
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA**

TESIS

SÍNTESIS DE 1-CINAMOIL DERIVADOS DE MELATONINA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

TREJO MUÑOZ CYNTHIA RAQUEL

MÉXICO, D.F.

AÑO 2007



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Alfonso Sebastián Lira Rocha
Vocal	Prof. Francisco Hernández Luis
Secretario	Prof. Lino Joel Reyes Trejo
1er. Suplente	Prof. Héctor García Ortega
2º. Suplente	Prof. Ernesto Sánchez Mendoza

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Edificio E, laboratorio 121,
Facultad de Química, UNAM.

Asesor:

Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha _____

Sustentante:

Cynthia Raquel Trejo Muñoz _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alfonso Lira Rocha por la oportunidad, el apoyo y orientación que me brindó durante la realización de esta tesis.

A mis queridos papás por su apoyo, sin el cual no hubiese logrado llegar hasta este punto de mi vida.

A mis hermanitos Lucero, Brenda y Osvaldo que me dieron ánimo cuando fue necesario.

A mis amigas Berenice, Victoria, Diana y Elizabeth, por el tiempo valioso que compartieron conmigo.

A Francisco por su amistad y paciencia.

A la UNAM, por brindarnos a los estudiantes la oportunidad de crecer en sentido académico.

Al personal académico de la USAI por la realización de los espectros de IR, RMN¹H y EM.

Y a mi misma, por cumplir uno de los objetivos más importantes en mi vida.

Índice de contenidos

	Página
1.0 INTRODUCCIÓN	1
2.0 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Melatonina.....	3
2.2 Biosíntesis, metabolismo y regulación de la melatonina.....	3
2.3 Receptores de melatonina.....	7
2.4 Acción de la melatonina en la reducción del estrés oxidativo.....	9
2.5 Melatonina en la inmunidad y el envejecimiento.....	10
2.6 Melatonina y el sistema circadiano.....	11
2.7 Melatonina y el sueño.....	12
2.8 Melatonina, maduración sexual y reproducción.....	13
2.9 Melatonina como una sustancia oncoestática.....	14
2.10 Melatonina y depresión.....	14
2.11 Relación estructura-actividad.....	15
2.12 Estudios sobre análogos de melatonina.....	15
2.13 Ácido cinámico, generalidades.....	16
2.14 Reacción de Knoevenagel	17
3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
4.0 HIPÓTESIS.....	20
5.0 OBJETIVO	21
6.0 PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.....	22
7.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	32
8.0 CONCLUSIONES.....	36
9.0 BIBLIOGRAFÍA.....	37
10.0 APENDICE.....	38

Lista de figuras

Figura 1. Inervación de la glándula pineal.....	4
Figura 2. Biosíntesis de la melatonina.....	5
Figura 3. Metabolismo de la melatonina.....	5
Figura 4. Vías de acción principales de la melatonina.....	7
Figura 5. Acciones mayoritarias de la melatonina.....	10
Figura 6. Estructura de la melatonina y sus principales sitios farmacofóricos.....	15
Figura 7. Síntesis del ácido cinámico.....	18
Figura 8. Síntesis de derivados del ácido cinámico.....	23
Figura 9. Síntesis de cloruros de cinamoilo.....	25
Figura 10. Síntesis de los derivados 1-N cinamoil sustituidos de la melatonina.....	26
Figura 11. Patrón de fragmentación principal de los análogos de melatonina sintetizados.....	34

Lista de Tablas

Tabla 1. Análogos de melatonina a sintetizar.....	21
Tabla 2. Sistemas de elución empleados	23
Tabla 3. Resultados de los compuestos i-vi.....	24
Tabla 4. Resultados de los compuestos vi- xi.....	26
Tablas 5-10: Señales de RMN ¹ H de los intermediarios obtenidos.....	31 y 32
Tabla 11. Desplazamientos de las señales comunes de los compuestos obtenidos.....	32
Tabla 12. Principales fragmentos de los espectros de masas de los compuestos sintetizados.....	34
Tabla 13. Bandas principales de los grupos funcionales importantes de los compuestos sintetizados.....	36
Tabla 14. Compuestos obtenidos.....	37

Lista de espectros

RMN ¹ H del ácido cinámico.....	40
RMN ¹ H del ácido p-nitrocínámico.....	41
RMN ¹ H del ácido p-fluorocínámico.....	42
RMN ¹ H del ácido p-metilcínámico.....	41
RMN ¹ H del ácido m-metoxicínámico.....	42
RMN ¹ H del ácido p-cianocínámico.....	43
IR del compuesto M1D.....	44
EM del compuesto M1D.....	45
RMN ¹ H del compuesto M1D.....	46
IR del compuesto M2D.....	47
EM del compuesto M2D.....	48
RMN ¹ H del compuesto M2D.....	49
IR del compuesto M3D.....	49
EM del compuesto M3D.....	50
RMN ¹ H del compuesto M3D.....	51
IR del compuesto M4D.....	52
EM del compuesto M4D.....	53
RMN ¹ H del compuesto M4D.....	54
IR del compuesto M5D.....	55
EM del compuesto M5D.....	56
RMN ¹ H del compuesto M5D.....	57
IR del compuesto M6D.....	58
EM del compuesto M6D.....	59
RMN ¹ H del compuesto M6D.....	60

1.0 INTRODUCCIÓN

La Melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina, MLT) es una neurohormona secretada principalmente por la glándula pineal, siguiendo un ritmo circadiano. Desde su descubrimiento y caracterización por Lerner en tejido de células pineales bovinas²⁵, se le han adjudicado muchas acciones fisiológicas, como es la regulación de ritmos circadianos y estacionales¹⁰, funciones inmunológicas⁹, la fisiología retinal, como inductor del sueño en humanos¹¹, como un sincronizador feto-maternal y como regulador de funciones endócrinas, neurofisiológicas y conductuales en vertebrados¹⁸. También se han propuesto diferentes aplicaciones terapéuticas para esta hormona y sus derivados, como la regulación de las alteraciones de ritmos circadianos y del sueño como el jet-lag, ciclo del sueño-vigilia, desordenes estacionales y depresión invernal; en patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, así como su aplicación como agente anticancerígeno¹⁸.

Además del secuestro de radicales libres y de sus propiedades antioxidantes⁸, la melatonina ejerce muchas de sus acciones activando receptores de alta afinidad acoplados a proteínas G, localizados en el Sistema Nervioso Central y en los tejidos periféricos. Hasta ahora se conocen tres subtipos de receptores de melatonina, dos de los cuales (MT₁ y MT₂)⁶ se encuentran, principalmente, en mamíferos, el otro sitio de unión, MT₃, ha sido recientemente caracterizado como un homólogo de la enzima humana quinona reductasa 2, también localizada en mamíferos.¹⁶

La importancia fisiológica y el potencial terapéutico de esta hormona y sus derivados han llevado a la investigación de los requerimientos farmacofóricos para la unión y activación del receptor de melatonina con el propósito de desarrollar agonistas y antagonistas selectivos de MT₁ y MT₂. Los modelos teóricos propuestos concuerdan en que el grupo 5-metoxilo, el grupo acetamido y el anillo indólico son esenciales en la interacción ligando-receptor.⁷ La interacción entre el anillo indólico de la melatonina y los residuos de los aminoácidos de los receptores propuesta por diversos grupos de investigación condujo a la investigación de Lira y colaboradores¹⁹, en la que se incorporaron diversos sustituyentes en la posición 1 del anillo indólico de la melatonina, observándose que dicha variación afectaba sensiblemente la actividad

biológica comparada con la actividad de melatonina, por lo que, siguiendo esta línea de investigación, en el presente trabajo se propone la síntesis de análogos de melatonina, a los cuales se les incorporará un grupo cinamato en la posición 1 del anillo indólico, lo que a su vez cambiará las propiedades electrónicas del anillo indólico y en consecuencia se espera que modifique la actividad biológica.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 Melatonina

La melatonina se encuentra comúnmente en la naturaleza, ha sido identificada en la mayoría de las taxa de los organismos (incluyendo bacterias, eucariontes unicelulares y en macroalgae), en diferentes partes de plantas y en especies vertebradas e invertebradas. En 1959, Lerner y colaboradores²⁵ aislaron y caracterizaron la melatonina a partir del tejido pineal bovino. Este descubrimiento dio lugar a diversos estudios los cuales han demostrado la participación de la melatonina en diversos procesos fisiológicos como son la regulación de los ritmos circadianos y estacionales, las funciones inmunológicas, la fisiología retinal, las respuestas cardiovasculares, y la modulación del inicio de la respuesta neuronal.

La melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona derivada del triptófano, secretada y sintetizada principalmente por la glándula pineal en vertebrados, siguiendo un marcado ciclo circadiano generado por un reloj o marcapasos interno situado en el hipotálamo, que es el núcleo supraquiasmático (SCN), el cual está sincronizado con el ciclo luz-oscuridad durante las 24 horas del día, siendo las concentraciones de melatonina en la pineal más altas por la noche que durante el día, en la mayoría de las especies examinadas.³ Aunque este no es el único órgano capaz de sintetizarla, su producción en la retina esta bien documentada y hay evidencia de su formación en el ovario, iris, el tracto gastrointestinal, piel, linfocitos y plaquetas. Algunas células y fluidos humanos contienen altos niveles de melatonina, como las células de la médula ósea que contienen concentraciones más altas que aquellas encontradas en el suero; esto también se ha observado en los fluidos cerebroespinales y en la bilis, sin embargo, la glándula pineal y la retina siguen siendo los sitios primarios de producción de melatonina.¹⁸

2.2 Biosíntesis, metabolismo y regulación de la melatonina

La glándula pineal se encuentra en el centro del Sistema Nervioso Central de mamíferos y es muy similar, morfológicamente hablando, a otras estructuras como la retina y el hipotálamo.² En principio esto coincide con el hecho de que

las células fotorreceptoras primitivas de este órgano se transformaron en células secretoras en la etapa final de la evolución de los vertebrados.¹ En el cerebro humano, la glándula pineal está localizada en la superficie dorsal del hipotálamo, ocupando una posición central entre los dos hemisferios cerebrales (Figura 1). El tejido altamente vascularizado de la glándula pineal está formado por dos tipos de células: los pinealocitos y las neuroglías. En los humanos los pinealocitos son más predominantes y son los responsables de la producción de melatonina y de péptidos como arginina-vasotocina.⁴

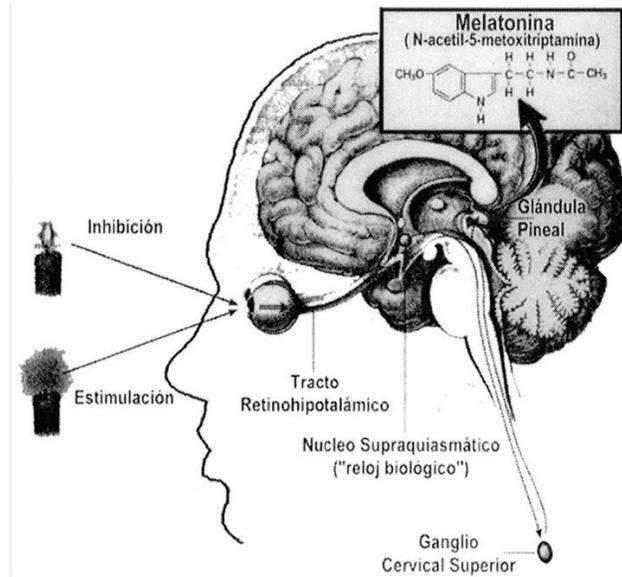


Figura 1. Inervación de la glándula pineal¹⁴

La melatonina es una indolamina con características estructurales similares a la serotonina. La 5-Hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) es convertida a melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) vía reacciones de acetilación y metilación catalizadas por la *N*-acetil transferasa (NAT) y 5-hidroxiindol-*O*-metil transferasa (HIOMT), respectivamente.⁴ El sustrato inicial de la síntesis de indolaminas como la melatonina es el aminoácido triptófano, el cual es convertido a serotonina (Fig 2).³

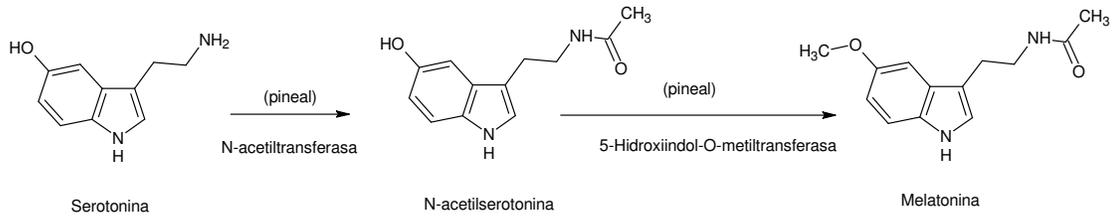


Figura 2. Biosíntesis de la melatonina. La serotonina (5-HT) proviene del aminoácido triptófano que es captado por los pinealocitos; la acetilación de la serotonina, catalizada por la NAT, genera la N-acetilserotonina, y la metilación de esta última, catalizada por la HIOMT, por transferencia del grupo metilo activo de la 5-adenosil metionina al grupo hidróxilo de la posición 5 del núcleo indólico, genera la N-acetil-5-metoxitriptamina (MLT).¹⁷

Tanto en el pinealocito como en el fotorreceptor retinal se lleva a cabo una misma ruta biosintética. La luz estimula la retina del ojo, la cual manda impulsos por dos vías para alterar la secreción pineal (Fig 4). Una de estas vías es la vía retinohipotalámica que estimula el SCN, el cual a su vez opera a través del tallo cerebral y la medula espinal para reducir la actividad de las fibras simpáticas viajando a través del ganglio cervical superior (SCG) hacia el pinealocito de la glándula pineal. Normalmente, estas fibras postganglionares liberan norepinefrina (NE), la cual incrementa el AMPc (3,5-monofosfato de adenosina cíclico) en los pinealocitos. El AMPc elevado está asociado con el incremento de la actividad de NAT y por lo tanto con la síntesis de la melatonina.³ Al aumentar las concentraciones de melatonina en la glándula pineal, la hormona difunde en forma pasiva hacia el fluido cerebroespinal y a la circulación.⁵

La mayoría de la melatonina circulante es excretada a la orina en forma de compuestos sulfatados como el catabolito 6-sulfatoximelatonina (6-SMT) que resulta de su catabolización en el hígado por la citocromo P₄₅₀ monooxigenasa, solo una pequeña porción es eliminada en forma libre (Fig. 3).¹³

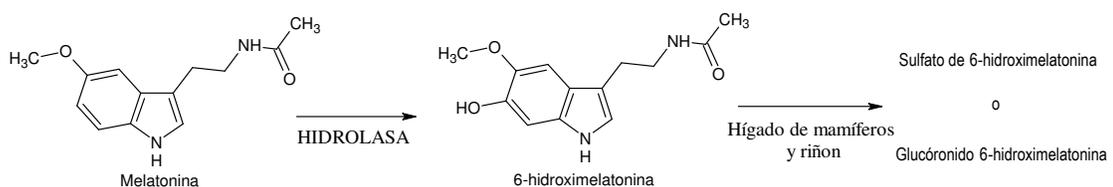


Figura 3. Metabolismo de la melatonina. La melatonina circulante es metabolizada principalmente en el hígado, donde es primero hidroxilada en la posición C6 por la citocromo P₄₅₀ monooxigenasa, y por lo tanto conjugada con el sulfato para ser excretada como sulfato de 6-hidroximelatonina, la conjugación del glucónido es limitada.¹⁸

El metabolismo en tejidos extrahepáticos es muy diferente. Los tejidos de origen neuronal, incluyendo la glándula pineal y la retina, contienen enzimas melatonina-deacetilantes, por medio de las cuales la melatonina puede ser deacetilada a 5-metoxitriptamina en cualquier tejido que las contenga. La melatonina puede ser metabolizada no enzimáticamente en todas las células y también extracelularmente por radicales libres y algunos otros agentes oxidantes. La melatonina se convierte en 3-hidroximelatonina cíclica cuando secuestra directamente dos radicales hidroxilo. En el cerebro una fracción de melatonina es metabolizada a derivados de cinuraminas como N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxicinuramina (AFMK) y N^1 -acetil-5-metoxicinuramina (AMK). AFMK es producido por numerosos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

En los mamíferos, la regulación de la biosíntesis de la melatonina pineal está mediada por el tracto retinohipotalámico, el cual se proyecta desde la retina hasta el SCN.¹⁸ La luz brillante sobre la retina reduce los niveles de AMPc, la actividad de NAT, y la síntesis de la melatonina por medio de esta vía. La actividad de HIOMT también es reducida ligeramente por la exposición a la luz.

Las lesiones en la vía retinohipotalámica o en el SCN no necesariamente eliminan los ritmos pineales de secreción. Una segunda vía ha sido descubierta entre la retina y el tallo cerebral que viaja a través del tracto óptico inferior (Fig. 4). Sin embargo aún no existe una explicación exacta para esta vía.³

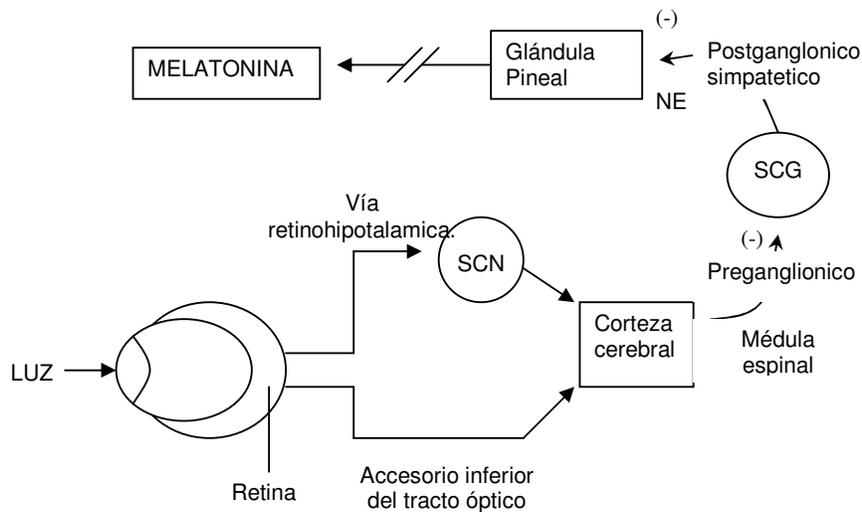


Figura 4. La luz recibida en la retina inhibe la función pineal por medio de dos vías principales, ambos alcanzan la glándula pineal a través del ganglio superior cervical (SCG) del sistema simpático. La poca secreción de norepinefrina (NE) por las neuronas del sistema postganglionar reduce la formación del AMPc y causa una marcada reducción en la actividad de la *N*-acetiltransferasa (NAT), la enzima limitante en la síntesis de melatonina.²

La síntesis de melatonina en la glándula pineal también es influida por neuropéptidos, como los péptidos vasoactivo intestinales, el péptido activante de la adenil ciclasa pituitaria y el neuropéptido Y, el cual es parcialmente coliberado y parece potenciar la respuesta de NE.¹⁸

2.3 Receptores de melatonina

Los receptores MT₁ y MT₂ pertenecen a la clase A de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), en tejidos nativos se encuentran acoplados a la inhibición del AMPc, inclusive si otras vías de transducción de señales están también moduladas por su activación. Los receptores humanos MT₁ y MT₂ fueron clonados a mediados de 1990; estos tienen una secuencia de 350-362 aminoácidos con aproximadamente 60% de homología. Estos receptores están caracterizados con los rasgos comunes de los GPCR.⁶

La mutagénesis directa del sitio y los receptores quiméricos se han empleado para investigar la relación estructura-actividad para los receptores MT₁ y MT₂. Desafortunadamente, no se ha obtenido información clara acerca de los aminoácidos esenciales para la unión del ligando. La información más relevante que se ha obtenido es que en ambos receptores MT₁ y MT₂, la

sustitución de un residuo de histidina en el α hélice transmembranal (TM) TM5 (His 195 en MT₁ e His 208 en MT₂) disminuyó la afinidad de unión de cuatro a ocho veces para los ligandos con un sustituyente metoxilo mientras que la potencia de los compuestos sin el grupo metoxilo fue ligeramente incrementada o no influenciada.

