

118

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SÍNTESIS ALTERNA Y EVALUACIÓN DE LA  
ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE LA AGOMELATONINA  
( BIOISÓSTERO DE MELATONINA)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUIMÍCO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**VICTOR HUGO PÉREZ CASTILLO**

**MÉXICO, D.F.**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**2002**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Jurado asignado:**

**Presidente :** Prof. ARMANDO CABRERA ORTIZ

**Vocal :** Profra. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ

**Secretario:** Prof. ALFONSO SEBASTIAN LIRA ROCHA

**1er. Suplente :** Prof. BLAS FLORES PÉREZ

**2do. Suplente :** Prof. FEDERICO GÓMEZ GARIBAY

### **SITIO DONDE SE DESARROLLO EI TEMA:**

LAB. 121, DEPARTAMENTO DE FARMACIA ; CONJUNTO "E", DIVISIÓN DE BIOQUIMICA Y FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

### **ASESOR DE TESIS**

M. en C. ALFONSO SEBASTIAN LIRA ROCHA



### **SUSTENTANTE**

VICTOR HUGO PÉREZ CASTILLO



**A ELIZABETH BASILIO  
CON TODO EL CORAZÓN  
POR SU APOYO, IMPULSO,  
AMOR Y PACIENCIA.**

**A MI FAMILIA  
POR SU CONSTANTE APOYO  
EN ESPECIAL A MI TIO IGNACIO  
POR SU APOYO Y CARIÑO**

**A MIS A MIGOS**

**HECTOR, CARLOS, BONFILIO Y CHUCHO**

**POR SU GRAN APOYO Y CARIÑO BRINDADO**

**EN LA CONJUNCIÓN DE MIS ESFUERZOS Y ANHELOS**

**A MIS MAESTROS**

**ALFONSO, DR. RAFAEL, ALICIA Y CECILIA**

**CON AGRADECIMIENTO Y ADMIRACIÓN POR SUS**

**VALIOSOS CONOCIMIENTOS IMPARTIDOS Y POR SU**

**AYUDA PARA LA CULMINACIÓN DE ESTA TESIS**

**DRA. OFELIA ESPEJO  
POR LAS FACILIDADES OTORGADAS  
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS**

**DRA. ELIA BROSLA Y SELENE  
POR EL APOYO EN LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS**

**A MIS COMPAÑEROS  
QUE PARTICIPARON Y APOYARON PARA LA CULMINACIÓN DE ESTA TESIS  
MARCOS, SUSI, MONSERRAT, LIZET, EVELYN ACOSTA, CHIO, PILY, VERO, EVELYN,  
ISELA, SUSANA HERRERA, SUSANA PINEDA, MIREYA, ALMA, RAY, GINA, RITA,  
ANGELICA ETEL Y TODOS LOS CHAVOS DEL LABORATORIO 122, CON GRATITUD,  
RESPETO Y RECONOCIMIENTO**

**A MIS PADRES  
MI ETERNO AGRADECIMIENTO  
POR SU CONSTANTE APOYO**

**A MIS HERMANOS  
EZEQUIEL, JOSE LUIS, EDUARDO,  
MARTHA ALEJANDRA Y ANA KAREN  
POR LA AMISTAD Y CARIÑO  
QUE SIEMPRE ME HAN DEMOSTRADO.**

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
<b>III. OBJETIVOS</b>	11
<b>IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	12
ESQUEMA No 2	12
IV.I PARTE SINTÉTICA	13
ESQUEMA No 1	19
ESQUEMA No 3	24
IV.II. PARTE BIOLÓGICA	25
ESQUEMA No 4	26
<b>V. PARTE EXPERIMENTAL</b>	27
V.I PARTE QUÍMICA	27
V.I. REACTIVOS	27
V.III PROCEDIMIENTO GENERAL DE LAS REACCIONES.	27
V.IV INSTRUMENTACIÓN.	28
V.V. CROMATOGRAFIA	29
V.VI SISTEMA DE ELUCIÓN EMPLEADO	30

<b>V. VII DESCRIPCIÓN DE LAS SÍNTESIS.</b>	<b>31</b>
<b>V. VIII Ácido <math>\gamma</math>-(<i>p</i>-metoxibenzoil) propiónico (1)</b>	<b>31</b>
<b>V. IX Ácido <math>\gamma</math>-(<i>p</i>-metoxifenil) butírico (2)</b>	<b>32</b>
<b>V. X 7-metoxi-1-tetralona (3)</b>	<b>34</b>
<b>V. XI (2 E/Z)-(7-metoxi-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ilideno)acetonitrilo (4a/4b)</b>	<b>35</b>
<b>V. XII (7-metoxi-1-naftil)acetonitrilo (5)</b>	<b>37</b>
<b>V. XIII. N-[2-(7-metoxi-1-naftil)etil]acetamida (6)</b>	<b>38</b>
<b>V. XIV Dietilfosfonato de cianometilo (f)</b>	<b>40</b>
<b>V. XV PRUEBAS BIOLÓGICAS</b>	<b>41</b>
<b>V. XVI DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS</b>	<b>41</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>
<b>VIII. ESPECTROS</b>	<b>50</b>

## Abreviaturas

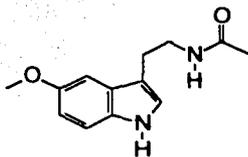
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	Anhidrido acético
<b>Ansiolítico</b>	Aquella sustancia que disminuyen la tensión emocional, los estados de angustia
<b>Antiapoptótica</b>	Evita la muerte celular programada
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefalica
<b>DCE</b>	1,2 Dicloroetano
<b>DGM</b>	Diglima
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>GP</b>	Glándula Pineal (Hormona)
<b>GSH</b>	Glutation peroxidasa es una enzima dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrogeno o lipoperoxidos
<b>HIOMT</b>	Enzima hidroxindol -O-metil transferasa
<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
<b>MEL</b>	Melatonina
<b>NAT</b>	Enzima N-Acetiltransferasa
<b>PPA</b>	Ácido polifosforico
<b>SIDA</b>	Sindrome de Inmunodeficiencia adquirida
<b>SNA</b>	Sistema Nervioso Autónomo
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano

# **I. INTRODUCCIÓN**

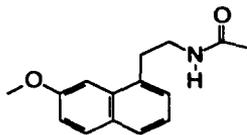
## I. INTRODUCCIÓN

Desde hace un cuarto de siglo se sabe que la administración de melatonina induce sueño en el hombre. Esta hormona ha provocado una verdadera revolución. La popularidad de la melatonina procede de los efectos demostrados en situaciones experimentales muy concretas sobre los radicales que son capaces de lesionar el material genético del DNA, las membranas lipídicas y las proteínas estructurales. A partir de estas observaciones se ha pensado que la melatonina sería eficaz para combatir el envejecimiento,<sup>1</sup> como ansiolítico,<sup>2</sup> las enfermedades neurodegenerativas<sup>3,4</sup> y cardiovasculares,<sup>5,6</sup> el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, el cáncer,<sup>7,8</sup> etc.

Sin embargo, no hay pruebas científicas de que el efecto antioxidante de la melatonina pueda mejorar todos estos trastornos o enfermedades. Además, la melatonina tiene dos limitantes, la primera es su corto tiempo de vida media<sup>9</sup> (15-30 min. en la rata) y la segunda es que actúa sobre los diferentes tipos de receptores (MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> y MT<sub>3</sub>)<sup>10,11,12</sup>, por lo que se han preparado diferentes tipos de sustancias análogos de melatonina para resolver estas dos limitantes.



Melatonina



Agomelatonina (S-20098)

El presente trabajo tiene como objeto la preparación de un bioisómero de melatonina (agomelatonina) mediante una ruta más corta a la reportada en la literatura. Además se analiza la actividad contráctil de dicha sustancia en duodeno aislado de rata, con el fin de determinar si presenta un comportamiento similar a melatonina, la cual, normalmente inhibe la contracción del mencionado tejido.<sup>13</sup>

## **II. ANTECEDENTES**

## II. ANTECEDENTES

La melatonina (5-metoxi-*N*-acetilriptamina) es una hormona endógena que se sintetiza y secreta nocturnamente por la glándula pineal (GP). En vertebrados, la síntesis se realiza en la GP, así como en varios tejidos periféricos. La GP está localizada en el centro del SNC de mamíferos y está relacionada con varias otras estructuras como la retina, el hipotálamo y el SNA, para el control de la liberación de dicha hormona.<sup>14</sup> Es una indolamina que tiene como precursor a la serotonina.<sup>15</sup>

Diversos estudios en los últimos 10 años han demostrado que la MEL provee una señal interna de sincronización del ritmo sueño-vigilia y de otros numerosos ritmos circadianos.<sup>14,16</sup> Por lo que interviene en numerosas funciones biológicas, las siguientes propiedades de la melatonina han sido repetidamente observadas:

- Efecto antigonadotrópico
- Efecto fortalecedor evidente sobre el sistema inmunológico.<sup>28</sup>
- Refuerza los antioxidantes que protegen a las células contra el daño por radicales libres.<sup>1</sup>
- Desacelera el crecimiento de tumores.<sup>7,27</sup>
- Provee protección contra problemas cardíacos.<sup>5,6</sup>
- Estabiliza la tensión sanguínea.<sup>5,6</sup>
- Resuelve problemas de insomnio.<sup>16,27</sup>
- Resuelve problemas de cambios de horario (jet-lag)<sup>30</sup>
- Limita y en ciertos casos frena la pérdida de la memoria.<sup>32,33</sup>
- Como ansiolítico<sup>2</sup>

La biosíntesis de MEL como la de todos los indoles de la pineal se inicia con la captación dentro de los pinealocitos del aminoácido triptofano circulante. Una fracción considerable del aminoácido circulante se utiliza para la síntesis de proteínas de la glándula pineal.<sup>15</sup> Para la biosíntesis de MEL, inicialmente el triptofano es oxidado en la posición 5 del anillo indólico por la acción de la triptofano hidroxilasa.<sup>17</sup> El 5-hidroxitriptofano producido es rápidamente descarboxilado por la descarboxilasa de *L*-aminoácidos aromáticos y forma la serotonina (5-hidroxitriptamina).<sup>18</sup>

La 5-HT de la glándula pineal sigue, por una parte, la ruta catabólica común a otros tejidos; y por otra, la formación de MEL. En esta última vía, es primero acetilado en el nitrógeno de la etilamina por la acción de la enzima *N*-acetiltransferasa,<sup>19</sup> (NAT) para formar la *N*-acetilserotonina,<sup>20,21</sup> la cual es a su vez *O*-metilada por efecto de la enzima hidroxindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT). Esta enzima está presente en el citoplasma de las células parenquimatosas de la GP y transfiere el grupo metilo activo de la *S*-adenosilmetionina al grupo hidroxilo de la posición 5 del núcleo indólico formándose *N*-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina<sup>20</sup> (figura No. 1). En vertebrados, la síntesis se realiza en la GP, así como en varios tejidos periféricos.

Una de las principales acciones fisiológicas de la de la HIOMT es que al convertir indolaminas, como la 5-HT, la que no puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), a compuestos metoxilados como la melatonina, éstos tienen un fácil acceso al cerebro.<sup>22</sup>

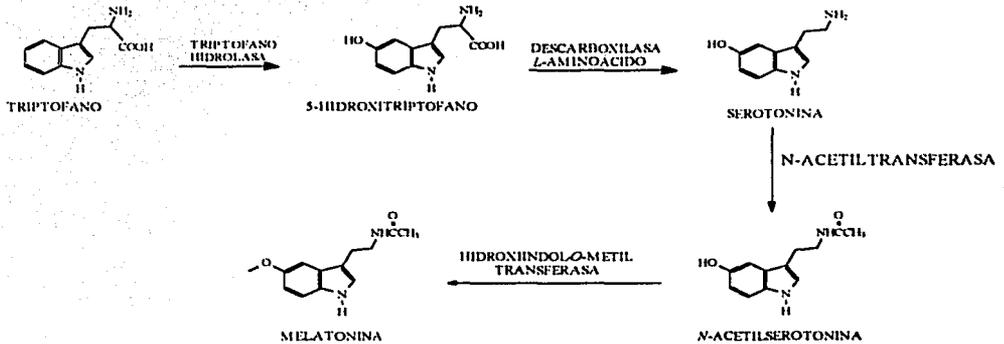


Figura 1. Biosíntesis de la melatonina (5-acetil-N-metoxitriptamina) <sup>17</sup>

La GP produce MEL durante la noche merced a un estímulo nervioso procedente de la retina y de diferentes núcleos cerebrales. Mientras que la luz frena la producción de MEL<sup>23</sup>, la obscuridad estimula su síntesis en todas las especies animales incluyendo al ser humano<sup>24</sup> (figura No. 2).

Sólo la MEL producida por la GP entra en el plasma circulante y se asocia a la albúmina, llega a diferentes órganos efectores, comprendidos tanto por el SNC como por tejidos periféricos. La MEL pineal representa en el organismo una señal circulante del tiempo, reguladora del sistema circadiano y de los ritmos diarios y anuales. La MEL se metaboliza en el hígado y sus metabolitos se excretan por orina. Entre éstos, el más importante es la 6-hidroximelatonina, y su forma sulfatada (6-sulfatoximelatonina) que provee un método de medición de la hormona y de su ritmo circadiano.

Se dice que la MEL previene ataques cardíacos resultantes del estrés, disminuyendo la producción de corticosteroides los cuales pueden dañar el músculo del corazón.<sup>5,6</sup> La MEL puede también reducir la tensión sanguínea al disminuir el ritmo cardíaco.

También, se ha observado que en personas con insomnio los niveles nocturnos de MEL están disminuidos. En estudios recientes se ha verificado que la MEL afecta al sueño modificando dos mecanismos distintos: aumenta la propensión al sueño<sup>16,23</sup> y sincroniza el reloj circadiano.<sup>8,26</sup>

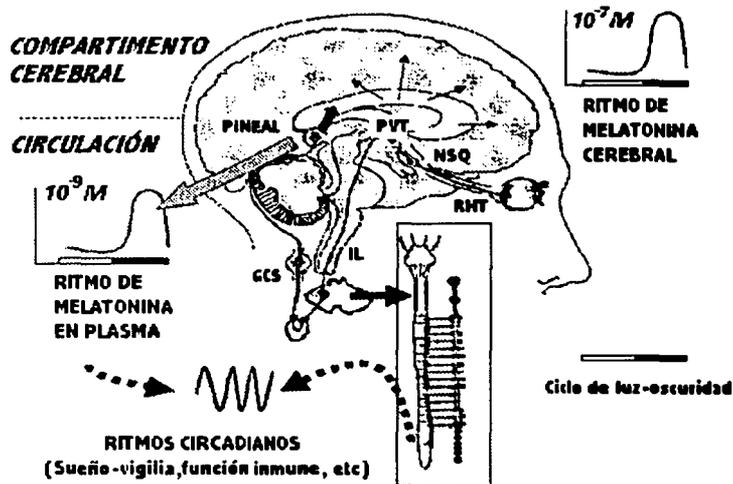


Figura No. 2 El ritmo de Mel es señal de sincronización para los ritmos circadianos. RHT: haz retino-hipotalámico, que proyecta en forma directa sobre los núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Se muestra la vía por la cual la luz inhibe la síntesis de melatonina pineal, que incluye a los núcleos paraventriculares (PVT), la columna intermediolateral medular (IL) y los ganglios simpáticos cervicales superiores (GCS). Los niveles cerebrales de MEL son unas 50 veces mayores que en plasma.<sup>27</sup>

La participación de la MEL ha estado asociada con procesos de ritmos endógenos que permiten la adaptación del sueño en diferentes horarios y el reajuste de procesos metabólicos regulados hormonalmente, fenómeno que le ha valido el calificativo de "reloj biológico" que todas las especies poseen para su adaptación a su entorno ambiental.<sup>16</sup>

En el ser humano, la melatonina actúa como un sincronizador de la temperatura corporal y la secreción del cortisol y la hormona adrenocorticotropica (ACTH).<sup>28,29</sup> Este efecto permite acelerar el acoplamiento al horario local tras un viaje transoceánico, reduce el efecto del jet-lag<sup>30</sup> y puede ser útil en personas con turnos rotatorios de trabajo.

