

00582

3  
2 ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

*PROPAGACIÓN DE LA VIDA*

**NUEVAS SÍNTESIS DE COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS;  
ESTUDIO TEÓRICO MECANÍSTICO Y PRUEBAS DE  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS (QUÍMICA ORGÁNICA)**

**PRESENTA**

**M.en C. ENRIQUE RAMÓN ANGELES ANGUIANO**

**BAJO LA DIRECCIÓN DEL:**

**DR. ROBERTO MARTÍNEZ**

**MÉXICO DF AGOSTO DE 1998**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

*264554*



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



Título de la tesis:

NUEVAS SINTESIS DE COMPUESTOS HETEROCICLICOS; ESTUDIO TEORICO  
MECANISTICO Y PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA

Grado y nombre del tutor o director de tesis:

DR ROBERTO MARTINEZ

Institución de adscripción del tutor o director de tesis:

UNAM

Resumen de la tesis: (Favor de escribir el resumen de su tesis a máquina, como máximo en 25 renglones a un espacio, sin salir de la extensión de este cuadro.)

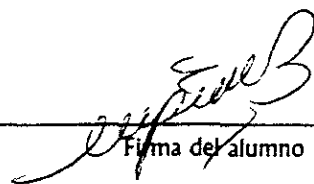
ABSTRACT

In this thesis, I describe the synthesis of heterocyclic compounds using dihydropyridines as starting material, in order to obtain indole and quiniline sistem. I used also computational tools in order to make theoretical studies of reaction mechanism in the synthesis of these compounds. The molecular modeling software that I used were UNICHEM, SPARTAN and HYPERCHEM on Silicon Graphics Workstation and CRAY Y/YMP 4/432 supercomputer. The compounds were synthesized in Medicinal Chemistry Laboratory and they were identified using spectroscopic means as Nuclear Magnetic Resonance, Mass Spectrometry, Infrared and x-ray Crystallographic.

Finally the compounds were probed in biological models as rat and mouse in order to determinate if the compounds have biological activity as antihypertensive and immunostimulant activity. I found that two of these compounda had good biological activity, so the studies will continue in order to determinate the viability of these compounds.

LOS DATOS ASENTADOS EN ESTE DOCUMENTO CONCUERDAN FIELMENTE CON LOS REALES Y QUEDO ENTERADO QUE, EN CASO DE CUALQUIER DISCREPANCIA, QUEDARÁ SUSPENDIDO EL TRÁMITE DEL EXAMEN

Fecha de solicitud: \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Firma del alumno

Acompaño los siguientes documentos:

- Nombramiento del jurado del examen de grado
- Aprobación del trabajo escrito por cada miembro del jurado
- Copia de la ultima revisión de estudios
- Comprobante de pago de derechos por registro del grado

Biblioteca del Plantel

Biblioteca Central

Entrega ejemplares de tesis

Título de la tesis:

~~NUEVAS SINTESIS DE COMPUESTOS HETEROCICLICOS; ESTUDIO TEORICO  
MECANISTICO Y PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA~~

Grado y nombre del tutor o director de tesis:

~~DOCTOR ROBERTO MARTINEZ~~

Institución de adscripción del tutor o director de tesis:

~~UNAM~~

Resumen de la tesis: (Favor de escribir el resumen de su tesis a máquina, como máximo en 25 renglones a un espacio, sin salir de la extensión de este cuadro.)

Se describe en este trabajo, la obtención de compuestos heterocíclicos por métodos antes no descritos, así como la síntesis de indoles y quinolinas a partir de dihidropiridinas. Se realiza en este trabajo además el estudio teórico mecanístico de las reacciones involucrada en la síntesis, para esto se utilizaron programas especializados (software), en modelaje molecular como UNICHEM, HYPERCHEM, SPARTAN etc, en Plataformas Silicon Graphics y en la supercomputadora CRAY YMP4/432. Los compuestos sintetizados fueron caracterizados por los métodos espectroscópicos tradicionales, y dos de los productos aislados fueron probados en modelos biológicos para determinar su actividad biológica, específicamente como antihipertensivos y como inmunoestimulantes, enontrándose una actividad buena, por lo cual los estudios continuaran con la finalidad de determinar su viabilidad como alternativa medicamentosa en padecimientos como enfermedades del miocardio y SIDA.

LOS DATOS ASENTADOS EN ESTE DOCUMENTO CONCUERDAN FIELMENTE CON LOS REALES Y QUEDO ENTERADO QUE, EN CASO DE CUALQUIER DISCREPANCIA, QUEDARÁ SUSPENDIDO EL TRÁMITE DEL EXAMEN

Fecha de solicitud: \_\_\_\_\_

  
Firma del alumno

Acompaño los siguientes documentos:

- Nombramiento del jurado del examen de grado
- Aprobación del trabajo escrito por cada miembro del jurado
- Copia de la última revisión de estudios
- Comprobante de pago de derechos por registro del grado

Biblioteca del Plantel

Entrega ejemplares de tesis

Biblioteca Central

# Agradecimientos

A la Memoria de mi padre:

***José Angeles Tinoco.*** Que donde estés te sientas orgulloso de mí.

A la memoria de mi querida hermana: ***Yola,*** por ti continuaré luchando y buscando.

Gracias a.....

A pesar de .....

Gracias a mi esposa ***Ana María Regalado Torres*** y mi madre ***María Anguiano Vda. de Angeles.***

Por Uds. he llegado hasta aquí, por su aliento, amor, entrega y sacrificio, ésto no hubiese sido posible sin su ayuda.

Gracias a mis ***queridos chamacos***

***José Alberto, Carlos Arturo y Marianita,*** por su tiempo; tiempo que no disfruté con ustedes y que espero algún día comprendan. Por su inocencia y amor incondicional, éste también es su triunfo.

Gracias a mis hermanas

***Rosa María, Rosario, Teresa y Jovita***

Por su cariño, estímulos valiosos y apoyo para continuar.

Gracias a mis hermanas

***Ma del Carmen y Marilú,*** por su apoyo.

Gracias a "Robert", ***Dr. Roberto Martínez***

***Cuautini,*** a pesar de todo lo que se presentó, te agradezco muchísimo el apoyo que me brindaste.

**Gracias a mi equipo del Laboratorio de Química Medicinal**  
**Alberto, por todo el apoyo que me brindaste**  
**Enrique, Nacho e Italo, por el esfuerzo que hacen por luchar por**  
**una causa.**

---

**Gracias a todos mis estudiantes del Laboratorio de Química**  
**Medicinal**

**Gracias al Dr. Rafael López-Castañares**  
**Cuatote, la hicimos!!**

**Gracias a los profesores: M.en C. Luisa Martínez, Dr. Andrés**  
**Romero, Dr. Edmundo Chavéz, Dra. Liliana Favari, M. en C. Sandra**  
**Díaz y a todos sus estudiantes, el apoyo que me brindaron para la**  
**consolidación de éste trabajo.**

**Gracias a la profesora Ana María Velázquez y la Dra. Sara E.**  
**Valdéz Martínez, por su apoyo incondicional.**

**Gracias a mis profesores de idiomas Nora, Silvia, Manón, Rogelio,**  
**Thelma y Marco, por su apoyo, paciencia y conocimientos**  
**transmitidos.**

**Finalmente**

**A pesar de...**

**De las piedras que algunos colocaron en mi camino y que sirvieron**  
**para fortalecer mis convicciones, también a Uds., les brindo éste**  
**logro....., que les aseguro, no será el último.**

**Se agradece de una manera especial al SEP-CONACYT, por su apoyo a través del Sistema Nacional de Investigadores que ha logrado que muchos de nosotros continuemos en la actividad académica y de investigación.**

---

**Se agradece así mismo a CRAY RESEARCH INC, DGAPA-UNAM, CONACYT, DGSCA, Facultad de Química de la UNAM y Coordinación de Investigación y Posgrado de la UAEM, por los apoyos económicos y técnicos otorgados para la consolidación de este trabajo.**

**Una mención especial a mi comité tutorial, Dr. Luis Angel Maldonado, Dr. Gustavo García de la Mora y Dr. Roberto Martínez, por sus valiosa guía en el desarrollo experimental de este trabajo.**

**Al H.Jurado, por sus comentarios y atinadas críticas al manuscrito de esta tesis.**

**Este trabajo de desarrollo en:**

**Laboratorio 1-2. Instituto de Química-UNAM**

**Laboratorio de Química Medicinal FESC-UNAM**

**Laboratorio de Inmunología FESC-UNAM**

**Laboratorio de Farmacología FESC-UNAM**

**Laboratorio de Toxicología CINVESTAV-IPN**

**Laboratorio de Visualización de la DGSCA-UNAM, con apoyo de la supercomputadora CRAY YMP 4/432.**



## **Reflexión**

**Había una vez un pescador exactamente en la línea limítrofe entre nuestro país y Estados Unidos, quién capturaba cangrejos y tenía dos recipientes en donde colocaba dichos crustáceos. Uno de ellos del lado americano, tapado y otro del lado mexicano, destapado. Un curioso le preguntó la razón por la cual el recipiente del lado americano estaba tapado, mientras que el que se encontraba del lado mexicano estaba destapado, al cual él contestó: " Aha! porque los cangrejos americanos se trepan entre sí hasta alcanzar la orilla y salirse." A esta respuesta el curioso replicó: " y que los del lado mexicano no se salen?" No! porque cuando están a punto de llegar a la orilla, no falta algún cangrejo que le jale la pata".**

**Cuando en nuestro País no exista ésto, ese..., ese día,**

**México será otro!**

**....you may say I´m a dreamer, but, I´m not the only one....**

**Imagine J.Lenon**

# ***El Honorable Jurado***

**PRESIDENTE**

*DR. LUIS ANGEL MALDONADO GRANIEL*

---

**PRIMER VOCAL**

*DR. GUSTAVO GARCÍA DE LA MORA*

**SEGUNDO VOCAL**

*DR. HÉCTOR SALGADO ZAMORA*

**TERCER VOCAL**

*DRA. BÁRBARA GORDILLO*

**SECRETARIO**

*DRA. OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ*

**PRIMER SUPLENTE**

*DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA*

**SEGUNDO SUPLENTE**

*DR. MARIO ORDOÑEZ PALACIOS*

***FACULTAD DE QUÍMICA***

***CIUDAD UNIVERSITARIA***

***MÉXICO DF***

***AGOSTO DE 1998***

# INDICE

<i>Introducción</i>	1
<hr/>	
<i>Generalidades</i>	3
I.- Modificaciones de la Síntesis de Hantzsch	3
II.- Aplicación de los Métodos Teóricos en la Predicción de mecanismos de Reacción	9
<i>Parte Experimental</i>	12
Reacción de Hantzsch	13
Reacción de Dihidropiridinas con SnCl <sub>2</sub> en medio ácido	21
<i>Discusión</i>	25
Parte Química	25
Parte Teórica, Estudio Teórico-Mecanístico	40
Parte Biológica	61
<i>Conclusiones</i>	75
<i>Bibliografía</i>	76
<i>Apéndice, Espectroscopía</i>	80

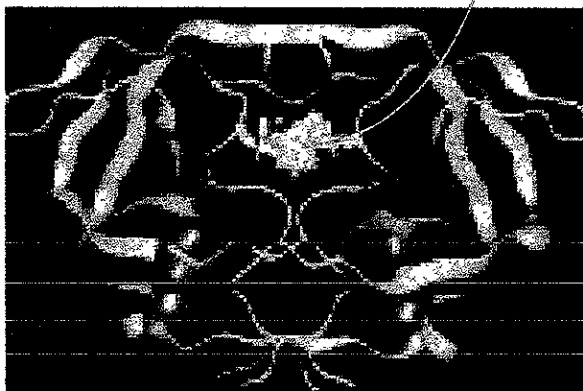
# NUEVAS SÍNTESIS DE COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS; ESTUDIO TEÓRICO MECANÍSTICO Y PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

## **Introducción:**

En la actualidad, los fármacos utilizados son producto del esfuerzo conjunto de varios grupos de investigación multi e interdisciplinarios, los cuales entre otros involucran químicos, farmacólogos, toxicólogos, inmunólogos y médicos. Esto representa un gasto de millones de dólares para la obtención de nuevos fármacos, por lo que cualquier técnica que la optimice y racionalice, es bienvenida. Por esto, hoy en día es necesario establecer una comunicación entre la comunidad científica en campos que tradicionalmente se encuentran aislados, tales como la química, la farmacología, la toxicología y la medicina, con la finalidad de tener un panorama amplio de un problema común: el desarrollo de nuevas alternativas farmacéuticas. La rama que reúne a las diferentes especialidades es la Química Medicinal, que ha sido considerada fundamental en el desarrollo de nuevos medicamentos alternativos. Sin duda alguna en este proceso de descubrimiento de nuevas estructuras químicas con actividad biológica es de gran importancia, la presencia del químico en el desarrollo y síntesis de sustancias químicas, auxiliado de las técnicas espectroscópicas tradicionales, así como de sistemas de predicción teórica de algunas de las propiedades fisicoquímicas de dichos compuestos, el cálculo de desplazamientos químicos en RMN de hidrógeno y carbono-13. Algunos ejemplos importantes de este tipo de investigaciones han sido descritos en revistas especializadas como el *Journal of Medicinal Chemistry*, *QSAR*, *Theochem*, tanto por grupos de investigación netamente académicos, como por compañías farmacéuticas líderes, como UPJOHN, MERCK, entre otras.<sup>1</sup> Esto muestra que la tendencia a nivel mundial es la investigación inter y multidisciplinaria para el descubrimiento de principios activos alternativos, con mayor potencia, selectivos, y menos tóxicos.<sup>2</sup> Ejemplos interesantes de como se aplica la nueva tecnología para el descubrimiento de nuevos fármacos es el descubrimiento de una sustancia

responsable de unir a la célula con el virus HIV. Mediante el conocimiento de la estructura cuaternaria de la enzima, el uso de computadoras y software especializado, investigadores de estos laboratorios lograron “diseñar” un inhibidor de la enzima,<sup>3</sup> como se muestra en la figura 1.

## Compuesto Experimental



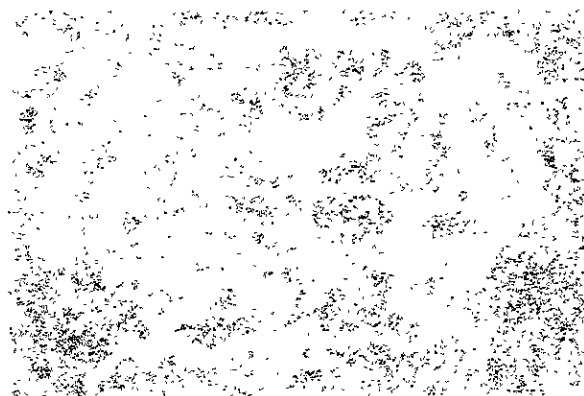
**Figura 1.- Estructura de la proteasa del virus HIV, que contiene el “inhibidor” en el centro.**

En la figura 1 se puede observar como en la enzima, el compuesto que se diseñó, “encaja” en una de sus zonas, inhibiendo su actividad y por lo tanto el virus pierde la capacidad de infectar a células sanas.

Es así que el objetivo de este trabajo consiste en presentar la obtención de compuestos heterocíclicos por métodos antes no descritos, proponer los posibles mecanismos que expliquen su y aplicar métodos teóricos utilizando software especializado, que refuercen o eliminen alguna de las proposiciones, así como la asignación de señales en RMN de hidrógeno y carbono 13. Además se presentarán los resultados de la actividad biológica de dos de los compuestos sintetizados, la *2-metil-3-etoxicarbonil-4-etoxicarbonilmetil-6-(2-hidroxi-5-nitrofenil) piridina ( compuesto 8 )*, el cual muestra actividad como antiarrítmico y antihipertensivo y el *3-(2-oxopropil)-1H-indol-2-carboxilato de etilo ( compuesto 9 )*, que mostró en estudios preliminares actividad como inmunoestimulante.

... ..

... ..



... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

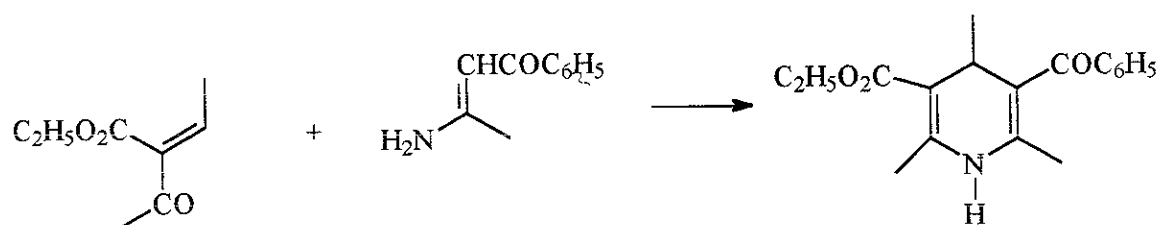
... ..

... ..

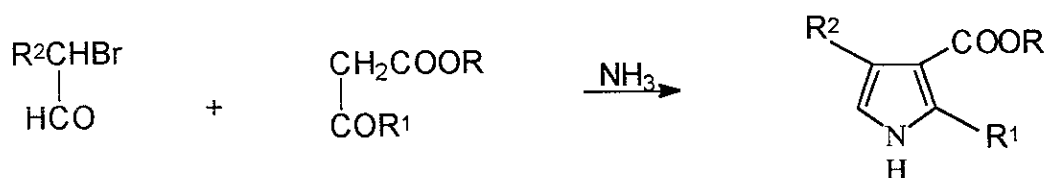
# GENERALIDADES

## I.- MODIFICACIONES DE LA SÍNTESIS DE HANTZSCH

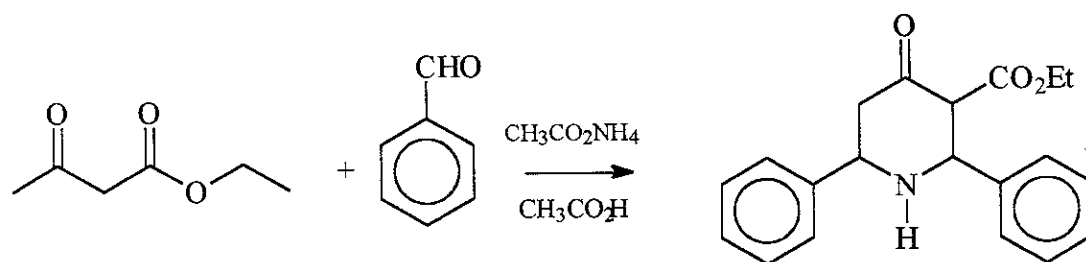
Desde que la síntesis original de Hantzsch<sup>4</sup> fue descubierta, ésta ha sufrido varias modificaciones, siendo las más comunes las realizadas en la materia prima o reactivos, algunos ejemplos de este tipo de modificaciones son las llevadas a cabo por Baeyer y después por Knoevenagel, quienes utilizaron un alquilidenos o arilidenos 1,3-dicarbonílicos y compuestos β-aminocarbonílico α,β insaturados para generar 1,4-dihidropiridinas asimétricas.<sup>5</sup>



Esta reacción se ha adaptado para la síntesis de algunos pirroles, utilizando α-halo aldehídos o cetonas.<sup>6</sup>



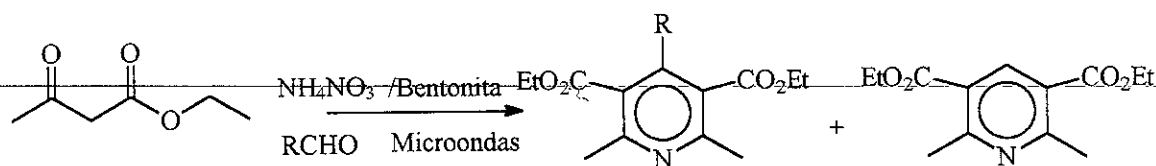
Modificando la fuente de nitrógeno y el medio de reacción, también es posible obtener 4-piridonas.



Una de las modificaciones más recientes a las condiciones de reacción de Hantzsch es el

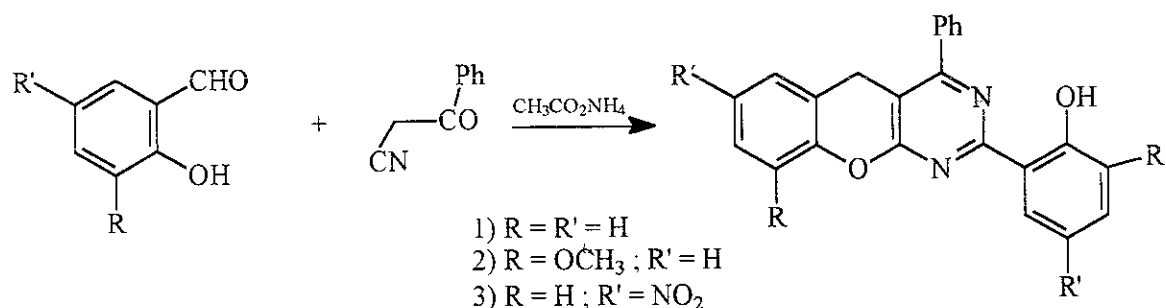
uso de energía de microondas en ausencia de disolvente y utilizando a la bentonita como catalizador

Es importante mencionar que en esta modificación no se logró aislar de las 1,4-dihidropiridinas<sup>7</sup> sino que se obtuvieron directamente las correspondientes piridinas.

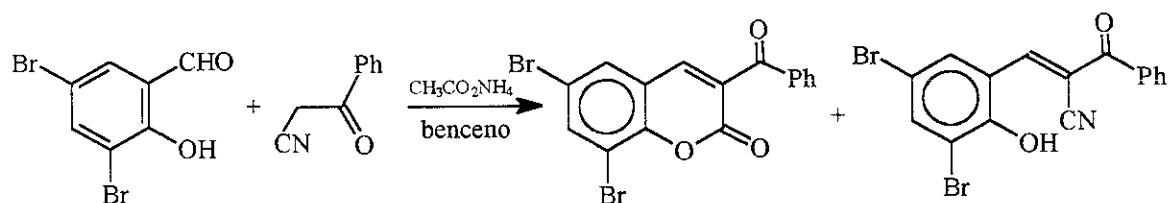


R=H, Me, Pr, *t*-Pr, Fenilo

Otros ejemplos de reacciones de Hantzsch modificadas donde se obtuvieron productos diferentes a las dihidropiridinas son:

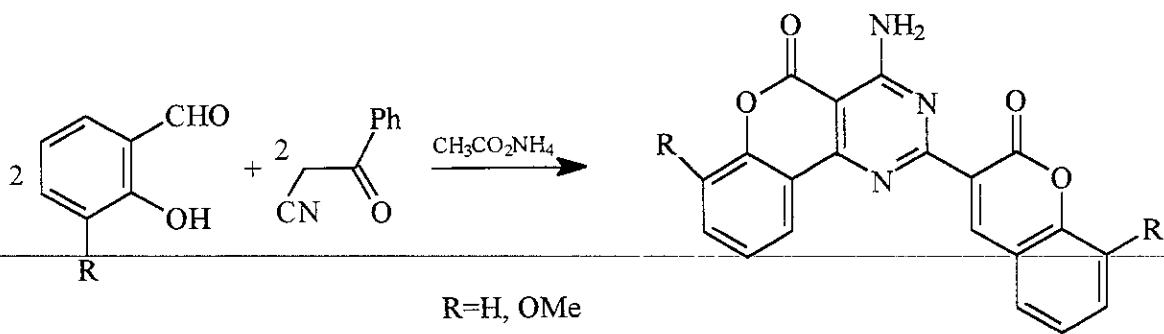


Ref 8

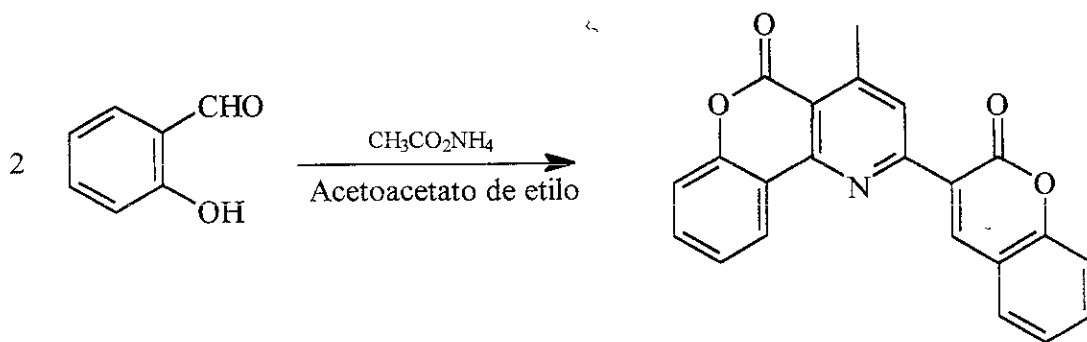


Ref 8

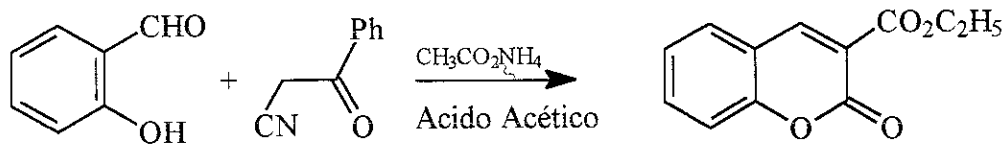




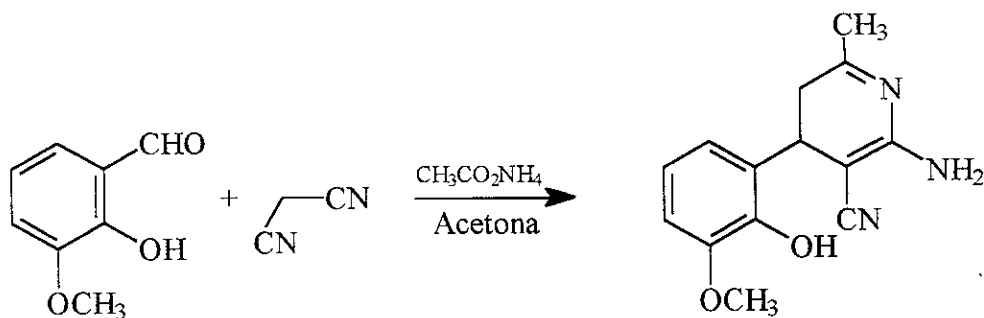
Ref 8



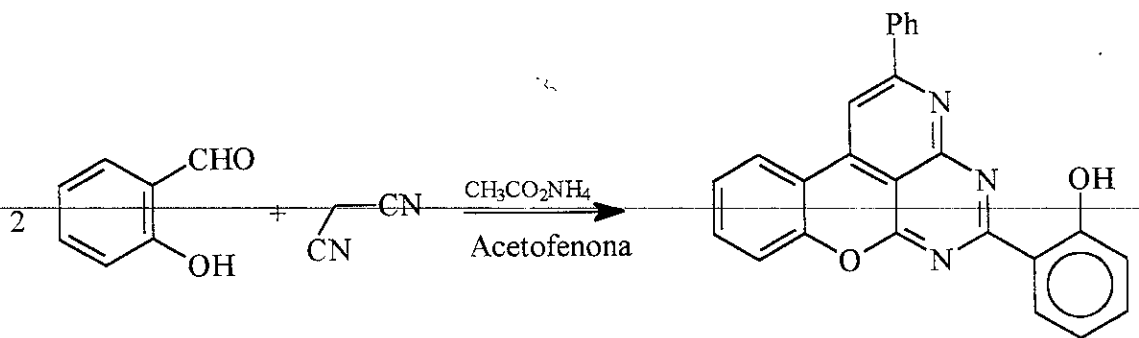
Ref8



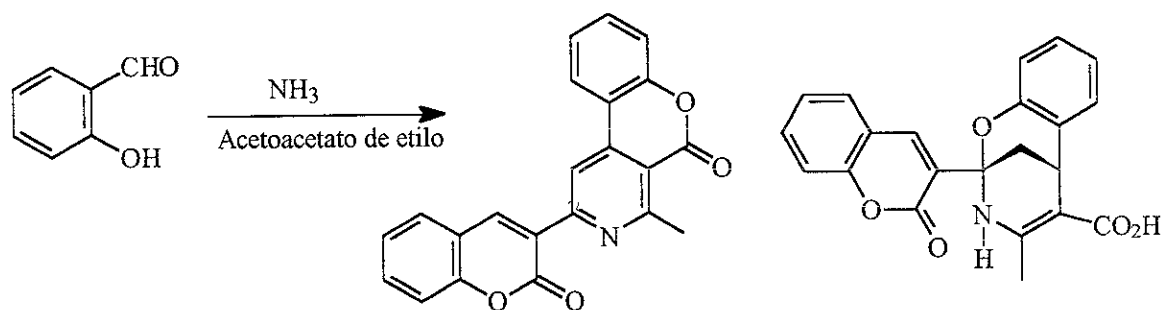
Ref 8.



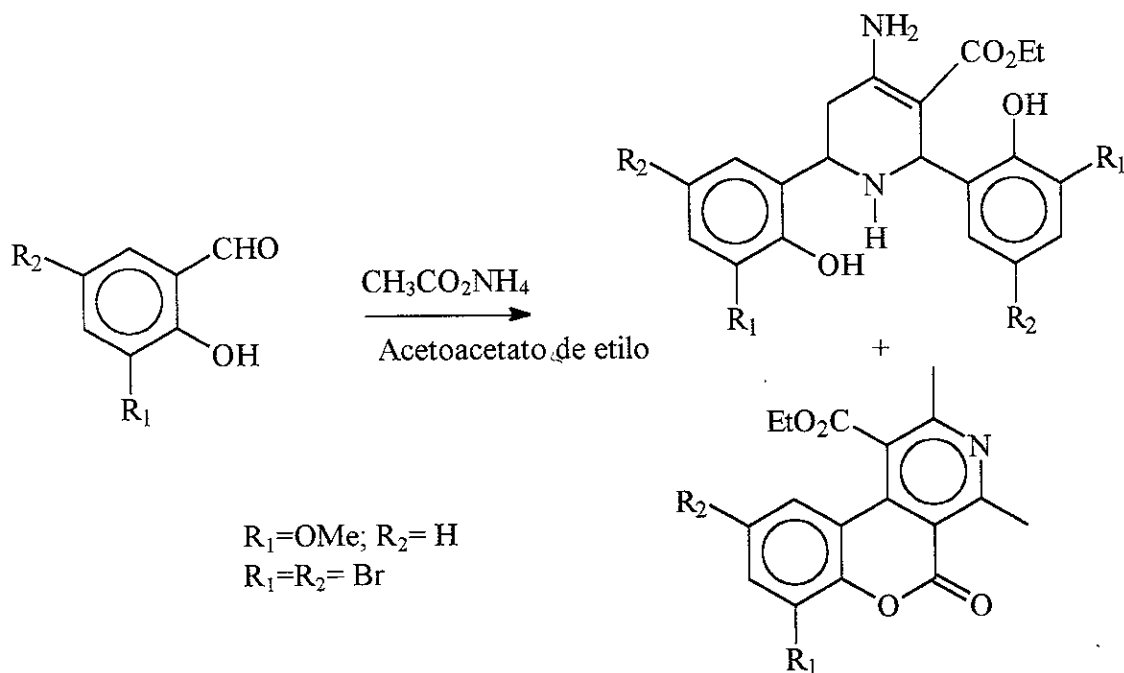
9a



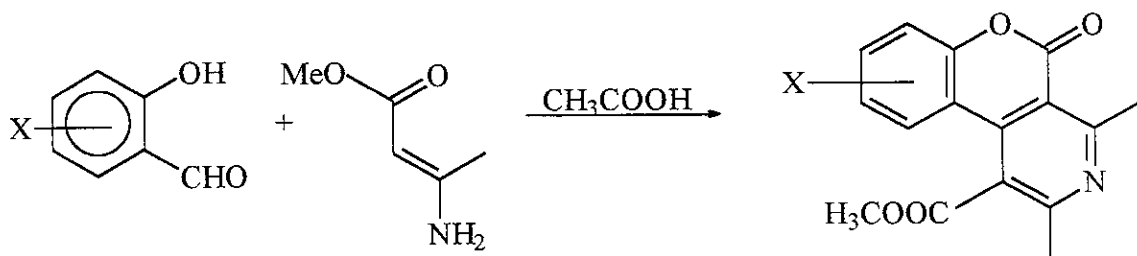
9b



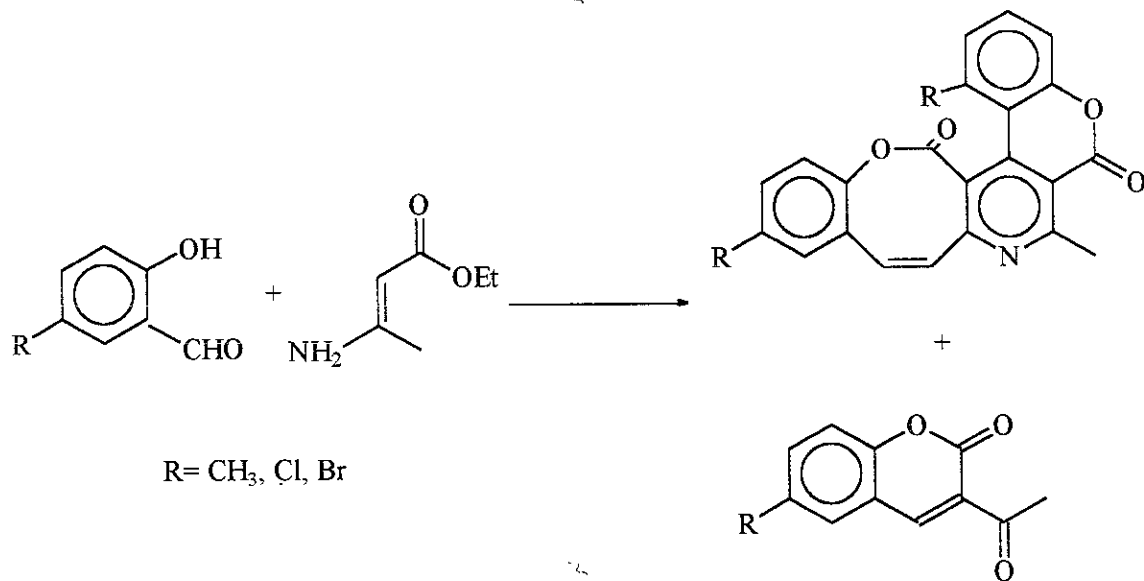
Ref 10



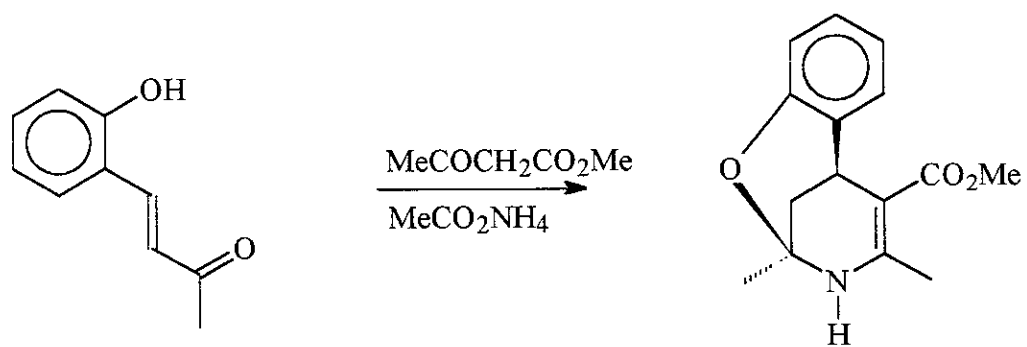
Ref. 11



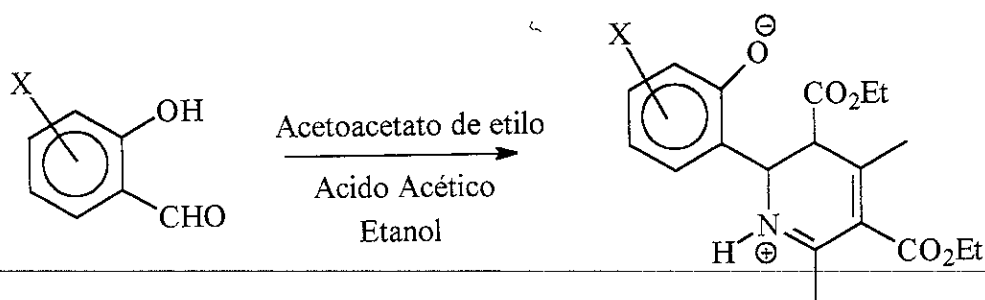
Ref. 12



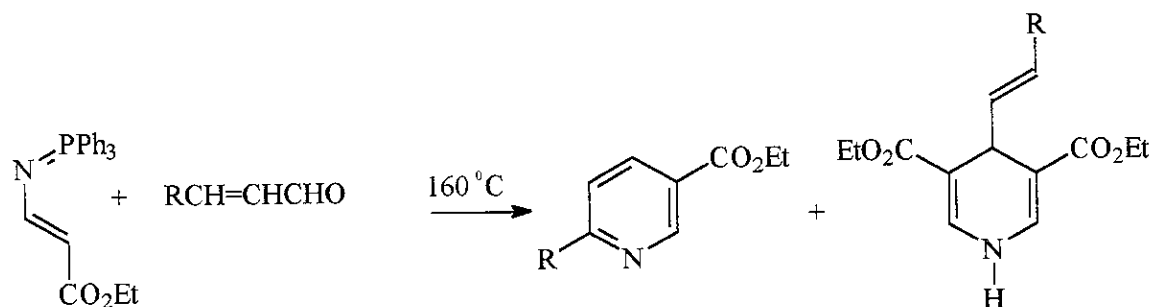
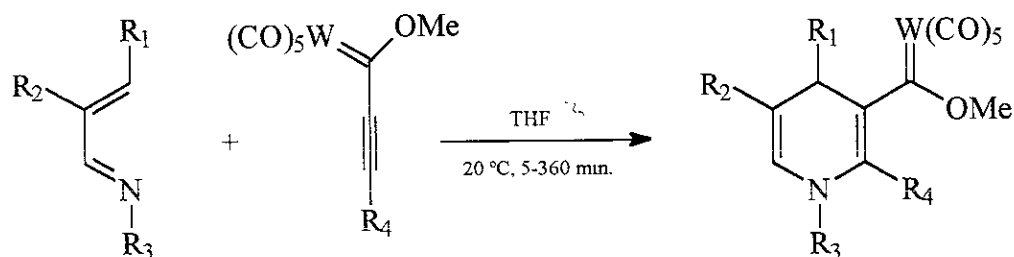
Ref. 13



Ref. 14



Así mismo, tenemos algunos ejemplos de síntesis de dihidropiridinas utilizando una metodología diferente a la tradicional.<sup>16,17</sup>



R= Fenilo, 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 2-O<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 2-H<sub>3</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, H

Hasta el momento, la síntesis de dihidropiridinas por diferentes métodos, continua vigente como una vía ventajosa para la obtención de compuestos con actividad antihipertensiva y los últimos reportes en donde se involucra este tipo de reacción muestran el uso de la química combinatoria<sup>18</sup> para la obtención de dihidropiridinas.<sup>19</sup>

## II.- Aplicación de los métodos teóricos en la predicción de mecanismos de reacción

En la última década, el acceso a poderosas computadoras ha facilitado el uso combinado de teoría y gráficos computacionales para entender y predecir estructuras moleculares, catálisis enzimática, proposición de la relación estructura-actividad y justificación de mecanismos de reacción, entre otros.

El modelado molecular usa la química computacional combinada con programas gráficos, con el objeto de beneficiarse de la siguiente información: 1) generación de la estructura molecular; 2) manipulación y análisis de las estructuras; 3) desarrollo de un modelo y 4) predicción de las propiedades estructurales, fisicoquímicas y biológicas. Una vez que se ha provisto al programa con la información sobre la conectividad y aspectos conformacionales de la molécula a modelar, la determinación de su geometría, se puede realizar con diferentes métodos que comprenden desde la mecánica molecular hasta la mecánica cuántica, los cuales tienen la capacidad de proveer información estructural con mucha precisión.

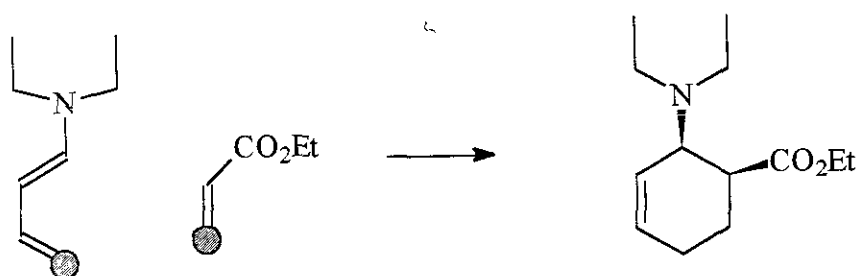
En el desarrollo de un modelo que explique el mecanismo de una reacción, se debe tomar en cuenta el ordenamiento tridimensional de los grupos esenciales, los cuales se transforman durante la reacción. La proposición de este modelo, así como la presentación espectacular de los gráficos generados por la computadora en donde se muestran las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, así como también sus interacciones potenciales, están basadas en la química teórica. Se han establecido dos protocolos computacionales que son usados para resolver problemas estructurales: aquellos basados en la mecánica molecular y los que se basan en la química cuántica.

Un procedimiento frecuentemente usado para comparar un conjunto de moléculas flexibles, es el uso de un análogo rígido y plegar las demás moléculas para ajustarlas a esta. Si todas las moléculas fueran flexibles, generalmente la elección de una conformación base puede resultar en una superposición arbitraria, ya que la conformación reactiva no es necesariamente la de mínima

energía como es el caso de la reacción de Diels Alder. En base a esto último, es importante mencionar que en el uso de métodos teóricos para la explicación de un mecanismo de reacción, es importante la participación de especialistas en química orgánica, quienes podrán compartir su experiencia adquirida a partir de los resultados experimentales, con los especialistas en química computacional.

Los conceptos básicos sobre la reactividad química pueden ser explicados de una manera simplista en la mayoría de los casos, como una interacción nucleófilo-electrófilo, lo que conduce invariablemente a la aplicación de la teoría de los orbitales frontera, la cual ha sido incorporada al concepto de reactividad molecular.<sup>20</sup> Es así que de acuerdo a la teoría de la conservación de la simetría orbital, los orbitales HOMO ( Highest Occupied Molecular Orbital) y del LUMO ( Lowest Unoccupied Molecular Orbital), son utilizados para explicar el mecanismo de reacciones orgánicas, que suceden, como es el caso de las reacciones pericíclicas.<sup>21</sup> Mediante diagramas de correlación se puede asignar a cada uno de los átomos de los reactivos, la contribución a los orbitales frontera de tal manera que la forma de acercamiento, está regida por dichas contribuciones. Así, cuando el valor de la contribución atómica en el orbital HOMO es negativo, implica un carácter nucleofílico en la especie, mientras que si este es positivo, su comportamiento es, por el contrario, electrofílico, explicándose así el acercamiento de los núcleos reactivos en los reactantes.

Un ejemplo de la aplicación de esta teoría<sup>22</sup> se muestra en el siguiente esquema:



Esta es una reacción típica  $[4\pi+2\pi]$  de tipo Diels-Alder, donde los átomos marcados contribuyen mayoritariamente a los orbitales frontera, siendo el dieno la entidad que contribuye más al HOMO o sea el agente nucleofílico, mientras que el dienófilo contribuye más al LUMO, comportándose como la entidad electrofílica y de esta manera se explica la formación del producto principal.

En materia de cómputo, hoy en día con los avances tecnológicos es posible analizar

características moleculares más rápido en sistemas complejos y de esta manera proponer no sólo rutas mecanísticas sino interacciones catalíticas y relación estructura química-actividad biológica, en base a los resultados obtenidos tanto en el laboratorio como por métodos teóricos.

---

## Parte Experimental

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. Los espectros de IR se determinaron en un equipo Nicolet FT-55X. Los espectros de RMN de hidrógeno (200 MHz) y de Carbono-13 (50 MHz), se obtuvieron en equipos Varian-Gemini-200 y Varian-VXR-300S, los espectros de masas en un equipo Jeol-SX-100 y la cristalografía de rayos-X fue determinada en un difractor Nicolet-R3m.

Los estudios teóricos fueron realizados en una estación de trabajo *Silicon Graphics* Indigo 2, utilizando el programa PIMMS<sup>23</sup> cuyo campo de fuerza COSMIC se basa en principios de mecánica molecular. En una segunda etapa las moléculas fueron optimizadas utilizando el método semiempírico MOPAC Ver 6.0<sup>24</sup> en los programas Spartan Ver 5.0,<sup>25</sup> Hyperchem Ver 5.01<sup>26</sup> y UNICHEM Ver 4.01,<sup>27</sup> apoyándose en la supercomputadora CRAY YMP 4/432. Los cálculos teóricos como: calores de formación, densidades electrónicas, orbitales HOMO-LUMO, momento dipolar fueron obtenidos de las moléculas en su geometría más estable con excepción de la reacción de adición  $[4\pi+2\pi]$ , en donde la conformación del dieno usada para el cálculo fue la *s-cis*. Los cálculos de los desplazamientos químicos de algunas de las estructuras en estudio, fueron realizados utilizando el programa ACD/LABS.<sup>28</sup>

Esta parte los resultados se presentan de acuerdo a la siguiente clasificación:

### I.- Reacción de Hantzsch

- a) Con 2-nitrobenzaldehído
- b) Con 2-nitro-5-hidroxibenzaldehído
- c) Con 2-hidroxi--5-nitrobenzaldehído

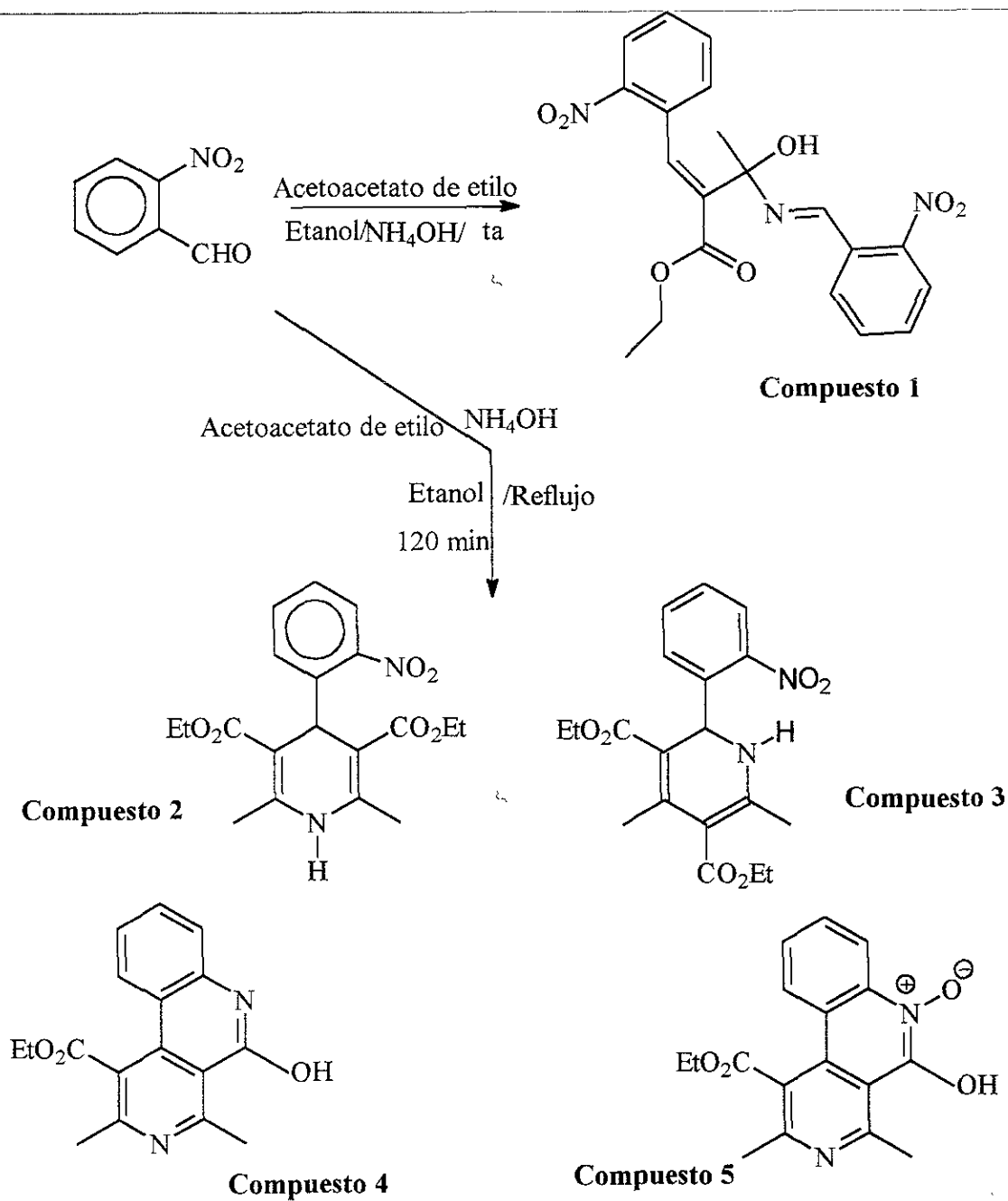
### II.- Reacción de dihidropiridinas con cloruro estanoso en medio ácido.

- a) De 1,4-dihidropiridinas a indoles
- b) De 1,2-dihidropiridinas a quinolinas



# I.- Reacción de Hantzsch

a) 2-nitrobenzaldehído (Esquema I).- Se presenta un resumen de los productos obtenidos en esta reacción.

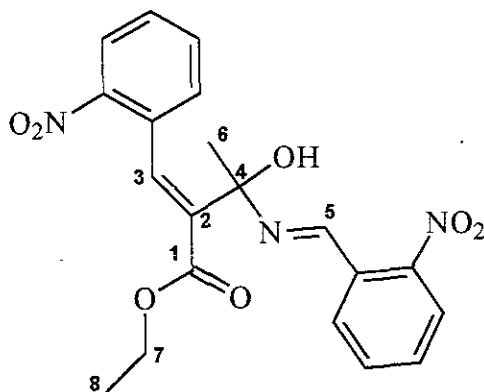


ESQUEMA 1

**(E)-2-(1-hidroxi-1-((E)-1-(2-nitrofenil)metilidenamino)etil)-3-(2-nitrofenil)-2-propenoato de etilo (compuesto 1).**

**Condiciones de temperatura ambiente.** Se colocaron 5 g (33 mmol) del 2-nitrobenzaldehído en etanol (50 mL), y se adicionaron gota a gota a una solución de 8.6 g (66 mmol) de acetoacetato de etilo y un exceso de hidróxido de amonio (20 mL al 30 %). Un vez terminada la adición y después de 30 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción, observándose la aparición de un precipitado, el cual fue separado por filtración a vacío y lavado con acetato de etilo y posteriormente con acetona. El producto de color amarillo tiene un pf de 174-176 °C, únicamente soluble en DMSO, rendimiento del 42% (2.20 gr.), con materia prima recuperada.

Espectroscopia-IR (pastilla, KBr):  $\nu$  cm<sup>-1</sup> 3329 (O-H), 3030 (C<sub>sp2</sub>-H), 2980 (C<sub>sp3</sub>-H), 1605 (C=O), 1534 (C=N). RMN-<sup>1</sup>H (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D, 200 MHz)  $\delta$  9.60 (s, 1H, OH, asociado), 8.82 (s, 1H, H5), 8.20-7.11 (m, 9H, H aromáticos y H3), 6.05 y 5.90 (s, OH libre), 3.85 (q, J=7.6 Hz, 2H, H7), 2.80 (s, 3H, H6), 0.57 (t, J=7.6 Hz, 3H, H8); RMN-<sup>13</sup>C (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D, 50 MHz)  $\delta$  178.4 (C1), 162.3 (C5), 146.8 (C-base de grupo nitro), 138-124 (C-sistema aromático), 92.2 (C4), 21.8 (C6), 12.6 (C8); E. Masas, IE, m/z (%): M<sup>+</sup> 413 (5), 397 [M-16] (4), 395 [M-18] (40), 368 [M-45] (15), 321 (100).

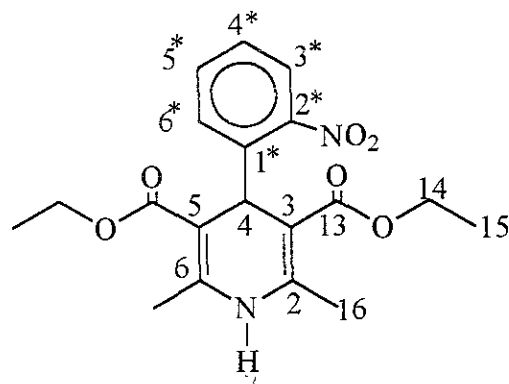


**Compuesto 1**

**Condiciones de reflujo.-** Se colocaron en un matraz redondo de 250 mL, 10 g (66 mmol) del 2-nitrobenzaldehído en 60 mL de etanol, 17.2 g (122 mmol) de acetoacetato de etilo y un exceso de hidróxido de amonio (30 mL al 30 %). A diferencia del caso anterior, la mezcla de reacción se mantuvo por 2 h a reflujo y se trabajó de manera convencional, aislando 4 compuestos sólidos: la 1,4-dihidropiridina como producto principal (**Compuesto 2**) en un rendimiento del 35% y otros tres,

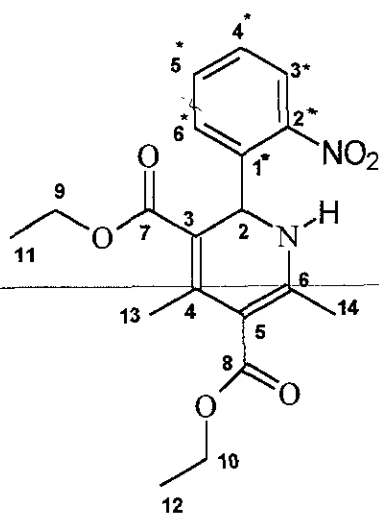
en rendimientos del 20 % del **Compuesto 3**, 15% del **Compuesto 4** y 20% del **Compuesto 5**.

**4-(2-nitrofenil)-2,6-dimetil-1,4-dihidro-3,5-piridinildicarboxilato de dietilo (Compuesto 2)**. Pf 122-124 °C ( Lit<sup>29a</sup>119-120 °C), IR (pastilla, KBr):  $\nu$  cm<sup>-1</sup> 3328 (N-H), 3091 (C<sub>sp<sup>2</sup></sub>-H), 2.978 ( C<sub>sp<sup>3</sup></sub>-H ), 1695, 1677 ( C=O); RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , 7.75-7.15, (m, 4H, C-H aromáticos), 6.12 ( s, 1H, N-H ), 5.8 (s, 1H, H<sub>4</sub> ), 4.0 (q, J=7.4 Hz, 4H, CH<sub>2</sub> éster), 2.28 (s, 6H, C16), 1.12 ( t, J=7.4 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>, éster ). RMN-<sup>13</sup>C ( 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$ , 168.5 (C=O), 148.2 (C2\*), 145.0 (C2), 143.3 (C1\*), 133.0 (C5\*), 131.8 (C6\*), 127.5 (C4\*), 124.0 (C3\*), 104.1 (C3), 60.2 (C14), 35.0 (C4), 20.2 (C16), 14.0 (C15); E. Masas, IE, m/z (%) : M<sup>+</sup> 374 ( 15 ), 358 ( 20 ) [ M-O ], 357 ( 100 ) [ M-OH], 298 (45).



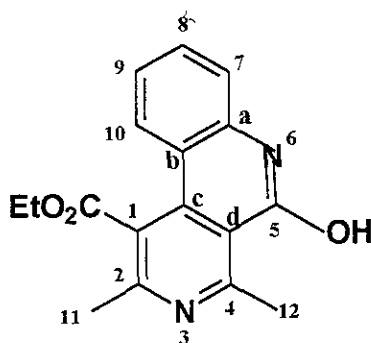
**Compuesto 2**

**4,6-dimetil-2-(2-nitrofenil)-1,2-dihidro-3,5-piridinildicarboxilato de dietilo, (Compuesto 3)**. Pf 158-160°C . IR (película) (  $\nu$  cm<sup>-1</sup>), 3450 (NH), 1710 (C=O), 1650 (C=O); RMN-<sup>1</sup>H. ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.29-7.35 (m, 4H, sistema aromático), 4.35 (q, J=7.4 Hz, 2H, H10), 4.09 (q, J=7.4 Hz, 2H, H9), 2.51 (s, 3H, H13), 2.21 (s, 3H, H14), 1.65 (s, 1H, NH), 1.35 (t, J=7.4 Hz, 3H, H11); 0.95 (t, J=7.4 Hz, 3H, H12); RMN <sup>13</sup>C, 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , 166.3 (C=O, C7), 164.0 (C=O, C8), 122-140 (C-aromáticos) 62.0 (C2), 61.0 (C9, C10), 31.0 (C13), 27.2 (C14), 14.2 (C11), 13.4 (C12).



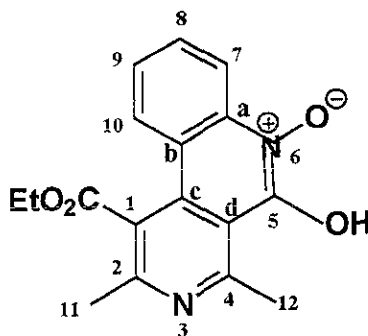
**Compuesto 3**

**5-hidroxi-2,4-dimetilbenzo[*c*][3,6]naftiridinil-1-carboxilato de etilo. ( Compuesto 4 ).** Pf 175-177 °C, Espectroscopía: Ir (KBr) ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>), 3450 (OH), 1720 (C=O); RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , 11.60 (s, 1H, O-H), 7.80 (d, J= 7.7 Hz, 1H, H-10). 7.50 (m, 2H, H-9, H-8), 7.10 (dd, Hz, J= 7.7 Hz, 1H, H7), 4.50 (q, J= 8.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.50 (s, 3H, H12), 3.10, 2.59 (s, 3H, H11), 1.38 (t, J= 8.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); RMN-<sup>13</sup>C ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , DEPT 8 carbonos protonados, ( 4 metinos, 1 metileno, 3 metilos ), 170.3 (C=O), 162.0 (C4), 161.3 (C-a), 155.3 (C5), 139.0 (C2), 138.8 (C-c), 131.2 (C8), 125.3 (C7), 121.4 (C9), 117.0 (C1), 116.1 (C10), 114.2 (C-d), 113 (C-b), 61.7 (CH<sub>2</sub> éster), 27.0 (C12), 22.4 (C11), 13.4 (CH<sub>3</sub>- éster); E. Masas, FAB m/z (% ), C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> , (M+1=M\*), 297 ( 100 ), 267 (24) [M\*-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>] 251 ( 94 ) [M\*-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>].