Los residuos de Ser 110 y Ser 114 en TM3 del receptor MT₁, parecen estar involucrados en la unión de agonistas solamente, ya que su mutación no afectó la afinidad por el antagonista luzindol. La respuesta del receptor quimérico reportado en TM6 ha sido identificado como la más relevante para la unión de melatonina.⁶

Los receptores de melatonina MT₁ median un número de respuestas funcionales en mamíferos, incluyendo la liberación de dopamina de la retina, la potenciación de la contracción inducida por la norepinefrina en las arterias y la inhibición de la formación de AMPc en el *pars tuberalis*.¹² Las acciones fisiológicas de los receptores MT₂, encontrados en el núcleo supraquiasmático hipotalámico y en la retina neuronal, se cree que regulan los efectos de la melatonina en los ritmos circadianos, inhiben la liberación de dopamina en la retina, inducen vasodilatación, favorecen la proliferación de esplenocitos e inhiben la actividad de los leucocitos en la microvasculatura.¹⁶

Además de estos dos receptores se ha encontrado, recientemente, otro sitio de unión de melatonina que presenta una menor afinidad. Este sitio de unión ha sido denominado MT₃, el cual es una quinona reductasa de tipo II (QR₂). Su presencia ha sido reportada principalmente en tejidos centrales y periféricos de hámster, pero también se expresa en ratones, ratas, conejos, pollos, puercos, perros y monos.¹⁵ La activación de este receptor reduce la presión intraocular e inhibe la adhesión de leucocitos inducida por leucotrieno B₄.¹⁶

La melatonina también se une con relevancia, pero con menor afinidad a la calmodulina, así como a receptores nucleares de la familia de receptores de ácido retinóico.¹⁸

2.4 Acción de la melatonina en la reducción del estrés oxidativo

La melatonina fue caracterizada como un secuestrador directo de radicales libres hace menos de 10 años.⁸ Tiene la habilidad para neutralizar directamente un número de radicales libres y especies activas del nitrógeno. En términos de secuestro directo de radicales libres, la melatonina interactúa con el altamente tóxico radical hidróxilo (*OH) con una velocidad constante equivalente a aquella mostrada por otros secuestradores de radicales hidróxilo altamente eficientes. Además, se ha reportado varias veces a la melatonina como neutralizante de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno singulete (¹O₂), el anión peróxinitrilo (ONOO⁻), el óxido nítrico (NO*) y el ácido hipocloroso (HOCl). También se ha encontrado que la melatonina estimula varias enzimas antioxidativas las cuales incrementan su eficiencia como agente antioxidante, estas enzimas son: la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peróxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GRd) y la óxido nítrico síntasa (NOS).^{8,18}

La melatonina también ha sido usada ampliamente como un agente protector contra una gran variedad de procesos y agentes que dañan los tejidos vía mecanismos de radicales libres.⁸

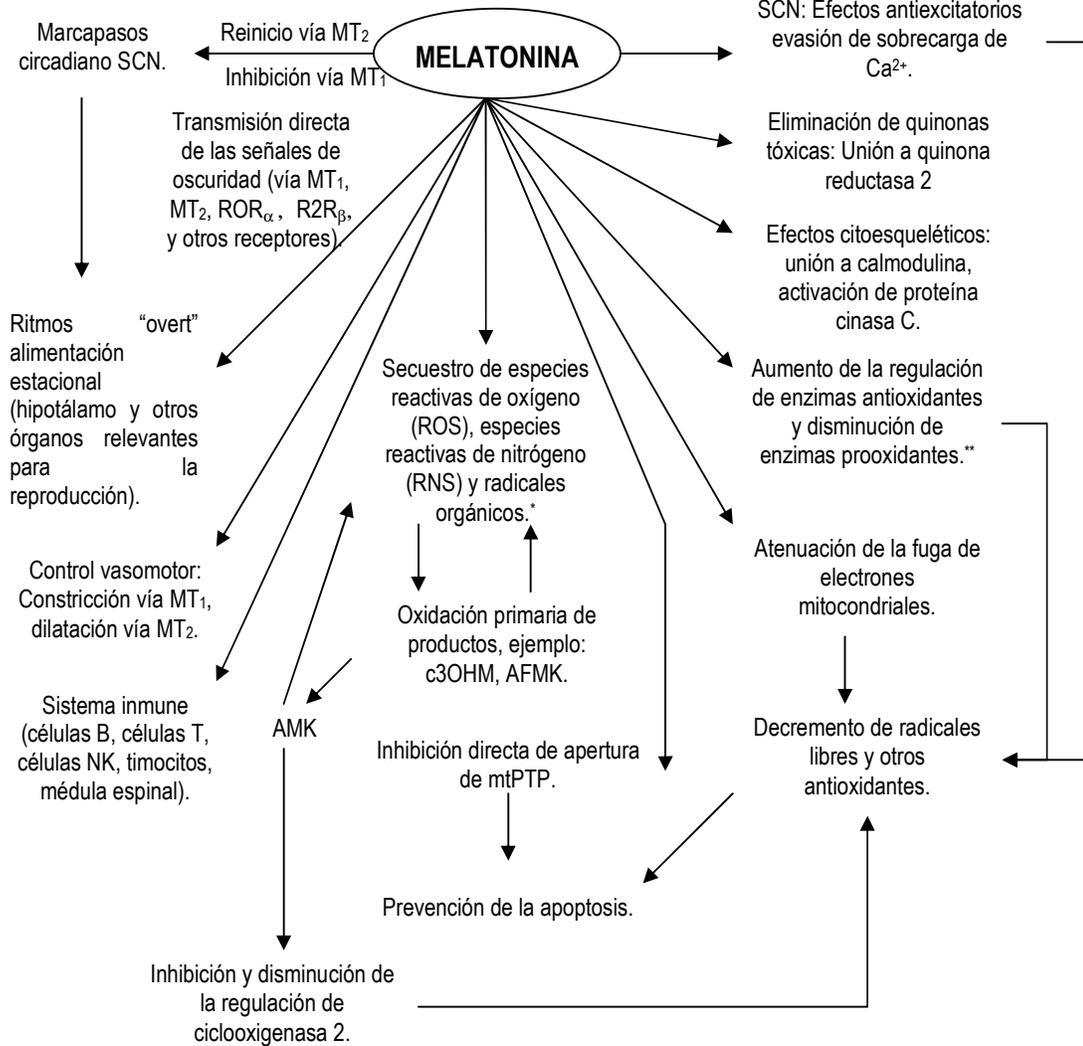


Figura 5. La pleiotropía de la melatonina: una revisión de varias acciones mayoritarias. AFMK, N¹-acetil-N²-formil-5-metoxicinuramina; AMK, N¹-acetil-5-metoxicinuramina; c3OHM, 3-hidroximelatonina cíclica; MT1, MT2, receptores de membrana de melatonina (1 y 2); mtPTP, poro de permeabilidad de transición mitocondrial; ROR α R2R β , receptores nucleares de la superfamilia de receptores del ácido retinoico. * Varias especies reactivas de oxígeno (ROS) secuestradas por melatonina: \cdot NO, \cdot NO₂ (en conjunto con \cdot OH o CO₃⁻), tal vez peroxinitrito (ONOO⁻); radicales orgánicos secuestrados por melatonina: radicales cationicos de protoporfirino, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenciltiazolona)-6-sulfónico (ABTS), radicales cationicos, radicales sustituidos antranilicos, algunos radicales peróxido; secuestro de radicales por c3OHM, AFMK y AMK. ** Incremento de la regulación de enzimas antioxidantes por melatonina.¹⁸

2.5 Melatonina en la inmunidad y el envejecimiento

El decaimiento asociado al envejecimiento de la función inmune, conocido como inmunosenescencia, se caracteriza por una disminución en la actividad funcional de las células NK (natural killer), granulocitos y macrófagos. Existe una reducción importante en la interleucina-1 (IL-1) y disminuye la generación

de especies reactivas del oxígeno (ROS) a partir de los monocitos. Además existe un incremento en la producción de IL-6. El envejecimiento también está asociado con los cambios en la inmunidad celular y humoral. El decremento de los complejos de proteínas de membrana de las células T: CD3 y CD4 así como el incremento de CD-8 ocurren en personas ancianas. El decremento de la producción de IL-2 que ocurre durante el envejecimiento causa una reducción en la formación de anticuerpos. La melatonina parece jugar un papel importante en la inmunomodulación. La melatonina induce tanto la inmunidad innata como la celular. Estimula la producción de células progenitoras, de granulocitos, de macrófagos y de células NK. La producción de IL-2, IL-6 e IL-12 es estimulada por melatonina. El incremento de la producción de células T-ayudadoras, particularmente de células CD4+, ocurre después de la administración de la melatonina, también se observa una disminución de las células T citotóxicas CD8+.⁹

La regulación de funciones inmunitarias por la melatonina parece involucrar la transducción de la señal de AMPc, canales tipo L de Ca²⁺ y glutatión. Los cambios estacionales en la función inmune observados tanto en humanos como en animales parecen estar mediados por los cambios en la duración de la secreción de melatonina. Por lo tanto tiene un valor terapéutico, ya que favorece la respuesta inmunológica en las personas ancianas y en los pacientes con un estado inmunocomprometido.⁹

2.6 Melatonina y el sistema circadiano

La melatonina producida en la glándula pineal es considerada como una manecilla neuroendocrina del reloj circadiano. A través de los dos subreceptores (MT₁ y MT₂), la melatonina provee un ciclo de retroalimentación del reloj circadiano en el núcleo supraquiásmico (SCN) y puede sincronizar los osciladores periféricos con el reloj central circadiano en el SCN. Al parecer la melatonina no produce efectos por si sola, sino a través de interacciones con otras sustancias neuroactivas. En el SCN, la melatonina interactúa con el Péptido Activador de la Adenil Ciclasa Pituitaria (PACAP), un neuropéptido del tracto retinohipotálamico, y suprime la fosforilación inducida por éste.¹⁰ En la pars tuberalis hipofisial (PT), la señal de la melatonina es esencial para inducir/mantener la expresión rítmica de los genes del reloj al interactuar con

la señalización de adenosina. De particular interés, parece que la melatonina puede ser eficaz en la reducción del estrés pero este potencial necesita ser explorado con estudios adicionales. Esto puede ser mediado a través de SCN, ya que se encontró que la melatonina atenúa el estrés inducido por la luz en ratones, vía una acción a nivel del SCN. Además, la capacidad reductora de estrés de la melatonina puede estar basada en su impacto directo en la corteza adrenal.¹⁰

2.7 Melatonina y el sueño

El sueño es un proceso neuroquímico organizado que involucra la promoción del sueño y los centros excitatorios en el cerebro. El sueño esta regulado principalmente por la necesidad de dormir y la hora del día. La interacción entre estos procesos forman la base de episodios remarcablemente estandarizados de sueño y de vigilia mientras se mantienen estables los niveles de la función neurocompartamental durante el día.¹¹

Debido a que el tiempo de vida media de la melatonina en el suero es de 40-50 minutos, su concentración circulante disminuye durante las horas de luz. Consecuentemente el “dim Light melatonin onset” (DMLO) el cual es el surgimiento inicial en la liberación de melatonina en la parte temprana de la noche bajo condiciones bajas de luz, es una medida consistente y confiable de la fase intrínseca circadiana.¹¹

Además la melatonina sirve como un señal del tiempo (señal de oscuridad) para varios órganos incluyendo el SCN por si mismo, y por lo tanto es capaz de acortar la fase del reloj circadiano endógeno y, en ausencia de luz, determinar los ritmos del sueño-vigilia y neuroendocrino.¹¹

La melatonina es un importante regulador fisiológico del sueño. Por lo tanto, el agudo incremento en el sueño por la noche ocurre 2 h después del inicio de la producción de melatonina endógena en humanos. La administración de melatonina durante el día resulta en la inducción de la fatiga (sentimiento de debilidad, cansancio, o falta de energía) y adormecimiento en humanos.¹¹

Los efectos benéficos de la melatonina en el mejoramiento del sueño por la noche han sido reportados, particularmente, en los pacientes ancianos con insomnio quienes no producen suficientes cantidades de esta hormona. Parece

ser que la melatonina actúa en las regiones del cerebro relacionadas con la regulación del sueño-vigilia, particularmente en el SNC.¹¹

2.8 Melatonina, maduración sexual y reproducción

La duración del episodio de secreción nocturna de melatonina aumenta con la duración de la noche, por lo tanto provee un calendario interno que regula los ciclos estacionales en la reproducción y en otras funciones de especies fotoperiódicas. El papel de la glándula pineal en la reproducción humana fue inicialmente propuesto en base a observaciones clínicas sobre los efectos de los tumores pineales en el desarrollo sexual. Datos más recientes muestran una asociación entre los niveles de melatonina endógena y el comienzo de la pubertad, así como la observación de los niveles elevados de melatonina tanto en hombres como en mujeres con hipogonadismo y/o infertilidad son consistentes con esta hipótesis.¹⁷

Evidencia reciente ha demostrado que la melatonina regula la función reproductiva por su acción inhibitoria a varios niveles del eje hipotálamo-pituitaria-gónadal. La secreción rítmica de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), a partir de un pequeño número de neuronas en el hipotálamo, controla la secreción de la hormona luteinizante y la hormona folículo-estimulante que regulan a su vez la actividad funcional de las gónadas.¹⁸

La melatonina ha demostrado ser un inhibidor de la expresión del gen que codifica para GnRH a nivel de RNA, al actuar sobre los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ acoplados a proteínas G, así como a otros receptores nucleares “huérfanos”.¹⁸

La melatonina ha sido implicada en la maduración sexual, ejerce un efecto inhibitorio en el hipotálamo y en la maduración de la pubertad. La disminución de melatonina en el suero debajo de cierto nivel (aprox. 115pg/mL) puede ser la señal que activa la secreción pulsátil de GnRH y en consecuencia el comienzo de los cambios en la pubertad. La liberación de la hormona luteinizante y la hormona folículo-estimulante son cruciales para los cambios en

la pubertad y por lo tanto la disminución de la concentración de la melatonina debajo de cierto valor es muy importante para el comienzo de la pubertad.

La demostración de que existen receptores de melatonina en los órganos sexuales, y la localización de receptores de hormonas sexuales en la glándula pineal soportan la teoría de que la melatonina juega un papel importante en las reproducción y maduración sexual.¹⁸

2.9 Melatonina como una sustancia oncoestática

Existe una evidencia de que la iniciación de tumores, la promoción y/o la progresión de los mismos puede ser detenida por la liberación nocturna de la melatonina en la sangre o en los tejidos extracelulares. También se ha demostrado que la melatonina inhibe el crecimiento de cáncer de mama causado por estrógeno al modular la vía de señalización del estrógeno de las células. Otro efecto antitumoral de la melatonina, parece ser el resultado de la inhibición dependiente de MT_1/MT_2 de la recaptura de ácidos grasos, en particular del ácido linoleico, lo cual previene la formación de su metabolito mitógeno, el ácido 1,3-hidroxiocetadecadienoico.

En varios estudios, la melatonina ha demostrado efectos oncoestáticos contra una variedad de células tumorales, incluyendo las líneas celulares de los carcinomas ováricos, carcinomas endometriales, células tumorales próstáticas, células humanas de melanoma y tumores intestinales. La melatonina no solo ha mostrado beneficios concernientes a la progresión de tumores, si no que también provee beneficios subjetivos e incrementa la calidad de vida de los pacientes con linfocitopenia asociada con los regimenes terapéuticos antitumorales.

En términos de reducción de mutagénesis, las acciones anticarcinógenicas de la melatonina son principalmente atribuidas a su actividad secuestrante de radicales libres y a su actividad como antioxidante.¹⁸

2.10 Melatonina y depresión

En muchos estudios de pacientes con trastornos de ánimo se ha encontrado que existe un nivel bajo de melatonina. La cantidades bajas de

melatonina es una característica importante en desordenes depresivos. Estos niveles bajos de melatonina han sido descritos como “rasgos marcadores” para la depresión. Sin embargo, los tratamientos con melatonina (3 mg) aumentaron significativamente el sueño, pero no mejoraron el estado clínico de los pacientes con depresión. Por otro lado, se encontró que un análogo de la melatonina como la agomelatina, un agonista de los receptores MT_1/MT_2 de melatonina y un antagonista selectivo de los receptores de $5-HT_{2C}$, es activo en muchos modelos animales de depresión.¹⁸

2.11 Relación estructura-actividad

Estudios recientes de relación estructura-actividad, SAR (structure-activity-relationship), han evidenciado que tanto el grupo 5-metoxilo como la cadena lateral acetilamidoetilo en la posición 3 del anillo indólico de melatonina, son importantes para la unión con alta afinidad a los receptores y que la distancia espacial relativa entre estos grupos es también un factor importante. Sin embargo, la cadena lateral de melatonina tiene un alto grado de flexibilidad, lo cual lleva a cierta incertidumbre del modo de interacción con el receptor.⁷ También se ha demostrado que el anillo indólico coadyuva a la fijación al sitio receptor.

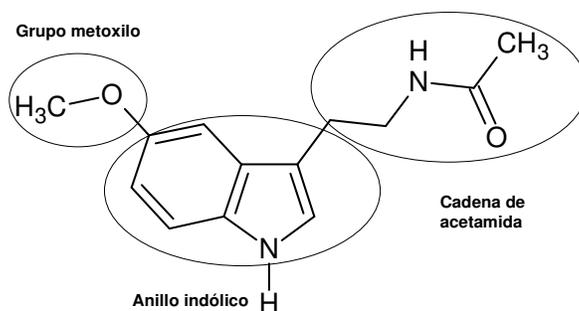


Figura 6. Estructura de la melatonina y sus principales sitios farmacofóricos.

2.12 Estudios de análogos de la melatonina

Se han realizado muchos estudios acerca de cómo se une la melatonina a sus sitios receptores empleando diferentes análogos de la melatonina,

obtenidos al modificar tanto el anillo indólico, el grupo 5-metoxilo y la cadena lateral del grupo acetamida.

Uno de estos estudios fue llevado a cabo por Lira y colaboradores.¹⁹ Las investigaciones realizadas se basaron en las propiedades electrónicas de diversos derivados de melatonina y su relación con la actividad biológica, en particular su afinidad por los diferentes sitios receptores. Las modificaciones que realizaron sobre el núcleo indólico indicaron que existen tres zonas con alta densidad de carga; una localizada sobre el grupo 5-metoxilo, otra sobre el átomo de oxígeno del grupo acetamido y una tercera que involucra al anillo indólico. Al incorporar los sustituyentes: bencilo, benzoilo y fenilo sustituidos en la posición "para" con grupos $-\text{NO}_2$, $-\text{OCH}_3$, etc., y realizar un estudio de las propiedades electrónicas de estos compuestos se observó que al incorporar sustituyentes con grupos electrodonadores se incrementaba la afinidad, concluyendo que es necesaria no solo la presencia de un grupo voluminoso, sino que la presencia de un grupo polar también es importante para la unión con los receptores, posiblemente debido a la interacción entre el grupo polar y los residuos de aminoácidos del receptor.

También se observó una interacción entre los protones del grupo metileno unido a la posición 3 del anillo indólico con los sustituyentes benzoilo, indicando una posible interacción a larga distancia entre estos.¹⁹

Considerando estas investigaciones se propone una nueva síntesis de derivados de la melatonina 1N sustituidos, seleccionando como sustituyente derivados del ácido cinámico, basados en sus propiedades electrónicas, con el fin de demostrar que el anillo aromático de los grupos cinamoilo no presenta una interacción a larga distancia en los átomos de hidrógeno presentes en el $\text{C}\beta$ unido a la posición 3 del anillo indólico.

2.13 Ácido cinámico, generalidades

Los ácidos hidróxicinámicos (AHC) y sus ésteres derivados (hidroxicinamatos) son compuestos que se encuentran altamente difundidos en la naturaleza, principalmente como agentes estructurales y funcionales en la pared celular de las plantas. Recientemente han adquirido importancia debido a sus propiedades químicas y biológicas. En los últimos 15 años ha habido un incremento considerable en la investigación de estos compuestos debido a que

son precursores de los aromas y sabores en las industrias de alimentos y fragancias, además de ser considerados componentes bioactivos de la dieta²². De las propiedades bioquímicas que se les han detectado, la actividad antioxidante se presenta como la más importante ya que se ha encontrado que está involucrada en la prevención de distintos males, tales como el envejecimiento celular, el cáncer y la arteroesclerosis, entre otros; como consecuencia de estos factores, el uso de esta clase de compuestos resulta interesante²³. Se les han adjudicado actividades antibacteriales, antifúngicas, y antiparasitarias. También son ampliamente usados en la síntesis de macromoléculas como unidades formadoras de polímeros, ya que tienen actividades muy interesantes, como alta fotorreactividad debido a la presencia, en la cadena principal o lateral, del grupo cinamoilo, el cual es bien conocido como una unidad fotorreactiva.²⁰

Para su uso en la producción de perfumes, la industria farmacéutica, la industria alimentaria y en otras aplicaciones técnicas los ácidos cinámicos son sintetizados a gran escala, una de las síntesis principales de estos ácidos es por medio de la reacción de Knoevenagel.

2.14 Reacción de Knoevenagel

La condensación de Knoevenagel es una reacción en la que intervienen aldehídos y cetonas por una parte; y por otra, sustancias con grupos metilenos activos, influenciados por la participación de bases débiles. Esta reacción puede efectuarse de diferentes maneras; el éster malónico, el éster acetilacético, el cianato de etilo u otra sustancia con un hidrógeno alfa reactivo, se condensan fácilmente con grupos carbonilos de aldehídos o cetonas en presencia de una base (dietilamina, piperidina, entre otras) y la reacción da origen a derivados etilénicos de dichos estéres.