Por otro lado, la MEL actúa como "secuestrador" (seavenger) de los radicales libres hidroxilo<sup>1</sup> y protege a las macromoléculas y especialmente al DNA, del ataque de los radicales libres, lo que podría ser un factor determinante en el ritmo de envejecimiento. Además, la MEL promueve la actividad de la enzima glutathion peroxidasa, lo que también contribuye a reducir el daño producido por el metabolismo oxidativo. El SNC es el órgano más susceptible al daño producido por radicales libres y sería en este sitio donde actuaría preferentemente la MEL. Esta acción antioxidante sería similar a la de la vitamina C y la vitamina E.<sup>31</sup>

En años recientes, la posible relevancia terapéutica de la MEL en la enfermedad de Alzheimer ha sido indicada por estudios *in vitro*. En cultivos de neuronas, la MEL protege a éstas células contra la toxicidad de  $\beta$ -amiloides ( proteínas anómalas que se depositan en los tejidos durante el transcurso de diversas enfermedades).<sup>32,33</sup>

La probabilidad de detectar niveles suprimidos de MEL en plasma es significativamente mayor en pacientes con demencia.<sup>3</sup> En vista de los datos experimentales en animales que indican que la melatonina tiene actividad antioxidante, antiapoptótica y antagonista del  $\beta$ -amiloide en el SNC,<sup>4</sup> es posible que esta sea útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Las mujeres con disminución grave de la capacidad visual tienen menor riesgo de desarrollar cáncer mamario, lo que tendría relación con el efecto de la luz visible sobre la secreción de MEL.<sup>7,34</sup> Se ha señalado que la MEL es útil para combatir los síntomas de epilepsia y de la enfermedad de Parkinson.<sup>35,36</sup> En los epilépticos, el tratamiento agudo con melatonina produce una mejoría clínica muy marcada, lo mismo que el tratamiento subagudo y crónico en pacientes con Parkinson. El mecanismo por el cuál la melatonina produce este efecto es desconocido, sin embargo, se cree que puede deberse a la capacidad de la melatonina para alterar el balance de algunos de los neurotransmisores del SNC.<sup>37,38</sup>

Recientemente, se ha desarrollado un interés considerable en el diseño de los ligandos del receptor de la MEL capaces de aumentar o disminuir la respuesta de la misma. Se han diseñado varios derivados de naftaleno como compuestos bioisotéricos de MEL, y varios de éstos han demostrado ser agonistas potentes para los receptores de MEL. Estos datos confirman el interés de los nuevos derivados de naftaleno, como agentes melatoninérgicos.<sup>39</sup>

El fenómeno por el que dos compuestos de estructuras relacionadas presentan propiedades biológicas semejantes fue descrito por Friedman como bioisótero.

Por tanto, puede definirse como bioisómeros a las moléculas o grupos de átomos que, debido a poseer propiedades físicas o químicas análogas, producen una respuesta farmacológica semejante o antagonista. Esta dualidad dependerá de que el compuesto interactúe con el centro activo de una enzima como sustrato de la reacción catalizada por aquella o que bloquee su centro activo sin transformarse o haciéndolo a menor velocidad. Una segunda posibilidad es que interactúe con su receptor produciendo los cambios conformacionales de los que resulta una respuesta biológica, o bien que dicha interacción sea improductiva.<sup>40</sup>

Además, Friedman considera que los isómeros que exhiben propiedades opuestas (antagonistas) tienen también que ser considerados como bioisómeros, ya que usualmente interactúan con el mismo sitio de reconocimiento. Este es el caso para el ácido *p*-aminobenzoico y la *p*-aminobenzenosulfamida, también para el ácido glutámico y sus análogos fosfónicos. El empleo del término isosterismo ha sido tomado más allá de su significado cuando se emplea en Química Farmacéutica y Thornber propone una definición más flexible de él término bioisómero: *bioisómero son grupos o moléculas que tienen semejanzas químicas y físicas que producen efecto biológico similar.*<sup>41</sup>

**Definición: bioisómero es un grupo químico o molécula que puede sustituirse por otro grupo químico, que tienen propiedades fisicoquímicas parecidas, además de actuar recíprocamente en el mismo sitio de reconocimiento produciendo similar actividad biológica ya sea agonista o antagonista.**

La síntesis de análogos (agonistas y de los antagonistas de melatonina) en el sitio unión de melatonina ha permitido sostener el papel que a desempeñado el sistema melatoninérgico en la regulación y organización circadiana. La agomelatonina S20098 se comporta como un cronobótico debido a su acción en diversos modelos de animales, reconocidos por su importancia terapéutica

Las posibles aplicaciones terapéuticas podían estar en el tratamiento de los desórdenes inducidos por los cambios estacionales. Sin embargo, la síntesis de antagonistas en perspectiva es una nueva herramienta que abre el estudio del receptor de la MEL, está disponible para investigar el papel del sistema melatoninérgico en la SNC, pero también en el nivel periférico.<sup>41</sup>

Dentro de la síntesis de los análogos de MEL que tienen actividad sobre los receptores melatoninérgicos se encuentra una variedad de metoxiindoles, entre los que destaca por su importancia, la agomelatonina debido a su actividad parecida a la de la melatonina. Hasta ahora, la ruta sintética reportada en la literatura (esquema 3) es muy larga. En el presente trabajo se propone una ruta alterna más corta (esquema 2)

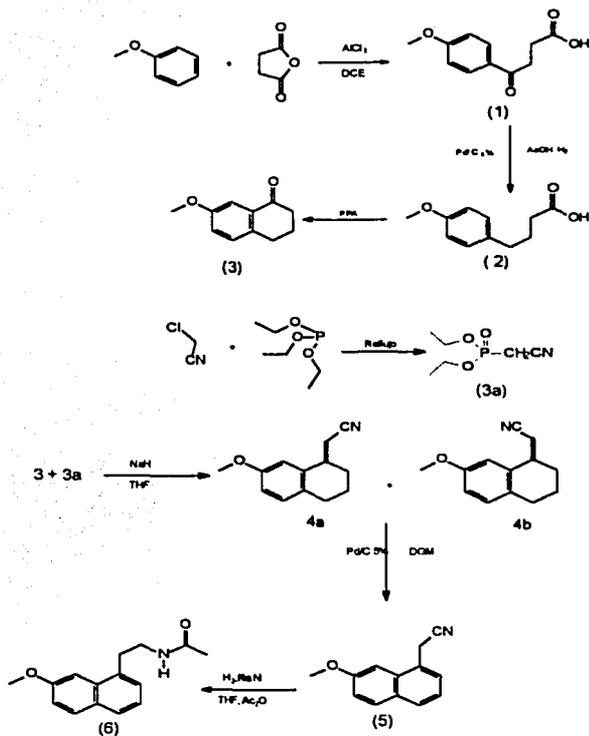
### **III. OBJETIVOS**

**III.OBJETIVOS.**

En la presente tesis se pretenden alcanzar los siguientes objetivos:

- a) **Realizar una ruta más corta de síntesis de la agomelatonina**
- b) **Disminución en el número de etapas en el trabajo experimental.**
- c) **Caracterización de los compuestos obtenidos**
- d) **Determinar de manera preliminar la actividad contráctil en duodeno aislado de rata de la agomelatonina.**

## **IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

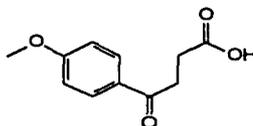


ESQUEMA 2. Ruta sintética alterna para la agomelatona

## IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

## IV.1. PARTE SINTÉTICA

## COMPUESTO 1



La síntesis alterna de *N*-[2-(7-metoxi-1-naftil)etil]acetamida (6), se efectuó siguiendo el esquema (No.2). Como paso inicial se requirió sintetizar el ácido  $\gamma$ -(4-metoxibenzoil)propiónico (1), lo que se realizó mediante una acilación de Friedel-Crafts.<sup>43</sup> El anisol se trató con anhídrido succínico en diclorometano usando  $AlCl_3$  como catalizador.

El crudo de reacción se cristalizó de etanol dando cristales blancos, con  $pf = 142-147\ ^\circ C$ ,  $R_f = 0.3$ . La identificación parcial se basó en la revelación del grupo carbonilo de cetona que dio positivo con DNF (2,4-dinitrofenilhidrazina), la identificación total se basó en sus propiedades físicas y espectroscópicas.

El espectro de IR de **1** (No. 1) muestra las bandas características de ácido carboxílico, una banda ancha en  $3400-3200\text{cm}^{-1}$  para OH, de COOH y las otras en 1670 y 1695 que corresponden al grupo carbonilo de cetona y al grupo carbonilo del ácido carboxílico, respectivamente.

En su espectro de RMN- $^1\text{H}$  (No.2) se observa una señal simple a 3.87 ppm que integra para 3 protones y corresponde al grupo metoxilo de la posición 4.

Otras señales características son: una señal triple a 3.27 ppm que integra para 2 protones, que corresponde a los protones del grupo metileno  $\alpha$  al grupo carboxílico; otra señal triple a 3.87 ppm, que integra para 2 protones que corresponde al grupo metileno del C- $\beta$ , además la señal más característica es una señal simple a 11.03 ppm del protón del grupo ácido que intercambia con agua deuterada. En su espectro de masas (No.3) se observó el ion molecular en 208 m/z con una abundancia relativa de 66%, el pico base está en 135 m/z y corresponde al fragmento

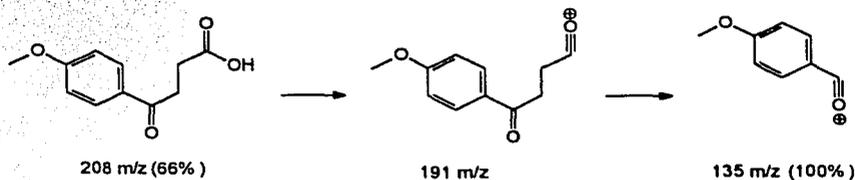
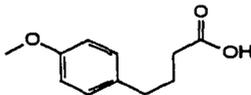


Figura 3. Patrón de fragmentación del compuesto **1**

## COMPUESTO 2



Se redujo (1), por hidrogenación catalítica,<sup>44</sup> utilizando como catalizador Pd/C al 5% y como disolvente AcOH concentrado, a 60 °C y presión de 40 lb/plg<sup>2</sup> en un equipo Parr, dando un sólido blanco. El crudo de reacción se recristalizó de benceno y se obtuvieron cristales blancos (70%) de ácido  $\gamma$ -(4-metoxifenil) butírico (2). Su  $pf=56-57$  °C y su  $R_f=0.4$ . (sistema de elución 1)

En primer término se realizó una identificación parcial, la que se basó en la ausencia del grupo carbonilo de cetona pues dio negativo con DNF. En segundo término se realizó la identificación total que se basó en sus propiedades físicas y espectrométricas .

En el espectro de IR de 2 (No. 4) se observó la desaparición de la señal de C=O, de cetona y se observa la señal en 1700  $cm^{-1}$ (C=O, de COOH); además en su espectro de RMN<sup>1</sup>H (No 5) se observó la presencia de una señal triple a 2.36 ppm, que integra para 2 protones, que corresponde a un metileno en C- $\gamma$ , adicionalmente se observó un quintuplete en 1.93 ppm que integra para 2 protones, que corresponde a un metileno en C- $\beta$  por la interacción de los protones vecinos en C- $\alpha$  y C- $\gamma$ .

En su espectro de masas (No.6) presentó un ion molecular de 194 m/z con una abundancia relativa 76%, el pico base se observó en 121 m/z que corresponde al fragmento.

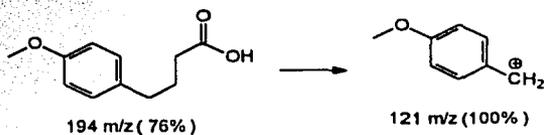
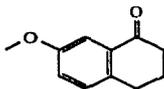


Figura 4. Patrón de fragmentación del compuesto 2

### COMPUESTO 3



El siguiente paso en la síntesis fue la formación del anillo de tetralona la cual se llevó a cabo de dos formas. En la primera se formó el cloruro del ácido, y posteriormente la ciclación se hizo con  $\text{AlCl}_3$ ,<sup>45</sup> con rendimientos bajos. La segunda ruta, que fue la que se siguió, fue con ácido polifosfórico,<sup>46</sup> que fue más rápida y se obtuvo mejor rendimiento.

El producto crudo, un sólido amarillo, se purificó por destilación de bulbo a bulbo. Se obtuvieron cristales blancos de 7-metoxi-1-tetralona (**3**) (73%), con un  $\text{pf} = 56\text{-}59^\circ\text{C}$  (Lit.  $\text{pf} = 61\text{-}63^\circ\text{C}$ )<sup>46</sup> y un  $R_f = 0.23$ .

Se caracterizó, parcialmente con DNF, dando positivo; posteriormente se realizó la identificación total que se basó en sus propiedades físicas y espectrométricas.

En el espectro de IR de **3** (No. 7) no se observó la señal de HO, del COOH y si la aparición de la señal en  $1700\text{ cm}^{-1}$  (C=O, bencilico); además, en su espectro de RMN<sup>1</sup>H (No.8) se observó la desaparición de una señal doble en 6.83 ppm, atribuible al protón en C-6, y la ausencia de la señal más característica, que es la del hidrógeno ácido que intercambia con (D<sub>2</sub>O). En su espectro de masas (No.9) presentó un ion molecular de 176 m/z con una abundancia relativa 100%, que corresponde al fragmento.

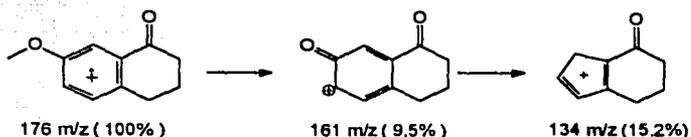
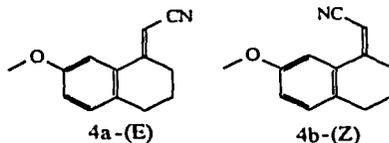


Figura 5. Patrón de fragmentación del compuesto **3**

## COMPUESTO 4a / 4b

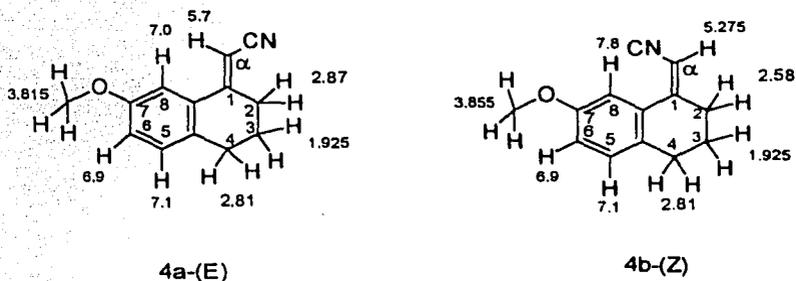


A continuación se realizó la condensación del anión del cianometilfosfonato de dietilo<sup>47</sup> con la 7-metoxitetralona (**3**), (reacción de Wadsworth-Emmmons).<sup>48</sup> Se obtuvo como crudo de reacción un sólido, junto con un aceite. Esta mezcla consta de los isómeros geométricos E y Z. El calentamiento de este crudo con ciclohexano y posterior decantación y enfriamiento del extracto permitió obtener uno de los isómeros como un sólido blanco. El compuesto **4a-(E)** tuvo un  $p_f = 54-56^\circ\text{C}$  y  $R_f = 0.22$ . En el caso del isómero **4b-(Z)** el  $R_f = 0.32$ .