**Compuesto 4**

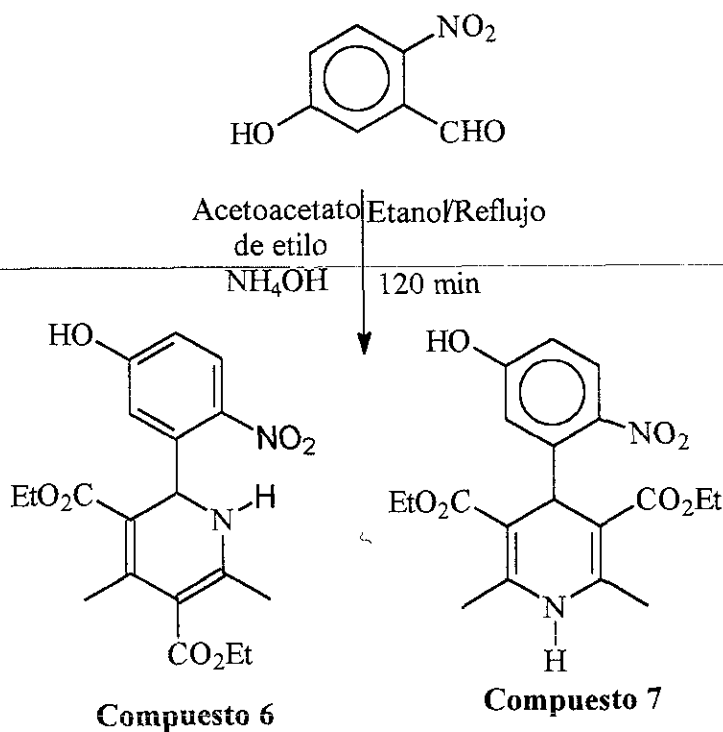
**N-óxido de 1-(etoxicarbonil)-5-hidroxi-2,4-dimetilbenzo[c][3,6]-6-naftiridina, (Compuesto 5)**. Pf 160-164 °C, IR (KBr) ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>), 3400-2400 (OH), 1710 (C=O); RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , 10.87 (s, 1H, O-H), 7.95 (d, J= 8 Hz, 1H, H7), 7.87 (d, J= 8 Hz, 1H, H10), 7.70 (dd, J= 1.1 Hz, J= 8 Hz, 1H, H9), 7.23 (dd, J= 1.1 Hz, J= 8 Hz, 1H, H8), 4.45 (q, J= 8.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.20 (s, 3H, H12), 2.70 (s, 3H, H11), 1.40 (t, J= 8.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); RMN-<sup>13</sup>C ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , 170.3 (C=O), 162.7 (C4), 156.5 (C-a), 155.6 (C5), 137.5 (C2), 134.6 (C-c), 132.2 (C8), 126.0 (C9), 122.9 (C10), 121.0 (C1), 117.0 (C-d), 114.6 (C7), 113.2 (C-b), 62.4 (CH<sub>2</sub> éster), 27.1 (C12), 23.2 (C11), 13.9 (CH<sub>3</sub>- éster) DEPT 8 carbonos protonados, (4 metinos, 1 metileno, 3 metilos ), E. Masas, FAB, m/z ( % ), C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, (M+1=M\*), 313 (3.3), 296 (91) [M\*-16], 251 (100) [M\*-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]



**Compuesto 5**

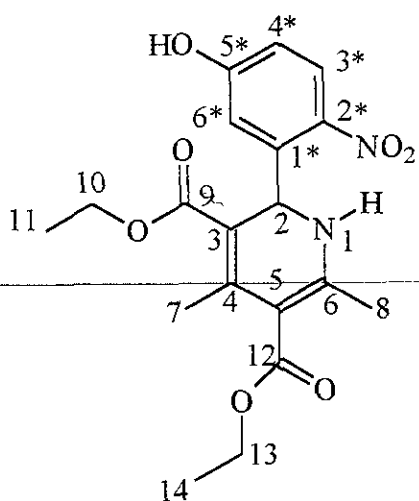
**b) Con 2-nitro-5-hidroxibenzaldehído .**

5 g del aldehído (30 mmol), en 50 mL de etanol, 7.8 g de acetoacetato de etilo ( 60 mmol) y 25 mL de hidróxido de amonio, se colocaron en un matraz redondo de 250 mL. La mezcla se mantuvo a reflujo por espacio de 2.0 h. La mezcla de reacción se trabajó de manera convencional, aislando 2 productos cristalinos, uno de ellos en un rendimiento del 20% y que corresponde a la 1,2-dihidropiridina (**Compuesto 6**) y el otro, en un rendimiento del 48%, de la 1,4-dihidropiridina (**Compuesto 7**) (Esquema II).



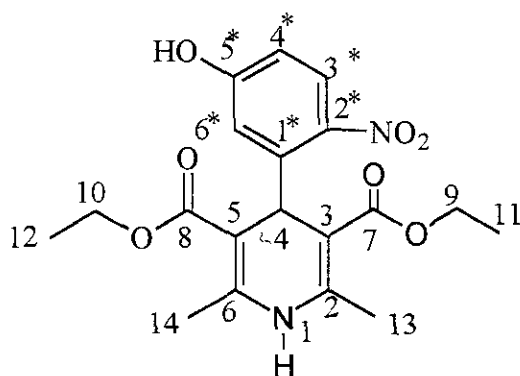
**Esquema II**

**4,6-dimetil-2-(5-hidroxi-2-nitrofenil)-1,2-dihidro-3,5-piridinilcarboxilato de dietilo, (Compuesto 6).** Pf 206-208 °C, IR ( película CHCl<sub>3</sub>) (  $\nu$  cm<sup>-1</sup>), 3346 (O-H), 3240 (N-H), 1701 (C=O), 1656 (C=O); RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , 10.3 (s, 1H, OH), 7.96 (d, J= 6.0 Hz, 1H, H3\*), 6.97 (d, J= 6.0 Hz, 1H, H6\*), 6.80 ( dd, J= 6 Hz, J= 1.8 Hz, 1H, H4\*), 6.52 (d, J= 2.5 Hz, 1H, NH), 6.18 (d, J= 2.5 Hz, 1H, H2), 4.20 (q, J= 9.4 Hz, 2H, H10), 4.0 (q, J= 9.4 Hz, 2H, H13), 2.51 (s, 3H, H7), 2.14 (s, 3H, H8), 1.28 (t, J= 9.4 Hz, 3H, H14), 1.06 (t, J= 9.4 Hz, 3H, H11); RMN-<sup>13</sup>C ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , 167.2 (C=O, C9), 165.0 (C=O, C12), 163.8 (C5\*), 154.5 (C6), 148.3 (C4), 139.8 (C2\*), 138.5 (C3), 127.0 (C3\*), 116.4 (C6\*), 114.7 (C4\*), 107.0 (C1\*), 102.2 (C5), 59.0 (C13), 58.8 (C10), 50.2 (C2), 20.80 (C7), 18.6 (C8), 13.8 (C14), 13.4 (C11); E. Masas IE m/z (%), M<sup>+</sup> 390 ( 15), 373 ( 18) [M-OH], 345 ( 30) [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O], 299 (100) [M- C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>].



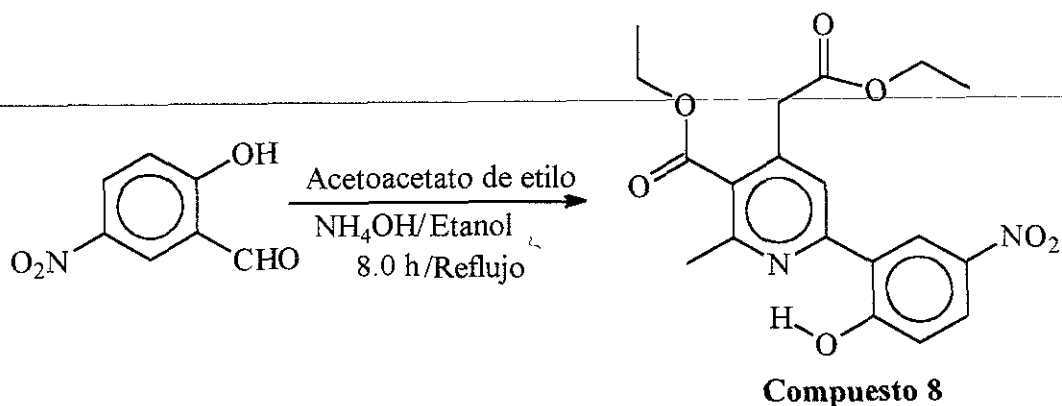
**Compuesto 6**

**2,6-dimetil-4-(5-hidroxi-2-nitrofenil)-1,4-dihidro-3,5-piridinilcarboxilato de dietilo. (Compuesto 7).** Pf 162-164 °C. IR ( película  $\text{CHCl}_3$ ) ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ), 3370 (O-H), 3300 (N-H), 1678 (C=O), RMN- $^1\text{H}$  ( 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ , 9.87 (s, 1H, OH), 8.23 (s, 1H, NH); 7.60 (d, J= 8.8 Hz, 1H, H3\*), 6.81 (d, J= 2.6 Hz, 1H, H6\*), 6.55 (dd, J= 8.8 Hz, J= 2.6 Hz, 1H, H4\*), 5.79 (s, 1H, H4), 3.89 (q, J= 14.1 Hz 4H, H9, H10), 2.19 (s, 6H, H13, H14), 1.02 (t, J= 14.1 Hz, 6H, H11, H12); RMN- $^{13}\text{C}$  ( 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.8 (C=O, C7), 161.3 (C7), 146.4 (C2\*), 145.2 (C2, C6), 139.5 (C1\*), 125.8 (C3\*), 117.0 (C6\*), 113.1 (C4\*), 102.2 (C5\*), 58.8 (C9, C10), 33.7 (C4), 18.2 (C13, C14), 13.6 (C11, C12); E. Masas IE m/z ( % ), M $^+$ , 390 ( 10), 373 ( 100) [M-OH].



**Compuesto 7**

c) Con el 2-hidroxi-5-nitrobenzaldehído.



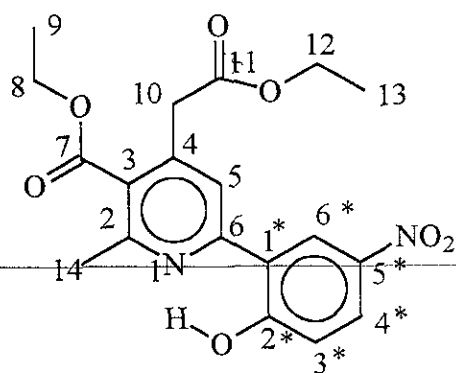
**Esquema III**

Una mezcla de 16.7 g (100 mmol) del aldehído, 25.2 g (210 mmol) del acetoacetato de etilo y 3.85 g de hidróxido de amonio (110 mmol) en 50 mL de etanol, se calentó a reflujo por 8 h. La mezcla se trabajó de manera convencional, aislándose un compuesto cristalino (**Compuesto 8**) con un rendimiento de 30%, el cual fue recristalizado de diclorometano/hexano (**Esquema III**).

**2-metil-3-etoxicarbonil-4-etoxicarbonilmetil-6-(2-hidroxi-5-nitrofenil)piridina.<sup>29b</sup>**

(**Compuesto 8**). Pf 176-178 °C, IR( película  $\text{CHCl}_3$ ) ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ), 3434 (OH), 3094 (Csp<sub>2</sub>-H), 2988 (Csp<sub>3</sub>-H), 1729 (C=O), 1596 (C=O); RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ , 15.56 (s, 1H, OH), 9.95 y 8.76 (d, J=2.4 Hz, 1H, H6\*), 8.42 y 8.25 (dd, J=9.3, 2.4 Hz, 1H, H4\*), 7.78 (s, 1H, H5), 7.44 y 7.06 (d, J=9.3 Hz, 1H, H3\*), 4.55 y 4.44 (q, J=7.5 Hz, 2H, H8), 4.21 (q, J=7.5 Hz, 2H, H12), 3.92 (s, 2H, H10), 2.79 y 2.70 (s, 3H, H14), 1.45 y 1.43 (t, J=7.5 Hz, 3H, H9), 1.35 (t, J=7.5 Hz, 3H, H13); RMN-<sup>13</sup>C (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ , 169.2, (C=O, C11), 166.2 (C=O, C7), 155.7 (C4), 154.4 (C2), 144.7 (C6), 139.7 (C5\*), 127.6 (C4\*), 127.2 (C5), 123 (C6\*), 119.3 (C1\*), 119.2 (C3), 117.2 (C3\*), 62.0 (C8), 61.5 (C12), 39.8 (C10), 23.3 (C14), 14.1 (C9), 14.08 (C13) Análisis elemental C= 59.02%, H= 5.46%, N= 7.62% calculado C= 58.76%, H= 5.15%, N= 7.21% para  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7$ . E. Masas IE m/z (%), M<sup>+</sup> 388 (100), 359 (15) [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>], 342 (70) [M-C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O]. Rayos X: Los cristales fueron crecidos de Hexano/diclorometano, resultando cristales monoclinicos, grupo espacial P2<sub>1/c</sub>.



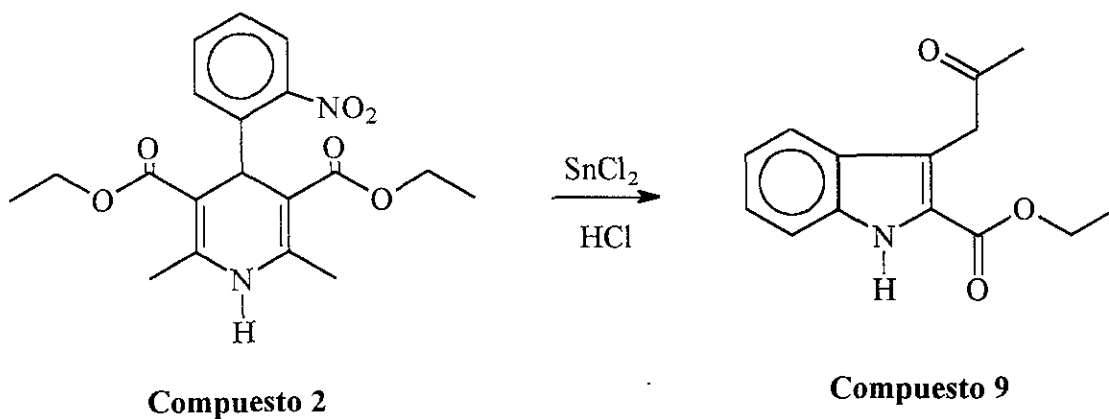


Compuesto 8

## II.- Reacción de dihidropiridinas con cloruro estanoso en medio ácido.

**Metodología general.**- A 2.6 mmol de la correspondiente dihidropiridina se le adicionó una mezcla de 5.4 g ( 11.3 mmol) de  $\text{SnCl}_2$  en 7 mL de HCl concentrado a  $5^\circ\text{C}$ ; la mezcla se llevó a temperatura ambiente y finalmente se sometió a reflujo por 5 h. Después de este tiempo se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, hasta pH neutro y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y el disolvente fue eliminado, a presión reducida, el sólido resultante fue recristalizado de acetato de etilo/hexano.

a) **Reacción del 4-(2-nitrofenil)-2,6-dimetil-1,4-dihidro-3,5-piridinildicarboxilato de dietilo con cloruro estanoso en medio ácido-( Esquema IV).**

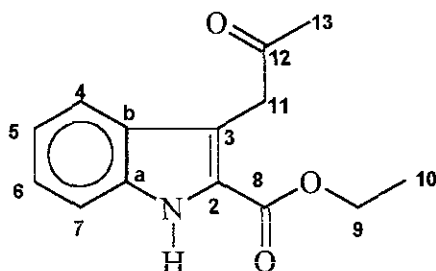


Compuesto 2

Compuesto 9

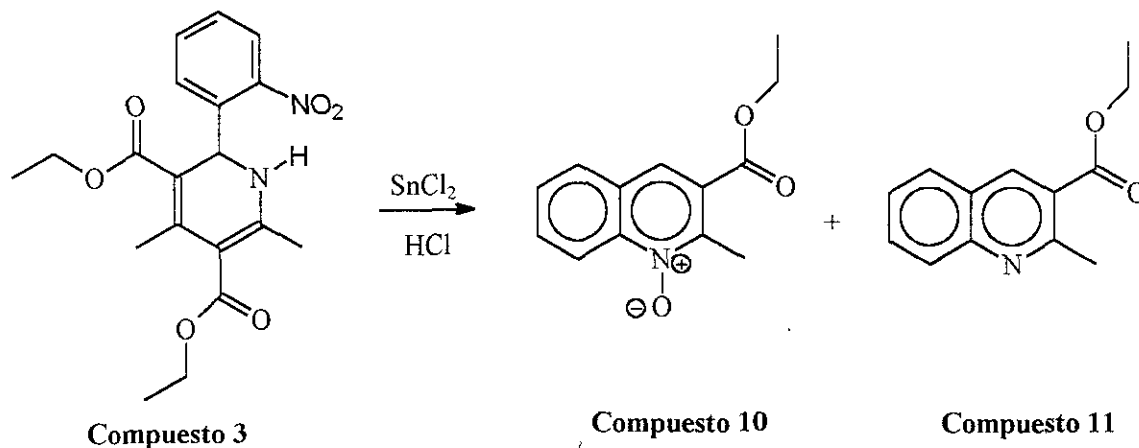
Esquema IV

**3-(2-oxopropil)-1H-indol-2-carboxilato de etilo. ( compuesto 9 ).** Pf 114-116°C, rendimiento 40 %, Espectroscopía: IR (pastilla, KBr) ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>), 3337 (N-H), 1724 (C=O), 1674 (C=O); RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , 8.92 (sa, 1H, N-H), 7.60 (ddd, J= 1.0, 8.0 Hz, 1H, H7), 7.38-7.10 (m, 3H, H4,H5, H6), 4.40 (q, J= 14.2 Hz, 2H, H9), 4.21 (s, 2H, H11), 2.18 (s, 3H, H13), 1.41 (t, J= 14.2 Hz, 3H, H10); RMN-<sup>13</sup>C ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , 206.1 (C12), 161.8 (C8), 135.8 (Ca), 127.9 (Cb), 125.9 (C6), 124.2 (C2), 120.7 (C4), 120.5 (C5), 116.5 (C3), 111.9 (C7), 61.0 (C9), 40.4 (C11), 29.1 (C13), 14.4 (C10); E. Masas IE m/z (%), M<sup>+</sup>, 245 (50), 202 (100) [M-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O], 156 ( 90) [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>].



**Compuesto 9**

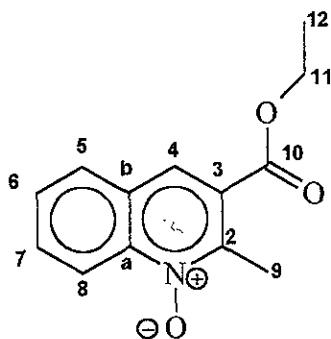
**b) Reacción del 4,6-dimetil-2-(2-nitrofenil)-1,2-dihidro-3,5-piridinildicarboxilato de dietilo con cloruro estano en medio ácido. (Esquema V)**



**Esquema V**

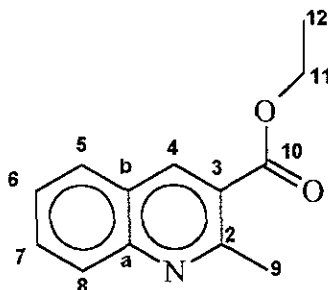
**N-óxido de 3-(etoxicarbonil)-2-metil-1-quinolina. ( compuesto 10 ).** Rendimiento 30%, pf 98-100 °C. IR ( pastilla KBr ) ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>), 1716 (C=O); RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , 8.80 (d, J= 8.2 Hz, 1H,

H<sub>g</sub>), 8.26 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.90-7.60 (m, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>), 4.45 (q, J= 14.1 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 2.96 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 1.46 (t, J= 14.1 Hz, 3H, H<sub>12</sub>); RMN-<sup>13</sup>C ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ, 165.3 (C=O, C<sub>10</sub>), 146.3 (C<sub>2</sub>), 142.3 (C<sub>a</sub>), 132.3 (C<sub>4</sub>), 129.0 (C<sub>6</sub>), 128.4 (C<sub>7</sub>), 127.6 (C<sub>5</sub>), 127.0 (C<sub>3</sub>), 126.0 (C<sub>b</sub>), 119.9 (C<sub>8</sub>), 62.0 (C<sub>11</sub>), 15.8 (C<sub>9</sub>), 14.2 (C<sub>12</sub>); E. Masas IE m/z ( % ), M<sup>+</sup> 231 ( 75), 214 ( 15) [M-OH], 186 (100) [M-45]. La difracción de Rayos X corroboran la presencia de una molécula de agua.



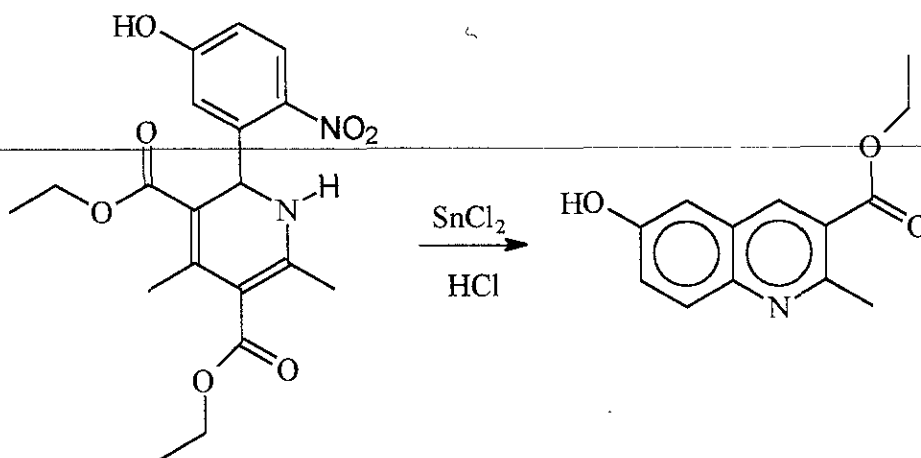
**Compuesto 10**

**2-metil-3-quinolinilcarboxilato de etilo.- ( compuesto 11 ).** Rendimiento 42%, pf 74-76 °C (Lit. <sup>30</sup> 70-72 °C) , IR ( pastilla KBr ) (  $\nu$  cm<sup>-1</sup>), 1718 (C=O); RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ, 8.80 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.0 (d, J= 6.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.80-7.45 (m, 3H, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 4.42 (q, J= 14.2 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 2.97 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 1.43 (t, J= 14.2 Hz, 3H, H<sub>12</sub>); RMN-<sup>13</sup>C ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), 166.4 (C=O, C<sub>10</sub>), 158.4 (C<sub>2</sub>), 148.5 (C<sub>a</sub>), 139.7 (C<sub>4</sub>), 131.5 (C<sub>8</sub>), 128.4 (C<sub>6</sub>), 126.4 (C<sub>7</sub>), 125.6 (C<sub>3</sub>), 123.8 (C<sub>b</sub>), 61.3 (C<sub>11</sub>), 25.6 (C<sub>9</sub>), 14.2 (C<sub>12</sub>); E. Masas IE m/z ( % ), M<sup>+</sup> 215 (100), 200 ( 10) [M-15], 187 ( 20) [M-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>], 170 ( 90) [M-45].



**Compuesto 11**

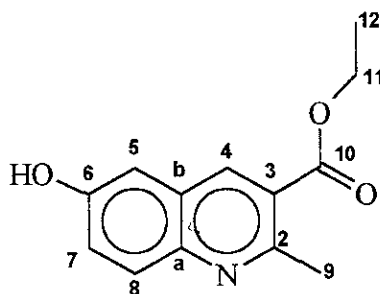
c) **Reacción del 4,6-dimetil-2-(5-hidroxi-2-nitrofenil)-1,2-dihidro-3,5-piridindicarboxilato de dietilo con cloruro estanoso en medio ácido.**



**Compuesto 6**

**Compuesto 12**

**6-hidroxi-2-metil-3-quinolincarboxilato de etilo.- ( compuesto 12 ).** Rendimiento 60 %, pf 153-155 °C. IR, ( pastilla KBr ) (  $\nu$  cm<sup>-1</sup>), 3431, (OH), 1725 (C=O), RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>+DMSO):  $\delta$ , 9.56 (s,1H, OH), 8.56 (s, 1H, H4), 7.86 (d, J=9 Hz, 1H, H8), 7.40 (dd, J=2.7 Hz, J=9 Hz, 1H, H7), 7.15 (d, J=2.7 Hz, 1H, H5), 4.42, (q, J=14.3 Hz, 2H, H11), 2.90 (s, 3H, H9), 1.45 (t, J=14.3Hz, 3H, H12). RMN-<sup>13</sup>C ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub> +DMSO):  $\delta$ , 166.1 (C=O, C10), 155.0 (C6), 154.0 (C2), 143.2 (Ca), 137.5 (C4), 128.9 (C8), 126.4 (C3), 123.7 (C7), 123.4 ( Cb), 108.5 (C5), 60.6 (C10), 24.6 (C12), 13.7 ( C11). E. Masas IE m/z ( % ), M<sup>+</sup> 231 (100), 216 [M-15] (4), 202 [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>] (20), 186 [M-OEt] (45).



**Compuesto 12**

## DISCUSIÓN

Con la finalidad de discutir ampliamente cada una de las fases de este trabajo, la discusión se divide en tres partes importantes: 1) la Parte Química en donde se discute la estructura propuesta con base a la asignación de las señales de los diferentes espectros en los productos obtenidos, 2) posteriormente se abordará la Parte Teórica en donde se proponen en primera instancia los mecanismos de reacción y en algunos de ellos se realizaron cálculos teóricos de orbitales moleculares HOMO, LUMO, momento dipolo y calor de formación de los intermediarios en los mecanismos propuestos y finalmente en la parte de Actividad Biológica se describirá primero la metodología utilizada para los estudios realizados de actividad biológica de dos de los productos obtenidos durante este trabajo y posteriormente se discutirán los resultados obtenidos.

### Parte Química

#### I.- REACCIÓN DE HANTZSCH, DEL 2-NITROBENZALDEHÍDO, A TEMPERATURA AMBIENTE.

##### Aislamiento del intermediario ( compuesto 1 ).

La observación de un abundante precipitado a los 30 minutos de mezclar los reactivos, cada vez que se llevaba a cabo la reacción de Hantzsch con el 2-nitrobenzaldehído, motivo el interés por aislar y caracterizar este compuesto. A pesar de su insolubilidad en la mayoría de los disolventes, se lograron obtener sus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en DMSO y  $\text{CF}_3\text{COOD}$  respectivamente lo que permitió inicialmente proponer cualquiera de las siguientes fórmulas como su probable estructura:

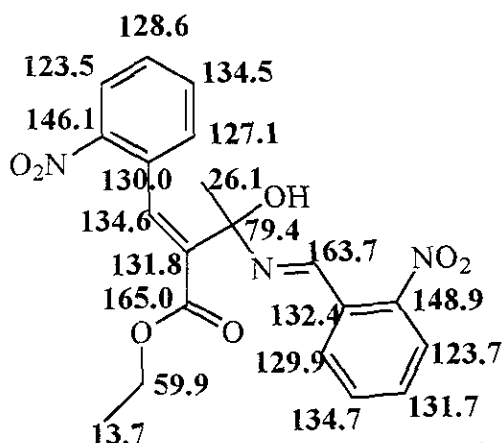


Figura II

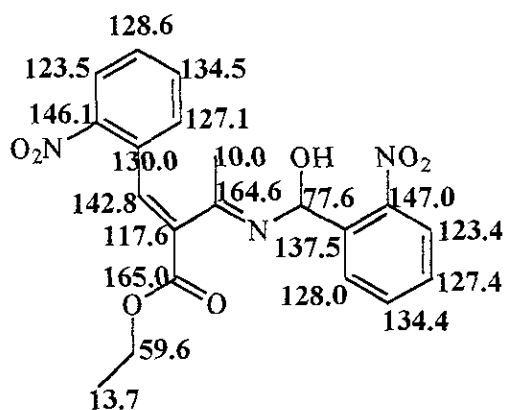
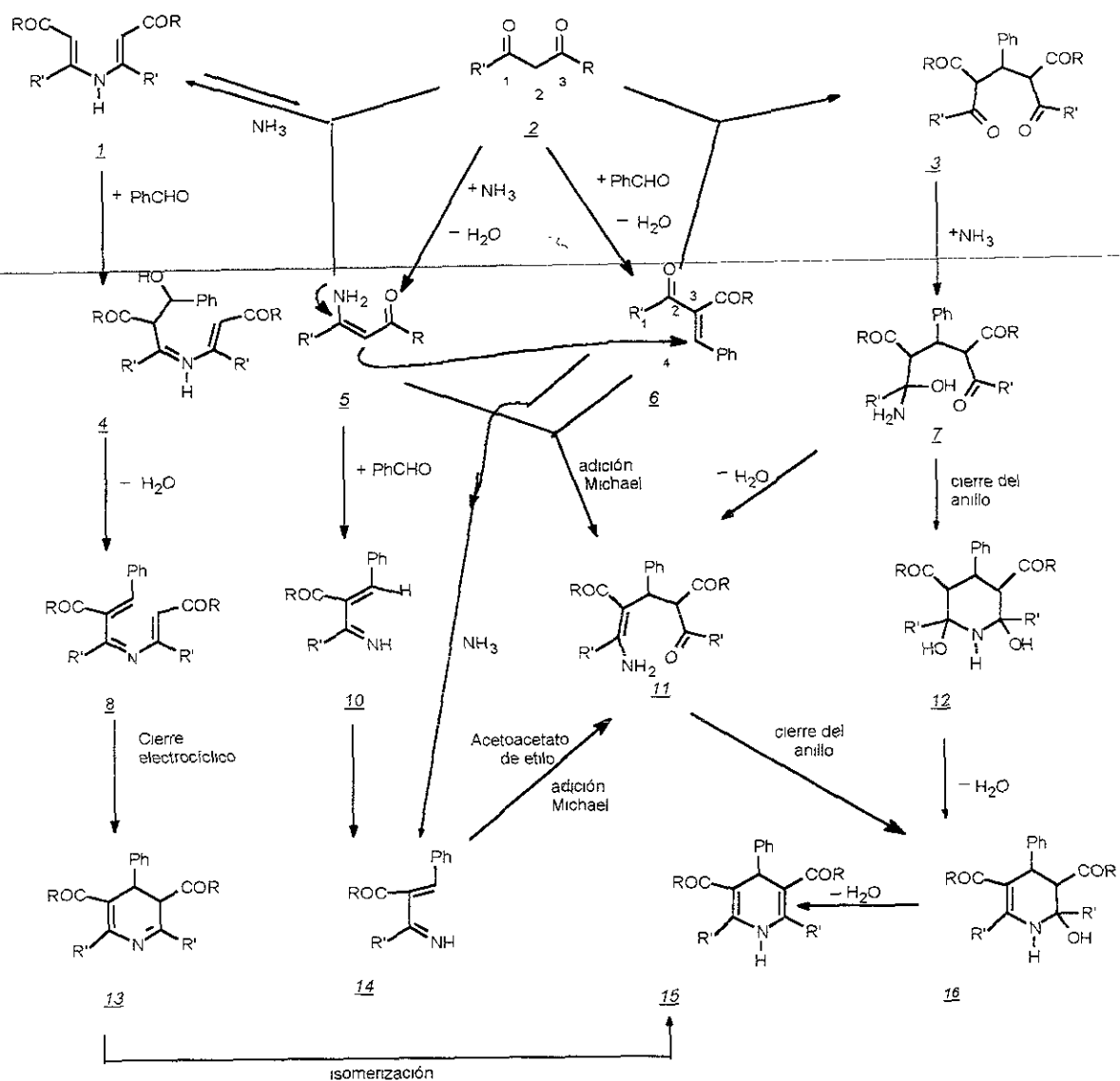


Figura III

Con respecto a su masa molecular, ambas estructuras concuerdan con el ion molecular a  $m/z$  413, la pérdida de 18 unidades de masa corroboran que la banda en  $3329\text{ cm}^{-1}$  de su espectro de IR y la señal en 9.50 ppm, encontrada en RMN de hidrógeno que se intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , pertenecen a un grupo hidroxilo. Las señales en RMN de hidrógeno en 8.20-7.15 ppm, que integran para 8 hidrógenos aromáticos que fueron asignadas a dos fenilos sustituidos y la presencia de un cuarteto a 3.92 ppm, que integró para dos hidrógenos y una señal triple a 0.57 ppm para tres hidrógenos, se asignaron a una unidad de éster etílico. Finalmente una señal simple a 2.80 ppm, fue asignada al metilo de la cadena. En las figuras II y III se encuentran los valores de los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  calculados para las estructuras propuestas en donde se confirma la presencia de los anillos bencénicos por la señales entre 138 y 124 ppm, la de un grupo carbonilo del éster a 178.4 ppm y la de un grupo imino por la señal a 162.0 ppm. Puesto que las dos estructuras poseen un carbono del imino con diferente sustitución, para decidir cual de las dos es la estructura correcta, se obtuvo el espectro de  $^{13}\text{C}$  tipo DEPT, en ácido trifluoroacético y encontrándose que la señal a 163 ppm corresponde al metino de un grupo imino, lo que permitió finalmente diferenciar entre las dos estructuras posibles, ya que la estructura de la figura II lo explica, mientras que la figura III, tiene el grupo imino sobre un carbono cuaternario. Una observación adicional en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , indica que el grupo hidroxilo forma un puente de hidrógeno con el grupo nitro del anillo bencénico, formando un sistema de 7 miembros (distancia calculada de  $2.8\text{ \AA}$ ), detectado a 9.6 ppm, así como el OH en su forma libre a 6.05 ppm y 5.93 ppm, señales que desaparecen por intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$ .

El mecanismo de la reacción de Hantzsch para la síntesis de dihidropiridinas ha sido ampliamente estudiada, y se han sugerido diferentes intermediarios que explican la formación de este tipo de compuestos como se muestra en el siguiente esquema.<sup>31</sup>(Esquema VI)



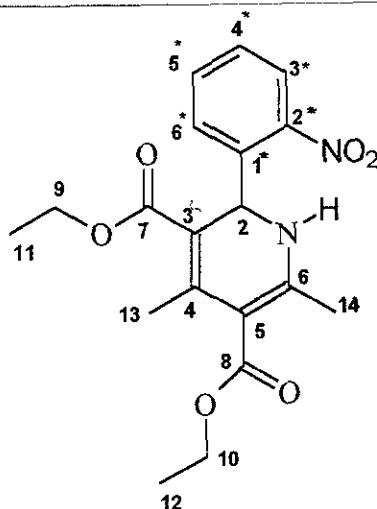
**Esquema VI**

Sin embargo hasta donde sabemos, una estructura como la que aquí se propone (**compuesto 1**) no se ha sugerido con anterioridad.

## 2) REACCIÓN DE HANTZSCH, DEL 2-NITROBENZALDEHÍDO, EN CONDICIONES DE REFLUJO

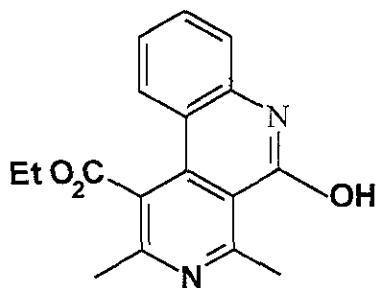
De esta reacción se obtuvieron cuatro compuestos sólidos, uno de estos fue caracterizado como la 1,4-dihidropiridina esperada (**compuesto 2**), en un rendimiento de 35%, mientras que los otros tres, se obtuvieron con rendimientos del 20% para el **compuesto 3**, 15 % para el **compuesto 4** y 20% para el **compuesto 5**. El **compuesto 3** fue caracterizado como la 1,2-dihidropiridina

isomérica la cual muestra en el espectro de RMN de hidrógeno que los ésteres presentes no son equivalentes, ya que se observan dos cuartetos que integran para dos hidrógenos c/u a 4.35 ppm y 4.09 ppm y dos señales triples que integran para tres hidrógenos c/u a 1.35 y 0.95 ppm asignados a los metilenos y metilos respectivamente. Esto se ve confirmado en el espectro de IR, que muestra dos bandas de grupo carbonilo en 1710 y 1670  $\text{cm}^{-1}$ , que va de acuerdo con la siguiente estructura:

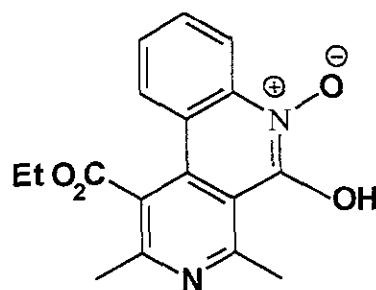


**Compuesto 3**

La comparación de la espectroscopía RMN de  $^1\text{H}$  de la 1,4-dihidropiridina (**compuesto 2**), con la de los **compuestos 4** y **5**, muestra en estos últimos la ausencia de las señales para uno de los ésteres. Por otra parte, los pesos moleculares de 296 y 312, sugieren las fórmulas condensadas de  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$  y  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ , para **4** y **5**, respectivamente, que fueron confirmadas por FAB. Las estructuras propuestas para estos dos compuestos son las siguientes:

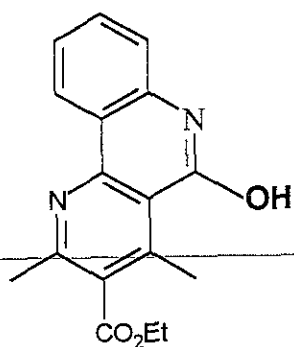


**Compuesto 4**

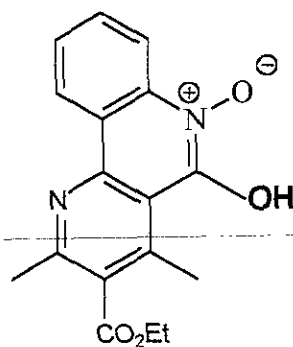


**Compuesto 5**





**Compuesto 4a**



**Compuesto 5a**

Los datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , obtenidos tanto experimentalmente como por cálculos, resultaron importantes ya que si se comparan por ejemplo las del **compuesto 4** con el de su isómero **compuesto 4a**, los desplazamientos químicos de los grupos metilo de ambas estructuras, difieren notablemente, como se muestra en la tabla I. Los desplazamientos químicos experimentales de dichos grupos en RMN de hidrógeno son de 2.60 ppm y 3.10 ppm y en RMN de carbono-13, de 22.0 ppm y 27.0 ppm (Tabla II) los cuales concuerdan con la estructura 4, proponiendo de esta manera que **4** y **5** provengan de una reacción intramolecular de la 1,4-dihidropiridina.

**Tablas comparativas de los desplazamientos químicos calculados y experimentales de los metilos en el anillo piridínico**

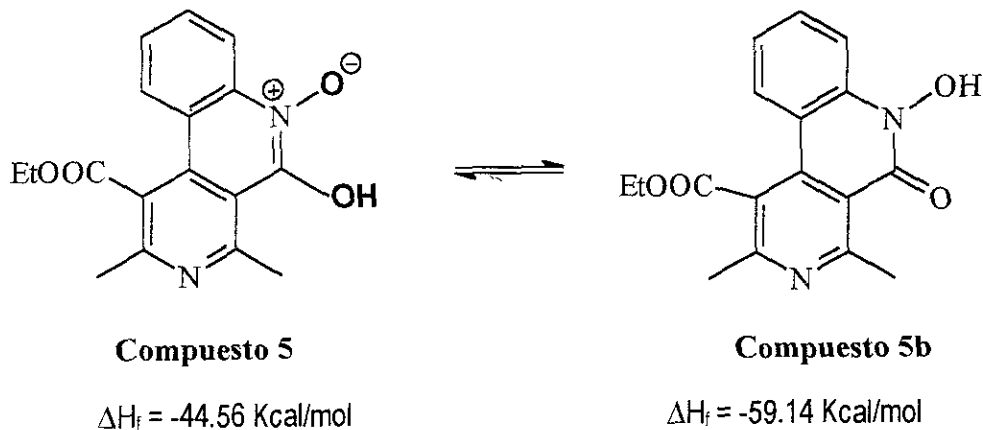
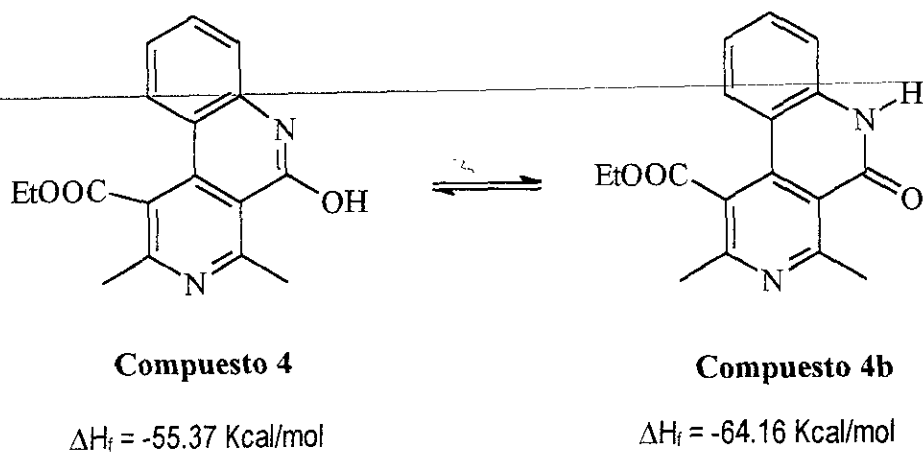
**Tabla I**

	RMN- $^1\text{H}$		RMN C-13	
	Teórico		Teórico	
<b>Compuesto 4</b>	<b>2.61</b>	<b>3.12</b>	<b>24</b>	<b>25</b>
<b>Compuesto 4a</b>	2.60	2.38	17	25

**Tabla II**

RMN-H		RMN C-13	
Experimental		Experimental	
<b>2.60</b>	<b>3.10</b>	<b>22</b>	<b>27</b>

Se debe hacer notar que para los compuestos **4** y **5**, pueden encontrarse en equilibrio tautomérico, como se muestra a continuación:



Los calores de formación obtenidos teóricamente para cada tautómero muestran que la diferencia entre el **compuesto 4** y el **compuesto 4b** es de 8.79 Kcal/mol y de 14.58 Kcal/mol entre **5** y **5a** respectivamente. Lo que indica que la forma de lactama es más estable. Sin embargo, el espectro de RMN- $^1\text{H}$  de **5**, presenta dos señales a campo bajo a 11.3 ppm y 10.8 ppm en una relación de 1:4.6, respectivamente, mientras que en resonancia de  $^{13}\text{C}$  sólo presenta una señal de carbonilo a 170.0 ppm, asignada al éster etílico. Los cálculos de desplazamiento químico realizados para ambas estructuras tautoméricas, indican que el carbonilo de éster aparece a 172.0 ppm y el de amida a 171.3, pero experimentalmente sólo se observó una señal a campo bajo y se asignó al carbonilo del éster, lo que sugiere que una de las estructuras predomina. Los desplazamientos

químicos en RMN de  $^{13}\text{C}$  teóricos<sup>28</sup> y experimentales de los diferentes carbonos de los **compuestos 4 y 5** y en sus dos formas tautoméricas se muestran en las tablas III y IV.

**Tabla III.- Valores comparativos teórico/experimentales.**

Carbono( Valores Experimental)	Compuesto 4 (Valores Calculados)	Compuesto 4b (Valores Calculados)
<b>Ca (161.3)</b>	<b>161.7</b>	<b>135.1</b>
Cb (113.0)	103.6	124.9
<b>Cc (138.8)</b>	<b>141.2</b>	<b>130.6</b>
<b>Cd (114.2)</b>	<b>113.2</b>	<b>128.8</b>
C4 (162.0)	171.4	166.9
<b>C5 (155.3)</b>	<b>158.3</b>	<b>171.2</b>
C1 (117.0)	119.5	119.5
C=O (170.3)	172.8	171.3

**Tabla IV Valores comparativos teórico/experimentales.**

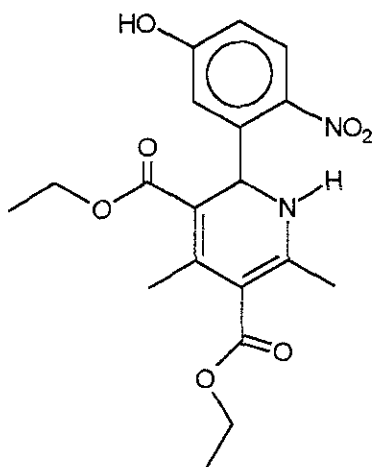
Carbono( Valor Experimental)	Compuesto 5	Compuesto 5b
<b>Ca (156.5)</b>	<b>151.4</b>	<b>132.7</b>
Cb (113.2)	105.8	122.0
<b>Cc (134.6)</b>	<b>135.5</b>	<b>130.9</b>
<b>Cd (115.2)</b>	<b>115.6</b>	<b>127.6</b>
C4 ( 162.7)	167.6	167.2
<b>C5 ( 155.6)</b>	<b>151.3</b>	<b>166.1</b>
C1 ( 121.0)	118.0	120.1
C=O (170.3)	172.8	171.3

Se puede observar que los valores experimentales coinciden más con las formas aromáticas, que con las formas de lactama. Sin embargo, puesto que los espectros de infrarrojo de ambos compuestos muestran además de las bandas del grupo carbonilo del éster, las bandas características del grupo amida en  $1680\text{ cm}^{-1}$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$  para **4b** y **5b**, respectivamente,

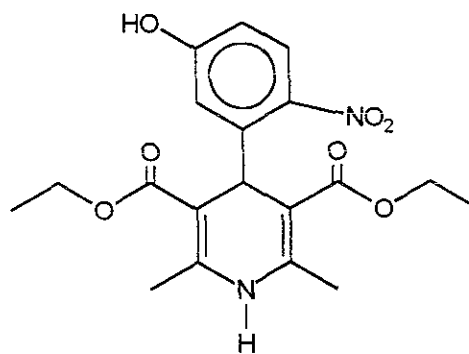
probablemente esto indique que en el estado sólido se encuentre presente la forma de lactama.

### 3) REACCIÓN CON EL 2-NITRO-5-HIDROXIBENZALDEHIDO

En la reacción del 2-nitro-5-hidroxibenzaldehído, en condiciones de Hantzsch, se obtuvieron dos compuestos a los que se les asignaron las estructuras **6** y **7** por comparación de sus datos espectroscópicos con la de sus análogos estructurales, los **compuestos 2** y **3**. Es importante hacer notar, que a pesar de la presencia del grupo orto-nitro en el aldehído de partida, en éste caso no se logró aislar los compuestos análogos a **4** y **5**.



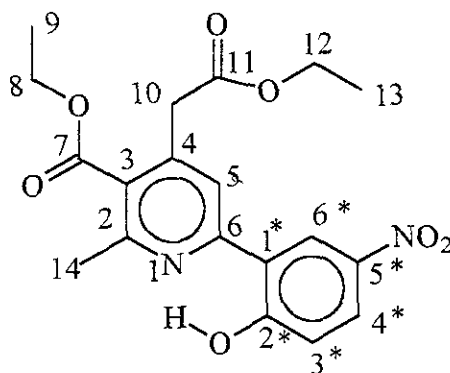
Compuesto 6



Compuesto 7

### 4) Reacción de Hantzsch del 2-hidroxi-5 nitrobenzaldehído.

De la reacción de Hantzsch del 2-hidroxi-5-nitrobenzaldehído, se aisló un producto cristalino que fue caracterizado como :



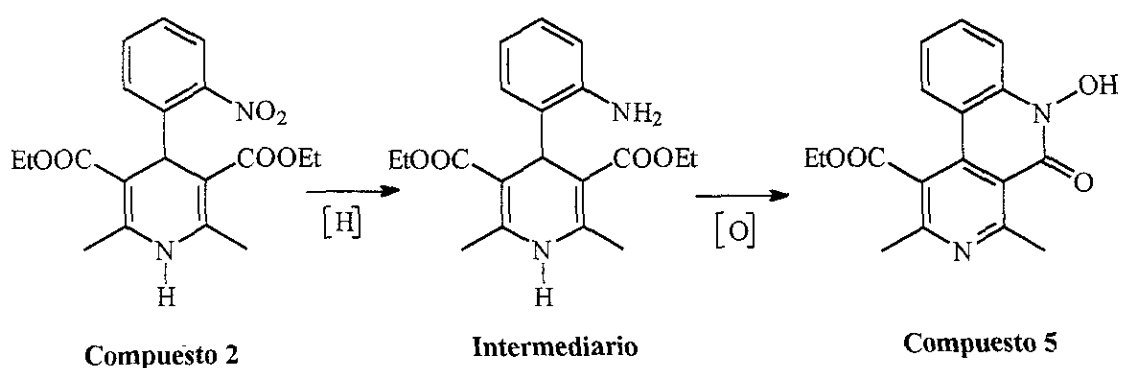
Compuesto 8

El espectro de IR muestra una banda en  $3600\text{ cm}^{-1}$  asignada al grupo hidroxilo en la

posición 2 del sistema aromático y también se observa la presencia de dos grupos carbonilo en 1700 y 1680. En RMN de carbono 13 se observan los dos grupos carbonilo en 169.2 y 166.2 ppm, y también la presencia de tres señales en 62.0, 39.8 y 61.5 ppm, que corresponden a los metilenos, C8, C10 y C12 respectivamente. En RMN de hidrógeno, se observa una señal simple que intercambia con D<sub>2</sub>O a 15.56 ppm asignada al grupo hidroxilo formando un puente de hidrógeno con el nitrógeno de la piridina, y además las señales debidas a los grupos metilos, uno de ellos como señal simple en 2.27 ppm asignada al metilo en la posición dos de la piridina, y dos cuartetos en 1.30 y 1.15 ppm debidos a los metilenos de los ésteres. La espectrometría de masas muestra el ion molecular a m/z 388 como pico base, y se observan además los fragmentos en 359 y 342 unidades de masa, que corresponden a las pérdidas de etilo y etanol respectivamente. Esta estructura fue confirmada por cristalografía de rayos X.

## II.- REACCIÓN DE DIHIDROPIRIDINAS CON CLORURO ESTANOSO EN MEDIO ÁCIDO.

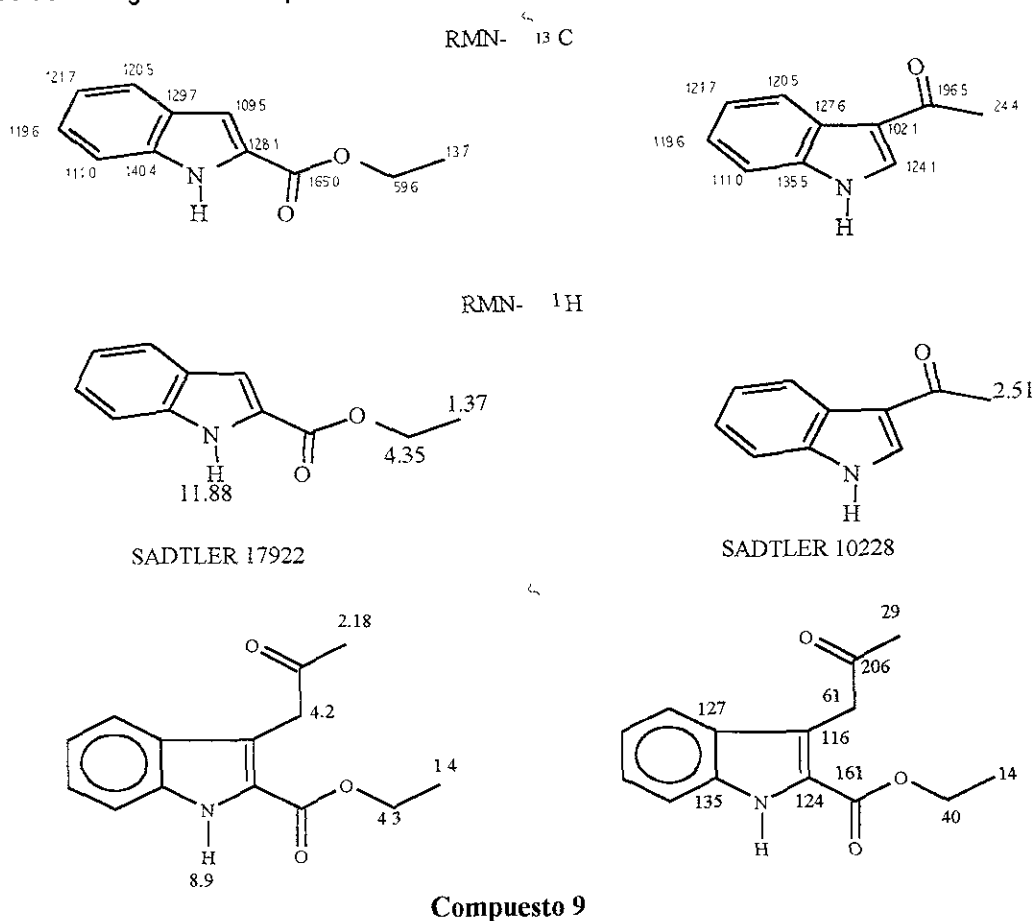
a).- Con objeto de confirmar las estructuras de los **compuestos 4 y 5** se intentaron sus síntesis parciales partiendo de la dihidropiridina (**compuesto 2**)(figura IV). Para ello se procedió a reducir el grupo nitro a la amina esperando que ésta pudiera realizar la adición-eliminación y generar de esta manera el cierre del anillo de lactama.



Esquema VII

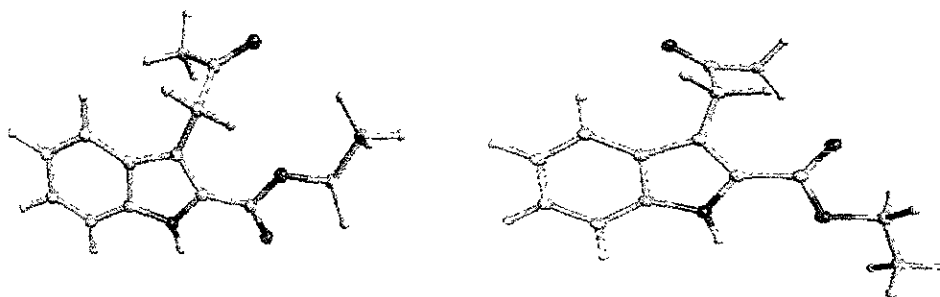
El tratamiento de la 1,4-dihidropiridina (**compuesto 2**) con cloruro estanoso en condiciones ácidas produjo un producto blanco cristalino que en RMN-<sup>1</sup>H muestra una señal a campo bajo en 8.90 ppm, que intercambia con D<sub>2</sub>O y que junto con la banda en IR a 3337 cm<sup>-1</sup>, indica que se

encuentra presente un grupo OH ó NH. Por otro lado también se observa una señal simple a 4.21 ppm que integra para dos protones de un metileno aislado. Su espectro de RMN de carbono-13, muestra la presencia de un grupo carbonilo de cetona a 206.1 ppm, y ésta debe de ser específicamente una metilcetona ya que en espectrometría de masas se observa la pérdida de 43 unidades de masa que es característico para este tipo de sistema. Sin embargo, la ausencia de las señales para uno de los grupos éster, indicó que la transformación química que se efectuó, no corresponde exclusivamente a una reducción del grupo nitro, sino más bien a una transformación más compleja. Los datos espectroscópicos disponibles nos sugirieron la presencia de un indol como sistema básico (**compuesto 9**), por lo que se correlacionaron los desplazamientos químicos en RMN  $^{13}\text{C}$  y de  $^1\text{H}$  de éste compuesto con los de compuestos semejantes<sup>32</sup> reportados en la colección *Sadtler* y en la literatura (Figura V), encontrando que los desplazamientos químicos de ciertos átomos de los siguientes compuestos están en valores cercanos a los que muestra el **compuesto 9**:



**Figura V.- Estructura propuesta para el compuesto 9, con los desplazamientos químicos experimentales**

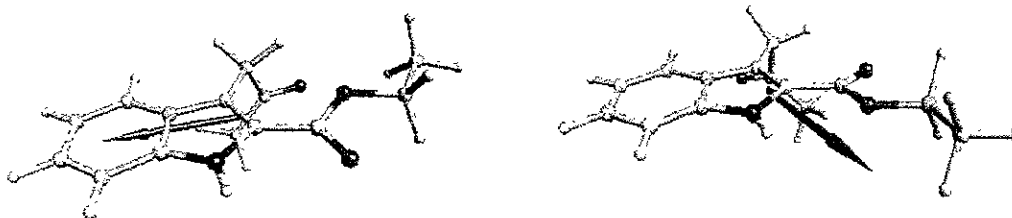
Para explicar la enorme diferencia en el desplazamiento químico del NH indólico entre el compuesto reportado ( *Sadtler 17922*) y el **compuesto 9** que son de 11.98 ppm y 8.90 ppm respectivamente ( $\Delta\delta= 2.98$  ppm) se realizó un cálculo teórico del análisis conformacional de ambos compuestos, encontrando que la razón por la cual el desplazamiento químico del protón del **compuesto 9** se encuentra a campos altos con respecto compuesto descrito en la colección *Sadtler*, es debido a que para el **compuesto 9** existen dos conformaciones energéticamente estables, ( *Figura VI* y *Fig VII* ) ya que sólo difieren una de otra en 1.94 Kcal/mol, en donde la diferencia significativa es la cercanía del grupo carbonilo con el protón en la posición 1 que da lugar a la formación de un puente de hidrógeno.



$$\Delta H_f = -76.92 \text{ Kcal/mol} \quad \Delta\Delta H_f = -1.94 \text{ Kcal/mol} \quad \Delta H_f = -78.86 \text{ Kcal/mol}$$

**Figura VI** Isómeros conformacionales del compuesto **9** **Figura VII**

La dirección del momento dipolo, en cada uno de éstos conformeros muestra que en un caso va en la dirección del NH, mientras que en el otro es perpendicular a ese grupo.



$$\mu = 2.686 \text{ Debyes}$$

$$\Delta\mu = 1.588 \text{ Debyes}$$

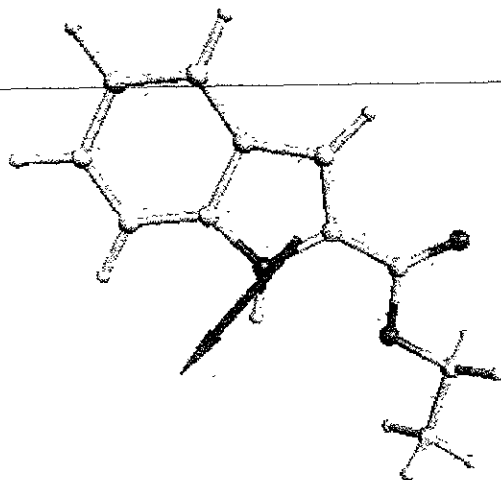
$$\mu = 4.274 \text{ Debyes}$$

**Figura VIII**

**Figura IX**

**Momento dipolo de los conformeros más estables del compuesto 9**

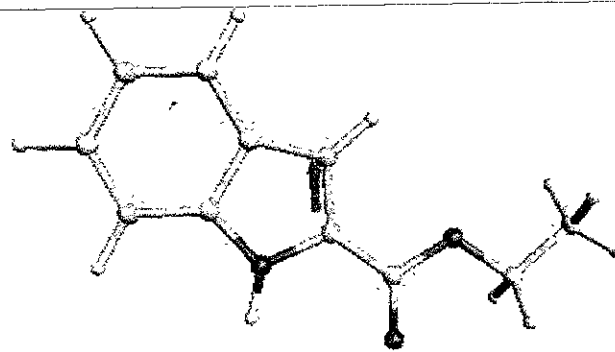
Para el caso del compuesto reportado en la colección Sadtler, se encontró que la diferencia de la energía de formación para los conforméros (Figuras X y XI) es de sólo 0.3 Kcal/mol, lo que significa que prácticamente existe una rotación libre del grupo éster.



$\mu = 2.678$  Debyes

$\Delta H_f = -34.41$  Kcal/mol

**Figura X**



$\Delta \mu = 1.902$  Debyes

$\mu = 0.778$  Debyes

$\Delta H_f = -34.06$  Kcal/mol

**Figura XI**

$\Delta \Delta H_f = 0.3$  Kcal/mol

**Momento dipolar y Calor de formación de los conforméros del compuesto reportado en el Sadtler**

Finalmente, de la diferencia de los momentos dipolar de estos conforméros, podemos concluir que debe ser más polar que el **compuesto 9**, lo que estaría de acuerdo con el desplazamiento químico observado para el NH. La estructura determinada por difracción de rayos X, confirma una de las conformaciones más estables, en donde se observa la cercanía del grupo carbonilo al NH.



En la figura XII, se muestra la estructura cristalina del compuesto 9, en donde se puede observar una de las conformaciones mencionadas anteriormente y que corresponde a la conformación cis entre el grupo carbonilo y el NH.