La reacción de condensación de Knoevenagel es importante en la Química Orgánica, siendo un camino especial de la misma, la variante Doebner. En ella, el aldehído o cetona se hace reaccionar con ácido malónico en piridina, en presencia de una amina como catalizador (usualmente pirrolidina o piperidina) originando así que el diácido carboxílico insaturado se descarboxile en el momento. De esta manera se puede sintetizar fácilmente el ácido cinámico.²⁴

La hidrólisis del éster bencilidenmalónico que se forma y la pérdida de una molécula de dióxido de carbono produce el ácido cinámico, cabe mencionar que esta reacción con ácido malónico solo puede llevarse a cabo únicamente con aldehídos.²¹

La reacción en general se ilustra a continuación:

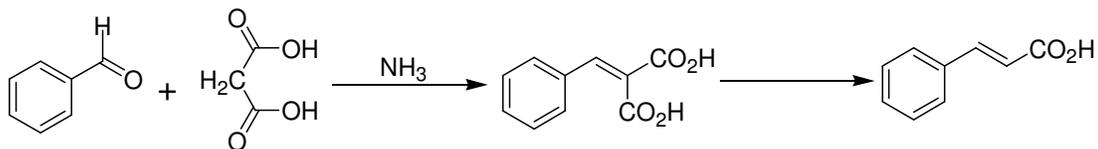


Figura 7. Síntesis del ácido cinámico.

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La melatonina y sus derivados han demostrado tener un papel muy importante en diversas actividades biológicas, además de un alto potencial terapéutico, por ello la búsqueda de análogos que actúen como antagonistas o agonistas para los receptores de melatonina (MT_1 , MT_2 , MT_3), es muy importante.

Considerando que la síntesis de análogos conformacionales de ligandos naturales es la mejor manera de investigar los átomos o conjunto de átomos causantes de la actividad biológica con el fin de mejorar las propiedades biológicas, se ha decidido aplicar este principio para realizar la búsqueda de nuevos análogos de melatonina.

En trabajos anteriores la incorporación de un grupo bezoilo a la posición 1 del anillo indólico demostró en el análisis de RMN 1H un desplazamiento a campo alto de los protones del grupo metileno unido a la posición 3 del anillo indólico de estos derivados. Esto se explicó en base a una posible interacción a larga distancia entre el anillo fenilo del grupo benzoilo y los protones mencionados.¹⁹

Por lo que se pretende demostrar con la incorporación de grupos cinamoilo, que contienen los mismos grupos pero con un doble enlace de por medio, con el fin de tener mayores grados de libertad para esta cadena y descartar la posible interacción a larga distancia, si el desplazamiento de los protones unidos al carbono β de la cadena de acetamida se ve modificado exclusivamente por esta interacción.

4.0 HIPÓTESIS

La incorporación de un grupo cinamoilo en la posición 1 del anillo indólico de la melatonina, no afectará el desplazamiento de los protones del carbono β de la cadena de acetamida, debido a que no existe una interacción a larga distancia entre estos y el grupo cinamoilo.

5.0 OBJETIVOS

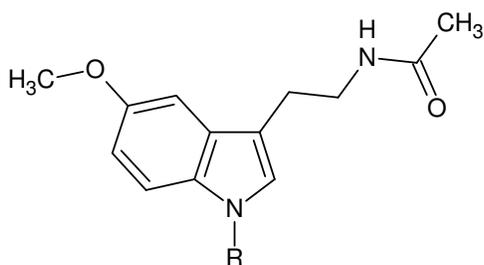
OBJETIVO GENERAL

- * Sintetizar y caracterizar análogos 1-cinamoil sustituidos de la melatonina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * Sintetizar los siguientes análogos de melatonina:

Tabla 1. Análogos de melatonina a sintetizar



Clave del compuesto	R	Nombre
M1D	-CO-CH=CH-C ₆ H ₅	<i>N</i> -(2-{5-metoxi-1-[(2 <i>E</i>)-3-fenilprop-2-enoil]-1 <i>H</i> -indol-3-il}etil)acetamida
M2D	-CO-CH=CH-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -NO ₂	<i>N</i> -(2-{5-metoxi-1-[(2 <i>E</i>)-3-(4-nitrofenil)prop-2-enoil]-1 <i>H</i> -indol-3-il}etil)acetamida
M3D	-CO-CH=CH-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -F	<i>N</i> -(2-{1-[(2 <i>E</i>)-3-(4-fluorofenil)prop-2-enoil]-5-metoxi-1 <i>H</i> -indol-3-il}etil)acetamida
M4D	-CO-CH=CH-C ₆ H ₄ - <i>m</i> -OCH ₃	<i>N</i> -(2-{1-[(2 <i>E</i>)-3-(3-metoxifenil)prop-2-enoil]-5-metoxi-1 <i>H</i> -indol-3-il}etil)acetamida
M5D	-CO-CH=CH-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃	<i>N</i> -(2-{1-[(2 <i>E</i>)-3-(4-metilfenil)prop-2-enoil]-5-metoxi-1 <i>H</i> -indol-3-il}etil)acetamida
M6D	-CO-CH=CH-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -CN	<i>N</i> -(2-{1-[(2 <i>E</i>)-3-(4-cianofenil)prop-2-enoil]-5-metoxi-1 <i>H</i> -indol-3-il}etil)acetamida

*Caracterizar los compuestos obtenidos mediante sus propiedades espectroscópicas (Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear), espectrometría de masas y sus constantes físicas.

6.0 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Reactivos y equipo

Todas las materias primas utilizadas en la síntesis se adquirieron comercialmente en grado reactivo.

Para la evaporación de los disolventes se empleó un evaporador rotatorio marca Buchi, modelo RE 111. Para la destilación a presión reducida se ocupó una bomba para vacío marca FECISA modelo FE-1405 con capacidad máxima de 0.1 mmHg.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Johns y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un aparato Nicolet FT5SX en pastilla de KBr. Las unidades se reportan en cm^{-1} .

Los espectros de RMN ^1H se realizaron en un aparato Varian VxR-300s (300 MHz). Los desplazamientos químicos están dados en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de señales se expresa como s= singulete, sa= señal ancha, c= señal cuadruple, d= señal doble, dd= señal doble de doble, ddd= señal doble de doble de doble, t= señal triple, q= señal quíntuple, m= señal múltiple.

Se empleó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, y como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6).

Los espectros de masas se determinaron por IE en un espectrofotómetro JEOL JMS-AX 505HA. El ión molecular se indica como M^+ . La nomenclatura se indica como m/z = masa/carga con su respectiva abundancia relativa.

Para la cromatografía en columna se empleó gel de sílice Merck 60 malla 70-230. Los análisis cromatográficos se efectuaron en capa fina analítica siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice Aldrich con un espesor de 0.2 mm. Para la visualización de las placas se empleó una lámpara de luz U.V.

Tabla 2. Sistemas de elución empleados

Sistema de elución	Disolventes	Proporción
I	Diclorometano/metanol	99:1
II	Diclorometano/acetona	99:1
III	Diclorometano/acetona	98:2
IV	Diclorometano/acetona	97:3
V	diclorometano	100
VI	Hexano/acetato de etilo	3:1

6.2 Descripción de la síntesis

Parte I. Síntesis de los derivados del ácido cinámico

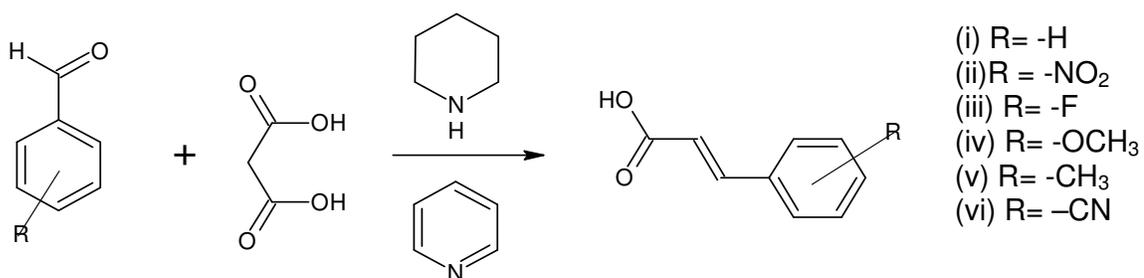


Figura 8. Síntesis de derivados del ácido cinámico

En un matraz de bola con boca esmerilada de 25 mL se colocaron 1.2 equivalentes de ácido malónico, 2 eq de piridina y aproximadamente 0.5 eq de piperidina. Se adicionó 1 eq del benzaldehído correspondiente ^(iv) y se colocó el refrigerante en posición de reflujo. _(iv)

Se calentó la mezcla de reacción a reflujo suave por una hora y media. Después de este tiempo se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se vertió sobre una mezcla de agua/hielo que contenía 30 mL de agua y 12 mL de HCl concentrado.

Posteriormente se enfrió en un baño de hielo/agua, induciendo la recristalización cuando fue necesario, se filtró el producto formado, y se lavó con agua destilada hasta que las aguas de lavado tuvieran pH neutro. La purificación del producto se realizó por recristalización con EtOH. Una vez seco el producto obtenido se determinó su punto de fusión.

A continuación se presenta una tabla con los resultados obtenidos para estos compuestos:

Tabla 3. Resultados de los compuestos i-vi.

Compuesto	Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	Rendimiento (%)
i	119-120	60
ii*	289	
iii*	209-210	
iv	110-112	75.8
v	190-193	86.32
vi	250-253	69.15

*Nota: Estos compuestos no se prepararon fueron obtenidos comercialmente

Parte II. Síntesis de los cloruros de cinamoilo *m* y *p*-sustituidos

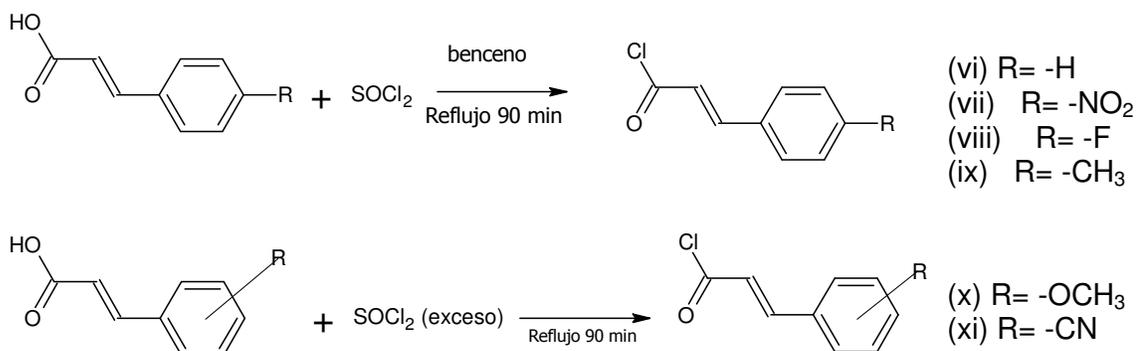


Figura 9. Síntesis de cloruros de cinamoilo.

En un matraz de boca esmerilada de 25 mL se colocaron 2 g del ácido cinámico *p*-sustituido correspondiente y 1 mL de cloruro de tionilo y 5 mL de benceno anhidro. Para las reacciones con exceso de cloruro de tionilo se les adicionó 5 mL del mismo; posteriormente en ambos casos se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante hora y media.

Después de este tiempo se dejó enfriar y se adaptó un equipo de destilación simple para eliminar el exceso de cloruro de tionilo, posteriormente se agregó aproximadamente 5 mL de benceno anhidro y se destiló de nuevo. Una vez terminada la destilación se determinó el punto de fusión del sólido remanente.

Para la purificación de los cloruros de ácido con un punto de fusión menor a 70 °C (viii, x, xi, xii y xiv), se realizó una destilación a presión reducida (14 mm Hg). Para los cloruros de ácido cuyo punto de fusión era mayor a 70 °C (ix, xiii) se realizó una recristalización con CCl₄. Una vez purificados se determinó su punto de fusión. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 4. Resultados de los compuestos vi-xi

Compuesto	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)
vi	50-53	82.1
vii	139-140	78.2
viii	73-78	70.8
ix	63-64	71.2
x	28-30	91.1
xi	90-93	86.9

Parte III

Síntesis de los derivados 1-N-cinamoil sustituidos de melatonina

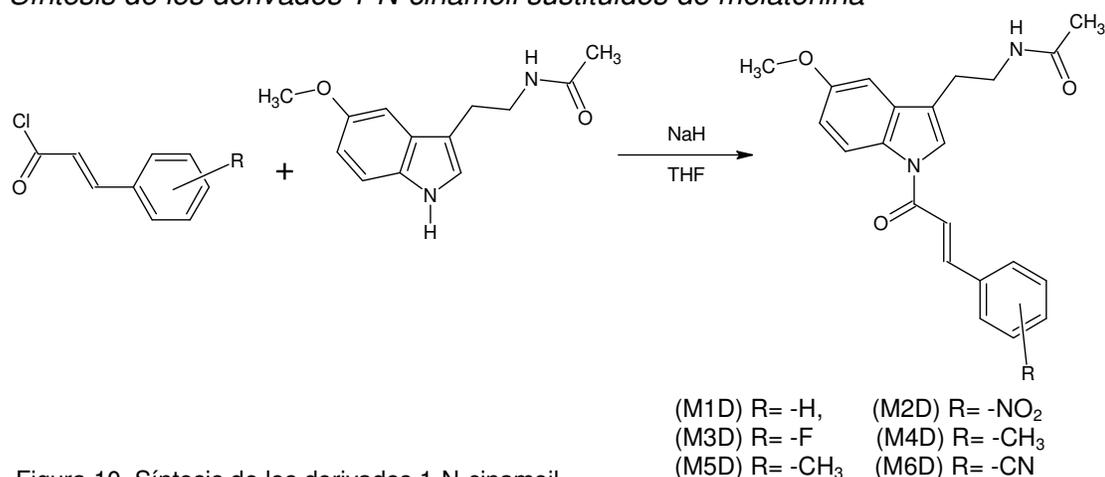


Figura 10. Síntesis de los derivados 1-N-cinamoil sustituidos de la melatonina

En un matraz de bola esmerilado de 25 mL, en condiciones anhidras, atmósfera inerte y con agitación magnética, se colocaron 45 mg de NaH (1.2 mmol) y 3 mL de THF anhidro. A esta suspensión se adicionó lentamente, mediante una cánula, una solución de 232 mg de melatonina (1 mmol) en 3 mL de THF anhidro. Se mantuvo en agitación durante 90 min a temperatura ambiente y protegido de la luz.

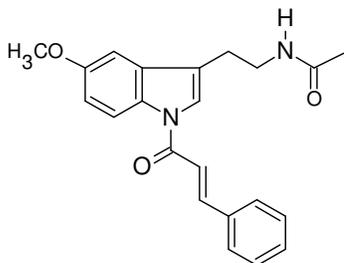
Después, se le añadió a la mezcla de reacción 1 mmol del correspondiente cloruro de ácido directamente al matraz de reacción bajo una atmósfera inerte de nitrógeno. Se mantuvo en ausencia de luz, atmósfera inerte y con agitación magnética por aproximadamente 10 horas.

Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió sobre una mezcla de agua/hielo (20 g) y se indujo la precipitación, el sólido obtenido se filtró al vacío

y se lavó con agua destilada hasta que las aguas de lavado presentaron un pH neutro.

A partir de este punto la purificación de cada compuesto obtenido fue diferente, y se describe en cada apartado.

N-(2-{5-metoxi-1-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enoil]-1*H*-indol-3-il}etil)acetamida (M1D)



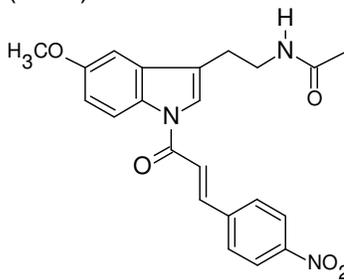
Al sólido obtenido, de color crema, (172.8 mg) se le realizó un análisis por CCF analítica, empleando el sistema de elución I, y se observó la presencia de melatonina y otro compuesto con un R_f mayor al de ésta. La purificación se llevó a cabo mediante una recristalización con aproximadamente 10 mL de etanol absoluto, obteniendo unos cristales amarillos en forma de agujas (120.1 mg, rendimiento 33.13%), con un punto de fusión de 170-172 °C y un R_f de 0.66. Se determinaron sus constantes espectroscópicas.

IR (KBr, espectro 1): 3343, 3063, 2831, 1658, 1614, 1595

RMN ^1H (CDCl_3 , espectro 2) 400 MHz δ : 8.42 (d ancho, 1H, $J=8.8$), 7.51 (s ancho, 1H), 6.98 (s ancha, 1H), 6.96 (m, 1H), 6.51 (s ancha, 1H, intercambia con D_2O), 3.84 (s, 3H), 3.66-3.65 (múltiple, aparente cuarteto, 1H), 2.95 (t, $J=6.4$, 1H), 2.04 (s, 3H); cinamoilo 7.90 (d, 1H, $J=15.6$), 7.65-7.64 (m, 2H), 7.44-7.43 (m, 3H), 7.18 (d, 1H, $J=15.2$)

EM m/z (IE, espectro 3): 363 ($M^+ + 1, 4.5$), 362 (M^+ , 17.3), 131 (100), 173 (66.4)

N-(2-{5-metoxi-1-[(2*E*)-3-(4-nitrofenil)prop-2-enoil]-1*H*-indol-3-il}etil) acetamida (M2D)



Al sólido obtenido, de color naranja, (320 mg) se le realizó un análisis por CCF, empleando el sistema de elución I, el cual indicó la presencia de melatonina y otros dos compuestos con un R_f mayor a esta. La purificación se llevó a cabo en primer lugar mediante la recristalización del compuesto con etanol absoluto, logrando la eliminación de la melatonina, el sólido restante se purificó mediante una cromatografía en columna con gel de sílice y como sistema de elución mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1, 98:2 y 97:3 obteniéndose 200 mg (rendimiento 50.39%) de un polvo amarillo cuyo punto de fusión fue 227-230 °C y un R_f de 0.60. Se determinaron sus

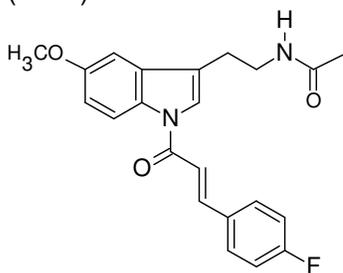
constantes espectroscópicas.

IR(KBr, espectro 4): 3324, 3093, 2832, 1659, 1344

RMN ¹H (DMSO d₆, espectro 5) 300 MHz δ: 8.35 (d, J=9.0, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.03 (t, J=5.7, 1H), 7.16 (d, J=2.7, 1H), 6.96 (dd, J=9,2.7, 1H), 3.82 (s,3H), 3.40 (c, J=5.1, 2H), 2.80 (t, J=5.4, 2H), 1.81 (s, 3H); *p*-nitro cinamoilo 8.32-8.29 (m, 2H), 8.19-8.16 (m, 2H), 7.97 (d, J=15.3, 1H), 7.91 (d, J=15.6, 1H).

EM m/z (IE, espectro 6): 408 (M⁺+1,5.9), 407 (M⁺, 20.6), 173 (100), 348 (52.9)

N-(2-{1-[(2*E*)-3-(4-fluorofenil)prop-2-enoil]-5-metoxi-1*H*-indol-3-il}etil)acetamida (M3D)



Al sólido obtenido, de color amarillo, (42 mg) se le realizó un análisis por CCF, empleando el sistema de elución I, el cual indicó la presencia de melatonina y otros tres compuestos cuyo R_f era mayor al de la melatonina. La purificación se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna con gel de sílice con sistema de elución mezclas de CH₂Cl₂/MeOH 100, 99:1 y 98:2 obteniéndose 21.2 mg (rendimiento 5.57%) de unos cristales amarillos con un punto de fusión de 179-182 °C y un R_f de 0.63. Se determinaron sus propiedades espectroscópicas.

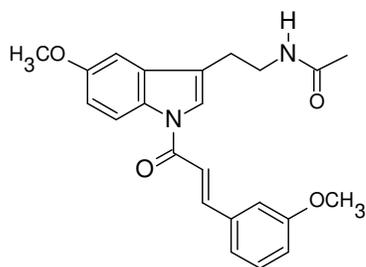
IR (KBr, espectro 7): 3333, 3066, 2933, 1631.