El aceite remanente es una mezcla de los isómeros E y Z.<sup>49</sup> En la mezcla original se encuentran en una relación 7.5:2.5 E/Z, determinada por cromatografía de gases. Dicha proporción varío 1:1 E/Z cuando se usa DME como disolvente en lugar de THF. Los intentos para separar los isómeros por métodos convencionales resultaron infructuosos. Lo máximo que se logró, mediante cromatografía en capa fina preparativa, fue obtener el isómero Z como producto mayoritario y esto sirvió para caracterización estructural.

En el espectro de IR de 4a (No. 10), se observó la desaparición de la señal del grupo C=O, y la aparición de una banda a  $2208\text{ cm}^{-1}$  (CN). Además, en su espectro de RMN<sup>1</sup>H (No. 12,4a), se observó la aparición de una señal doble en 5.7 ppm que integra para un protón, y corresponde al hidrógeno de la posición C- $\alpha$  del isómero (*E*). Mientras que para el isómero *Z* el desplazamiento para este protón es de 5.276.

Se ha reportado en la literatura,<sup>49</sup> que los protones olefinicos en el isómero *E* se encuentran desplazados a campo bajo con respecto a los protones del isómero *Z*. Esto permite proponer que el sólido 4a tiene la isomeria *E* como se indica en el esquema 1.



ESQUEMA No 1

Además, se observó que los desplazamientos de los protones H-2 en el caso de 4a se encuentra a 2.87 ppm, esto es, se han desplazado a campo bajo con respecto a los mismos protones de 4b (2.58). Esto se atribuye al efecto desprotector del grupo ciano que debería estar en relación *cis* con respecto a estos protones. Cabe señalar que el desplazamiento de los protones H-2 en la 7-metoxitetralona y la tetralona se encuentran en 2.6 ppm. Estos valores concuerdan con el desplazamiento de H-2 para el compuesto 4b. Además, al comparar el desplazamiento de H-8 en 4a y 4b, se observó un corrimiento de 7.0 ppm a 7.8 ppm, respectivamente, lo cual se atribuye al efecto de desprotección que ejerce el grupo ciano sobre este protón al estar en relación *cis* respecto al anillo aromático.

En resumen, podemos afirmar que el sólido 4a es el isómero *E* mientras que 4b es el isómero *Z*. Como se puede apreciar en el esquema 1 el desplazamiento de los protones de las posiciones 3, 4, 5 y 6 de los isómeros *E* y *Z* no se afectan, lo anterior se explica por que tienen las mismas interacciones.

En su espectro de masas (No. 14 4a / 4b) presentaron los mismos patrones de fragmentación un ion molecular de 199 m/z con una abundancia relativa 100% y corresponde al fragmento

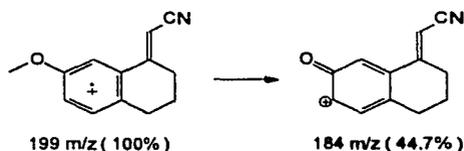
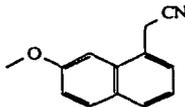


Figura 6. Patrón de fragmentación del compuesto 4a/4b

## COMPUESTO 5



Posteriormente se realizó la deshidrogenación del anillo de la mezcla de isómeros 4a y 4b. Se realizaron modificaciones a la técnica reportada en la literatura, que consisten en Pd/C al 10% en triglima a reflujo durante 30 minutos en atmósfera de nitrógeno.<sup>50</sup>

Las condiciones que usamos fueron Pd/C al 5 %, que se agregó a la mezcla de isómeros 4a y 4b previamente disuelta en diglima con atmósfera de argón.

El crudo de reacción se cristalizó con ciclohexano, obteniéndose un sólido cristalino blanco de (7-metoxi-1-naftil)acetonitrilo (5), (75%) su  $pf = 77-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  y un  $R_f = 0.4$ . posteriormente se realizó la identificación total que se basó en sus propiedades físicas y espectrométricas.

En el espectro de IR de 5 (No.15) se observó la banda en  $2247\text{ cm}^{-1}$  (CN). El espectro RMN<sup>1</sup>H de este compuesto (No.16) mostró la presencia de un singulete en 4.08 ppm que integra para dos protones y corresponden a los hidrógenos del C- $\alpha$ . Además, en la zona aromática se observaron tres señales, dos dobles a 7.33 y 7.79 ppm que integran para dos protones, y corresponden a los hidrógenos en los C-2 y C-4 y un doble de dobles a 7.2 ppm que integra para un protón y corresponde al hidrógeno de la posición C-3. En su espectro de masas (No.17) se observó el ión molecular en 197 m/z con una abundancia relativa 100% que corresponde a la estructura propuesta.

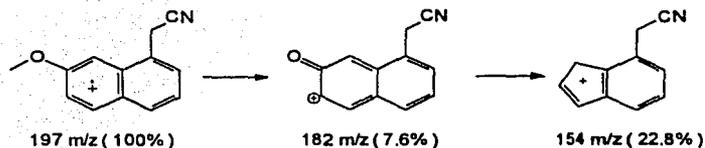
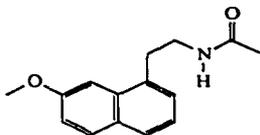


Figura 7. Patrón de fragmentación del compuesto 5

## COMPUESTO 6



La última fase de la síntesis implica la reducción del grupo ciano y la formación de la acetamida. Esto se realizó mediante la hidrogenación catalítica del compuesto 5 con Nickel-Raney<sup>51</sup> en una mezcla de anhídrido acético y tetrahidrofurano, a una presión de 50 lb/plg<sup>2</sup> de H<sub>2</sub> y 50 °C.<sup>52</sup>

El crudo de reacción se recrystalizó de tolueno-hexano (2:1), obteniéndose un sólido cristalino blanco de *N*-[2-(7-metoxi-1-naftil)etil]acetamida (**6**) (60%), con un *pf*=109.2-109.8°C (Lit. *pf*=109-110 °C)<sup>53</sup> y un *R<sub>r</sub>* = 0.352. posteriormente se realizó la identificación total que se basó en sus propiedades físicas y espectrométricas.

En el espectro IR de 6 (N<sub>o</sub>18), se observaron las siguientes bandas en 3293-3075 cm<sup>-1</sup>(-NHCOCH<sub>3</sub>), así como la banda en 1654 cm<sup>-1</sup>(C=O, de amida)

En su espectro de RMN<sup>1</sup>H de (N<sub>o</sub>19) se observaron dos señales triples en 3.62 y 3.25 ppm, cada una íntegra para dos protones y corresponden a los grupos metílenos en los C-α y C-β, respectivamente; además, una señal simple en 1.966 ppm que integra para 3 protones y corresponde al grupo metilo de la acetamida.

En su espectro de masas (No.20) presentó el ion molecular en 243 m/z con una abundancia relativa 26.6%, pico base en 184 m/z, que corresponde al fragmento.

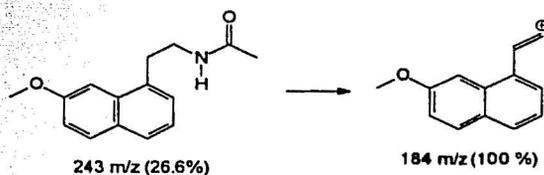
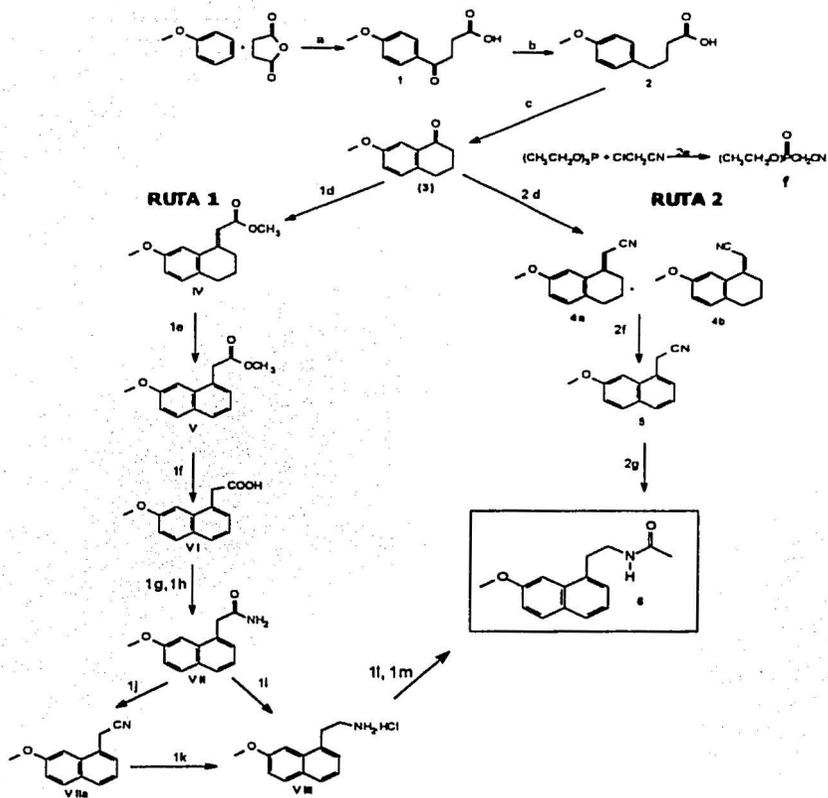


Figura 8. Patrón de fragmentación del compuesto 6

Al comparar la ruta alterna con la ruta propuesta en la literatura,<sup>53,54,55</sup> mostradas en el esquema 3, se aprecia que la ruta alterna consta de menos número de pasos. La comparación parte del compuesto 3, que es el punto común en ambas rutas. Mientras que la ruta 1 comprende 8 ó 9 pasos para obtener el compuesto 6, la ruta 2 comprende 3 pasos, además de la preparación del compuesto f.



**ESQUEMA 3.** Comparación de la ruta reportada en la literatura (1) y la ruta alterna (2):

a)  $\text{AlCl}_3$ , DCE; b)  $\text{Pd/C5\%}$ , AcOH; c) PPA,  $90^\circ\text{C}$ ;

(1) 1d) Zn,  $\text{BrCH}_2\text{COOCH}_3$ ; 1e)  $\text{S}_2$ ; 1f) Saponificación; 1g)  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ; 1h)  $\text{NH}_4\text{OH}$ , éter,  $0^\circ\text{C}$

1i)  $\text{LiAlH}_4$ , éter; 1j)  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ , THF,  $0^\circ\text{C}$ ; 1k)  $\text{H}_2$ , Ni-Raney; 1l)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ; 1m)  $\text{RCOCl}$ ,  $0^\circ\text{C}$

(2) 2d) NaH, THF + f; 2e) Reflujo; 2f)  $\text{Pd/C5\%}$ , AcOH; 2g)  $\text{H}_2$ -Ni-Raney, THF, Ac<sub>2</sub>O

### IV. II Parte biológica

Se ha reportado que la melatonina inhibe la contracción del músculo liso de duodeno de rata,<sup>13</sup> razón por la cual se evaluó dicha actividad para la agomelatonina.

Se determinó esta actividad tanto para melatonina como para agomelatonina utilizando concentraciones crecientes (10, 20, 40, 80, 160 y 320  $\mu\text{M}$ ). A continuación se presentan los registros obtenidos esquema (No 4) a las diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos probados.

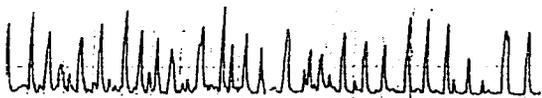
Como puede observarse en los registros esquema (No 4), en todos los casos la respuesta obtenida a las diferentes concentraciones es la inhibición de contracción del músculo liso, además de que ocurren cambios en la frecuencia y la amplitud.

Los resultados muestran que la melatonina a 10  $\mu\text{mol/ml}$  no inhibe la actividad contráctil. A partir de 20  $\mu\text{mol/ml}$  se obtiene una inhibición de la respuesta contráctil. A medida que aumenta la concentración, aumenta la actividad inhibitoria sobre duodeno. Se observa una inhibición completa de la contracción a partir de 80  $\mu\text{mol/mL}$ .

En cambio con la agomelatonina, se puede observar que la actividad inhibitoria empieza desde 10  $\mu\text{mol/ml}$  y a partir de 40  $\mu\text{mol/mL}$  hay una inhibición completa de la actividad contráctil.

De acuerdo a los resultados preliminares, la agomelatonina presenta un comportamiento similar al de la melatonina, pero, de manera cualitativa, ligeramente mayor.

## MELATONINA



10 µmol/ml



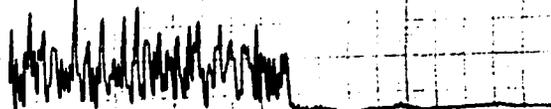
20 µmol/ml



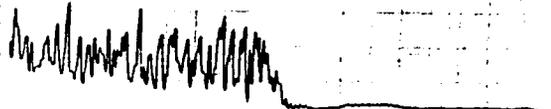
40 µmol/ml



80 µmol/ml



160 µmol/ml

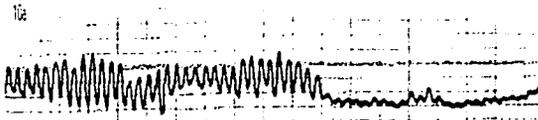


320 µmol/ml

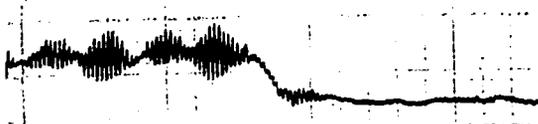
## AGOMELATONINA



10 µmol/ml



20 µmol/ml



40 µmol/ml



80 µmol/ml



160 µmol/ml



320 µmol/ml

ESQUEMA No 4 Comparación de las diferentes concentraciones de melatonina y agomelatonina con respecto a la actividad contráctil en duodeno de rata.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

## **V. PARTE EXPERIMENTAL**

## **V. PARTE EXPERIMENTAL**

### **V.I PARTE QUÍMICA**

### **V.II REACTIVOS**

Las materias primas iniciales y algunos disolventes utilizados en las síntesis se adquirieron comercialmente en grado reactivo.

Algunos, como el 1,2dicloroetano, se destilaron sobre  $P_2O_5$  después de refluja por una hora; Hexano y Acetato de etilo se destilaron.

### **V.III PROCEDIMIENTO GENERAL DE LAS REACCIONES.**

Las reacciones se realizaron en atmósfera inerte (Argón) y en condiciones anhidras. La adición de reactivos se realizó por medio de una jeringa hipodérmica.

#### V.IV INSTRUMENTACIÓN:

Los espectros de resonancia magnética protonica ( $RMN^1 H$ ) se determinaron con un espectrómetro Varian EM-390 ( 300MHz) (USAI, Facultad de Química),utilizando deuterio-cloroformo como disolvente. Los desplazamientos químicos  $\delta$  se dan en ppm y las constantes de acoplamiento se reportan en Hertz. La multiplicidad se expresa como s = singulete, t = señal triple, d = señal doble, dd = doble de dobles, q = señal cuadruple.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 337 en pastilla de bromuro de potasio o en película, según sea el caso, las señales se reportan en  $cm^{-1}$ .

Los espectros de masas se determinaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) o por introducción directa de la muestra en un aparato marca JEOL-JMS-AX505-HA. La simbología utilizada es  $M^+$  = ión molecular. Se indica como  $m/z$ = masa/carga con su respectiva abundancia relativa.

Los puntos de fusión ( pf ) fueron determinados en un aparato Fisher Johns y en un aparato marca Büchi modelo 530, la temperatura se reporta en grados centígrados y no están corregidos.