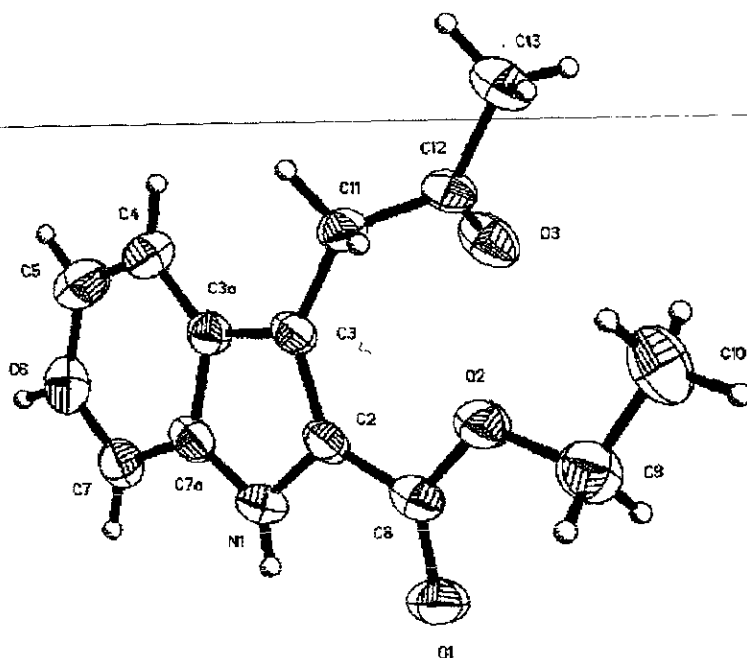
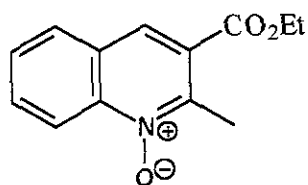


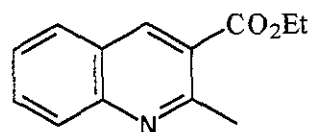
Figura XII Rayos X del compuesto 9

**b) Reacción de la 1,2-dihidropiridina con cloruro estanoso en medio ácido.**

Con la finalidad de determinar cual sería el comportamiento de las 1,2-dihidropiridinas (**compuestos 3 y 6**) frente a las condiciones de reducción que fueron efectivas para su isómero 1,4, se procedió a tratarlas con cloruro estanoso en medio ácido. Una vez aislados y purificados los productos de reacción para cada uno de los casos, sus datos espectroscópicos de infrarrojo y RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mostraron que difieren de manera notable de las del **compuesto 9** indólico. Uno de ellos muestra sus diferencias más significativas en el desplazamiento químico en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  a 2.97 ppm y 47.0 ppm, respectivamente, que se asigna a un metilo, el cual se encuentra unido a un sistema aromático de una quinolina; además en el espectro de  $^{13}\text{C}$  indica la presencia de otro metilo, correspondiente al éster etílico. La estructura de quinolina (**compuesto 11**) propuesta fue corroborada por comparación de sus características físicas y espectroscópicas con las descritas<sup>33</sup> para este compuesto. El otro compuesto muestra como diferencia significativa con el **compuesto 11**, la presencia de un átomo de oxígeno adicional.



Compuesto 10



compuesto 11

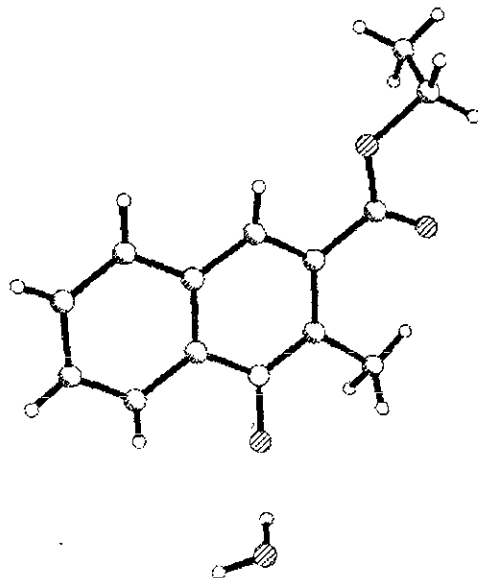
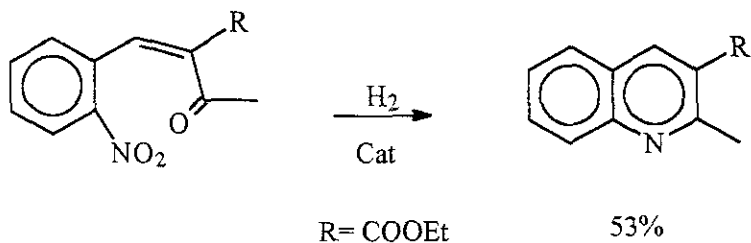


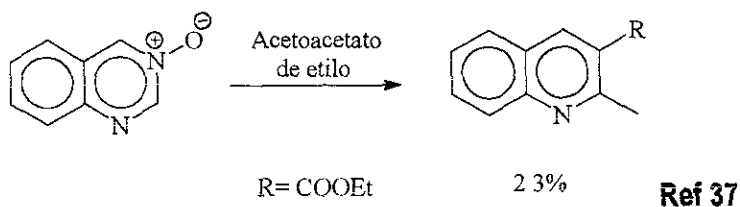
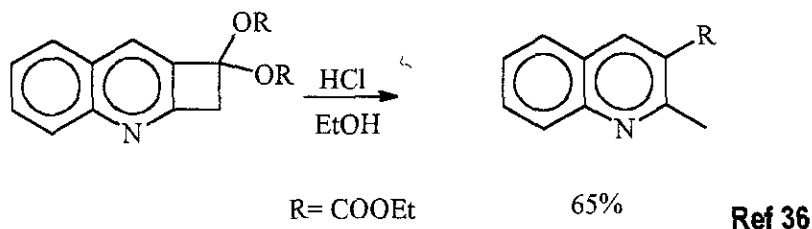
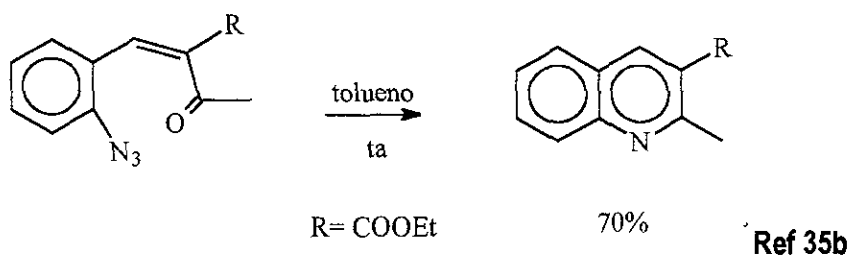
Figura XIII Estructura por Difracción de Rayos X del compuesto 10

El espectro de difracción de rayos X del **compuesto 10**, muestra la presencia de un N-óxido y una molécula de agua (Figura XIII), confirmando de esta manera lo mencionado anteriormente.

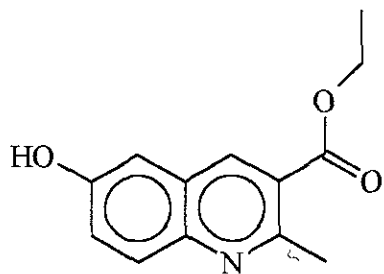
Mientras que el **compuesto 10** no ha sido preparado, el **compuesto 11** fue descrito por primera vez por P. Friedlander<sup>34</sup> sintetizó este compuesto con bajos rendimientos vía la condensación del 2-aminobenzaldehído con acetoacetato de etilo. Algunos ejemplos en donde se han descrito la síntesis, de éste compuesto se muestran a continuación:



Ref 35a



Resulta interesante comentar que el **compuesto 11**, se utiliza como precursor en la síntesis de herbicidas,<sup>38</sup> para la generación de tintes, así como intermediario en la síntesis de antibióticos.<sup>39</sup> De la reacción del **compuesto 6** con cloruro estanoso en medio ácido, se logró aislar un compuesto quinolinico, como producto principal en un rendimiento de 40%. Su espectro de masas muestra, que el ion molecular difiere por 16 unidades con respecto al **compuesto 11** y los desplazamientos químicos que presenta en sus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  son muy similares a los del **compuesto 11**, por lo que fue asignada la estructura **12** a ese compuesto. Cabe mencionar que a diferencia del caso anterior, no se detectó la presencia de ningún compuesto con el grupo N-óxido.



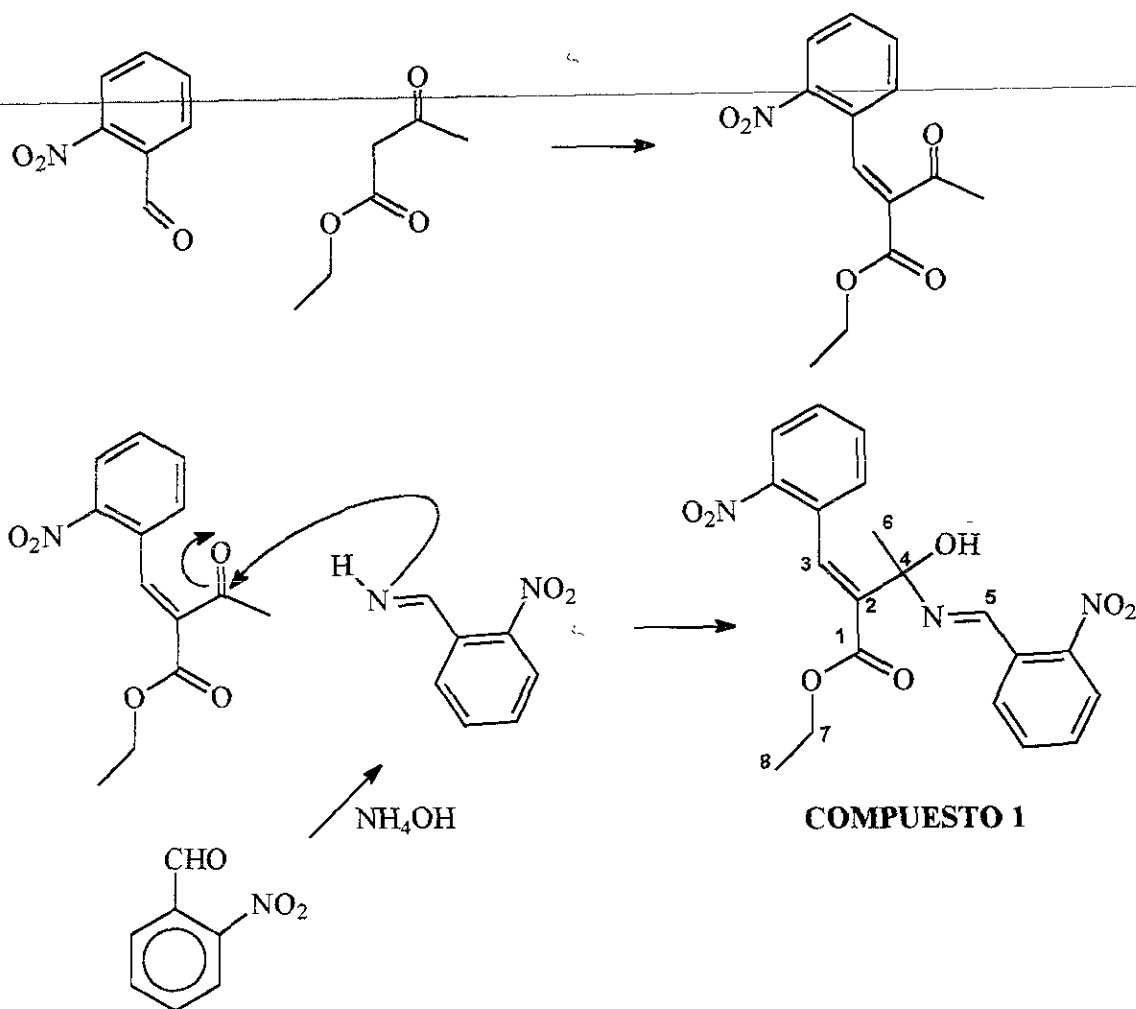
**Compuesto 12**

# ESTUDIO TEÓRICO-MECANÍSTICO

Los mecanismos propuestos que explican la formación de los productos, fueron estudiados desde el punto de vista teórico, empleando para esto software especializado adecuado. Se aplicó la siguiente metodología:

En primera instancia se utilizó el programa **PIMMS**<sup>23</sup> de Oxford Molecular con la finalidad de construir las estructuras en dos dimensiones y se transportó al módulo de tres dimensiones. Una vez ahí, se aplicó mecánica molecular para obtener un mínimo energético ó la estructura más estable y ésta a su vez fueron exportadas a **UNICHEM Ver. 4.01**,<sup>27</sup> **SPARTAN 5.0**,<sup>25</sup> **HYPERCHEM 5.01**,<sup>26</sup> en donde se aplicó mecánica cuántica a nivel **AM1**<sup>24</sup>. Con estos programas se obtuvieron los datos del análisis conformacional, además de obtener el calor de formación y los orbitales moleculares en diferentes niveles energéticos (HOMO, LUMO), las poblaciones electrónicas y momento dipolar de cada molécula optimizada. De esta manera cada una de las propuestas se estudió de manera particular y se compararon los resultados obtenidos en los diferentes programas con la finalidad de establecer si existe alguna diferencia significativa entre ellos, así como encontrar la contribución a los orbitales moleculares de manera puntual, y determinar así si la propuesta realizada es consistente.

**Compuesto 1.-** La formación del **compuesto 1**, puede explicarse tal y como se ilustra en el siguiente esquema (**Esquema VIII**):

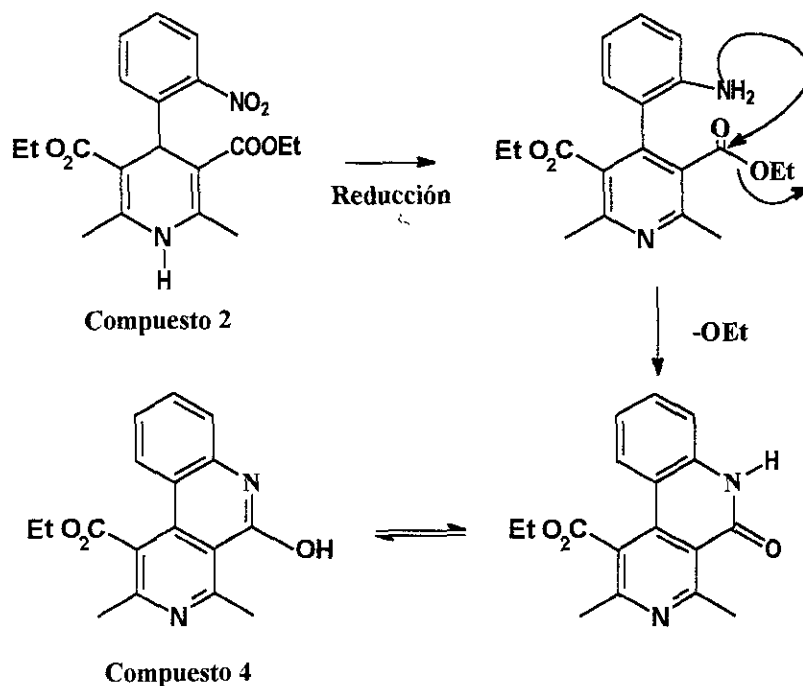


**Esquema VIII**

El primer paso de la reacción consiste en la condensación de un equivalente del aldehído con el acetoacetato de etilo, este compuesto reacciona con otro equivalente del aldehído pero en forma de base de Schiff, dando el producto aislado por una reacción de adición-eliminación. En este caso se consideró innecesario realizar cálculos teóricos, debido a que el mecanismo propuesto prácticamente no tiene variables.

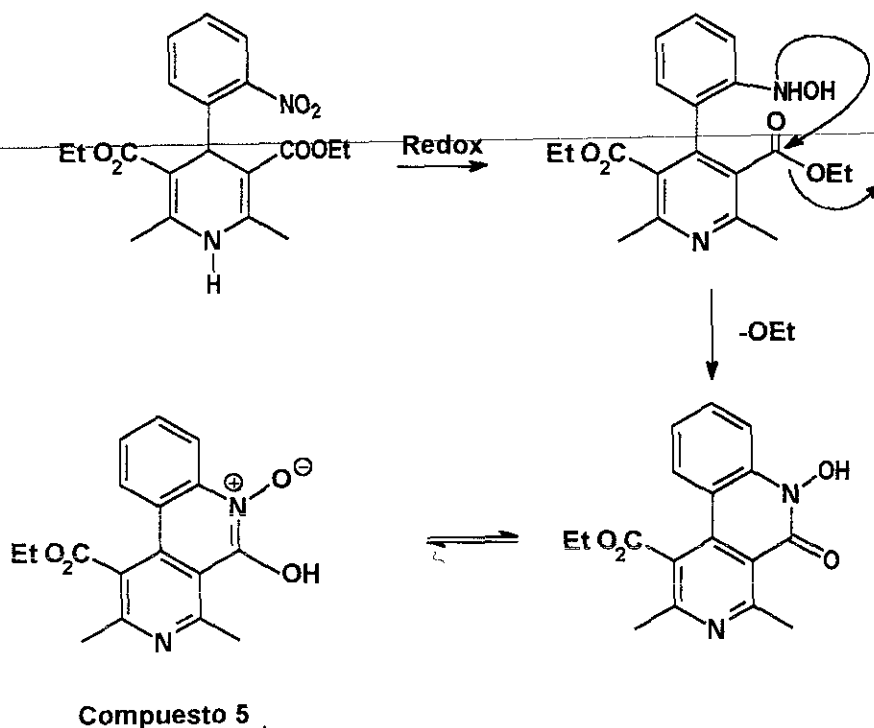
### Mecanismo de la formación de los compuestos 4 y 5.

Por las fórmulas condensadas de estos compuestos y por el hecho de que en el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno se detecte únicamente la presencia de un éster nos sugiere que el otro éster pudo modificarse por condensación con una entidad nucleofílica. Se propone que la dihidropiridina se oxida a la piridina mientras que la entidad que se reduce es el grupo nitro en primera instancia a la hidroxilamina y finalmente a la amina. La condensación intramolecular de la hidroxilamina o la amina con uno de los grupos éster genera los **compuestos 4 y 5** respectivamente. Este proceso químico encuentra soporte por el hecho ya conocido, que las dihidropiridinas son entidades reductoras<sup>40</sup>; por ejemplo la NADPH es una 1,4-dihidropiridina la cual actúa como agente reductor biológico.



Esquema IX Génesis del compuesto 4

Para la formación del **compuesto 5** la secuencia mecanística sería similar a la anterior:

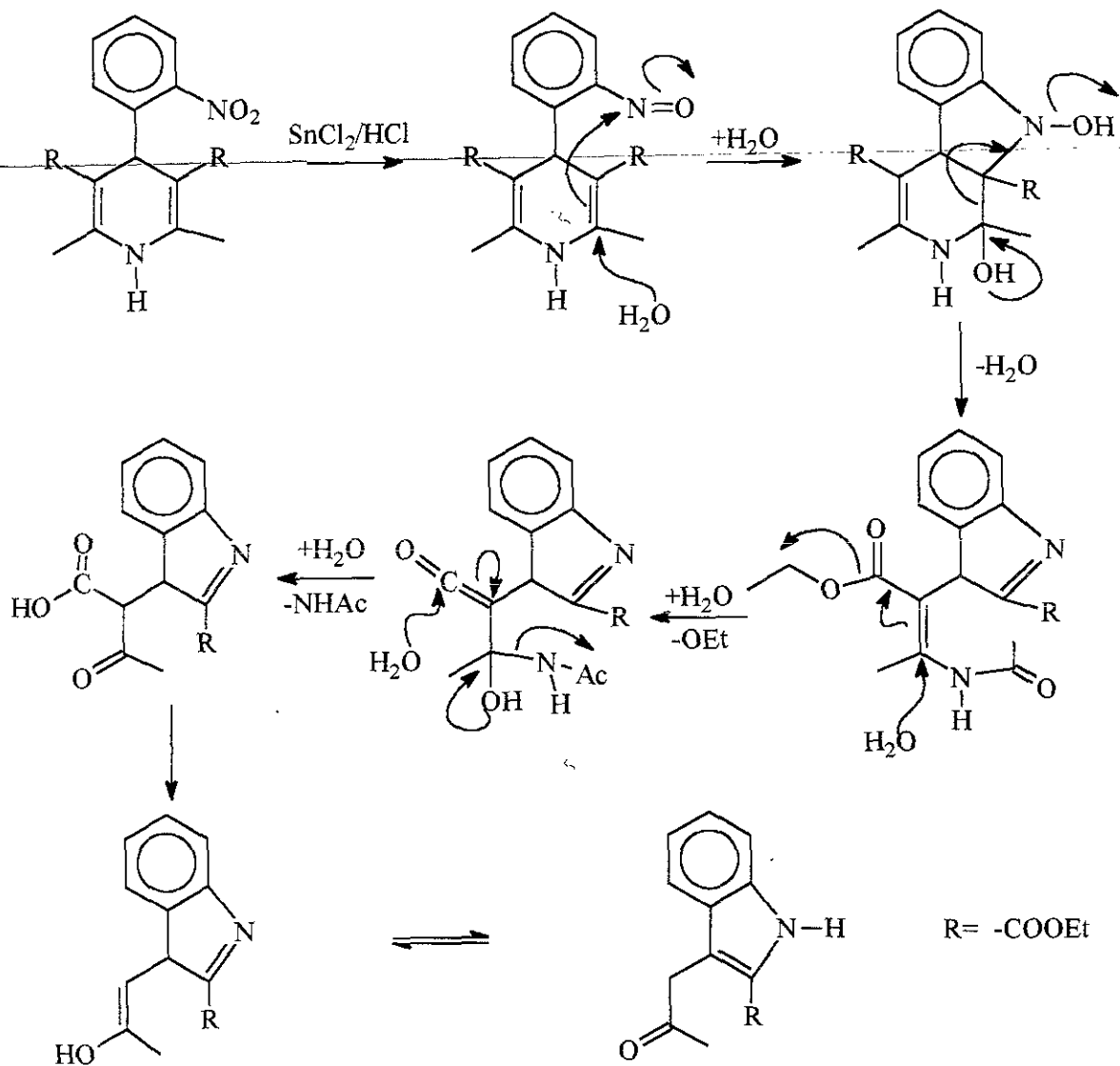


### Esquema X Génesis del compuesto 5

Como en el caso anterior, la ruta mecanística propuesta para la formación de estos compuestos, no parece tener alternativas, por lo que se consideró innecesario realizar cálculos teóricos.

**Formación del compuesto 9.**- En este caso se tienen dos propuestas mecanísticas que explican la formación de este compuesto y que se muestran en los siguientes esquemas:

PROPUESTA 1



Esquema XI

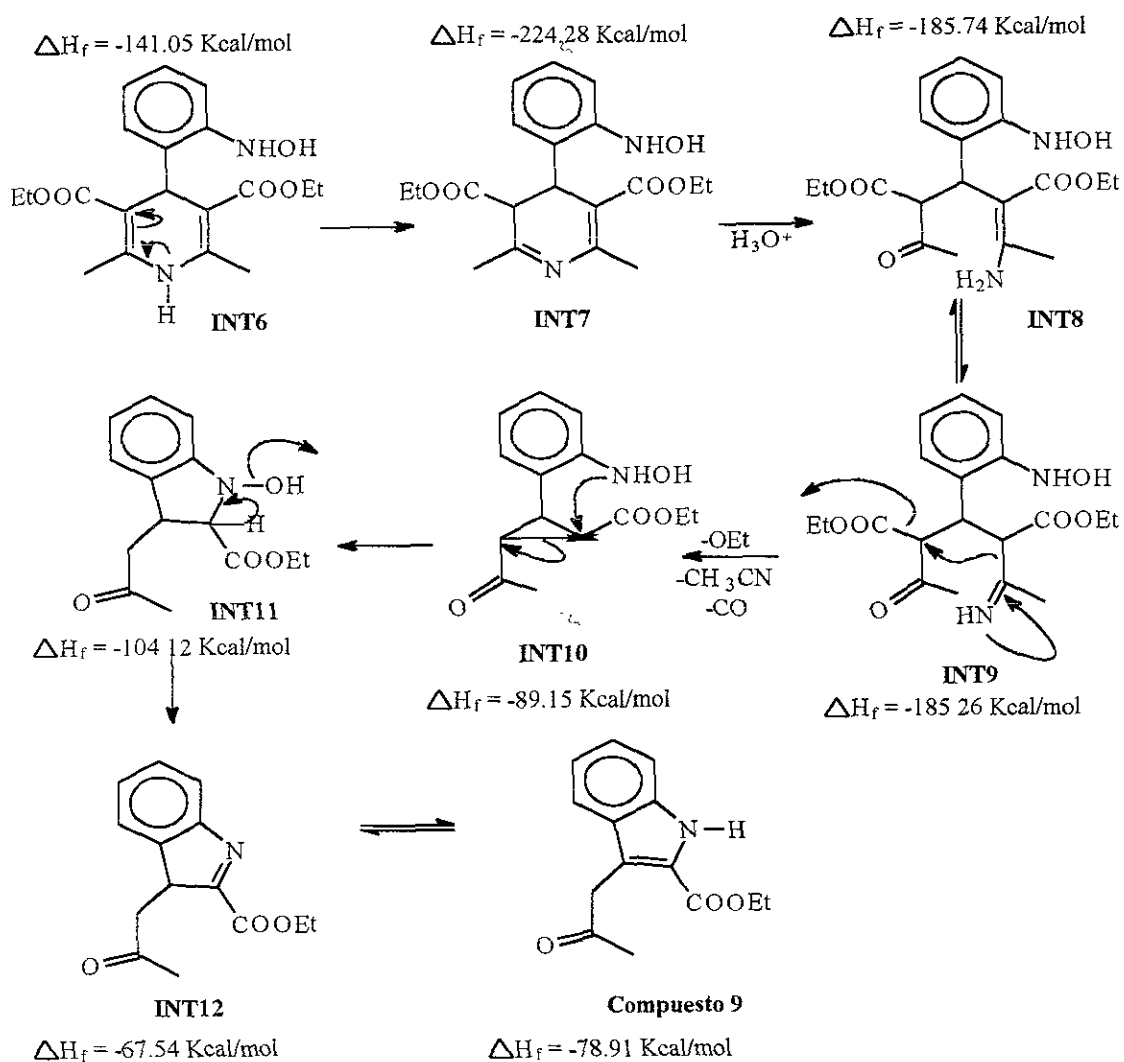
Aquí se propone la reducción de la 1,4-dihidropiridina (**compuesto 2**), formándose el nitroso derivado (**INT1**), el cual mediante la adición de una molécula de agua al carbono 2 de la dihidropiridina y ataque nucleofílico intramolecular al nitrógeno del grupo nitroso, se genera el anillo de cinco miembros (**INT2**). En este intermediario la entrada de un par de electrones del grupo hidroxilo, propicia la apertura del anillo de seis miembros (**INT3**), que por la adición de otro



equivalente de agua y la pérdida de etanol se forma la cetena (**INT4**), la cual mediante la adición de una molécula de agua y la pérdida de acetamida dan origen al ácido carboxílico y la cetona respectivamente (**INT5**). Finalmente la descarboxilación e isomerización (**INT5a**) de éste último explica la formación del **compuesto 9**.

Se propusieron dos mecanismos alternativos que son los siguientes:

## PROPUESTA 2



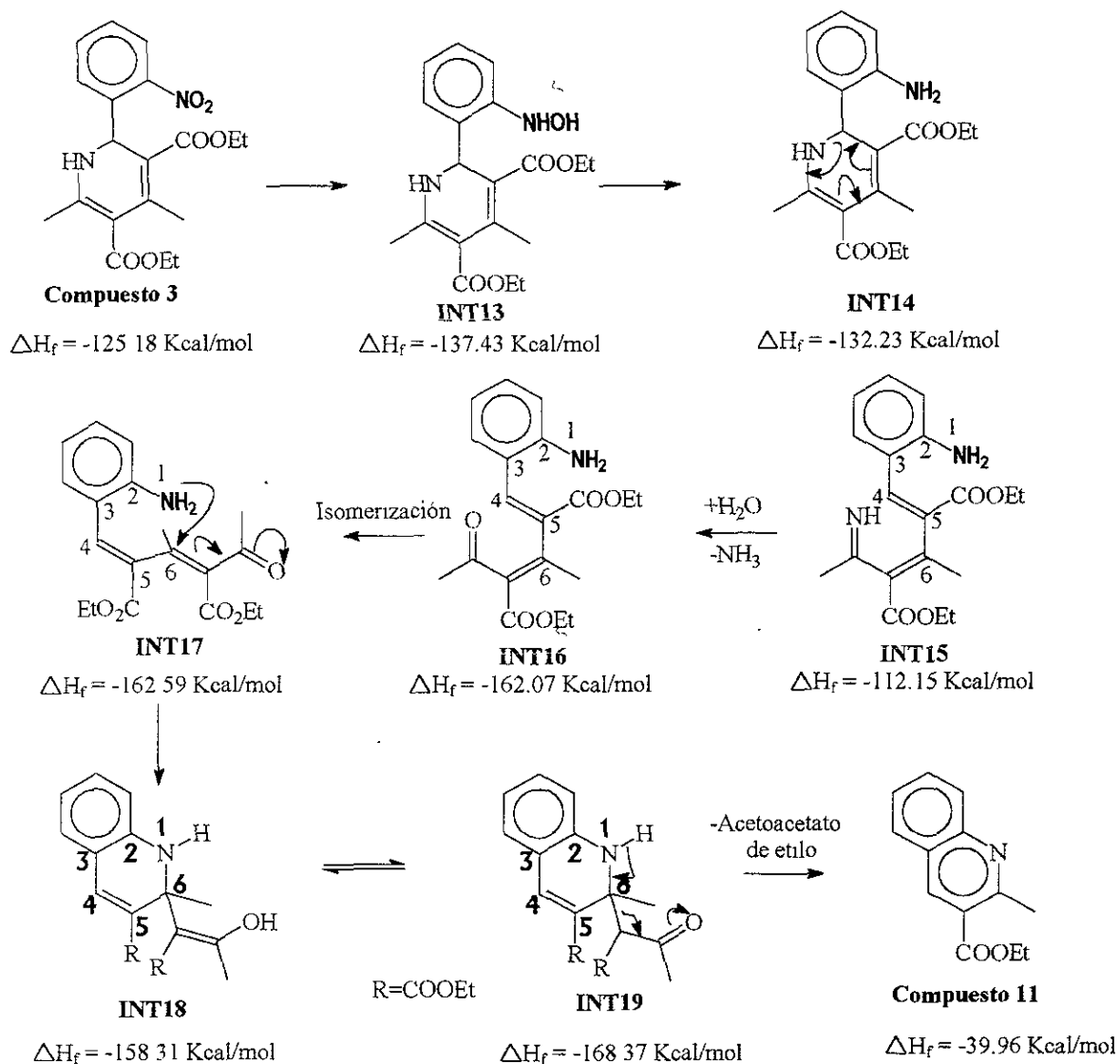
Esquema XII

En esta última propuesta, el primer paso de la reacción es la isomerización al **INT7**, la apertura del ciclo mediante la adición de una molécula de agua forma el **INT8**, que se isomeriza al **INT9**. La reacción intramolecular de éste y con la consecuente pérdida de acetonitrilo y monóxido de carbono y etóxido, forma el intermediario **INT10**, el cual reacciona intramolecularmente, atacando el nitrógeno de la hidroxilamina, abriendo el anillo de tres miembros y formando uno de cinco (**INT11**), quién mediante una pérdida de agua forma **INT12**, que esta en equilibrio con el **compuesto 9**.

## QUINOLINAS

Considerando que en esta reacción los dos productos, que se obtienen difieren sólo en el estado de oxidación del nitrógeno en el heterociclo, se puede sugerir un mecanismo similar en ambos casos con la única diferencia que el nitrógeno en el intermediario que se va a ciclar tendría el estado de oxidación apropiado, como a continuación se muestra:

### PROPUESTA 3

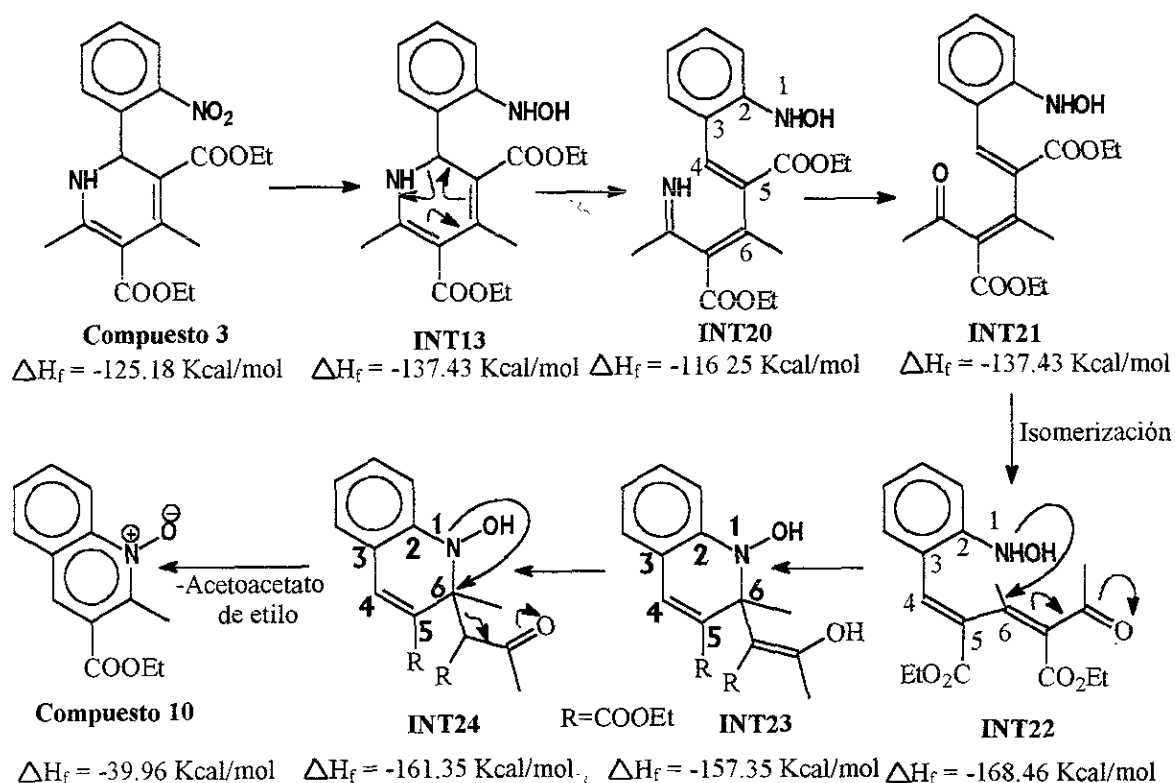


### Esquema XIII

En el caso de la formación del **compuesto 11**, se propone que el **compuesto 3** se reduzca, primero a la hidroxilamina (**INT13**) y posteriormente a la amina (**INT14**), la cual mediante una

isomerización azaciclohexadieno→azahexatrieno produce **INT15**, que pasa de la imina→cetona **INT16** y con la geometría adecuada **INT17**, se cicla por medio de una reacción Michael intramolecular obteniendo **INT18**. Este a su vez se transforma del enol a la cetona correspondiente (**INT19**), que finalmente por medio de la eliminación de una molécula de acetoacetato de etilo se transforma en el **compuesto 11**. Como se mencionó anteriormente, para explicar la formación del **compuesto 10**, el mecanismo es similar al anterior, sólo que la especie nucleofílica nitrogenada es ahora la hidroxilamina, como se muestra a continuación:

#### PROPUESTA 4

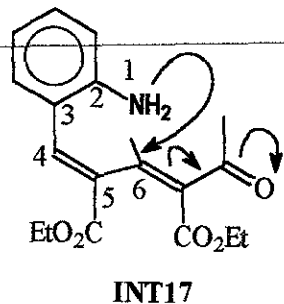


#### Esquema XIV

La característica más relevante de ambas propuestas es la ciclación, para lo cual se realizaron estudios teóricos de estos intermediarios, con la finalidad de establecer la cercanía de ambos centros para efectuar el cierre. Así mismo se puede observar que existe un ataque nucleofílico del nitrógeno, ya sea en forma de amina o en forma de hidroxilamina, hacia el carbono 6 que por ende deberá tener un carácter electrofílico.

Con la finalidad de establecer que el cierre de la formación del anillo de seis miembros en

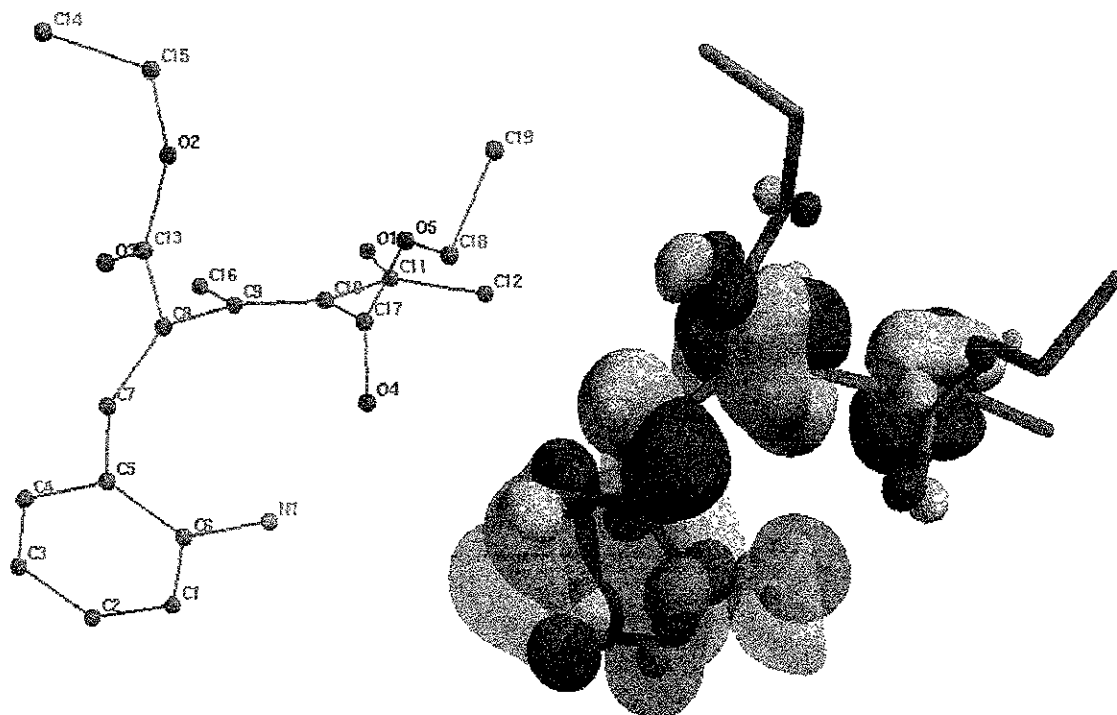
los pasos INT17→INT18 e INT22→INT23 de las propuestas 3 y 4 que explican la formación de los **compuestos 10 y 11** se justifiquen teóricamente, se calculó la contribución de los orbitales moleculares HOMO LUMO en los intermediarios clave es decir INT17 e INT22. Los resultados son los siguientes:



ÁTOMO	HOMO (%)	LUMO (%)
N1	26.08	--
C6*	--	17.84
C7**	--	8.997

\* C9, \*\* C10 en la figura

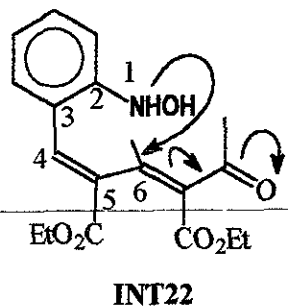
Gráficamente se muestra en la figura XIV:



**Figura XIV Representación gráfica de la contribución a los orbitales moleculares HOMO-LUMO**

Aquí se representa los orbitales HOMO sombreado, mientras que en sólido, la contribución al LUMO.

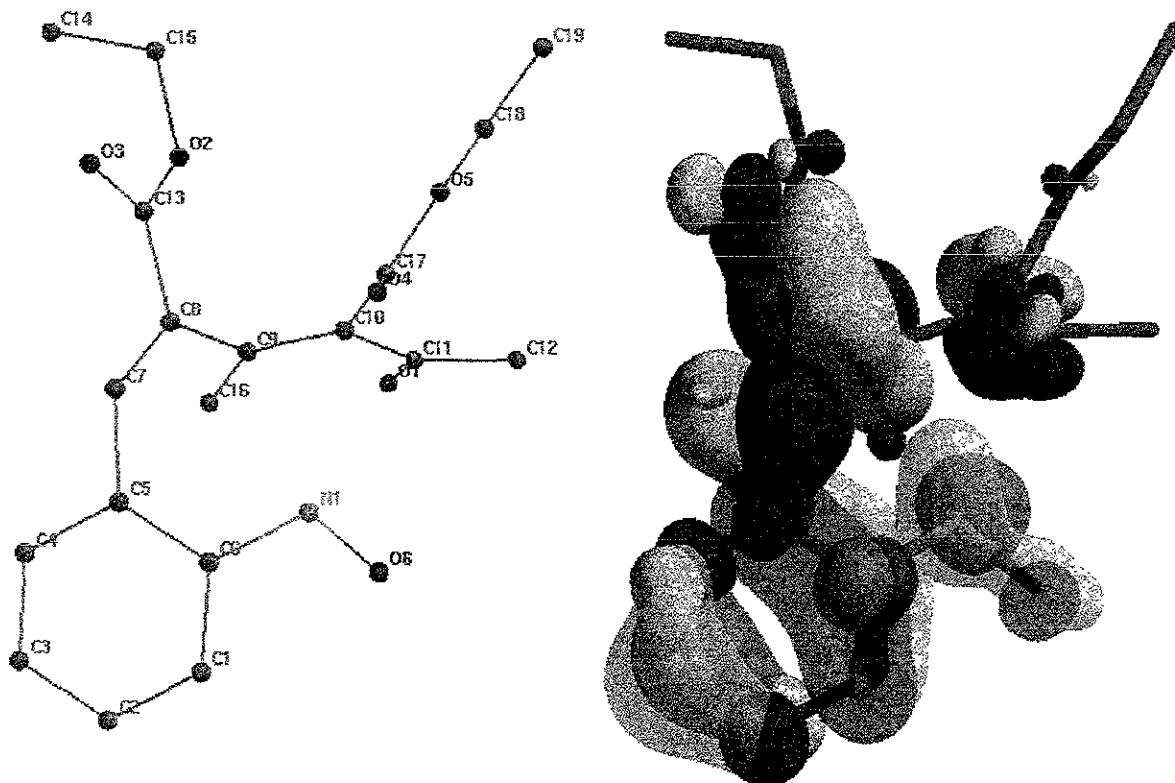
Para el INT22 tenemos:



ÁTOMO	HOMO (%)	LUMO (%)
N1	20.21	--
C6*	--	14.56
C7**	--	7.63

\*C9 y \*\* C10 en la figura

Gráficamente se muestra en la figura XV:

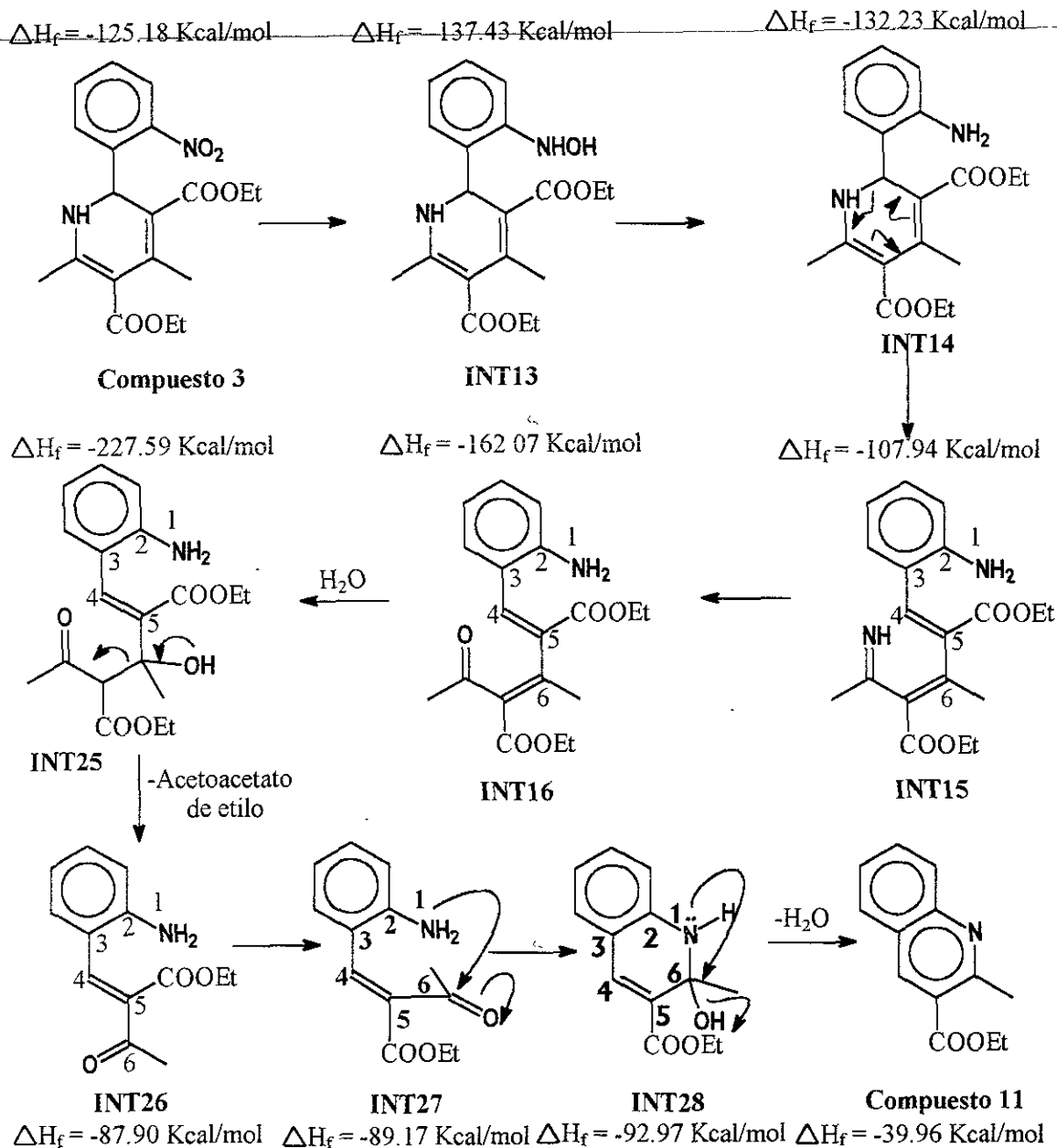


**Figura XV.- Representación gráfica de la contribución a los orbitales moleculares HOMO-LUMO**

Donde la zona sombreada representa la contribución al HOMO, mientras que la zona sólida representa la contribución al LUMO. Los resultados obtenidos muestran que los mecanismos propuestos son congruentes, ya que la zona que contribuye al LUMO (zona electrofílica) son los átomos 6 y 7 de ambos intermediarios. Por otro lado, la distancia entre los centros reaccionantes en la estructura termodinámicamente más estable, son de 3.09 Å y 3.11 Å respectivamente.

Una variante de este mismo proceso, es que antes de efectuarse el cierre (INT17→INT18 e INT22→INT23), se elimine un equivalente de acetoacetato de etilo como lo muestran la siguientes propuestas:

**PROPUESTA 5**

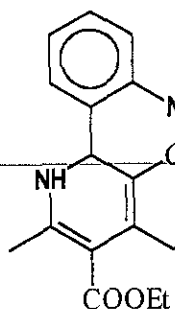


**Esquema XV**

Y de manera similar, para el caso del **compuesto 10** se tiene:

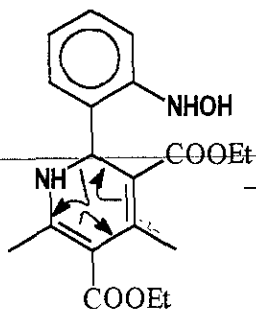
**PROPUESTA 6**

$\Delta H_f = -125.18$  Kcal/mol



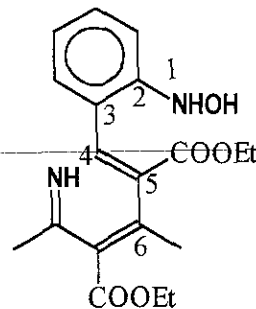
**Compuesto 3**

$\Delta H_f = -137.43$  Kcal/mol



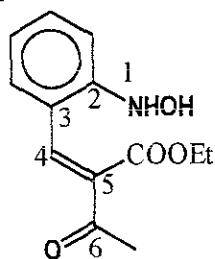
**INT13**

$\Delta H_f = -132.23$  Kcal/mol



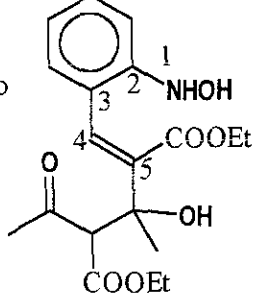
**INT20**

$\Delta H_f = -92.38$  Kcal/mol



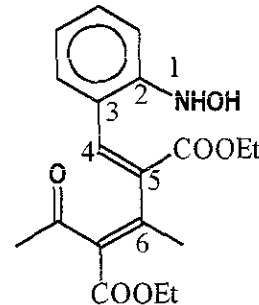
**INT30**

$\Delta H_f = -230.44$  Kcal/mol



**INT29**

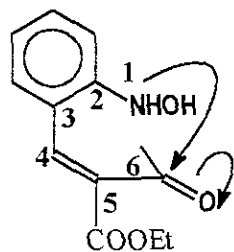
$H_2O$



**INT21**

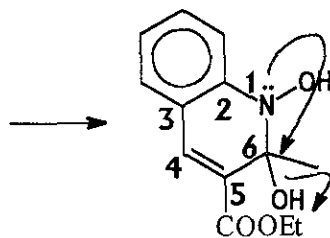
$\Delta H_f = -169.66$  Kcal/mol

Isomerización



**INT31**

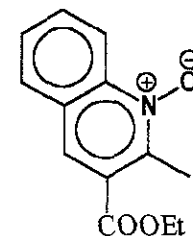
$\Delta H_f = -93.92$  Kcal/mol



**INT32**

$\Delta H_f = -90.67$  Kcal/mol

$-H_2O$



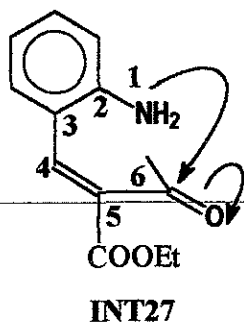
**Compuesto 10**

$\Delta H_f = -92.97$  Kcal/mol

**Esquema XVI**

En estas nuevas propuestas las contribuciones a los orbitales moleculares HOMO, LUMO en los intermediarios INT27 e INT31 son:

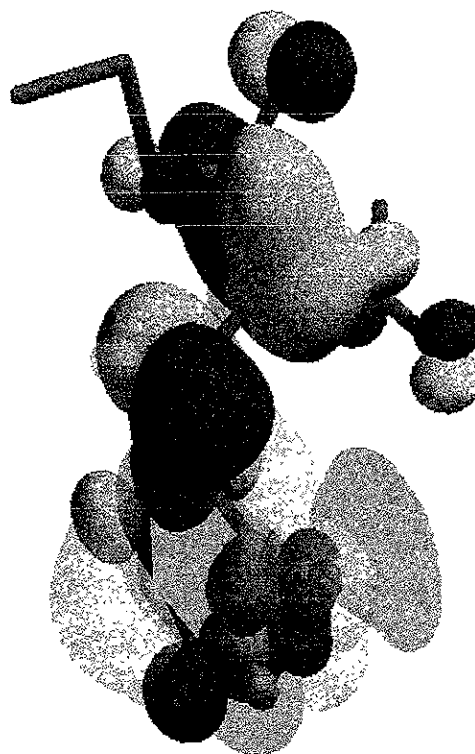
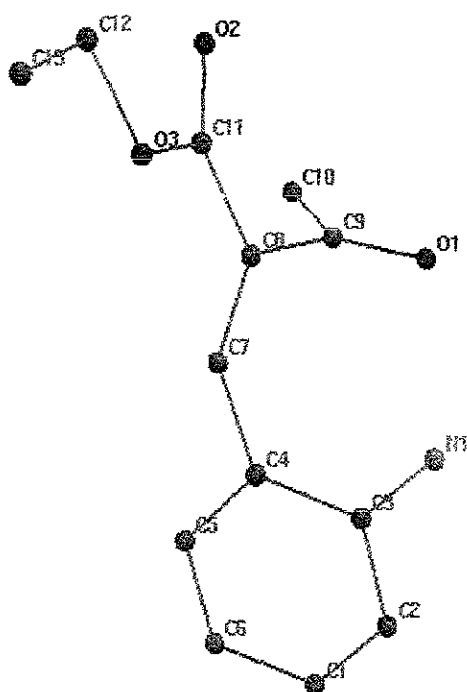




ÁTOMO	HOMO (%)	LUMO (%)
N1	25.60	--
C6*	--	2.0
O	--	--

\* C9 en la figura

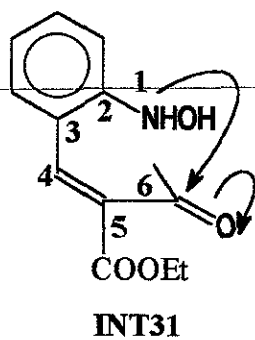
Gráficamente esta última se representa así:



**Figura XVI Representación gráfica de la contribución a los orbitales moleculares HOMO-LUMO**

De igual manera, aquí se representa los orbitales moleculares HOMO en sombre, mientras que en sólido la contribución al LUMO.

Y para el intermediario INT31, tenemos:



ÁTOMO	HOMO (%)	LUMO (%)
N1	20.66	--
C6*	--	1.0
O	--	--

\* C9 en la figura

El gráfico es el siguiente:

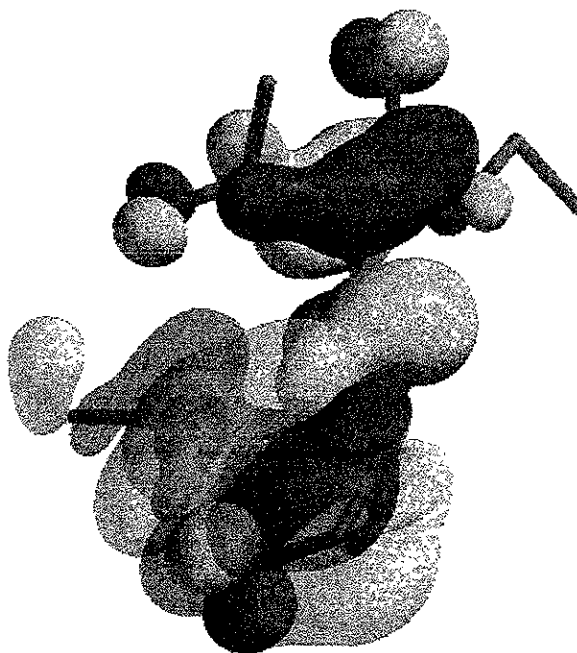
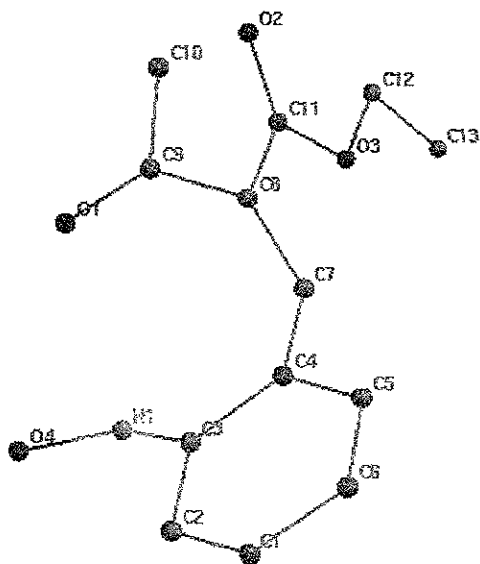


Figura XVII Representación gráfica de la contribución a los orbitales moleculares HOMO-LUMO

Si comparamos los intermediarios **INT17** contra **INT27** e **INT22** contra **INT31** y sumamos las contribuciones al LUMO , tenemos lo siguiente

INTERMEDIARIO	HOMO	LUMO
<b>INT17</b>	26.08	26.84
<b>INT27</b>	225.60	2.0

INTERMEDIARIO	HOMO	LUMO
<b>INT22</b>	20.21	22.19
<b>INT31</b>	20.66	1.0

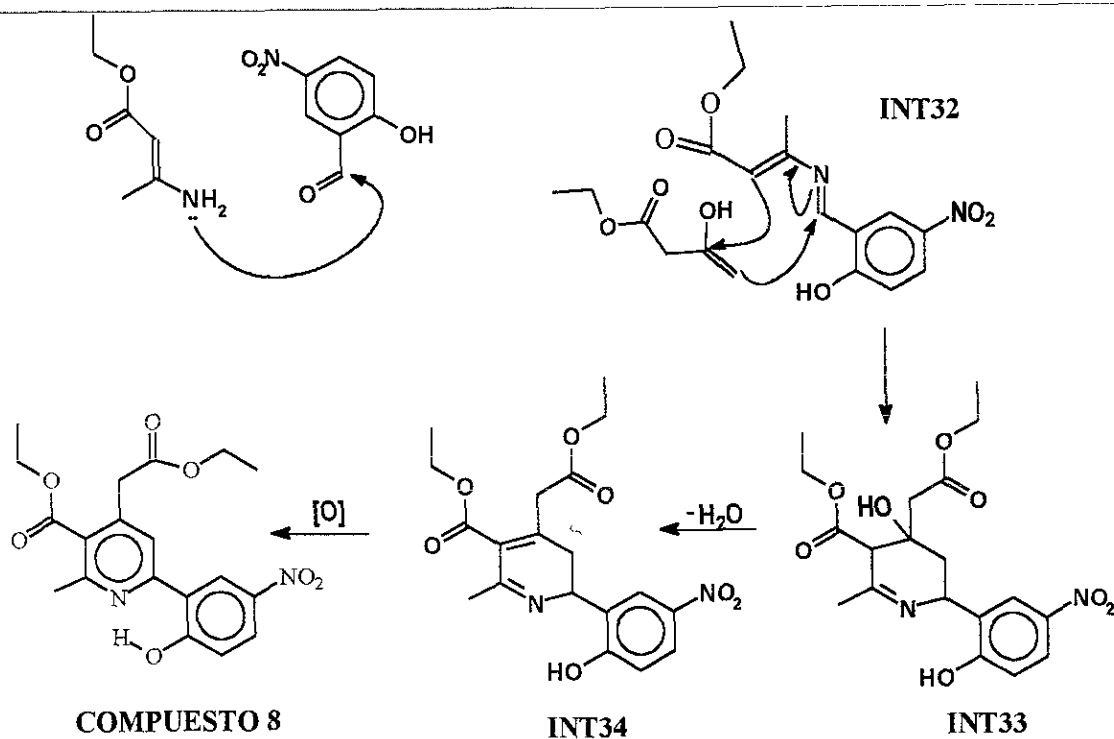
Los resultados muestran que la contribución al HOMO es semejante en ambas propuestas, pero no así en el LUMO donde la diferencia es muy significativa. Por lo tanto las estructuras de los intermediarios más probables son las del **INT17** e **INT22**, y se puede concluir que la ciclación sucede antes de perder la molécula de acetoacetato de etilo. Finalmente y con la finalidad de establecer si existe alguna diferencia significativa entre el método teórico utilizado en este trabajo (semiempírico **AM1**) y otros como **Ab initio** y **PM3** se realizó el cálculo de la energía de formación del **INT17**, los resultados son los siguientes:

**AM1**            162.59 Kcal/mol  
**PM3**            161.96 Kcal/mol  
**Ab initio**      162.60 Kcal/mol

Estos resultados indican una diferencia no significativa, concluyendo de esta manera que el método semiempírico **AM1**, utilizado para el cálculo de las propiedades fisicoquímicas en las estructuras químicas es el mas adecuado.

