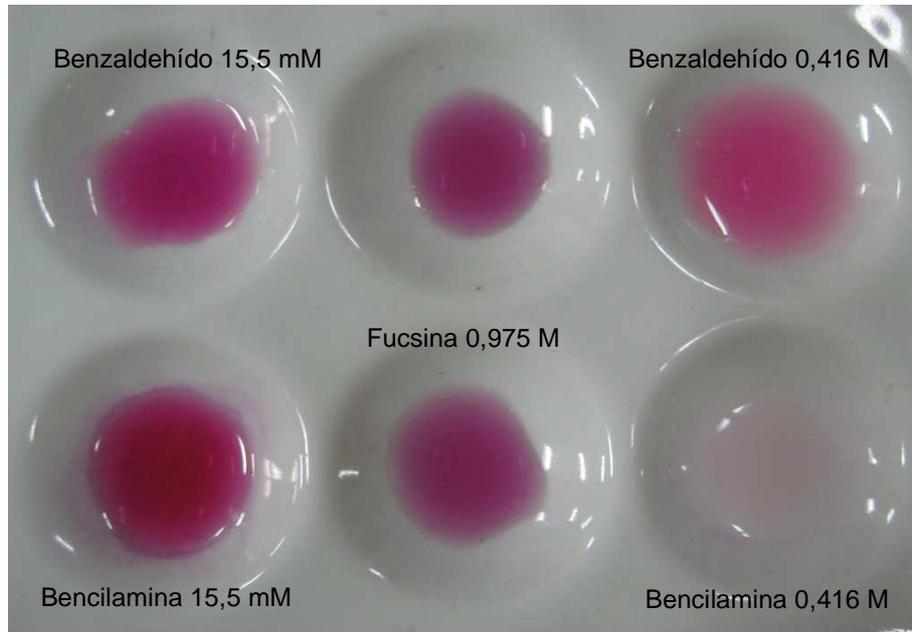


Foto 1 Coloración del colorante fucsina en pozos de porcelana frente al sustrato bencilamina y el producto benzaldehído a diferentes concentraciones.

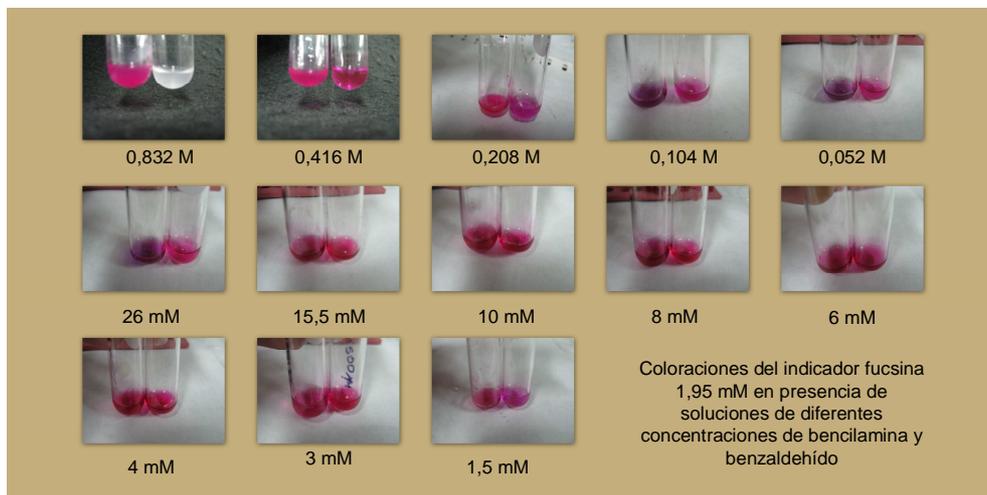


Foto 2 Coloración del colorante fucsina frente al sustrato bencilamina y el producto benzaldehído a diferentes concentraciones.

Los ensayos iniciales para la evaluación de la actividad enzimática de MAO-B fueron llevados a cabo empleando el colorante fucsina, durante un lapso de tiempo los resultados fueron los esperados pudiéndose evaluar la oxidación de bencilamina a benzaldehído por acción de la enzima; al tratar de llevar a cabo los análisis de inhibición con L-deprenilo al 0,003  $\mu\text{M}$  ( $\text{LC}_{50}$ ) ya no fue posible reproducir los resultados. El colorante se mostró bastante inestable con el tiempo y método de preparación. Por esta razón se decide utilizar colorante azul de Nilo como agente de coloración; en este caso el colorante forma un complejo de color rojo con bencilamina mientras que en presencia del aldehído no se observa cambio de color. Este colorante según lo reportado por Harrison <sup>[8]</sup>, presenta una mayor ventaja pues era más fácil visualizar los cambios de coloración en la gama de azul a rojo que detectar variaciones de color entre el blanco y el fucsia.

Coloración observada en pozos de porcelana	
[Bencilamina] (M)	Azul de nilo
0,832	0
0,416	1
0,208	2
0,104	3
0,015	4
[Benzaldehído] (M)	
0,832	8
0,416	8
0,208	7
0,104	6
0,015	5

Tabla 6 Coloraciones del colorante azul de nilo obtenidas en pozos de porcelana.

0									8
Bencilamina	1	2	3	4	5	6	7	Benzaldehído	

Tabla 7 Variación de las coloraciones del colorante azul de nilo.

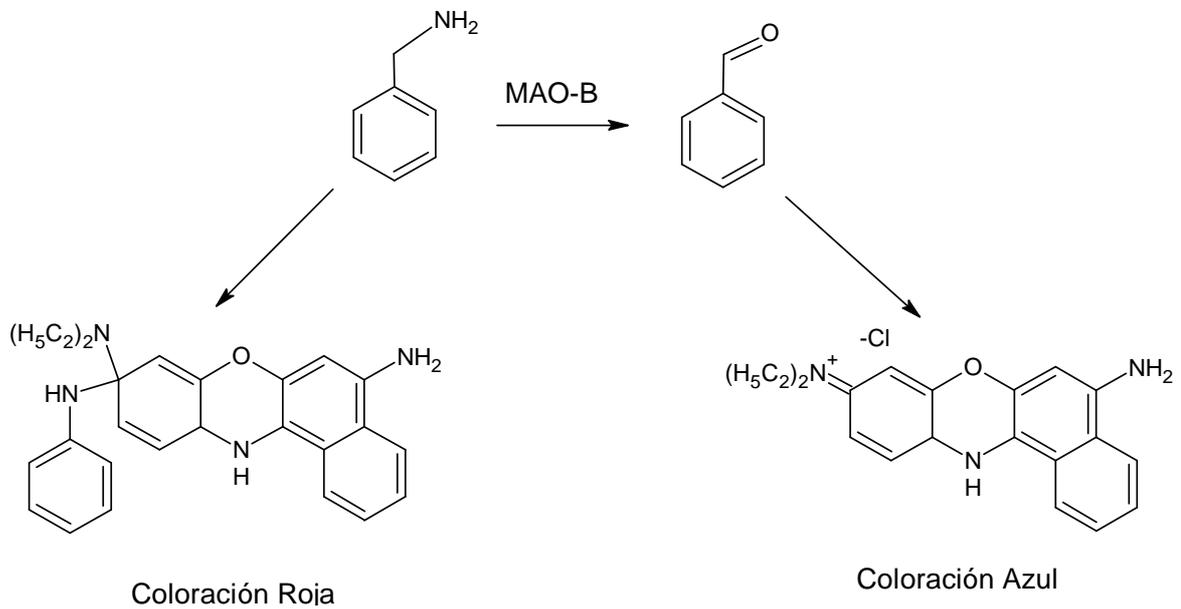


Figura 9 Cambio del colorante Azul de Nilo en presencia de bencilamina y benzaldehído.

El colorante azul de nilo se preparó disolviendo el sólido en agua destilada, se evaluaron en pozos de porcelana un grupo de soluciones del colorante a diferentes concentraciones para probar su coloración frente al sustrato bencilamina y el producto de oxidación benzaldehído, encontrándose que a una concentración de colorante de 0,75 mM es posible apreciar diferencias de coloración empleando bencilamina y benzaldehído hasta una concentración mínima de 8 mM teniendo que diferenciarse entre un violeta claro (bencilamina) y azul claro (benzaldehído). Cuando se realizaron las pruebas sobre placas de CCF se encontró que era posible visualizar una diferencia

entre bencilamina y benzaldehído a concentraciones de 0,052 M con una concentración de colorante de 0,5 mM.

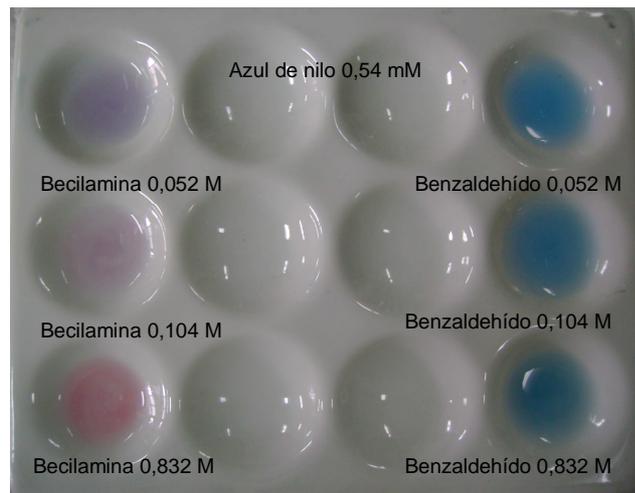


Foto 3 Coloración de la mezcla del colorante azul de Nilo 0,54 mM con bencilamina y con benzaldehído a diferentes concentraciones en pozos de porcelana.