La destilación de bulbo a bulbo se realizó en un aparato Kugellrohr de 500 watt marca Aldrich. Para la evaporación de los disolventes se empleó un evaporador rotatorio marca Büchi RE

Para realizar las hidrogenaciones catalíticas se utilizó un hidrogenador marca Parr Mod.3916EG con 60 lb/plg<sup>2</sup> y 80 °C como capacidad máxima y un Frasco reactor de 500 ml, utilizando hidrógeno de tanque de la casa INFRA

#### V.V. CROMATOGRAFIA:

El progreso de las reacciones se siguió a través de cromatografía en placa fina siguiendo técnicas convencionales hasta detectar la desaparición de las materias primas o la constancia de un producto, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice Merck 60 F<sub>254</sub> con un espesor de 0.25 mm.

Para la separación y purificación de los compuestos se realizaron cromatografías en columna, utilizando gel de sílice Merck 60 malla 70-230.

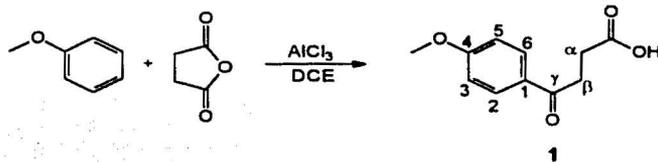
En la cromatografía en capa fina preparativa se utilizaron placas de vidrio de 20x20 revestidas con gel de sílice Merck 60 F<sub>254</sub> con un espesor de 2 mm.

Los compuestos orgánicos se visualizaron por iluminación con luz ultravioleta, por exposición a vapores de yodo o por exposición con solución en etanol de 2,4 dinitrofenilhidrazina.

**V.VI. SISTEMA DE ELUCIÓN EMPLEADOS.**

<b>SISTEMA</b>	<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>PROPORCIÓN</b>
<b>1</b>	<b>tolueno/THF/AcOH</b>	<b>180:16:6</b>
<b>2</b>	<b>Hexano/Acetato de etilo</b>	<b>95:5</b>
<b>3</b>	<b>Diclorometano/metanol</b>	<b>95:5</b>

## V.VII. DESCRIPCIÓN DE LAS SÍNTESIS.

V.VIII      **Ácido  $\gamma$ -(*p*-metoxibenzoil)propiónico (1).**

En un matraz bola de 100 ml con 3 bocas, tipo europeo, acondicionado con termómetro, embudo de adición de sólidos y trampa anhidra, se enfriaron 52 ml de 1,2-dicloroetano a 4 °C, luego se agregaron 20 g (155 mmol) de  $\text{AlCl}_3$  y la suspensión amarilla se mantuvo en agitación durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 7.98 g (77.8 mmol) de anhídrido succinico a travez del embudo de polvos. Se cambió el embudo de adición de sólidos por un embudo de adición de líquidos cargado con 8.54 ml (77.8 mmol) de anisol. Este se adicionó gota a gota a la suspensión, manteniendo la temperatura a 4 °C. Terminada la adición se dejó 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se retiró el enfriamiento dejando a temperatura ambiente la reacción durante 2 horas.

La mezcla de reacción se vertió, con agitación vigorosa, sobre 400 g de hielo-agua contenidos en un vaso precipitado de 500 ml. Al precipitado formado se le agregaron 50 ml HCl conc.

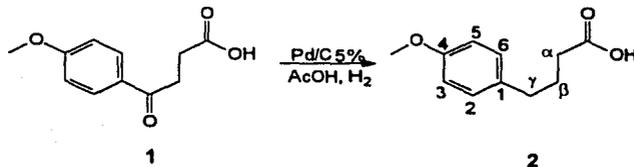
Este precipitado se separó por filtración al vacío y se dejó secando toda la noche con succión. El crudo de reacción se recrystalizó de etanol, y se obtuvo un rendimiento (65%) de cristales blancos de ácido  $\gamma$ -(*p*-metoxibenzoil) propiónico **1** con punto de fusión (142-147 °C) y  $R_f = 0.3$  (sistema 1). Sus constantes espectroscópicas son:

**IR (película, espectro 1)** 3400-320 (OH, de COOH); 1695 (C=O, de COOH); 1670 (C=O). 1670

**RMN <sup>1</sup> H (CDCl<sub>3</sub>, espectro 2)** ; 3.277 ( t, J=6.6, 2H)  $\alpha$ -H; 2.80 ( t, J=6.6, 2H)  $\beta$ -H; 3.87 ( s, 3H) CH<sub>3</sub>O-,  $\delta$ -H; 6.94 ( dd, J=9, 2H)  $\delta$ , 6-H; 7.96 (dd, J=9.3 2H)  $\delta$ , 7,9-H; 11.036 , int...con D<sub>2</sub>O, COOH-H

**EM (EI, espectro 3)** 208(M<sup>+</sup>, 66%); 209(M<sup>+</sup>+1, 8.5%); 135(M<sup>+</sup>-17, 100%); 136(M<sup>+</sup>-16, 47.6%); 107(M<sup>+</sup>-73, 30%); 92(m<sup>+</sup>-170, 45%)

**V.IX**      *Ácido  $\gamma$ -(*p*-metoxifenil)butírico (2)*



En una botella de hidrogenación de 500ml se mezclaron 5.199 g (24 mmol) de **1** y 0.70 g de Pd / C al 5% bajo atmósfera inerte.

La mezcla anterior se resuspendió en 81 ml de ácido acético glacial. Posteriormente, la botella se adaptó al hidrogenador y un sistema de calentamiento. Se eliminó el aire presente en la botella mediante inyección / expulsión de 30 lb/plg<sup>2</sup> de hidrógeno tres veces. Después se cargó con hidrógeno hasta llegar a una presión de 38 lb/plg<sup>2</sup> y se hidrogenó a una temperatura de 65 °C hasta que dejó de consumirse hidrogeno (2.5 h).

La mezcla de reacción se filtró al vacío, sobre una cama de celita, para eliminar el catalizador, el filtrado se vertió sobre 200 g de hielo-agua contenidos en un vaso de 500ml. Enseguida se formó un precipitado blanco. Este precipitado se aisló mediante filtración con vacío y se dejó secando toda la noche con succión.

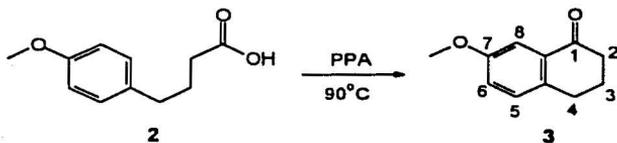
El crudo de la reacción se recrystalizó de benceno, para obtener un rendimiento (70%) de cristales blancos de ácido  $\gamma$ -(*p*-metoxifenil) butírico (**2**) con punto de fusión de (56-57 °C) y  $R_f = 0.4$  (sistema 1). Se determinaron sus constantes espectroscópicas.

**IR (película, espectro 4)** 3100-2800(OH, de COOH);1700 (C=O,de COOH)

**RMN <sup>1</sup> H (CDCl<sub>3</sub>,espectro 5)** :2.62 ( t, J=7.5, 2H ) **H- $\alpha$** ; 2.36 ( t, J=7.5, 2H) **H- $\gamma$** ; 1.93 ( q, J=15, 2H) **H- $\beta$**  ; 3.78 ( s,3H) CH<sub>3</sub>O-,**H-4**; 7.09 ( dd, J=8.7, 2H) **H-3,5**; 6.83(dd, J=8.7 2H )**H-2,6**; 7.836 ,int ...con D<sub>2</sub>O,COOH-1H

**EM(EI,espectro 6 )** se observó a 194(M<sup>+</sup>,76%); 195(M<sup>+</sup>+1,9.5%);134(M<sup>+</sup>-60,79%) ;121(M<sup>+</sup>-73.100%)

V.X *7-Metoxi-1-tetralona (3).*



En un matraz bola de 25ml de una boca, equipado con agitación mecánica, se mezclaron 4 g de PPA y 1.295 g (0.20 mol) de 2 y se calentaron con un baño de aceite a 90 °C, durante 15 minutos.

Posteriormente, se retiró el baño de aceite y la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se vertió en un vaso precipitado de 250 ml que contiene 10 g de agua-hielo con agitación vigorosa (precaución ya que desprende gases tóxicos).

La suspensión se extrajo con acetato de etilo (25 ml x 3). La fase orgánica se lavó con una solución de NaOH 10%, hasta pH neutro, se lavó con una solución saturada de cloruro de sodio y el extracto se trató con sulfato de sodio anhidro. Se concentró a sequedad en rotavapor. Se obtuvo un aceite que se purificó por cromatografía en columna (sistema 2).

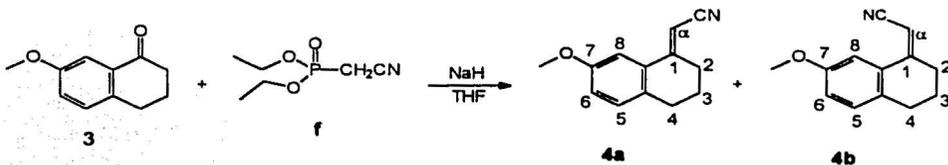
Las fracciones de composición semejante se juntaron y concentraron en rotavapor, obteniéndose un sólido amarillo. Este último se purificó por una destilación de bulbo a bulbo para obtener un rendimiento (73%) de cristales blancos de 7-metoxi-1-tetralona **3**, con punto de fusión de (56-59 °C) y  $R_f = 0.23$  (sistema 2). Se determinaron sus constantes espectroscópicas.

**IR** (película, espectro 7) max. 1700 (C=O, de cetona)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, espectro 8) ; 2.9 ( t, J=6, 2H ) **H-2**; 2.6 ( t, J=6, 2H) **H-4**; 2.1 ( q, J=12.3, 2H) **H-3** ; 3.83 ( s, 3H) CH<sub>3</sub>O-, **H-7**; 7.16 ( d, J=8.4, 1H) **H-5**; 7.51(d, J=2.7 1H) **H-8**; 7.06 ( dd, J=8.4, 2.7 1H) **H-6**

**EM**(EI, espectro 9) se observó a 176(M<sup>+</sup>, 100%); 177(M<sup>+</sup>1, 13.3%); 175(M<sup>+</sup>+1, 7.6%) ; 161(M<sup>+</sup>-15, 9.5%) 148(M<sup>+</sup>-28, 30.4%); 134(M<sup>+</sup>-42, 15.2%); 120(M<sup>+</sup>-56, 766.6%)

**V.X (2 E/Z)-(7-metoxi-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ilideno) acetonitrilo (4a / 4b).**



En un matraz bola de 150 ml de 3 bocas, tipo europeo, acondicionado con termómetro, embudo de adición de líquidos y un sistema con flujo de argón, se agregaron 0.3949 g (16 mmol) de NaH en 20 ml de THF.

En el embudo de adición de líquidos se colocaron 2 ml (9.8 mmol) de cianometilfosfonato de dietilo en 5 ml de THF. Esta solución se adicionó gota a gota, manteniendo la temperatura abajo de los 30 °C.

Terminada la adición se dejó una hora a temperatura ambiente (el color del anión fue amarillo claro). Posteriormente se agregaron 0.87 g (4.9 mmol) de 7-metoxitetralona, disuelta en 5 ml de THF, en condiciones anhidras. Esta solución se goteó a través de una cánula sobre el matraz con el anión. Terminada la adición se dejó 3 horas a temperatura ambiente.

Pasado el tiempo anterior, la mezcla de reacción se agregó sobre un vaso precipitado de 500 ml con 100 g de hielo-agua. La mezcla se llevó a pH ácido agregando HCl 10%. Se realizaron tres extracciones con acetato de etilo, la fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro de sodio y se trató con sulfato de sodio anhidro, se concentró a presión reducida. Se obtuvo una mezcla de dos compuestos, uno sólido (4a) y el otro un aceite (4b) en proporción de 7.5:2.5

El compuesto 4a de la mezcla cristalizó de ciclohexano, obteniéndose cristales blancos con un punto de fusión (54-56 °C) y  $R_f=0.28$  (sistema 2). El compuesto 4b sólo se pudo separar parcialmente del sólido por placa preparativa, asimismo se logró separar analíticamente por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas. Se determinaron las constantes espectroscópicas de 4a y 4b.

IR (película, espectro 10,4a) 2208(CN)

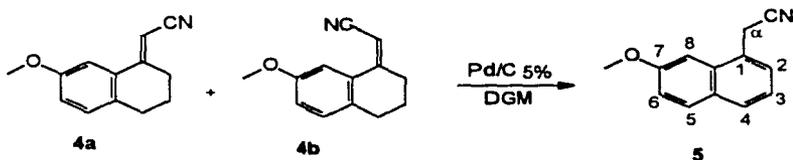
RMN <sup>1</sup> H (CDCl<sub>3</sub>, espectro 11,4a) ; 5.702 ( dd, J=1.2,1.4, 1H ) H-α; 2.87 ( t, J=6.45, 2H) H-2; 1.925(q,J=6.3,2H)H-3; 2.8 ( t, J=6.3, 2H) H-4; 7.1 ( d, J=8.4, 1H) H-5; 6.92 (dd, J=2.7,8.55,1H )H-6; 3.81 ( s,3H) CH<sub>3</sub>O-,H-7; 7.03 ( d, J=2.7 1H) H-8

EM(EI, espectro 12,4a) se observó que a 199(M<sup>+</sup>,100%); 200(M<sup>+</sup>+1,43.8% );198(M<sup>+</sup>-1,68.5%);  
;184(M<sup>+</sup>-15,44.7%);172(M<sup>+</sup>-27,45.7%)

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>,espectro 11,4b); 5.276 ( dd, J=1.2,1.5, 1H ) H-α; 2.58 ( t, J=1.5, 4.8, 2H)  
H-2 ; 1.925 (q, J=6.3,2H)H-3; 2.81 ( t, J=6.3, 2H) H-4; 7.1 ( d, J=8.4, 1H) H-5; 6.92 (dd,  
J=2.7,8.55,1H ) H-6; 3.85 ( s,3H) CH<sub>3</sub>O-,H-7; 7.8 ( d, J=2.7 1H) H-8

EM(EI, espectro 12,4b) se observó que el patrón de fragmentación es 199(M<sup>+</sup>,100%);  
200(M<sup>+</sup>+1,43.8% );198(M<sup>+</sup>-1,68.5% );184(M<sup>+</sup>-15,44.7%);172(M<sup>+</sup>-27,45.7%)

V.XII (7-metoxi-1-naftil)acetonitrilo (5)



En un matraz de bola de 10 ml se disolvieron 80 mg (24 mmol) de la mezcla de 4-(E) y 4-(Z) en 5 ml de diglima anhidra , posteriormente se agregaron 56 mg de Pd / C al 5% anhidro y la mezcla se mantuvo en reflujo durante 90 minutos bajo atmósfera inerte. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se filtró al vacío sobre una cama de celita.

El filtrado se concentró a presión reducida obteniéndose un sólido que se purificó por cromatografía en columna con una fase móvil de 95:5 hexano/acetato de etilo.

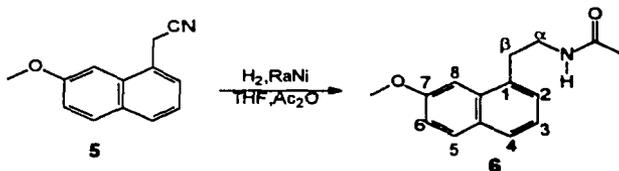
Las fracciones de composición semejante se juntaron y concentraron en rotavapor, obteniéndose un sólido blanco. Este sólido se recrystalizó de ciclohexano para dar cristales blancos (75%) en forma de agujas, los cuales corresponden al (7-metoxi-1-naftil)acetonitrilo (**5**). Su punto de fusión fue de 77-79 °C y su  $R_f=0.4$  (sistema 2). Se determinaron sus constantes espectroscópicas.