**FORMACIÓN DEL compuesto 8.**- Los antecedentes mecanísticos de este tipo de reacciones<sup>31</sup> nos permiten sugerir dos posibles rutas que expliquen la obtención del **Compuesto 8**.

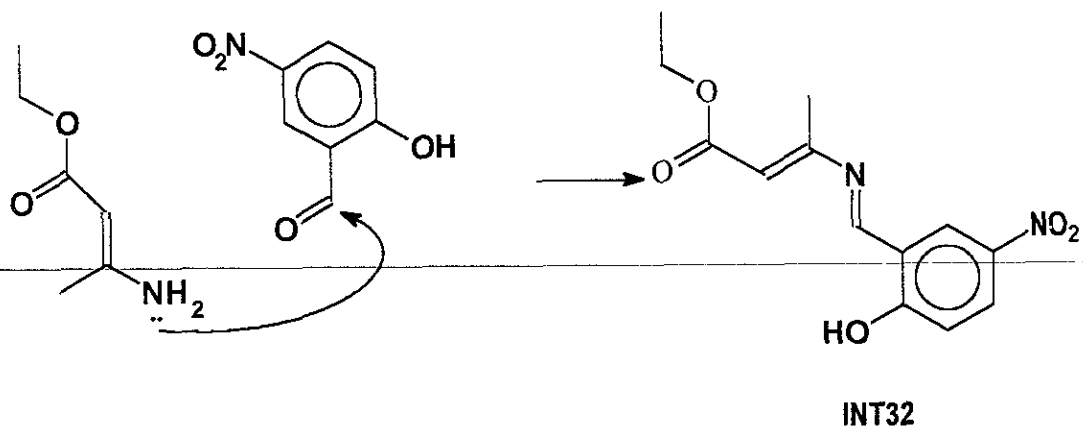
**PROPUESTA 7**



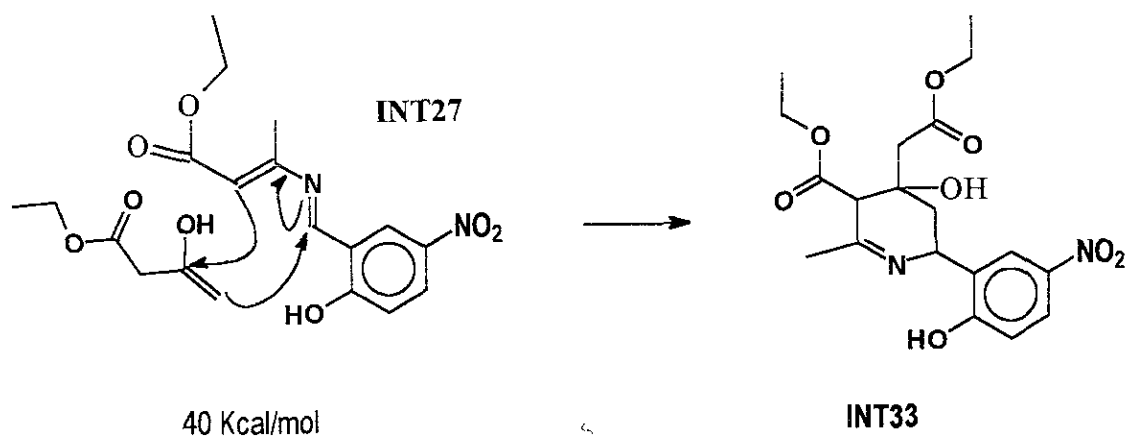
**Esquema XVII**

En esta propuesta, el primer paso es la condensación del aldehído aromático y la enamina conjugada del acetoacetato de etilo, formándose la base de Schiff, la cual mediante una adición [4π+2π] intermolecular con una de las formas enólicas del acetoacetato de etilo produce la dihidropiridina, que finalmente se oxida para obtener el producto aislado (**compuesto 8**).

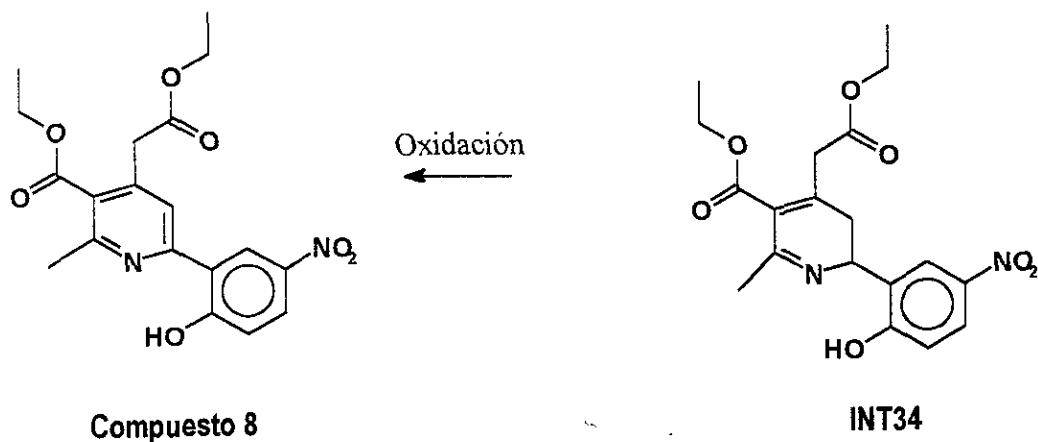
Analizando esta propuesta por paso, cabe mencionar que el primero de éstos, consiste en la condensación del aldehído con la enamina cinética, la energía requerida para que ocurra ésta y produzca el **INT32** es de 35 Kcal/mol



Este intermediario mediante una reacción  $[4\pi+2\pi]$  que requiere de una energía de 40 Kcal/mol, genera el intermediario **INT33**

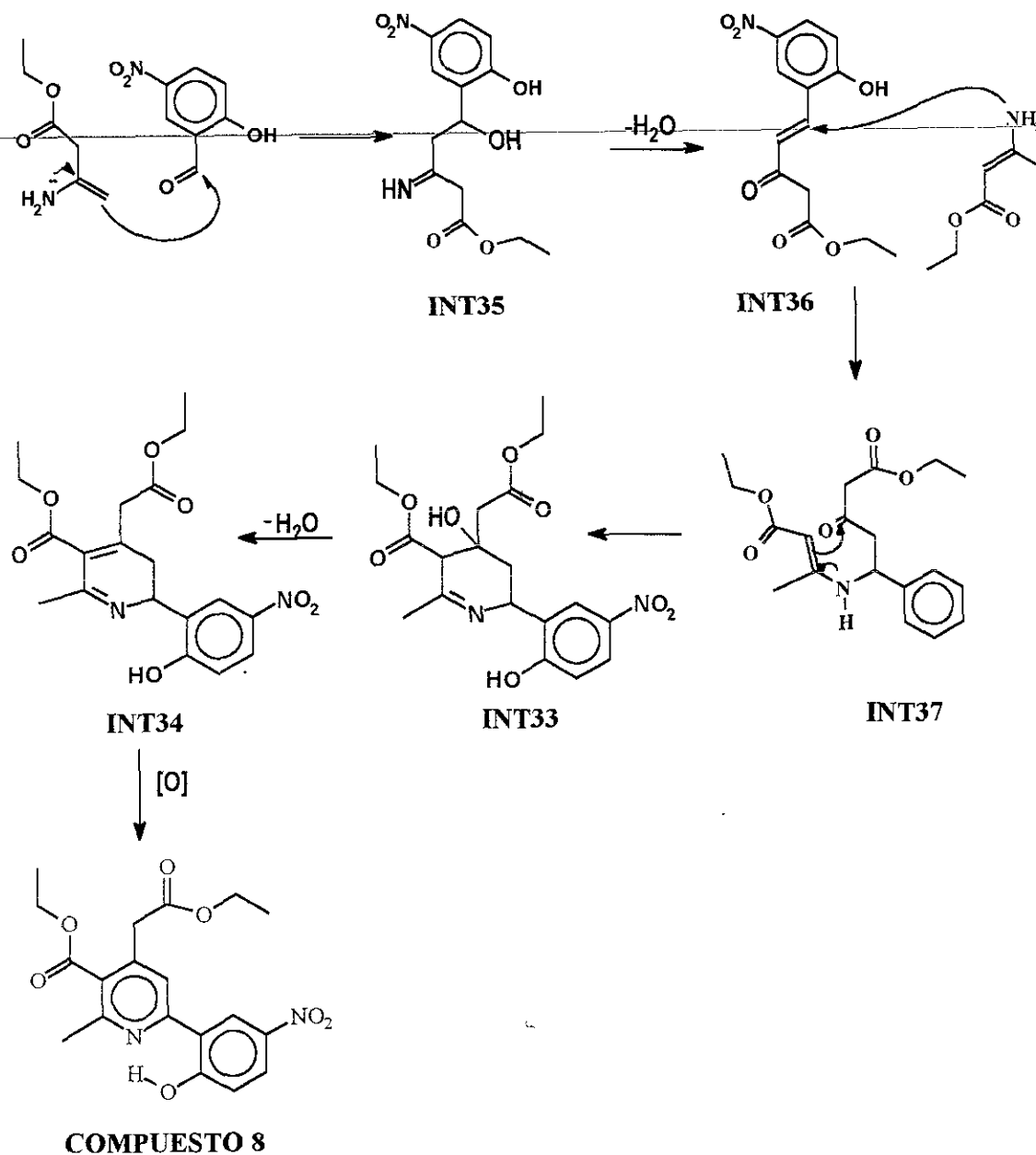


Este último intermediario se deshidrata para formar el intermediario **INT34**, que finalmente se oxida para obtener, el **compuesto 8**.



## PROPUESTA 8

Se resume ésta, en el siguiente esquema:



El primer paso de la reacción requiere de 32 Kcal/mol y consiste en el ataque nucleofílico de la enamina aislada, generándose el intermediario **INT35**.



Si comparamos los resultados de ambas propuestas se encuentra que la energía de para que ocurra la primera etapa del mecanismo de reacción no representa una diferencia significativa, dado de que sólo hay una variación de 3 Kcal/mol entre una y otra; pero por otro lado en la segunda etapa, se observa que la diferencia de energía entre las dos es de 7 Kcal/mol, que puede ser importante energéticamente hablando. Sin embargo, este análisis no resultó con diferencias tan significativas (con excepción de la antes mencionada), por lo que se puede concluir que ambas propuestas podrían ser consideradas como viables.



## **PARTE BIOLÓGICA**

En esta sección presento en primera instancia los conceptos generales de la evaluación de la actividad biológica del **compuesto 8**, en el área de enfermedades cardiovasculares, ~~específicamente de las arritmias e hipertensión y posteriormente los aspectos generales y la metodología utilizada para determinar la actividad biológica.~~

### ***I.- Actividad Biológica del compuesto 8***

#### ***Aspectos generales de antiarrítmicos.-***

Según cifras del sistema nacional de salud, en 1992 una de las principales causas de mortalidad en México fueron las enfermedades crónicas vasculares con un 13.5%. Dentro de éstas, la hipertensión arterial es la más frecuente y afecta hasta un 30% de la población mundial.<sup>41</sup>

El control de la presión arterial con fármacos antihipertensivos es una alternativa que se utiliza frecuentemente, no sólo para reducir la presión arterial sino también para prevenir otra clase de lesiones en diversos órganos. Los fármacos más empleados para el control de la presión arterial son: diuréticos, bloqueadores adrenérgicos, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, vasodilatadores y calcioantagonistas. Desde que el tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial se inició hace unos 35 años, los calcioantagonistas y en particular los derivados piridínicos se han convertido en un periodo de apenas 5 años, en el grupo de medicamentos más utilizados y se caracterizan por inhibir la penetración de iones  $Ca^{2+}$ , a través de la membrana activada de células musculares lisas de la pared vascular,<sup>43</sup> necesarios para la activación de las contracciones de la célula cardíaca. Por otro lado, se considera pertinente definir algunos términos que serán utilizados en esta sección, así tenemos :

**ISQUEMIA.-** La oclusión aguda de una arteria coronaria debida a una enfermedad arterioesclerótica o a la presencia de un trombo que origina isquemia miocárdica que trae como consecuencia infarto agudo del miocárdio. La isquemia miocárdica se define como un estado en el cual el flujo sanguíneo al miocárdio no es suficiente para proveer de oxígeno a las células, pasando de una respiración aeróbica a una glucólisis anaeróbica para producir energía.<sup>43</sup> La ausencia de flujo colateral en la isquemia severa, impide el aporte de substratos metabólicos favoreciendo la acumulación de

catabolitos en el tejido afectado.

**REPERFUSIÓN** .- Al momento que se elimina la obstrucción coronaria, ocurre una entrada abrupta de sangre que lleva oxígeno y nutrientes al tejido cardíaco. A esta entrada de sangre al miocárdio después de un período de isquemia se le denomina reperfusión.<sup>44</sup> Es al inicio del período de reperfusión en donde ocurre una entrada masiva de calcio al espacio intracelular que se traduce en:

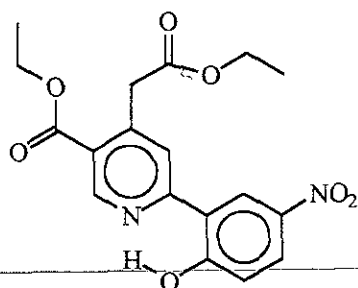
- i. Un incremento en la actividad de proteasas y fosfolipasas sensibles al calcio que origina daños estructurales en la célula miocárdica.
- ii. Producción de oxiradicales,<sup>44</sup> metabolitos altamente reactivos, de oxígeno molecular, que si se acumulan, provocan arritmias.
- iii. Estrés físico ocasionado por hinchazón osmótica y una contracción sostenida.
- iv. Activación de *ATPasa* dependiente del calcio la cual apresura la disminución de ATP.

De este modo un aumento de calcio intracelular por reperfusión ocasiona daño celular irreversible y arritmias cardíacas.

#### **CLASIFICACIÓN DE LAS ARRITMIAS CARDÍACAS.<sup>43</sup>**

- a) **Taquicardia**, significa frecuencia cardíaca rápida, mayor a 100 latidos por minuto, las tres causas principales de taquicardia son: aumento de la temperatura corporal, estimulación del corazón por el sistema nervioso simpático y estados tóxicos del corazón.
- b) **Fibrilación Auricular**, es un aleteo auricular en el que se presentan un gran número de impulsos nerviosos que se difunden en todas direcciones a través de las aurículas.
- c) **Fibrilación Ventricular**, es un aleteo ventricular en el que se presentan un gran número de impulsos nerviosos que se difunden en todas direcciones a través de los ventrículos.

Todos los calcioantagonistas inhiben la entrada de calcio al interior de la célula; sin embargo, los más selectivos son los fármacos dihidropiridínicos (Nifedipina, Nitrendipina, Felodipina, Nicardipina, etc.).<sup>45</sup> Considerando que el **compuesto 8** cumple con una serie de requisitos para considerarse como calcioantagonista, como la presencia de: ésteres, sistema aromático y un grupo nitro, se procedió a determinar el efecto antiarrítmico de la **2-metil-3-etoxicarbonil-4-etoxicarbonilmetil-6-(2-hidroxi-5-nitrofenil) piridina**.



### Compuesto 8

El modelo biológico consistió en inducir arritmias por isquemia y reperfusión miocárdica a 4 lotes de ratas Wistar macho (n=10). Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (55 mg/Kg por vía intraperitoneal), manteniéndolos con respiración asistida. Se realizaron registros electrocardiográficos con el fin de determinar la actividad cardíaca y sus cambios, además de obtener los registros de presión sanguínea mediante la canulación de la arteria femoral. Se abrió el tórax del lado izquierdo para localizar la arteria descendente anterior izquierda, la cual se ligó con hilo de seda trenzado calibre 6.0, con el fin de provocar un período de isquemia de cuatro y medio minutos y al término se retiró la oclusión, comenzando la reperfusión y observando a partir de este momento diferentes tipos de arritmias ventriculares como extrasístoles ventriculares, taquicardia ventricular y fibrilación ventricular.

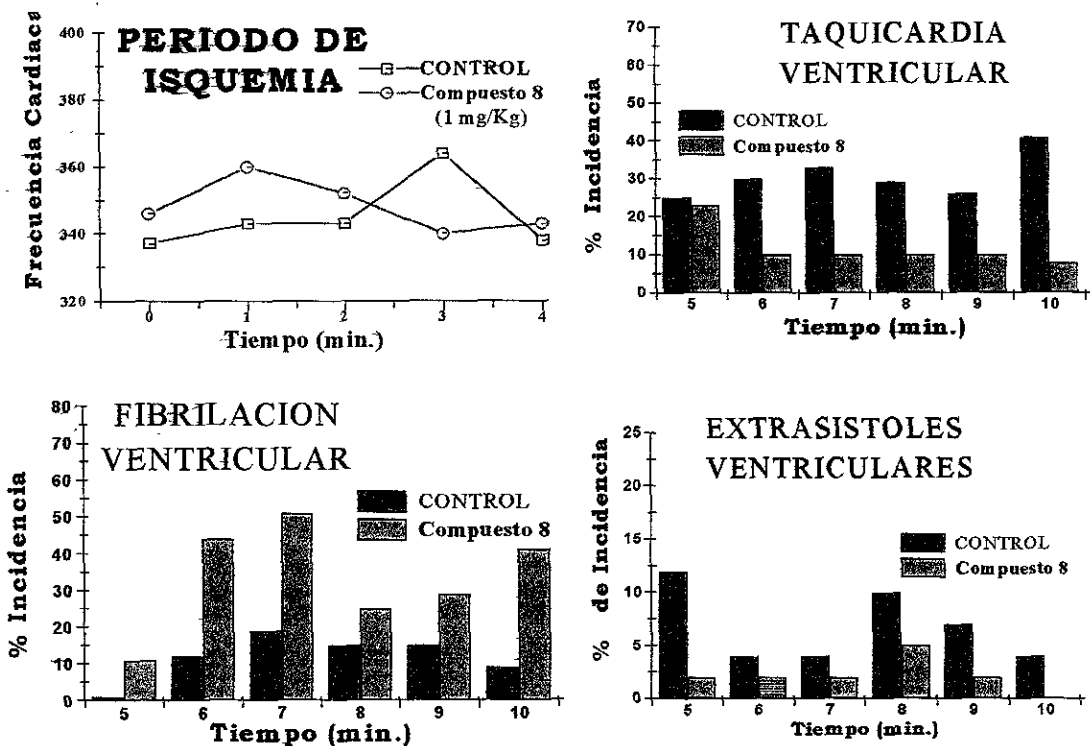
El **compuesto 8** fue administrado previamente por la vena femoral, a dosis de 1.0 mg /kg, 3.1 mg /kg, y 10.0 mg /kg, en un volumen de 0.1 mL del vehículo que consiste de 0.03 mL de acetona y 0.07 mL de propilenglicol, antes de realizar la oclusión. Una vez realizada la oclusión, se registró la actividad electrocardiográfica por espacio de 30 segundos en los primeros cuatro minutos. Cumpliendo el tiempo de isquemia se retiró la ligadura e inició el período de reperfusión, registrando su actividad a los minutos 5, 6, 7, 8, 9, 10. También se le determinó la relación entre el efecto antiarrítmico y las dosis de 1.0, 3.1 y 10.0 mg/kg, siguiendo la metodología anterior. Para el caso del grupo control, se le administró el vehículo únicamente.

### Resultados

Las gráficas 1, 2 y 3 muestran el efecto antiarrítmico del **compuesto 8** a las dosis de 1, 3.1 y 10 mg/kg de peso en comparación con su grupo control, en ellas se muestra el efecto sobre la frecuencia cardíaca en un período de 0 a 4 minutos, es decir el período de isquemia, observándose que oscila entre 365 y 339 latidos por minuto para el grupo control, mientras que para los grupos

que recibieron la dosis de 1.0, 3.1, y 10 mg/kg de peso oscila entre 365 a 340, y de 365 a 218 y de 365 a 195 lat/min respectivamente. Por otro lado, se muestra el efecto de este compuesto a diferentes dosis en relación, a la actividad antiarrítmica, mostrado por el % de incidencia de arritmias cardíacas como son; Taquicardia Ventricular (TV), Extrasístoles ventriculares (EV), y Fibrilación Ventricular (FV).

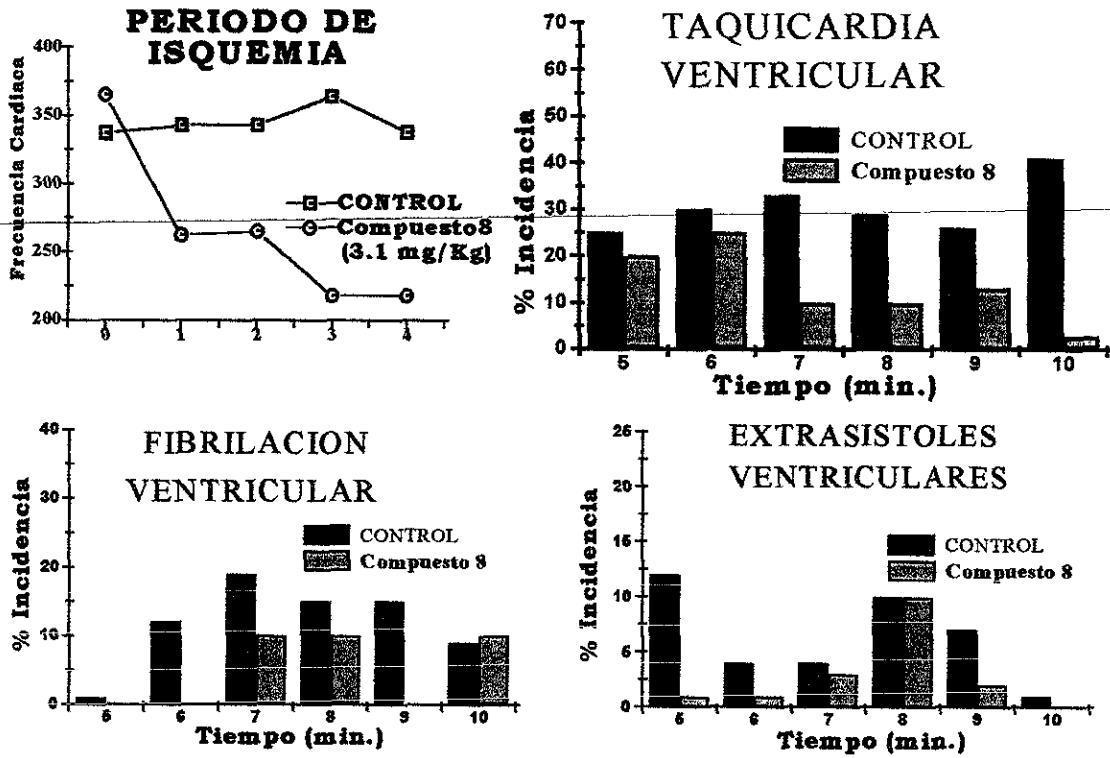
De las tres dosis evaluadas para el **compuesto 8**, se observó que sólo la dosis de 3.1 mg/kg de peso protege sobre las diferentes arritmias cardíacas obtenidas por reperfusión. El porcentaje de incidencia de arritmias cardíacas se encuentra en un intervalo del 25 % al 42 % para la TV, del 1.6 % a 12.5 % para las EV y del 0.4 % a 1.6 % para la FV, en el caso del grupo control, mientras que para el **compuesto 8** a dosis de 1.0, 3.1, y 10 mg/kg el porcentaje de incidencia para la TV es del 8 % al 24 %, 10 % al 29 %, y del 0 % al 17%; para las EV el porcentaje de incidencia es de 0 % al 5 %, 0 % al 11 %, y del 0 % al 11%, y para la FV el porcentaje de incidencia es del 11 % al 51 % y del 5 % al 30%, respectivamente.



Gráfica 1. Actividad antiarrítmica de el **compuesto 8** a una dosis de 1 mg/kg.

En esta gráfica se muestra el efecto sobre la frecuencia cardíaca en el periodo de ischemia comparado con el grupo control. Posteriormente se observa el efecto de este compuesto sobre los diferentes tipos de arritmias cardíacas, entre ellas la taquicardia ventricular, extrasístoles

ventriculares y fibrilación ventricular.



Gráfica 2. Actividad antiarrítmica del **Compuesto 8** a una dosis de 3.1 mg/kg.

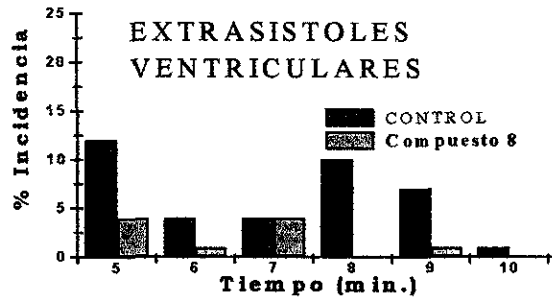
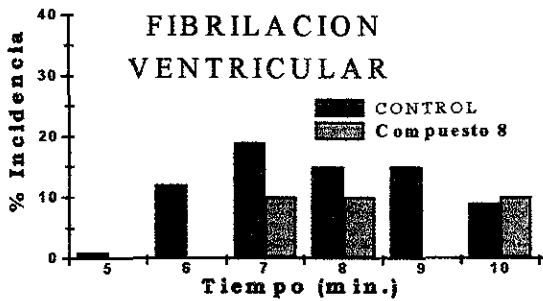
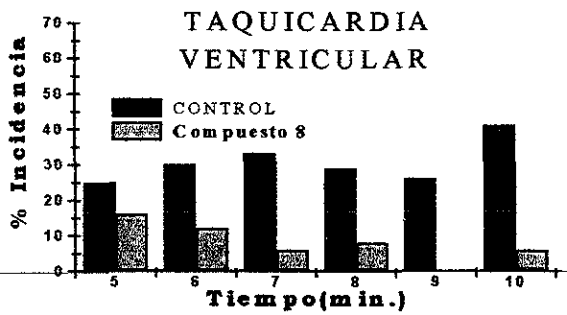
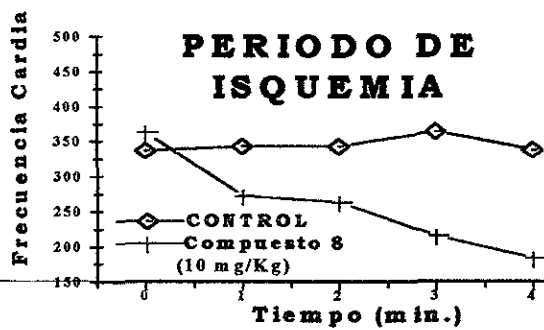
En esta gráfica se muestra el efecto sobre la frecuencia cardiaca en el periodo de isquemia comparado con el grupo control. Posteriormente se observa el efecto de este compuesto sobre los diferentes tipos de arritmias cardíacas, entre ellas la taquicardia ventricular, extrasístoles ventriculares y fibrilación ventricular.

GOVERNMENT

The Government of the State of New York, in and through the Department of Education, has the honor to acknowledge the receipt of your letter of the 10th day of June, 2010, regarding the above-captioned matter.

The Department of Education is currently reviewing the information provided to it and will advise you of the results of its review as soon as possible.

Very truly yours,  
 Commissioner of Education



Gráfica 3. Actividad antiarrítmica del **Compuesto 8** a una dosis de 10 mg/kg.

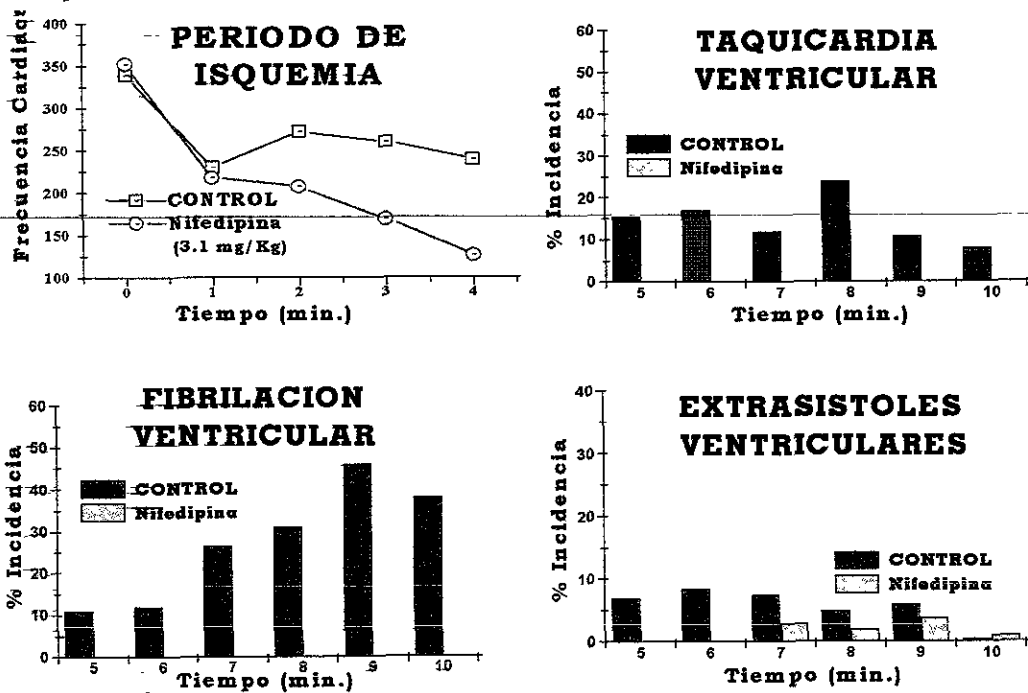
En esta gráfica se muestra el efecto sobre la frecuencia cardiaca en el período de isquemia comparado con el grupo control. Posteriormente se observa el efecto de este compuesto sobre los diferentes tipos de arritmias cardíacas, entre ellas la taquicardia ventricular, extrasístoles ventriculares y fibrilación ventricular.

Se observa que el **compuesto 8**, posee propiedades protectoras sobre las arritmias cardíacas a una dosis de 3.1 mg/Kg, por lo que resulta un candidato alternativo en el tratamiento de las alteraciones en ritmo cardíaco.

Con la finalidad de comparar estos resultados con un principio activo comercial, se realizaron los mismos estudios con la Nifedipina, la cual contiene en su estructura los requerimientos antes mencionados. Los resultados son los siguientes:

La gráfica 6 muestra el efecto antiarrítmico de la Nifedipina de Bayer a una dosis de 3.1 mg/Kg de peso en comparación con su grupo control, en ella se muestra el efecto sobre la frecuencia cardiaca, en el período de isquemia, observándose que oscila entre 353 a 126 lat/min. Por otro lado se muestra el efecto de este compuesto a la dosis de 3.1 mg/kg, en relación a la actividad antiarrítmica mostrado por el porcentaje de incidencia de las diferentes arritmias cardíacas. Para este compuesto se observó que a la dosis de 3.1 mg/kg protege de las arritmias cardíacas obtenidas

por reperfusión. El porcentaje de incidencia para la EV es del 0 % al 4 %, para la TV y FV es del 0%.



Gráfica 6. Actividad antiarrítmica de la Nifedipina a una dosis de 3.1 mg/kg.

En esta gráfica se muestra el efecto sobre la frecuencia cardiaca en el período de isquemia comparado con el grupo control. Posteriormente se observa el efecto de este compuesto sobre los diferentes tipos de arritmias cardiacas, entre ellas la taquicardia ventricular, extrasístoles ventriculares y fibrilación ventricular.

Comparando la actividad de la nifedipina ( compuesto comercial), contra el compuesto experimental, se observa que los resultados son semejantes; sin embargo, los estudios de toxicidad comparativa, se determina que la nifedipina presenta mayor índice de toxicidad que el **compuesto 8**. La toxicidad se determinó en base a pruebas hematológicas, para lo cual se administraron las sustancias por vía subcutánea a una dosis de 100  $\mu$ g/Kg y se realizaron las siguientes mediciones: concentración de hemoglobina, hemetocrito y fagocitosis. Todos los estudios se realizaron con grupos de 10 ratones c/u y con un grupo control al cual se administró el vehiculo (agua-DMSO), los resultados son los siguientes:



Prueba	Control	Nifedipina	Compuesto 8.
[C] Hemoglobina	12.37	12.18	13.61
Hematocrito	36.41	35.83	40.2
[C] de Eritrocitos	6.098	6.06	6.86
Actividad Fagocítica	1	-0.701	0.018

Los resultados obtenidos muestran una variación no significativa en los tres primeros estudios con respecto al control, pero si observamos la última prueba de actividad fagocítica, es de notar que la Nifedipina provocó una supresión mayor en esta actividad, lo que se traduce en un efecto inmunotóxico mayor que el **compuesto 8**, el cual a pesar de también provocar supresión, ésta no fue de la magnitud de la nifedipina. Por otro lado, los estudios que se realizaron a nivel del efecto macro y microscópico, de órganos de animales tratados crónicamente con el **compuesto 8** por 6 meses, indican que no éste presenta efectos nocivos a hígado, cerebro, bazo y corazón. Cabe mencionar que estos estudios son aún preliminares, y para concluir que el **compuesto 8** se convierta en una alternativa terapéutica, se requiere de una mayor cantidad de estudios, los cuales en este momento se llevan a cabo.

## **II.- Actividad Biológica del compuesto 9.-**

### **Aspectos Generales.-**

Actualmente no existe una nomenclatura sencilla que describa convenientemente las acciones inmunofarmacológicas de las sustancias que tienen actividad en el sistema inmune; la mayoría de los agentes son clasificados como inmunoestimulantes; sin embargo, el contexto en el que ocurre la estimulación varía ampliamente.<sup>46</sup> La forma más común de producir estimulación es en combinación con el antígeno lo cual generalmente se refiere como acción adyuvante.<sup>47</sup> Es útil disociar la respuesta inmune celular de la respuesta de anticuerpos T-dependientes ya que difieren en su forma de modulación. La respuesta de células B requiere una fase inductiva de 24 hr dependiente de células T-cooperadoras y macrófagos antes de su activación. Los adyuvantes de las respuestas de células B son dependientes de células T como los muramildipéptidos, las endotoxinas y los polinucleótidos. La respuesta de células T difieren de las respuestas de células B en el inicio

de los procesos involucrados, los agentes inmunoterapéuticos no han sido cuidadosamente analizados en este respecto, por esto los adyuvantes de células T han sido recientemente reconocidos como una clasificación independiente.

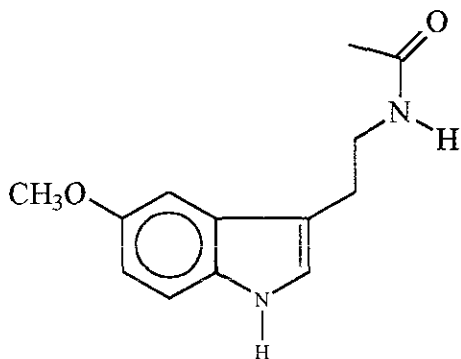
Un rasgo importante acerca de los inmunoestimulantes, es su capacidad de aumentar no sólo la formación sino el número de células del sistema retículo endotelial (SRE). Esta acción predice el incremento en la eliminación de partículas y patógenos a nivel intravascular e incrementa la resistencia a patógenos, particularmente aquellos que infectan el SRE. Otro grupo en el contexto de la Inmunofarmacología y particularmente inmunorestauración, incluye las hormonas tiroideas y las drogas timomiméticas. Las hormonas tiroideas tienen como rasgos generales, la capacidad de aumentar una variedad de funciones inmunológicas celulares, particularmente en el ratón atímico, o después de la supresión del sistema de células T como el cáncer, la vejez, etc.

La inducción de interferones (IFN) es otro rasgo común de acción de los agentes inmunoterapéuticos. Los interferones están implicados en el fenómeno inmunoregulatorio llevando a la activación de células NK y macrófagos para eliminar las células tumorales. Agentes tales como las glicanas, los polinucleótidos y los pirimidinóles inducen IFN. Otro aspecto frecuentemente observado de los compuestos inmunológicamente activos es la capacidad inmunomoduladora, esto es estimular en una dosis e inhibir en otra (usualmente más alta). Generalmente cualquier sustancia a una dosis suficientemente alta puede tener efectos inhibitorios, por lo tanto es importante distinguir si los efectos inhibitorios representan una acentuación fisiológica de los mecanismos supresores, efectos antiproliferativos en linfocitos, efectos inmunotóxicos específicos o toxicidad no específica.

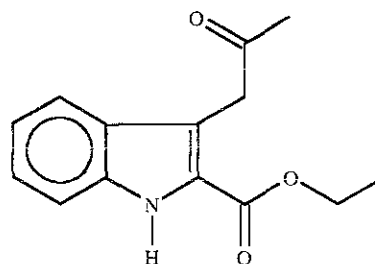
Otra forma útil de agrupar a los agentes es por medio de su capacidad para activar algunos de los sistemas de nucleótidos cíclicos (AMP o GMP cíclicos). Existe mucha evidencia de que estos agentes, al incrementar el GMP cíclico estimulan la formación de linfocitos, macrófagos y granulocitos incluyendo la proliferación, la secreción y la motilidad y los agentes que incrementan el AMP cíclico generalmente inhiben estas funciones pero promueven otras como la diferenciación de células T<sup>48</sup>

Además de definir su actividad a nivel del Sistema Inmune es necesario que los candidatos a agentes inmunoterapéuticos sean analizados en su farmacocinética, farmacodinamia, relación dosis-respuesta, toxicología y efectos colaterales y vías de administración para finalmente definir todos los aspectos farmacéuticos para el desarrollo del producto final que saldrá al mercado.

Por otro lado, está reportado que los indoles presentan actividad biológica como antipsicóticos<sup>50</sup> anticonvulsiantes relajantes musculares y axiolíticos,<sup>51</sup> neuroprotectores y antiinflamatorios.<sup>52</sup> Es importante mencionar que algunos indoles presentan una marcada actividad biológica, como lo es la melatonina, hormona producida por la glándula pineal y que ha sido ampliamente estudiada, ya que se ha determinado su influencia en el sistema inmune.<sup>53</sup> Dada la semejanza estructural del **Compuesto 9** con aquéllos que presentan actividad biológica semejante, se realizaron pruebas para determinar la actividad inmunoestimulante, así como pruebas de inmunotoxicidad. Los métodos utilizados se presentan a continuación.



Melatonina



Compuesto 9

## MÉTODOS:

A.- Ensayo de la actividad fagocítica de granulocitos *in vitro*.

Fundamento.- El concepto de fagocitosis está basado en la capacidad de las células del sistema retículo endotelial de eliminar partículas extrañas. En este caso el elemento extraño es el carbón coloidal que se administra a la muestra de células en el cultivo. Su medida indica si el sistema inmune se encuentra estimulado, normal o deprimido, dependiendo de la velocidad y capacidad de eliminación del cuerpo extraño.

1. Método.

a. Preparación de granulocitos. Se obtiene sangre completamente fresca de individuos sanos y se deja sedimentar a través de dextrán (sangre:dextrán = 2:1) por 30 min. a 25°C y se somete a centrifugación con Ficoll-Hypaque (20min a 1500xg). El sobrenadante resultante se descarta, la pastilla leucocitaria se resuspende en medio RPMI, se centrifuga por 10min. a 400xg, se lava y se

resuspende en medio RPMI y se ajusta la densidad a  $3 \times 10^6$  células/mL.

b. Preparación de levadura de pan. La levadura de pan se suspende en solución salina 0.9%, se calienta por 30 minutos en un baño de agua hirviendo, se filtra dos veces a través de una gasa estéril y se ajusta a una densidad de  $3.7 \times 10^7$ .

c. Incubación de la mezcla.

1.- 200 mL. de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (control) por 200 microlitros de la solución de la muestra (preferiblemente de 4 a 6 concentraciones tales como 100, 10, 1, 0.1 mg en PBS).

2.- 200 microlitros de suspensión de granulocitos.

3.- 200 microlitros de suero opsonizador (de 5 donadores sanos y diluido 1:10 con 0.9% de salina).

4.- 200 microlitros de células de levadura.

Estas muestras se incuban en baño de agua a  $37^\circ\text{C}$  por 10 minutos con agitación suave, y después la fagocitosis es terminada añadiendo EDTA. De cada mezcla incubada se transfieren 500 mL se transfieren al portaobjetos, se secan a temperatura ambiente y se tiñen usando el método Pappenheim. Usando el microscopio con aceite de inmersión, se determina el número de partículas ingeridas por granulocito contando 200 a 300 células.

d. Cálculos

Índice de fagocitosis (IF) = suma de partículas ingeridas / número de granulocitos.

% de fagocitosis (estimulación o supresión) =  $(IF_{\text{muestra}} - IF_{\text{control}}) \times 100 \times IF_{\text{control}}$

#### PLACAS HEMOLÍTICAS DE CUNNINGHAM<sup>54</sup>

Para evaluar la actividad inmunoestimulante de estos productos se utilizó la técnica de células formadoras de placas hemolíticas bajo el siguiente diseño experimental. Se formaron 6 lotes de 4 ratones cada uno; un ratón se uso de control negativo, otro de control positivo y los dos restantes fueron tratados con el **compuesto 9**. A los ratones con el producto se les administró 50 mg/Kg de peso durante 5 días consecutivos y en el 2° y 4° día de tratamiento se les administró 0.5 mL de eritrocitos de carnero al 2% por vía subcutánea. A los controles positivos se les administró en el 2° y 4° día 0.5 mL de eritrocitos de carnero al 2%. Al 6° día de tratamiento todos los ratones fueron sacrificados para realizar la técnica de Cunningham (4), la cual consiste en colocar una

muestra de sangre del animal sacrificado entre dos portaobjetos, la cual fluirá capilarmente entre estos, observándose la formación de placas en el caso de actividad hemolítica.

Con la intención de establecer si el compuesto químico presenta actividad biológica como agente inmunoterapéutico así como determinar si presenta una toxicidad importante a nivel celular se realizaron primero pruebas de fagocitosis y generación de placa hemolíticas de acuerdo con técnicas descritas.<sup>47</sup>

carnero	conejo	ratón	humano
> 5 mg/mL	> 5 mg/mL	> 5 mg/mL	0.5 mg/mL

Los resultados del efecto del **compuesto 9** en el % de fagocitosis de las células blancas de sangre periférica es el siguiente:

Muestra	% de Fagocitosis
Controles	85 +/- 8.0
Indol	89 +/- 5.0

Esta técnica mide el grado en que las células son capaces de fagocitar un elemento extraño al organismo, respuesta directamente ligada a los fenómenos de defensa, es decir a la eficacia del sistema inmune, de tal manera que a mayor respuesta fagocítica, mayor respuesta inmunológica y como se puede observar en los resultados obtenidos en los experimentos, la respuesta fagocítica se incremento en un rango del 4%, aumento que nos indica la viabilidad del compuesto para continuar los estudios que indiquen de una manera significativa a que nivel se encuentra su actividad biológica. En este caso la materia extraña que se administró fue carbón activado.

#### **Evaluación Inmunotoxicológica de 3-(2-oxopropil)-1H-indol-2-carboxilato de etilo.**

Finalmente se determinó el efecto en la producción de placas hemolíticas con eritrocitos de bazo de ratón para determinar el grado de toxicidad del **compuesto 9**; la metodología se muestra a continuación:

Se toman muestras de sangre de distintas especies ( ratón, carnero, conejo y humano), las cuales son mezcladas con EDTA. Cada muestra se lava con una solución de Alserver's ( buffer de fosfatos, pH=6.1), se centrifuga a 1500 rpm durante 20 min. Las muestras se lavan en dos

ocasiones más con SSE para eliminar el Alserver's y se centrifugan una vez más a 1500 rpm durante 20 min y se elimina el sobrenadante.

b) Se preparan 30 mL de cada una de las muestras una suspensión de eritrocitos al 2% en solución salina fisiológica y por otro lado, se prepara una solución salina fisiológica una suspensión del compuesto a evaluar a diferentes concentraciones, estas muestras se incuban a 37°C y se toman 100 mL de esta suspensión para ser colocadas en los pozos de las placas los cuales contienen los eritrocitos. El testigo control consiste de los vehículos utilizados en esta prueba sin el compuesto químico.

c) Una vez realizada esta operación, las placas se sellan con papel parafilm y se incuban por espacio de dos horas, tiempo en el cual se leen los resultados obtenidos y se vuelve a tomar otra lectura de los mismos después de 24 horas

Muestra	No de Placas Hemolíticas
Control (solo eritrocitos)	100 +/- 15
Control (nada)	0
Indol (100 mg/mL )	100 +/- 15

En este caso la técnica consiste en someter un cultivo celular a una concentración conocida de la sustancia química y en donde dichas células al entrar en contacto con dicho compuesto, reaccionarían provocando una hemólisis, manifestándose como placas sobre el cultivo, cabe señalar que esta técnica es más sensible que la hemólisis, por lo que de igual manera se establece que el indol presenta una baja toxicidad.

Aunque el aumento en la actividad fagocítica no fue significativo, los resultados muestran que dicha actividad aumentó, y para determinar con certeza si el compuesto químico actúa a otro nivel, se procedió a realizar estudios en timo, que como se sabe, es el órgano responsable de la respuesta inmune, encontrándose un aumento en su tamaño, en un 18%, ( de 0.148 g a 0.175 g) en animales a los cuales se les administró una dosis de 100 µgr/Kg. La metodología utilizada fue la siguiente: se administró el **compuesto 9** a lote de 8 ratones en una única dosis de 100 µgr/Kg vía intraperitoneal manteniendo a dos ratones como testigos a los cuales sólo se les administró solución salina. Después de 8 horas de haber sido administrado el compuesto, los animales fueron

sacrificados, observando que el timo se encontraba crecido comparativamente con respecto a los testigos. Se tomaron muestras de 1.5 cm<sup>3</sup> de este órgano que fueron colocadas en formol al 10% de una solución amortiguadora de fosfatos, se tomaron posteriormente cortes de 5μ y se ocluyeron en parafina para ser montados en portaobjetos, los cuales finalmente se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron observados al microscopio, estos resultados preliminares muestran una marcada influencia sobre el timo, que es uno de los órganos primarios en el sistema inmunológico y que está encargado de la producción y diferenciación de los linfocitos; además, en este órgano las células T se multiplican y reproducen; siendo estas últimas las responsables de la actividad inmune de los organismos superiores.

Por otro lado, los resultados toxicológicos del indol, muestran prácticamente una nula actividad tóxica a nivel celular, al determinar daños celulares sólo a muy altas concentraciones, es decir a más de 5 mg/mL para los casos de las células de carnero, conejo y ratón y de 0.5 mg/mL en células humanas. Estos resultados nos han permitido establecer los parámetros importantes en la viabilidad para que un compuesto químico pueda ser considerado como alternativa terapéutica, por lo que en este caso los estudios continuaran con pruebas más sofisticadas y sensibles, de tal manera que tengamos la certeza de la efectividad de este compuesto.

## **Conclusiones.**

1.- De las reacciones efectuadas en este trabajo de investigación, se logró el aislamiento de 12 compuestos de los cuales 6 de ellos no han sido descritos anteriormente. ( **Compuestos 1, 3, 6, 8, 10 y 12** )

2.- Apoyándose con programas especializados en cómputo, se calcularon los desplazamientos químicos de los compuestos propuestos y fue posible la asignación de la estructura.8

3.- Se determinó que la 2-nitro-2,6-dimetil-3,5-dicarbetoxi-1,4-dihidropiridina, produce con el tratamiento con cloruro estanoso, en medio ácido, un indol, mientras que su isómero 1,2-dihidropiridínico produce bajo las mismas condiciones quinolinas. Se propusieron los mecanismos de reacción que explican la formación de los productos.

4.- Aplicando mecánica molecular y mecánica cuántica se realizaron los cálculos teóricos de algunos intermediarios claves en los diferentes mecanismos de reacción, que ayudaron a reforzar o eliminar las propuestas realizadas.

5.- Se determinó la actividad biológica de dos de los compuestos aislados, el **compuesto 8** posee propiedades protectoras sobre las arritmias cardíacas a una dosis de 3.1 mg/Kg, por lo que resulta en este momento un candidato viable en el tratamiento de enfermedades del miocardio, ya que este compuesto es menos tóxico con respecto a la nifedipina, medicamento comercial ya que no presenta una disminución importante en el fenómeno de inmunosupresión; sin embargo es necesario continuar con las siguientes fases del desarrollo de nuevos principios activos, tales como la fase preclínica y clínica.

6.- Finalmente, el **compuesto 9**, presenta actividad biológica como inmunoestimulante, ya que en los estudios preliminares de este compuesto, que aumenta el tamaño del timo, órgano responsable de la respuesta inmune, así mismo se encontró un aumento ligero en la actividad fagocítica. En este caso los estudios continúan con la finalidad de establecer con certeza la eficacia en este tipo de mecanismo de reacción.



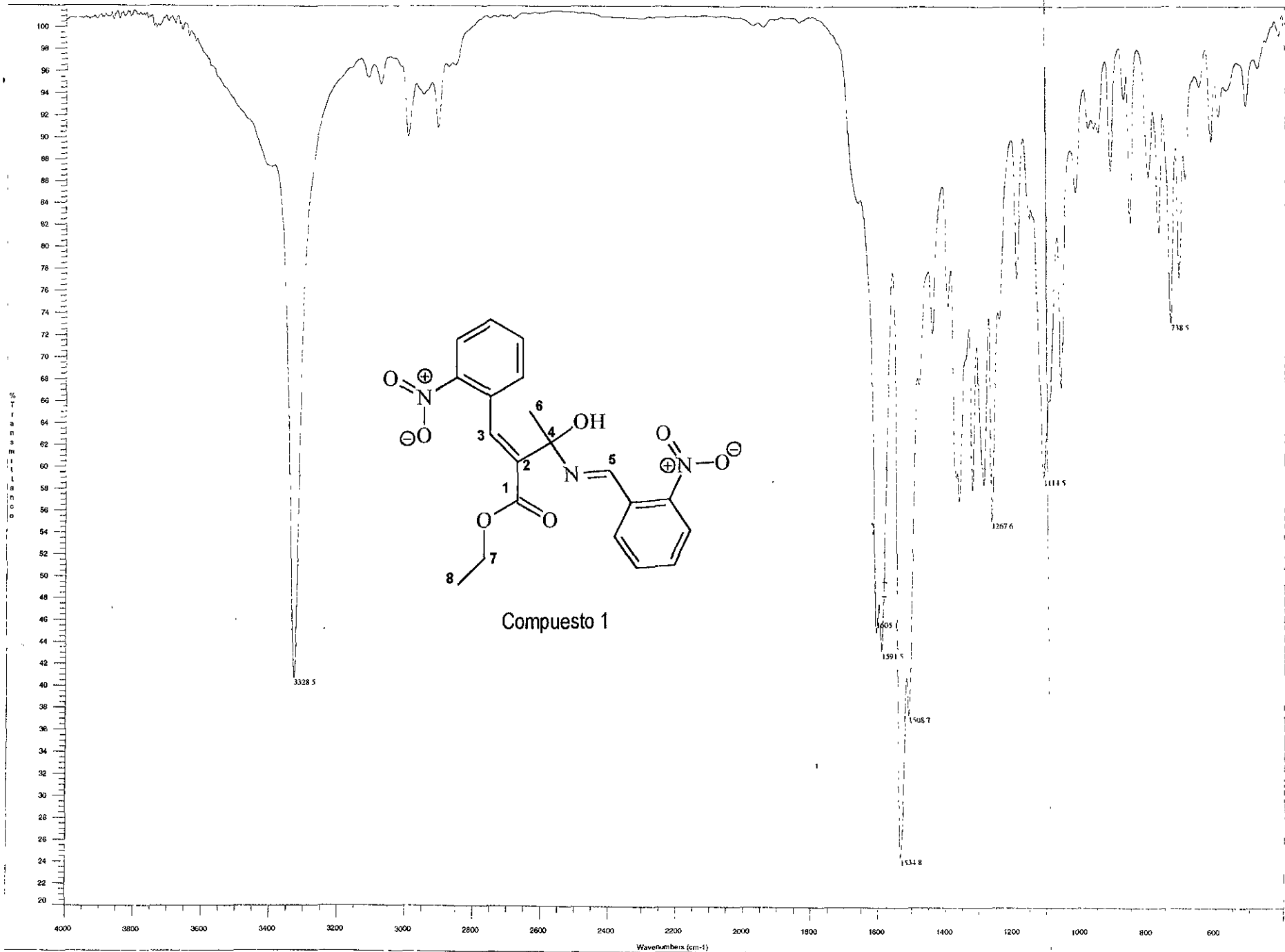
## Referencias

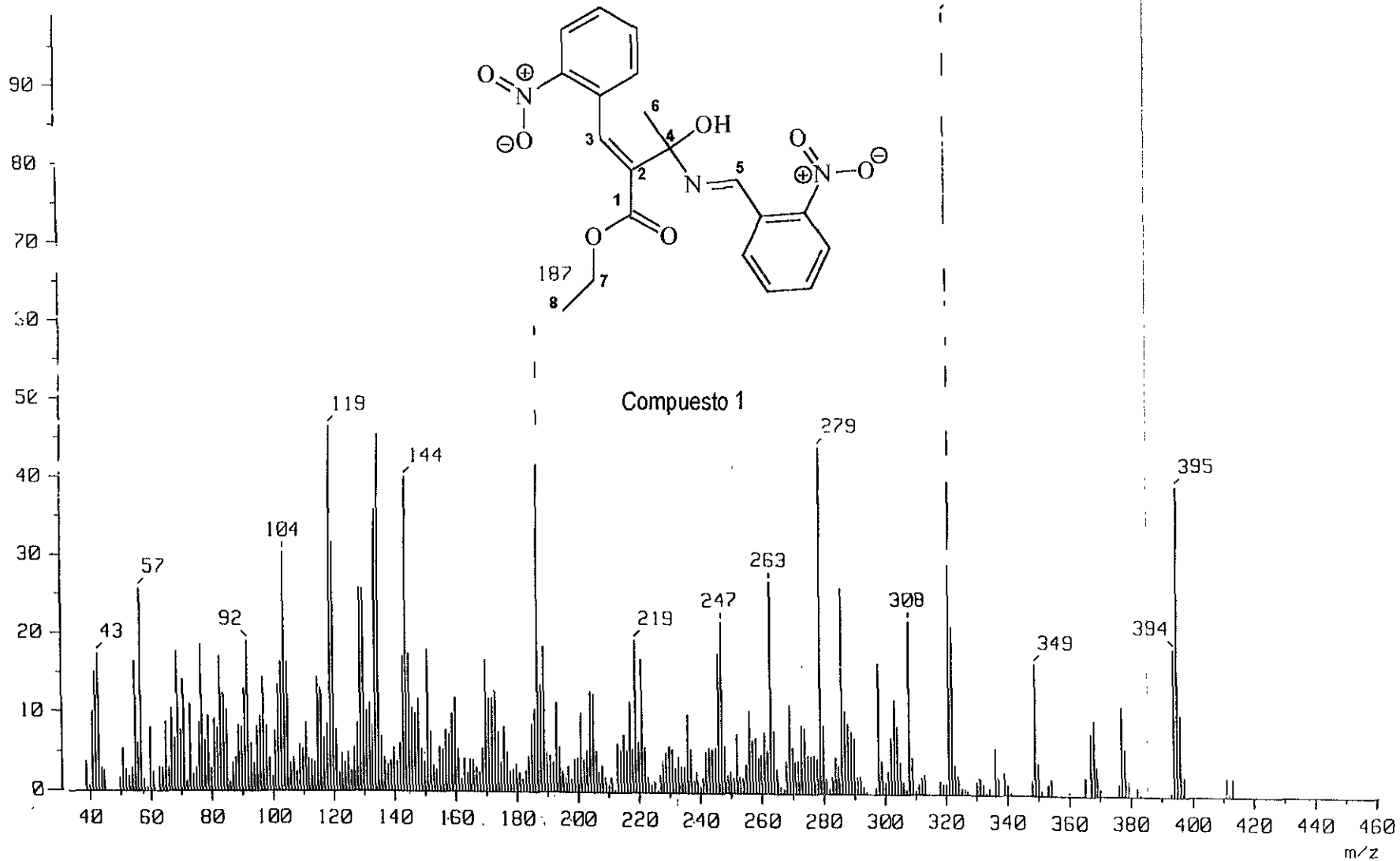
- 1.- a) H. J. Federsel, *Chemtech*, **23**, 24, 1993; b) D. L. Sackett, W. M. Rosenberg, J. A. Muir-Gray, R. B. Haynes, W. S. Richardson, *Brit. Med. J.*, **312**, 126, 1997; c) S. Garattini, *Science*, **275**, 87, 1997.
- 2.- E. Reis-Arndt, *Drugs Made Ger.*, **26**, 130, 1983.
- 3.- C. E. Bugg, W. M. Carson, J. A. Montgomery, *Scientific American*, 60, Dec. 1993.
- 4.- A. Hantzsch, *Ann.Chem.*, **215**, 1, 1882.
- 5.- U. Eisner, J. Kuthan, *Chem. Rev.*, **72**, 1, 1972.
- 6.- a) M. W. Roomi, S. F. MacDonald, *Can. J. Chem.*, **48**, 1689, 1970; b) V. Kameswaran, B. Jiang, *Synthesis*, 530, 1997.
- 7.- F. Delgado, C. Alvarez, O. García, G. Penieres, C. Márquez, *Synth. Commun.*, **21**, 2127, 1991.
- 8.- A. Sakurai, H. Midorikawa, *J. Org. Chem.*, **34**, 3612, 1969.
- 9.- a) A. Sakurai, Y. Motomura, H. Midorikawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 973, 1973.; b) A. Sakurai, Y. Motomura, H. Midorikawa, *J. Org. Chem.*, **37**, 1523, 1972.
- 10.- J. Svetlik, F. Turecek, V. Hanus, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 563, 1987.
- 11.- A. Sakurai, H. Midorikawa., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2025, 1975.
- 12.- C. N. O'Callaghan, *Synthesis*, 136, 1986.
- 13.- K. Rajyalakshmi, V. Srinivasan, *J. Heterocyclic. Chem.*, **17**, 1737, 1980
- 14.- J. Svetlik., F. Turecek, V. Hanus, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2053, 1988.
- 15.- C. N. O'Callaghan, *Synthesis*, 499, 1987.
- 16.- J. Barluenga, M. Tomás, J. A. López, E. Rubio, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 3981, 1997.
- 17.- P. Molina, A. Pastor, M. J. Vilaplana, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 8283, 1997.
- 18.- a) R. A. Houghten, A. Nefzi, J. Ostresh, *Chem. Rev.*, **97**, 446, 1997.; b) O. Hayashida, Y. Murakami, J. Kikuchi, Y. Hisaeda, *Chem. Rev.*, **96**, 721, 1996; c) J. A. Ellman, L. Thompson, *Chem. Rev.*, **96**, 555, 1996.