Foto 4 Coloración del colorante azul de Nilo 0,54 mM sobre placas de CCF empleando bencilamina 0,104 M (puntos 1,2 y 3) y benzaldehído 0,104 M.

Se realizó también la evaluación de la enzima MAO-B y de los inhibidores L-deprenilo (5 ppm) y cloruro de berberina (5 ppm) con el colorante azul de nilo a una concentración de 0,5 mM para descartar una posible interferencia en la coloración en los ensayos de actividad e inhibición de la enzima; encontrándose que no existía cambio alguno en la coloración azul del colorante a las concentraciones evaluadas.

#### IV.2.- Optimización de los parámetros que afectan la actividad enzimática de MAO-B en CCF.

Se realizó la evaluación de la actividad oxidativa de MAO-B sobre el sustrato bencilamina tomando como control positivo (ausencia de inhibición) la formación del aldehído correspondiente. Para ello se evaluaron los colorantes fucsina (clorhidrato de p-rosanilina) y azul de Nilo (cloruro de azul de Nilo). Se empleó el procedimiento planteado por Harrison <sup>[8]</sup>, siendo necesario la optimización de los parámetros del experimento.

Para la optimización de los factores que afectan la actividad enzimática de MAO-B, cada parámetro fue evaluado por separado empleando el control positivo y negativo como se indicó en la metodología.

Se colocaron sobre placas de CCF 10µL de el sustrato bencilamina y el producto por deposición; se rociaron con una solución de MAO-B, la placa fue incubada a 37 °C en cámara de humedad por 25 min a pH 7,6 bajo las condiciones a evaluar, luego de haber culminado el tiempo de reacción, la placa se secó y roció con el colorante.

De los parámetros evaluados, el pH y la temperatura permanecieron constantes pues éstas son las condiciones óptimas para que se desarrolle la catálisis enzimática; para determinar el tiempo más adecuado de incubación se realizaron ensayos a 20, 25, 30 y 35 min encontrándose que el tiempo de 25 min era el más adecuado para el ensayo pues, en un tiempo mayor no se observa variación en el desarrollo de la reacción.

La solución de la enzima se preparó a  $\frac{1}{4}$  de la concentración obtenida en la extracción, empleándose 200  $\mu\text{L}$  de la fracción mitocondrial enriquecida en MAO-B ([proteína] =  $8 \pm 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en 600  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 100mM pH 7,6. A la solución así preparada se le adicionó albúmina sérica para estabilizar la enzima, en los ensayos se encontró que la albúmina debe tener una concentración final de 0,002 mg/ $\mu\text{L}$ ; esto representa casi el doble de albúmina que la indicada por Harrison <sup>[8]</sup>.

En los ensayos iniciales, la concentración óptima de bencilamina para trabajar fue 4mM, sin embargo, en las pruebas posteriores se presentaron serios problemas con el sustrato, el mismo empezó a mostrar igual coloración que el benzaldehído dando así un falso positivo (formación del aldehído) teniéndose que probar a mayores concentraciones, esto debido a la oxidación natural de bencilamina a benzaldehído.

Se evaluó también la manera más efectiva de colocar cada uno de los componentes que conforman la reacción. Para estos ensayos se emplearon las metodologías de baño y rocío de la solución de MAO sobre las placas de CCF según lo ensayado por Harrison. <sup>[8]</sup> Se observó que la deposición de bencilamina y benzaldehído con un capilar no es homogénea, se forman aros concéntricos que al ser revelados muestran diferentes concentraciones, esto debido a la polaridad del solvente en el que están preparados los compuestos y a la interacción de la sílica con el solvente, lo cuál produce el efecto observado. Se intentó eliminar este problema empleando otros solventes en la preparación de bencilamina y benzaldehído sin obtener buenos resultados, sólo se logró reducir el problema si la placa es secada inmediatamente después de la aplicación con un secador lo cual evita esta expansión.

<b>Parámetro evaluado</b>	<b>Valores reportados por Harrison <sup>[8]</sup></b>	<b>Valores obtenidos en la optimización</b>
Tiempo de incubación	25 min	25 min
Concentración de la enzima	¼[proteínas]	¼[proteínas]
Concentración del sustrato	3 mM	4 mM
Temperatura de incubación	37 °C	37 °C en cámara de humedad
Adición de albúmina sérica	0,8 mg	1,6 mg ( concentración final: 0,002 mg/µL)

Tabla 8 Resultados de la optimización de los parámetros que afectan la actividad enzimática de MAO-B en CCF.

Una vez optimizados los parámetros se realizó la evaluación de la actividad enzimática de MAO-B sobre el sustrato bencilamina utilizando los colorantes fucsina y azul de nilo para detectar la oxidación del sustrato. Inicialmente se trabajó empleando fucsina 0,75 mM pero tal como se indicó en el aparte *III.2.1*, los primeros resultados fueron satisfactorios pudiéndose evaluar la oxidación de bencilamina a benzaldehído por acción de la enzima pero al tratar de llevar a cabo los análisis de inhibición con L-deprenilo al 0,003 µM (LC<sub>50</sub>) no fue posible reproducir los mismos; además el colorante se mostró bastante inestable al tiempo, método de preparación y forma de almacenamiento, en algunos casos se obtuvo una solución completamente incolora que era bastante sensible a los reactivos y en otras oportunidades la solución resultante mostraba una coloración marrón rojiza con partículas de sólido suspendidas; siendo necesario el almacenamiento del colorante en frascos color ámbar bajo refrigeración para evitar una rápida descomposición del mismo. Es por ello que se hace el cambio al

colorante azul de nilo, el cual había demostrado ser efectivo para la diferenciación entre bencilamina y benzaldehído en las pruebas preliminares.

Se emplea así el colorante azul de nilo a una concentración de 0,5 mM; las evaluaciones iniciales permiten detectar la actividad enzimática de MAO-B sobre el sustrato bencilamina apreciando visualmente la transformación en comparación con una placa control; sin embargo nuevamente, al tratar de realizar los ensayos inhibitorios con L-deprenilo al 0,003  $\mu$ M ( $LC_{50}$ ) no fue posible observar inhibición de la actividad de la enzima sobre la placa.

Estos resultados llevaron al desarrollo de otras metodologías para la detección de la actividad inhibitoria; se trató de incorporar el uso de los colorantes en el método espectrofotométrico, por ser una técnica más sensible que la observación directa sobre una placa de CCF.

IV.3.- Validación del método cualitativo en CCF para detectar la inhibición de la actividad enzimática de MAO-B en presencia de inhibidores conocidos de la enzima.

Una vez establecidas las condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración de enzima, concentración de sustrato y adición de albúmina sérica, tal como se indica en el aparte *IV.2*; se realizó la evaluación de los inhibidores en presencia del colorante. El procedimiento empleado fue colocar sobre una placa de CCF con un capilar aproximadamente 1 gota de L-deprenilo 0,5  $\mu$ g/mL y cloruro de Berberina 0,5  $\mu$ g/mL por separado, posteriormente, se roció con el respectivo colorante.

A pesar de lograr identificar diferencias de coloración entre bencilamina y benzaldehído en placas de CCF con el colorante azul de Nilo (aparte IV.1), al momento de realizar los ensayos empleado los inhibidores sobre la placa de reacción con MAO-B, ya no fue posible visualizarlas obteniéndose las placas siempre con la coloración azul del colorante, incluso en los puntos de aplicación de bencilamina, esto indica que la misma fue transformada en su producto de oxidación por acción de la enzima. Se intentaron aumentar las concentraciones empleadas de sustrato para hacer más intenso el color de diferencia entre bencilamina y benzaldehído pero no se logró observar cambios, esto es indicativo que MAO-B y el inhibidor no logran interactuar adecuadamente sobre la placa de CCF de forma tal que sólo se aprecia la catálisis enzimática más no la inhibición.

#### ***V.- Determinación de la actividad enzimática de MAO-B utilizando dopamina como sustrato.***

V.1.- Evaluación mediante espectrofotometría UV de la actividad enzimática de MAO-B utilizando como sustrato dopamina.

Debido a la inestabilidad mostrada por los colorantes fucsina y azul de nilo en la determinación de la actividad enzimática de MAO-B en CCF, a la falta de interacción entre la enzima y el compuesto inhibidor sobre la placa de CCF, y los resultados obtenidos en los experimentos desarrollados en tubos de ensayo; se desarrollo en colaboración con el profesor Canino <sup>[44]</sup> una metodología para determinar la actividad enzimática de MAO-B por espectrofotometría UV usando dopamina como sustrato, tomando como base los ensayos realizados por Yamazaki. <sup>[41]</sup>

En el método espectrofotométrico utilizando bencilamina como sustrato <sup>[41], [42],[13]</sup> y <sup>[15]</sup>, la amina es oxidada a benzaldehído por acción de la enzima MAO-B; dicha

transformación es evaluada por cambios en el espectro de absorción por la aparición del producto. Las mediciones se realizan directamente usando el producto de transformación a 254 nm.