**IR** (película, espectro **13**) 2247 (CN), 1625 (CH=CH)

**RMN** <sup>1</sup> H (CDCl<sub>3</sub>, espectro **14**) ; 4.081 (s, 2H) -CH<sub>2</sub>-,  $\alpha$ -H; 7.5 (d, J=9, 1H) H-2; 7.33 (dd, J=7.2, 8.1, 1H) H-3 ; 7.79(d, J=8.1, 1H) H-4; 3.97(s, 3H) CH<sub>3</sub>O-, H-7; 7.817( d, J=9, 1H) H-5,; 7.22(dd, J=2.4, 9, 1H) H-6; 7.08(d, J=2.1, 1H) H-8

**EM**(EI, espectro **15**) 197(M<sup>+</sup>, 100%); 198(M<sup>+</sup>+15.2%); 196(M<sup>+</sup>+1, 6.6%) ; 182(M<sup>+</sup>-15, 7.6%); 154(M<sup>+</sup>-43, 22.8%)

V.XIII **N**-[2-(7-metoxi-1-naftil)etil]acetamida (**6**)



En una botella de hidrogenación de 500 ml se mezclaron bajo atmósfera inerte 0.986 g (49 mmol) de **5** disueltos en 25 ml THF anhidro, y 0.591 g de Ni-Raney, previamente lavado dos veces con agua, etanol absoluto y anhídrido acético.

Después se agregaron 10 ml de anhídrido acético. La botella se acopló al hidrogenador y a un sistema de calentamiento. Se eliminó el aire presente en el frasco reactor mediante inyección / expulsión de 30 lb/plg<sup>2</sup> de hidrógeno tres veces, después se cargó con hidrógeno hasta una presión de 50 lb/plg<sup>2</sup>, se calentó a una temperatura de 50 °C y se hidrogenó durante 6 horas.

La mezcla de reacción se filtró al vacío sobre una cama de celita, el filtrado se basificó con NaOH 1 M y luego se extrajo con acetato de etilo (3x 25 ml). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, luego con una solución saturada de NaCl, y se trató con sulfato de sodio anhidro, después se concentró a sequedad en rotavapor. El crudo de la reacción se recrystalizó en una mezcla Tolueno-Hexano (2:1), para obtener un rendimiento (60%) de cristales blancos en forma de agujas de *N*-[2-(7 -metoxi-1-nafil)etil]acetamida (**6**). Su punto de fusión fue de 109.2-109.8 °C (Lit.<sup>53</sup> 109-110 °C) y su  $R_f = 0.352$  (sistema 3). Se determinaron sus constantes espectroscópicas.

**IR (película, espectro 16)** 3293-3075 (-NHCO-); 1654 (C=O, de -NHCO-)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, espectro 17)** ; 1.966(s, 3H) CH<sub>3</sub>CO-, 1'H ; 3.62 (td, J=7.5, 6.3, 2H) H-α; 2.25 (t, J=7.5, 2H) H-β; 7.27 (m, J=7.25, 7.26, 2H) H-2,4; 7.68(dd, J=3, 6.3, 1H) H-3 ; 3.99 (s, 3H) CH<sub>3</sub>O-, H-7; 7.76 (d, J=9, 1H) H-5; 7.167(dd, J=2.4, 8.85, 1H) H-6; 7.465(d, J=2.4, 1H) H-8; 5.670, int. con D<sub>2</sub>O, (-NHCO-1H)

**EM(EI, espectro 18)** se observó a 243(M<sup>+</sup>, 26.6%); 244 (M<sup>+</sup>+1, 4.7%); 184(M<sup>+</sup>-59, 100%) ; 171(M<sup>-</sup>-72, 63.8%)

V.XIV      **Dietilfosfonato de cianometilo (f)**



En un matraz bola de 50 ml con 2 bocas, acondicionado con termómetro, una columna Vigreux y trampa anhidra, se agregaron 4.2 ml de cloroacetnitrilo y 11.5 ml de fosfito de trietilo, y la mezcla se calentó a una temperatura 125-130 °C durante 3.5 horas. Después se destiló a presión reducida el exceso de fosfito de trietilo (40 °C 2 a 3 mmHg) y el Dietilfosfonato de cianometilo (110-125 °C 2 a 3 mmHg). Este producto se utilizó sin mayor purificación.

## V.XV PRUEBAS BIOLÓGICAS

## V.XVI DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS

La determinación de la actividad biológica de los siguientes compuestos:

- Melatonina
- Agomelatonina

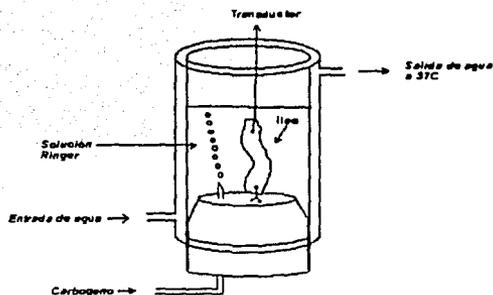
Las concentraciones que se manejaron fueron las siguientes (tabla 1):

Concentración ( $\mu\text{mol} / \text{ml}$ ) de melatonina y agomelatonina
10
20
40
80
160
320

Se llevó a cabo utilizando la siguiente metodología: Se utilizaron 2 ratas machos cepa Wistar con un peso de entre 180 y 230 g que fueron privadas de alimentación 8-12 horas antes de realizar el experimento, previa adaptación a las condiciones del laboratorio (tuvieron libre acceso al agua) Los registros se llevaron a cabo usando un equipo polígrafo con hardware y Software (Polyview) incluido, (marca Grass. Modelo 7D)

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y se colocaron en posición supina sobre la mesa practicándoseles una incisión longitudinal en el abdomen, localizando y extrayendo la porción intestinal que corresponde al duodeno. El tejido se transfirió a una caja Petri con solución Ringer (composición en mM: NaCl, 137.9; KCl, 2.7; NaHCO<sub>3</sub>, 11.9; CaCl<sub>2</sub>, 1.82; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.37; .72 y glucosa 5.56) a 37°C ± 1°C de temperatura, se eliminó el mesenterio adherido y se cortaron cuatro fragmentos de aproximadamente 1.5 a 2 cm, cada uno, a los que se les amarró en un extremo un hilo de sutura de 5 cm y en el extremo opuesto, otro de 20 cm.

Los fragmentos se colocaron en cámaras para tejido aislado convencionales, sujetándolas por el hilo corto y en el orden siguiente: en la que corresponde al canal uno se colocó la porción proximal al estomago y así sucesivamente, de tal forma que en el canal cuatro, se encuentre el fragmento distal. Las cámaras se llenaron con 15 ml de solución Ringer, también a 37°C ± 1°C y, por medio de una manguera se burbujeo el gas carbógeno (5%CO<sub>2</sub> y 95%O<sub>2</sub>) con una presión suave, para oxigenarlos. El hilo largo de cada tejido se amarró al transductor del equipo a la argolla de 2 g



**Preparación del equipo.** El tejido se sujeta a la argolla ubicada en la base de la cámara, por medio de un hilo: en su otro extremo, el hilo se amarra al transductor del equipo. La cámara está llena de solución ringer a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , a la que se le burbujea carbógeno con presión suave.

En estas condiciones se estabilizó el tejido, posteriormente, se procedió a la administración de melatonina y agomelatonina a las concentraciones indicadas en la tabla 1. Se registró la actividad basal durante 5 minutos, tras los cuales se adicionó a cada cámara  $10\mu\text{L}$  de la solución del compuesto que se probaba, incubando el tejido hasta completar diez minutos. Pasado este tiempo se lavó el tejido con solución Ringer a la temperatura adecuada y se dejó estabilizar el tejido aproximadamente 30 minutos antes de aplicar la siguiente concentración, hasta llegar  $320\mu\text{L}$ .

## **VI. CONCLUSIONES**

## VII CONCLUSIONES

Con base en los datos espectrocópicos de los compuestos preparados se puede decir que se cumplió en su totalidad con los objetivos planteados en esta tesis

La ruta sintética alterna propuesta en este estudio ofrece las siguientes ventajas:

- 1.- El trabajo experimental se realiza en menos tiempo
- 2.- Se reduce el número de etapas de experimentación.

La ruta de síntesis propuesta en el presente trabajo deja abierta la posibilidad de realizar modificaciones y poder preparar intermediarios para obtenerse compuestos químicamente similares a la melatonina para su posterior estudio. Resta lograr la optimización de este proceso experimental, por nuestra parte a cortamos el camino y queda la tarea a otros la continuación de estos estudios.

Aunque los resultados de las pruebas biológicas son preliminares, es posible afirmar que el duodeno también disminuye su contractilidad espontánea en presencia de agomelatonina. Los resultados muestran que la actividad contráctil es ligeramente mayor en agomelatonina que en melatonina. Al igual que la parte sintética queda la tarea a otros la continuación de estos estudios sobre la actividad contráctil de duodeno de rata.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

VIII.BIBLIOGRAFÍA

1. Poeggeler, B.; Reiter, R.J.;Tan, D.X,Chen L.D and Manchester, L.G.; **J. pineal Res, 1993, 14**,151-168
2. Guardiola-Lemaitre, B.; **Adv. Pineal Res, 1991, 351-353**
3. Liu R. Y.; Zhou, J.N.; van Heerikhuize, J.;Hofman, M.A.; Swaab, D.F.; **J Clin Endocrinol Meted, 1999, 84, 323-327**
4. Reiter, R.J.; Garcia, J.J.; Pic, J.; **Restorative Neurosci,1998, 25, 135-142**
5. Seltzer, A.; Viswanathan, M. And Saavedra, J.M.; **Endocrinology, 1992, 130,1896-1902**
6. Viswanathan, M.; Laitinen, J.M. And Saavedra, J.M.; **Proc. Natl. Acad. Sci , 1990, 87, 6200-6203**
7. Vacas, M.I.; delzar, M.M.; Martinuzzo, M. And Cardinilli, D.P.; **J. Pineal Res.,1992,13,60-65**
8. Arendt, J.; **N. Engl. J. Med., 2000, 343,114-1116**

9. Claustrat, B.; Le Bards, D.; Brunj Thivolle, P.; Mallo, C.; Arendt, J. And Chazot, G.; Johnn Libbeg, 1989,305-310
10. Song, Y. Pang. C. S. Agre E.A. Brown G. M. and Pang S.F. *Eur. J. Endocrinol* (1996) 133,128-133
11. Dubocovich. M. L., Yun, K., Al-Gloul, W. M., *FASEBJ* (1998) 12,1211-1120
12. Repport, S. M, Godson C, Mahle,D.D. Weaver, D. R., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1995) 92,8734-8738
13. Harlow, H.J.; B.L. Weerley , *J. Pineal Res.*, 1986, 3, 277-284.
14. Cardinali, D.P.; Pevet, P.; *Med. Rev.*, 1998 ,2,175-190
15. Lavie, p.; *Khythm Annu. Rev. Psychol* ,2001,52,277-303
16. Wurtman, R.J.; Shein, H.; Axelrod, J. and Larin, F.; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 1969, 62 ,749
17. Lovenberg, W.; Jequire, E. And Sjoerdsma, A.; *Science*, 1967,155,217

18. Snyder, S.N.; Axelrod, J.; Wurtman, R.T. and Fischer, J.E.; **J. Pharmacol. Exptl. Therap.**, *1965*, **147**,371
19. Wurtman, R.J and Antón- Tay, F.; **Recent Progress in Homone Researche**, *1969*, **25**,493
20. Axelrod, J and Weissbach, H.J.; **Biol. Chem.**, *1961*,**236**,211
21. Weissbach, H.; Redfield, B.G. and Axelrod, J.; **Biochem. Biophys. Acta.**, *1960*,**43**,352
22. Axelrod, J and Lauber, J.K.: **Biochem. Pharmacol**, *1968*,**17**,828
23. Brzezingki, A.; **N. Engl. J. Med.**, *1997*,**336**, 186-195
24. Lewy, A.J.; Wehr, T.A.; Goodwin, F.K.; Newsome, D.A.; **Science**,*1980*, **210**,1267-1269
25. Lavie, P.; **J. Biol. Khythms**, *1997*,**12**,657-665
26. Lewy, A.J.; Ahmed, S.; Jackson, J.M.; Sack, R.L.; **Chronobiol Int.**, *1992*, **9**,380-392
27. **Publicación en saludpublica.com.; Abril 27 2001**

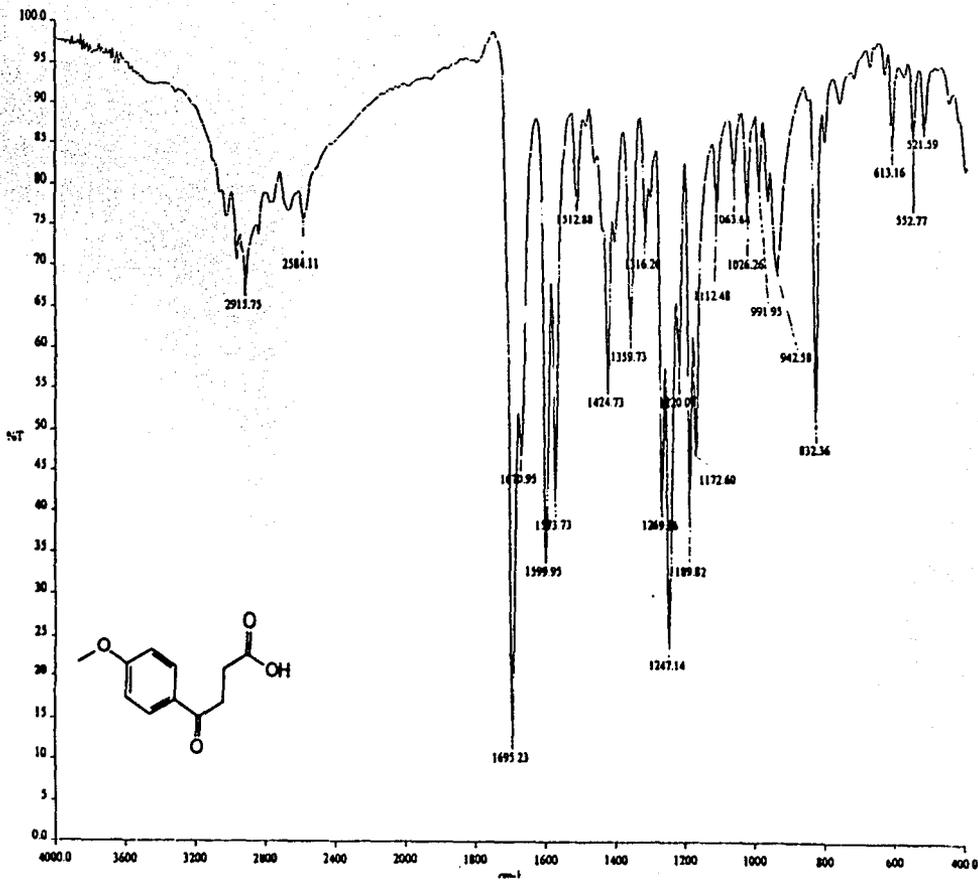
28. Esteban, C.C, **Prescripción de Farmacos Vol.2-No 5 Mayo 1996**
29. Myers, B. L.; badia, p., **Neurosci Biobehav Rev., 1995**
30. Tovitoo, Y., **Horm. Res. ,1995, 43,12-19**
31. Arendt, J.; Deacon, S.; Englih, J.; Hampton, S.; Morgan, L.; **J. Sleep Res.,1995, 4,74.**
32. Poppolla, M.; Bozner, P.; Soto, C.; Shao, H.; Robakis, N.K.; Zagorski, M.; Frangione, B.; Ghiso, J., **J. Biol. Chem.,1998 , 273,7185-7188**
33. Chyan, Y.J.; Poeggeler, B.; Omar, R.A.; Chain, D.G.; Frangione, B.; Ghiso, J.; Pappolla, M. A., **J. Biol. Chem. ,1999, 274, 21937-21942**
34. Blask, D. E.; Wilson, S. T.; Zalatan, F., **Cancer Res.,1997 ,57,1909-1914.**
35. Antón-Tay, F.; Díaz, J.L. and Fernández Guardiola, A. **Life Sci. ( part I), 1971,10,841**
36. Antón-Tay, F. and Fernández Guardiola, A., **Pineal Gland. Biochemistry and physiology, D.C. klein, Ed. New York: Kaven,1973**
37. Antón-Tay, F.; G.E.W. Wolstenholme and J. KnightEds., **London: Churchil 1971, 213-227**