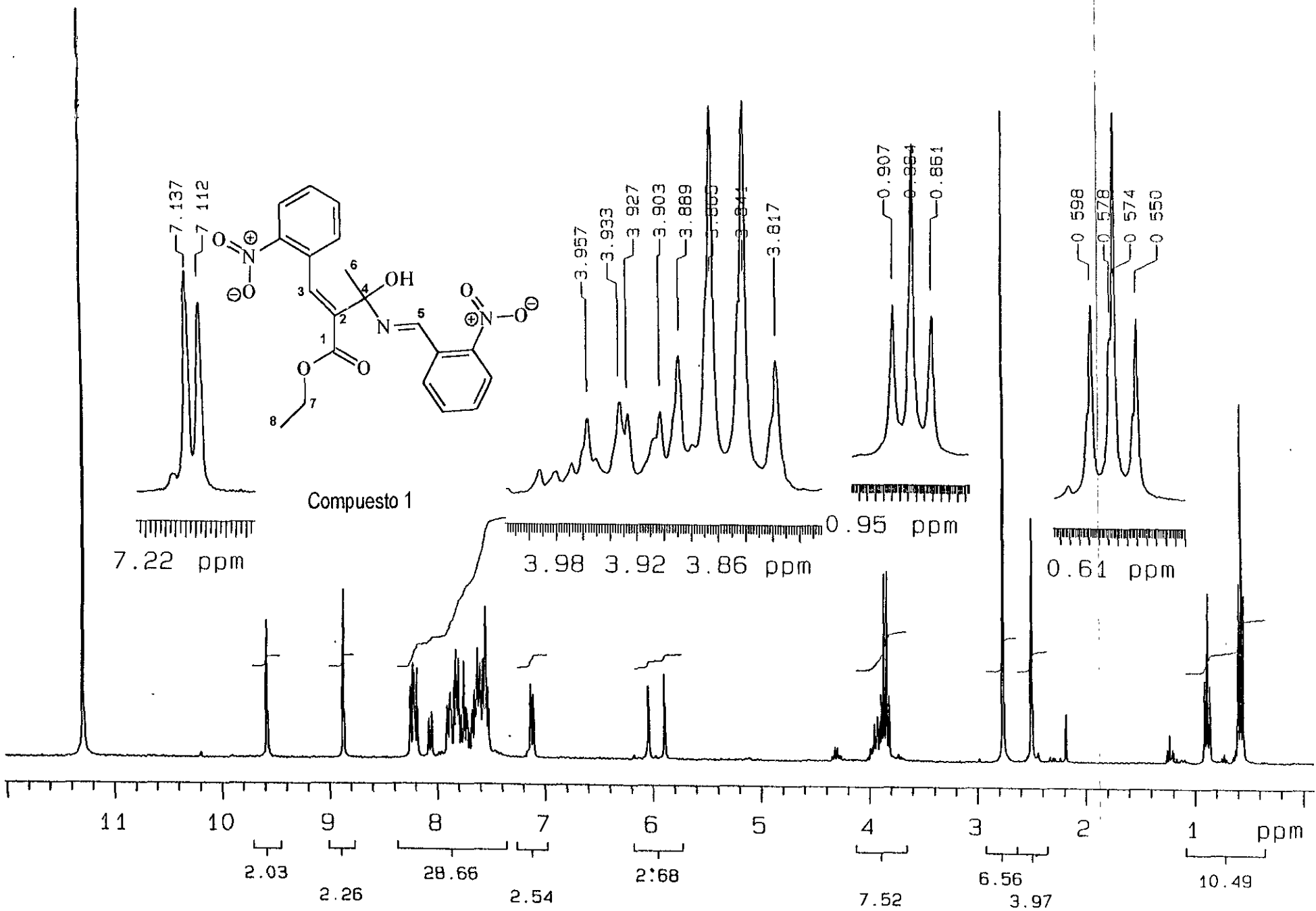
- 19.- a) L. Toung, R. Chung, K. Khashar, T. Tim., *Can. Pat. Appl. CA*, 2,188,071, 1997; *CA*, **127**, 90648d, 1997; b) K. Jacobson, J. L. Jiang, Y. C. Kim, Y. Karton, A. Van Rhee, *PCT Int., Appl. WO*, 97 27,177, 1997, *CA*, **127**, 190650y, 1997; *CA.*, **126**, 4706z, 1997.
- 20.- F. Mendizabal, R. R. Contreras, *Int., Quantum Chem.*, **26**, 751, 1992.
- 21.- a) I. Fleming, *"Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions"*, Wiley, 1976; b) T. H. Lowry, K. S. Richardson, *"Mechanism and Theory in Organic Chemistry"*, Harper and Row Publ. 2<sup>ed</sup>, 1981.
- 22.- J. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **6**, 16, 1967.
- 23.- **PIMMS, ASP**, software desarrollado y distribuido por Oxford Molecular Ltd., 1993.
- 24.- Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., Stewart, J. J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3902, 1985
- 25.- **Spartan** Ver 5.0, Wavefunction Products, 1998
- 26.- **Hyperchem** Ver 5.01, Hypercube, 1996.
- 27.- **UNICHEM**, Ver 4.01, developed and distributed by Oxford Molecular Ltd., 1998.
- 28.- Advanced Chemistry Development, Inc, 1997.
- 29.- a) L. E. Hinkel, E. E. Aylung, W. H. Morgan, *J. Chem. Soc.*, 1835, 1931; b) I. Menconi, E. Angeles, R. Martínez, *J. Heterocyclic Chem.*, **32**, 831, 1995.
- 30.- A. Bassett, N. Luheshi, S. M. Salem, R. K. Smalley, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 6561, 1990.
- 31.- a) A. P. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 4003, 1949; b) B. E. Norcross, G. Clement, M. Weistein, *J. Chem. Ed.*, **46**, 694, 1969; c) D. M. Stout, A. I. Meyers, *Chem. Rev.*, **82**, 223, 1982; d) A. Katritzky, D. O. Ostercamp, T. I. Yousaf, *Tetrahedron*, **43**, 5171, 1987.
- 32.- M. S. Morales-Ríos, J. Espinera, P. Joseph-Nathan; *Mag. Res. Chem.*, **25**, 377, 1987.
- 33.- D. H. Kim, *J. Heterocycl. Chem.*, **23**, 1471, 1986.;
- 34.- P. Friedlander, C. F. Gohring, *Ber.* **16**, 1833, 1883.
- 35.- a) D. Sicker, G. Mann, *Z. Chem.*, **25**, 365, 1985; b) D. Sicker, A. Rabe, A. Zakrzewski, G. Mann; *J. Prakt. Chem.*, **329**, 1063, 1987.
- 36.- Y. Hamada, M. Sugiura, M. Hirota, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 2893, 1981

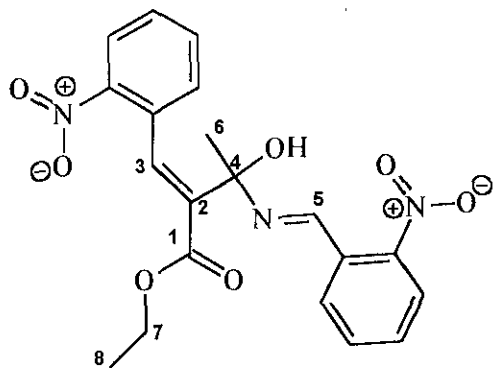
- 37.- T. Higashino, Y. Nagano, E. Hayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 1943, 1973.
- 38.- a) P. J. Wepplo, Eur. Pat. Appl. EP 95, 104; US Appl. 381,817; US, 4,474,692; b) D. R. Maulding, R. F. Jr Doehner, Pat US, 4,459,408, Appl. 381,813; Pat US 4,656,283 US Appl. 381,815 mayo 1982; Pat US, 4,925,944 Appl. 326,846 marzo 1989; Pat US 4,910,327 Appl. 329,736 marzo 1989.
- 39.- Pat Ger Offen, DE 3,412,292 Appl. 1984; Pat Rom RO, 89,707 Jun 1986, Appl 114,269, abril 1984
- 40.- a) S. Obika, T. Nishiyama, T. Tatematsu, M. Nishimoto, K. Miyashita, T. Imanishi, *Heterocycles*, **44**, 537, 1997; b) J. Bedat, N. Ple, G. Dupas, J. Bourguignon, G. Queguiner, *Tetrahedron: Asymetry*, **6**, 923, 1995; c) A. Katoh, S. Naruse, J. Ohkanda, H. Yamamoto, *Heterocycles*, **45**, 1441, 1997, d) D. M. Stout, A. Y. Meyers, *Chem. Rev.*, **82**, 223, 1982.
- 41.- Canifarma, Industria Farmacéutica, No. 43, 48, 1994,.. Sociedad de Hipertensión Arterial en México, A.C. Programa de Actualización Médica Permanente en Hipertensión Arterial, 1992.
- 42.- a) Patrick, G. L., Kinsman, O. S. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **31**, 615-624, 1996.; b) Hernandez-Gallegos, Z., Lehmann F., P.A., Hong, E., Posadas, F., Hernandez-Gallegos, E., *ibid*, **30**, 355-364, 1995.; c) Dolle, F., Hinnen, F., Valette, H., Fuseau, C., Duval, R., Peglion, J., Crouzel, C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **5**, 749, 1997.
- 43.- Guyton, C.A., "Tratado de Fisiología Médica", Editorial Interamericana, México, D.F. 6a. Edición, 1984, p. p. 179-244.
- 44.- M.Bernier, D.Hearse, *J.Am.Physiol.*254, H862, 1988; D.Hearse, *J.Cardiarase Drugs Ther.*, **5**, 853, 1991.
- 45.- a) Kronenberg G., Wuppertal, RFA, **19**, 36, 1990; b) Meyer, H., Wehinger, E., "Cardiovascular Drugs", **17**, 151, Wiley Interscience Publications, New York, 1986; c) Ringer, S., *J. Physiol.* 1882, **4**, 29.; d) S. F. Flaim, R. Zelis. "Calcium Blockers Clinical Aplications", Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich, 121,1982.
- 46.- Hadden J. W., *Imm. Today*. **14**, 275, 1993.
- 47.- Audibert F. M. & Lise Luc D., *Imm. Today*. **14**, 281, 1993..
- 48.- a) Hadden J. W.. *Cyclic nucleotides in lymphocyte proliferation and differentiation in Immunopharmacology*, 1977; J.W. Hadden, R.G. Coffey & Spreafico F. eds Plenum Press. New York,pp. 1-28. ; b) Hadden J.W.. *Mechanisms of potentrations in Immunopharmacology*, 1977
- 49.- D. W. Choi, *Trends Neorosci.*, **11**, 465, 1988.

- 50.- O. Cornec, B. Joseph, J-Y. Mérour, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 8587, 1995.
- 51.- a) Rossi, A., Marazziti, D., Palego, L., Rotondo, A., Giannaccini, G., Masala, I. and Lucacchini, A. *Biological Psychiatry*, **42**, 107S, 1997; b) Challamel, M. J., Claustrat, B, Kocher, L., Louis, J. *Clinical Neurophysiology*, **26**, 429, 1996.
- 52.- C. J. van Oss, B. Rabin, H. Fujii, J. Kite, K. Wicher, Cap 8, 157, 1982 , *Methods in Immunodiagnosis*, N.R.Rose, P.E. Bigazzi, John Willey and Sons, Ed. Willey-Interscience, 1980;
- 53.- a) Claustrat, B; Geoffriau, M; Brun, J; Chazot, G., *PATHOL. BIOL.*, **44**, 645, 1996; b) Tarzia, G., Diamantini, G., Di Giacomo, B., Spadoni, G., Esposti, D., Nonno, R., Lucini, V., Pannacci, M., Frascini, F., Stankov, B. M., *Journal of Medicinal Chemistry*, **40**; 2003, 1997; c) Spadoni, G., Balsamini, C., Diamantini, G., Di Giacomo, B., Tarzia, G., Mor, M., Piazzi, P. V., Rivara, S., Lucini, V., Nonno, R., Pannacci, M., Frascini, F., Stankov, B. M., *ibid*; **40**; 1990, 1997.
- 54.- Cunningham A. J., Szenberg A. *Immunology* , **14**, 599, 1968.

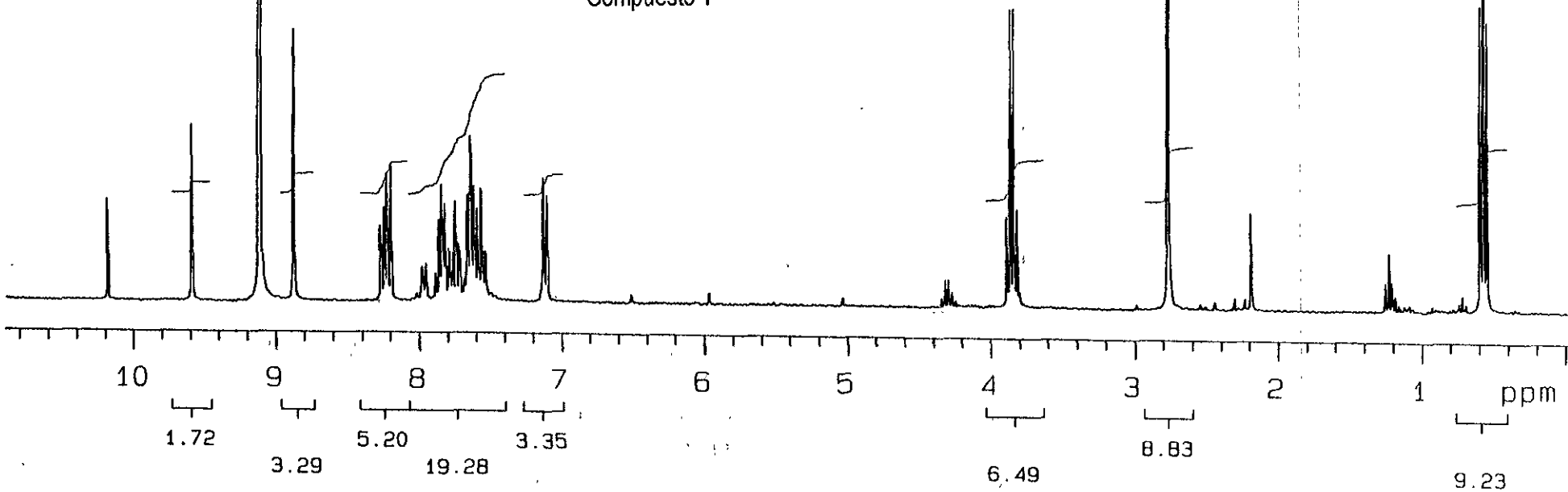




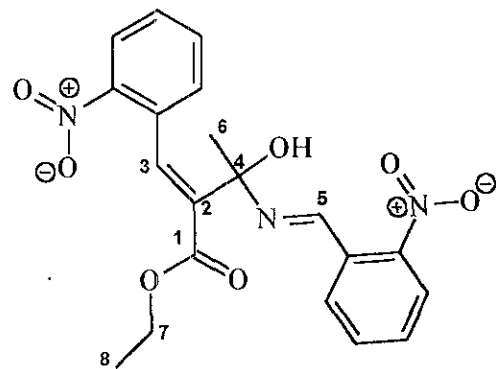




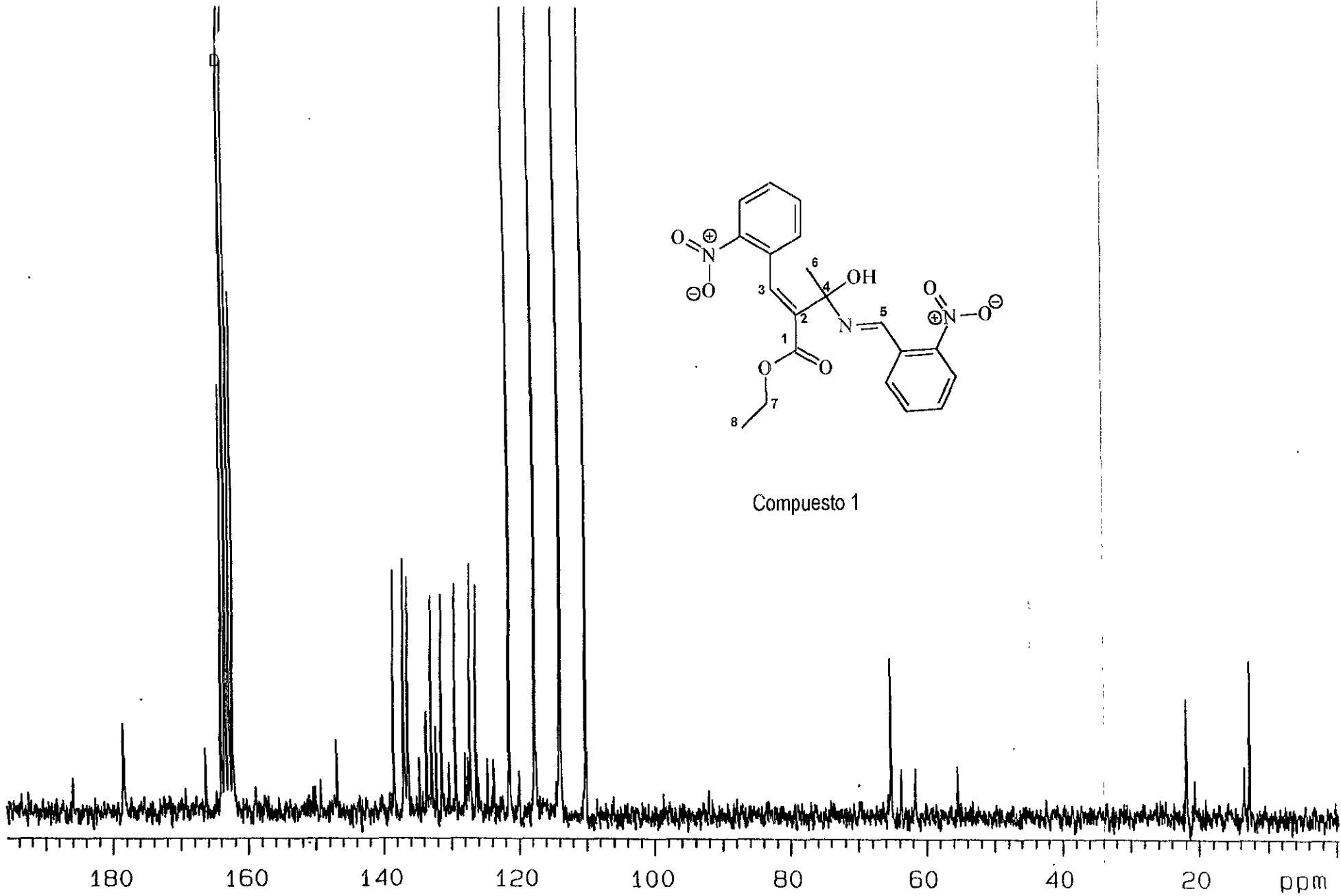
Compuesto 1

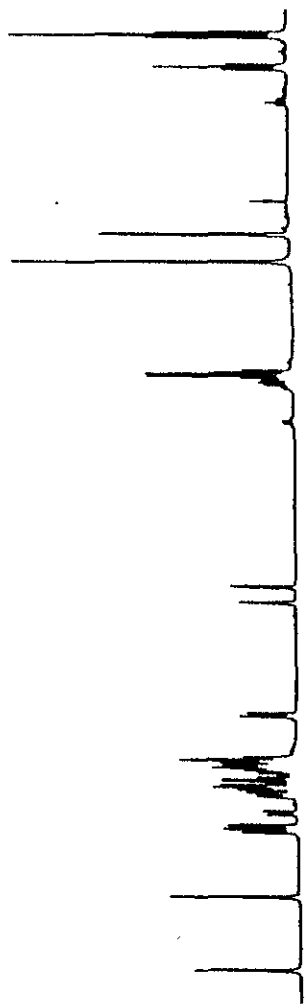
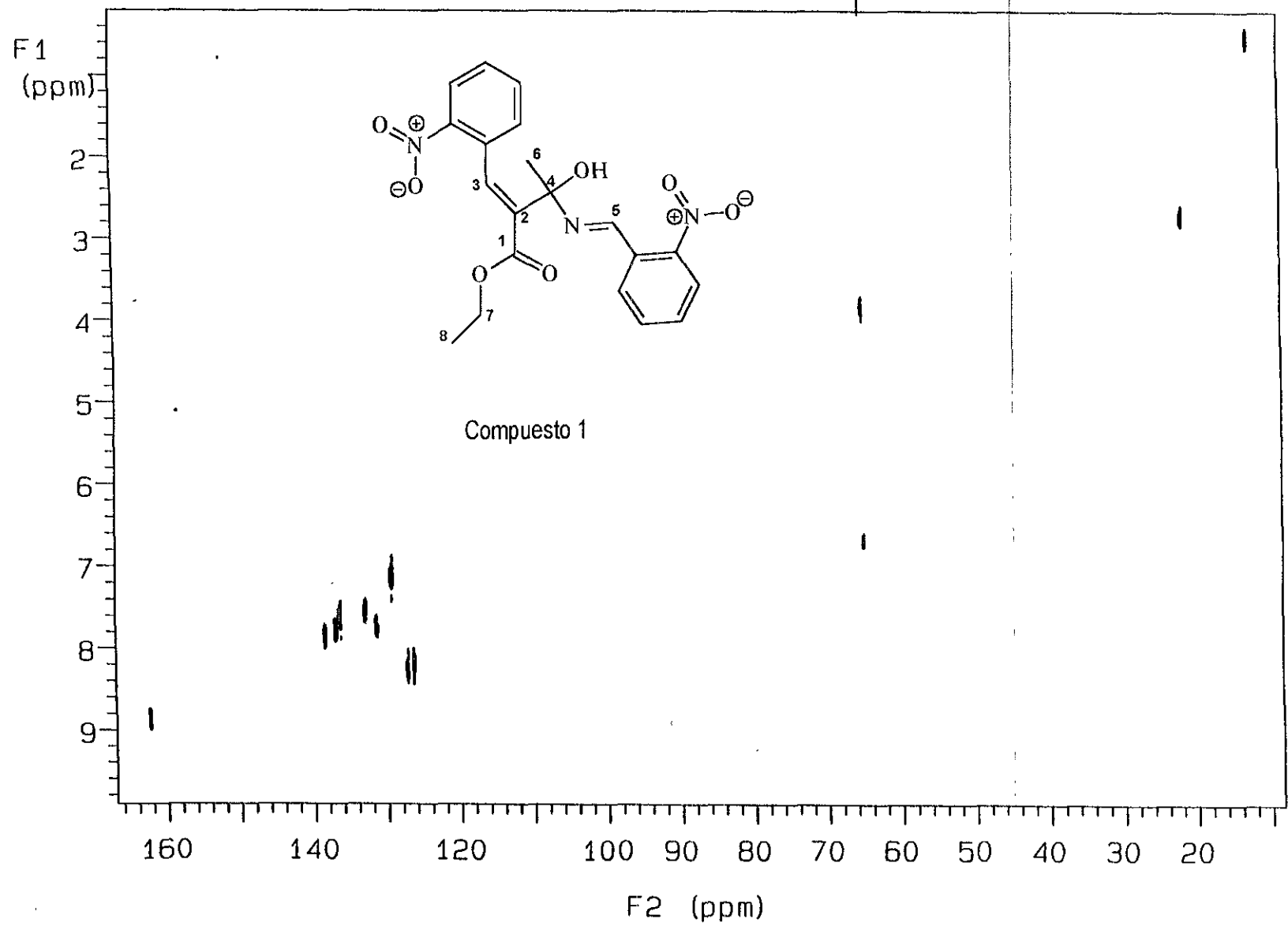


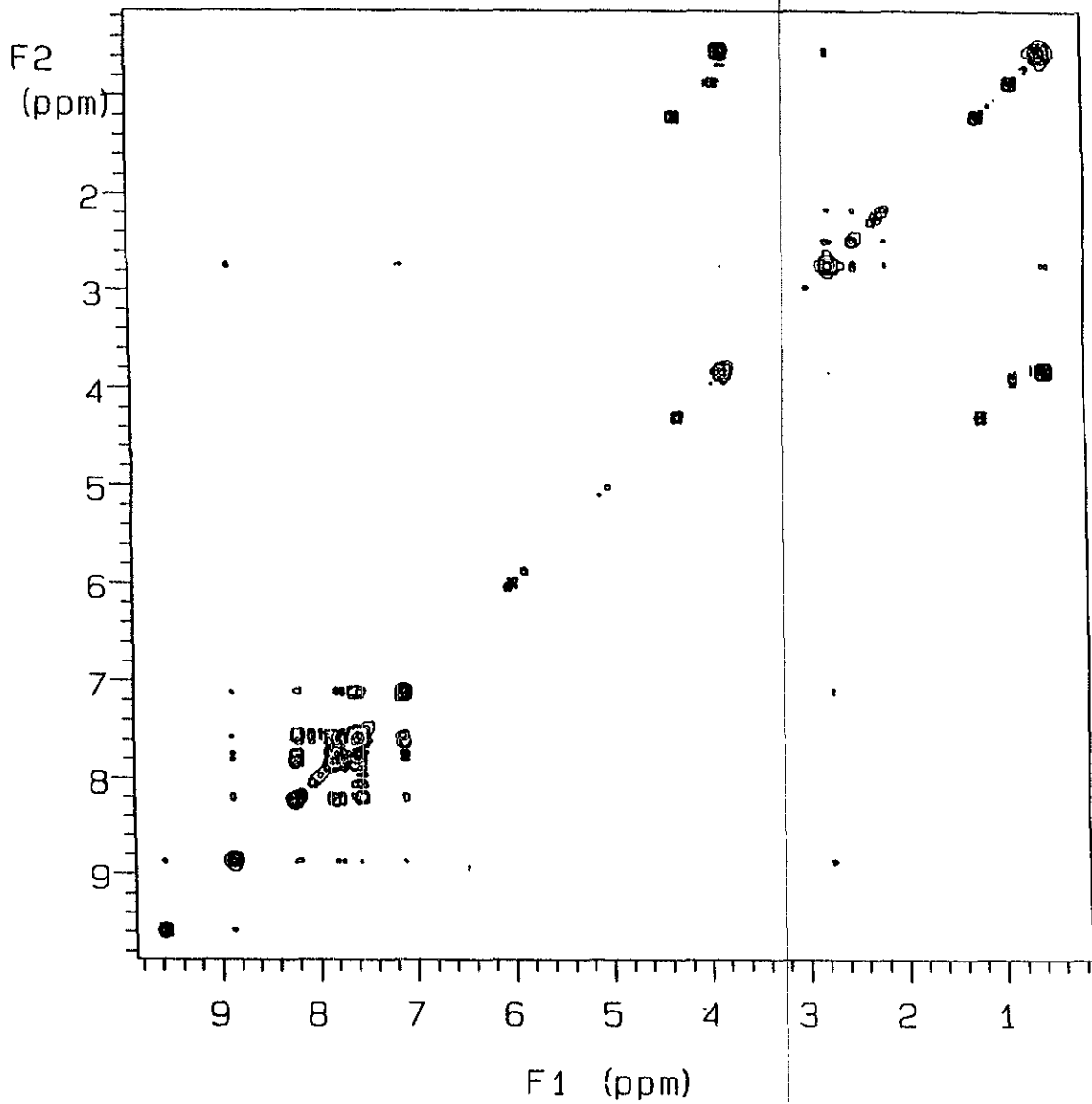
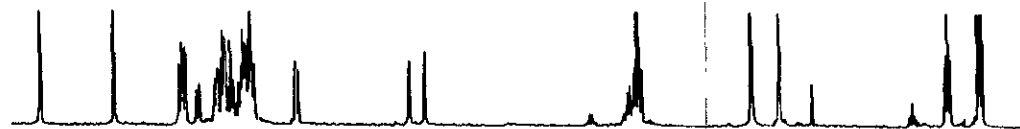
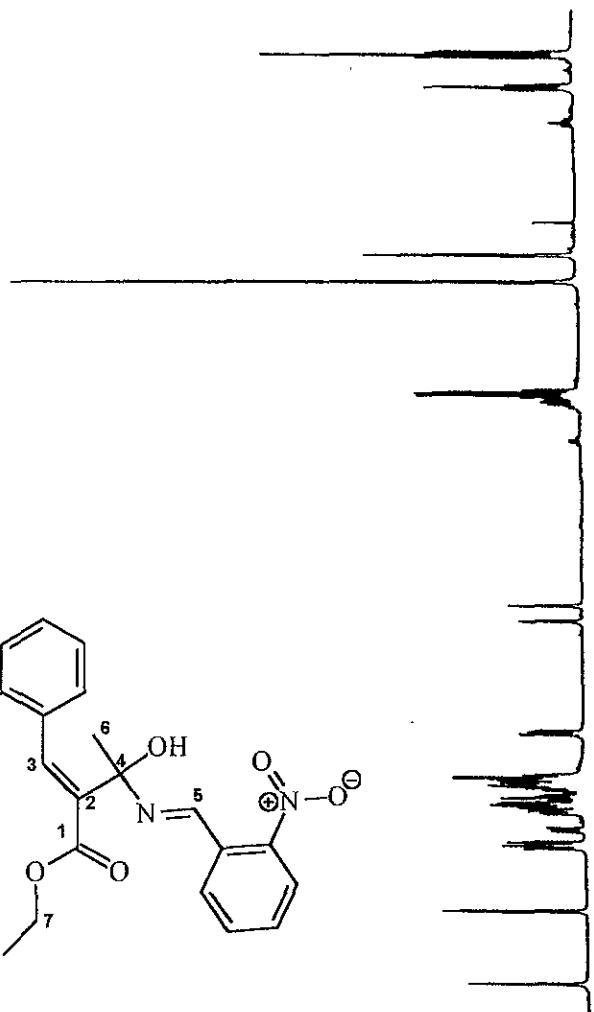
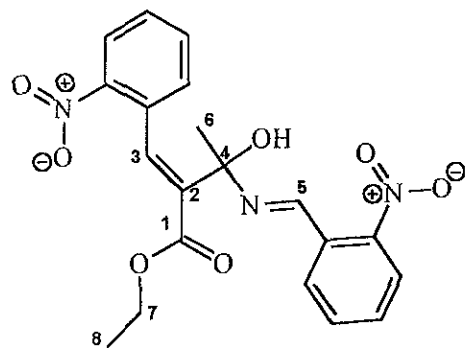


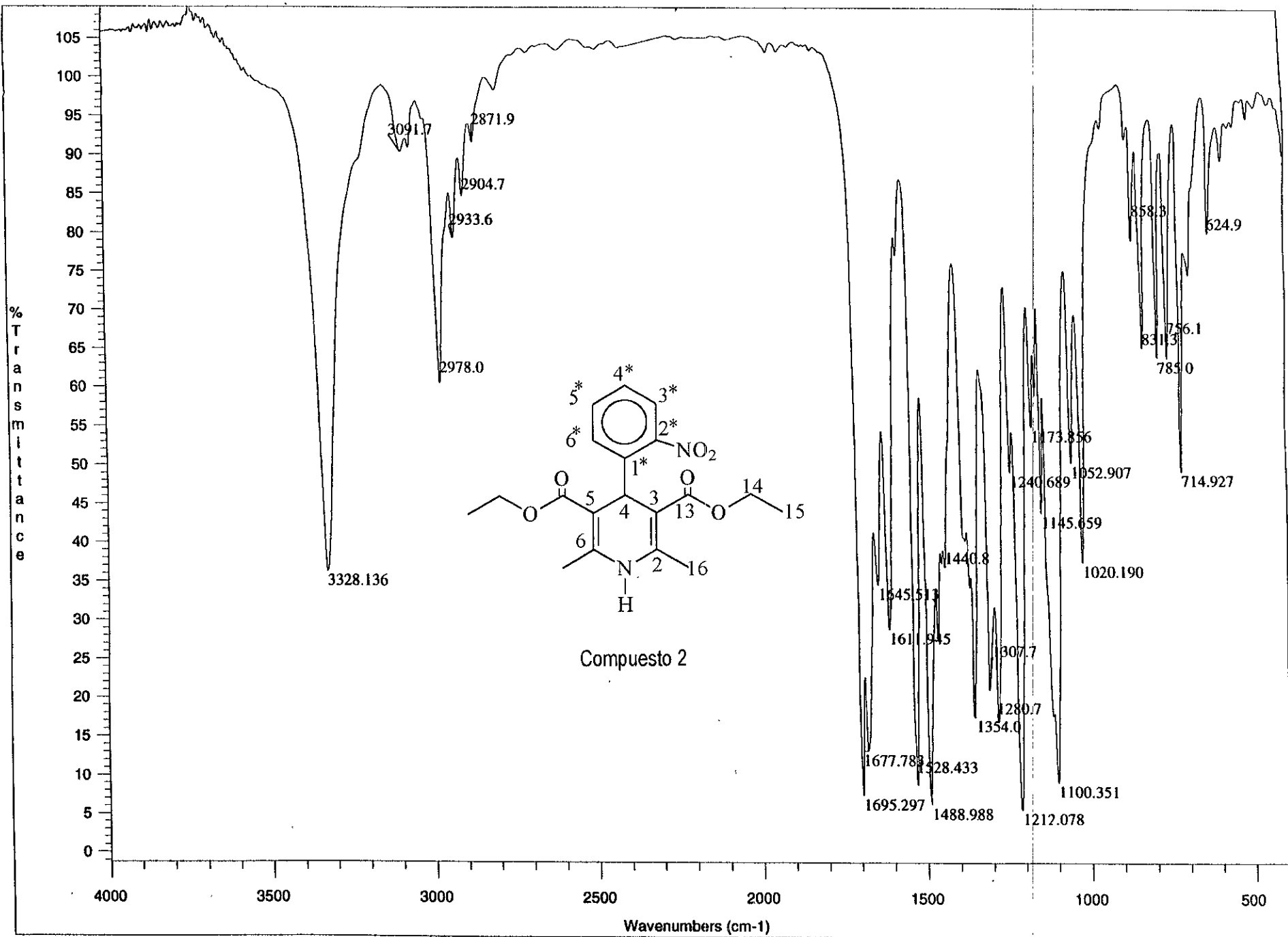


Compuesto 1

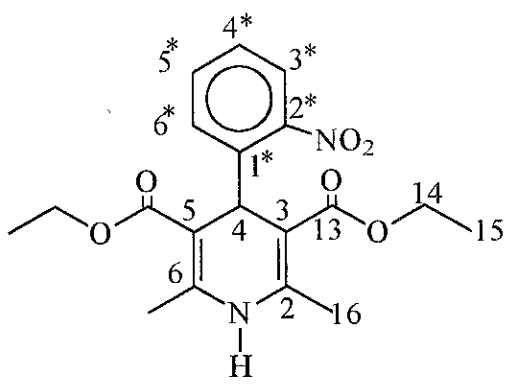




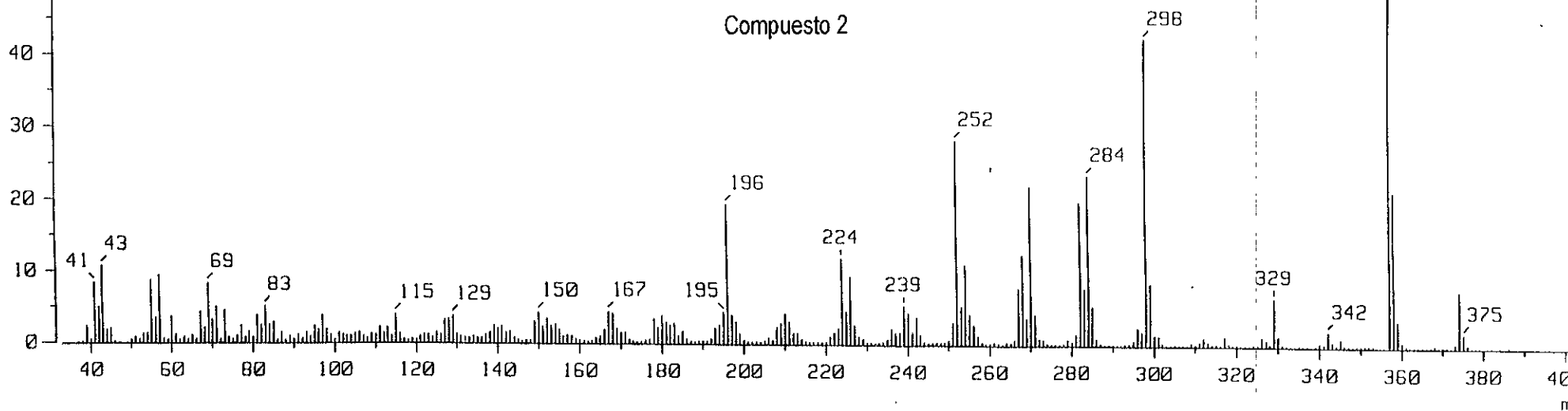




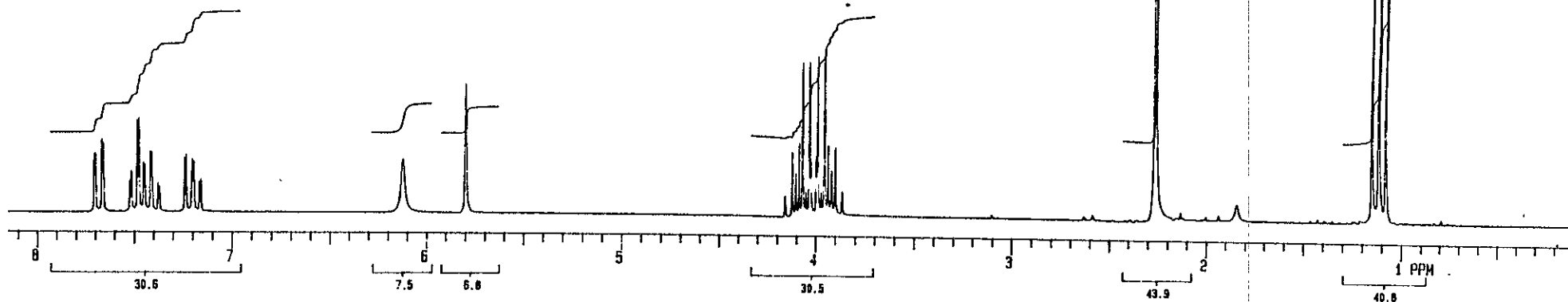
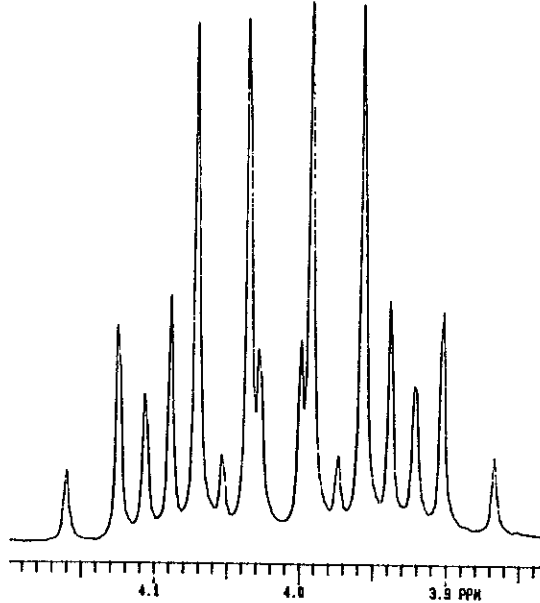
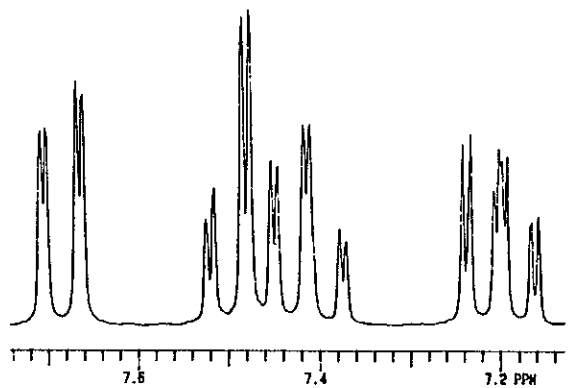
120  
100



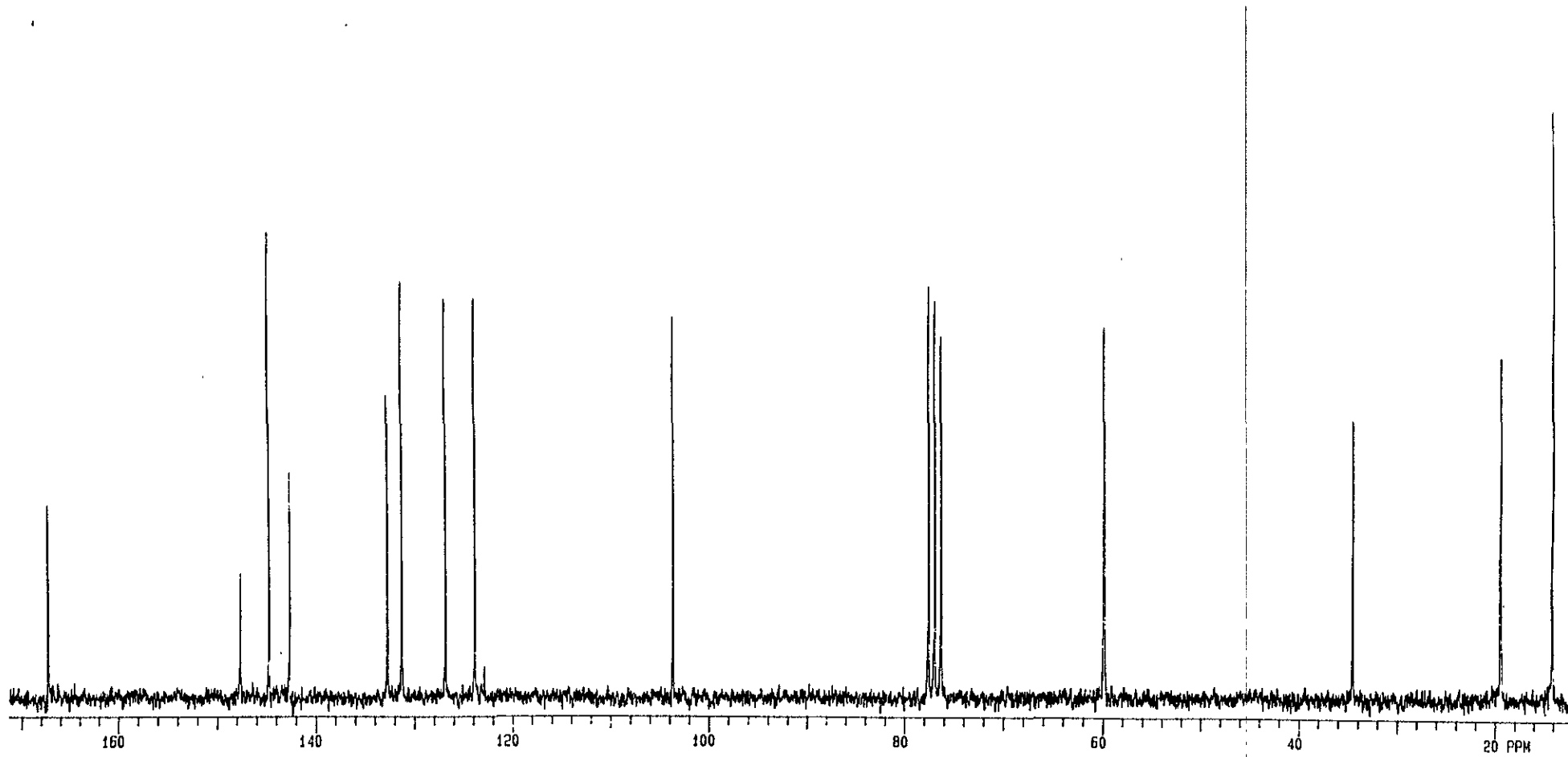
Compuesto 2



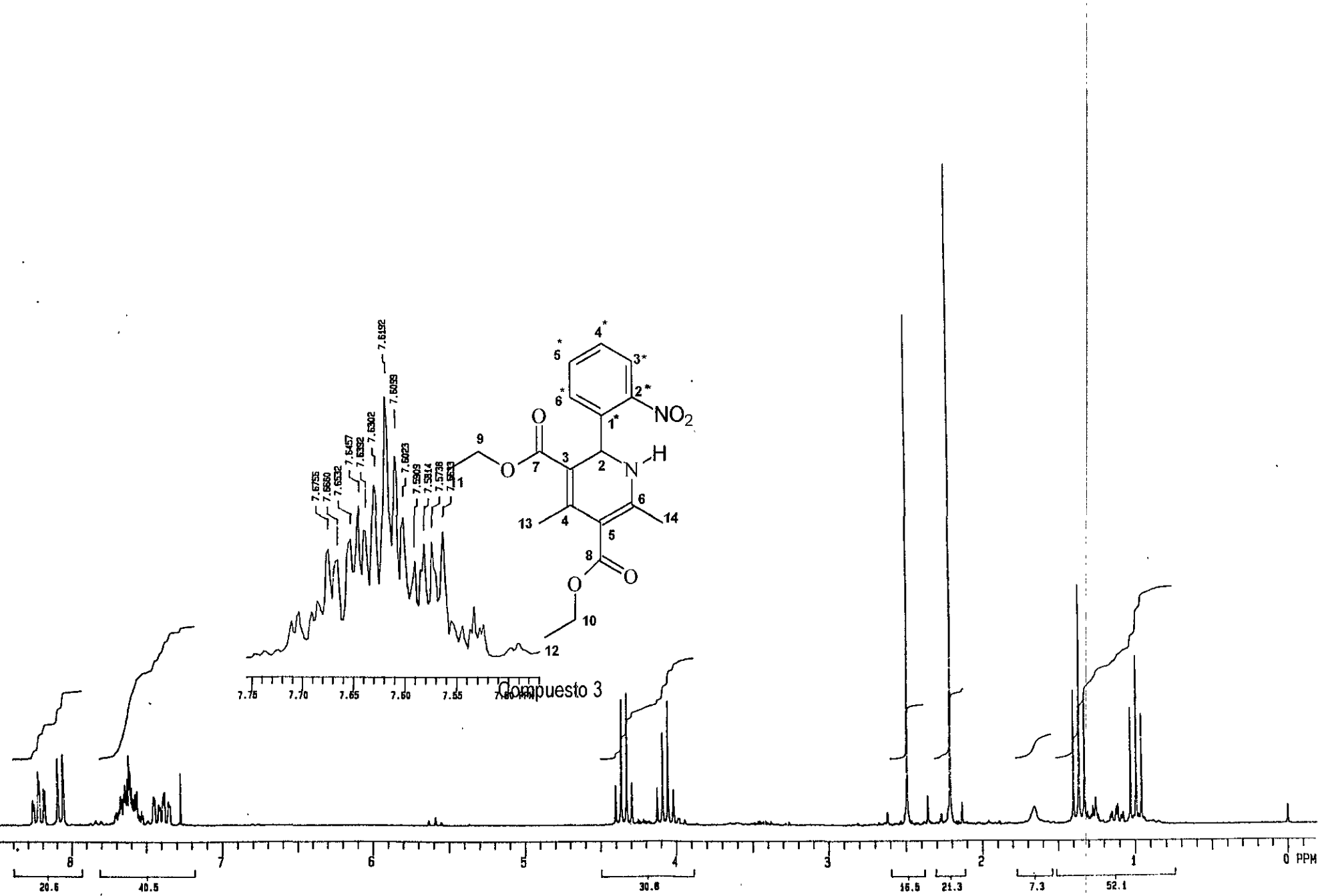
m.



Compuesto 2

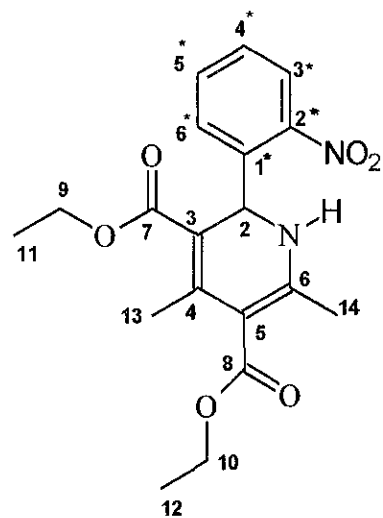


Compuesto 2

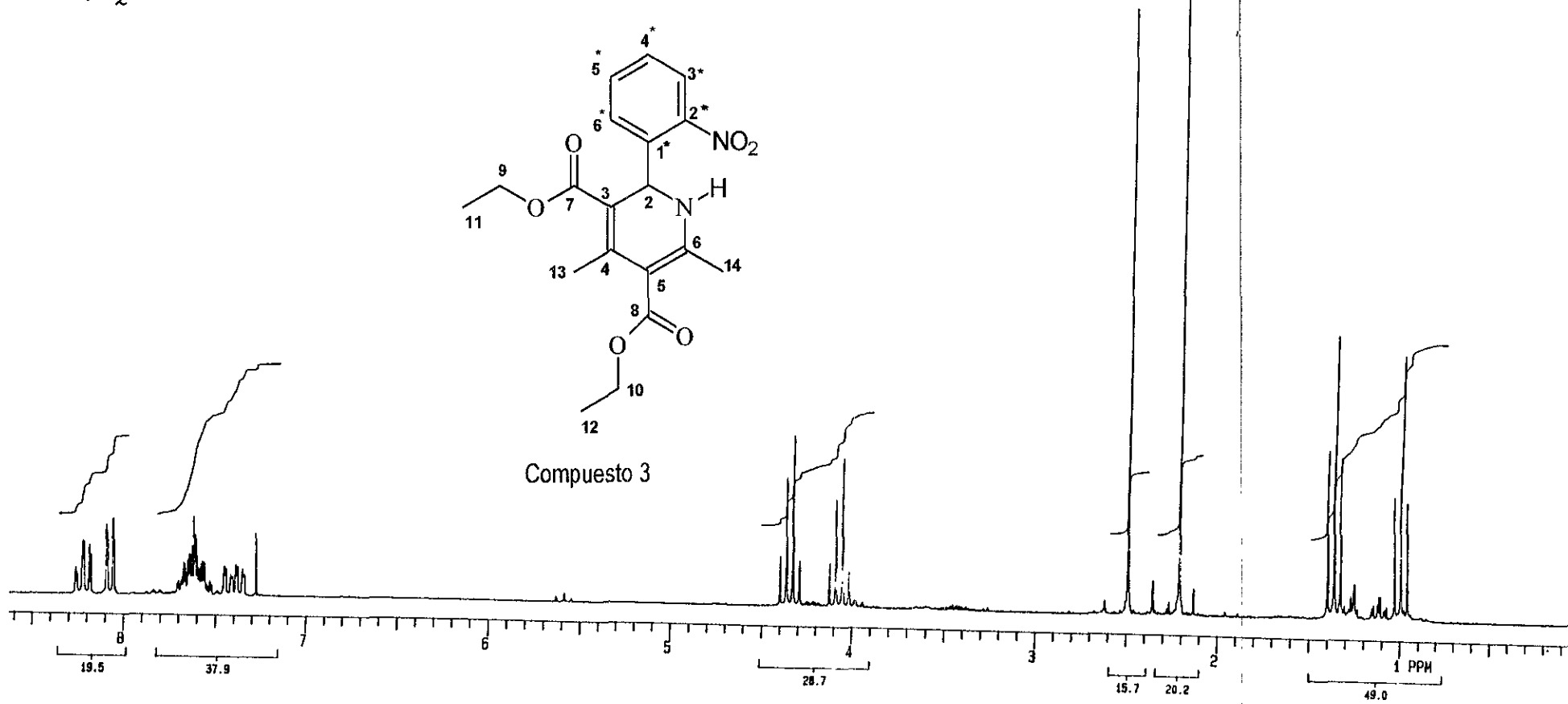


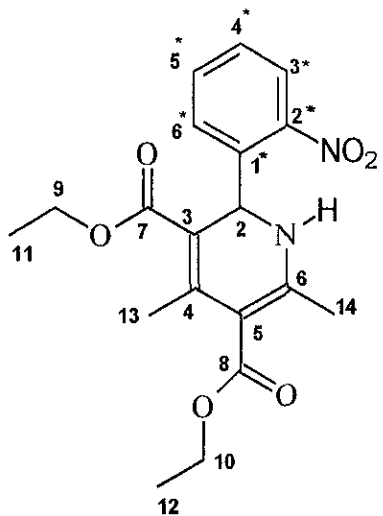


+D<sub>2</sub>O

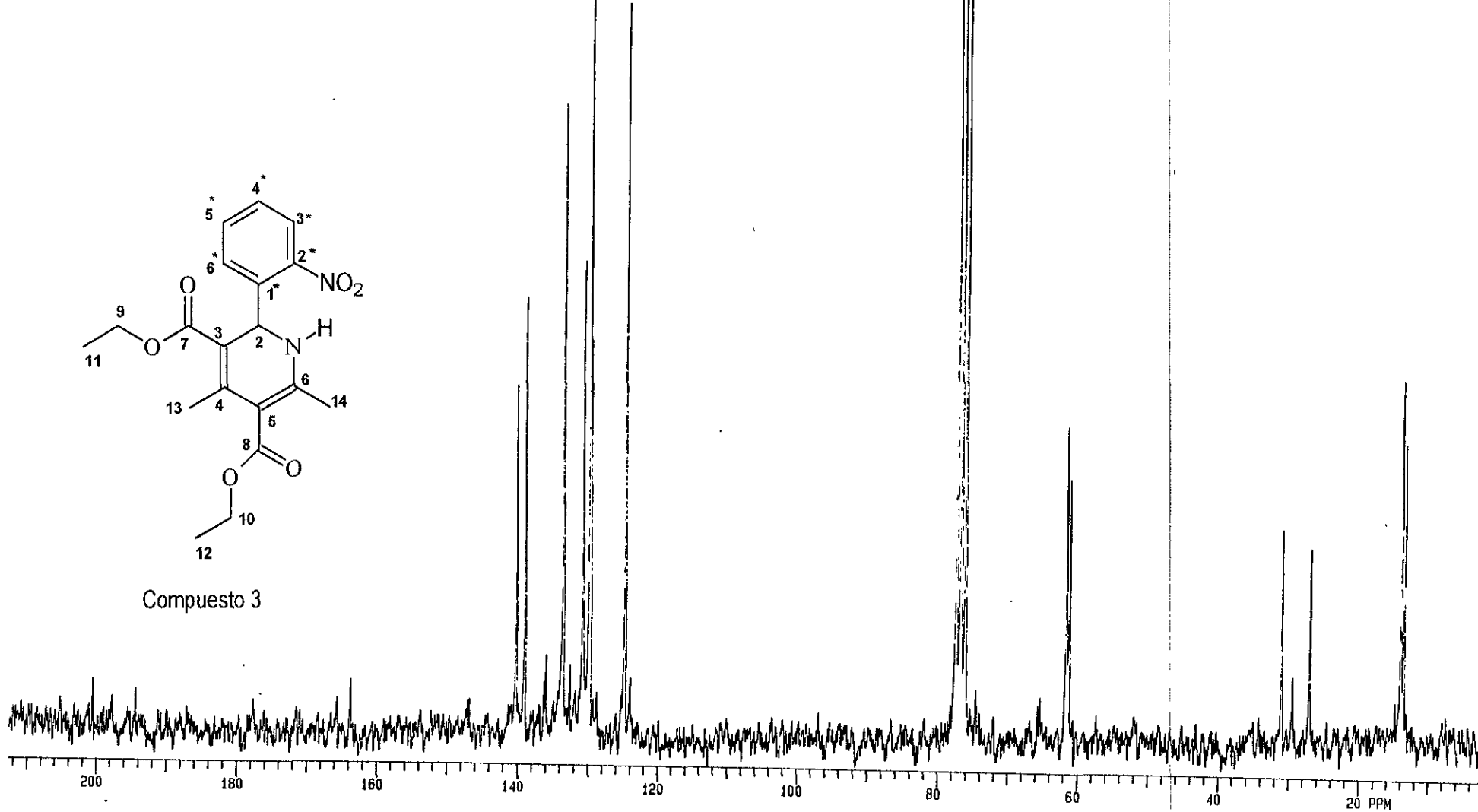


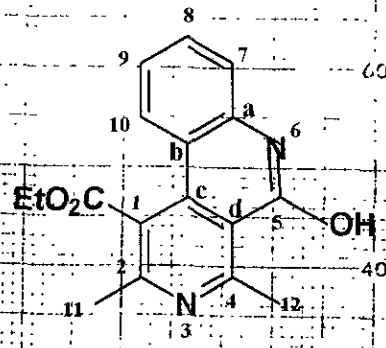
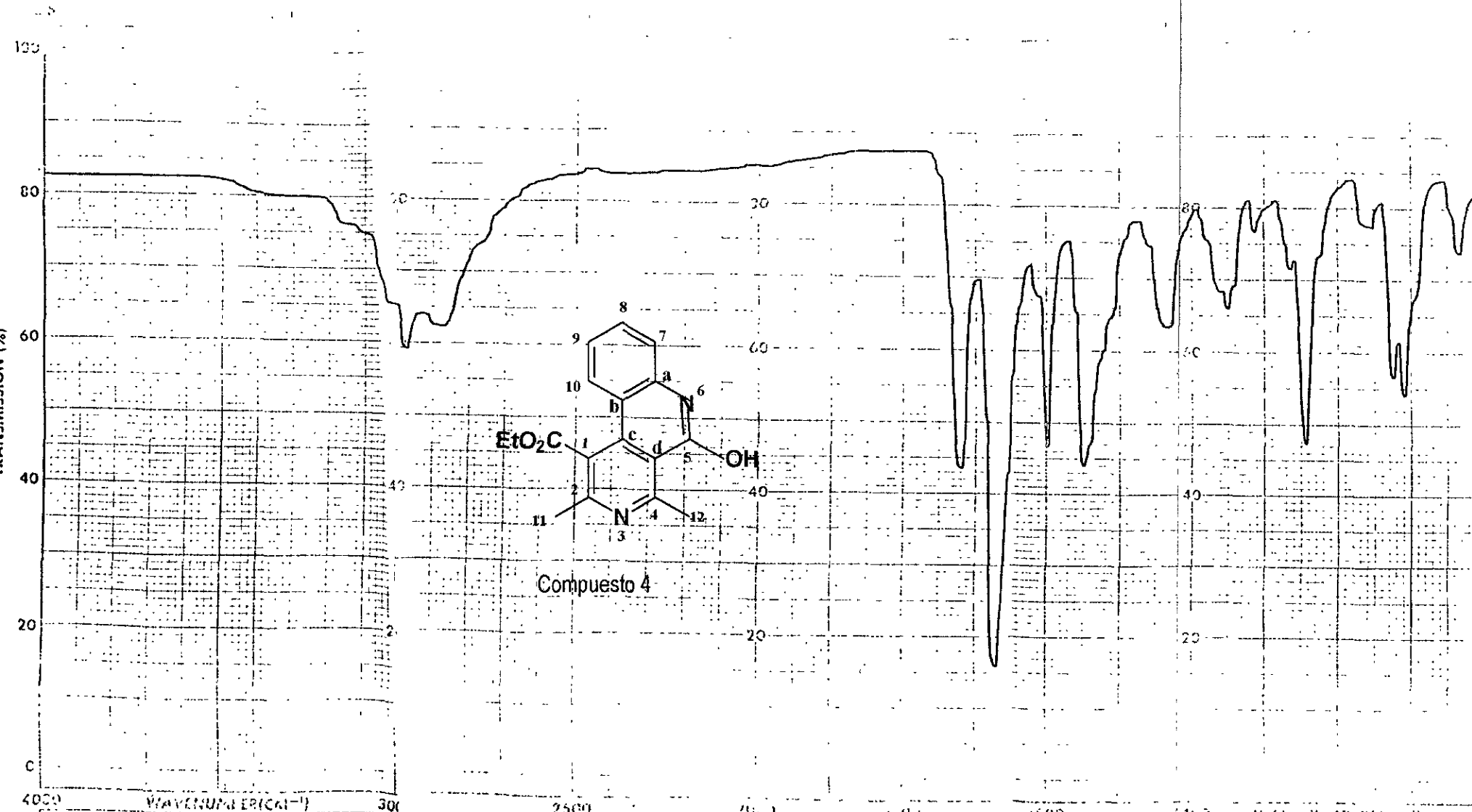
Compuesto 3





Compuesto 3



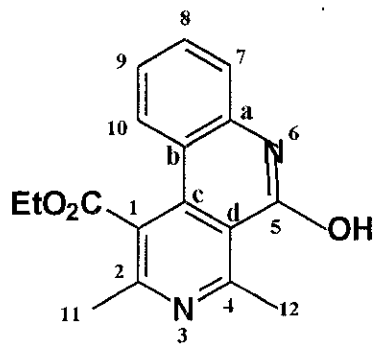
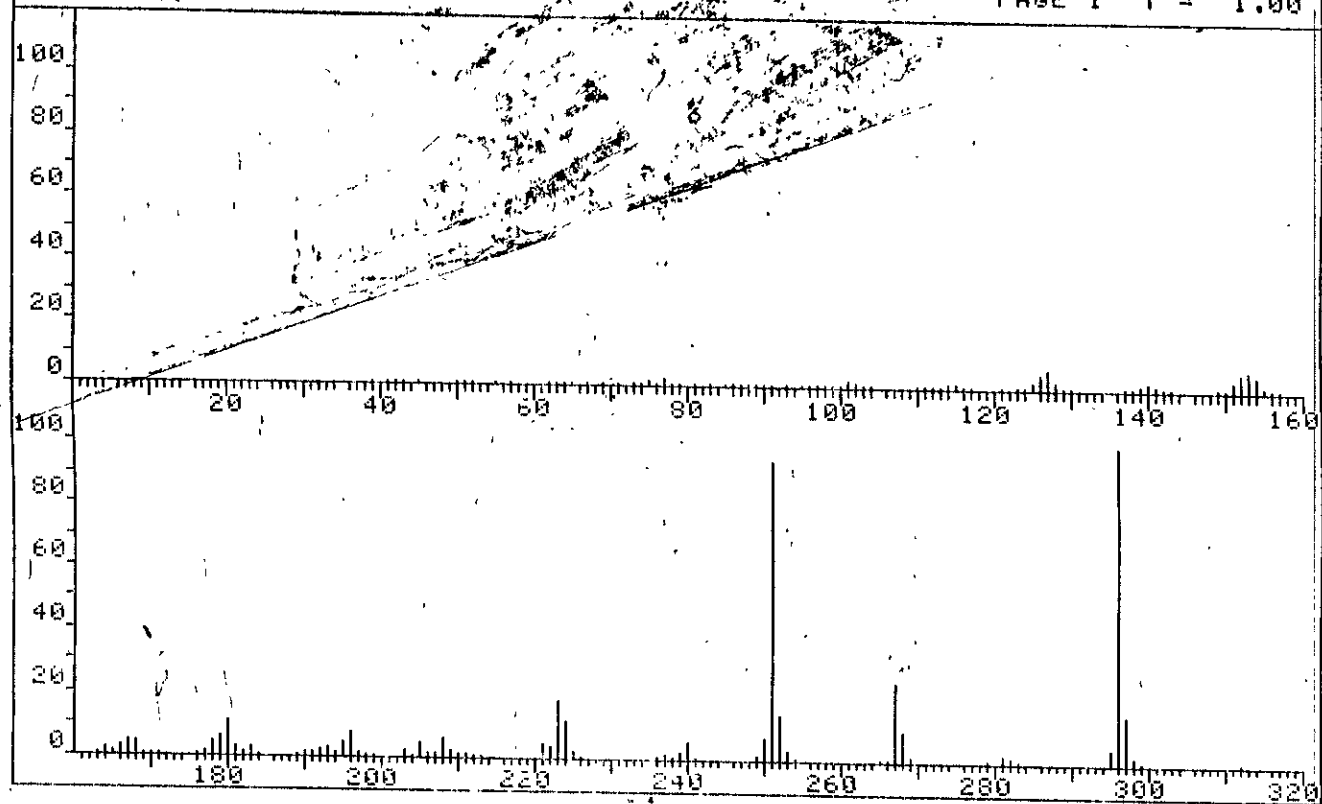


Compuesto 4

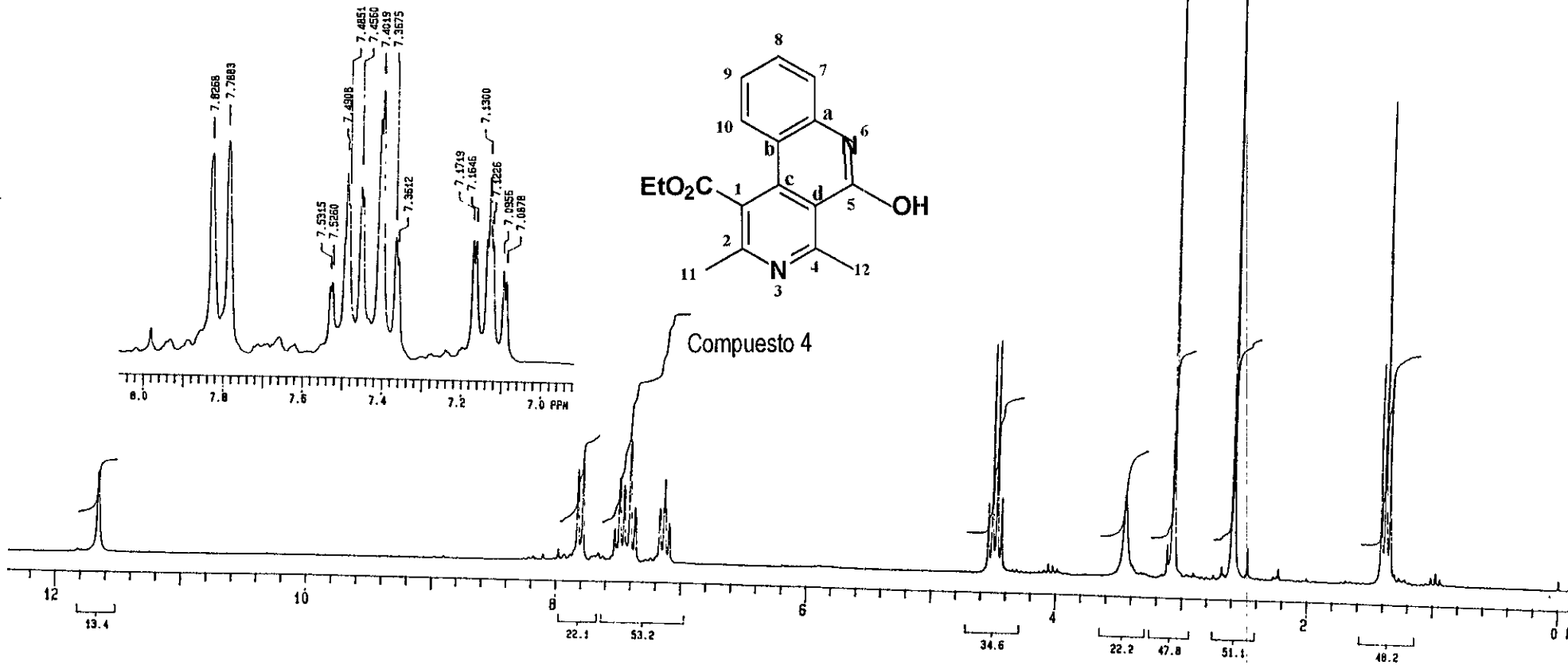
SP. FILE	REMARKS	COM. 1	ANALISIS	EXPL. AT. SIGN.	1-0	SC. FILE TIME	12
ORIGIN		COM. 2	COM. 3	EXPL. AT. SIGN.		RES. FILE	1
		COM. 4	COM. 5	EXPL. AT. SIGN.		RES. PROGRAM	N
		COM. 6	COM. 7	EXPL. AT. SIGN.			