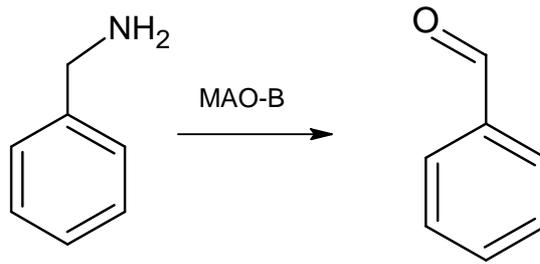


Figura 10 Oxidación de bencilamina por acción de MAO-B.

La dopamina es el sustrato natural de la enzima, el pico de absorción de la misma se encuentra ubicado a 280 nm. Debido a que las muestras a evaluar, presentan un espectro de absorción que interfiere a 280 nm, se realiza la adición de la base como artificio químico para poder evitar esta interferencia, la adición de base produce un corrimiento batocrómico hacia 296 nm donde si es posible realizar la medición.<sup>[44]</sup> En el método desarrollado con dopamina, el sustrato es transformado por acción de la enzima, y la determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática se realiza al medir la transformación de la dopamina remanente por acción del NaOH añadido. Los valores de absorbancia se registraron a 302 nm, lo cuál lleva a considerar que el producto observado es el aminocromo (2,3-dihidroindol-5,6-diona), éste es una o-quinona cíclica derivada de la oxidación de la dopamina.

Según Bisaglia y col<sup>[45]</sup>, en la presencia de un agente oxidante como iodato de sodio, la dopamina se oxida a la correspondiente dopamino-o-quinona, la cual sufre una reacción de ciclación para dar resultado la leucoaminocromo y su posterior oxidación a

aminocromo con subsiguientes rearrreglos y oxidaciones que derivan en otros productos (ver figura 11).<sup>[45]</sup> En condiciones fisiológicas (oxidación enzimática a 37 °C y pH 7,4), la adición del oxidante (enzima) cataliza la formación del intermediario aminocromo visualizándose bandas características entre 300 y 475 nm; en contraste con la ausencia de otras especies intermediarias como la dopamino-o-quinona que no llega a ser detectada.<sup>[45]</sup>

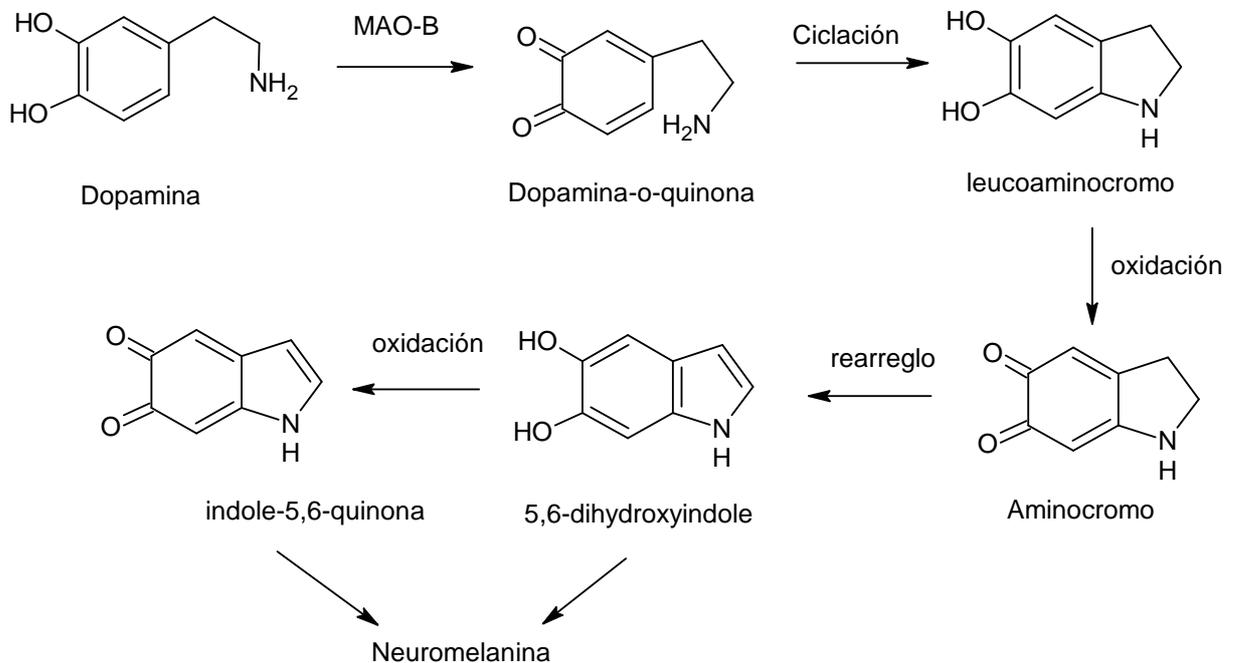


Figura 11 Vía oxidativa de la síntesis de neuromelanina a partir de la oxidación de dopamina. [45]

Se realizaron ensayos simultáneos por espectrofotometría UV empleando como sustrato bencilamina (aparte *III.1*) y empleando dopamina según el protocolo indicado en la metodología; esto permitió comparar la actividad de la enzima frente a ambos sustratos; y tal como se esperaba la enzima presenta buena actividad frente a su sustrato natural dopamina.

En el gráfico 4, se puede apreciar los espectros de absorción del sustrato dopamina y su producto de oxidación; así como los espectros correspondientes al corrimiento batocrómico. Se planteó la adición de NaOH al medio para provocar el corrimiento de los espectros y la medición en este rango de longitud de onda buscando poder utilizar este método para la evaluación de la actividad inhibitoria de una serie de compuestos análogos a cloruro de berberina.

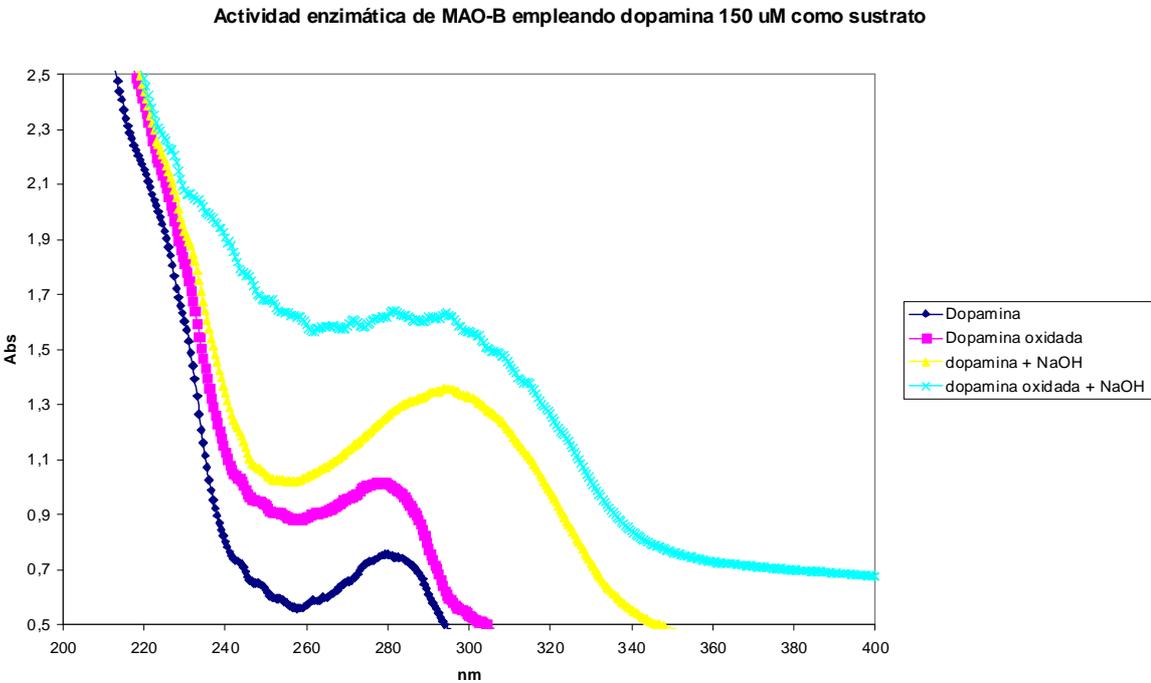


Gráfico 4 Actividad enzimática de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150  $\mu$ M. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8  $\mu$ g/  $\mu$ L.

V.2.-Evaluación de la actividad inhibitoria sobre MAO-B mediante espectrofotometría UV de análogos de berberina empleando dopamina como sustrato.