38. Antón-Tay, F.; Chou, C.; Antón, S. And Wurtman, R. J., *Science*, **1968**, **162**, 277
39. Avendaño, C., *Introducción a la Química Farmacéutica*, **1993**, 3ra ed. Mc.Graw-Hill / Interamericana de España, S. A.: 57-58
40. Witt-Enderby, P.A, Massana, M. I., *Endocrinology (Baltimore)* (1998) **139**, 3064-3071
41. Wermuth, C.G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 1996, 204-207 Academic press
42. Guardiola- Lemaitre B., *Advances in Pineal Research* 8 (M moller, P Péveteds ) ,J Libbey, london, **1994**, 333-348
43. Castillo, R.; Suárez, H. M.; Aparicio, M.; Hernández-luis; Hernández, F.; *Org. Prop. Proced. int.*, **1995**, **27(5)**,550-552.
44. Horning and reisner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, **71**,1036
45. William, S. ;Johnson and Howard, J. Glenn., *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**,**71**,1092-1096
46. Artur I. Vogel, *A tex-book of practical organic chemistry*, Ed longman ,**1978**, N.Y, USA P.IV,135
47. Norman, D. Dawson, Alfred Burger., *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**,**74**,5312-5314

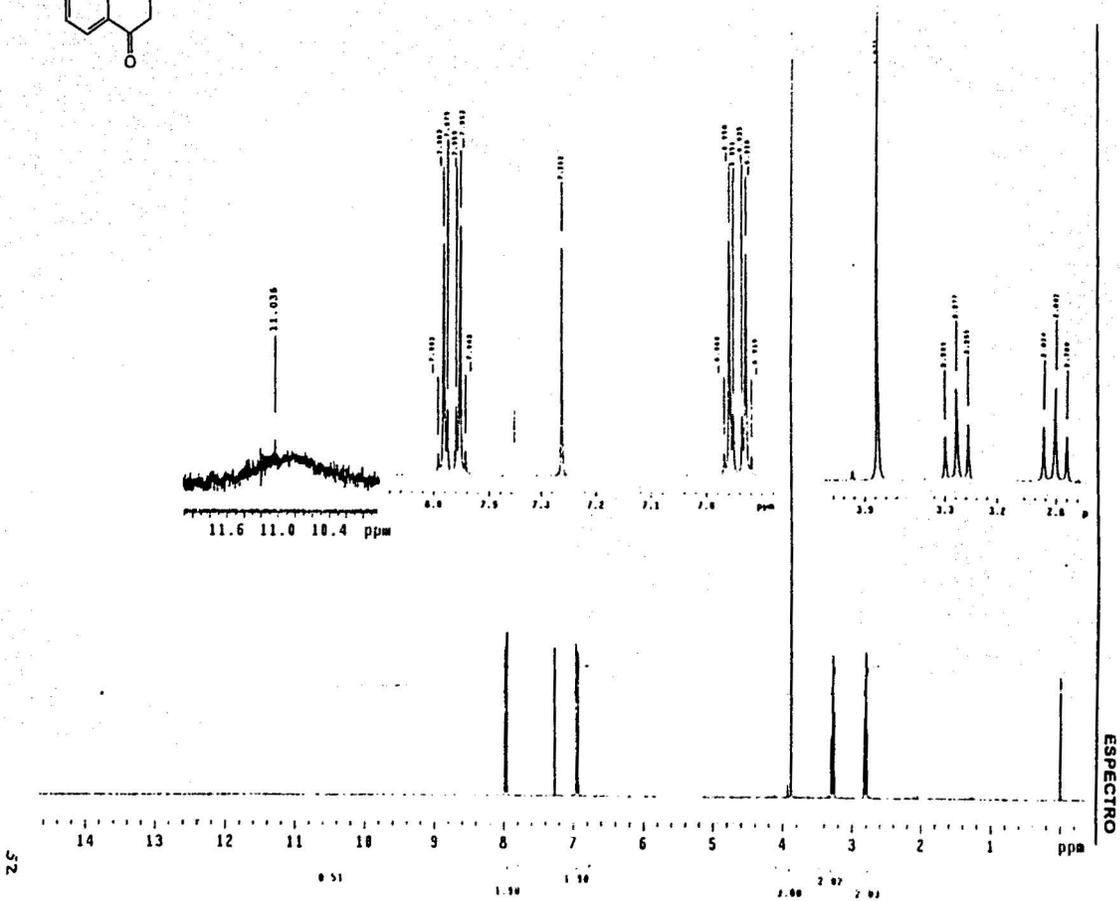
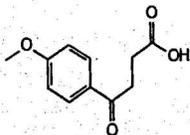
48. Wadsworth, W. S.; Jr., Emmons W.D., **J. Am. Chem. Soc.**, 1961,83,1733-1738
49. Jones, G. And Maisey, R.F., **Chem.Comm.**,1968, 543-545
50. Hongmee Lee; Ronald G.Harvey., **J. Org. Chem.**, 1990, 55,3787-3791
51. Kathryn, A. Parker; Dee Ann Casteel., **J. Org. Chem.**, 1998, Vol.53,No 12, 2847-2850
52. Mor, M; Spadoni, G; Di Giacomo, B; Diamantini, G., **Bioorg. Med. Chem.** 2001, 9, 1045-1057
53. Yous, S.; Aandrieux, J.; Howell, H. E.; Morgan, P. J.; Renard, P.; Pfeiffer, B.; Lesieur, D.;  
Guardiola-Lemaitre, B.,**J. Med. Chem.**, 1992, 35(8),1484-1486
54. Andrieux, J.; Anker, D.; Mentser, C., **Chim. Ther.**, 1966, 57-61.
55. Yous, S.; Depreux P.; Renard, P., **Arch. Pharmacol.**,1993 , 326 ,119-120.

## **VIII. ESPECTROS**

ESPECTRO DE IR (N.º 1) ácido  $\gamma$ -(4-metoxibenzoil)propionico (1)

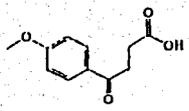
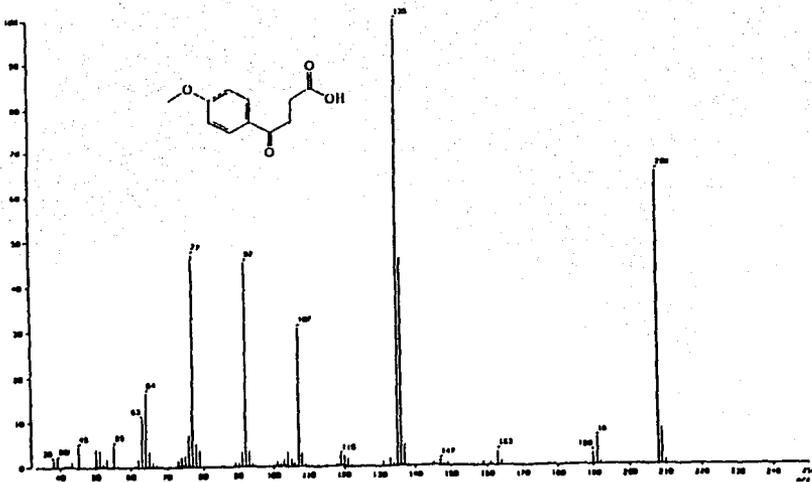


ESPECTRO



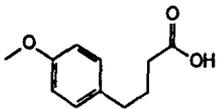
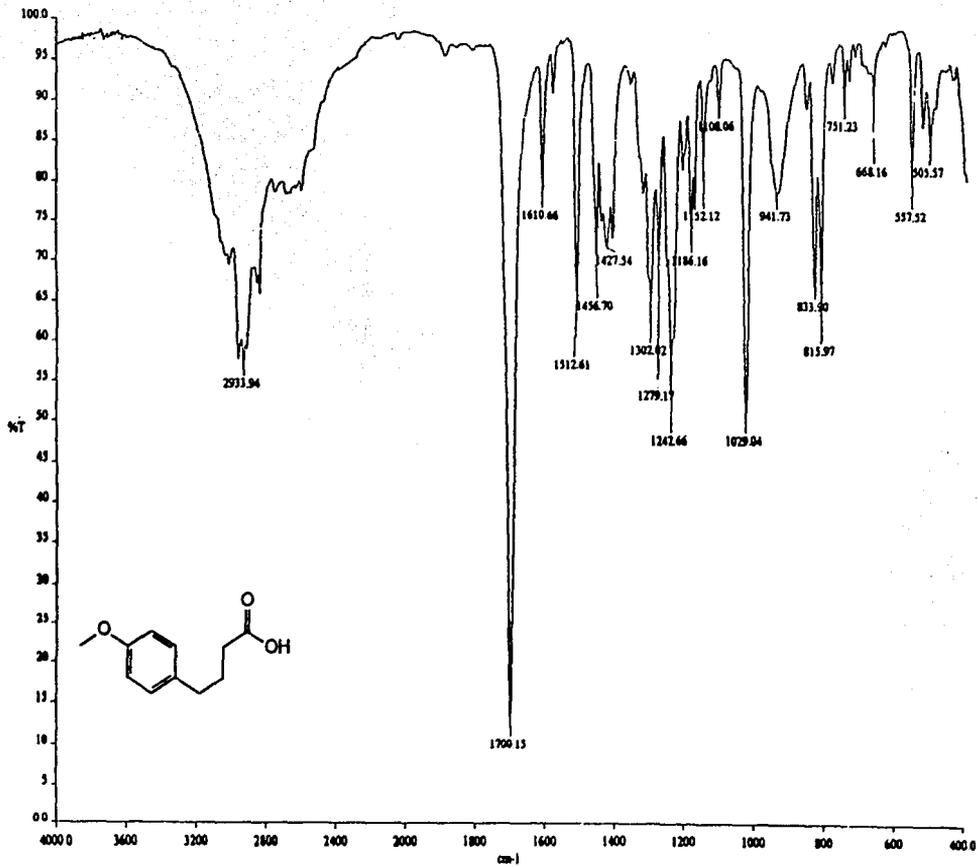
ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup> (N<sub>2</sub>O) acido y (4-metoxibenzoil)propionico (1)

ESPECTRO



ESPECTRO DE EM (No3) ácido y (4-metoxibenzoil)propionico (1)

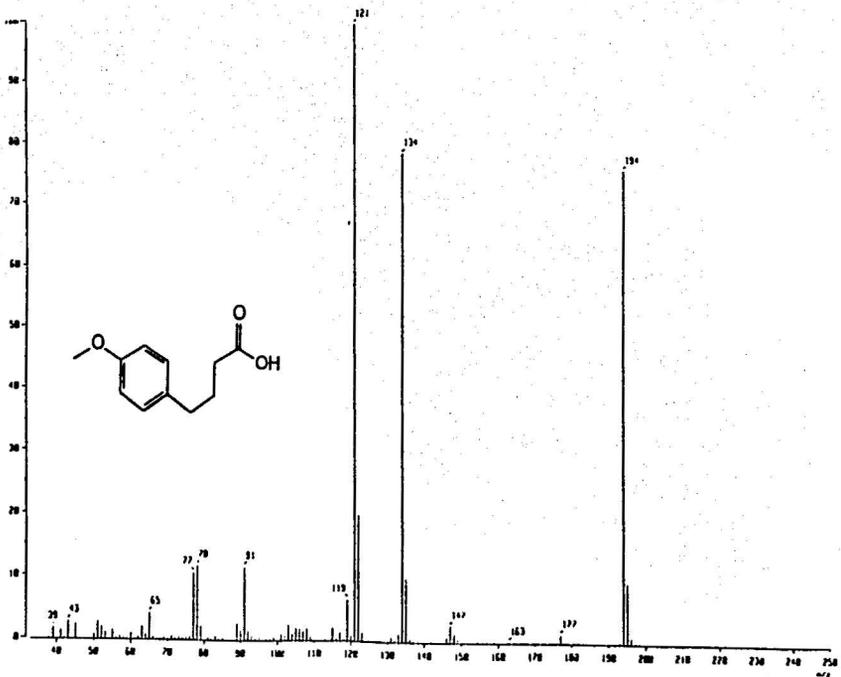
ESPECTRO DE IR (N<sub>2</sub>) ácido γ (4-metoxifenil)butírico (2)



ESPECTRO

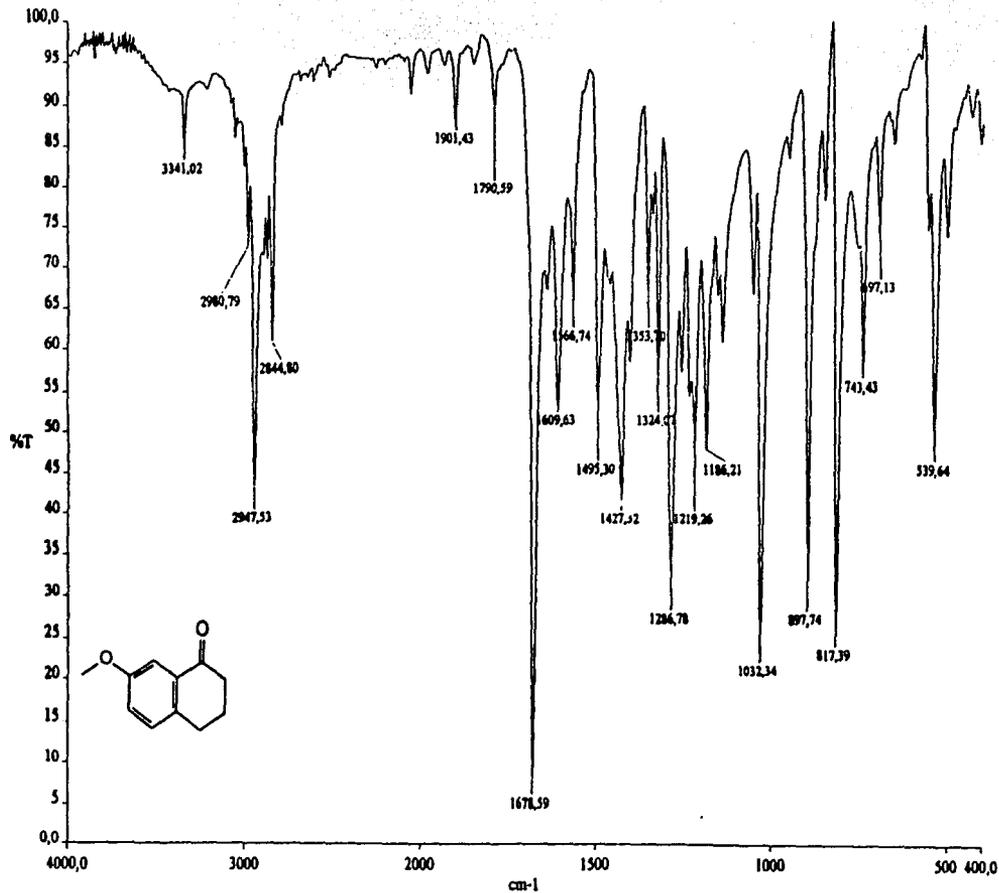


ESPECTRO DE EM(N.º 6) ácido γ(4-metoxifenil)butírico (2)