RMN ¹H (CDCl₃, espectro 8) 400 MHz, δ:8.44 (d, 1H, J= 8.8), , 7.01-6.98 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 5.72 (s ancha, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.66 (c, 2H, J= 5.6), 2.94 (t, 2H, J=6.4), 1.99 (s, 3H); *p*-fluoro cinamoilo 7.92 (d, 1H, J= 15.6), 7.68-7.64 (m,2H), 7.17-7.12 (m, 2H), 7.14 (d, 1H, J= 15.2)

EM m/z (IE, espectro 9): 381 (M⁺+1,4.5), 380 (M⁺, 19.5), 149 (100), 173 (75.2)

N-(2-{1-[(2*E*)-3-(3-metoxifenil)prop-2-enoil]-5-metoxi-1*H*-indol-3-il}etil)acetamida (M4D)

Al producto obtenido de color amarillo (161.2 mg) se le realizó un análisis por CCF, empleando el sistema de elución I, el cual indicó la presencia de melatonina y otros cuatro compuestos, tres de los cuales poseían un R_f mayor al de la melatonina y el restante un R_f menor a la melatonina. La purificación se llevó a cabo en primer lugar



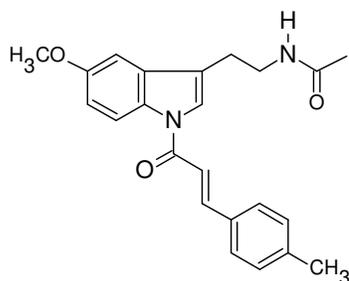
mediante una recristalización con etanol absoluto, lo cual permitió eliminar dos de las impurezas (melatonina y otro compuesto) y mediante una cromatografía en columna de gel de sílice, empleando el sistema de elución $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100 y 99:1, obteniendo unos cristales amarillos (107.7mg, rendimiento 27.44%), cuyo punto de fusión fue de 130°C y su R_f de .Se determinaron sus propiedades espectroscópicas.

IR (película, espectro 10): 3337, 3074, 2936, 1658, 1257.

RMN ^1H (CDCl_3 , espectro 11) 400 MHz, δ : 8.43(d, 2H, $J=8.8$), , 7.50 (s, 1H), 6.99-6.97 (m, 2H), 6.10 (s,1H), 3.86 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 2.93 (s, 2H), 1.99 (s, 3H); p-metoxi cinamoilo 7.89 (d, 1H, $J=15.2$), 7.36 (dd, $J=7.8,7.6$, 1H), 7.26-7.23 (m, 2H), 7.18-7.16 (m, 1H, $J=15.6$),3.87 (s, 3H).

EM m/z (IE, espectro 12): 393 ($M^++1,4.6$), 392 (M^+ , 16.9), 161 (100), 333 (21.4)

N-(2-{1-[(E)-3-(4-metilfenil)prop-2-enil]-5-metoxi-1H-indol-3-il}etil)acetamida (M5D)



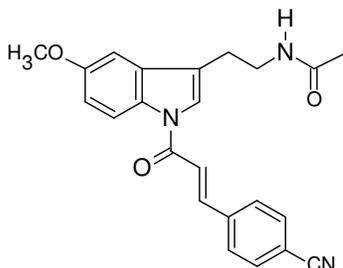
Al producto obtenido de color crema (123 mg) se le realizó un análisis por CCF, empleando el sistema de elución I, el cual indicó la presencia de melatonina y otros cuatro compuestos, los cuales poseían un R_f era mayor al de la melatonina. La purificación se llevó a cabo primero mediante una recristalización con etanol absoluto, y posteriormente mediante una cromatografía en columna de gel de sílice, (diclorometano/acetona 100/97:3) obteniendo unos cristales de color amarillo cuyo punto de fusión fue de $160-163^\circ\text{C}$ y su R_f de 0.63. Se determinaron sus propiedades espectroscópicas.

IR (KBr, espectro 13): 3461, 3221, 2906, 1661, 1570, 1248

RMN ^1H (CDCl_3 , espectro 14) 300 MHz, δ : 8.44 (d,1H, $J=9.3$), 7.51 (s,1H), 6.99-6.97 (m, 2H), 6.21 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.66 (q, 2H, $J=5.7$), 2.96 (t, 2H, $J=6.3$), 2.41 (s, 3H), 2.04 (s, 3H); p-metil cinamoilo 7.91 (d, 1H, $J=15.3$), 7.15 (d, 1H, $J=15.3$),7.55 (d ancha, $J=7.8$, 2H), 7.24 (d ancha, $J=8.1$, 2H), 2.40 (s, 3H).

EM m/z (IE, espectro 15): 377 ($M^{+}+1$, 3.6), 376 (M^{+} , 15.9), 145 (100), 173 (36.3)

N-(2-{1-[(2*E*)-3-(4-cianofenil)prop-2-enoil]-5-metoxi-1*H*-indol-3-il}etil)acetamida (M6D)



Al sólido obtenido de color amarillo (230 mg) se le realizó un análisis por CCF, empleando el sistema de elución I, el cual indicó la presencia de melatonina y otros tres compuestos, dos de los cuales poseían un R_f mayor al de la melatonina y el restante menor al de la melatonina. Para la purificación del compuesto se realizó una recristalización con etanol anhidro, la cual permitió la eliminación de la melatonina y de la impureza con R_f menor a esta. Posteriormente se realizó una cromatografía en columna de gel de sílice (diclorometano/acetona 100/97:3), se obtuvieron unos cristales amarillos (77.7mg, rendimiento 20.06%) cuyo punto de fusión fue de 227-229 °C y un R_f de 0.67. Se determinaron las constantes espectroscópicas.

IR (KBr, espectro 16): 3309, 2998, 2223, 1658, 1396

RMN ^1H (CDCl_3 , espectro 17) 300 MHz, δ : 8.43 (d, 1H, $J=9.6$), 7.51 (s, 1H), 7.02-6.99 (m, 2H), 5.66 (s, 1H) 3.88 (s, 3H), 3.66 (c, 2H, $J=6.0$), 2.95 (t, 2H, $J=6.3$), 1.98 (s, 3H); p-ciano cinamoilo 7.92 (d, 1H, $J=15.6$), 7.31 (d, 1H, $J=15.6$), 7.80-7.09 (m, 4H)

EM m/z (IE, espectro 18): 388 ($M^{+}+1$, 7.1), 387 (M^{+} , 28.6), 173 (100), 328 (65.2)

7.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS

La asignación de las señales para los intermediarios obtenidos se indica a continuación:

7.1 Intermediarios

Ácido cinámico

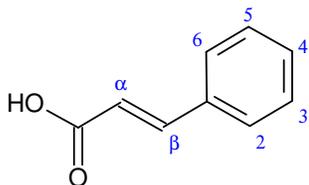


Tabla 5. Señales de RMN¹H para el ácido cinámico

δ	Tipo de señal	J (Hz)	H Protón
6.45	Doble	15.9	α
7.79	Doble	15.9	β
7.57-7.51	Múltiple	-	6 y 2
7.43-7.35	Múltiple	-	5,4 y 3
11.87	S ancha		

Ácido p-nitrocínámico

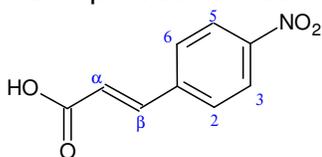


Tabla 6. Señales de RMN¹H para el ácido p-nitrocínámico

δ	Tipo de señal	J (Hz)	H Protón
6.72	Doble	15.9	α
7.67	Doble	15.9	β
8.23-8.19	Múltiple	-	5 y 3
7.97-7.93	Múltiple	-	6 y 2

Ácido p-metilcínámico

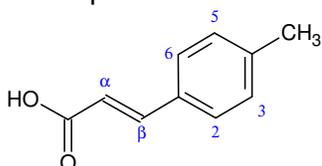


Tabla 7. Señales de RMN¹H para el ácido p-metilcínámico

δ	Tipo de señal	J (Hz)	H Protón
6.41	Doble	15.9	α
7.77	Doble	15.9	β
7.22-7.20	Doble	8.1	5 y 3
7.47-7.44	Doble	8.1	6 y 2
2.38	Simple	-	CH ₃ -Ar

Ácido m-metoxicínámico

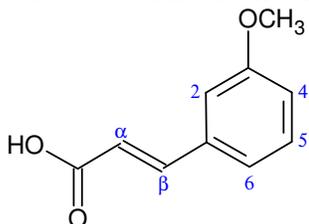


Tabla 8. Señales de RMN¹H del ácido m-metoxicínámico

δ	Tipo de señal	J (Hz)	H Protón
6.45	Doble	15.9	α
7.76	Doble	15.9	β
7.07	ddd	2.1, 1.95	2
6.97	ddd	8.3, 2.1	4
7.08	Doble	8.1, 7.8	5
7.15	Doble	7.8	6
3.85	simple	-----	-OCH ₃

Ácido p-fluorcínámico

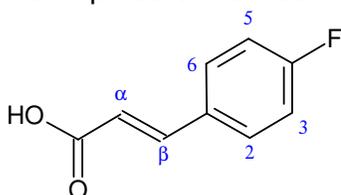


Tabla 9. Señales de RMN¹H del ácido p-fluorcínámico

δ	Tipo de señal	J (Hz)	H Protón
6.38	Doble	15.9	α
7.75	Doble	15.9	β
7.13-7.07	Múltiple	-	6 y 2
7.55	Múltiple	-	5 y 3

Ácido p-cianocinámico

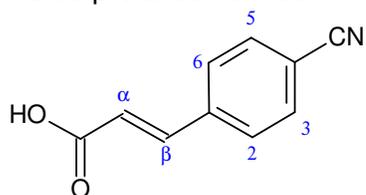


Tabla 10. Señales de RMN¹H del ácido p-cianocinámico

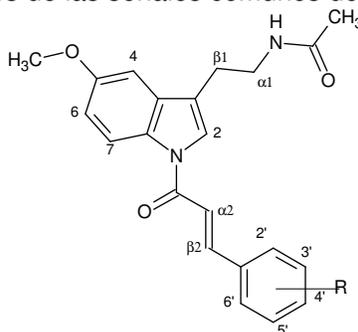
δ	Tipo de señal	J (Hz)	H Protón
6.69	doble	16.4	α
7.62	doble	16.0	β
7.89-7.84	Múltiple	-	H-2, H-3, H-5, H-6

Con base en estos datos se comprueba que se obtuvieron los compuestos pronosticados. De manera general, se puede apreciar que el desplazamiento de los protones del anillo aromático depende del sustituyente en la posición 4 o 3 del mismo. Tomando en cuenta la constante de acoplamiento de los protones α y β de la doble ligadura se puede afirmar que la estereoquímica de la misma es de tipo *trans*.

7.2 Análogos de melatonina

De acuerdo a los espectros de RMN ¹H, los desplazamientos para cada análogo de melatonina se describen en la Tabla 11.

Tabla 11. Desplazamientos de las señales comunes de los compuestos obtenidos



Compuesto	H-2	H-4	H-6	H-7	α 1	β 1	α 2	β 2	NH	CH ₃ O-	CH ₃ CO-
Melatonina En CDCl ₃	7.36	7.03	6.87	7.27	3.60	2.95	-	-	6.01	3.86	1.93
Melatonina en DMSOd ₆	7.08	7.00	6.69	7.21	3.29	2.76	-	-	7.95	3.74	1.79
M1D	7.51	6.98	6.95	8.43	3.66- 3.65	2.94	7.18	7.91	6.51	3.85	2.04
M2D	8.16	7.16	6.96	8.35	3.40	2.80	7.91	7.97	8.03	3.82	1.81
M3D	7.50	7.01-6.98		8.44	3.66	2.94	7.14	7.92	5.72	3.88	1.98
M4D	7.50	6.99-6.97		8.43	3.64	2.93	7.18- 7.16	7.89	6.10	3.86	1.99
M5D	7.51	6.99-6.97		8.43	3.66	2.96	7.16	7.93	6.21	3.86	2.04
M6D	7.51	7.02-6.99		8.44	3.66	2.94	7.31	7.92	5.66	3.88	1.98

Se puede observar que para todos los compuestos sintetizados, se presentan las señales correspondientes a los protones de la cadena de acetamida (α 1, β 1, y $-\text{COCH}_3$), así como la de los protones del grupo metoxilo, por lo que podemos decir que estos grupos funcionales no se vieron afectados al realizar la síntesis. Es conveniente resaltar que las señales para los protones α 1 y β 1 se observan como una señal cuádruple y triple, respectivamente, lo que indica que la reacción de acilación se realizó en la posición 1 y no en el grupo acetamida.

Es importante señalar que para todos los compuestos sintetizados, las señales correspondientes a los protones α y β al grupo acetamida no se observa un desplazamiento significativo con respecto a las señales que presenta la melatonina, esto indica que no existe una influencia del sustituyente sobre estos protones, lo cual puede deberse a la distancia del sistema aromático.

Por otro lado, se observa que los desplazamientos y el tipo de señal correspondientes a los protones del doble enlace conjugado, se mantienen sin alteración, de lo que se deduce que no existe ninguna interacción de este sistema con alguna región del anillo indólico.

También se observa, para todos los compuestos, un desplazamiento de la señal perteneciente a H-7 a campo bajo con respecto a los valores de melatonina, lo cual puede deberse a la interacción del grupo carbonilo del sustituyente sobre este protón, si el grupo carbonilo tuviera otra conformación estructural, el efecto se observaría sobre H-2, sin embargo el desplazamiento de las señales para este protón están a campo alto con respecto a los valores de la melatonina, esto indica que este protón está ligeramente protegido.

De acuerdo a los espectros de masas obtenidos para los diferentes análogos de melatonina sintetizados, a continuación, se muestran los fragmentos principales:

Tabla 12. Principales fragmentos de los espectros de masas de los compuestos sintetizados.

Compuesto	Ión molecular (M/Z)	Abundancia relativa (%)	Pico base (M/Z)
M1D	362	17.26	131
M2D	407	20.57	173
M3D	380	19.46	149
M4D	392	16.96	161
M5D	376	15.93	145
M6D	387	28.57	173

Para todos los compuestos obtenidos se observa un patrón de fragmentación principal:

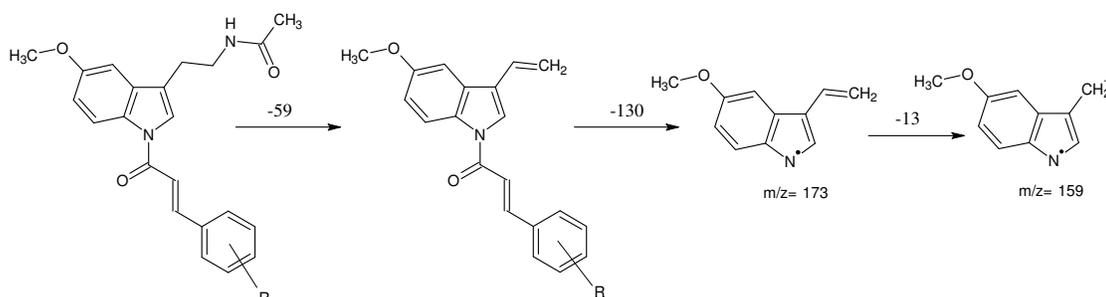
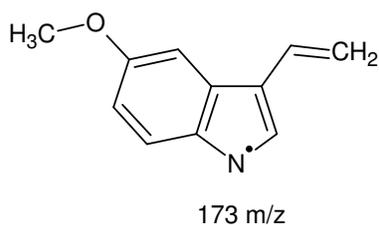
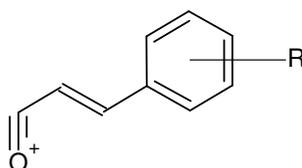


Figura 11. Patrón de fragmentación principal de los análogos de melatonina sintetizados

Para los compuestos M2D y M6D, se observa que el fragmento principal es:



Mientras que para los demás compuestos el fragmento principal que se presenta corresponde a la ruptura del sustituyente cinámico.



En cuanto a los espectros de infrarrojo, las bandas principales de los grupos funcionales importantes se describen a continuación:

Tabla 13. Bandas principales de los grupos funcionales importantes de los compuestos sintetizados.

Compuesto	Grupo funcional	Tipo de señal	Frecuencia (cm ⁻¹)
M1D	N-H del grupo amida	Banda intensa	3344
	C=O de la amida	Banda intensa	1658
	C-H insaturados	Bandas medias	3112-3063
	C-H saturados	Bandas de poca intensidad	2962-2919
	-OCH ₃	Banda de baja intensidad	2831
M2D	<i>N-H del grupo amida</i>	<i>Banda media</i>	<i>3324</i>
	C=O de la amida	Banda intensa	1658
	C-H insaturados	Banda de baja intensidad	3092
	C-H saturados	Banda de baja intensidad	3935
	-OCH ₃	Banda de baja intensidad	2832
	-NO ₂	Banda intensa	1344
M3D	N-H del grupo amida	Banda intensa	3333
	C=O de la amida	Banda intensa	1682
	C-H insaturados	Bandas de baja intensidad	3066
	C-H saturados	Bandas de medias	2877-2875
	-OCH ₃	Banda de baja intensidad	2831
	-F	Banda intensa	1224
M4D	N-H del grupo amida	Banda intensa	3336
	C=O de la amida	Banda intensa	1658
	C-H insaturados	Banda de poca intensidad	3073
	C-H saturados	Banda de poca intensidad	2934
	-OCH ₃ del anillo indólico	Banda de poca intensidad	2834
	-OCH ₃ del sustituyente	Banda intensa	1256
M5D	N-H del grupo amida	Banda de baja intensidad	3461
	C=O de la amida	Banda intensa	1661
	C-H insaturados	Bandas medias	3109-3006
	C-H saturados	Bandas de baja intensidad	2906
	-OCH ₃	Banda media	3077
M6D	N-H del grupo amida	Banda intensa	3309
	C=O de la amida	Banda intensa	1658
	C-H insaturados	Banda de baja intensidad	3036
	C-H saturados	Bandas de baja intensidad	2997
	-OCH ₃	Banda de baja intensidad	2839
	-CN	Banda media	2224

Como se puede observar en la Tabla 13. todos los compuestos presentaron señales similares pertenecientes a los grupos funcionales que caracterizan a la melatonina, así como las señales características de los sustituyentes cinamoilo, estos resultados confirman los datos obtenidos en los espectros de RMN ¹H.

8.0 CONCLUSIONES

De acuerdo a la hipótesis planteada:

- * Se realizó la síntesis y caracterización estructural de los siguientes compuestos considerados análogos de melatonina

Tabla 14. Compuestos obtenidos

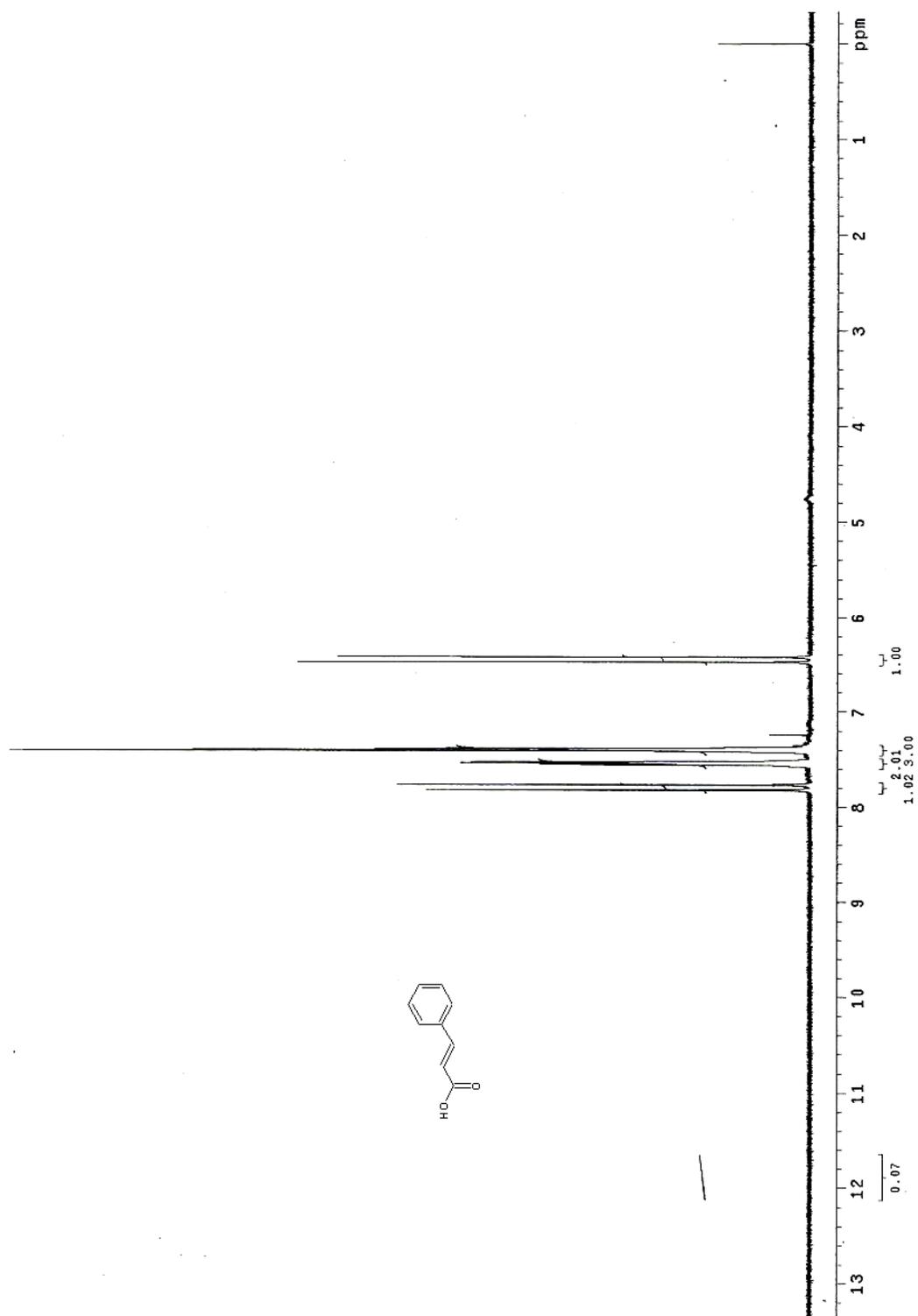
Compuesto
1- <i>N</i> -cinamoil melatonina (M1D)
1- <i>N</i> -(4-nitrocinamoil)melatonina (M2D)
1- <i>N</i> -(4-fluorocinamoil)melatonina (M3D)
1- <i>N</i> -(2-metoxicinamoil)melatonina (M4D)
1- <i>N</i> -(4-metilcinamoil) melatonina (M5D)
1- <i>N</i> -(4-cianocinamoil)melatonina (M6D)

- * Con base en sus datos espectroscópicos y sus constantes físicas, se puede decir que se logró la síntesis de todos los compuestos. La caracterización de la estructura se realizó por evidencias espectroscópicas (Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear) y Espectrometría de masas.
- * De acuerdo a los resultados obtenidos de la RMN ¹H se concluye que no existe una interacción a larga distancia entre el anillo aromático de los grupos cinamoilo y los átomos de hidrógeno presentes en el C β unido a la posición 3 del anillo indólico, corroborando así la hipótesis propuesta.