En estos experimentos se trabajó en conjunto con Canino <sup>[44]</sup>. Para la evaluación de la actividad inhibitoria sobre MAO-B usando como sustrato dopamina, se empleó cloruro de berberina y un grupo de 17 derivados obtenidos mediante modificaciones estructurales por Canino y col <sup>[44]</sup>. Inicialmente, se realizó la evaluación de la actividad inhibitoria de berberina y sus derivados sobre MAO-B empleando como sustrato bencilamina, pero se encontró que los máximos de absorción de berberina y los derivados coincidían con los de bencilamina y en algunos casos con benzaldehído (zona de 240 a 260 nm) creando interferencia en el espectro. En la tabla 8 se muestran las estructuras de los compuestos evaluados por espectrofotometría de UV empleando dopamina como sustrato.

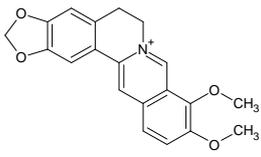
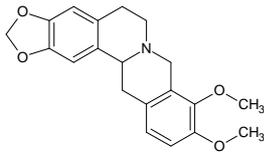
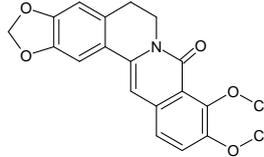
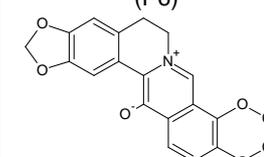
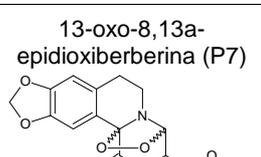
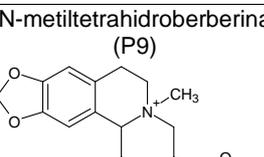
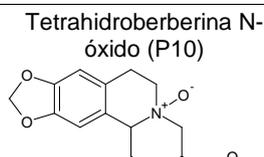
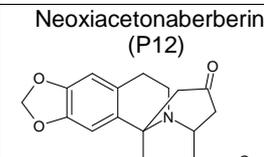
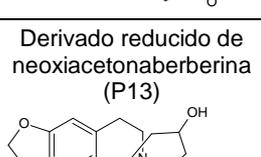
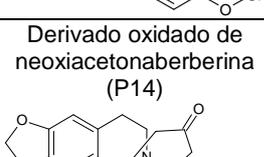
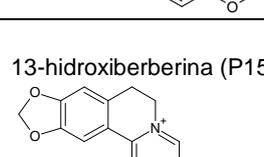
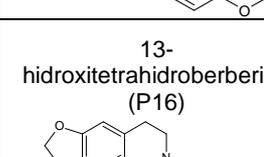
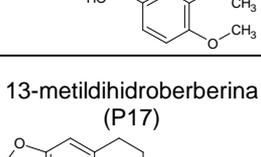
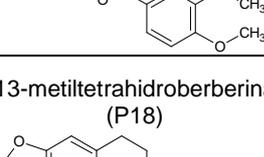
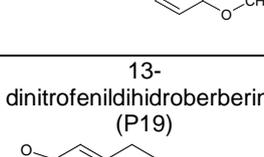
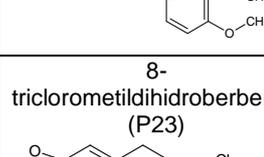
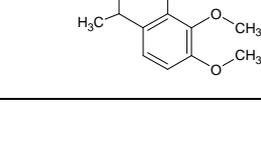
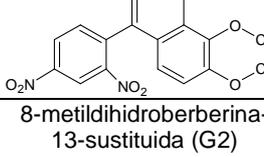
<p>Cloruro de berberina</p> 	<p>Tetrahydroberberina (P2)</p> 	<p>8-oxoberberina (P5)</p> 	<p>13-berberinafenolbetaína (P6)</p> 
<p>13-oxo-8,13a-epidioxiberberina (P7)</p> 	<p>N-metiltetrahydroberberina (P9)</p> 	<p>Tetrahydroberberina N-óxido (P10)</p> 	<p>Neoxiacetonberberina (P12)</p> 
<p>Derivado reducido de neoxiacetonberberina (P13)</p> 	<p>Derivado oxidado de neoxiacetonberberina (P14)</p> 	<p>13-hidroxiberberina (P15)</p> 	<p>13-hidroxitetrahydroberberina (P16)</p> 
<p>13-metildihidroberberina (P17)</p> 	<p>13-metiltetrahydroberberina (P18)</p> 	<p>13-dinitrofenildihidroberberina (P19)</p> 	<p>8-triclorometildihidroberberina (P23)</p> 
<p>8-fenildihidroberberina-13-sustituida (G1)</p> 		<p>8-metildihidroberberina-13-sustituida (G2)</p> 	

Tabla 9 Compuestos evaluados por espectrofotometría de UV usando dopamina como sustrato.

La concentración adecuada de dopamina a usar así como las demás variables del experimento, temperatura y tiempo de reacción, fueron determinadas en los ensayos de actividad enzimática de MAO-B con dopamina en aparte *III.3*, adicionalmente, se realizaron espectros de absorción a diferentes concentraciones de los derivados sintéticos para descartar posibles interferencias en el rango de trabajo así como la concentración más adecuada a emplear tomando como parámetro base el IC<sub>50</sub> de berberina 98,47  $\mu\text{M}$  <sup>[42]</sup>.

El ensayo desarrollado presenta la ventaja de utilizar 1/10 de la concentración de sustrato, enzima e inhibidores en comparación con el mismo experimento donde se emplea bencilamina como sustrato. Esto no sólo reduce el consumo de reactivos para cada determinación sino que permite la evaluación de inhibidores en concentraciones más bajas, favorece el trabajo con compuestos de solubilidad limitada y aumenta el límite de detección. Como desventaja, se encuentra que el rango de absorbancia entre los máximos de absorción de dopamina y de su producto de oxidación es muy reducido con lo cual se afecta la sensibilidad del método.

Los ensayos se realizaron por triplicado, siendo registrados los valores a 302 nm, longitud de onda a la cual se minimizan las interferencias con la absorción de las muestras, siendo también una longitud de onda cercana al máximo de absorción de la dopamina en medio básico (296nm).<sup>[44]</sup> Bisaglia <sup>[45]</sup> reporta que el pH representa un factor importante en las reacciones de rearreglo de los productos de oxidación de la dopamina, a mayor pH las bandas de absorción se incrementan; por tanto esto hace pensar que al aumentar la basicidad del medio, se favorecen las reacciones de formación de las especies intermediarias de dopamina y por tanto la banda observada a 302 corresponde al aminocromo.

Actividad e inhibición MAO-B empleando dopamina como sustrato , inhibición de los compuestos P12, P13 y P14

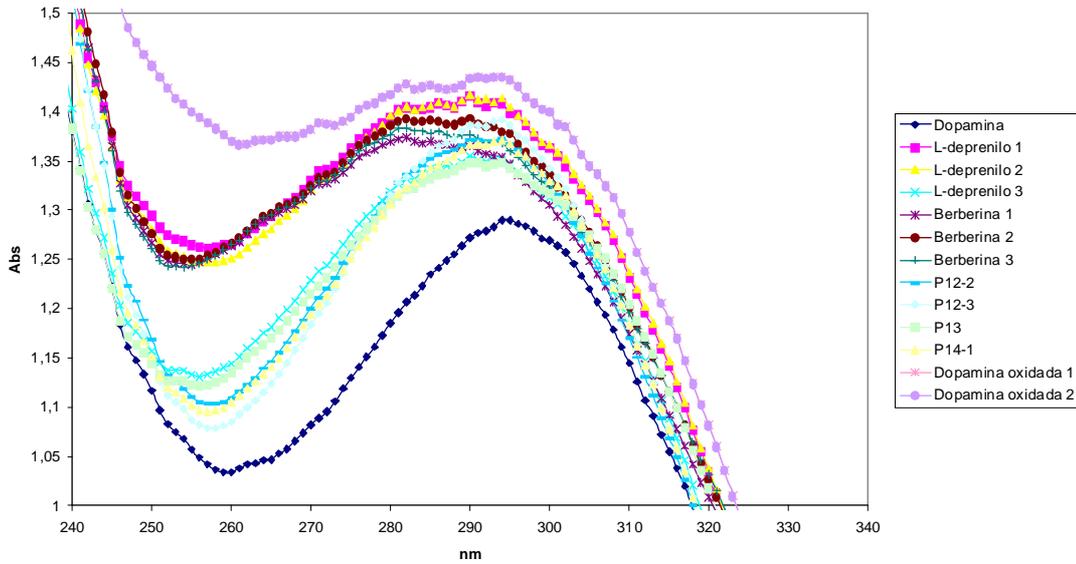


Gráfico 5 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 µM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 µg/ µL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 µM; Cloruro de berberina 98 µM; P12 = neoxiacetonaberberina; P13 = derivado reducido neoxiacetonaberberina; P14 = derivado oxidado neoxiacetonaberberina; P12, P13 y P14 están a concentración 100 ppm

	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio Abs	% inhibición
Dopamina	1,257	--	--	1,257 ± 0,001	
Dopamina oxidada	1,385	1,385	--	1,385 ± 0,001	
P12	1,27	1,303	1,322	1,30 ± 0,03	68
P13	1,305	--	--	1,305 ± 0,001	63
P14	1,315	1,259	--	1,29 ± 0,04	77
L-deprenilo	1,344	1,352	1,294	1,33 ± 0,03	
Cloruro de berberina	1,285	1,316	1,304	1,30 ± 0,02	