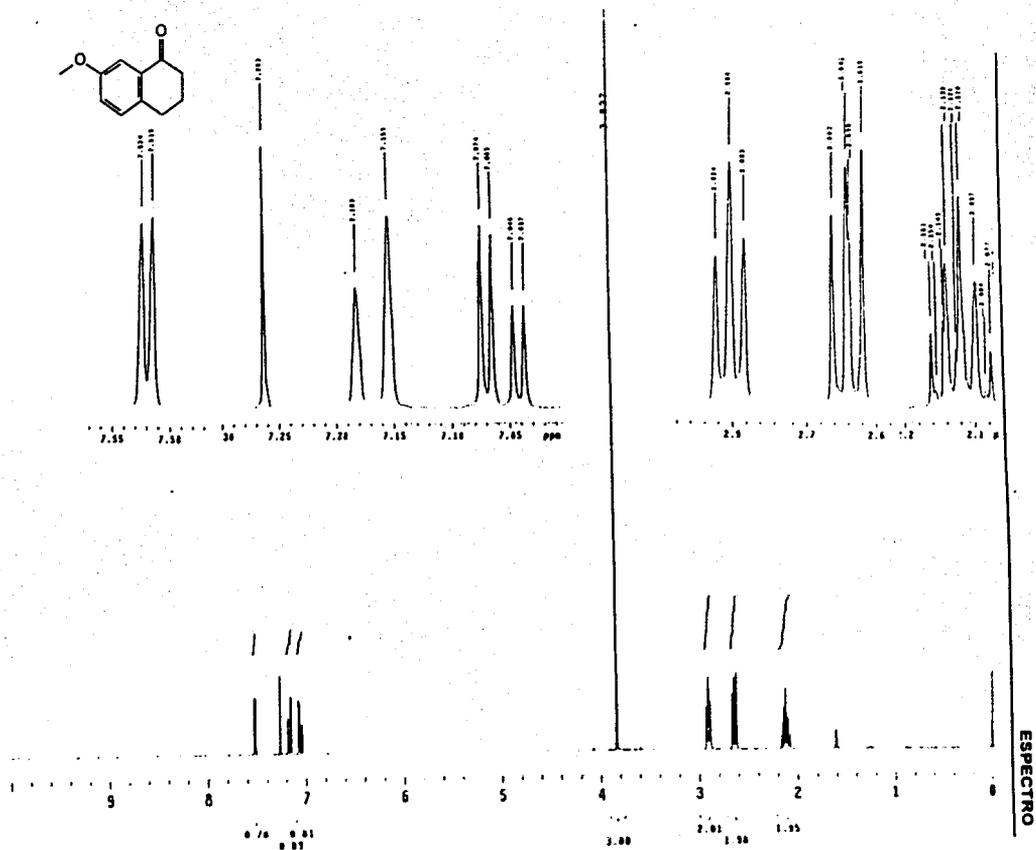
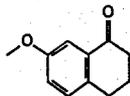


ESPECTRO

ESPECTRO DE IR (Nº7) 7-metoxi-1-tetralona (3)



ESPECTRO



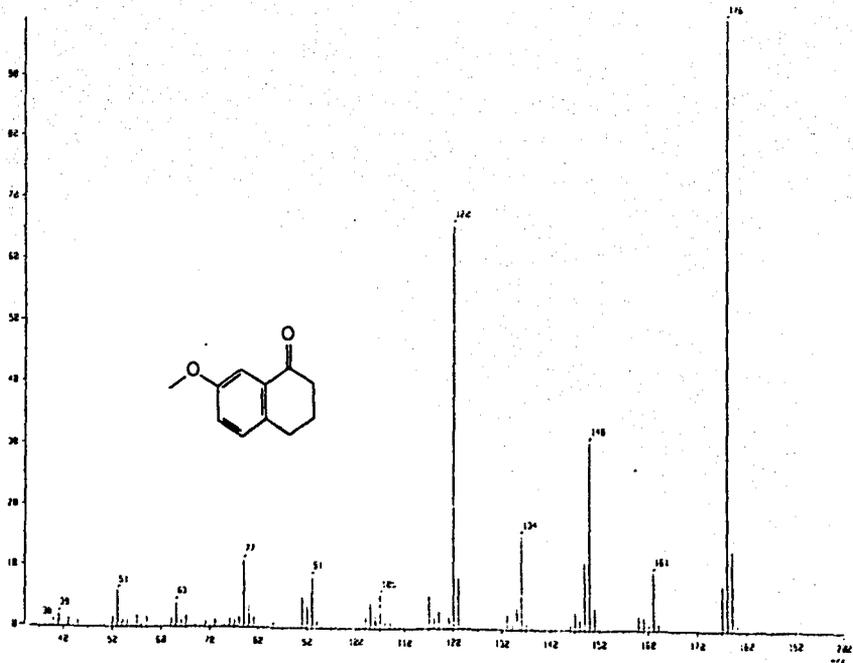
58

ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>IR(N 8) 7-metoxi-1-tetralona (3)

ESPECTRO

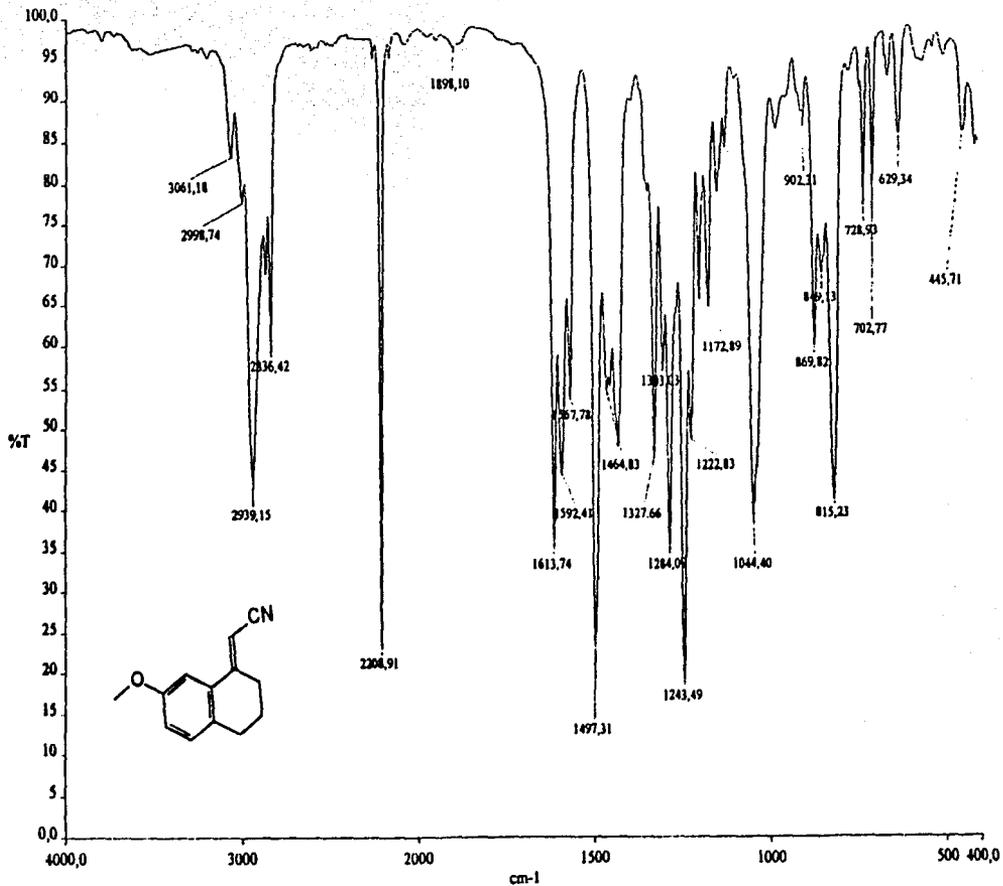
58

ESPECTRO DE EM (Nº9) 7-metoxi-1-tetralona (3)

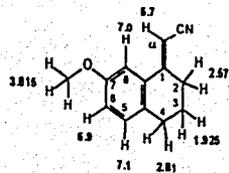


ESPECTRO

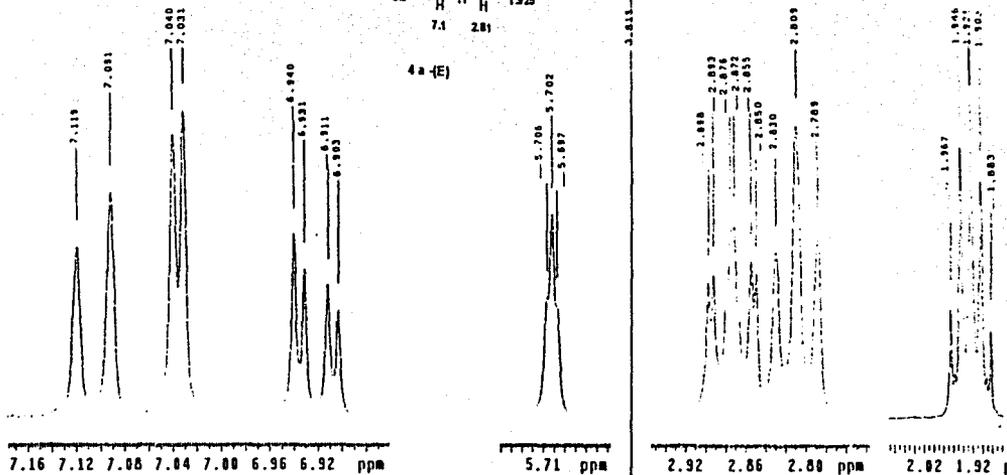
ESPECTRO DE IR (Nº 10) (E)-(7-metoxi-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ilideno)acetoniitrilo



ESPECTRO



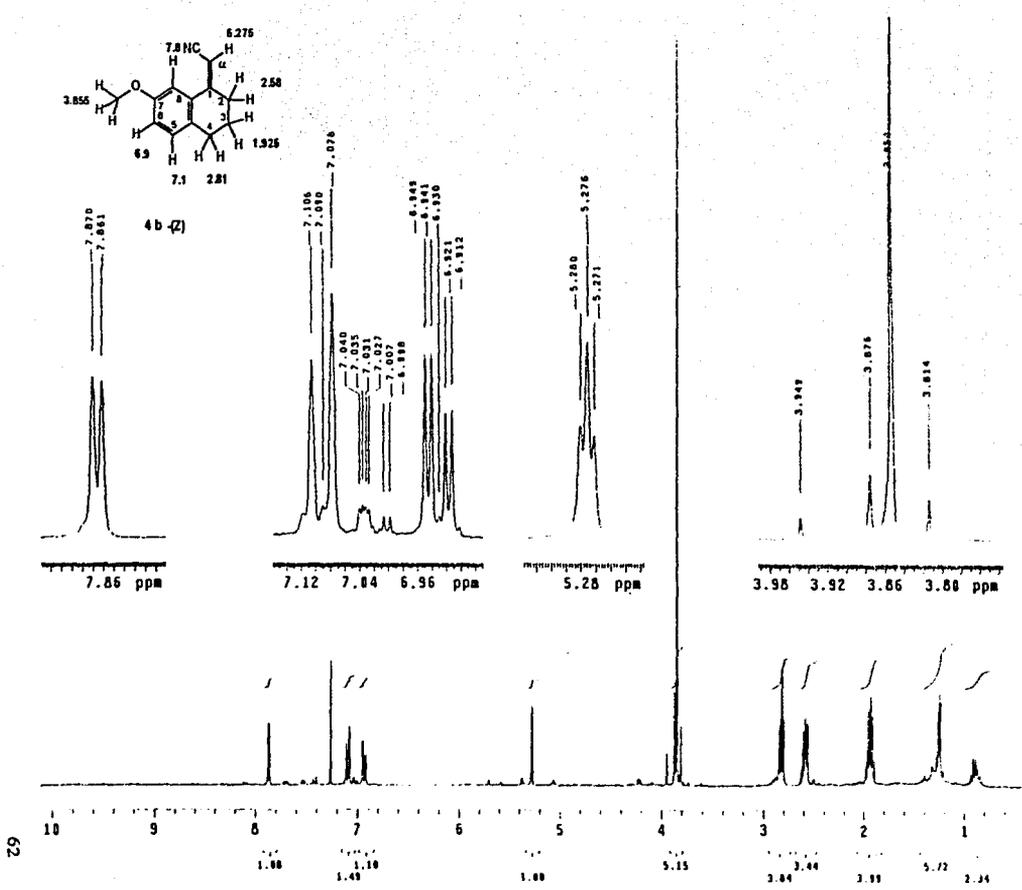
4a-(E)



61

RMN<sup>1</sup>H (No. 12, 4a) (E)-(7-metoxi-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ilideno)acetoniitrilo

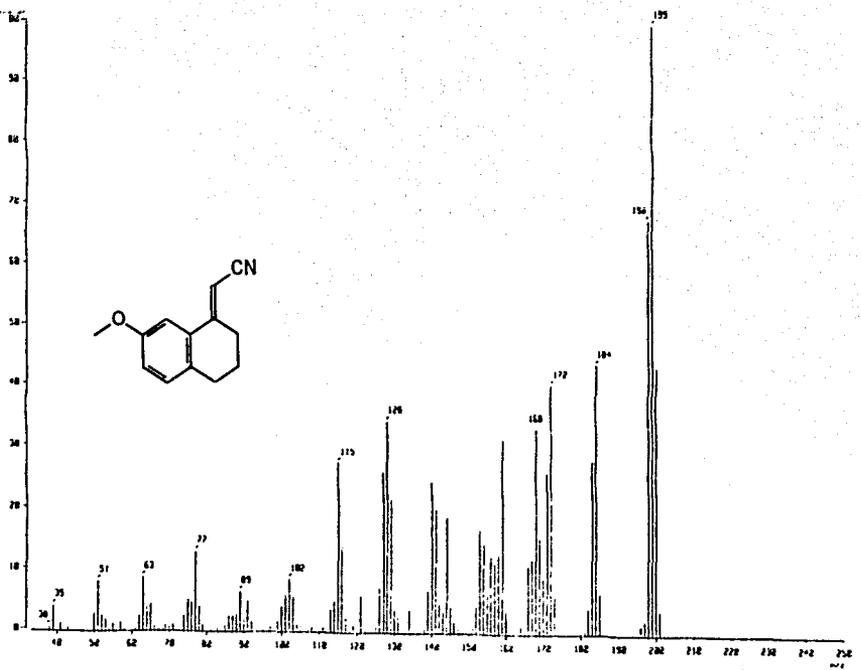
ESPECIALLY



RMN<sup>1</sup>H (No. 12, 4b) (Z)-(7-metoxi-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ilideno) acetoniitrilo

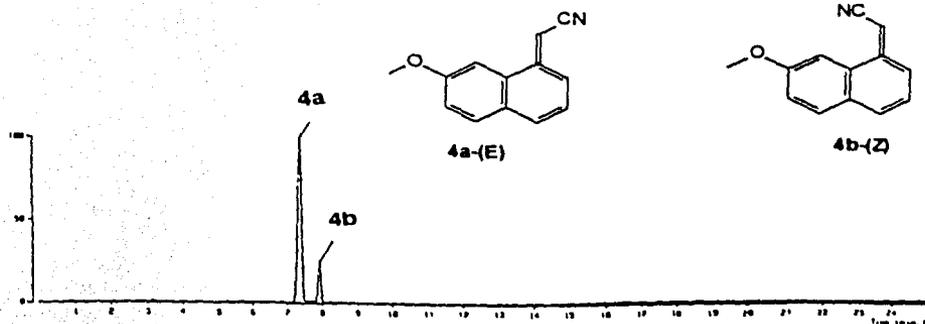
ESPECTRO

ESPECTRO

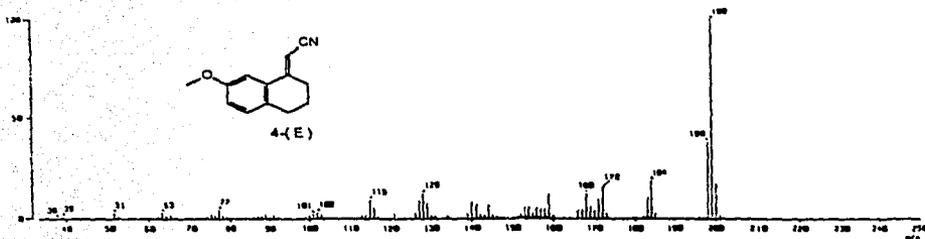
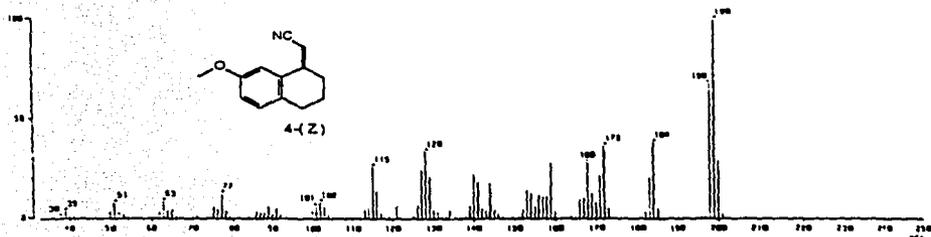