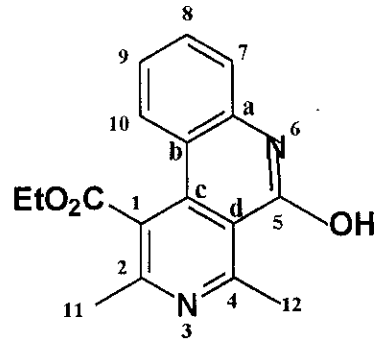
*Klor  
Pastilla  
aire*

FRN 9231 SPECTRUM 40 RETENTION TIME 2.7  
 LARGST 4: 295.9, 100.0 251.0, 94.7 266.9, 24.7 223.0, 18.7  
 LAST 4: 297.0, 15.3 298.0, 2.2 299.0, 3.3 312.0, .5  
 PAGE 1 Y = 1.00



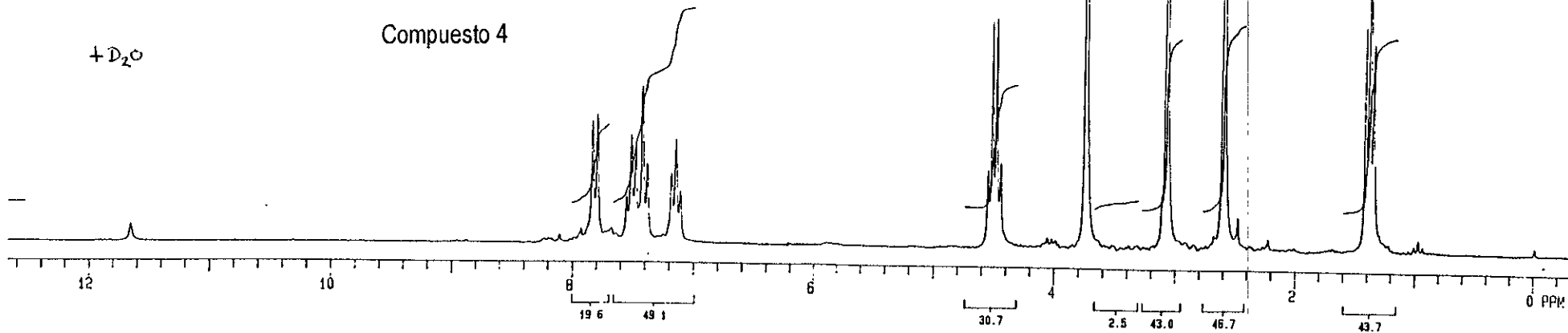
Compuesto 4

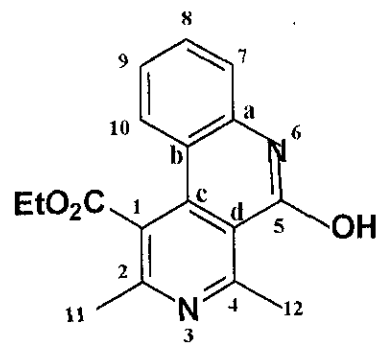




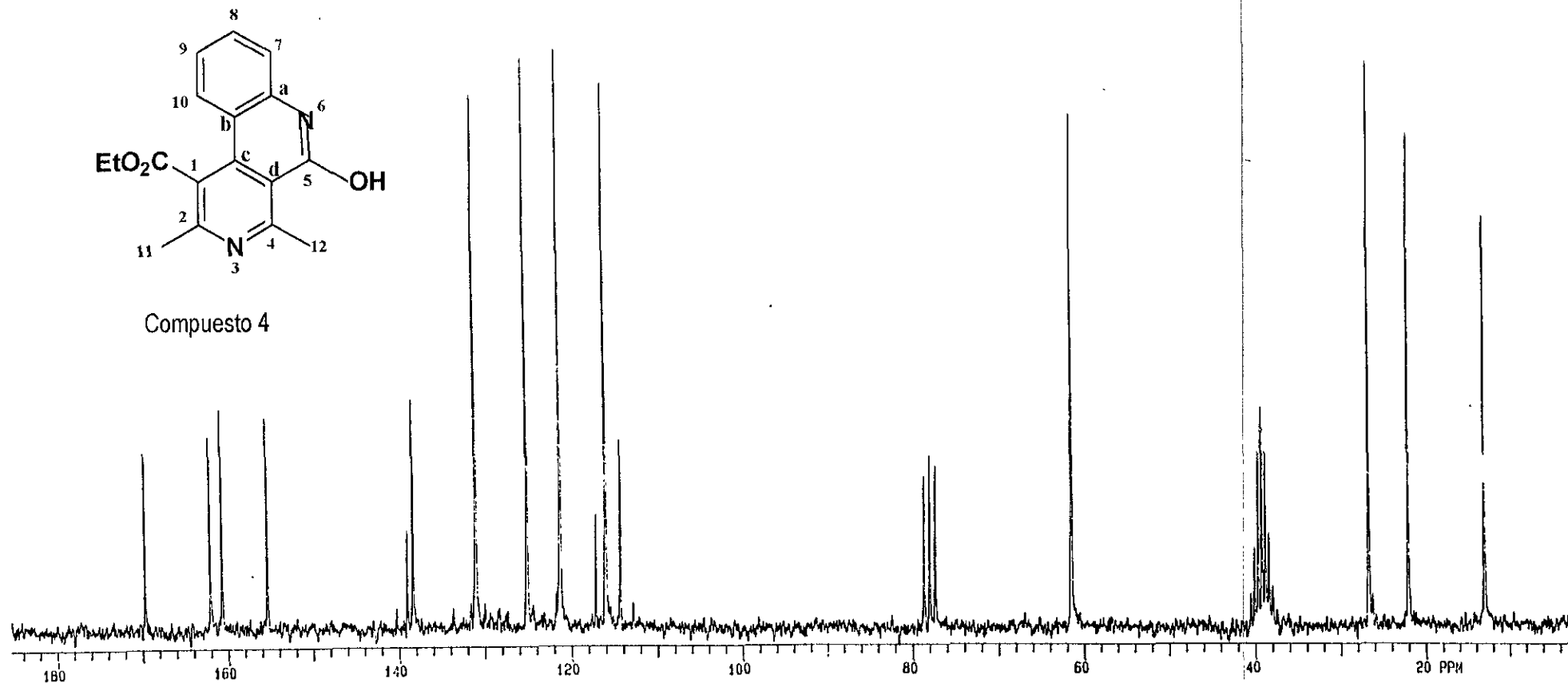
Compuesto 4

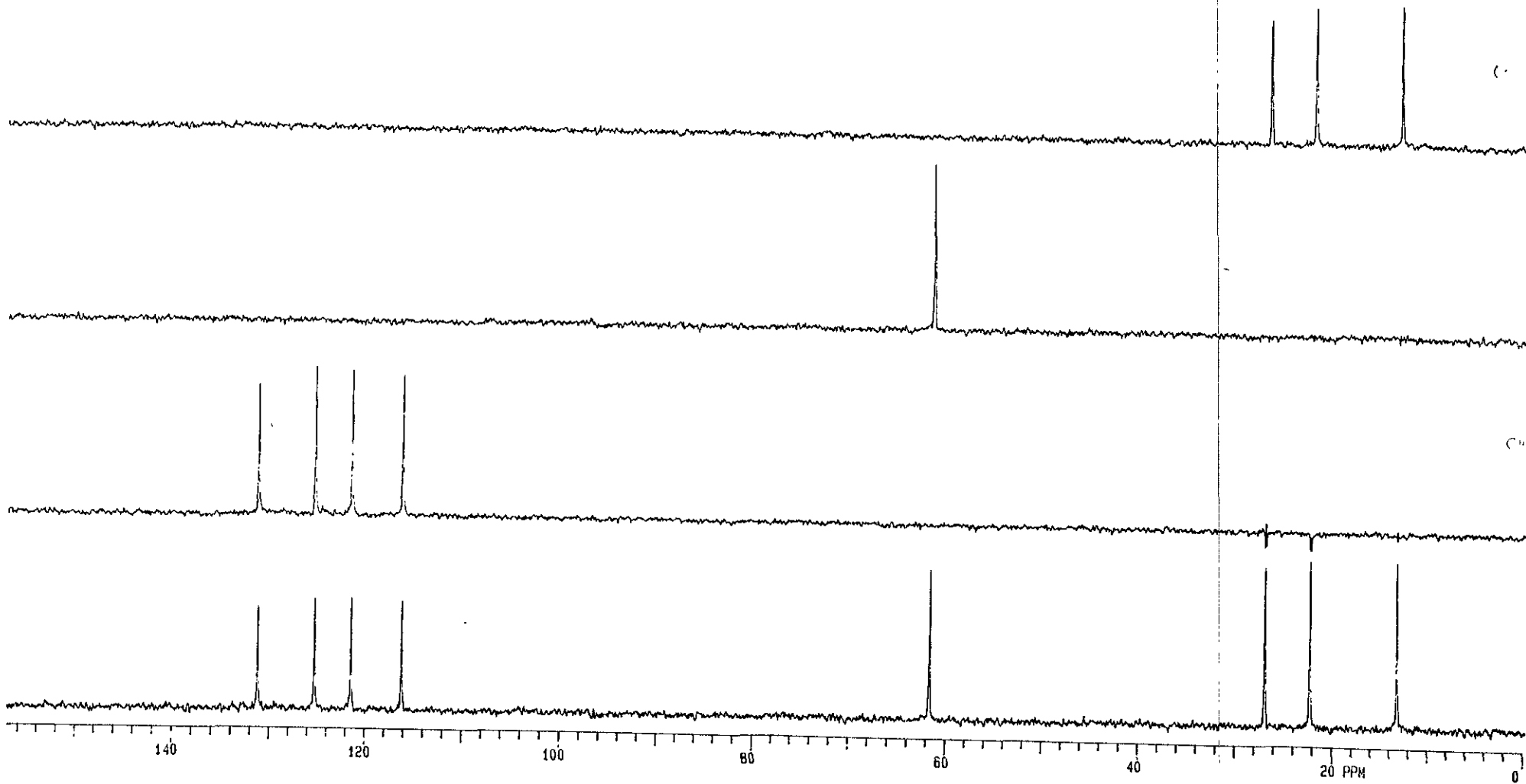
+D<sub>2</sub>O





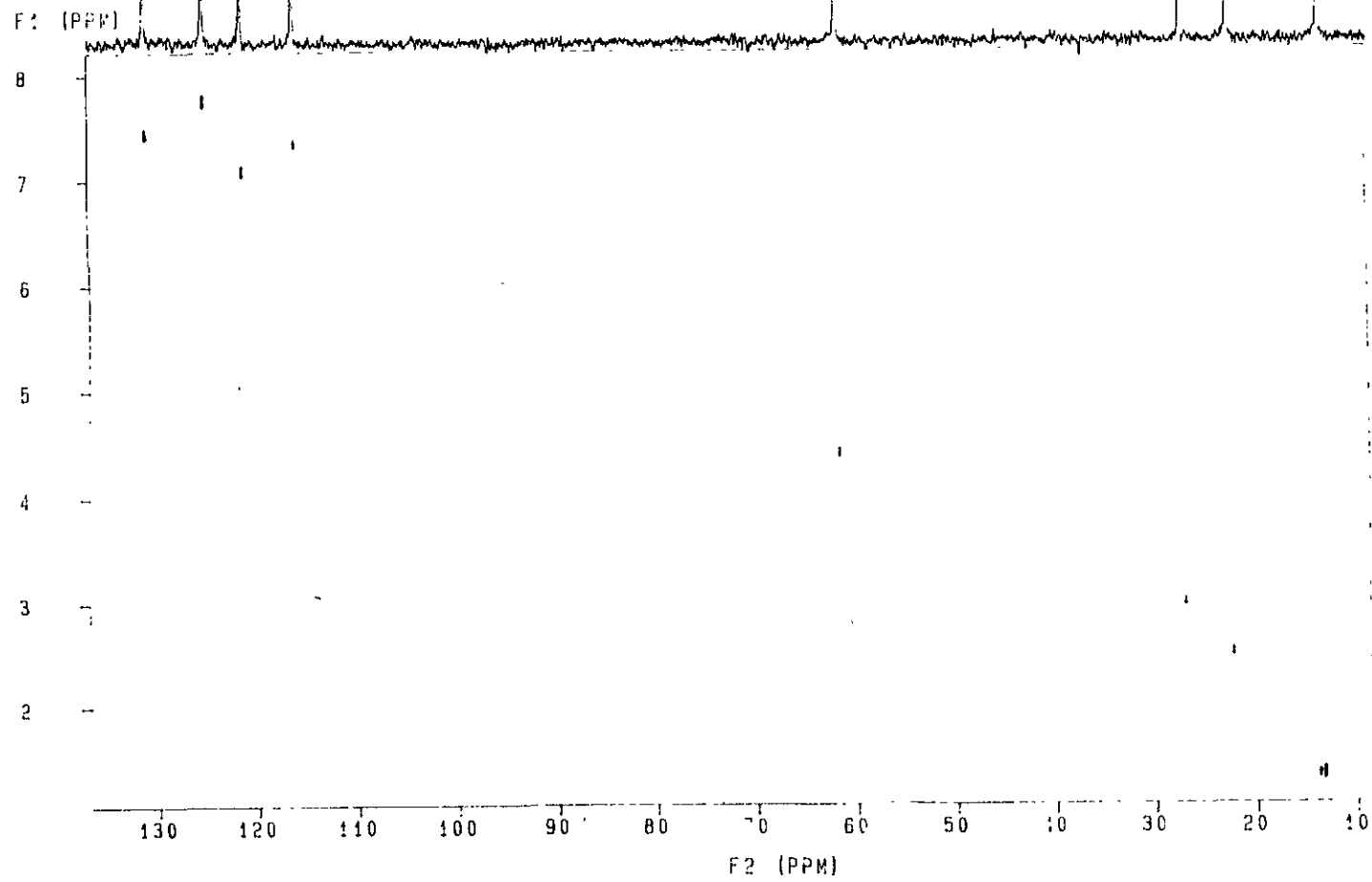
Compuesto 4



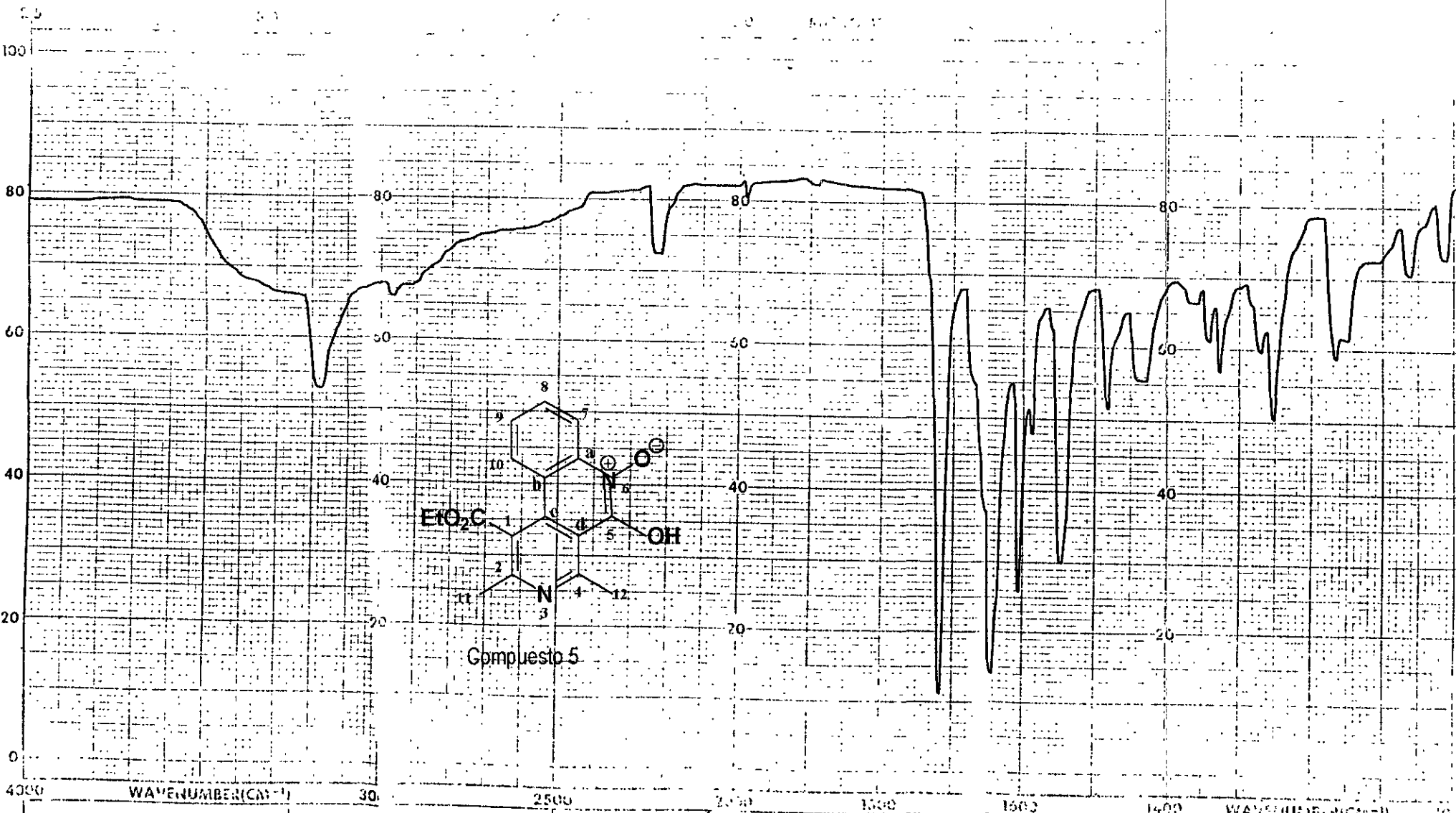


Compuesto 4

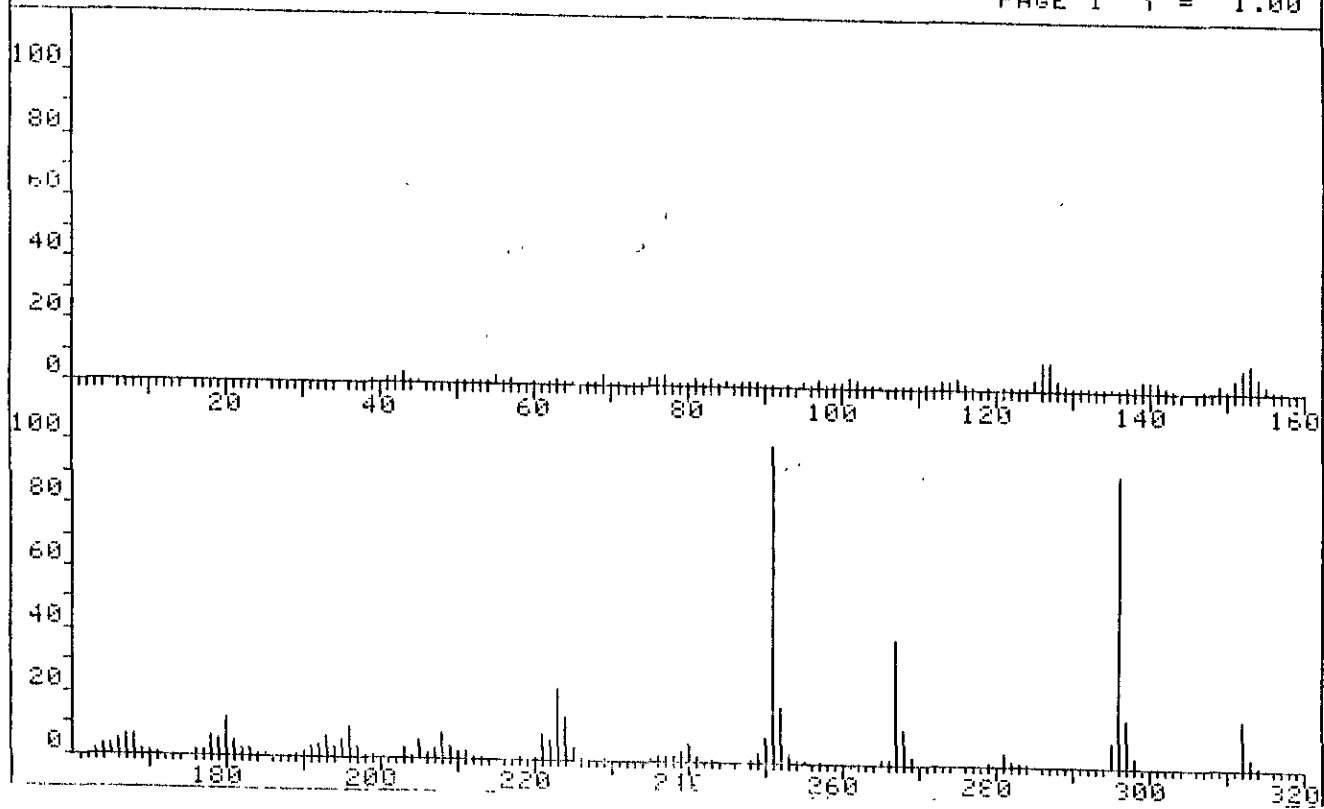




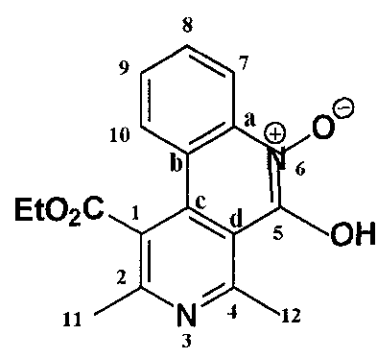
Compuesto 4



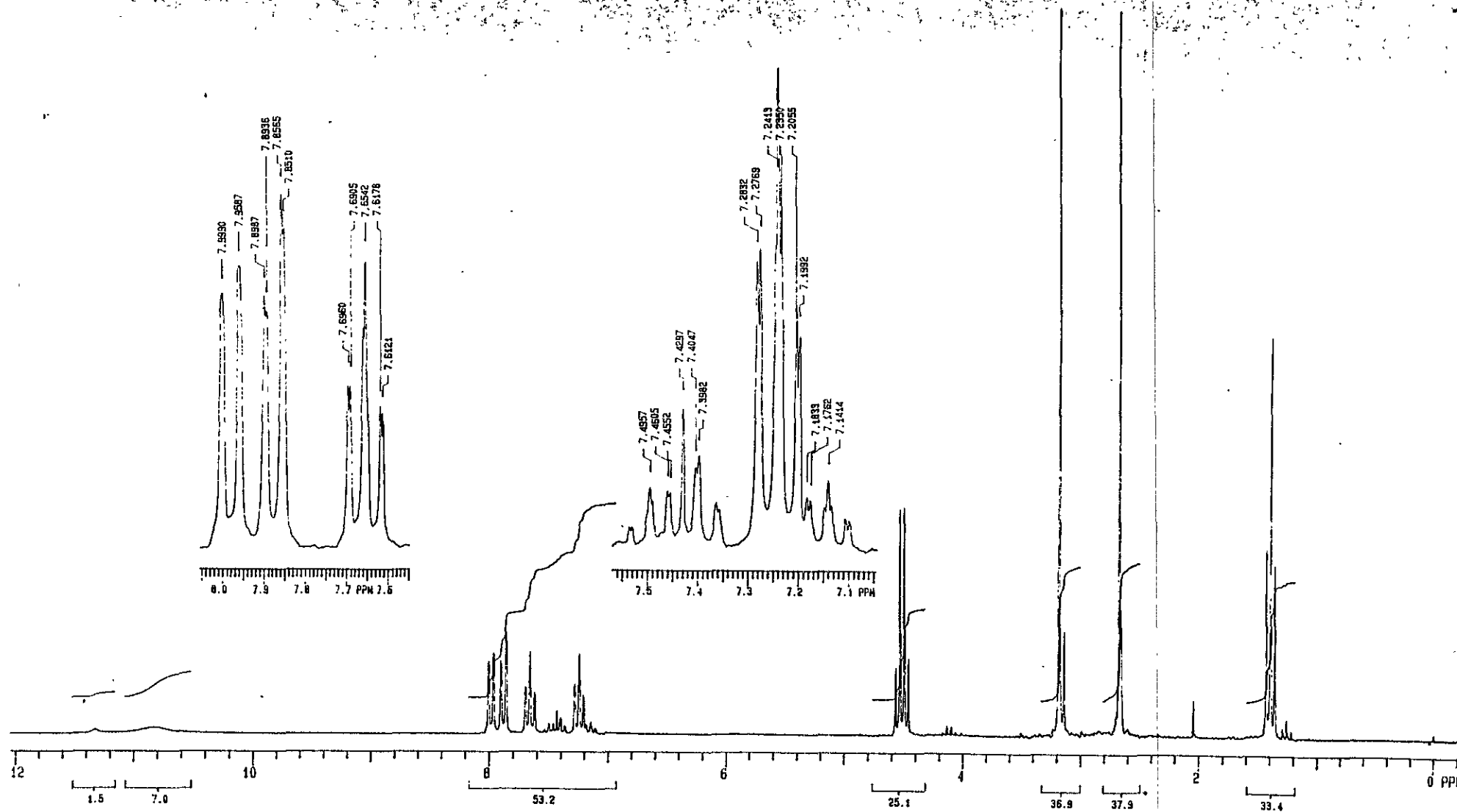
SAMPLE	REMARKS	SOLVENT CONCENTRATION CELL PATH REFERENCE	ABSISSA EXPANSION SUPPRESSION TIME DRIVE	SCAN TIME RESPONSE SHT PROGRAM
		<i>KBr          Pastilla          aire</i>	1.0	12 N



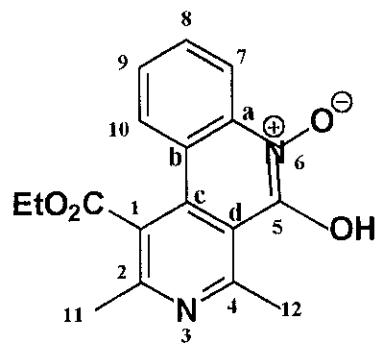
5



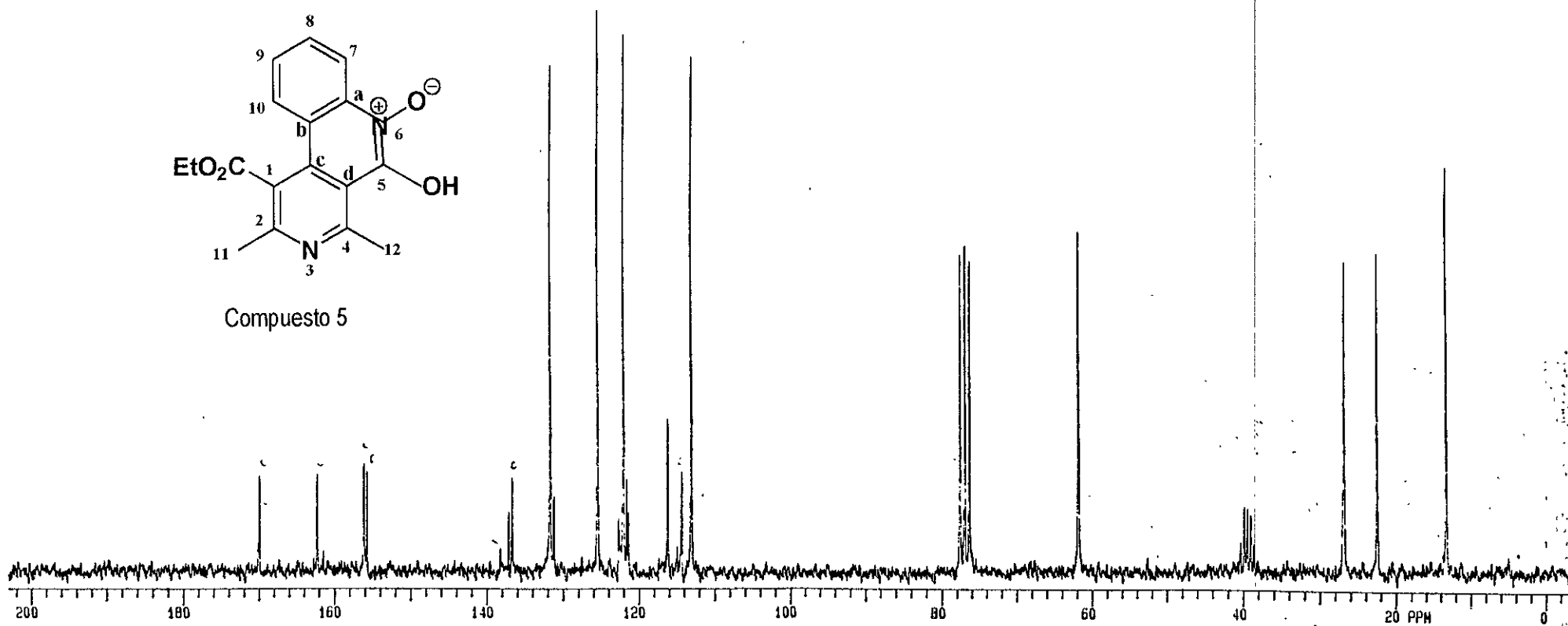
Compuesto 5

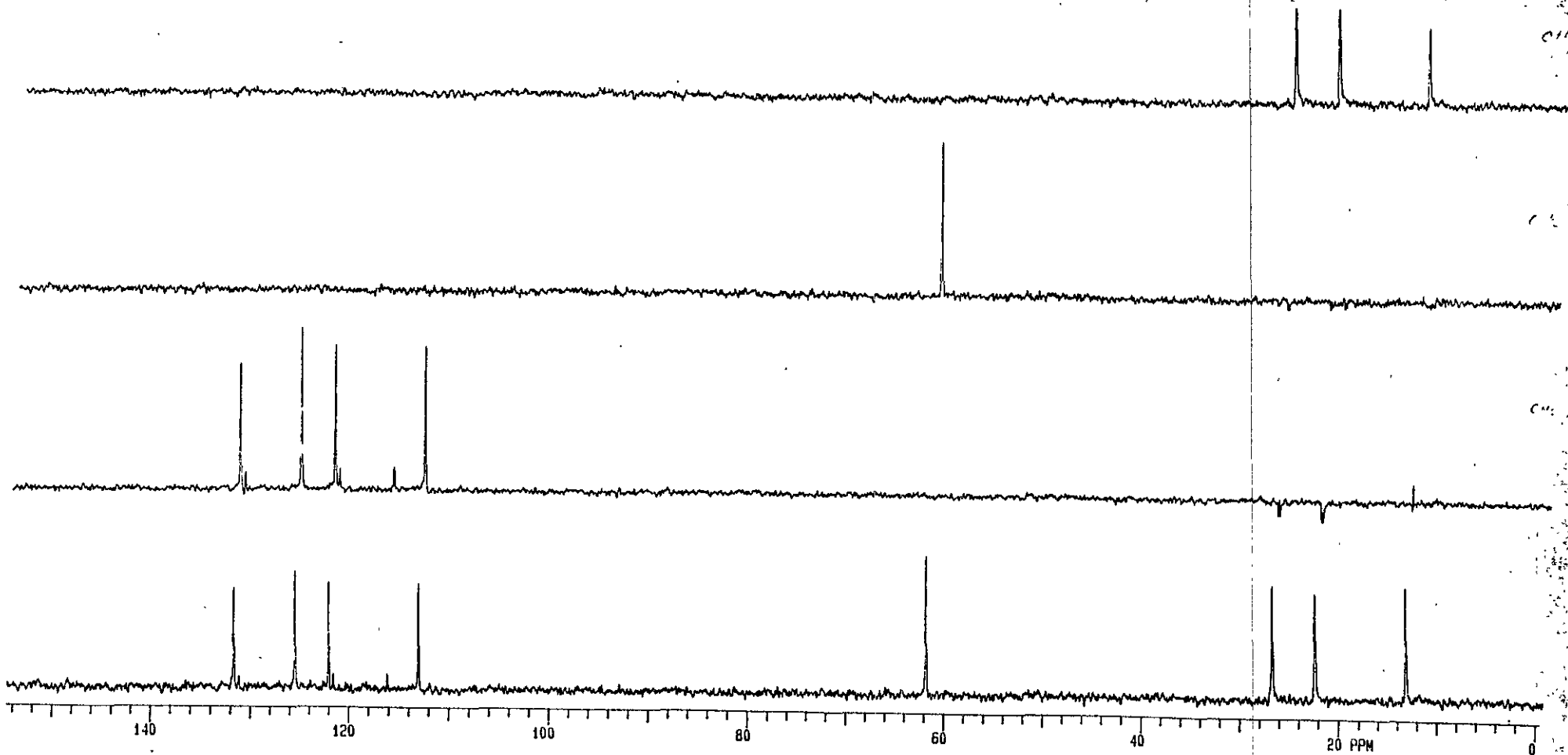


Compuesto 5

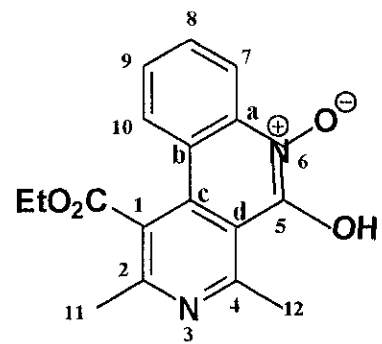


Compuesto 5





Compuesto 5



Compuesto 5

F1 (PPM)

8

7

6

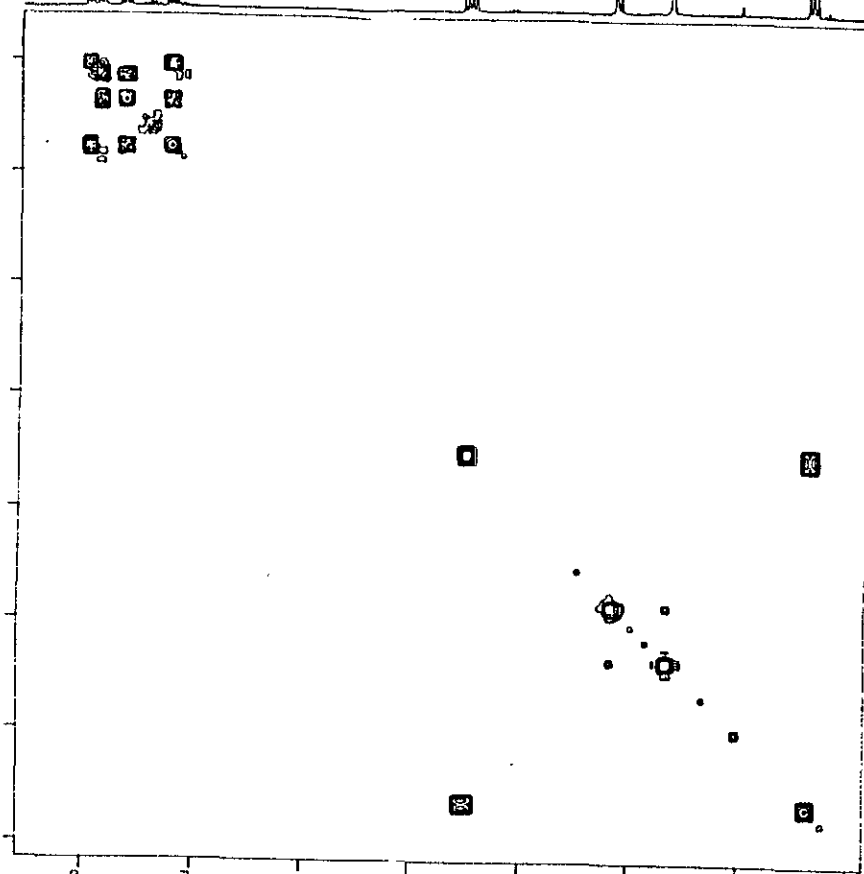
5

4

3

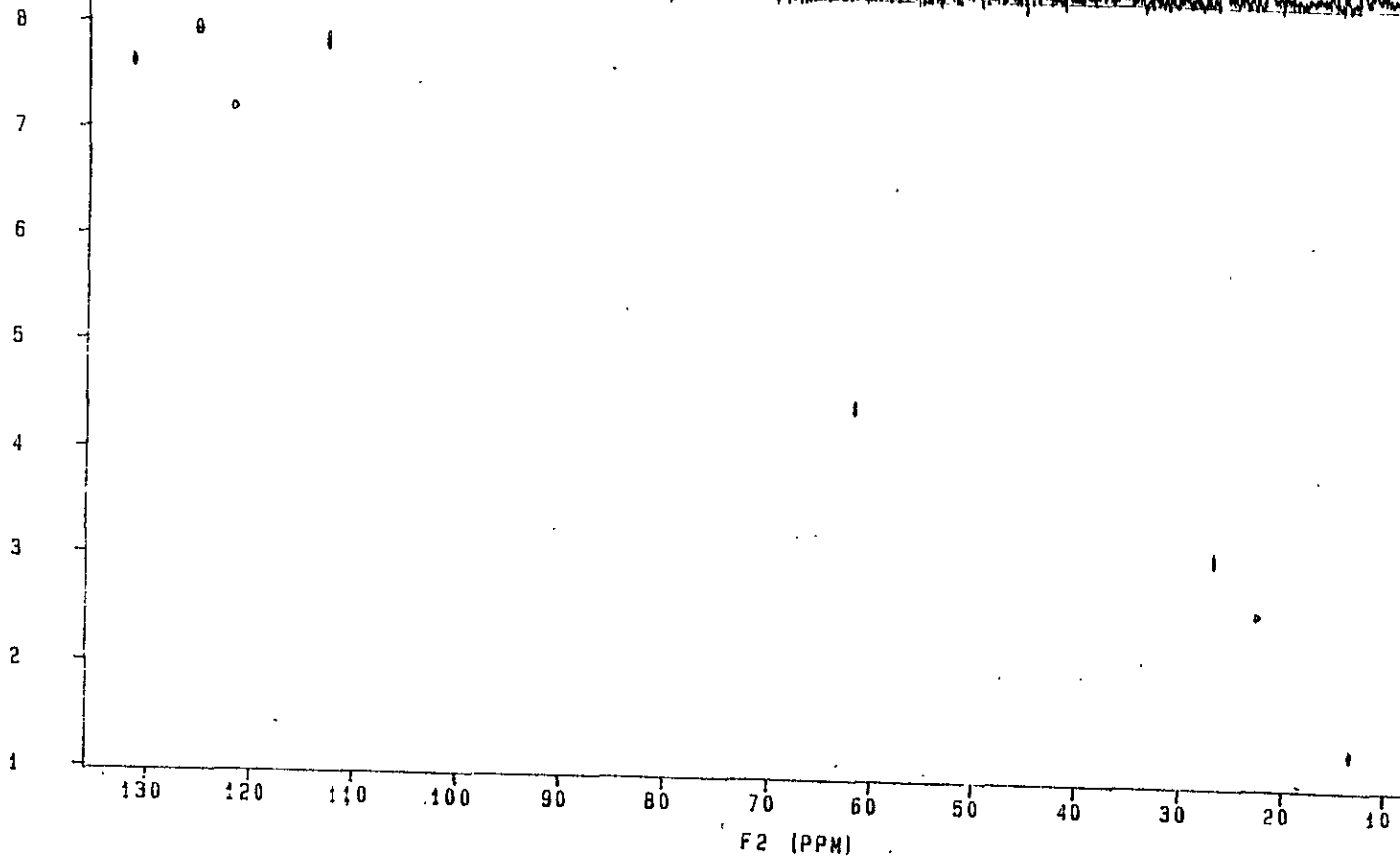
2

1



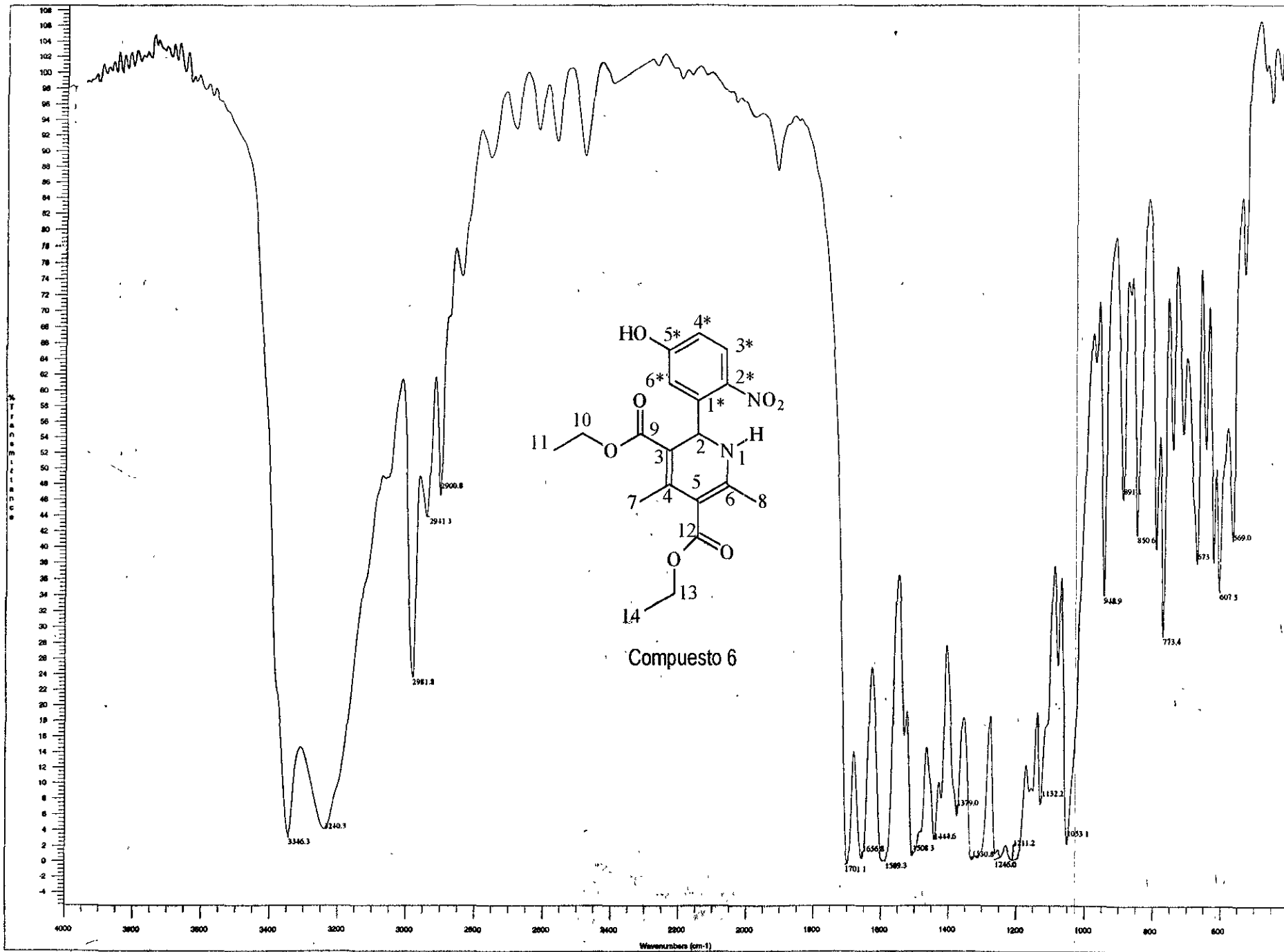
F2 (PPM)