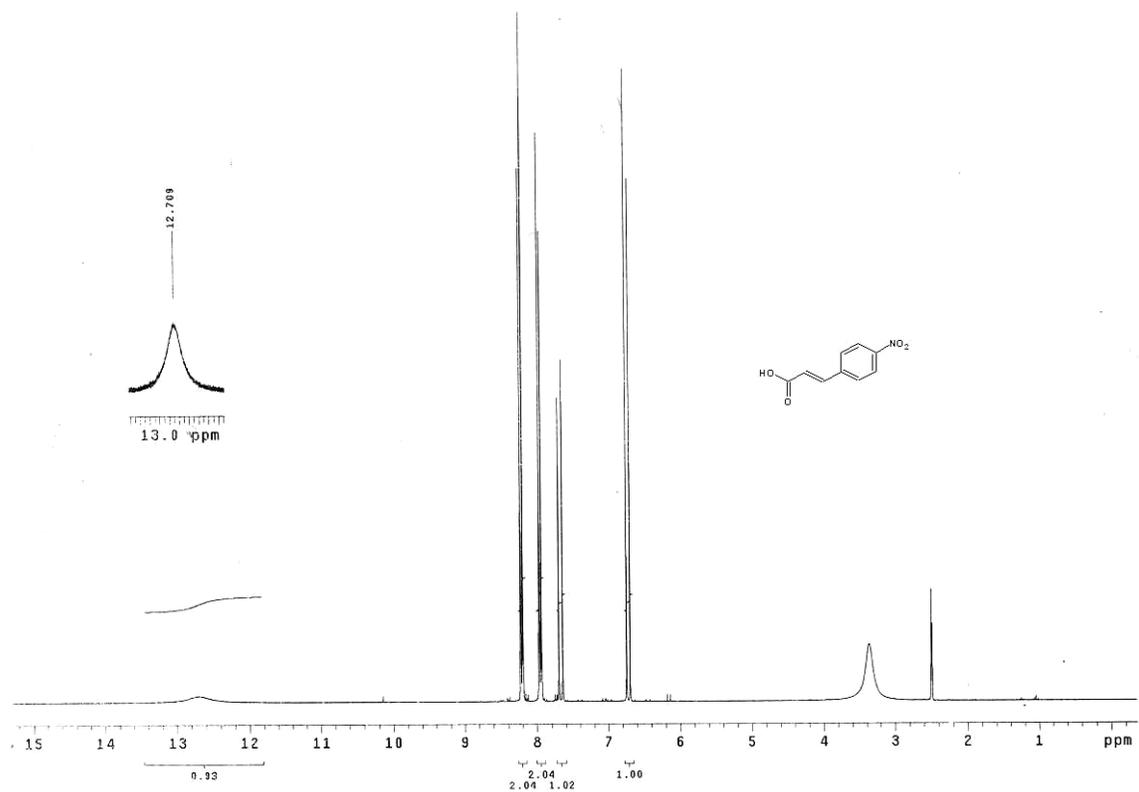
9.0 BIBLIOGRAFÍA:

1. E.J.W.Barrington *Introducción a la endocrinología general y comparada*. Madrid, **1975**.
2. Maestroni GMJ. *Journal of Pineal Research*. **1993**, 14, 1-10
3. Norris David O. *Vertebrate endocrinology* 3ª edición USA, **1996**
4. Chad E. Beyer, Jeffery D. Steketee and David Saphier. *Biochemical Pharmacology* **1998**, 56, 1265-1272
5. Brzezinski A. *N Engl J Med* **1997**, 336, 186-195
6. Silvia Rivara, Simone Lorenzi, Marco Mor. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2005**, 48, 4049-4060
7. Silvia Rivara, Giuseppe Diamantin, Barbara Di Giacomo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2006**, 14, 3383-3391
8. Russel J. Reiter, Dun-xian Tan, Carmen Osuna, Eloisa Gutto. *Journal of Biomedical Science* **2007**, 444-458
9. Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP. *Immunity & ageing* **2005**, 2, 17
10. Korf H.W., von Gall C. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2006**, 252, 57-68
11. Tali Gorfine, Yanir Assaf, Yonatan Gashen-Gottstein. *Neuroimage* **2006**, 31, 410-418.
12. Paula A. Witt-Enderb y Margarita L. Dubocovich. *Molecular Pharmacology* **1996**, 50, 166-174
13. Díaz López B. *Revista Española de Geriátría y Gerontología*. **2001**, 36:05, 262-269.
14. Moore RY. *Prog Reprod Biol* **1978**, 4, 1-29.
15. Leclerc Véronique, Yous Saïd, Delagrangé Philipe, Boutin Jean A., Renard Pierre, Lesieur Daniele. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2002**, 45, 1853-1859.
16. Dubocovich M.L, Rivera-Bermudez M.A, Gerdin M.J, Masana M.I. *Frontiers in Bioscience*, **2003**, 1:8, 1093-108.
17. Macchi Mila M. and Bruce Jeffrey N. *Frontiers in Neuroendocrinology*. **2004**, 25: (3-4), 177-95
18. Pand-Perumal S.R, Srinivasan V., Maestroni G.J.M., Cardinali D.P., Poeggeler B. and Hardeland R. *The FEBS Journal* **2006**, 273, 2813-2838.
19. Lira Rocha A., Espejo González O., Naranjo Rodríguez E., *European Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 37, 945-951.
20. Constantine I. Chiriac, Fulga Tanasa y Marioara Onciou. *Molecules* **2005**, 10, 481-487.
21. Cope A. *Condensation Reactions* **1931**, 59, 2327-2330.
22. Shiyi Oku y Kin-Chor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2004**, 84, 1261-1269.
23. Mathew y T. Emilia Abraham. *Critical Reviews in Biotechnology* **2004**, 24, 59-83.
24. Monika Gupta and Basant Purnima W. *ARKIVOC* **2007**, (i), 94-98.
25. Lerner AB, Case JD, Takahasji Y. *Journal of Biomedical Chemistry*. **1960**, 235, 1992-1997.

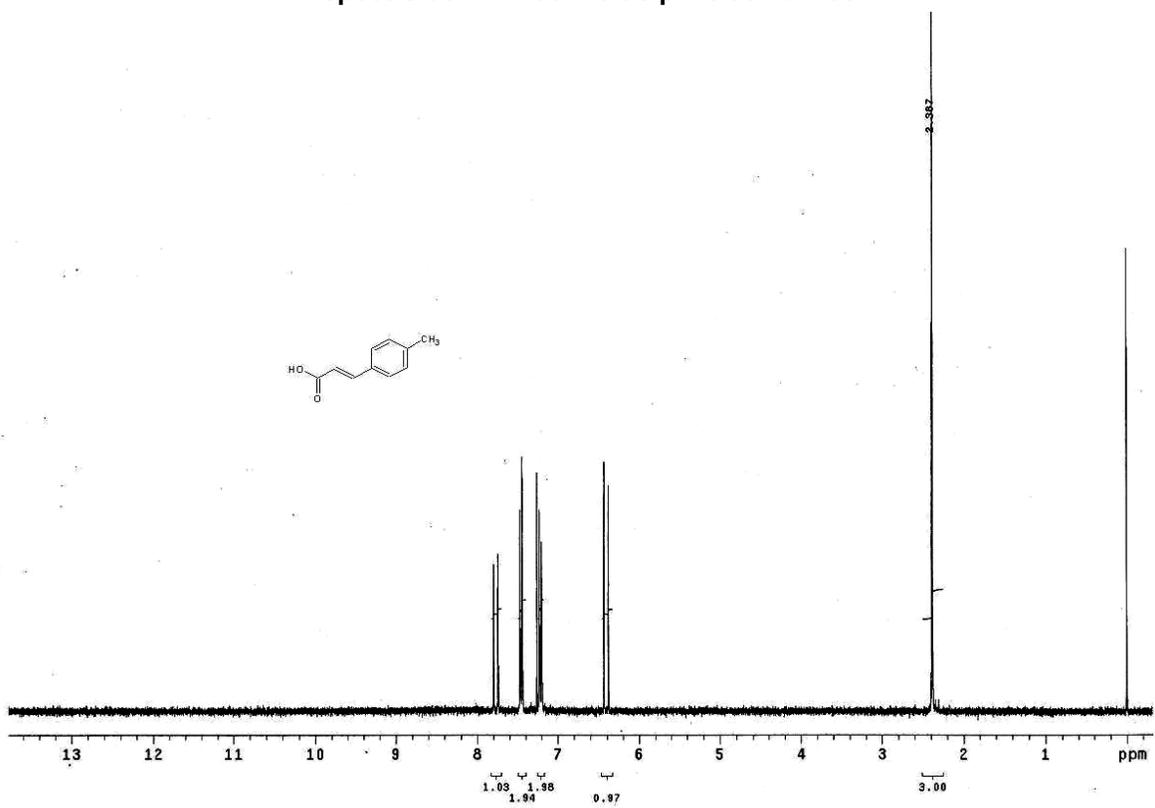
APENDICE



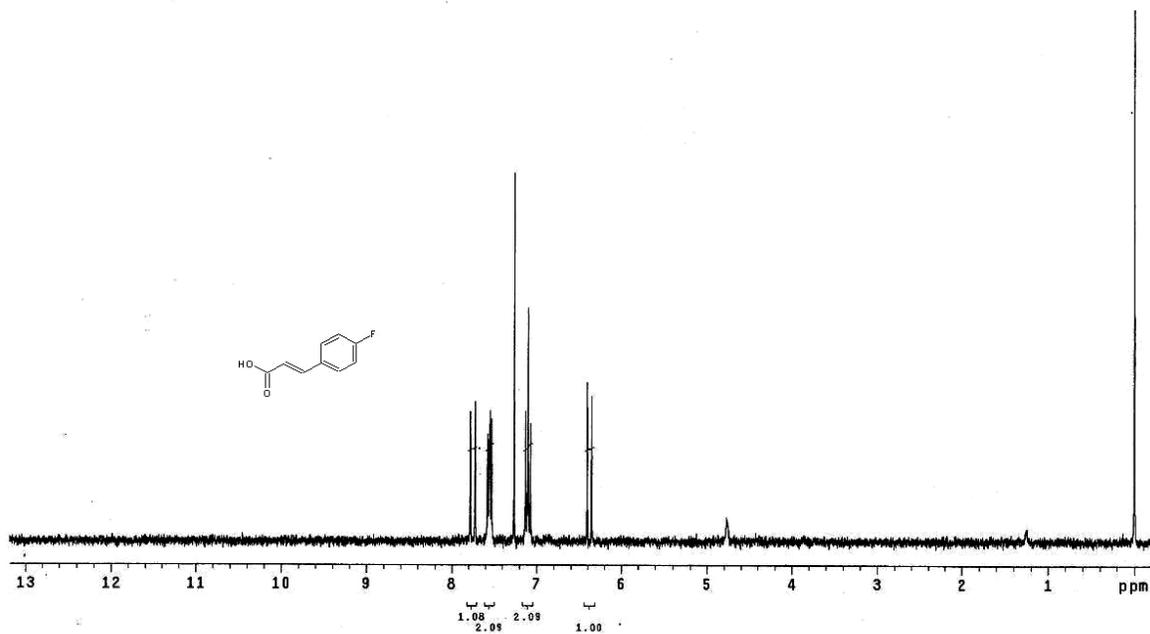
Espectro de RMN del Ácido cinámico



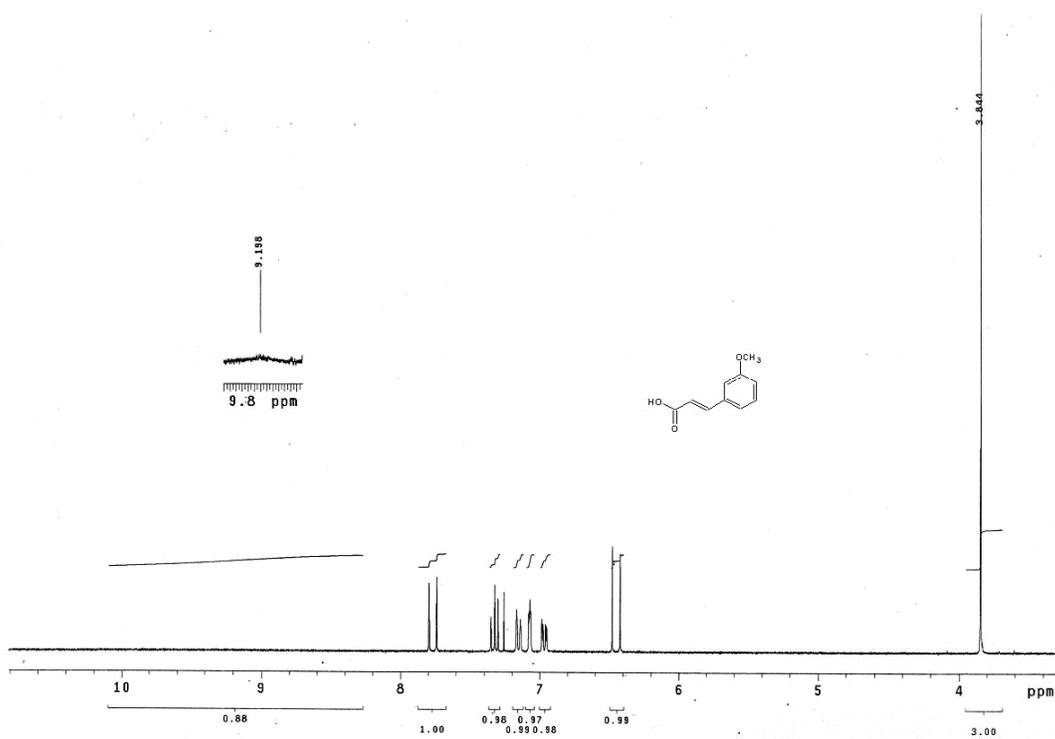
Espectro de RMN del Ácido p-nitrocinnámico



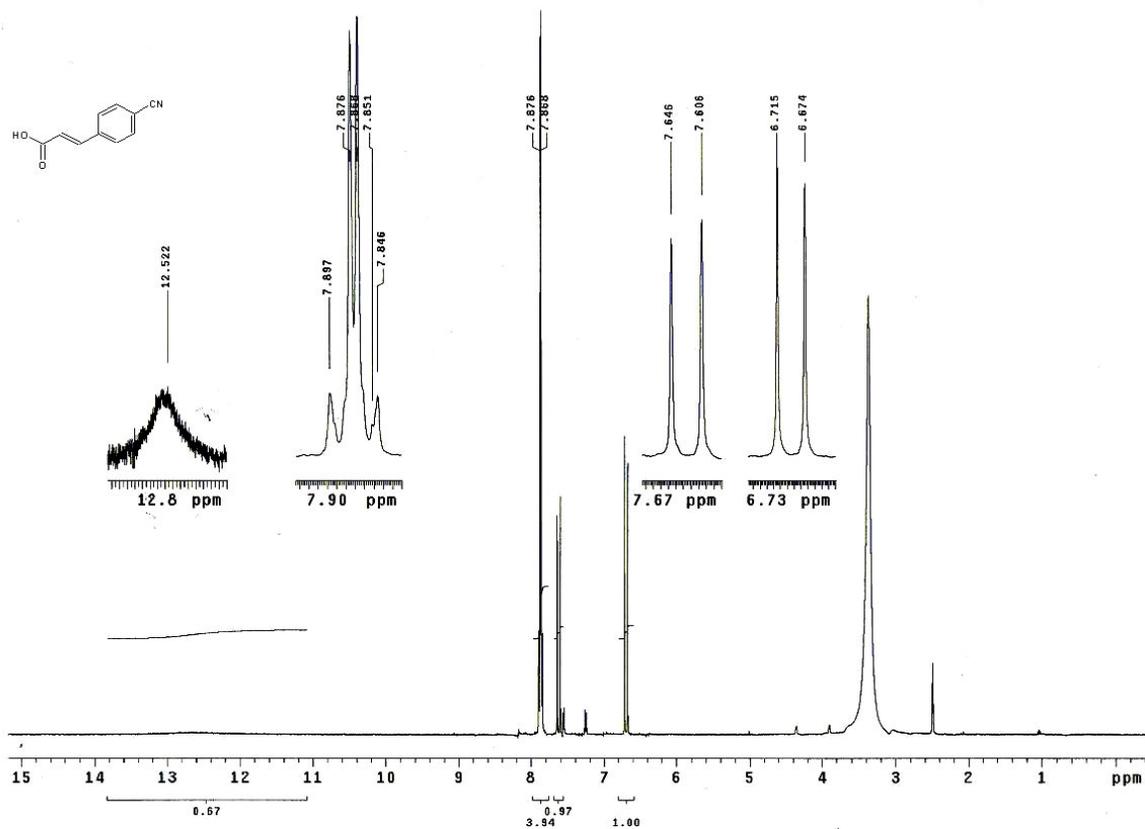
Espectro de RMN del Ácido p-metilcinnámico



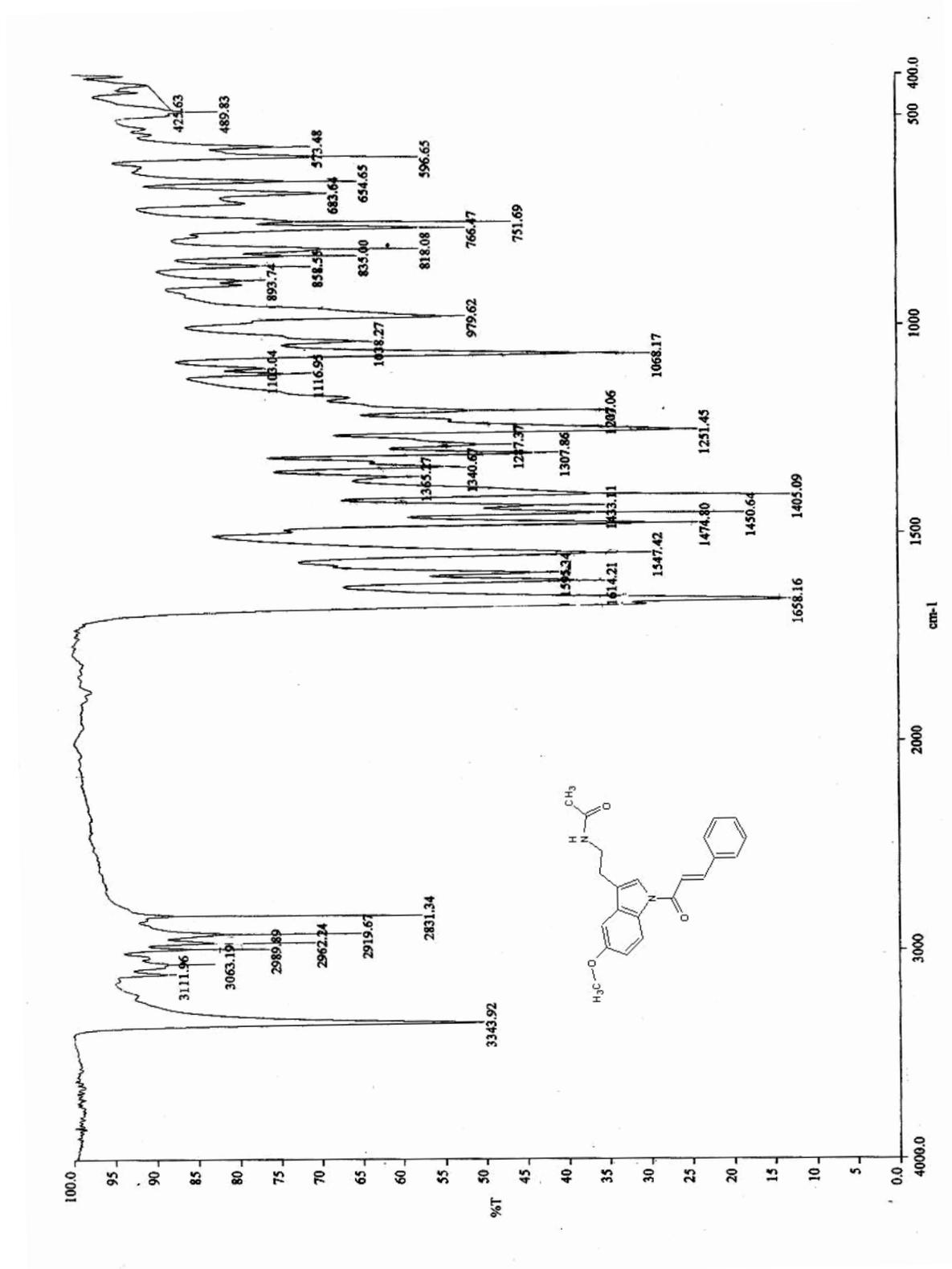
Espectro de RMN del Ácido p-flourocínámico