Tabla 10 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 µM. Condiciones de reacción: λ = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 µg/ µL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 µM; Cloruro de berberina 98 µM; P12 = neoxiacetonaberberina; P13 = derivado reducido neoxiacetonaberberina; P14 = derivado oxidado neoxiacetonaberberina; P12, P13 y P14 están a concentración 100 ppm

Actividad e inhibición MAO-B empleando dopamina como sustrato, inhibición de los compuestos P2, P5, P18

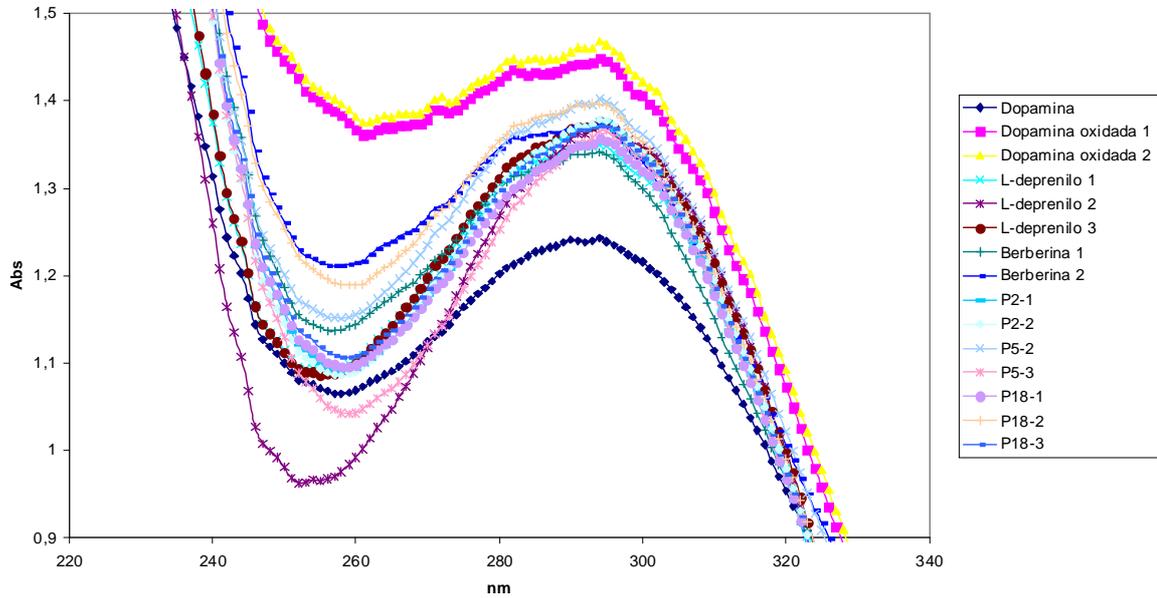


Gráfico 6 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 µM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 µg/ µL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 µM; Cloruro de berberina 98 µM; P2 = tetrahydroberberina; P5 = 8-oxoberberina; P18 = 13-metiltetrahydroberberina; P2, P5 y P18 están a concentración 100 ppm

	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio Abs	% inhibición
Dopamina	1,202	--	--	1,202 ± 0,001	
Dopamina oxidada	1,389	1,411	--	1,40 ± 0,02	
P2	1,318	1,323	1,358	1,33 ± 0,02	34
P5	1,469	1,345	1,316	1,38 ± 0,08	12
P18	1,303	1,328	1,319	1,32 ± 0,01	42
L-deprenilo	1,301	1,336	1,328	1,32 ± 0,02	
Cloruro de berberina	1,279	1,307	--	1,29 ± 0,02	

Tabla 11 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 µM. Condiciones de reacción: λ = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 µg/ µL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 µM; Cloruro de berberina 98 µM; P2 = tetrahydroberberina; P5 = 8-oxoberberina; P18 = 13-metiltetrahydroberberina; P2, P5 y P18 están a concentración 100 ppm

Actividad e inhibición de MAO-B empleando Dopamina como sustrato, inhibición de los compuestos G1, G2 y P7

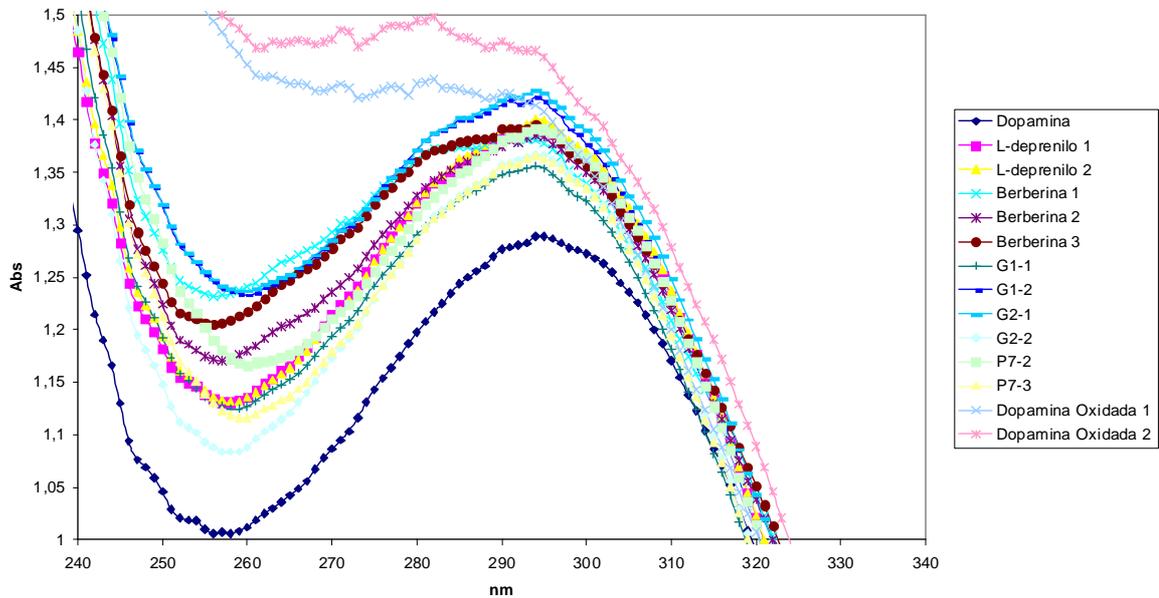


Gráfico 7 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150  $\mu\text{M}$ . Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Inhibidores: L-deprenilo 0,03  $\mu\text{M}$ ; Cloruro de berberina 98  $\mu\text{M}$ ; G1 = 8-fenildihidroberberina-13-sustituída; G2 = 8-metilidihidroberberina-13-sustituída; P7 = 13-oxo-8,13a-epidioxiberberina; G1, G2 y P7 están a concentración 100 ppm

	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio Abs	
Dopamina	1,263	--	--	1,263 $\pm$ 0,001	
Dopamina oxidada	1,336	1,394	--	1,37 $\pm$ 0,04	% inhibición
G1	1,304	1,358	--	1,33 $\pm$ 0,04	33
G2	1,371	1,319	--	1,35 $\pm$ 0,04	20
P7	1,346	1,317	--	1,33 $\pm$ 0,02	33
L-deprenilo	1,347	1,354	--	1,351 $\pm$ 0,005	
Cloruro de berberina	1,320	1,332	1,341	1,33 $\pm$ 0,01	

Tabla 12 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150  $\mu\text{M}$ . Condiciones de reacción:  $\lambda$  = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Inhibidores: L-deprenilo 0,03  $\mu\text{M}$ ; Cloruro de berberina 98  $\mu\text{M}$ ; G1 = 8-fenildihidroberberina-13-sustituída; G2 = 8-metilidihidroberberina-13-sustituída; P7 = 13-oxo-8,13a-epidioxiberberina; G1, G2 y P7 están a concentración 100 ppm

Actividad e inhibición MAO-B empleando dopamina como sustrato, inhibición de los compuestos P9, P10 y P16

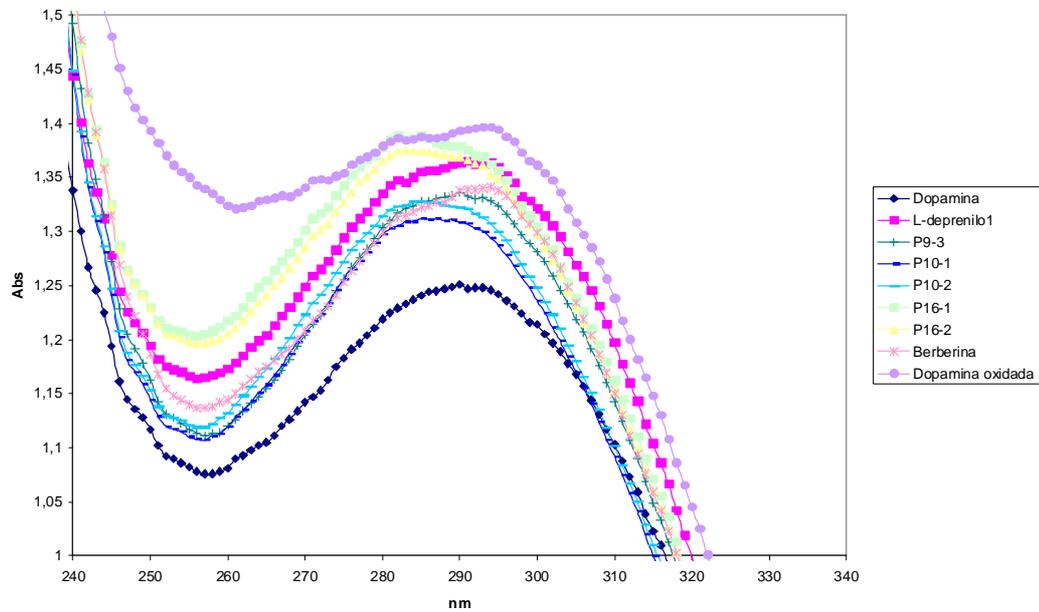


Gráfico 8 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 µM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 µg/ µL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 µM; Cloruro de berberina 98 µM; P9 = N-metiltetrahydroberberina; P10 = tetrahydroberberina N-óxido; P16 = 13-hidroxitetrahydroberberina; P9, P10 y P16 están a concentración 100 ppm