5  
F1 (PPM)



Compuesto 5





1891004

100

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

40

60

80

100

120

140

160

180

200

220

240

260

280

300

320

340

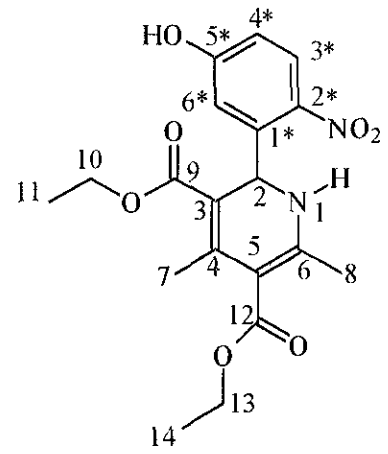
360

380

400

420

m/z



Compuesto 6

299

252

196

224

283

314

345

41

43

57

83

129

132

150

178

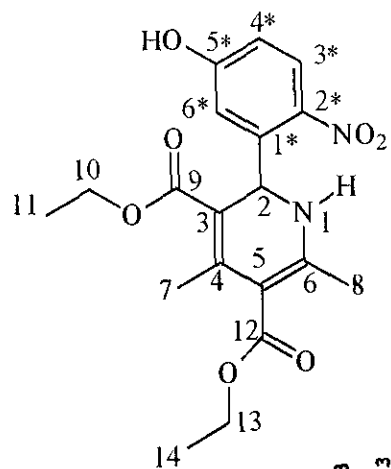
212

342

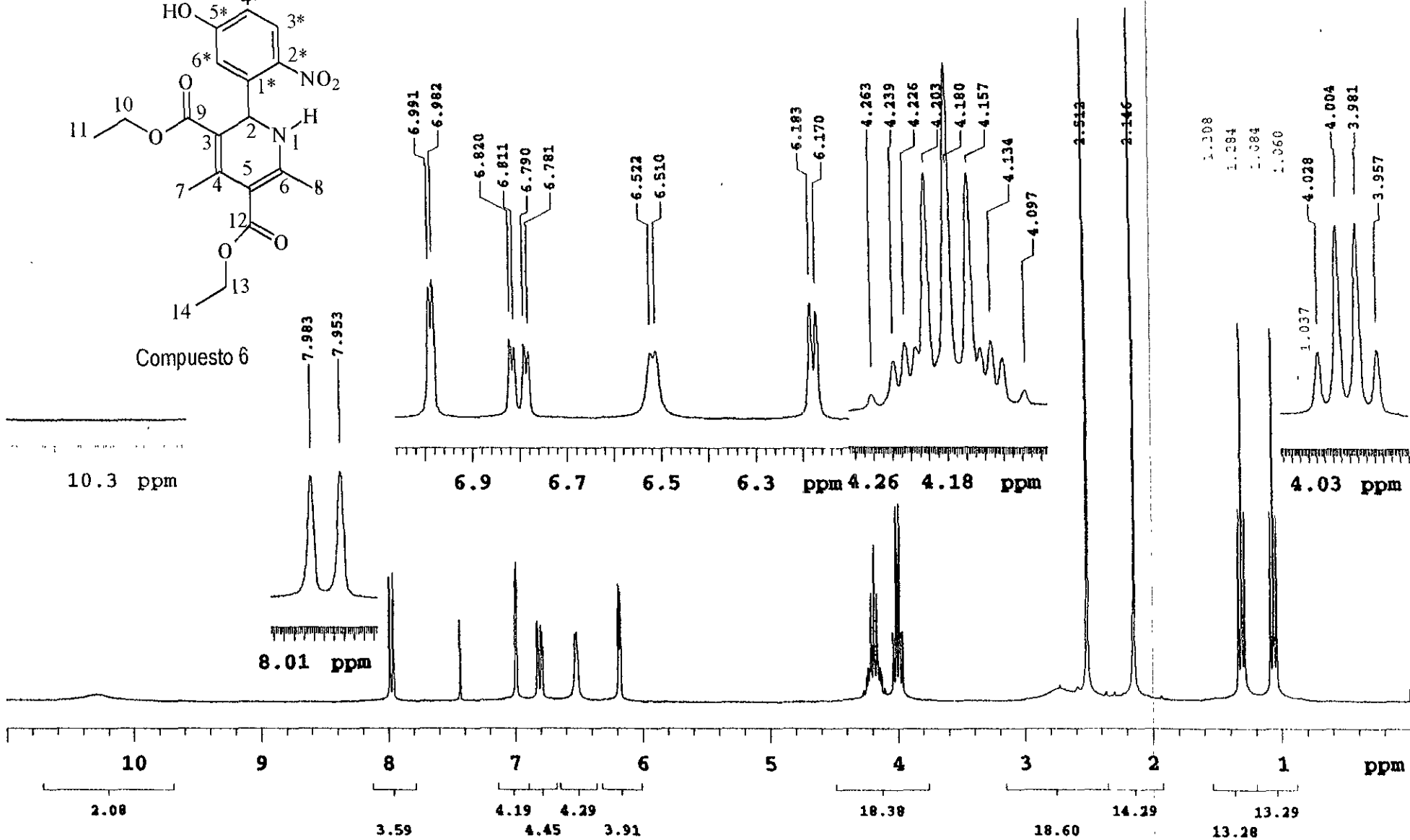
373

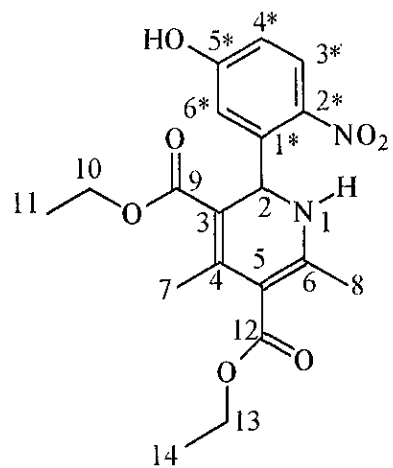
391

423

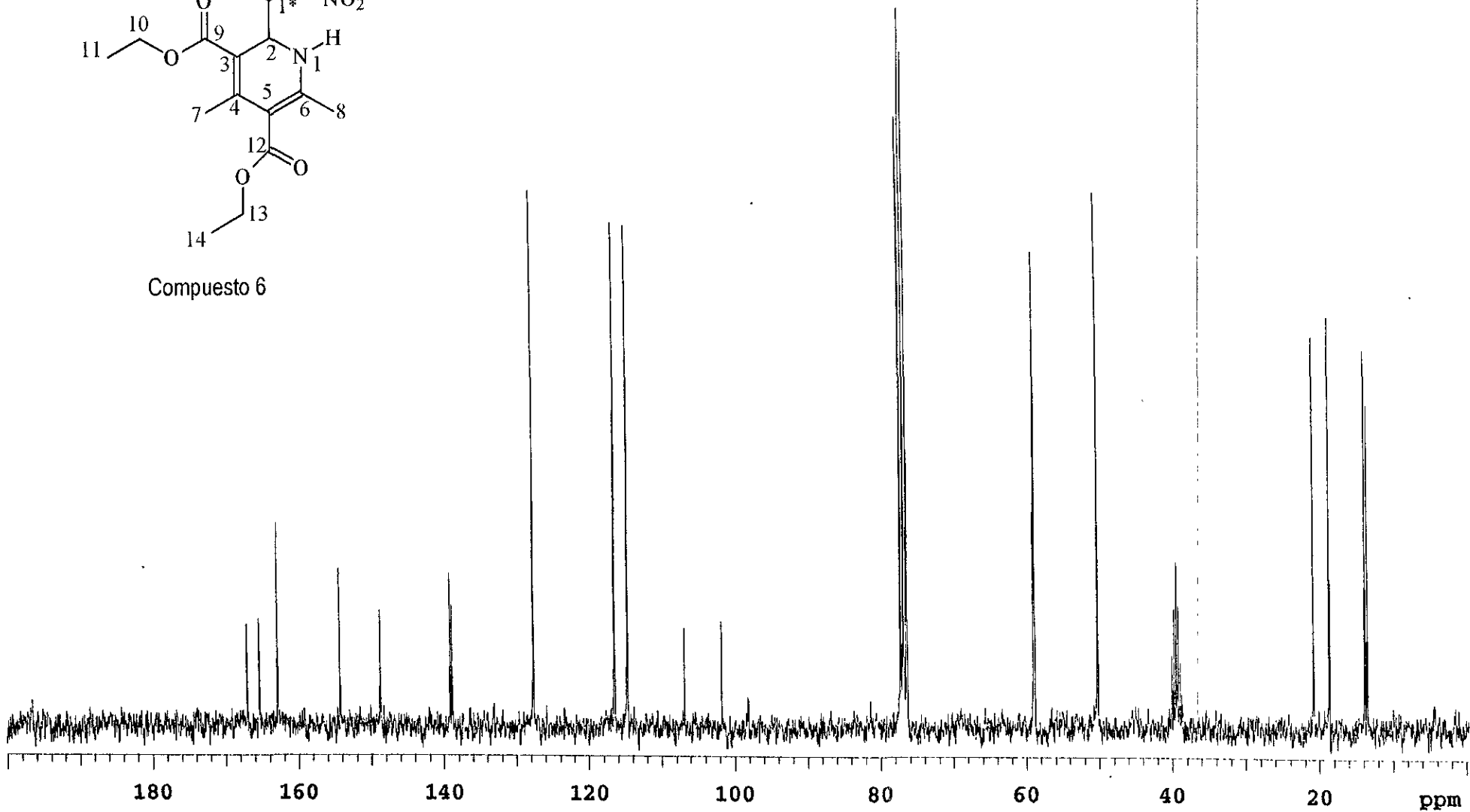


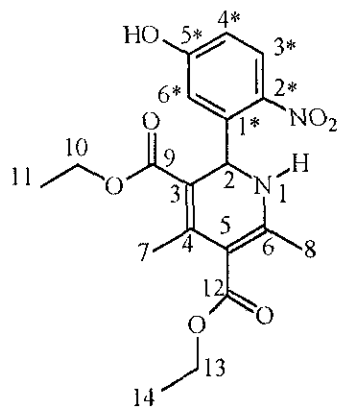
Compuesto 6



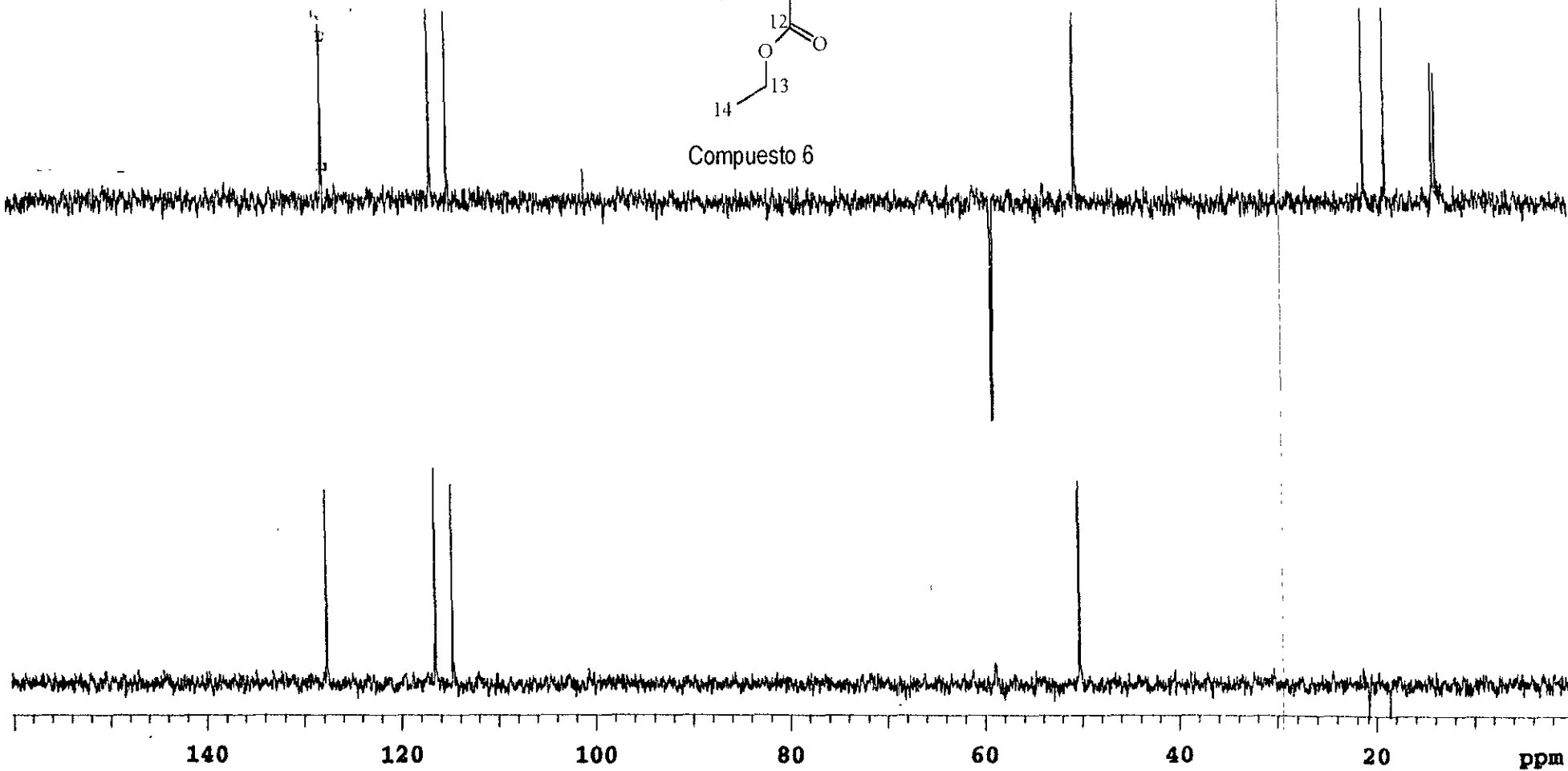


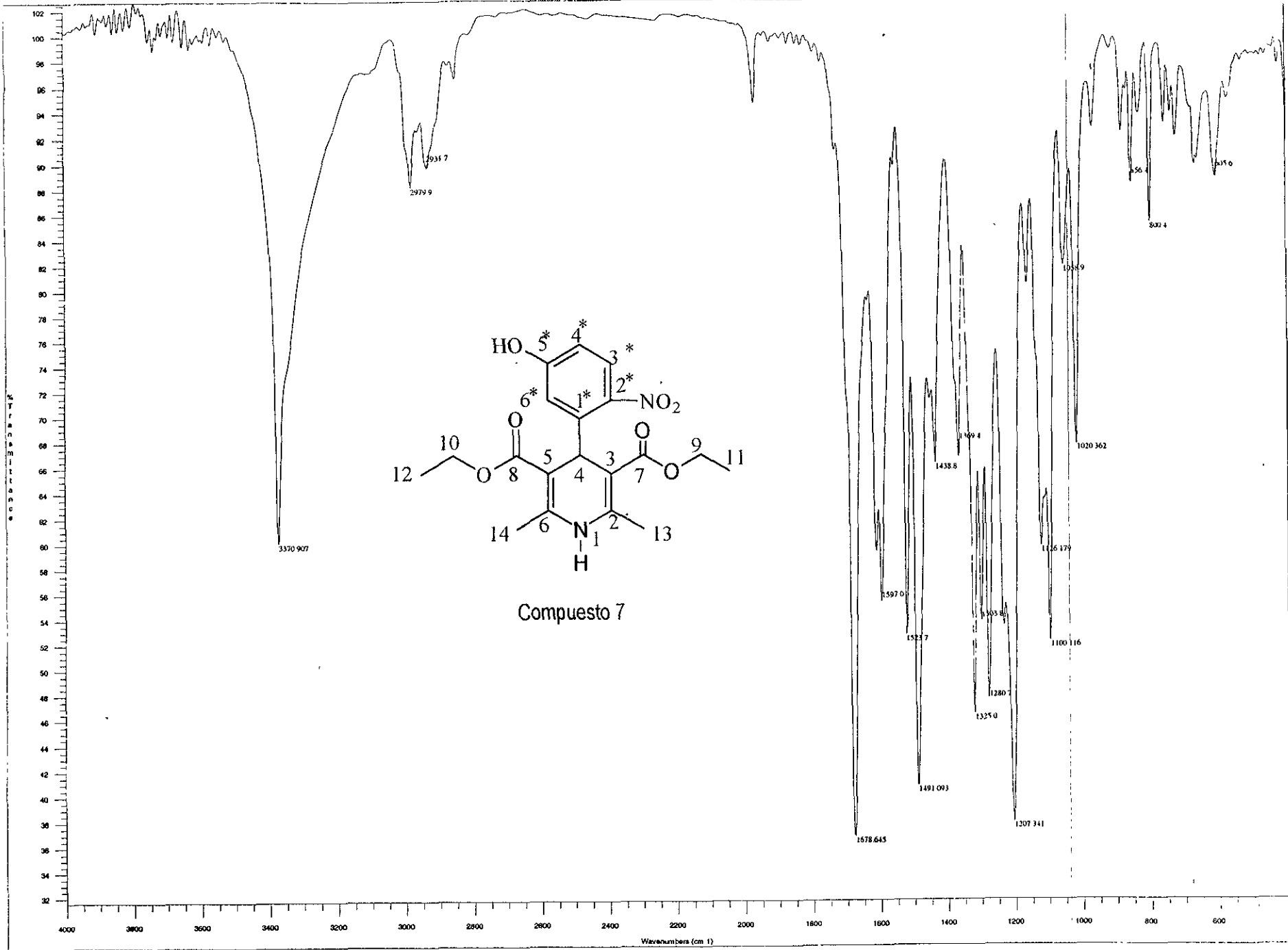
Compuesto 6



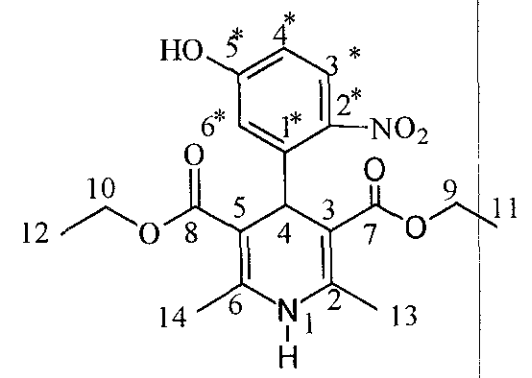
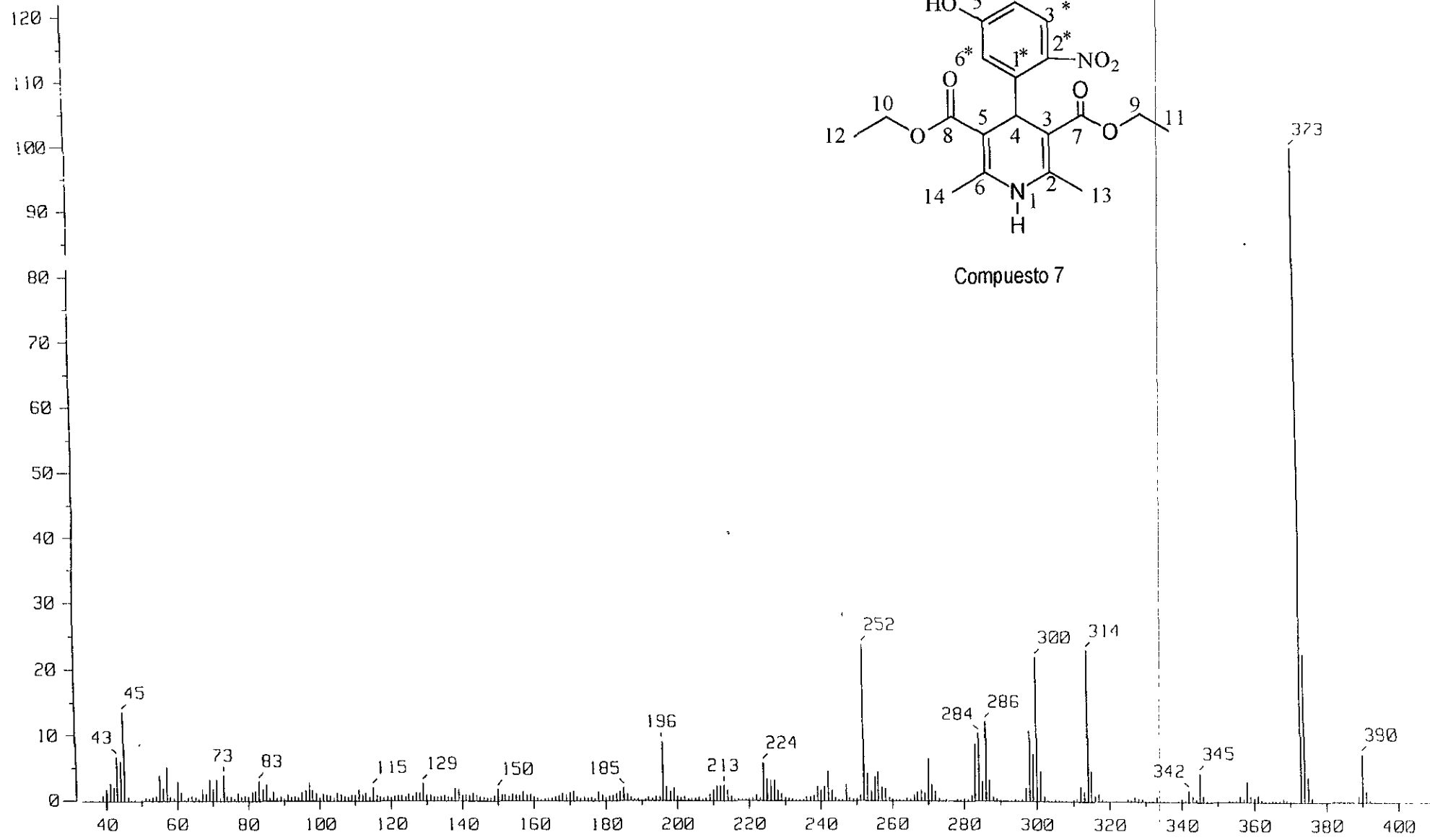


Compuesto 6

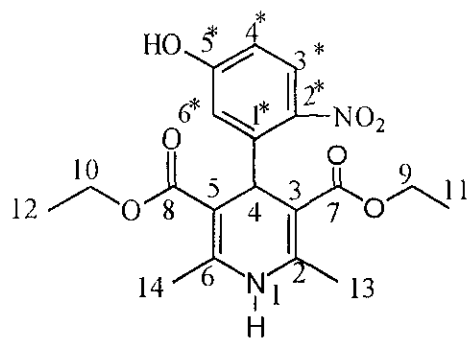




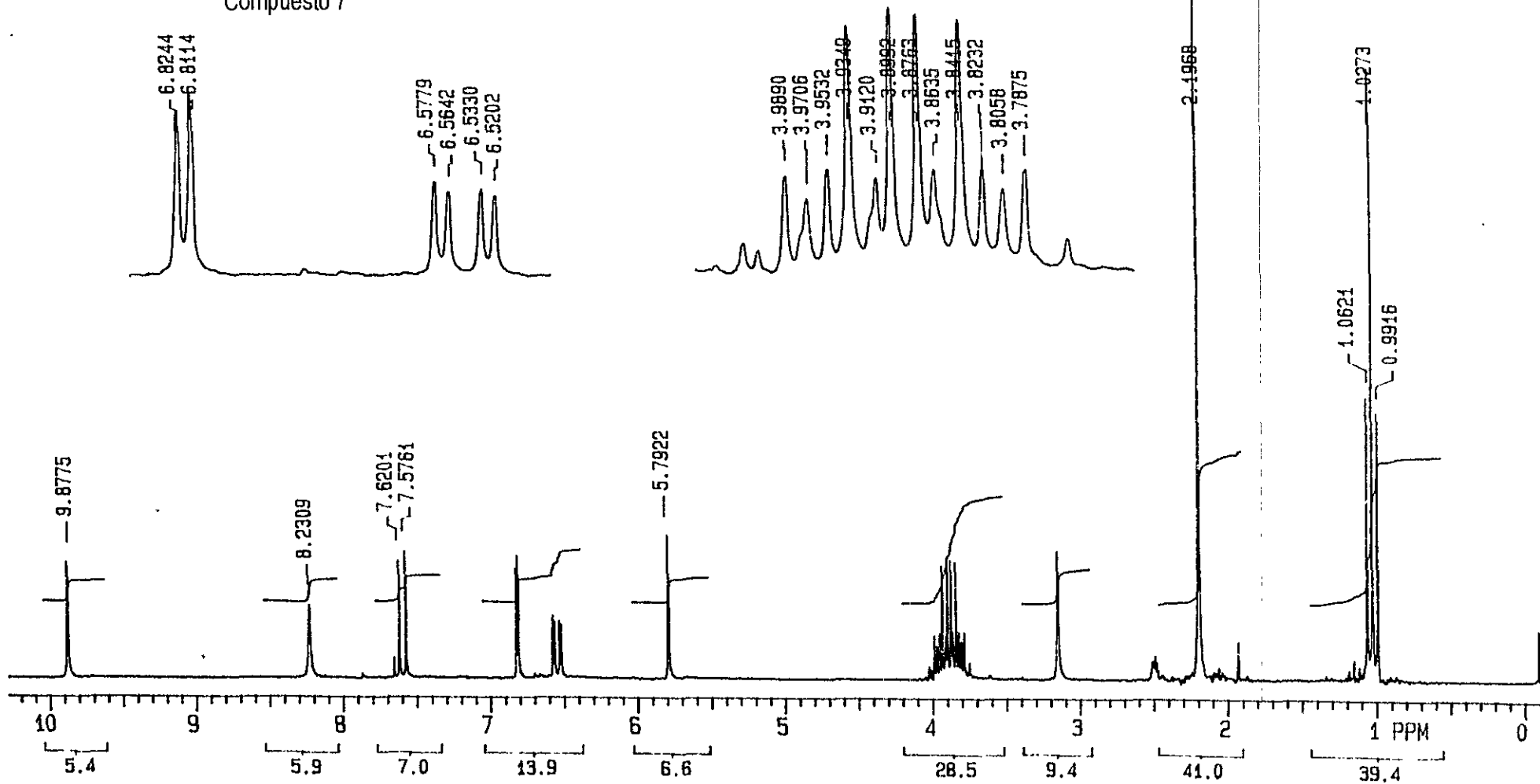
5554332



Compuesto 7

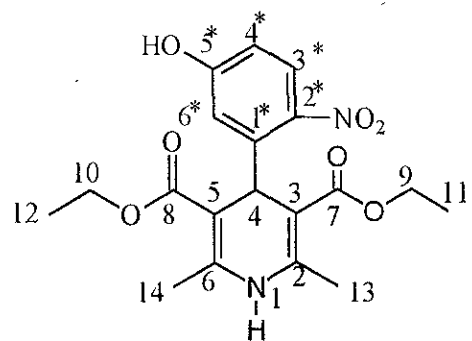


Compuesto 7

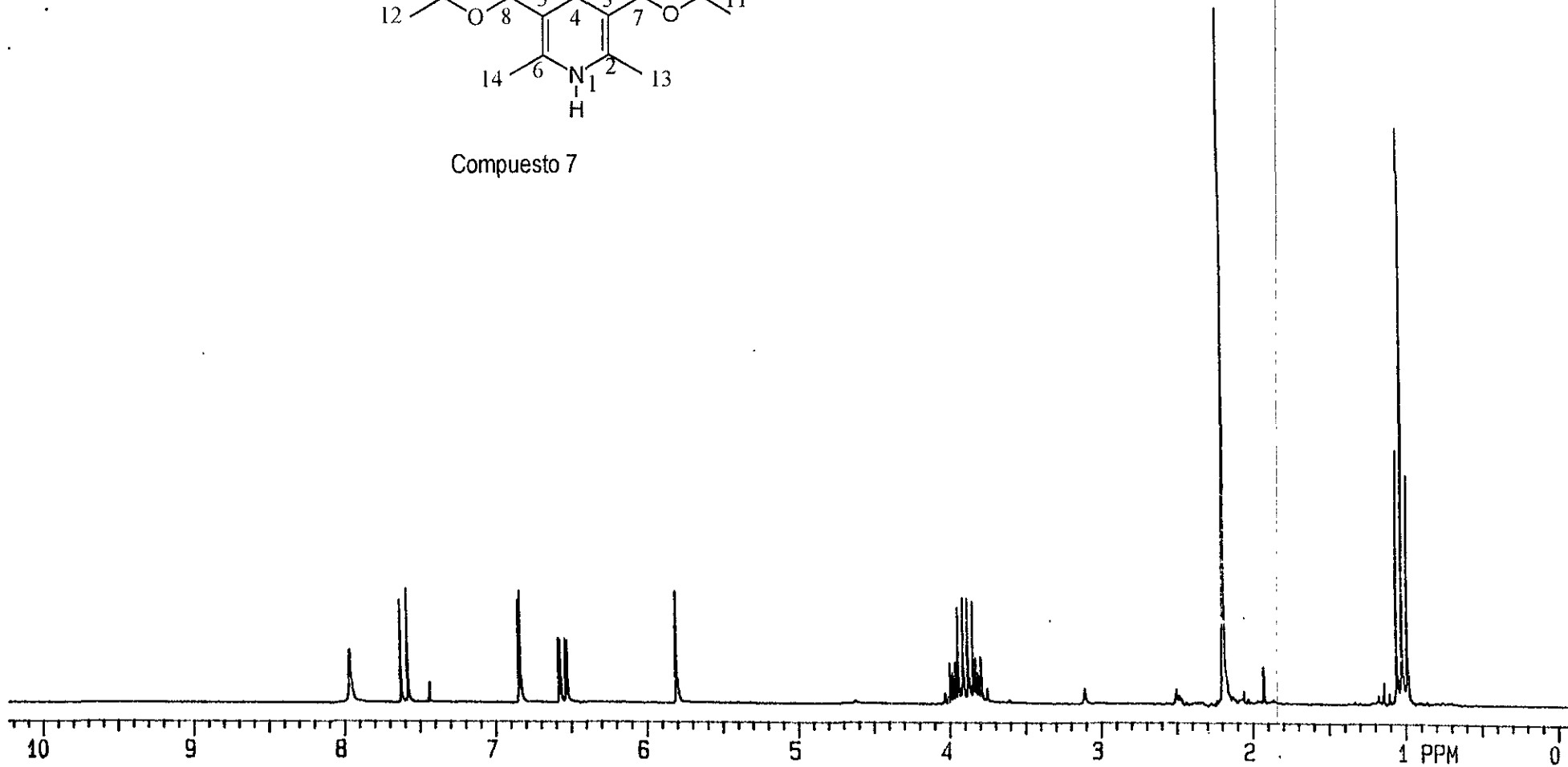


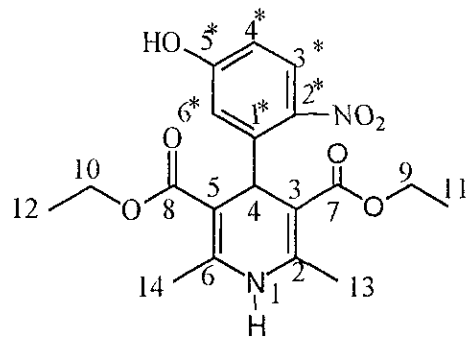


+D2O

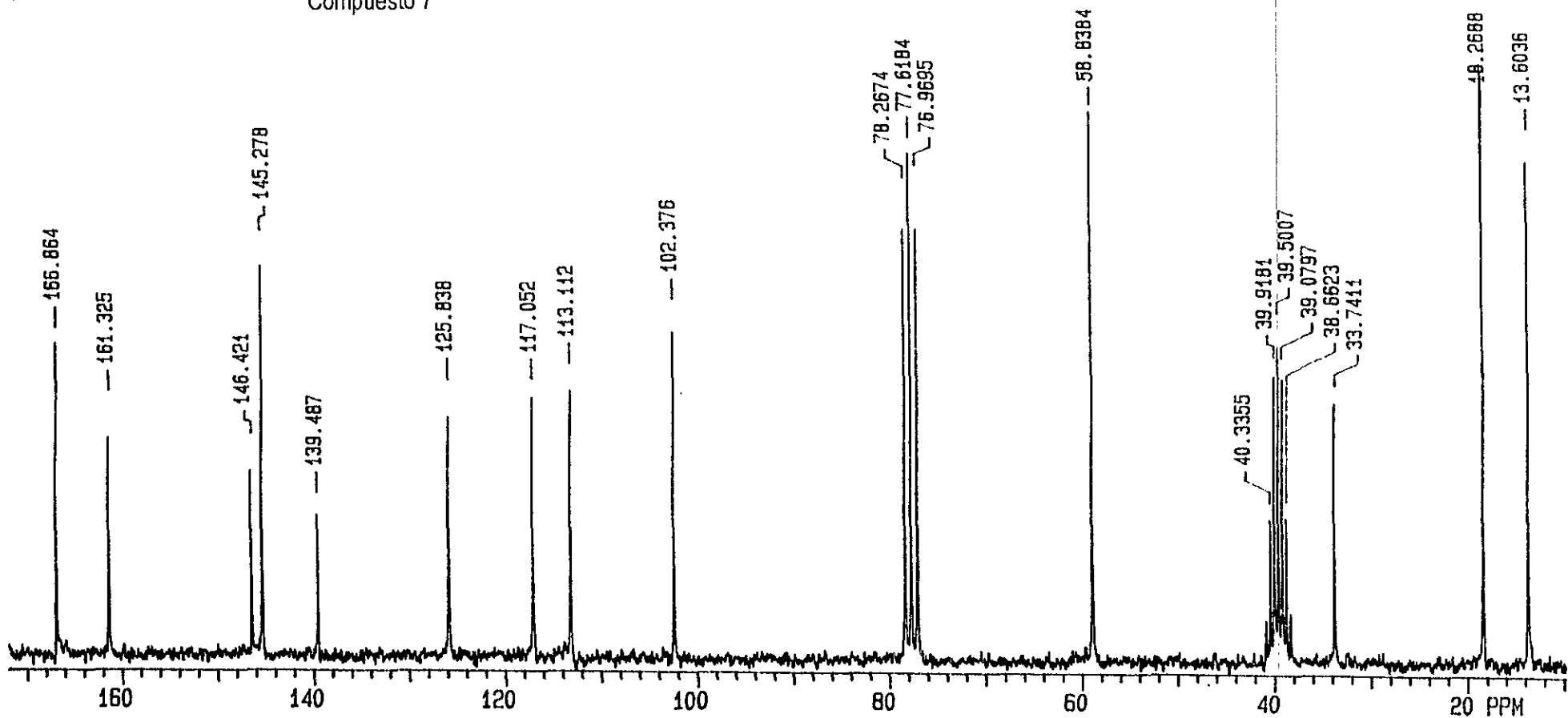


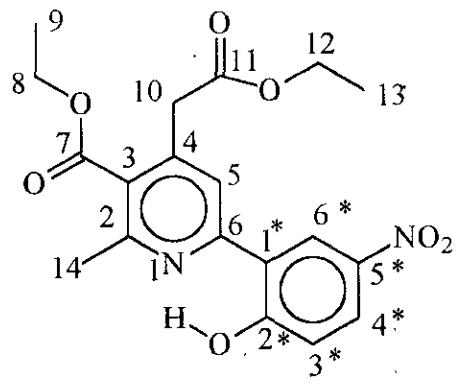
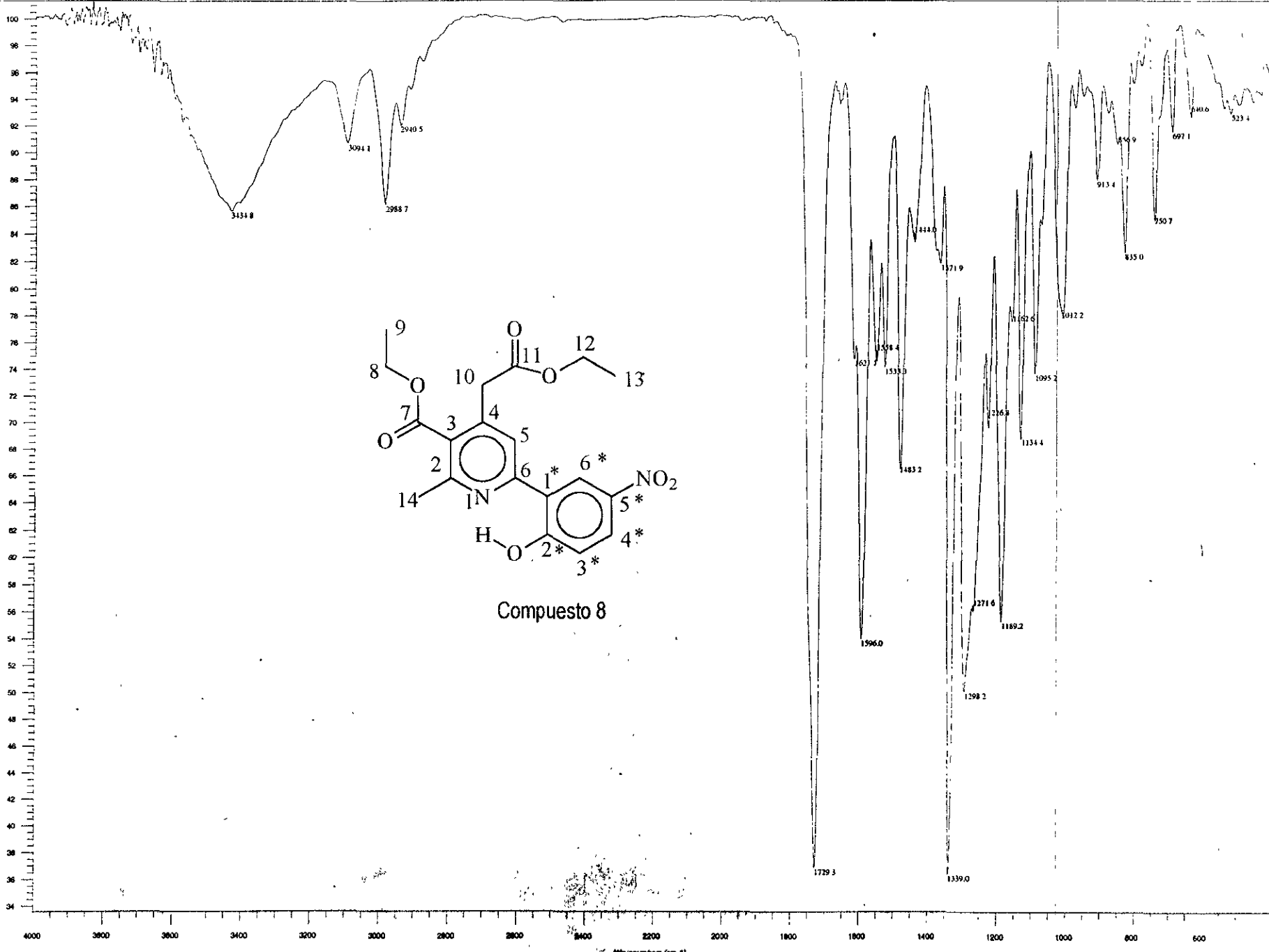
Compuesto 7





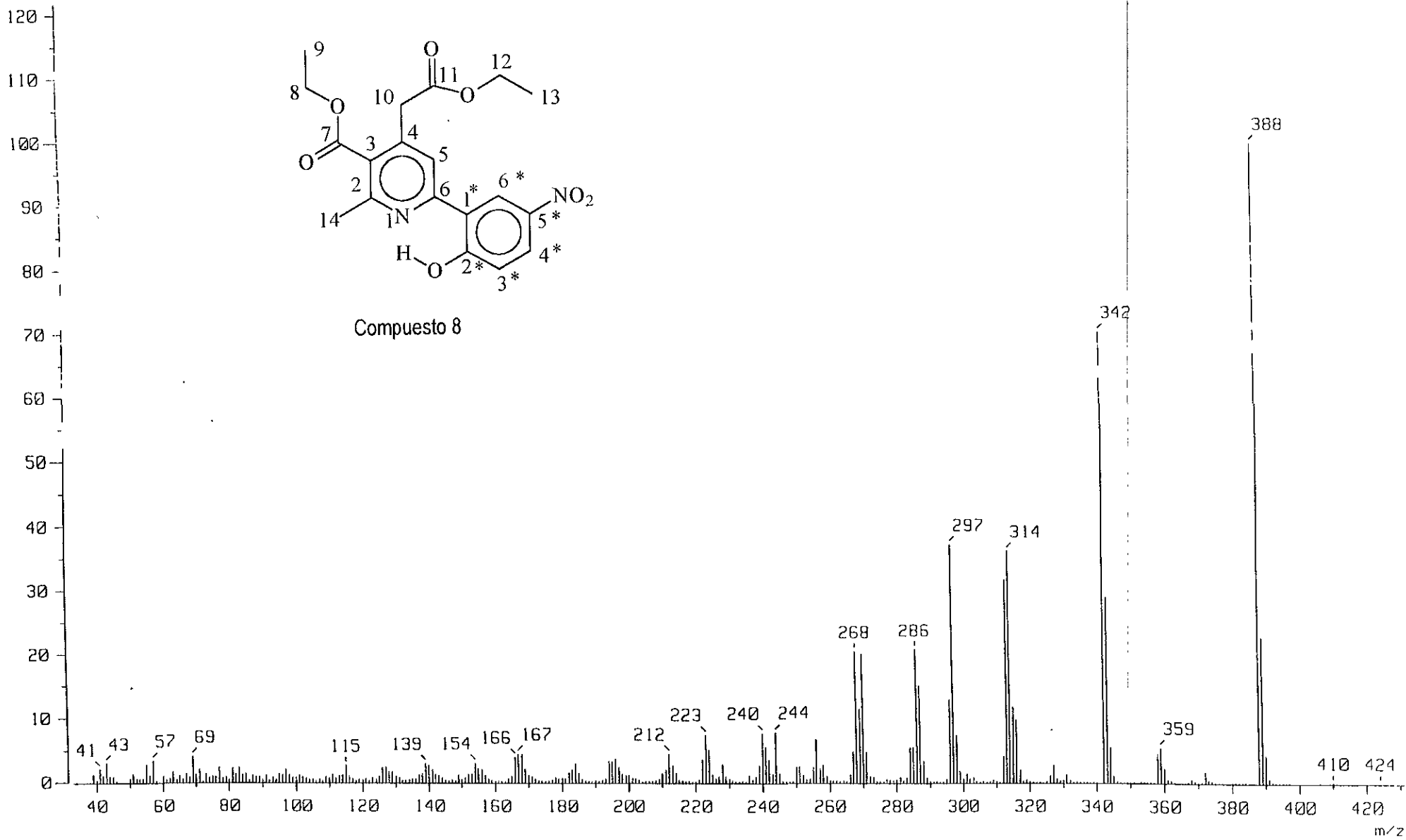
Compuesto 7



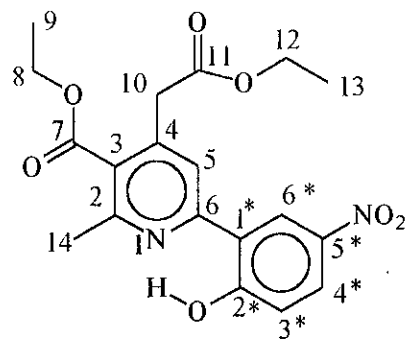


Compuesto 8

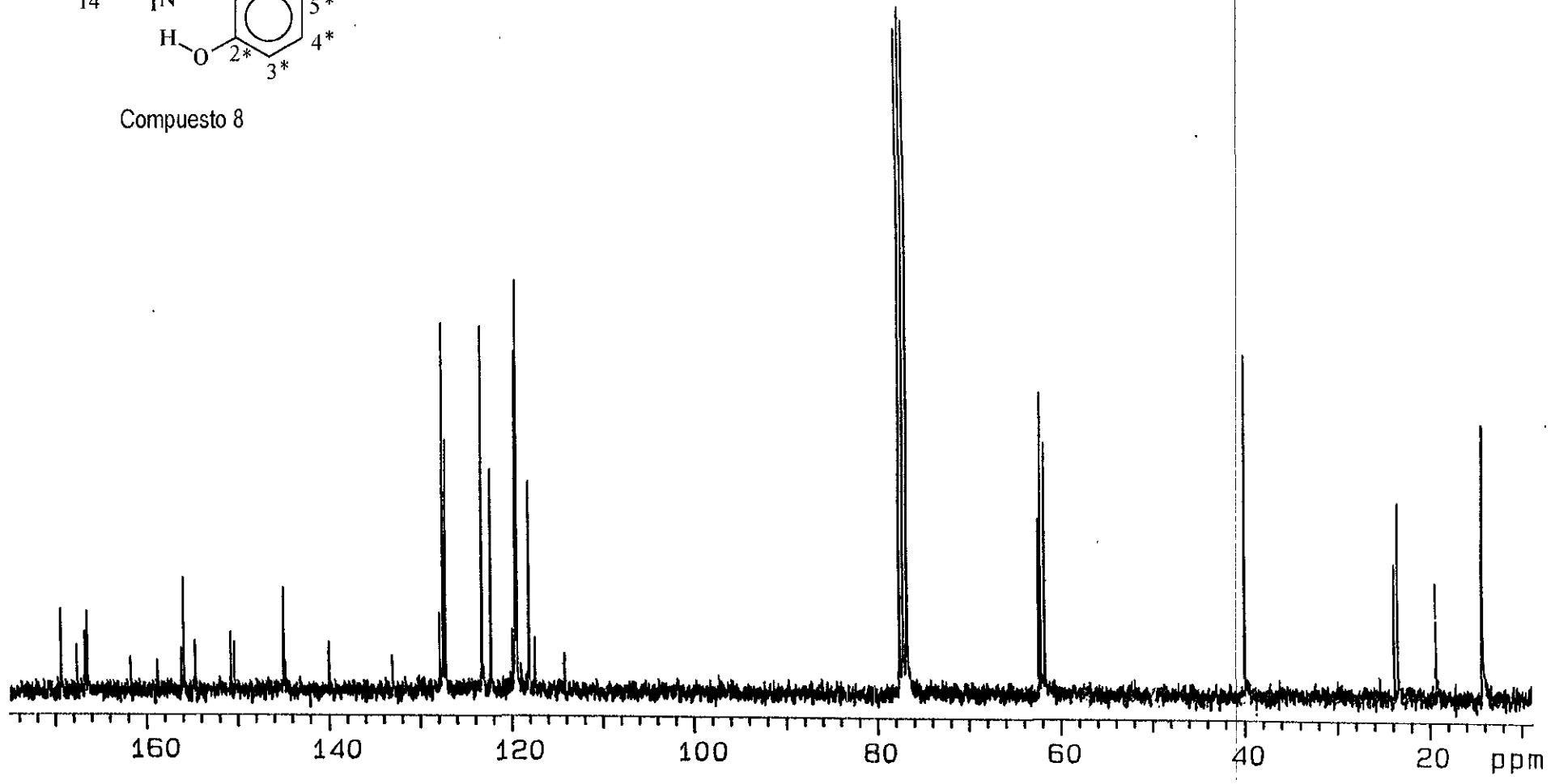
Wavenumbers (cm⁻¹)