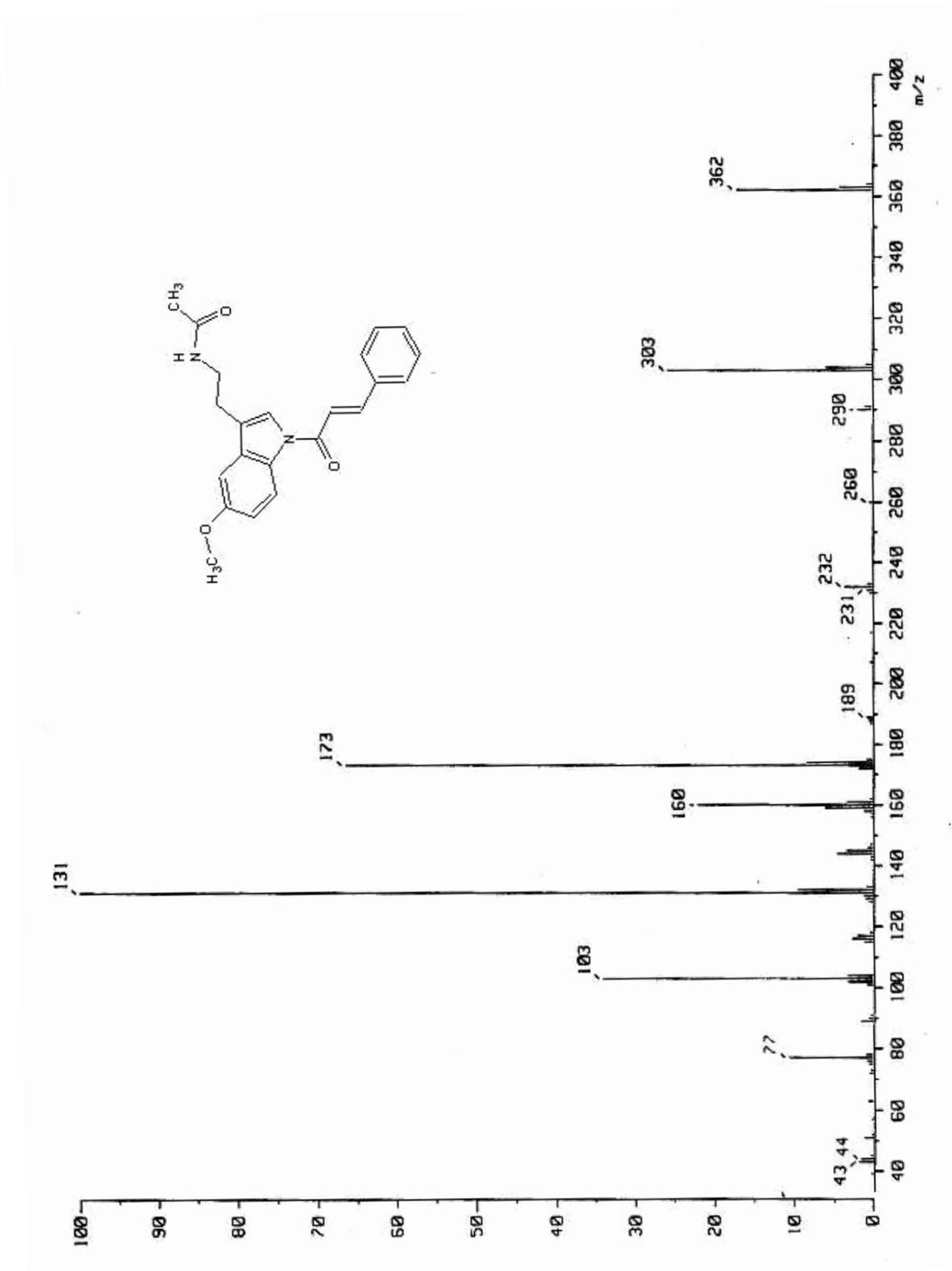
Espectro de RMN del Ácido m-metoxicínámico



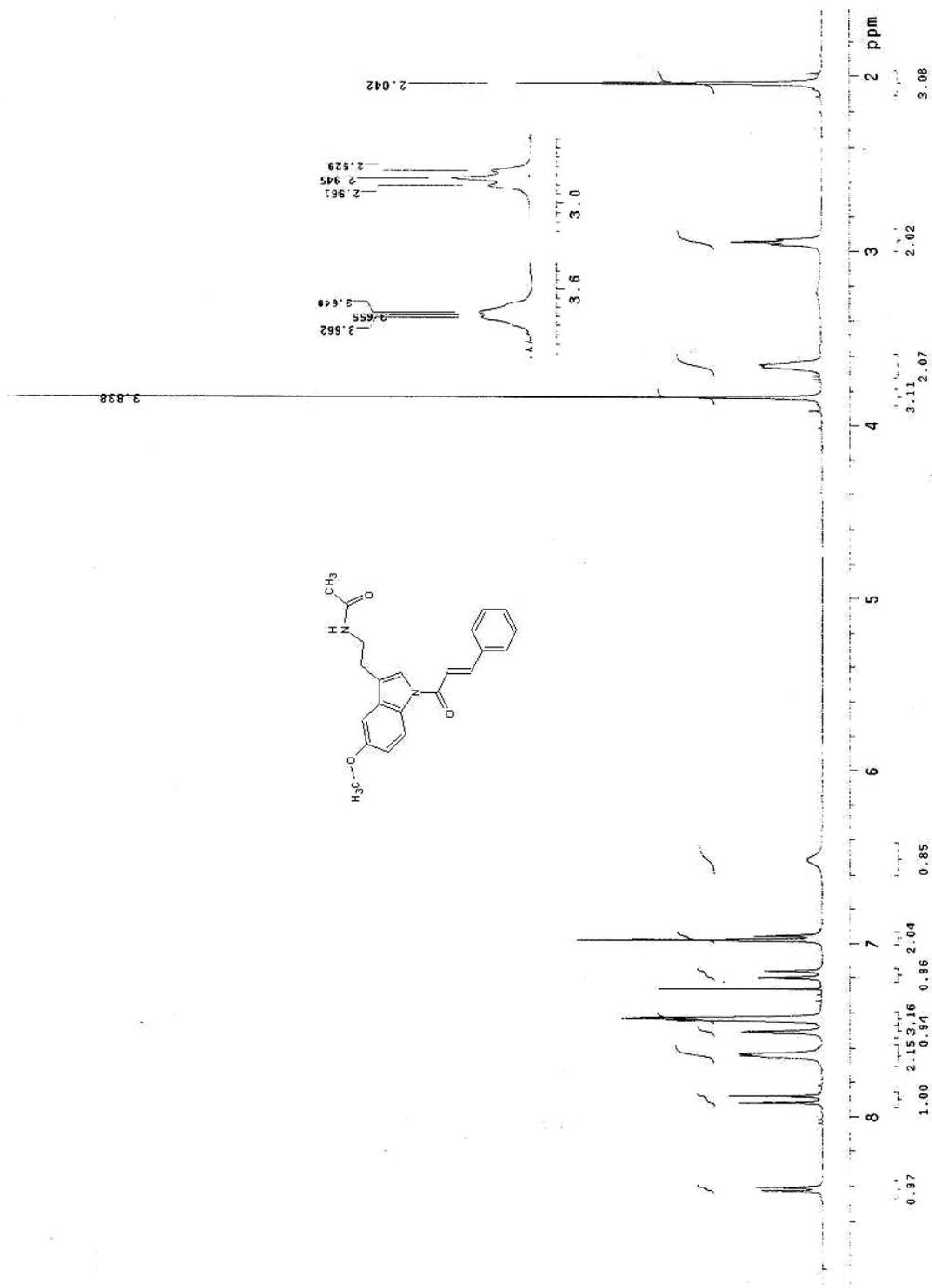
Espectro de RMN del ácido p-cianocinámico



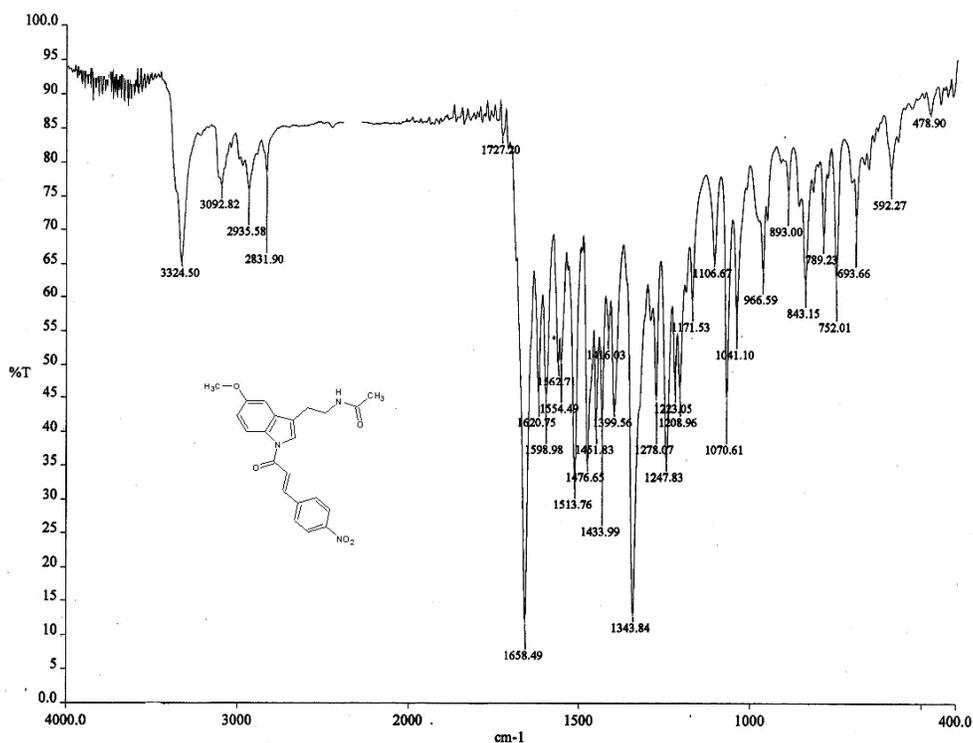
Espectro de Infrarrojo del compuesto M1D



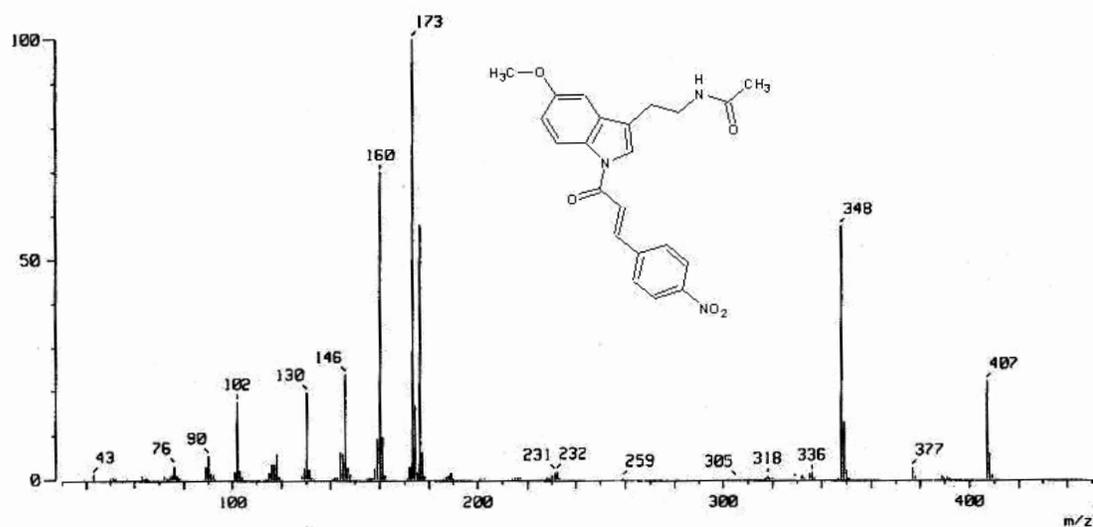
Espectro de masas del compuesto M1D



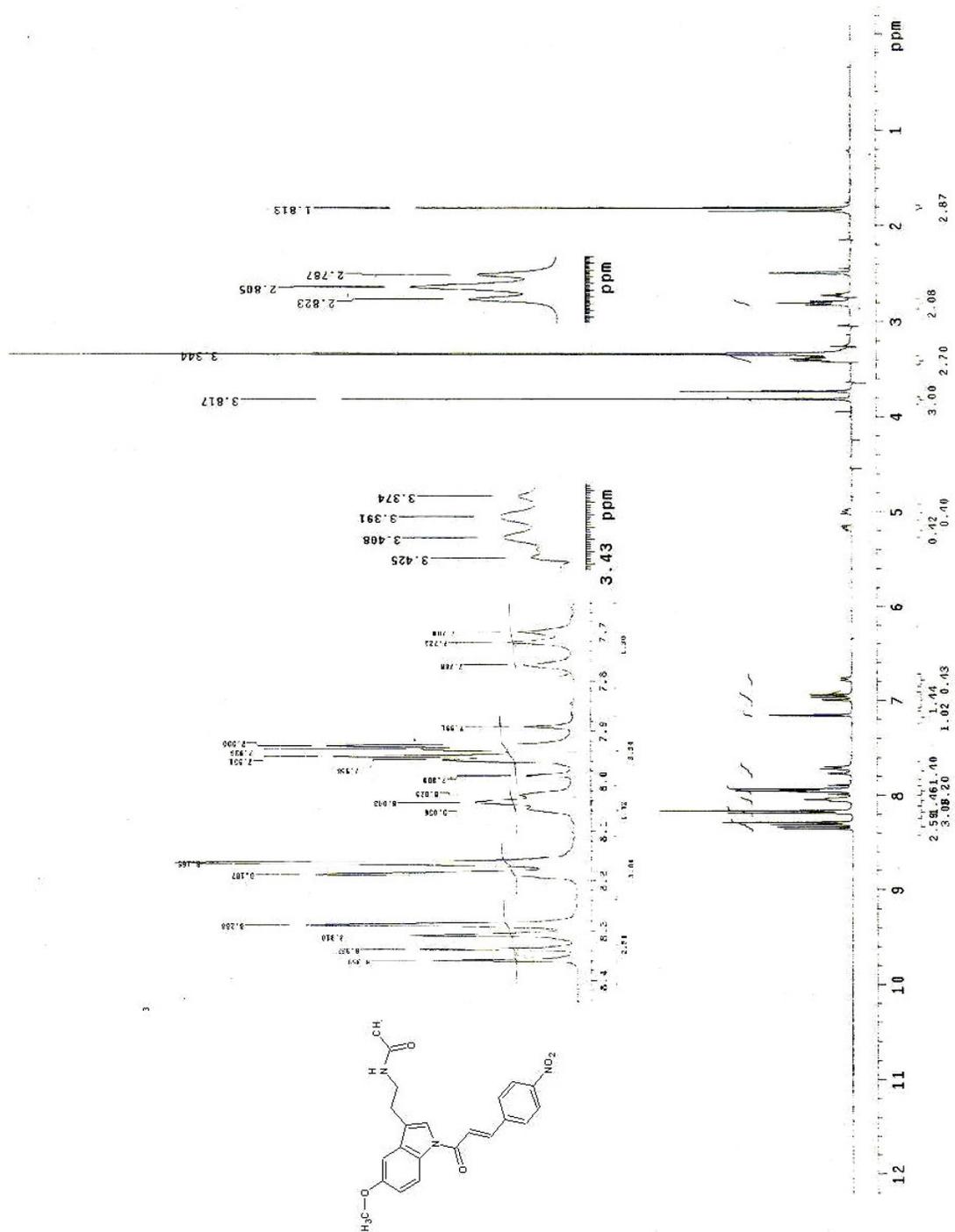
Espectro de RMN ¹H del compuesto M1D



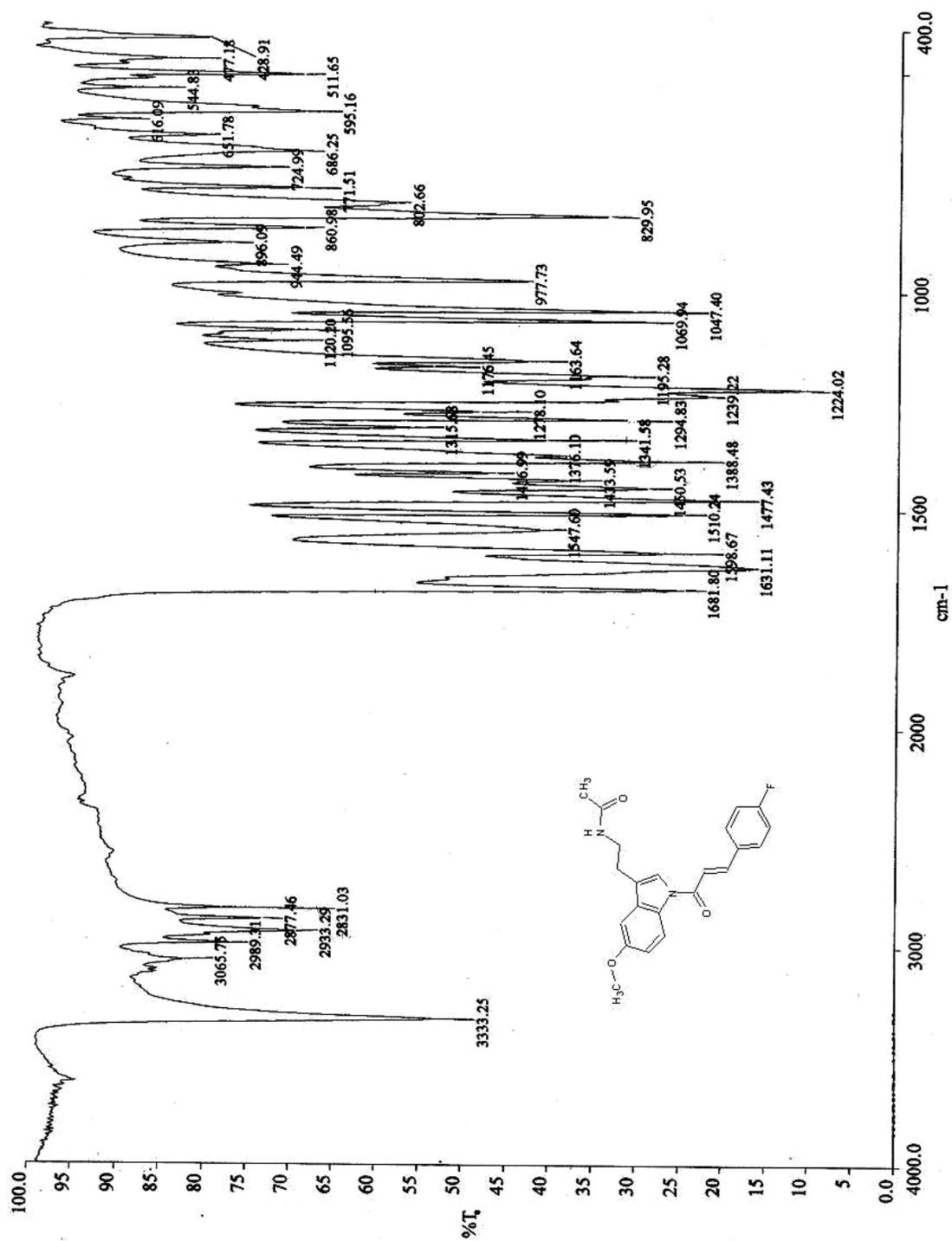
Espectro de infrarrojo para el compuesto M2D.