	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio Abs	
Dopamina	1,197	--	--	1,197 ± 0,001	
Dopamina oxidada	1,347	--	--	1,347 ± 0,001	% inhibición
P9	1,183	1,188	1,259	1,21 ± 0,04	91
P10	1,211	1,223	1,276	1,24 ± 0,04	73
P16	1,283	1,273	1,284	1,280 ± 0,006	100
L-deprenilo	1,305	1,265	1,225	1,27 ± 0,04	
Cloruro de berberina	1,279	--	--	1,279 ± 0,001	

Tabla 13 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 µM. Condiciones de reacción: λ = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 µg/ µL. Inhibidores: P9 = N-metiltetrahydroberberina; P10 = tetrahydroberberina N-óxido; P16 = 13-hidroxitetrahydroberberina; P9, P10 y P16 están a concentración 100 ppm

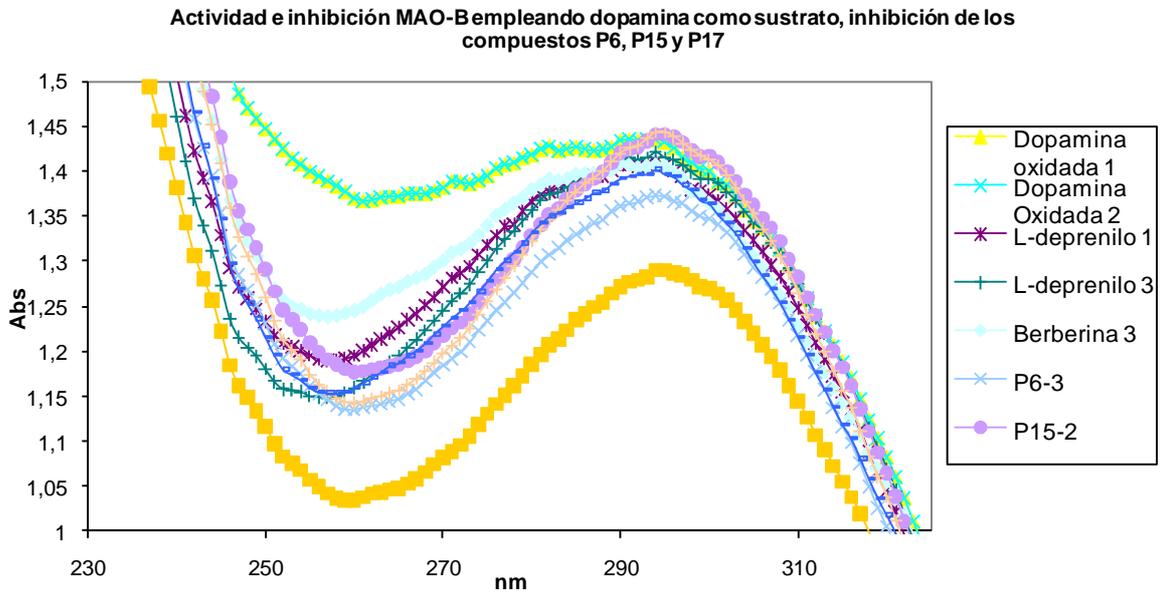


Gráfico 9 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 µM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 µg/ µL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 µM; Cloruro de berberina 98 µM; P6 = 13-berberinafenolbetaína; P15 = 13-hidroxiiberberina; P17 = 13-metildihidroberberina; P6, P15 y P17 están a concentración 100 ppm

	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio Abs	
Dopamina	1,413	1,416	1,257	1,362 ± 0,001	
Dopamina oxidada	1,385	1,385	--	1,39 ± 0,03	% inhibición
P6	1,300	1,351	1,332	1,33 ± 0,01	15
P15	1,385	1,400	1,396	1,40 ± 0,04	0
P17	1,342	1,406	1,378	1,4 ± 0,1	55
L-deprenilo	1,358	1,396	1,377	1,38 ± 0,04	
Cloruro de berberina	1,396	1,243	1,346	1,33 ± 0,04	

Tabla 14 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 µM. Condiciones de reacción:  $\lambda = 302$  nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 µg/ µL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 µM; Cloruro de berberina 98 µM; P6 = 13-berberinafenolbetaína; P15 = 13-hidroxiiberberina; P17 = 13-metildihidroberberina; P6, P15 y P17 están a concentración 100 ppm

Actividad e inhibición MAO-B empleando dopamina como sustrato, inhibición de los compuestos P19 y P23

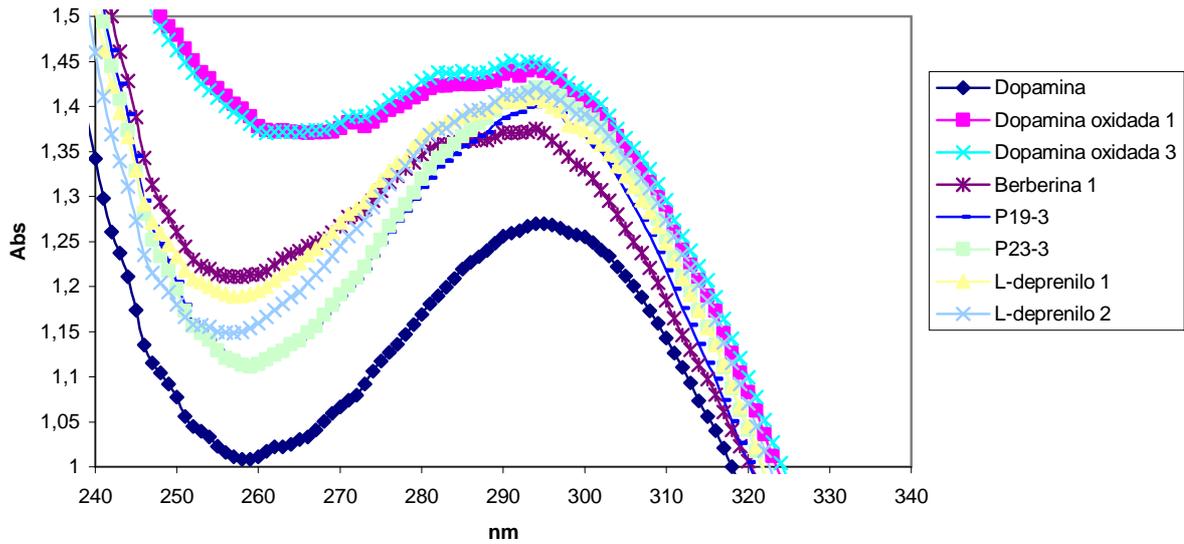


Gráfico 10 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 µM. Condiciones de reacción: 30 min, 37°C, [proteína] = 8 µg/ µL. Inhibidores: L-deprenilo 0,03 µM; Cloruro de berberina 98 µM; P19 = 13-dinitrofenildihidroberberina; P23 = 8-triclorometildihidroberberina; P19 y P23 están a concentración 100 ppm

	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio Abs	
Dopamina	1,241	--	--	1,241 ± 0,001	
Dopamina oxidada	1,391	1,369	1,403	1,39 ± 0,02	% inhibición
P19	1,467	1,414	1,350	1,41 ± 0,06	0
P23	1,323	1,307	1,376	1,34 ± 0,04	36
L-deprenilo	1,358	1,377	--	1,37 ± 0,01	
Cloruro de berberina	1,307	--	--	1,307 ± 0,001	

Tabla 15 Actividad e inhibición de MAO-B empleando como sustrato dopamina 150 µM. Condiciones de reacción: λ = 302 nm; 30 min, 37°C, [proteína] = 8 µg/ µL. Inhibidores: P19 = 13-dinitrofenildihidroberberina; P23 = 8-triclorometildihidroberberina; P19 y P23 están a concentración 100 ppm

De los 17 compuestos evaluados, 7 presentaron actividad inhibitoria considerable, comparable o incluso superior a berberina, de ellos el más sobresaliente es la tetrahydroberberina 13-hidroxitetrahydroberberina.