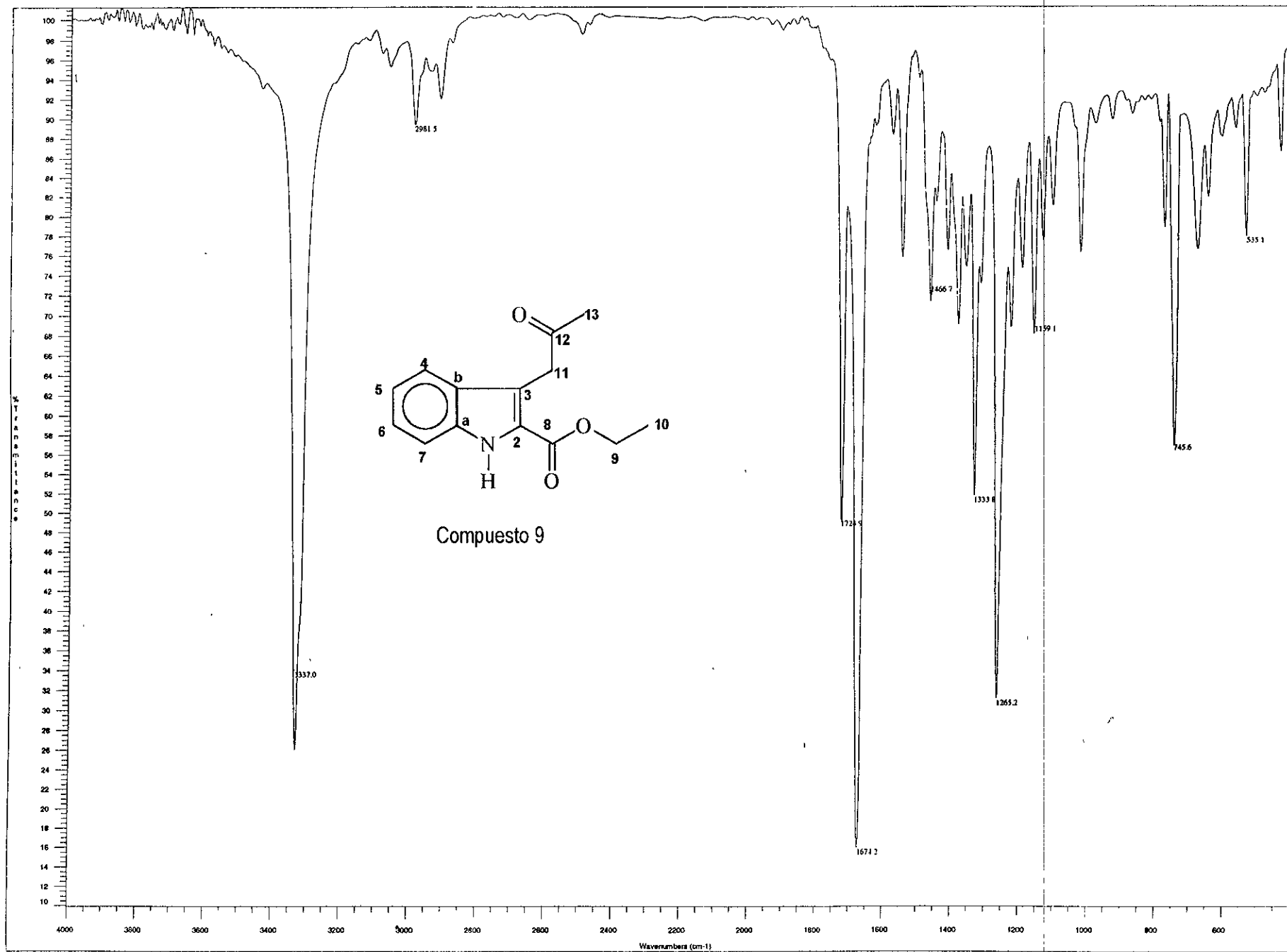


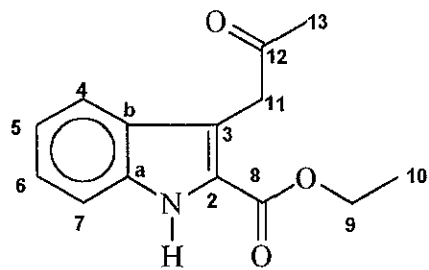




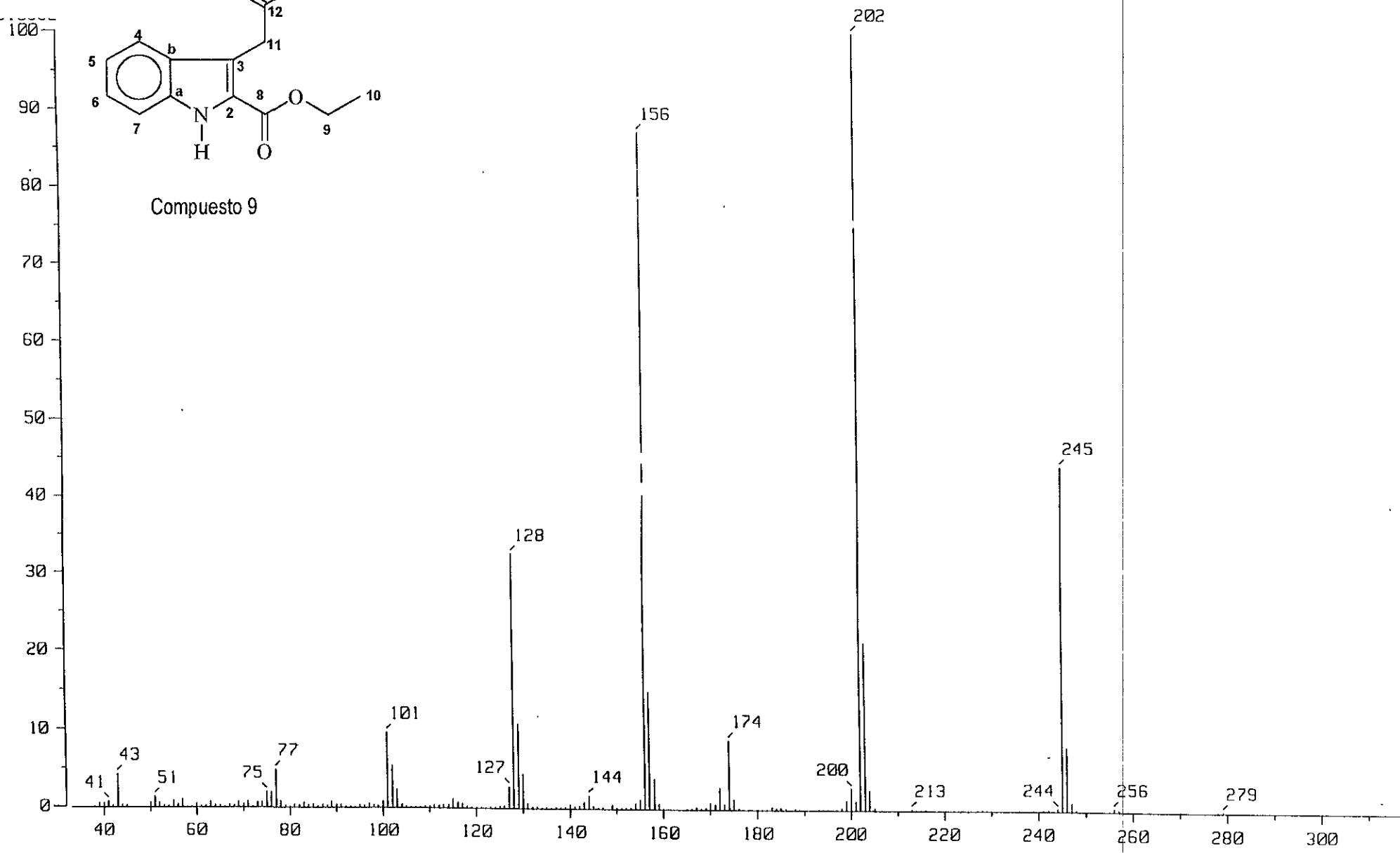
Compuesto 8



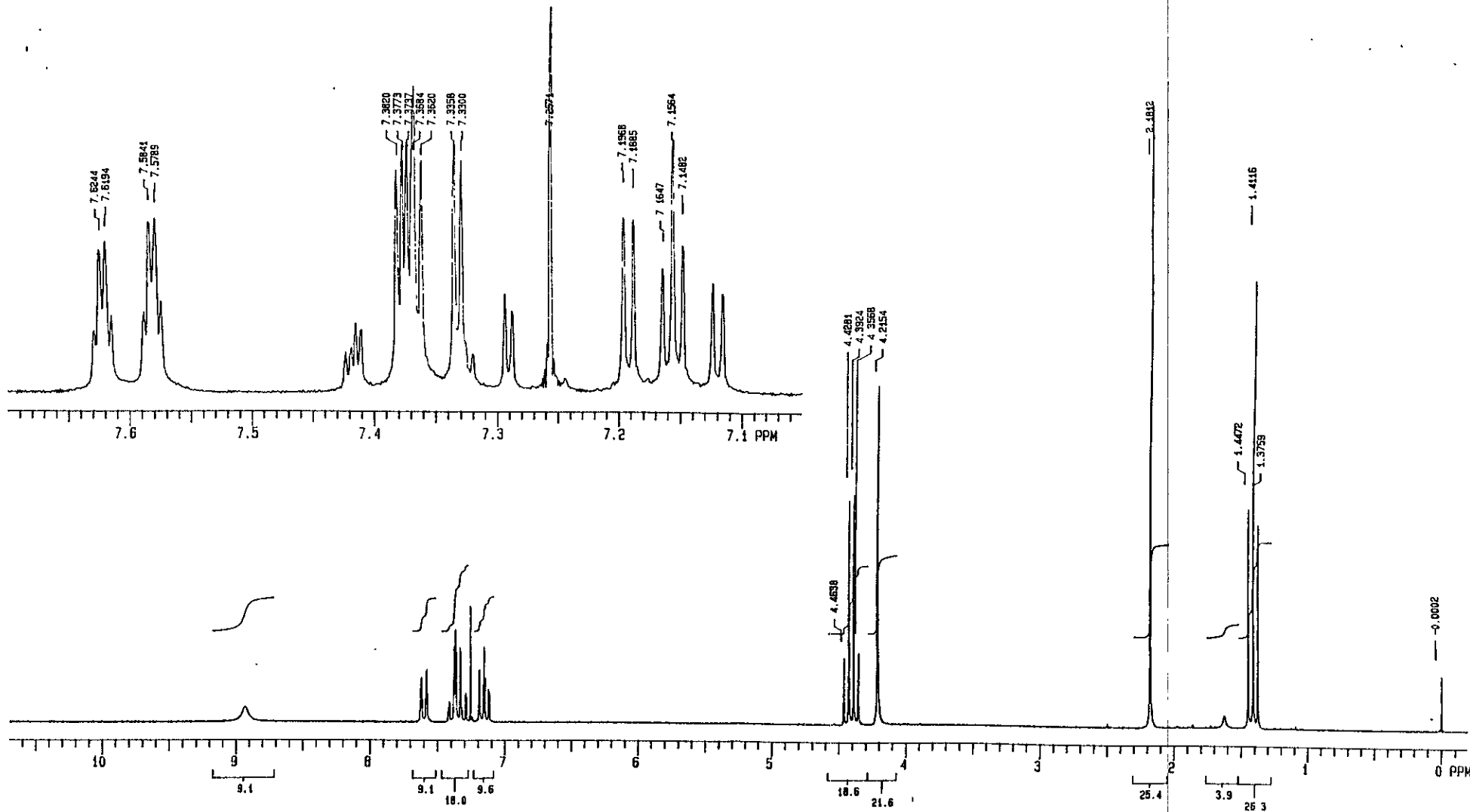




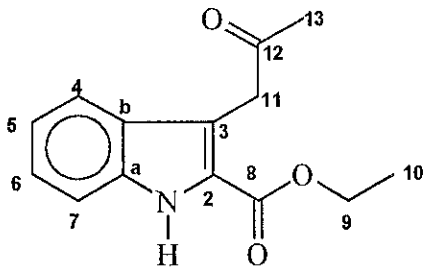
Compuesto 9



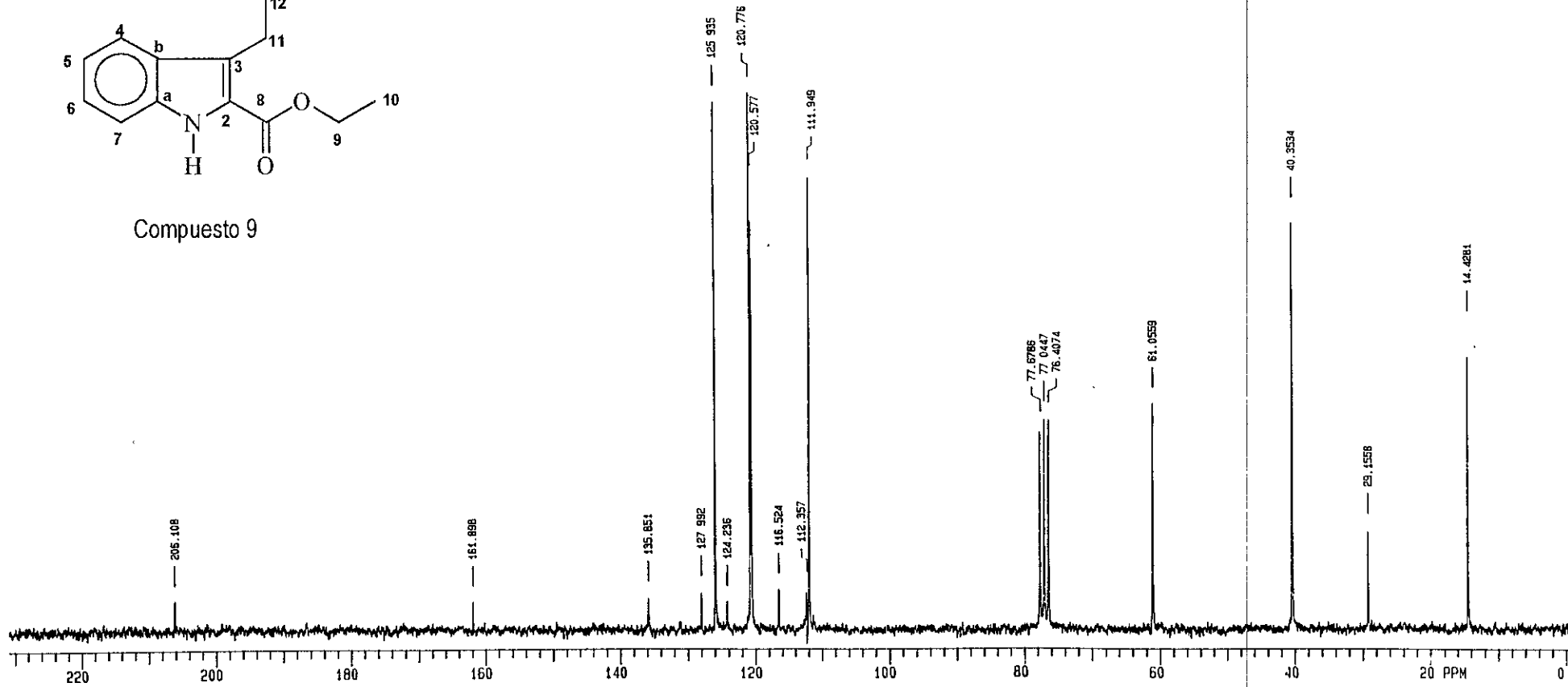


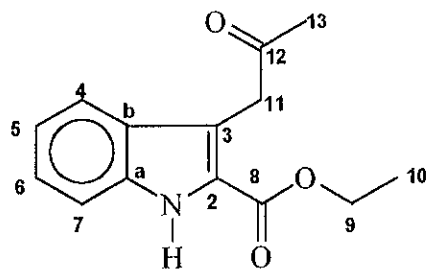


Compuesto 9

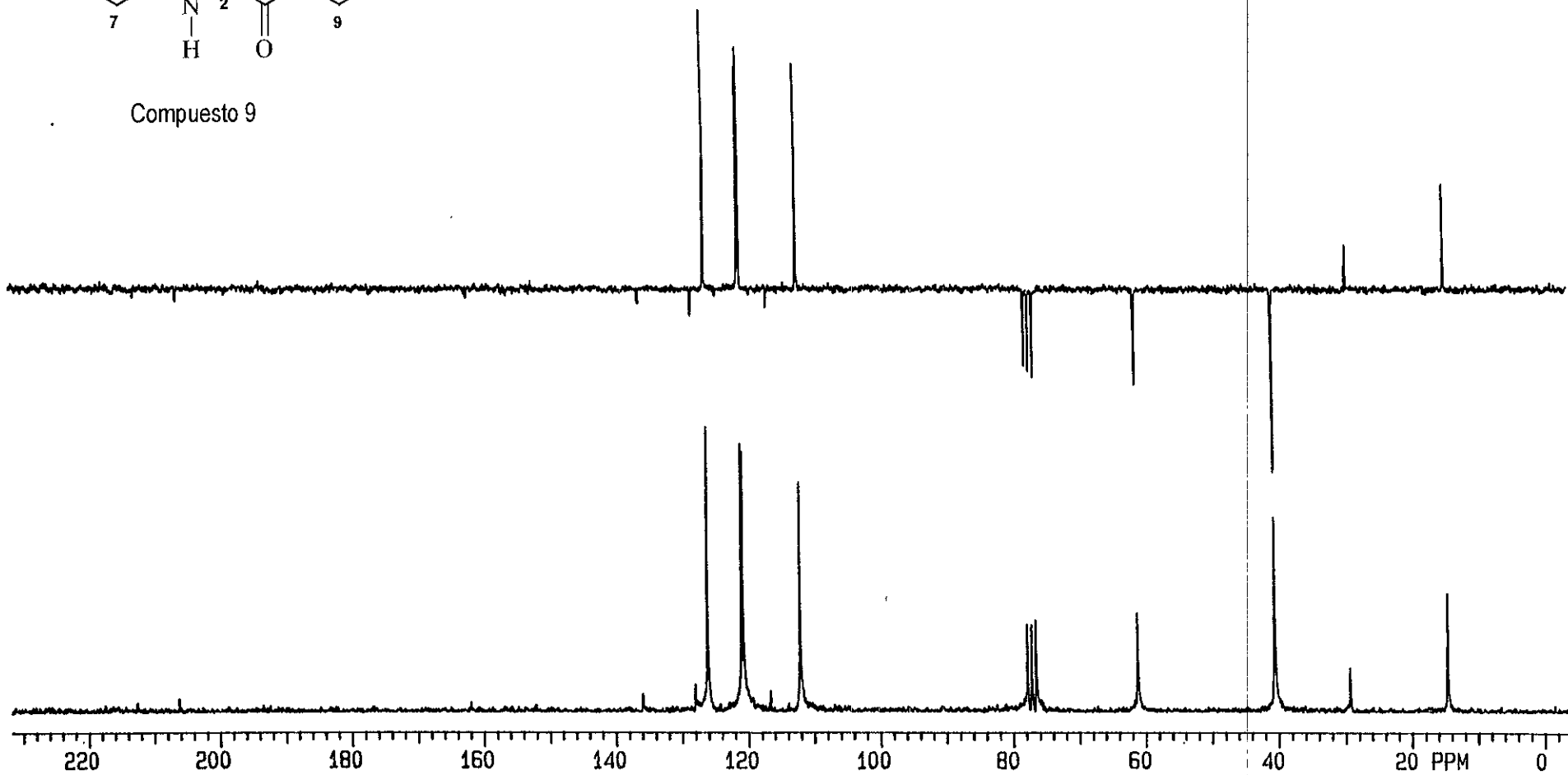


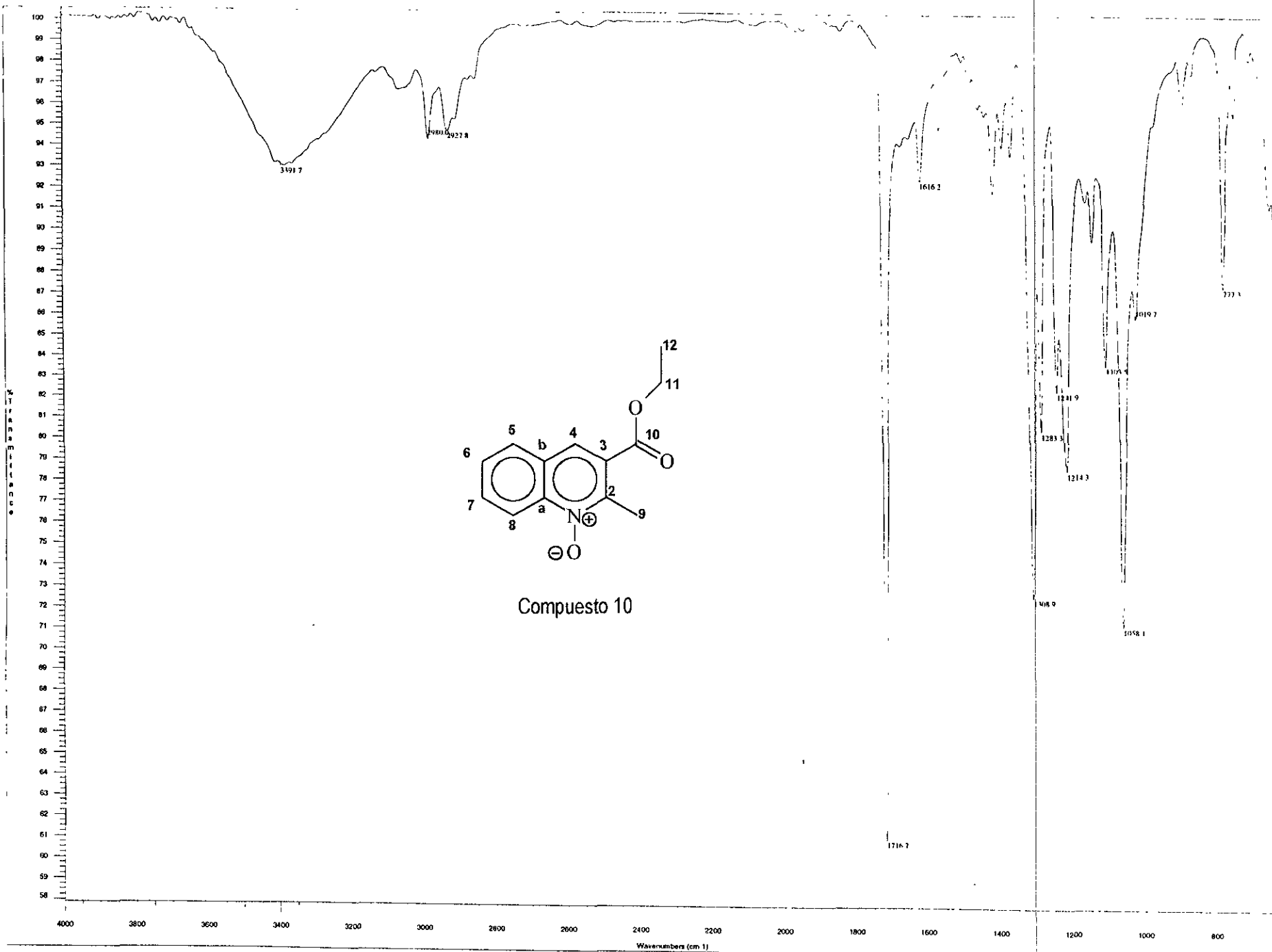
Compuesto 9

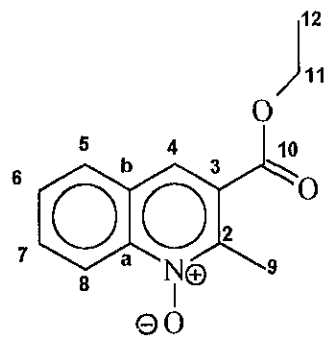




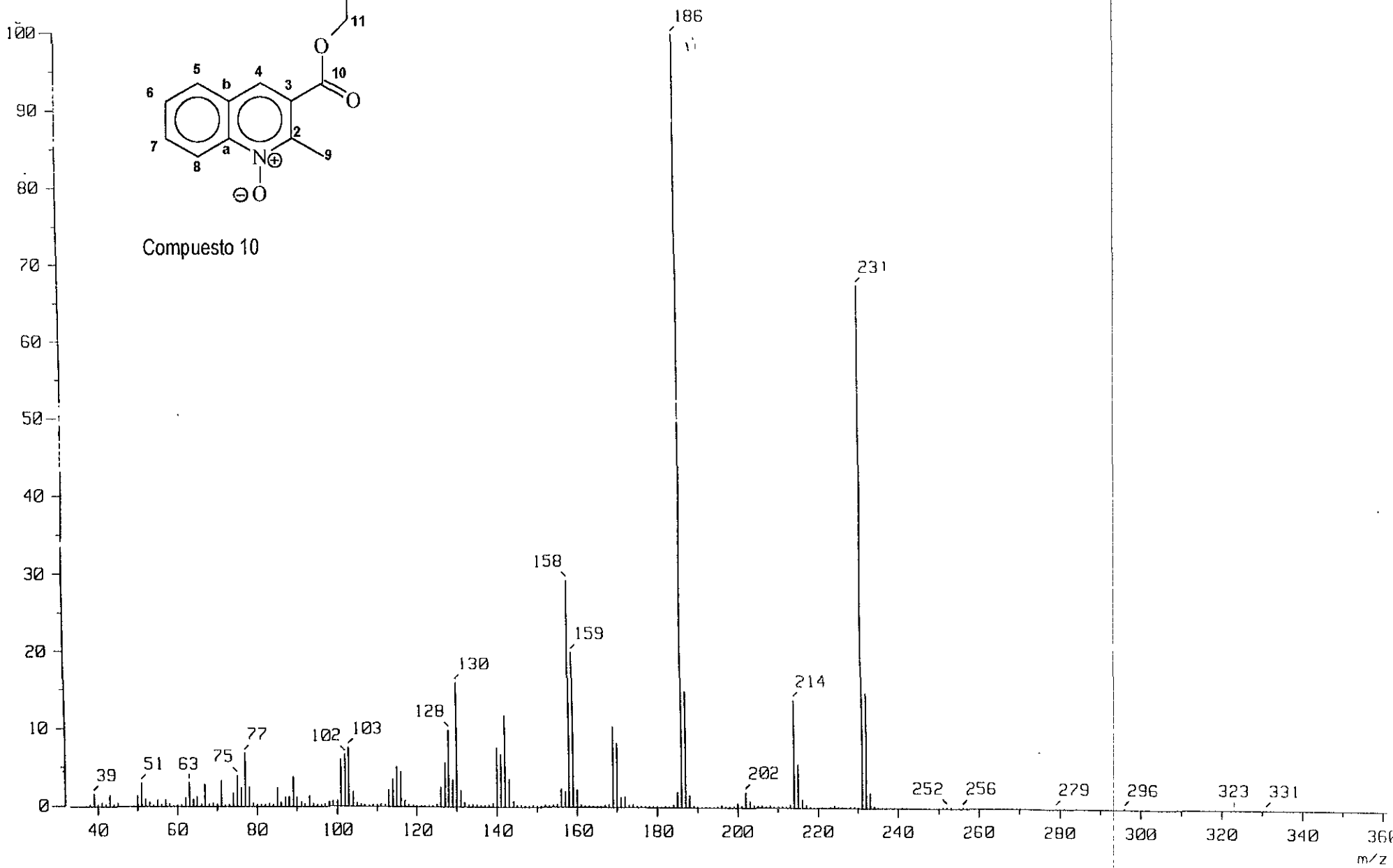
Compuesto 9

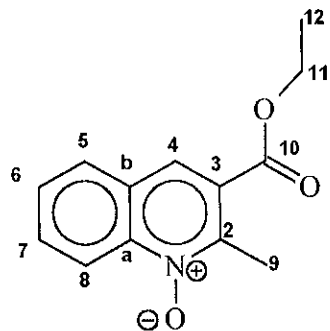




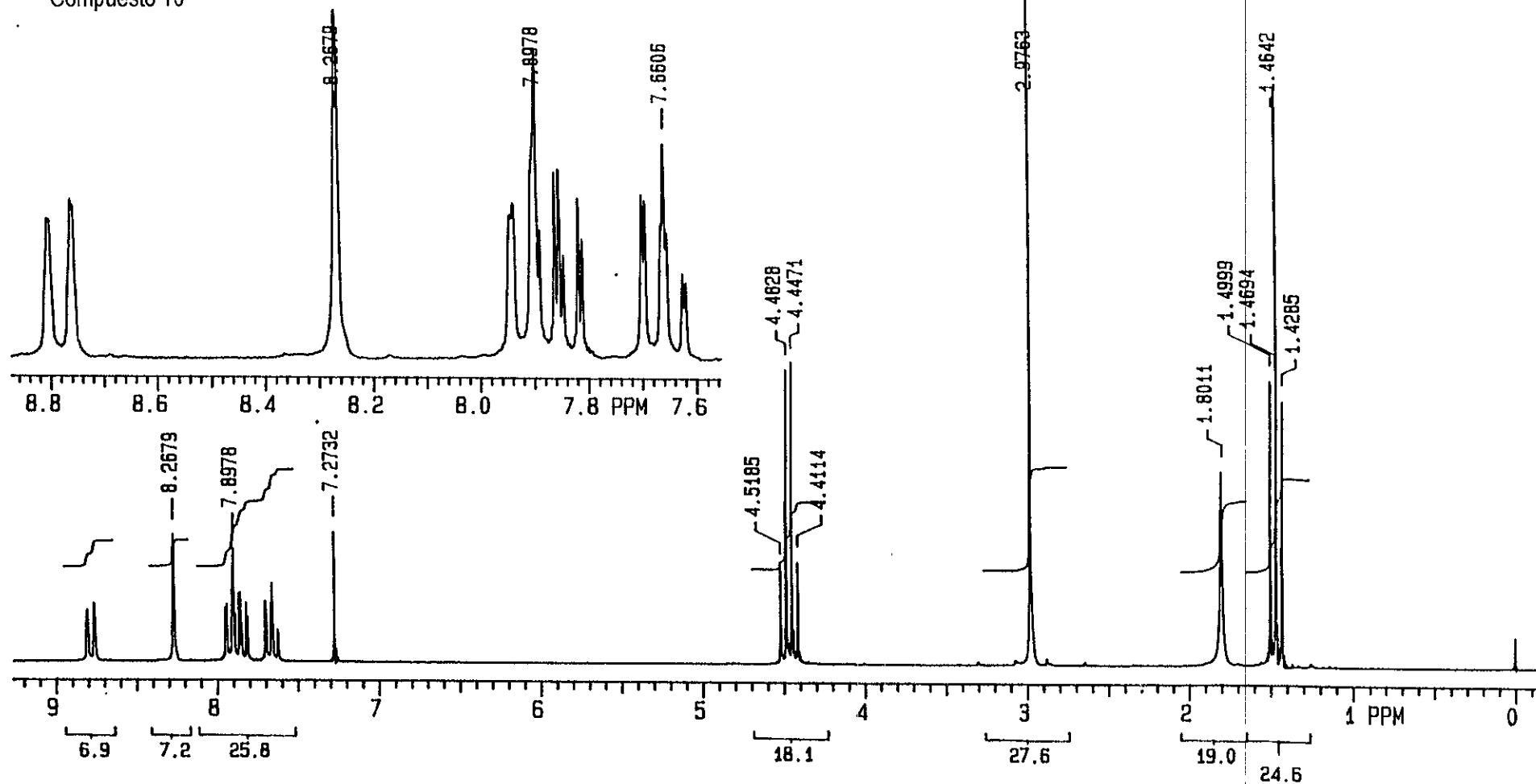


Compuesto 10

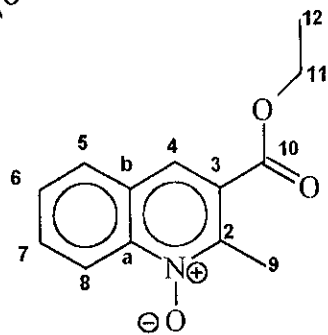




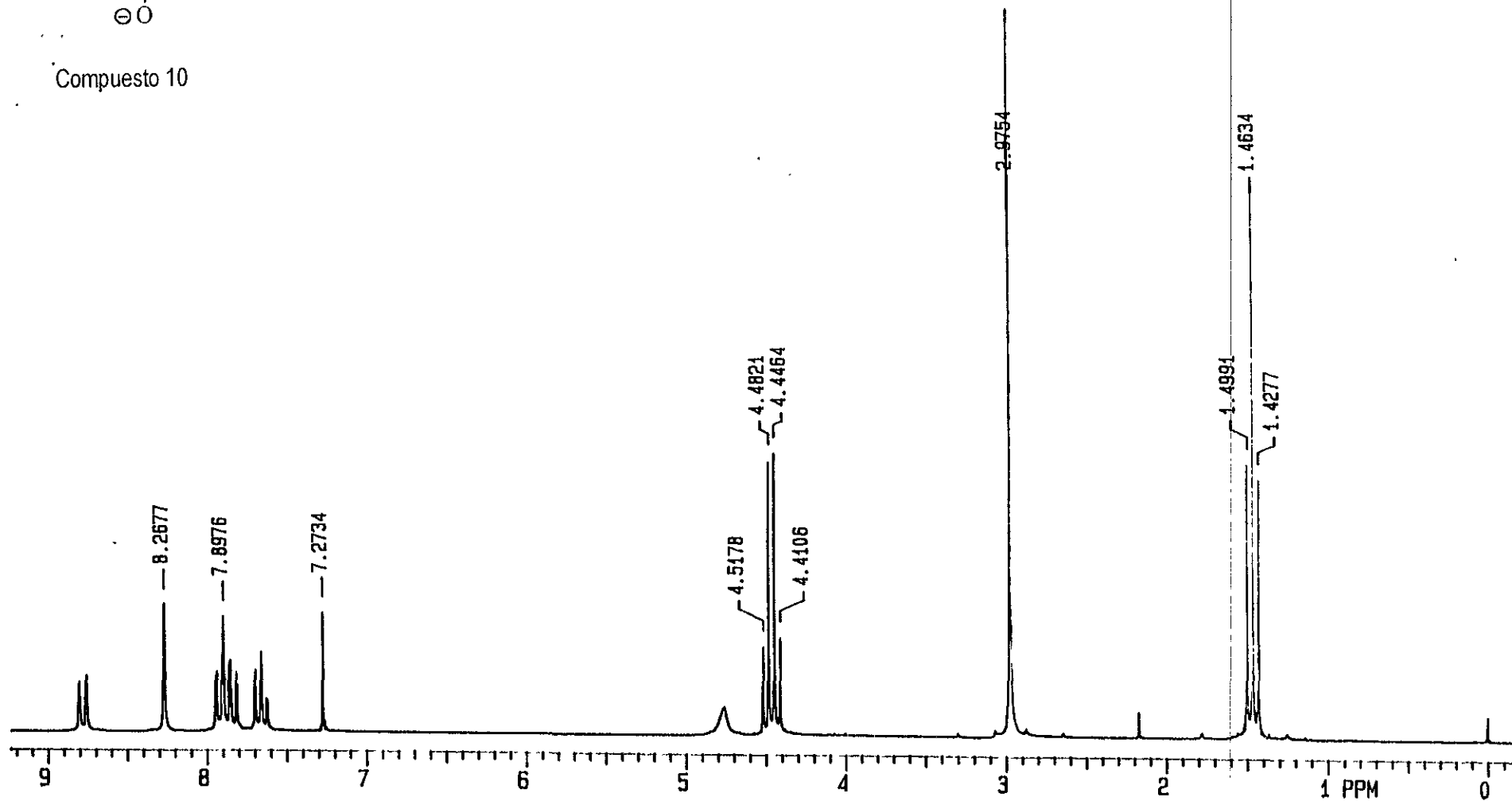
Compuesto 10

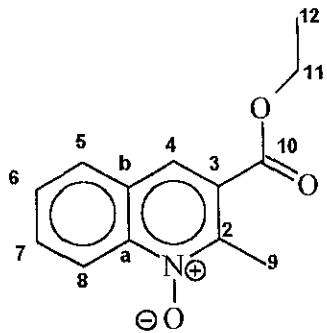


10

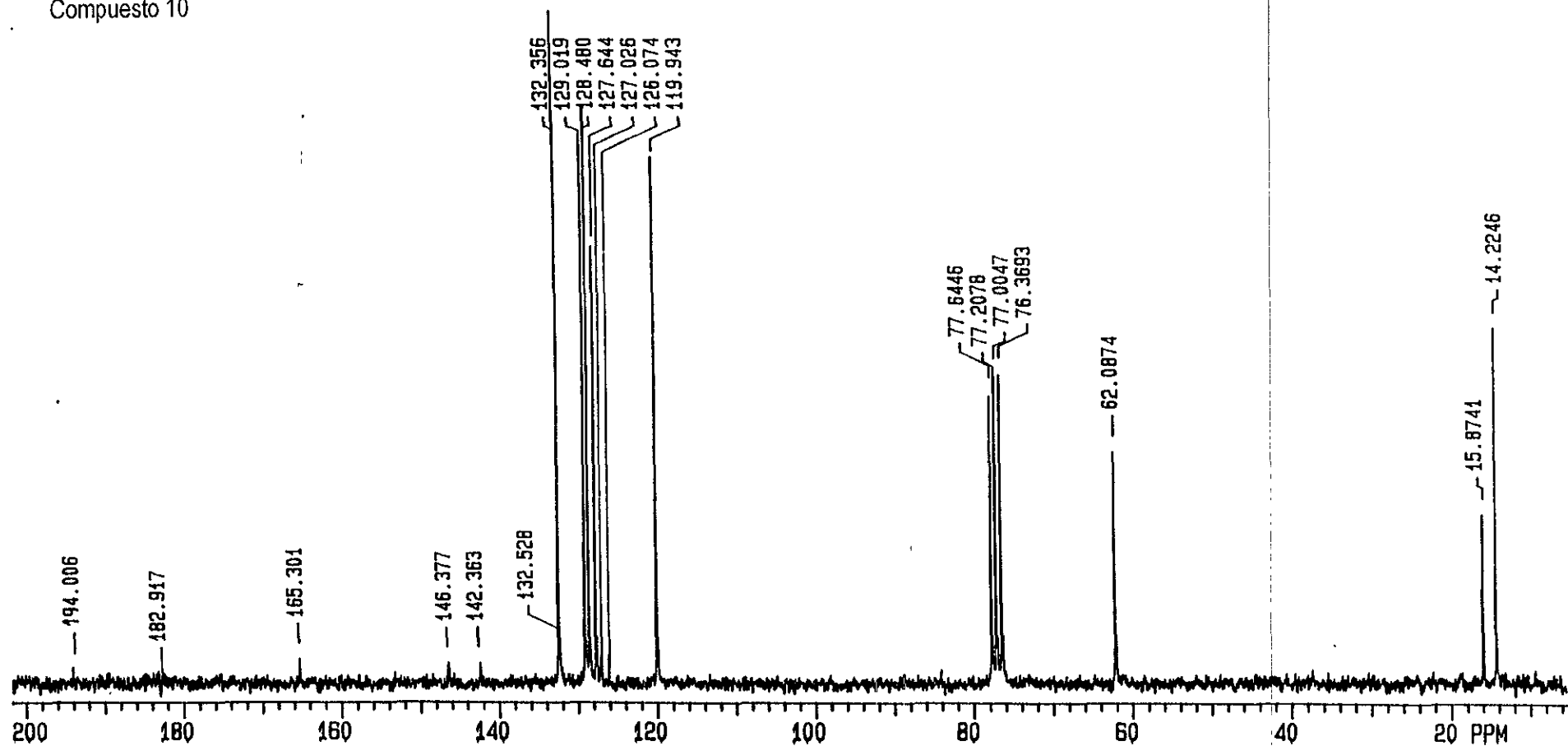


Compuesto 10

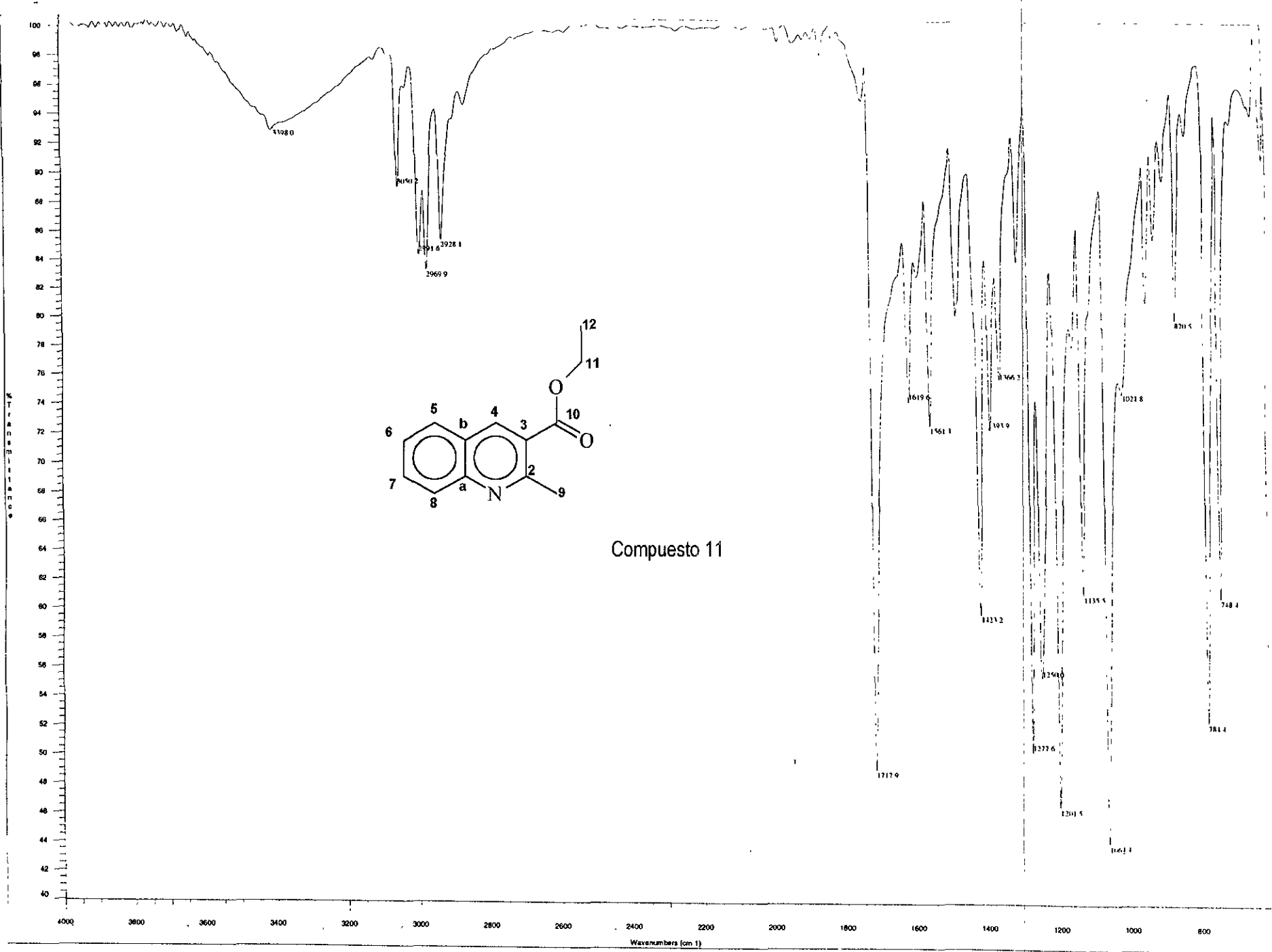




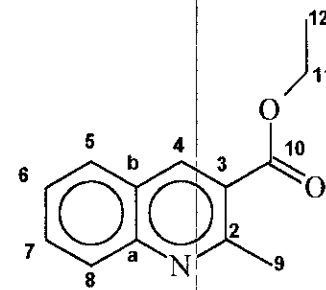
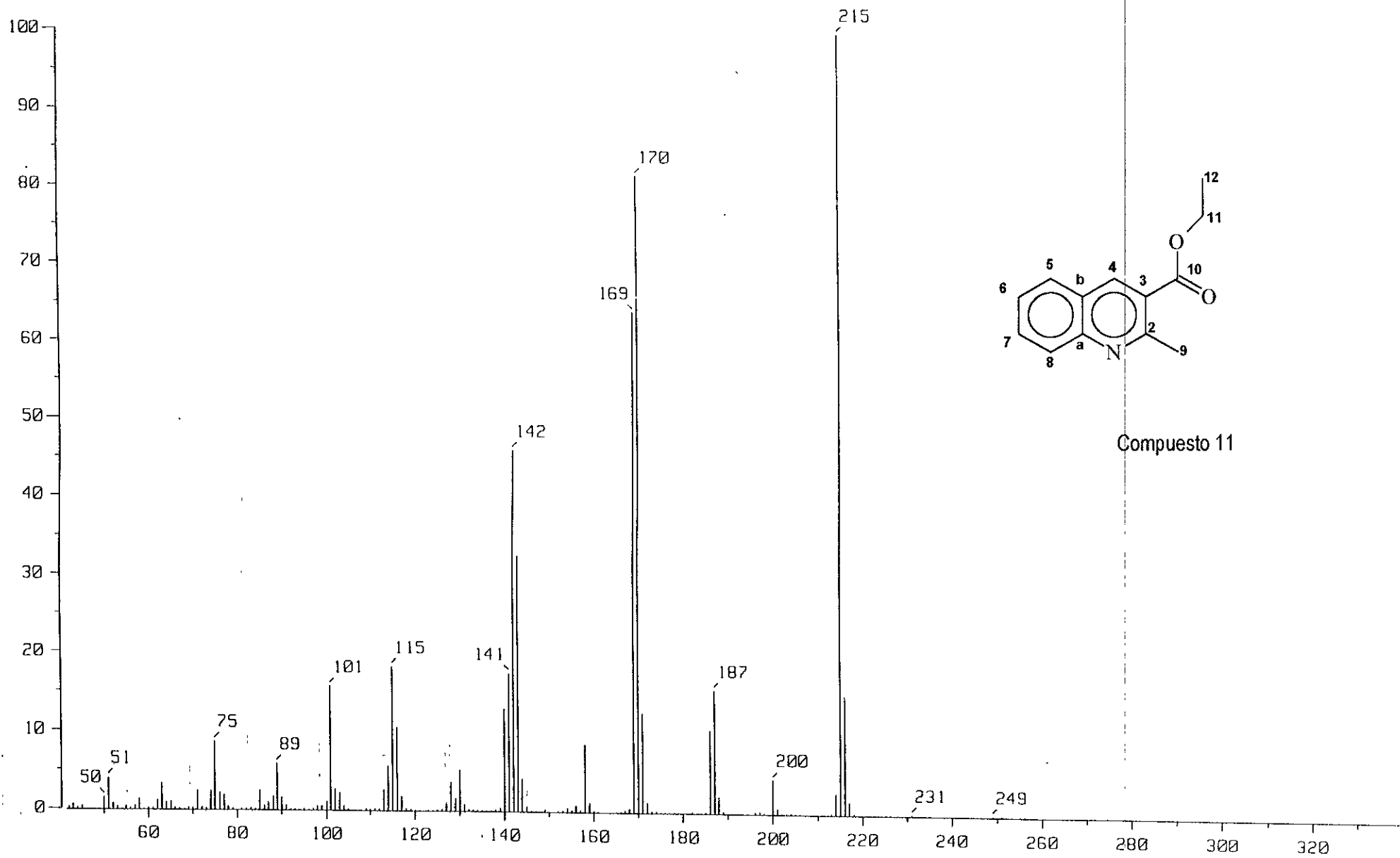
Compuesto 10



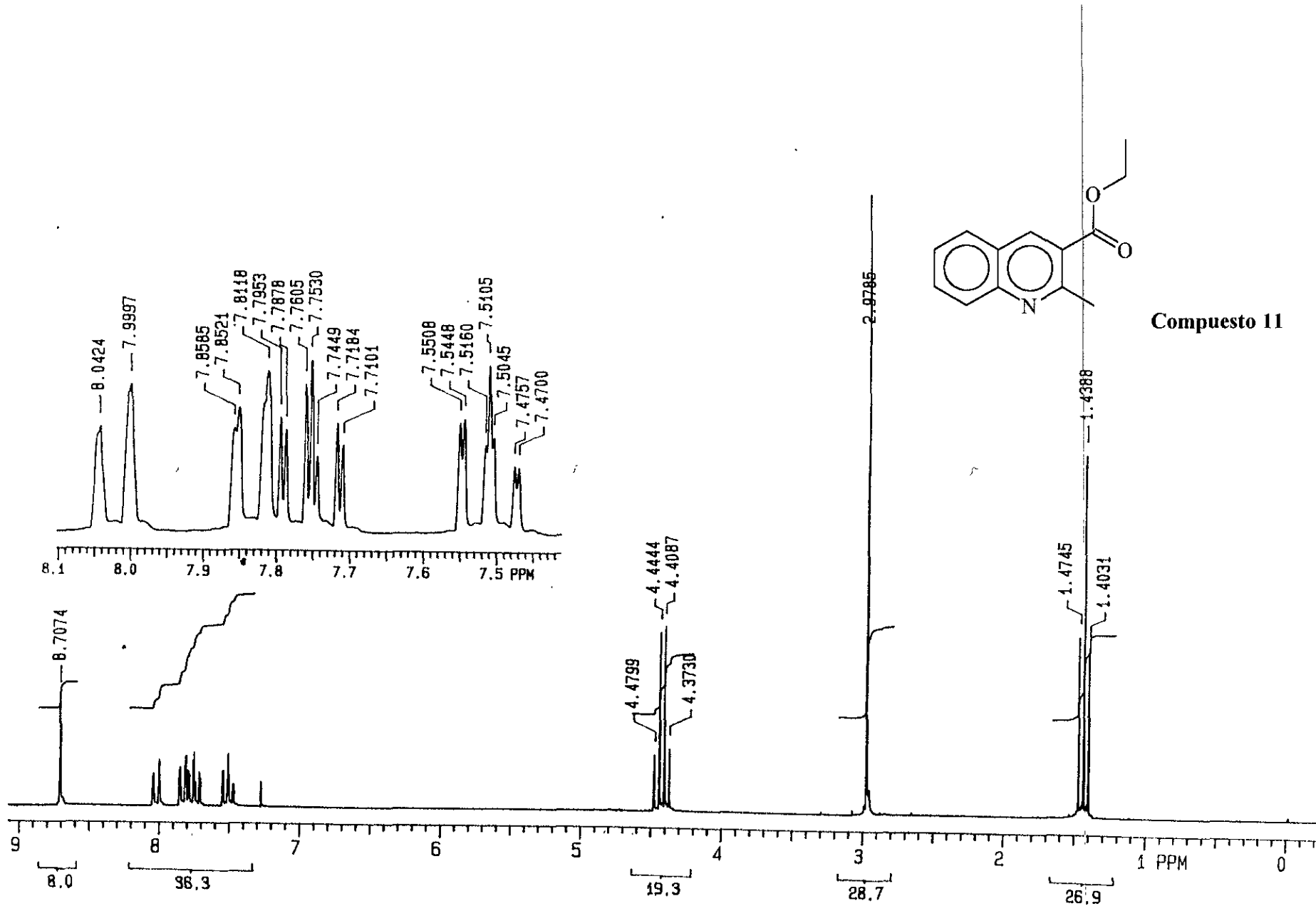


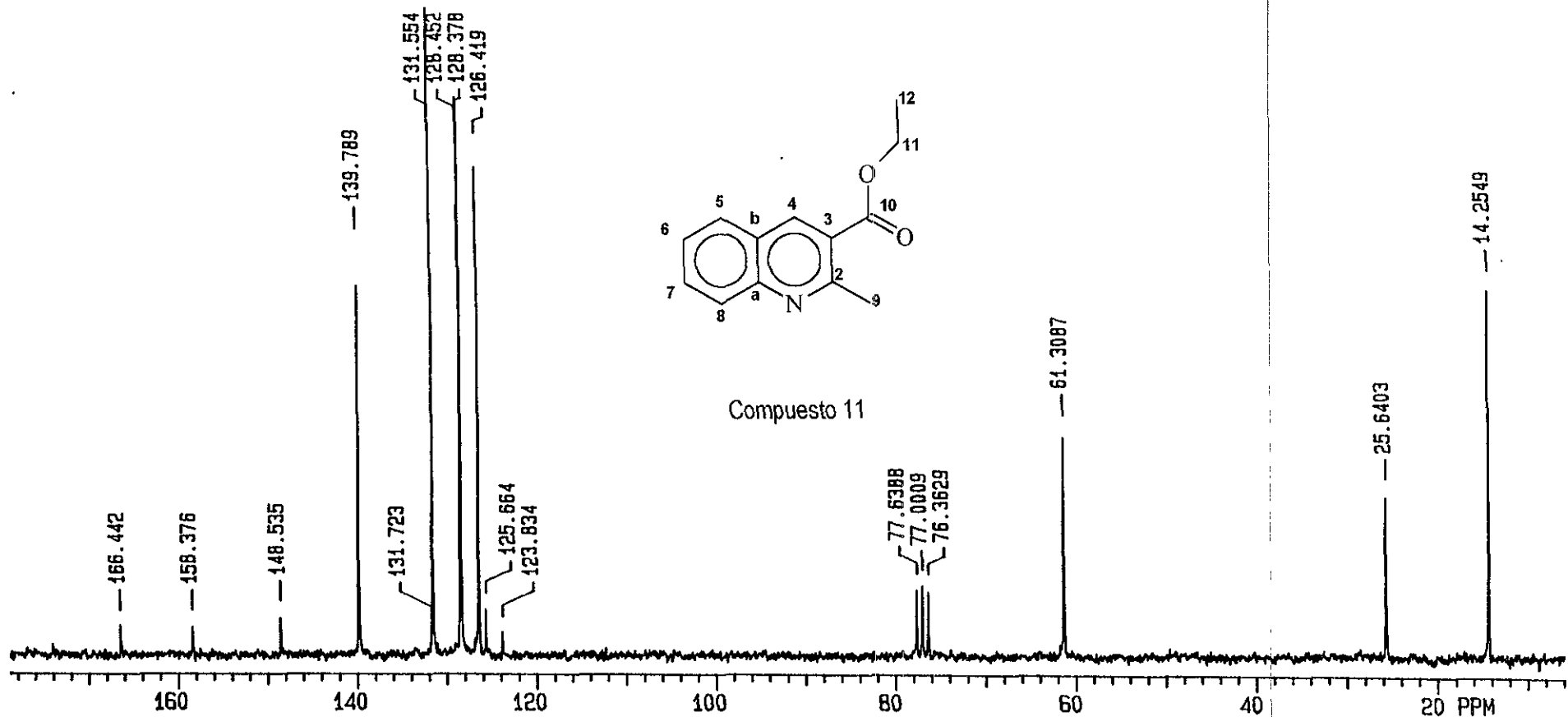


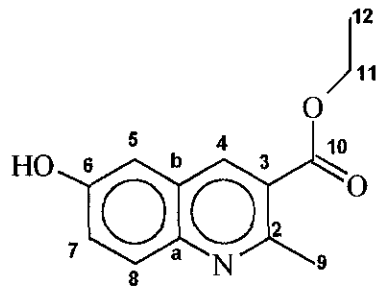
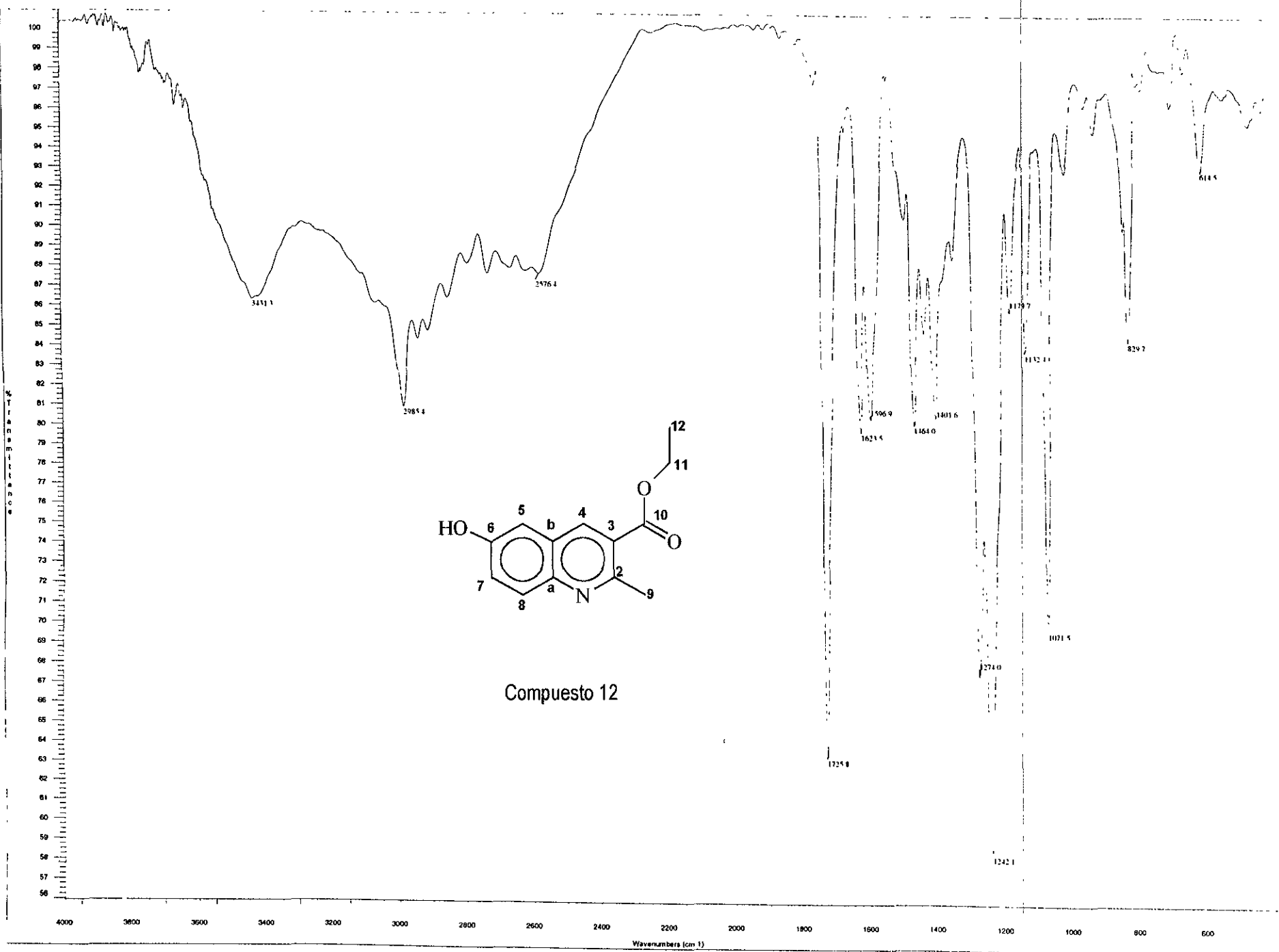
Compuesto 11



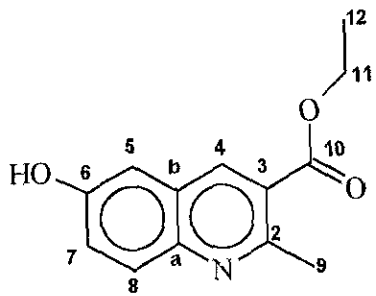
Compuesto 11



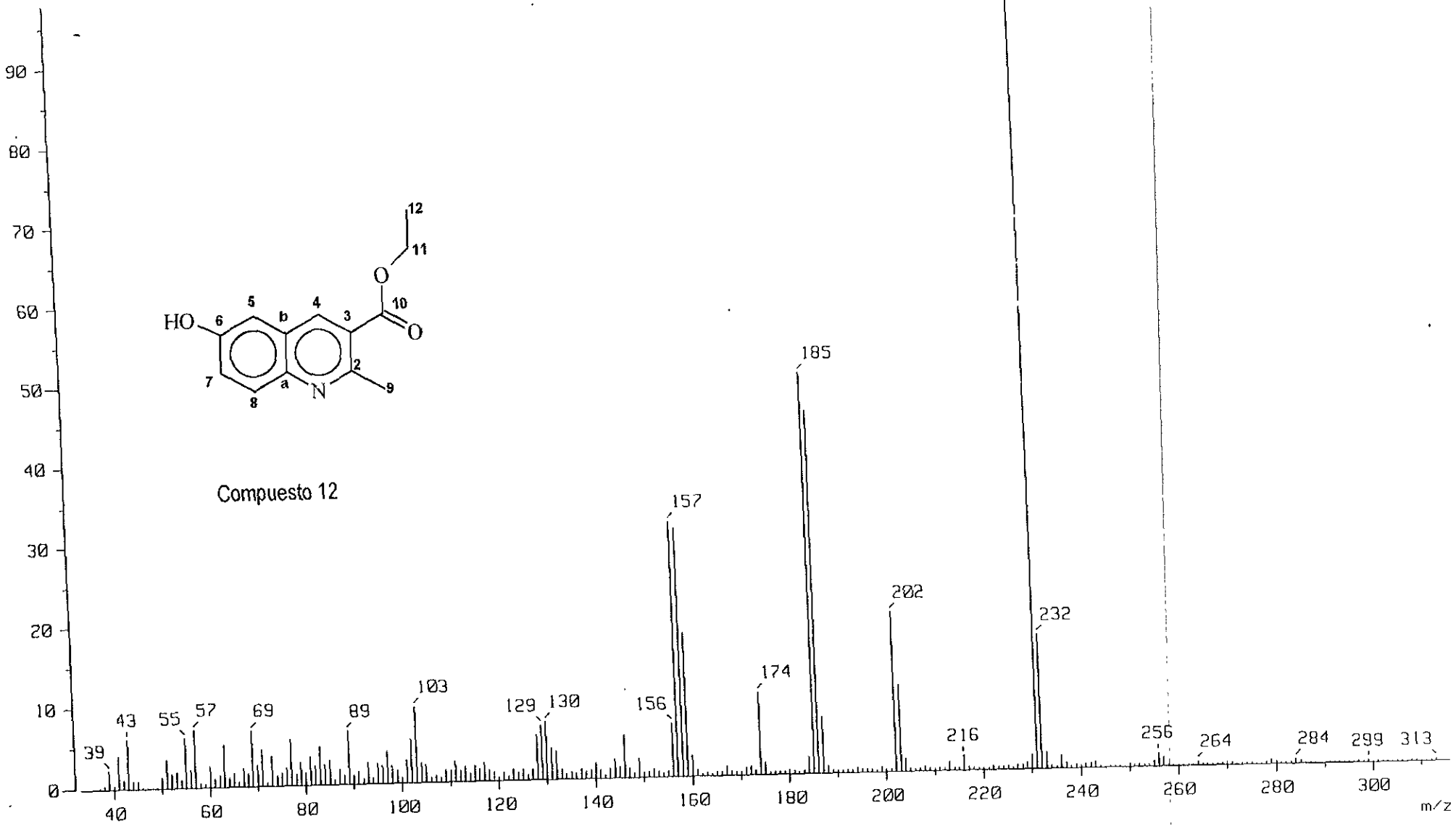


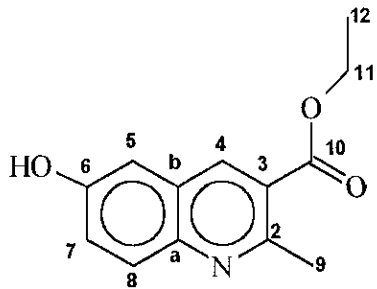


Compuesto 12

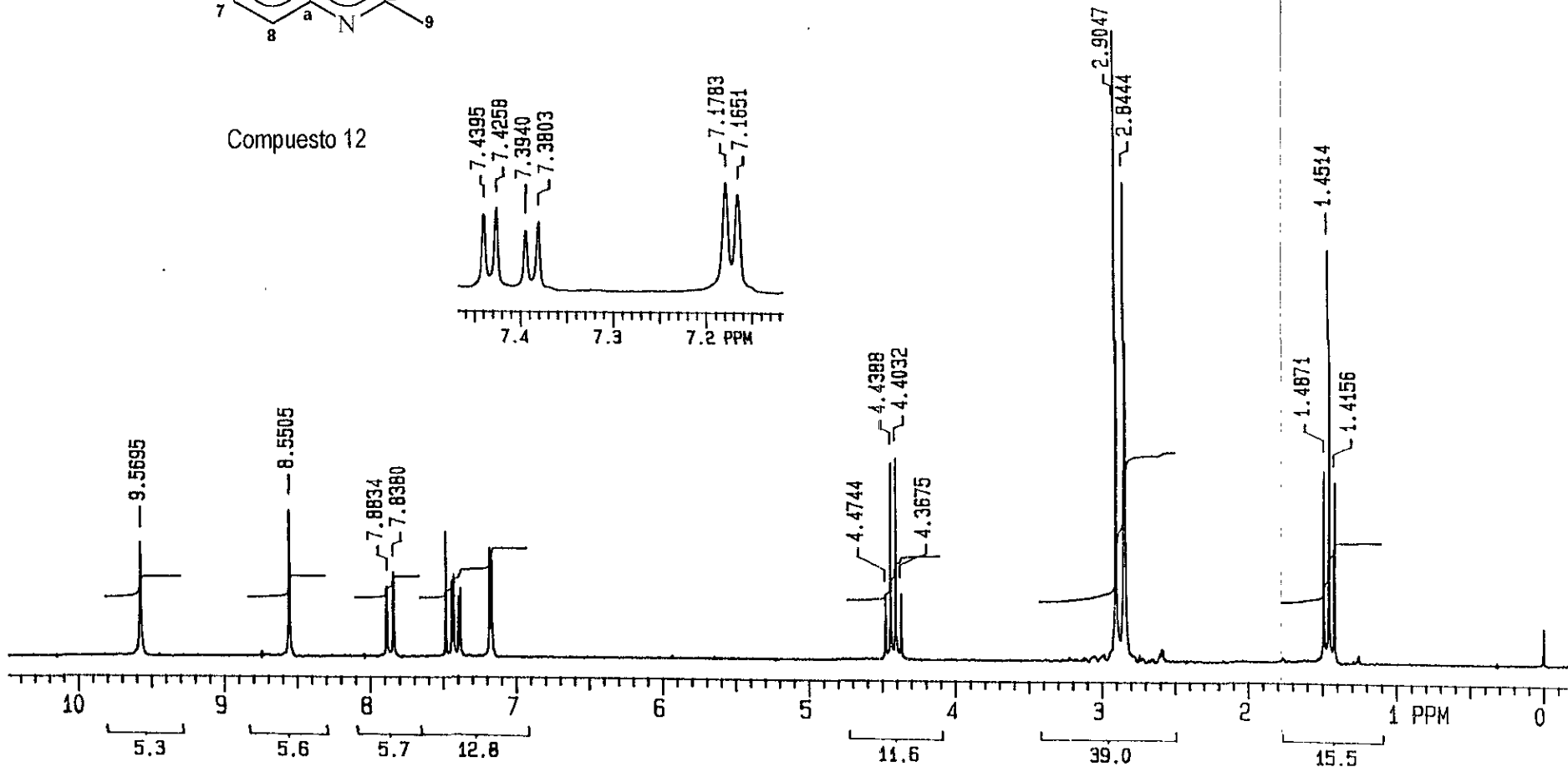


Compuesto 12



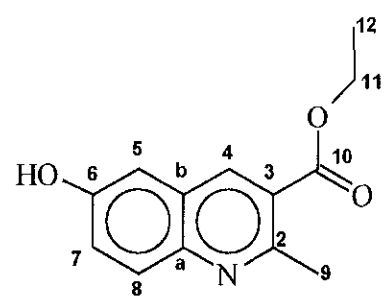


Compuesto 12

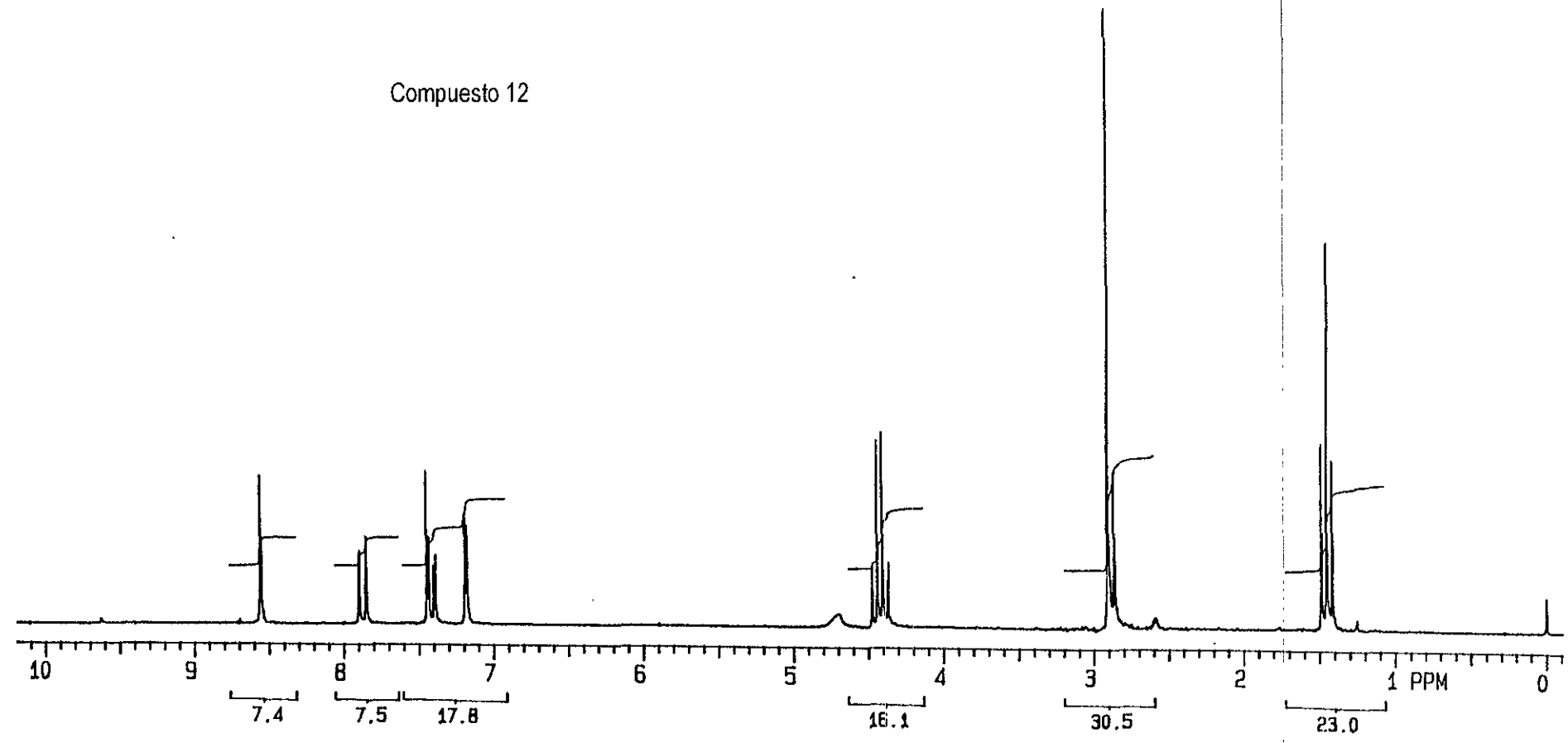


12

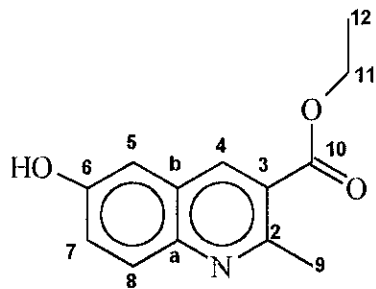
+D2O



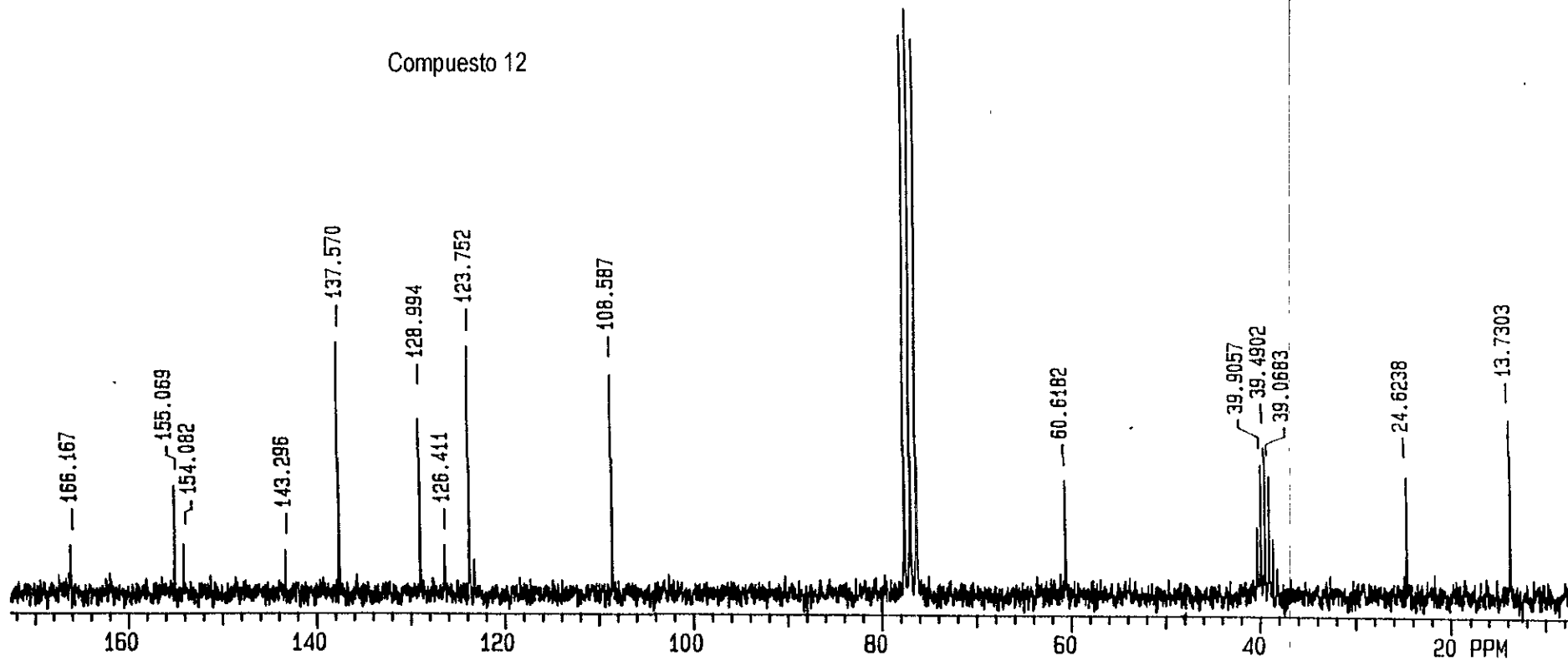
Compuesto 12

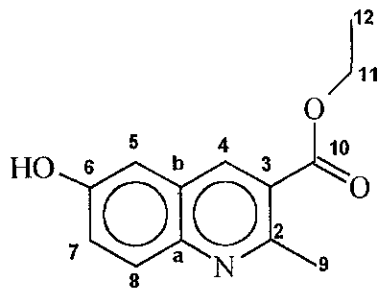




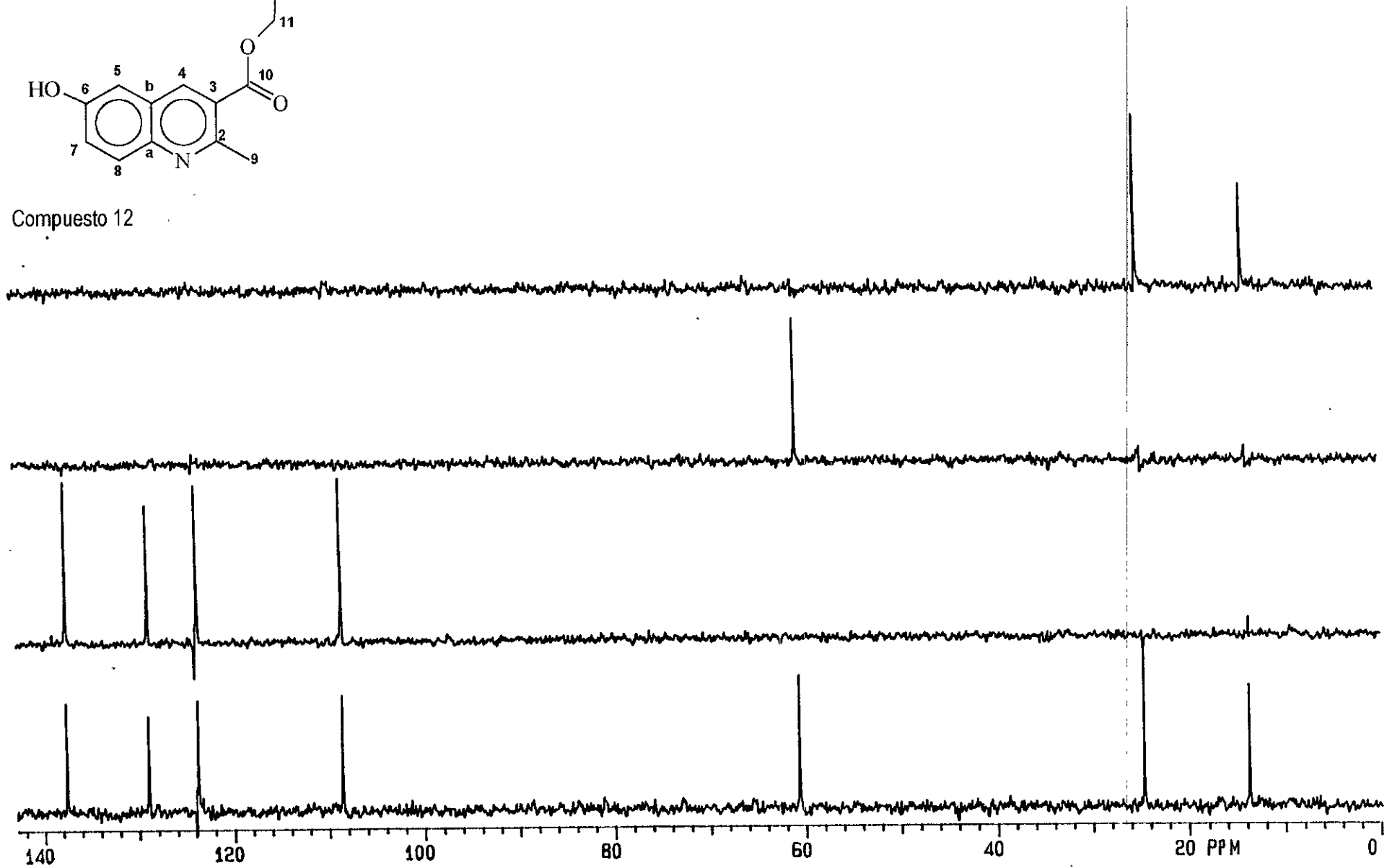


Compuesto 12



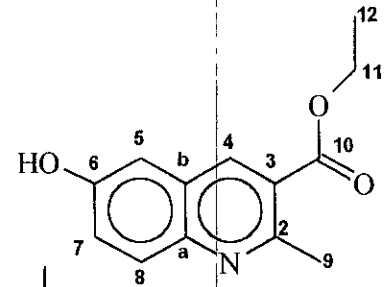
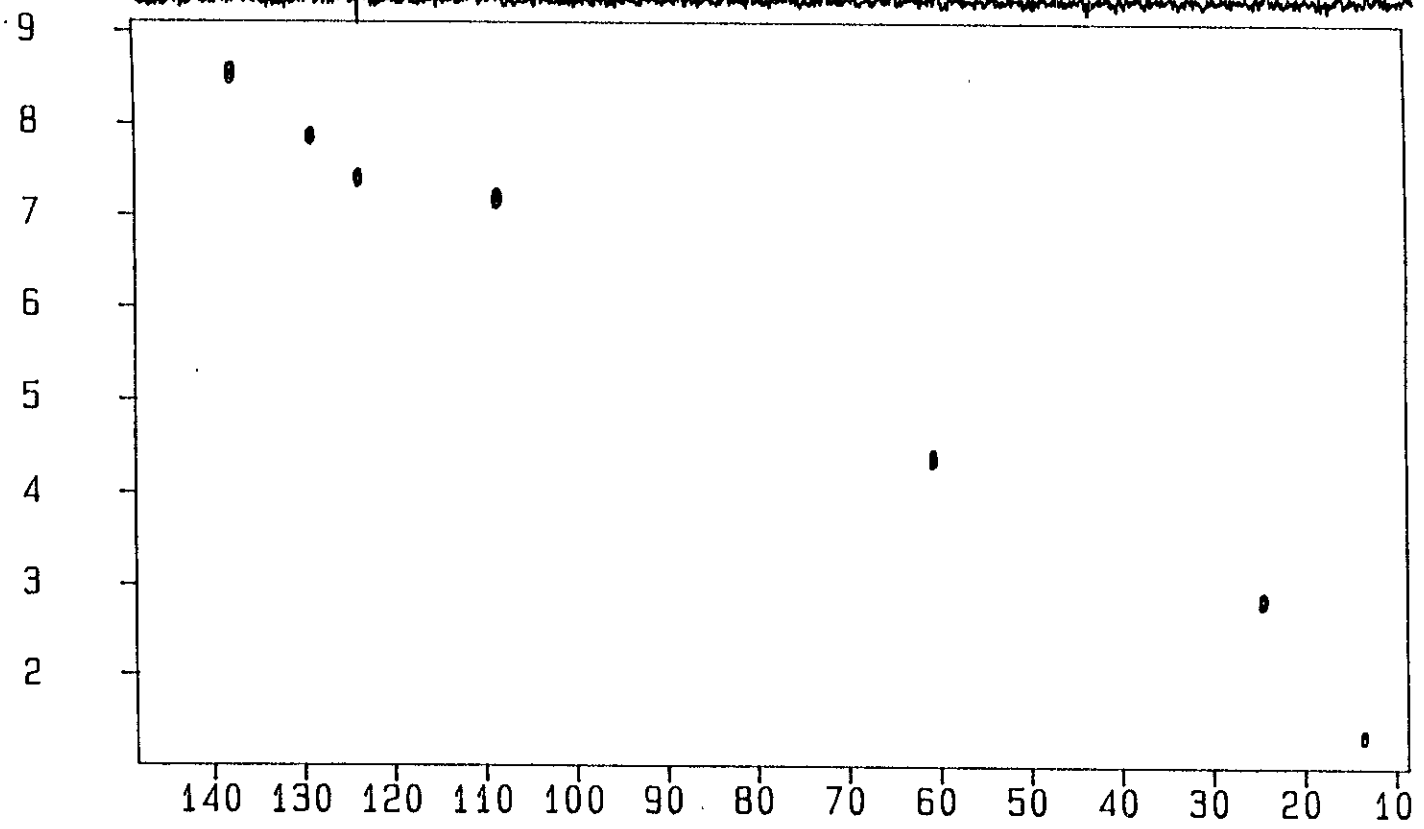


Compuesto 12



12

F1 (PPM)



Compuesto 12