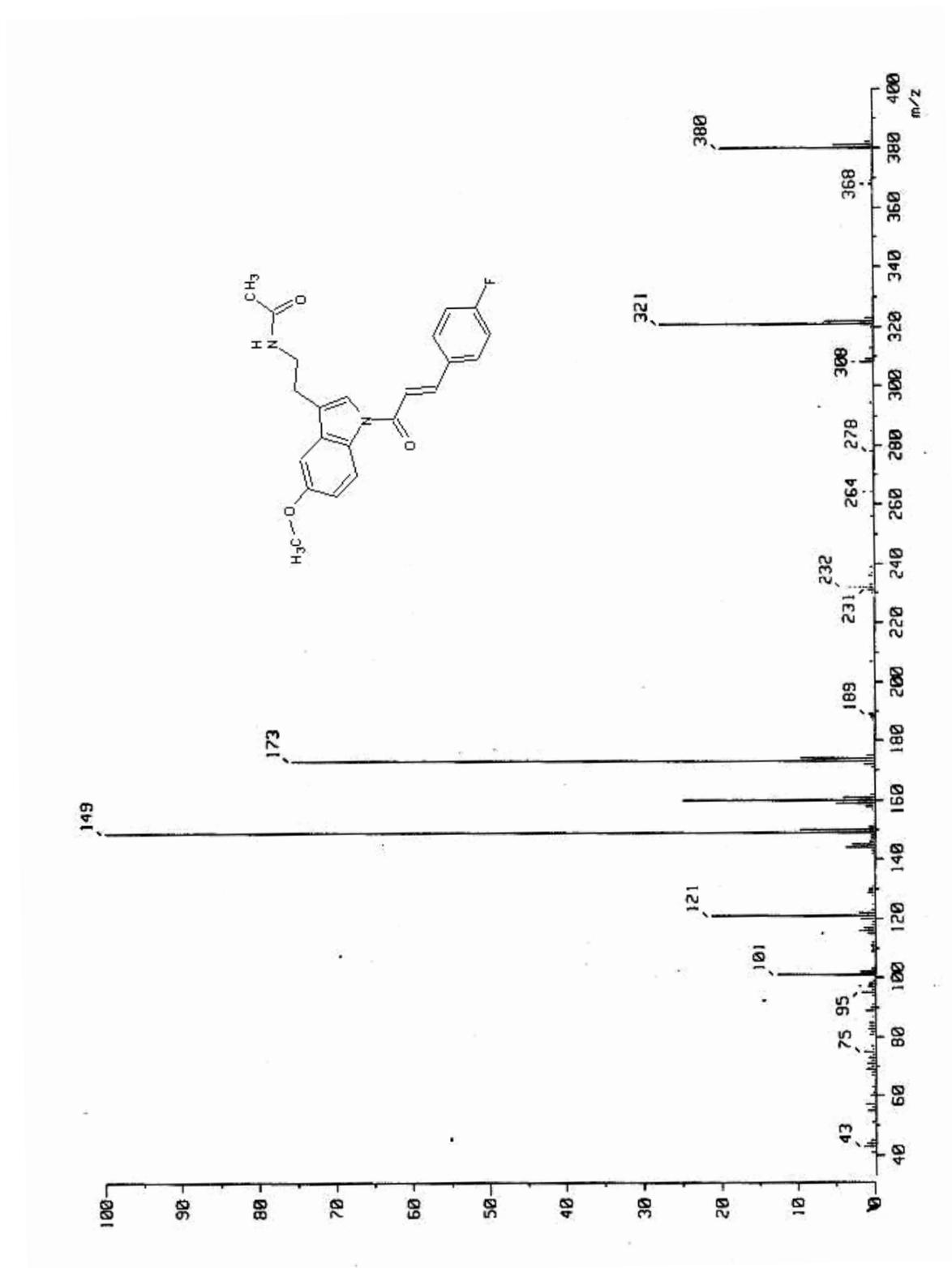
Espectro de masas para el compuesto M2D.



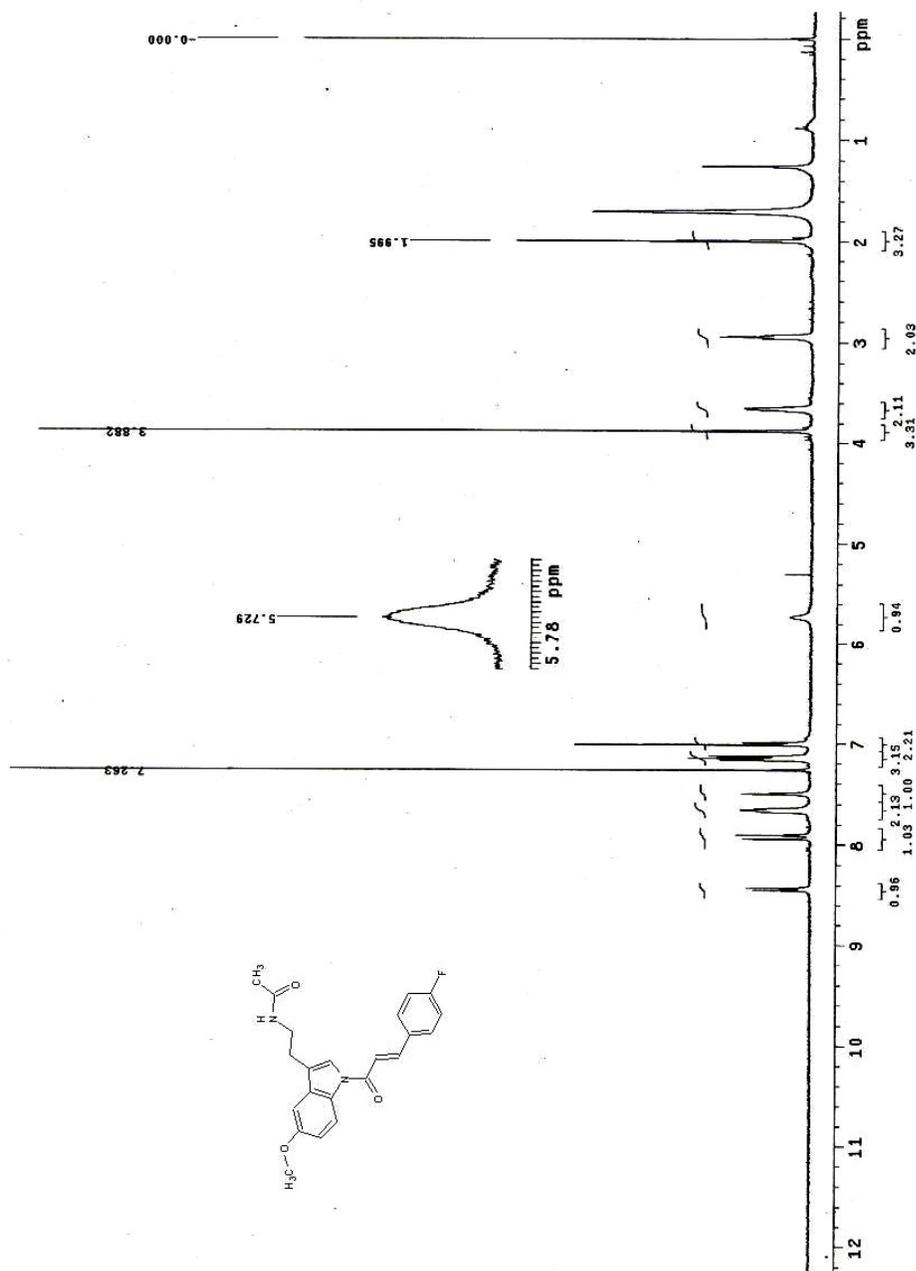
Espectro de RMN ¹H del compuesto M2D



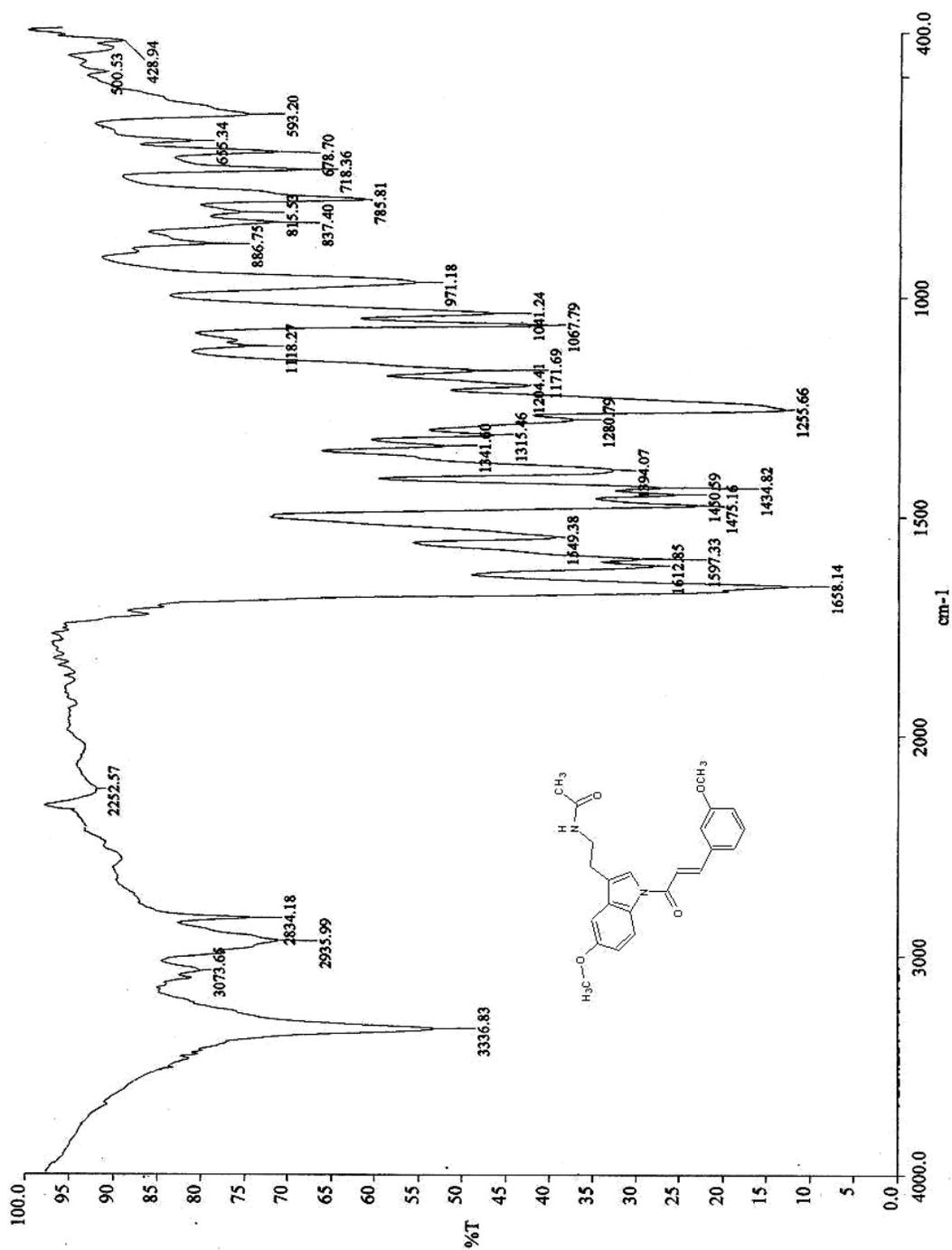
Espectro de infrarrojo del compuesto M3D.



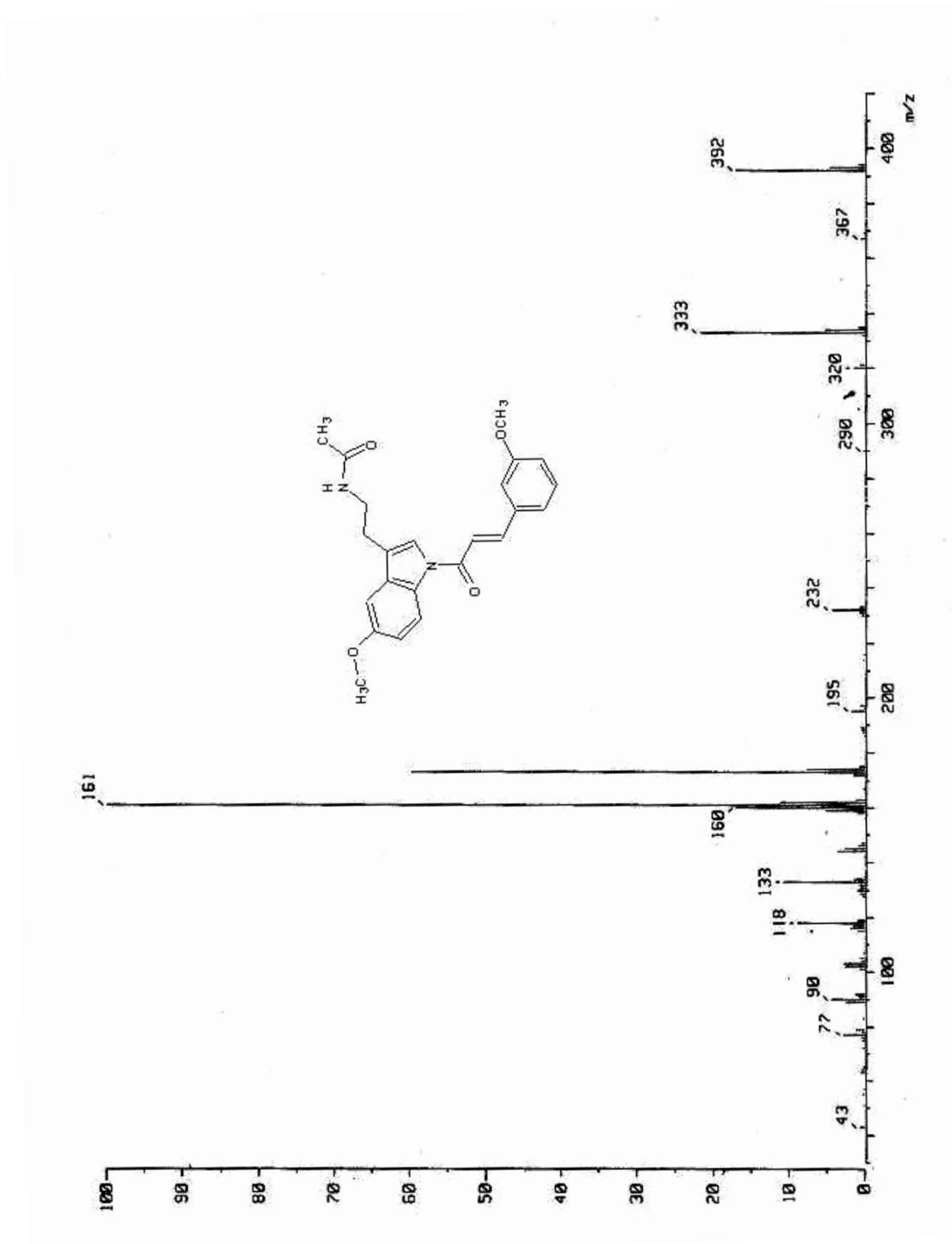
Espectro de masas del compuesto M3D.



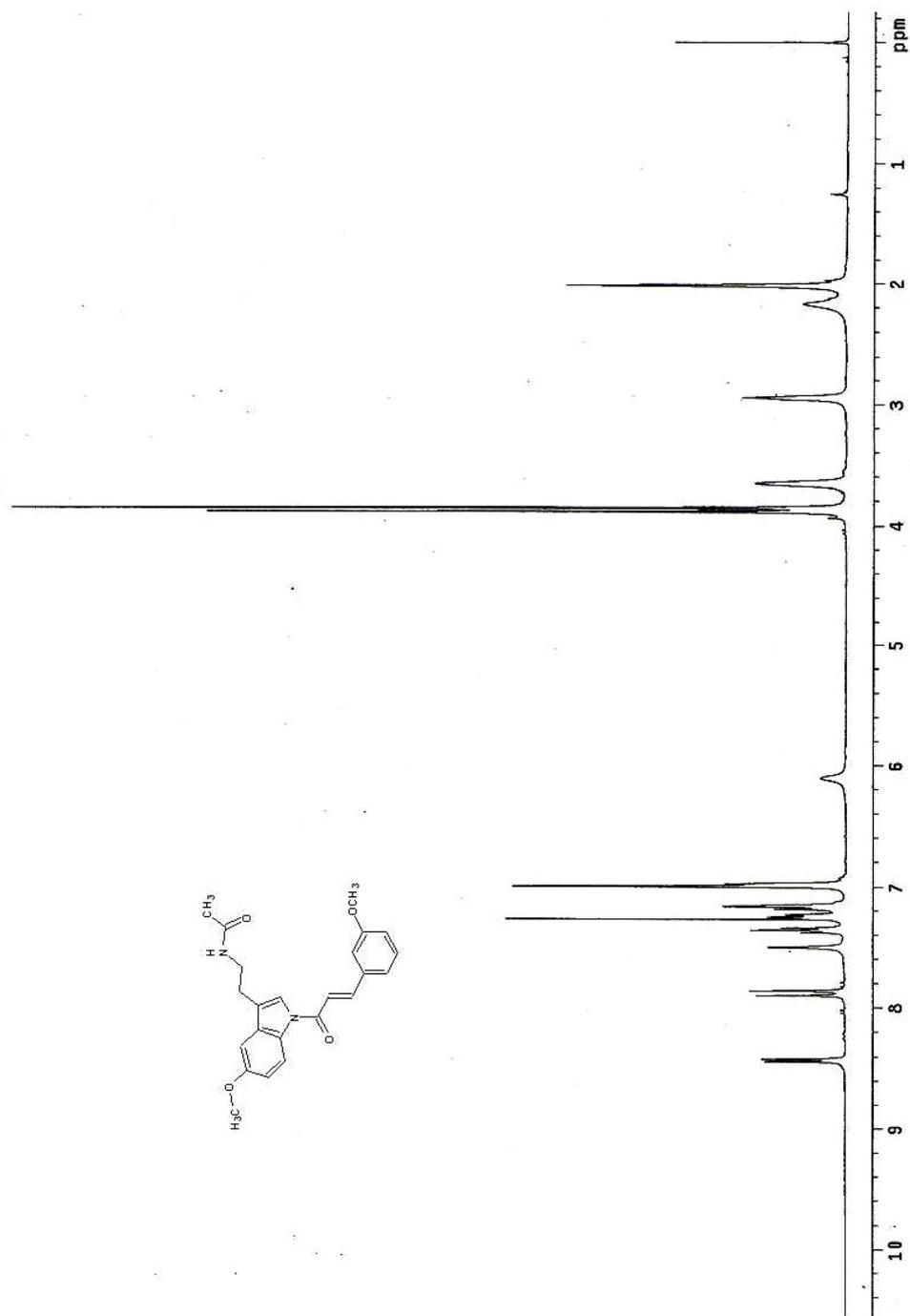
Espectro de RMN ¹H del compuesto M3D



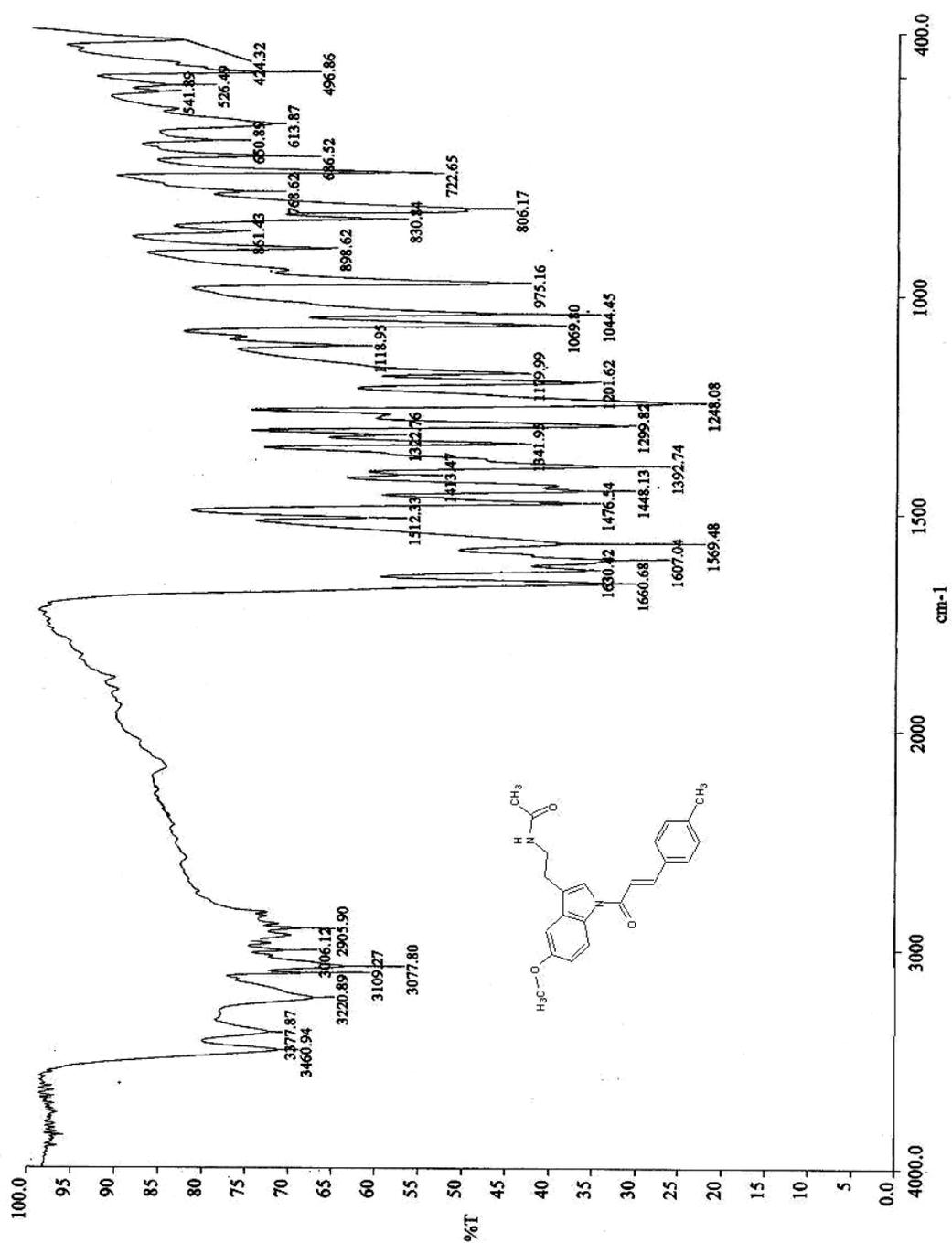
Espectro de infrarrojo del compuesto M4D.