Compuesto	Masa (mg)	PM (g/mol)	% Actividad (%)	% Inhibición (%)
Berberina	1,10	371,8	46	54
G1	1,03	516,7	67	33
G2	1,03	501,7	80	20
P10	1,01	355,4	27	73
P12	0,99	409,4	32	68
P13	0,99	411,4	37	63
P14	1,01	407,4	23	77
P15	0,99	387,8	100	0
P16	1,03	355,4	0	100
P17	0,99	479,3	45	55
P18	1,07	353,4	58	42
P19	0,99	503,5	100	0
P2	1,00	339,4	66	34
P23	1,02	454,7	64	36
P5	0,99	351,4	88	12
P6	1,03	351,4	85	15
P7	1,01	383,4	67	33
P9	1,05	354,4	9	91

Tabla 16 Porcentajes de inhibición de los compuestos evaluados [44]

Canino y col <sup>[44]</sup> reportan que tres de los compuestos que muestran alto porcentaje de inhibición, presentan como diferencia estructural con respecto a berberina un esqueleto voluminoso con pérdida de la planaridad en los anillos B y C con lo cuál estos compuestos podrían bloquear el sitio catalítico de la enzima evitando la transformación del sustrato; asimismo, puede inferirse de los resultados obtenidos que los sustituyentes oxigenados en posición C-13 favorecen la inhibición. <sup>[44]</sup>

## Conclusiones

Se realizó el seguimiento de la actividad enzimática de MAO-B empleando bencilamina 1,5 mM como sustrato a 30 min y 37 °C por espectrofotometría de UV, obteniéndose una actividad enzimática de  $1531,3 \pm 0,2$  nmol/h\*mg a una concentración de proteína de  $8 \pm 1$  µg/µL. En la evaluación por el mismo método de la inhibición de la enzima con L-deprenilo 0,03 µM, bajo las mismas condiciones, se encontró un porcentaje de inhibición de  $32,08 \pm 0,02$  %, el cuál se encuentra en el rango del IC<sub>50</sub> reportado por la literatura.

Se logró desarrollar y evaluar la metodología para la determinación de la actividad enzimática de MAO-B por CCF empleando los agentes colorantes fucsina y azul de nilo; siendo éste último el que más se ajusta a lo requerido en la evaluación de la oxidación de bencilamina a benzaldehído por acción de la enzima. El colorante reacciona con bencilamina cambiando su coloración cambiando su coloración de azul a rojo, mientras que en presencia de benzaldehído mantiene su color azul; es posible encontrar una amplia gama de tonalidades en función de la concentración empleada de colorante y de sustrato.

Se encontró que para poder realizar una apropiada determinación de la oxidación de MAO-B sobre bencilamina en CCF los parámetros adecuados deben ser:

- Tiempo de incubación: 25 min.
- Temperatura: 37 °C.
- Concentración de la enzima:  $\frac{1}{4}$  de la concentración de proteínas, entre  $5,6 \pm 0,2$  µg/µL a  $10 \pm$  µg/µL dependiendo de la fracción aislada.
- Concentración de sustrato: 4 mM.

- Adición de albúmina sérica bovina: se encontró que con la adición de 1,6 mg de albúmina la solución enzimática se estabiliza pudiéndose observar mayor superficie de transformación de bencilamina a benzaldehído.
- Concentración de colorante: 0,5 mM.

Aunque se pudo determinar la actividad de MAO-B en CCF, no fue posible realizar la determinación de la inhibición sobre la enzima, pues MAO-B y el inhibidor no logran interactuar adecuadamente sobre la placa de CCF, apreciándose únicamente la catálisis enzimática más no la inhibición.

Estos resultados llevaron a desarrollar una nueva metodología para determinar la actividad enzimática de MAO-B por espectrofotometría de UV usando dopamina como sustrato en colaboración con Canino<sup>[44]</sup>. La determinación de la actividad enzimática se realiza al medir la transformación de la dopamina remanente de la catálisis. Los valores de absorbancia se registraron a 302 nm, considerando que el producto observado es el aminocromo (2,3-dihidroindol-5,6-diona), éste intermediario es una o-quinona cíclica derivada de la oxidación de la dopamina, presenta bandas características entre 300 y 475 nm. Se planteó la adición de NaOH al medio para provocar el corrimiento de los espectros y la medición en este rango de longitud de onda buscando poder utilizar este método para la evaluación de la actividad inhibitoria de una serie de 17 compuestos análogos a cloruro de berberina. De los compuestos evaluados, se encontró que 7 presentaron actividad inhibitoria comparable o incluso superior a berberina, de ellos el más sobresaliente es la 13-hidroxitetrahydroberberina, la cuál presenta el mayor porcentaje de inhibición.

El ensayo desarrollado presenta la ventaja reducir el consumo de reactivos para cada determinación permitiendo la evaluación de inhibidores en concentraciones más

bajas, favoreciendo el trabajo con compuestos de solubilidad. Aún así, se presenta desventaja como la baja sensibilidad del método debido a que el rango de absorbancia entre los máximos de absorción de dopamina y de su producto de oxidación es muy reducido.

## Recomendaciones

Aún cuando no fue posible la determinación de la inhibición de la actividad enzimática de MAO-B por CCF, existen evidencias que el método autobiográfico podría implementarse con cambios adecuados en la metodología; se plantea el uso de gel de poliacrilamida para entrapar la enzima. Este soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro, con lo cuál se podría solucionar el problema de interacción entre la enzima y el inhibidor.

Se plantea además, continuar la evaluación por espectrofotometría de UV de la enzima MAO-B empleando dopamina como sustrato en un rango de longitud de onda mayor a la empleada en esta investigación; evaluando otros compuestos alcaloidales de interés.

## Bibliografía

- [1] Hostettmann, K. Strategy for the Biological and Chemical Evaluation of Plant Extracts. Descargado en octubre, 2007.  
(<http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/hostettmann.pdf>.)
- [2] Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. España. Descargado en octubre, 2007. (<http://www.cun.es/areadesalud/tu-perfil/mayores/enfermedad-de-parkinson/>.)
- [3] National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Descargado en octubre, 2007. ([http://www.ninds.nih.gov/disorders/spanish/parkinson\\_disease\\_spanish.htm](http://www.ninds.nih.gov/disorders/spanish/parkinson_disease_spanish.htm).)
- [4] El Manual Merk. Décima Edición. 1999. Ediciones Harcourt, S.A.
- [5] Benito-León, J., Porta-Etessam, J., Bermejo, F. (1998). Epidemiología de la enfermedad de Parkinson. *Neurología*; **13**: 2-9.
- [6] Mohamad, H., Holger, N., Rodríguez, M., Alfonso, C, Avilán, J. (2003). Determinación de la tasa de mortalidad de la Enfermedad de Parkinson en Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas*; **111**:46-49.
- [7] Goodman, G. (1996). The pharmacological bases of therapeutics. 9° Edición. Editorial Mc Graw Hill.
- [8] Harrison, S. (2005). Efecto inhibitorio de alcaloides isoquinolínicos sobre la enzima Monoamino Oxidasa B (MAO-B). Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela.
- [9] Haefely, W., Burlad, W., Cesura, A., Kettler, R., Lorez, H. (1992). Biochemistry and pharmacology of moclobemide, a prototype RIMA. *Psychopharmacology*, **106**, 6 – 14.
- [10] Ives, J., Iem, J. (1989). Antidepressant agents. *Medical Chemistry*, **24**, 21 – 29.
- [11] Nagatsu, T. (2004). Progress in MAO in relation to genetic engineering. *Neuro Toxicology*, **25**, 11 – 20.

- [12] Fowler, J. y Logan, J. (2004). Comparison of binding of the irreversible monoamine oxidase tracers, (11C) clorgyline and (11C) l-deprenyl in brain and peripheral organs humans. *Nuclear Medicine and Biology*. **31**, 313-319.
- [13] Hubálek, F., Binda, C., Youdim, M., Li, M., Herzig, Y., Sterling, J., Edmonson, D y Matteri, A. (2004). Inactivation of purified human recombinant monoamine oxidase A and B by rasagiline and its analogues. *Journal Medicine Chemical*. **47**, 1760-1766.
- [14] Legros, H., Dingeval, M., Janin, F., Costentin, J y Bonnet, J. (2004). Toxicity of treatment associating dopamine and disulfiram for catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells: relationships with 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde formation. *Neuro Toxicology*. **25**, 365-375.
- [15] Ma, J., Yoshimura, M., Yamashita, E y Nakagawa, A. (2004). Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. *Journal of Molecular Biology*. **338**, 103-114.
- [16] Tetrad, V., Langston, T. (1989). The effect of deprenyl (selegiline) on the natural history of Parkinson`s disease. *Science*. **245**, 519-522.
- [17] Silverman, R. (2000). *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. Academic Press, ed. San Diego, California, USA.
- [18] Foye, W. (1998). *Principios de Química Farmacéutica*. 2da edición. Editorial Reverté.
- [19] Silverman, R. (1992). *The Organic Chemistry of Drugs Design and Drug Action*, Ed. Academic Press, San Diego, California, USA.
- [20] Hilman. G. (1997). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*.
- [21] Sit, S. (2000). Dopamine Agonists in the Treatment of Parkinson's Disease – Past, Present and Future. *Current Pharmaceutical Design*. **6**, 1211-1248.
- [22] Robinson, J., Bochinfuso, R., Khalil, A. (1994). Irreversible inhibition of rat liver mitochondrial MAO A and MAO B by enantiomers of deprenyl and  $\alpha$  - methylpargyline. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **47**, 324-328