ESPECTRO DE EM (No.11) (E)-(7-metoxi-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ilideno)acetoniitrilo (4a)

ESPECTRO

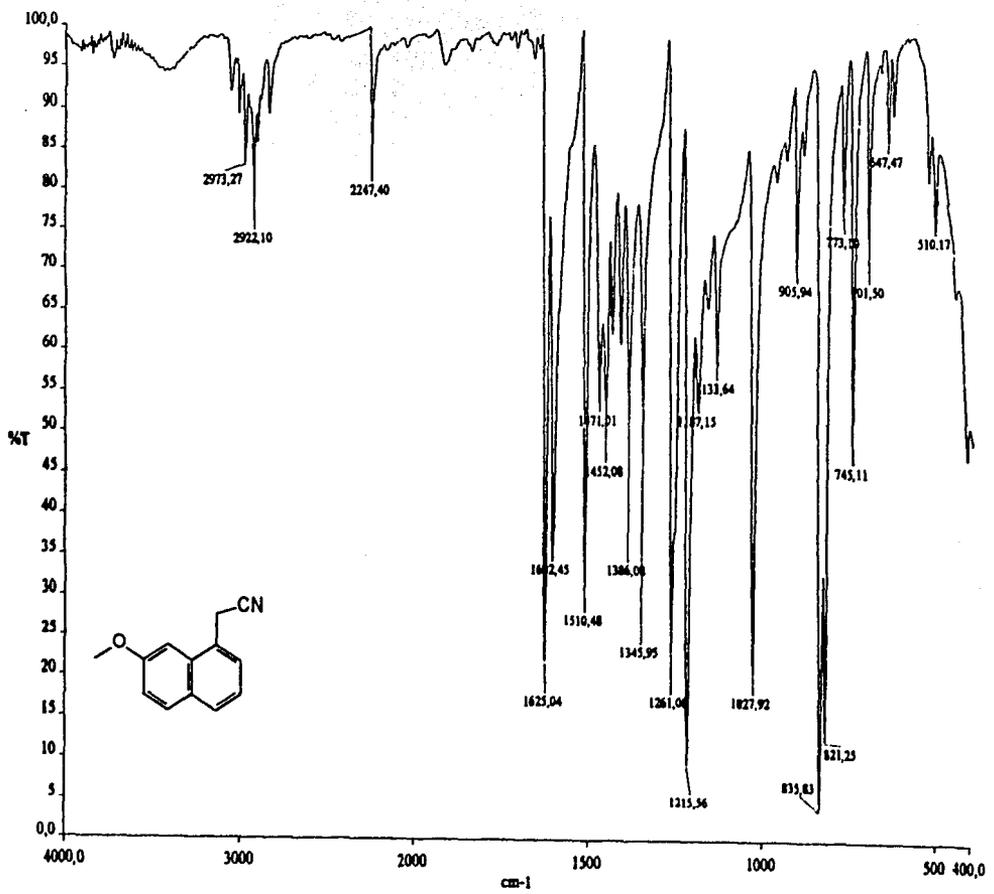


ESPECTRO DE CG (N<sub>2</sub>13) (E)-(7-metoxi-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ilideno) acetoniitrilo  
(Z)-(7-metoxi-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ilideno) acetoniitrilo

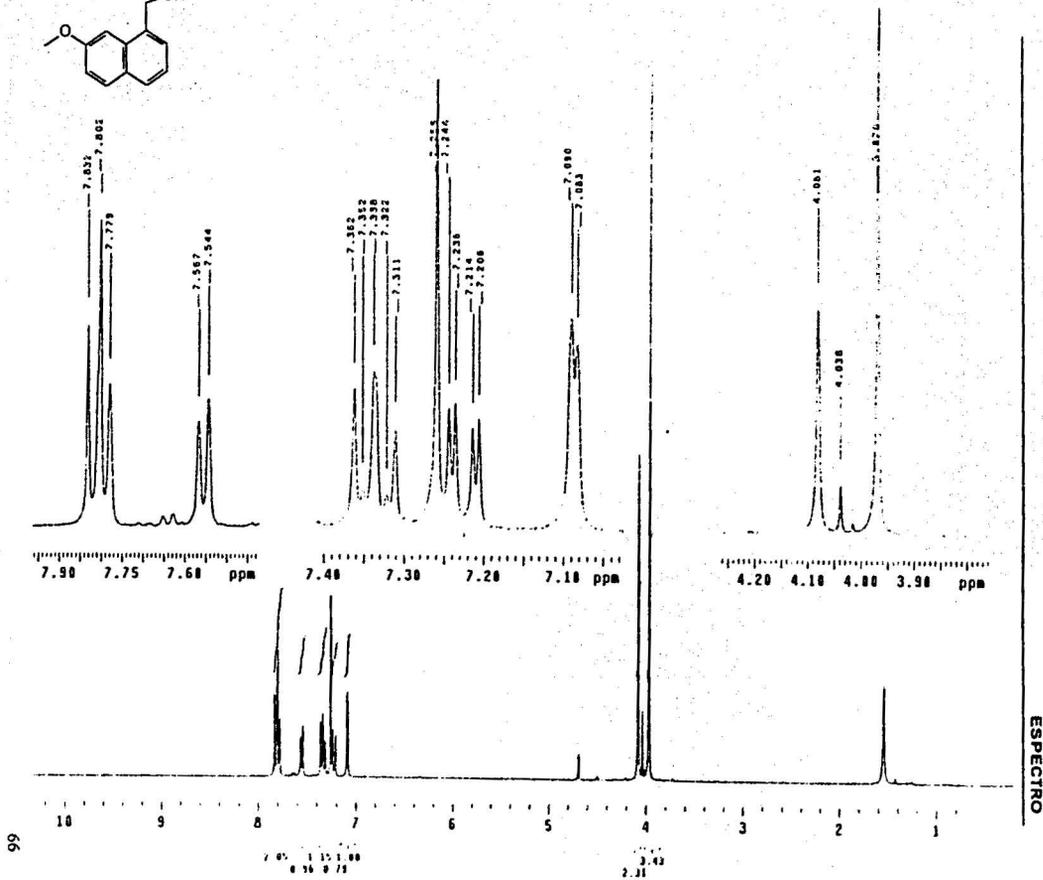
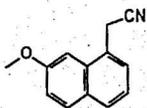


ESPECTRO DE EM (N<sub>0</sub>14) (E)-(7-metoxi-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ilideno) acetoniitrilo  
(Z)-(7-metoxi-3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ilideno) acetoniitrilo

ESPECTRO DE IR (N.º 15) (7-Metoxi-1-naftil) acetonitrilo (5)

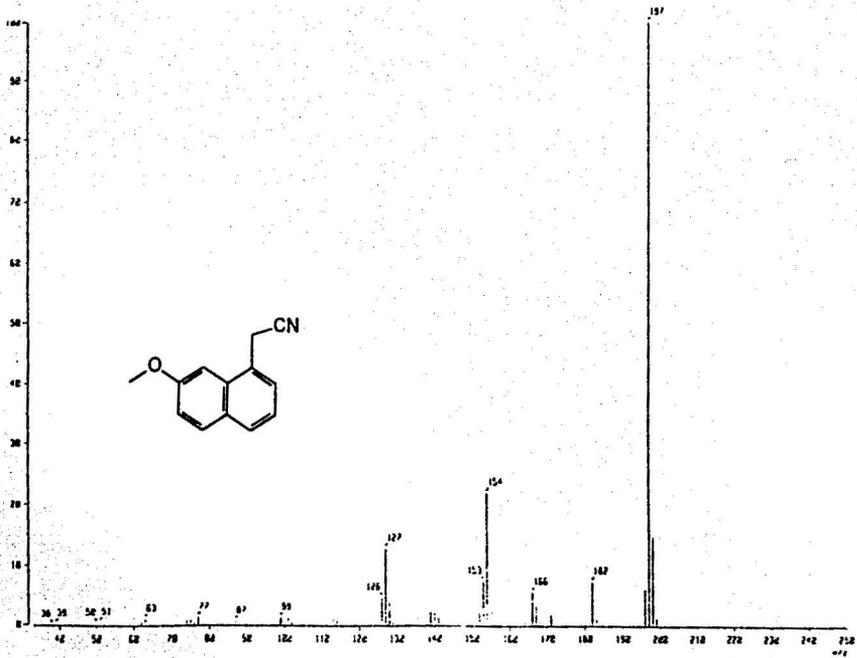


ESPECTRO



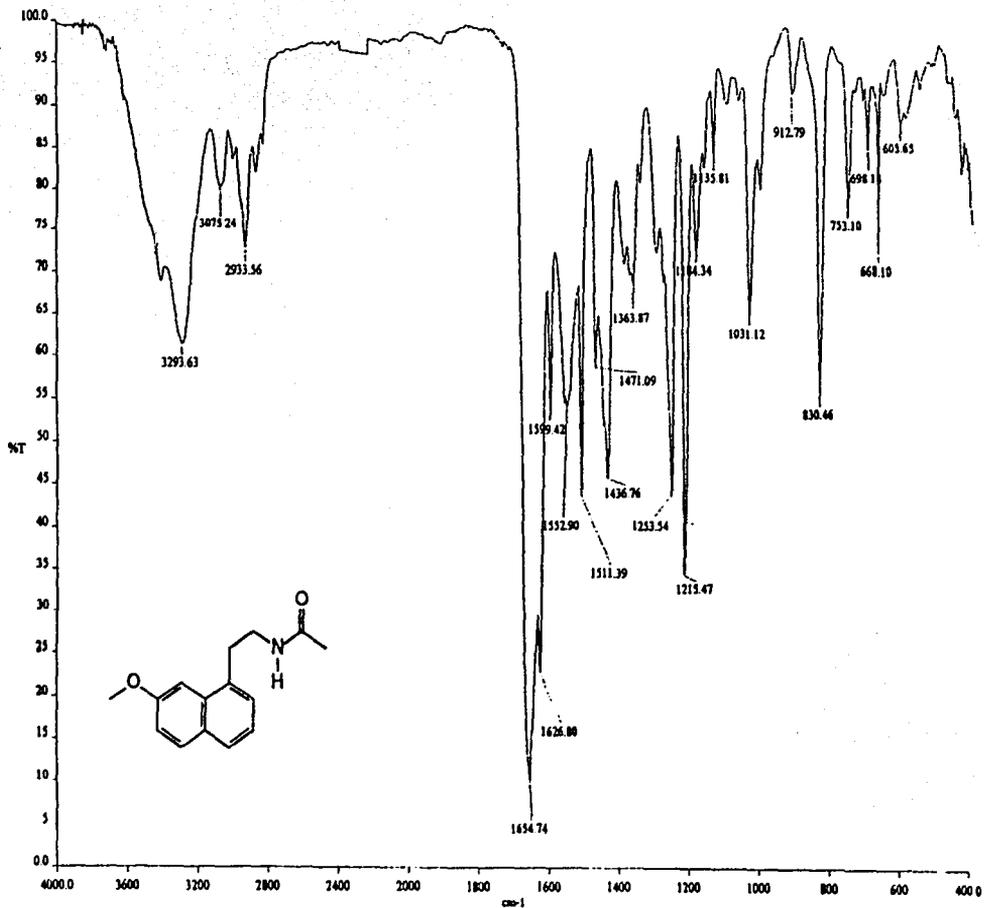
ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H (No 16) (7-Metoxi-1-naftil) acetonitrilo (5)

ESPECTRO



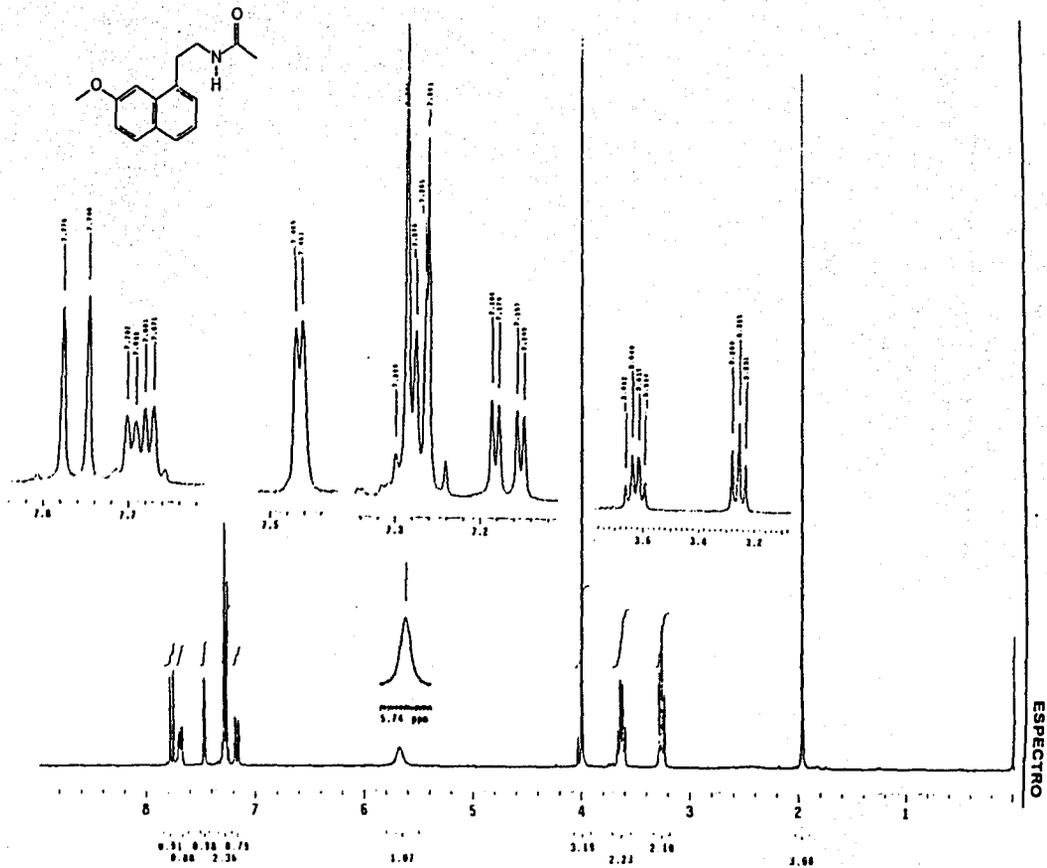
ESPECTRO DE EM (No.17) (7-Metoxi-1-naftil) acetonitrilo (5)

ESPECTRO DE IR (N.º18) N-[2-(7-metoxi-1-naftil)etil]acetamida (6)



ESPECTRO

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA



ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H (No19) N-(2-(7-metoxi-1-naftil)etil)acetamida (6)