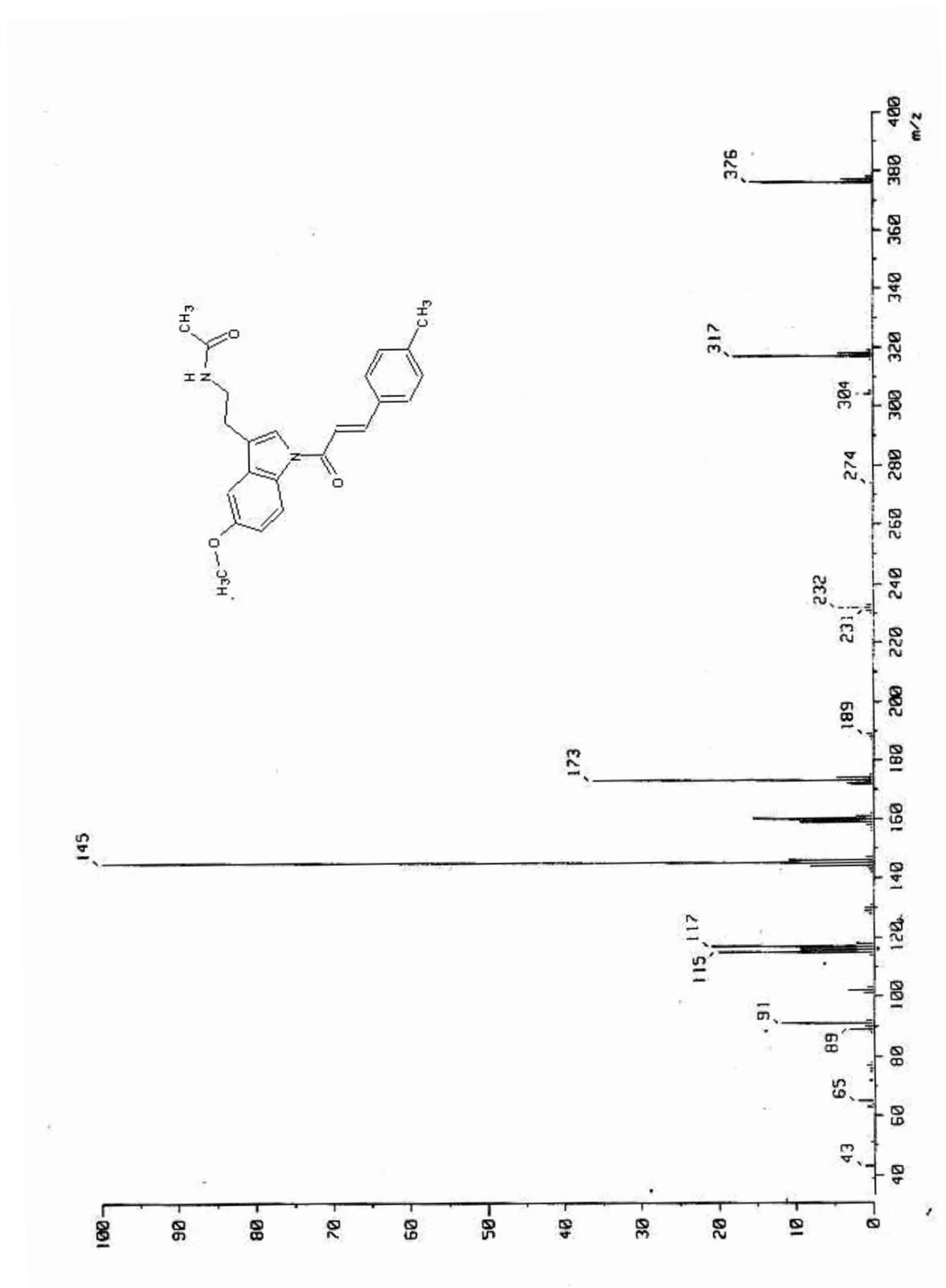
Espectro de masas del compuesto M4D.



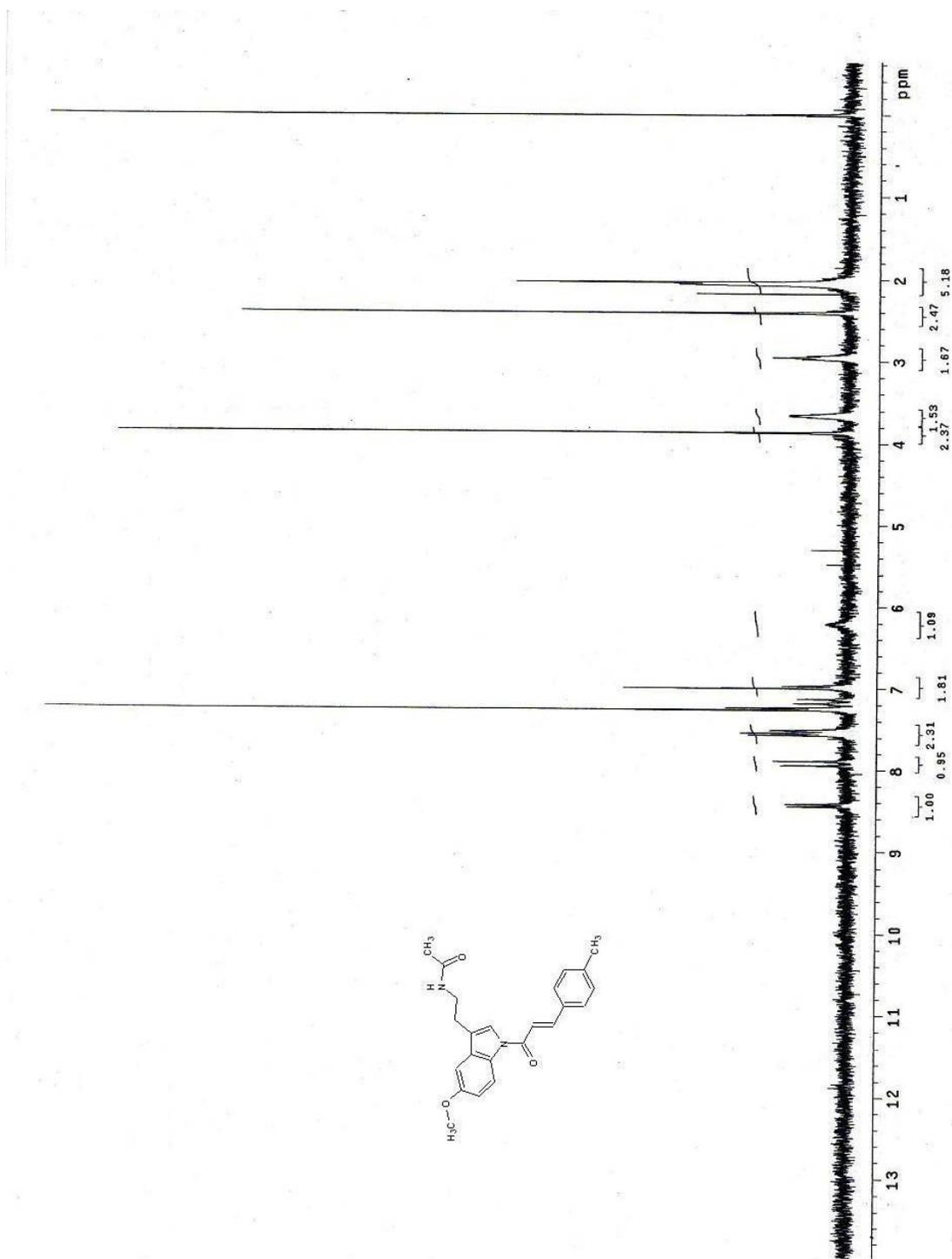
Espectro de RMN ¹H del compuesto M4D

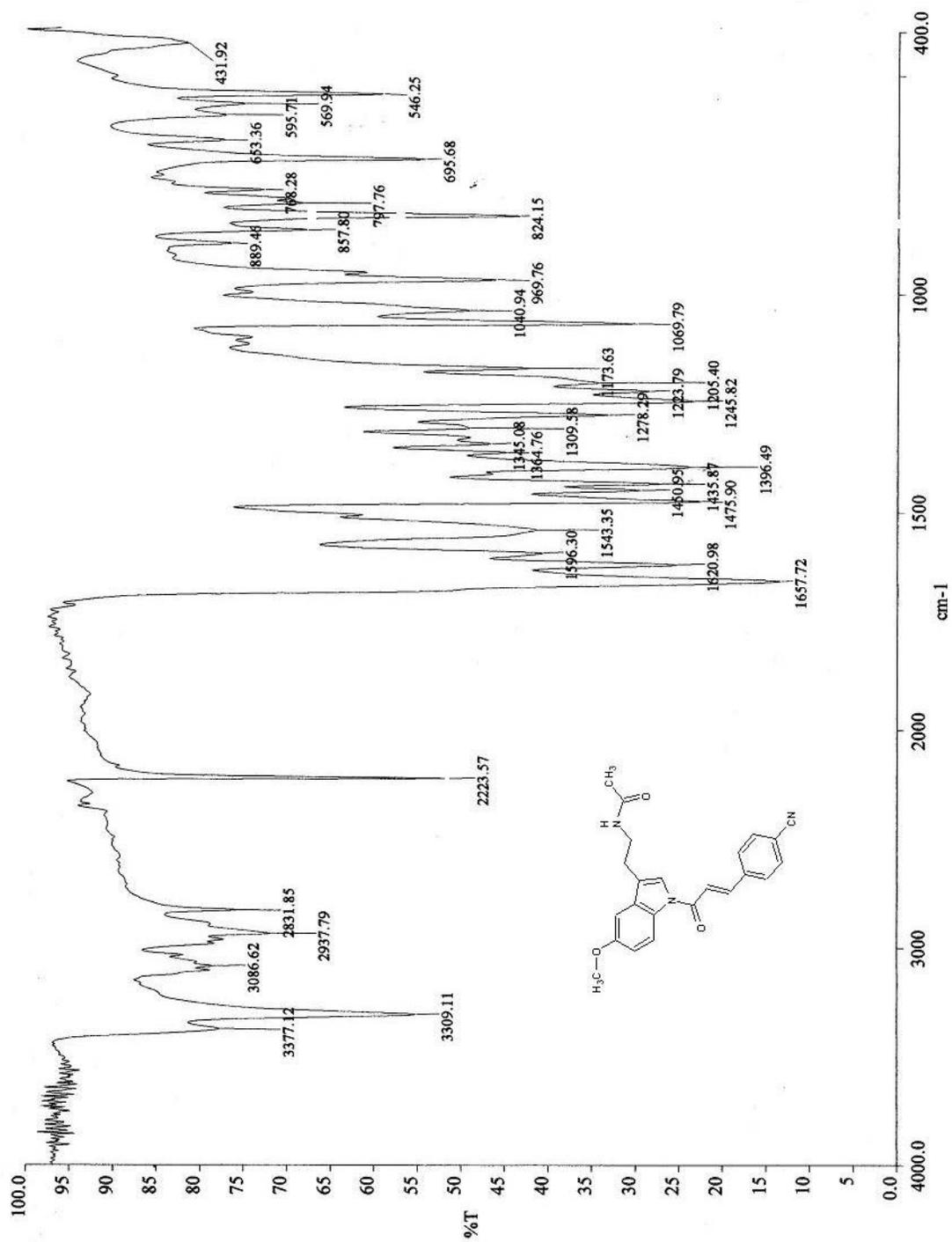


Espectro de infrarrojo del compuesto M5D.

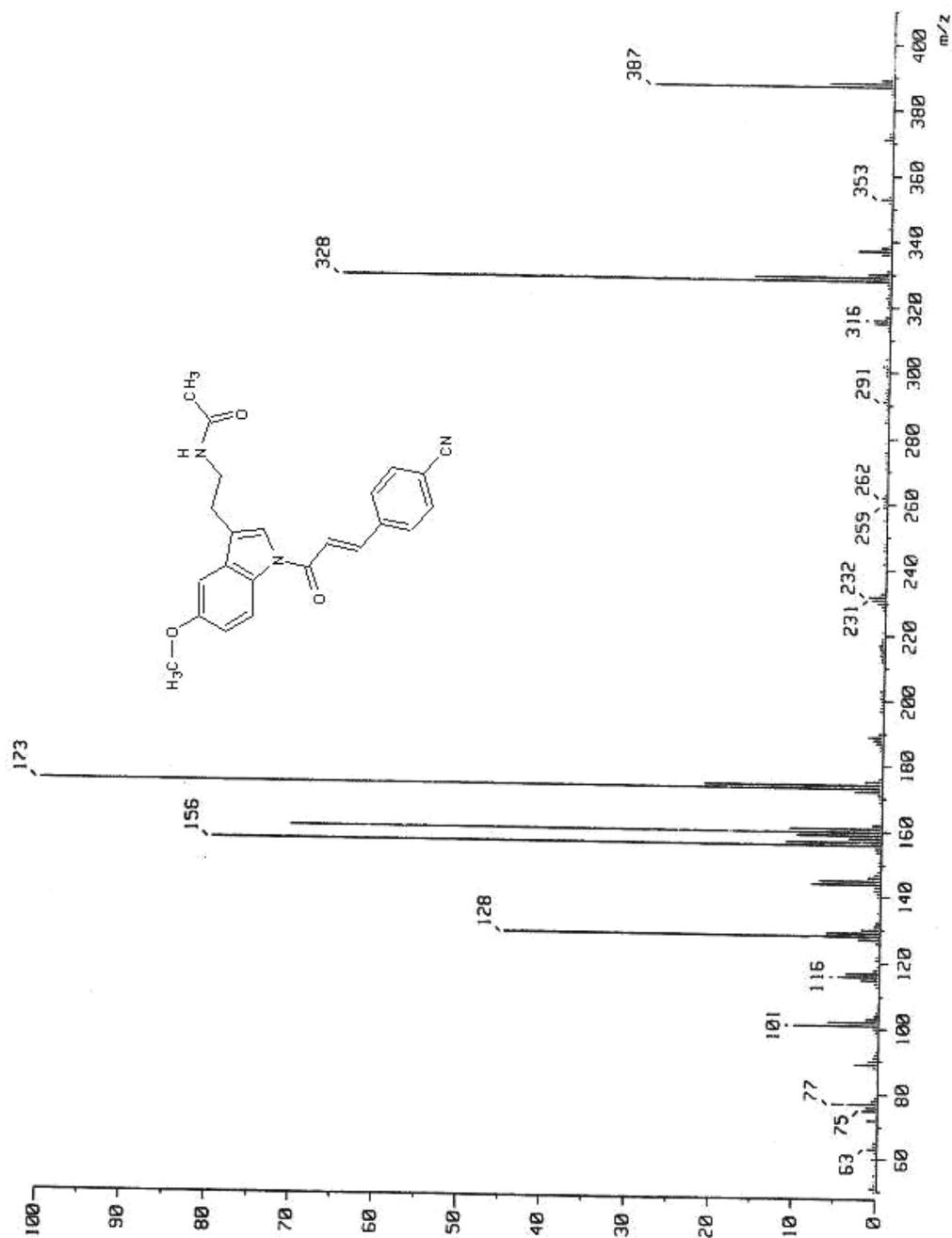


Espectro de masas del compuesto M5D.

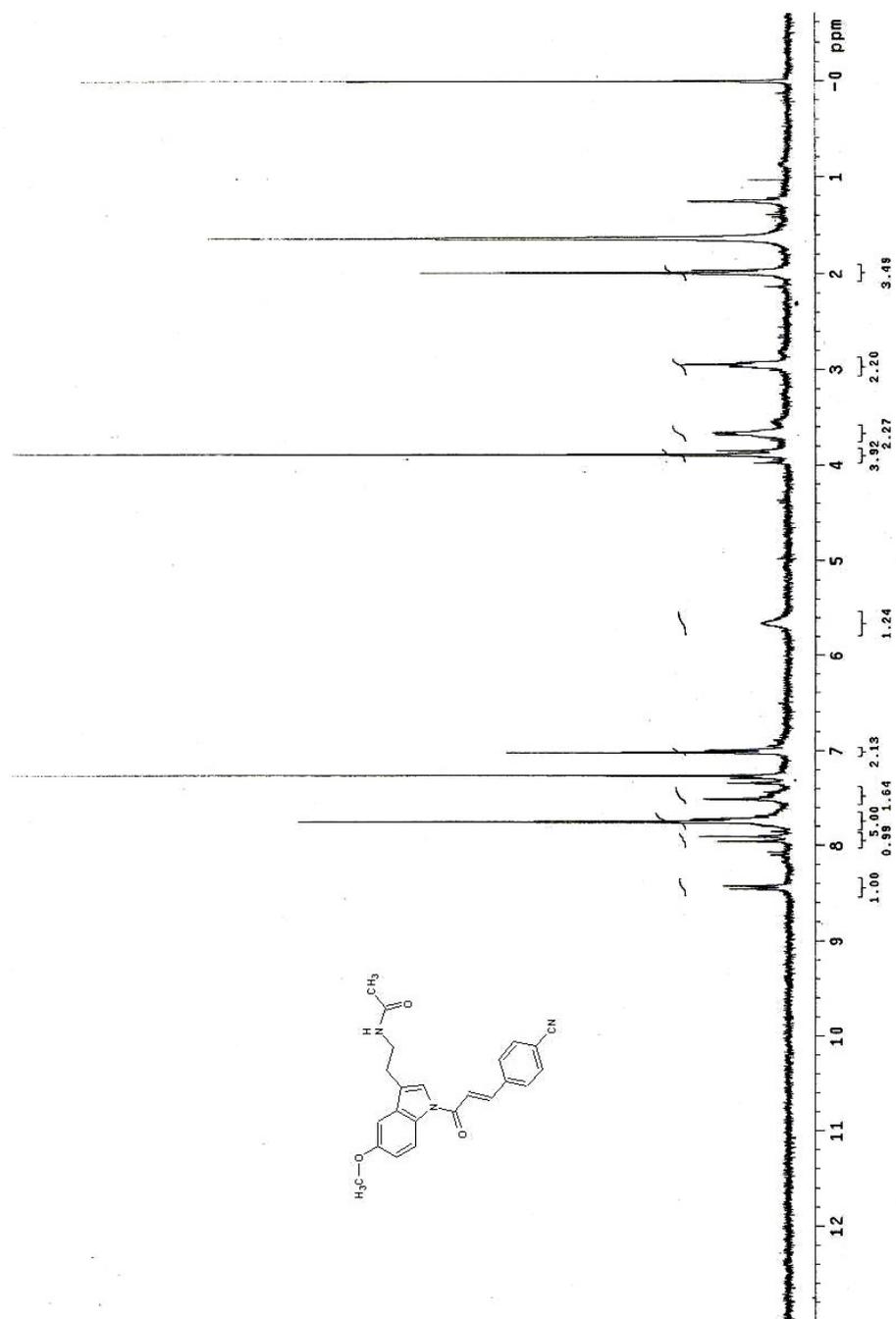
Espectro de RMN ^1H del compuesto M5D



Espectro de IR del compuesto M6D.



Espectro de Masas del compuesto M6D.



Espectro de RMN ^1H del compuesto M6D