- [23] Marcano, D., Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Segunda Edición. Consejo de Desarrollo Humanístico de Caracas. UCV. Caracas – Venezuela.
- [24] Dong Kong L., Cheng A. y Xiang R. (2001). Monoamine oxidase inhibitors from rhizoma of *Coptis chinensis*. *Planta Medica*, **67**, 74-76.
- [25] Lagidina, O., Nikol's, k., Faddeeva, M. (2003). Inhibition of liver mitochondrial monoamine oxidase activity by alkaloids isolated from *Chelidonium* and *Macleaya* and by their derivate drugs, *Tsitologija*, **45**, 1032-1037.
- [26] Ro, J., Lee S., Lee, K., Lee, M. (2001) Inhibition of type A monoamine oxidase by coptisine in mouse brain. *Life Sciences*, **70**, 639-645.
- [27] Bentley, K. (1995) The isoquinoline alkaloids. Quinta Edición. Editorial Harwood Academic Publishers, Volumen 1 y 2. Bangalore-India
- [28] Shamma, M., Moniot, J. (1978). Isoquinoline Alkaloids Research. Editorial Plenum.
- [29] [http://www.unedcervera.com/c3900038/quimica\\_ingenieria/cromatografia.html](http://www.unedcervera.com/c3900038/quimica_ingenieria/cromatografia.html). Descargado en noviembre, 2007.
- [30] <http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/capa-fina>. Descargado en noviembre, 2007.
- [31] Salazar, O., Furlan, R. (2007). A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, **18**: 209–212.
- [32] Rahalison L, Hamburger M, Hostettmann K, Monod M, Frenk E. (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*, **2**: 199–203.
- [33] Saxena G, Farmer S, Towers GHN, Hancock REW. (1995). Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. *Phytochemical Analysis*, **6**: 125–129.
- [34] Annis SL, Velasquez L, Xu H, Hammerschmidt R, Linz J, Trail F. (2000). Novel procedure for identification of compounds inhibitory to transcription of genes

- involved in mycotoxin biosynthesis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**: 4656–4660.
- [35] Müller MC, Dausend C, Weins C, Frimmel FH. (2004). New bioautographic screening method for the detection of estrogenic compounds. *Chromatographia*, **60**: 207–211.
- [36] Rhee IK, van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, **915**: 217–223.
- [37] Marston A, Kissling J, Hostettmann K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, **13**: 51–54.
- [38] Ramallo IA, Zacchino SA, Furlan RLE. (2006). A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochemical Analysis*, **17**: 15–19.
- [39] Holt A., Sharman D., Baker G., Palcic M. (1997). A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, **55**: 1166 – 1169.
- [40] Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. 1era edición. Editorial, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri.
- [41] Yamazaki, M., Satoh, Y., Maebayashi, Y y Horie, Y. (1988) Monoamine oxidase inhibitors from a drugs a fungus, *Emericella navahoensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **36** (2), 670-675.
- [42] Bastidas, E. (2004). Efectos de los alcaloides bencilisoquinolínicos sobre la actividad de la enzima monoamino oxidasa. Trabajo Especial de Pasantía Doctoral. Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela.

- [43] Cheronis, N. (1965). Semimicro cualitativa organic análisis: the systematic identification of organic compounds. 3<sup>o</sup>Ed. Interscience Publishers. New York.
- [44] Canino, L. (2009). Derivados semisintéticos del alcaloide berberina y sus actividades como posibles inhibidores de la enzima monoamino oxidasa. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela.
- [45] Bisaglia, M.; Mammi, S.; Bubacco, L. (2007). Kinetic and Structural Analysis of the Early Oxidation Products of Dopamine. Analysis of the interactions with  $\alpha$  – synuclein. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 282 , **21**: 15597 – 15605.

## Apéndice

Los ensayos de aislamiento enzimático y cuantificación de proteínas se realizaron en la Sección de Bioquímica Médica, Facultad de Medicina (UCV), bajo la supervisión del Prof. Freddy González – Mujica. Las determinaciones espectrofotométricas y ensayos sobre CCF, fueron realizados en el Laboratorio de Productos Naturales (Lab. 321) de la Escuela de Química, Facultad de Ciencias (UCV), bajo la supervisión de la Prof. María Rodríguez.

Materiales y equipos empleados

### Equipos

- Balanzas (Denver Instrument Company AA-200).
- Centrífuga MSE Mistral 4L.
- Centrífuga RC5C Sorvall Instruments Dupont Rotor SS34 de aluminio.
- Centrífuga Beckman Model L5-75 Ultracentrífuga rotor 30 de titanio.
- Congelador a -70°C Marca So-Low.
- Homogenizador Marca Litenin
- pH con electrodo de calomen Beckman 015-247664-A.
- Espectrofotómetro de UV al vacío Novaspec II Pharmacia LKB.
- Vortex Mixer VM-300, 115 Volt.
- DS Lab Digital Microcentrifuge Model DSC-01524SMD. Digisystem Lab Instruments Inc.
- Espectrofotómetro de UV Nicolet Evolution 300. Thermo Electron Corporation. Programa Vision Pro.

### **Materiales**

- Beakers.
- Celda de cuarzo.
- Cilindros graduados.
- Cronómetro.
- Eppendorff.
- Gradillas.
- Micropipetas de 0,2 – 20  $\mu\text{L}$ ;  
10 – 100  $\mu\text{L}$ ; 20 – 200  $\mu\text{L}$ ;  
100 – 1000  $\mu\text{L}$ ; 1000 – 5000  
 $\mu\text{L}$ .
- Pipetas pasteur.
- Puntas para micropipetas.
- Termómetro.
- Tubos de ensayo.
- Tubos para centrifugas, con  
tapas.
- Placas de sílica gel.
- Pozos de porcelana.
- Capilares

### **Reactivos químicos**

- Agua bidestilada.
- Albúmina, suero bovino 500  
 $\mu\text{g/mL}$ .
- Bencilamina.
- Benzaldehído.
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$
- Fucsina (clorhidrato de p-  
rosanilina).
- Azul de nilo.
- Bisulfito de sodio.
- Ácido clorhídrico.
- L-deprenilo.
- Cloruro de berberina.
- $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  4%(Reactivo  
Lowry A)
- 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,4 %  $\text{NaOH}$ ;  
6,16% tartrato de sodio; 1%  
SDS (Dodecil sulfato de  
sodio) (Reactivo Lowry B)
- Sacarosa.
- Reactivo Folin Ciocalteu.

### Fórmulas empleadas:

Para el cálculo de la cuantificación de proteínas:

$$\overline{X}_{\text{Albúmina}} = \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{Abs}_{\text{Albúmina}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}} \right] \quad [1]$$

$$\frac{\mu\text{g}_{\text{proteínas}}}{\mu\text{L}} = \frac{\overline{X}_{\text{Albúmina}} \cdot (\text{Abs}_{\text{MAO}} - \text{Abs}_{\text{blanco}})}{\mu\text{L}} \quad [2]$$

$$[\text{Proteínas}] = \left( \frac{\mu\text{g}_{\text{proteínas}}}{\mu\text{L}} \right) \quad [3]$$

Para el cálculo inhibición de la actividad enzimática:

$$\% \text{Inh} = \frac{\overline{\text{Abs}}_{\text{control}} - \overline{\text{Abs}}_{\text{inhibición}}}{\overline{\text{Abs}}_{\text{control}}} \times 100\% \quad [4]$$

Para el cálculo de la actividad enzimática por espectrofotometría de UV empleando bencilamina como sustrato:

$$V = \frac{\overline{\text{Abs}} \times 80 \text{nmol} \times V_{\text{Tr}}}{\text{mg} \times t_r \times \text{mL}} \quad [5]$$

$$S_V = V \cdot \sqrt{\left( \frac{\Delta_{\overline{\text{Abs}}}}{\overline{\text{Abs}}} \right)^2 + \left( \frac{\Delta_V}{V} \right)^2 + \left( \frac{\Delta_{\text{mg}}}{\text{mg}} \right)^2} \quad [6]$$

Para el cálculo de la actividad enzimática e inhibición por espectrofotometría de UV empleando dopamina como sustrato:

$$\%Act = \frac{\overline{Abs}_{inhibición} - \overline{Abs}_{dopamina}}{\overline{Abs}_{dopamina oxidada} - \overline{Abs}_{dopamina}} \times 100\% \quad [7]$$

$$\%Inh = 100\% - \%Act \quad [8]$$

Para el cálculo de errores de sumas, restas, multiplicaciones y divisiones:

$$y = a + b + c \quad [9]$$

$$\Delta y = \sqrt{\delta_a^2 + \delta_b^2 + \delta_c^2} \quad [10]$$

$$x = \frac{a \cdot b}{c} \quad [11]$$

$$\Delta x = x \cdot \sqrt{\left(\frac{\delta_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\delta_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{\delta_c}{c}\right)^2} \quad [12]$$