



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

SÍNTESIS DE AMIDAS DERIVADAS
DEL ÁCIDO 12-FENILACETILRICINOLEICO
CON POTENCIAL EFECTO ANTI-ALODÍNICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO ACADÉMICO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

P R E S E N T A

JUAN JOSÉ GÓMEZ ASTUDILLO

DIRECTOR: Dr. MANUEL LÓPEZ ORTIZ

ASESORES:

Dr. ERICK ALBERTO CORREA PADILLA

Dr. SEBASTIÁN MARTÍNEZ FLORES

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL 2024.



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.



Lugar donde se desarrolló este trabajo

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Síntesis de Fármacos, L-9, primer piso de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Batalla 5 de mayo esq. Fuerte de Loreto, Colonia Ejército de Oriente, Iztapalapa, C.P. 09230, Ciudad de México, México.

Congreso:

Parte de estos resultados se presentaron en el 19° Congreso de investigación de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza- UNAM, con el trabajo “Síntesis de amidas derivadas del ácido 12-fenilacetilricinoleico con potencial efecto anti-alodínico”. Septiembre de 2023.



Dedicatoria

A mis padres **Juan Gómez y Maribel Astudillo**, quiero agradecerles de corazón por el constante apoyo, consejo y cariño que me han brindado durante mi carrera universitaria. Su aliento inquebrantable y amor incondicional fueron la motivación detrás de cada logro. Este logro no solo es mío, sino también de ustedes, mis pilares y fuentes de inspiración. Gracias por ser mi faro en este viaje.

A mis abuelos **Ernesto Astudillo y Hermelinda Peralta**, mis segundos padres, que siempre han estado ahí presentes y especialmente cuando les he necesitado, por sentirse orgullosos de quien soy y lo que he logrado y darme todo su amor y apoyo. Gracias desde lo más profundo de mi corazón.

A mis hermanos **Sayra, Avimael y Marisol Gómez**, gracias por el apoyo en todo momento de este camino, por los momentos de risas compartidas y por el consuelo en los momentos difíciles. Su presencia desde niño ha llenado mi vida de alegría y significado. Aprecio cada gesto de amabilidad y la forma en que nos apoyamos mutuamente. Estoy agradecido con la vida por tener a cada uno de ustedes, no los cambiaría.



Agradecimientos

- **Universidad Nacional Autónoma de México**

Por la beca otorgada en el programa de BECAS DE TITULACIÓN-ALTO RENDIMIENTO ACADÉMICO 2023-2024, y todas las herramientas esenciales para mi formación académica, social y cultural durante mi periodo de estudio.

- **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM**

Por la oportunidad de llevar a cabo mis estudios de licenciatura y de conocer a profesores excepcionales. Sin su apoyo, hubiera enfrentado dificultades para culminar esta etapa académica.

- **Laboratorio de Síntesis de Fármacos, UMIEZ, FES Zaragoza, UNAM.**

Por permitirme adquirir nuevos conocimientos y consolidar los previamente adquiridos, por concluir satisfactoriamente mi servicio social y la elaboración de esta tesis.

- **Instituto de Química UNAM**

En especial a los técnicos: Elizabeth Huerta, Ma. Delos Ángeles Peña, Beatriz Quiroz, Virginia Gómez, Mayra León y Adriana Romo, por el apoyo brindado en la obtención de los Espectros de Resonancia Magnética Nuclear.



Agradecimientos

A mi Maestro Jedi **Manuel López** por todo lo que me ha enseñado estos años, por la confianza, los consejos, todos los buenos momentos y sobre todo por el apoyo y lealtad que me han brindado.

A mis asesores, **Erick Padilla**, por sus consejos para mejorar como persona y en el entorno académico, y a **Sebastián Flores**, por el apoyo en obtener cada una de las espectroscopias de este proyecto, resolver mis dudas, así como los consejos brindados.

A mis amigos y compañeros de laboratorio **Cynthia Juárez y Erick Rangel**, qué fueron parte fundamental en mi estadía en el L-9, por apoyarme, aconsejarme y alentarme a ser mejor. Ustedes ocasionaron que disfrutara trabajar. Gracias por todas las risas y grandes momentos dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigos; **Aidé Barrón, Ana Karen Rul, Arturo Estrada, Alejandra Avendaño, Daniel Zúñiga, Diana Adame, Diego Arroyo, Erick Espinoza, Fernando Silva, Gael Marmolejo, Guadalupe Vázquez, Itzel Feria, José Villamil, Kevin Catalán, Kevin Mendoza, Leny Mejía, Lisandro Castañeda, Obed Bello, Rodrigo Silva, Sara Hernández, Tania Torres y Valkiria García**, que fueron y son una parte fundamental en mi formación como persona y estudiante, que sin su apoyo, consejo y cariño me hubiera perdido en el camino, por la ayuda y todas las experiencias vividas a su lado.

A mi pareja **Stephany Trejo**, que siempre me apoyó y estuvo a mi lado como mi compañera, confidente e inspiración, cada paso ha sido más significativo gracias a ella. Aprecio profundamente su presencia y agradezco la inspiración y estabilidad que aporta a mi vida.



Tabla de contenido

Abreviaturas, acrónimos, símbolos y fórmulas.....	VII
1. Resumen.....	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1. Dolor.....	3
3.1.1. Mecanismo del dolor	5
3.1.2. Dolor neuropático.	7
3.1.3. Mecanismo periférico de la vía nociceptiva en DN	7
3.2. Cannabinoides.....	8
3.2.1. Sistema endocannabinoide.....	9
3.2.2. Receptores cannabinoides.....	9
3.2.3. Receptor CB1	10
3.2.4. Receptor CB2	10
3.2.5. Endocannabinoides	11
3.3. Ácido ricinoléico.....	14
3.3.1. Derivados del ácido ricinoleico con actividad cannabinoide.....	15
4. Planteamiento del problema	16
6. Pregunta de investigación	16
7. Objetivos.....	16
8. Método	18
8.1. Técnicas, materiales o instrumentos.....	18
8.2. Reactivos y materias primas	19
8.3. Disolventes	19
8.4. Cristalería.....	19
8.5. Materiales y equipos	20
8.6. Variables	20
9. Hipótesis.....	20
10. Diseño de estudio	20
11. Procedimiento	21



12. Resultados	28
12.1. Propiedades de los compuestos	28
12.1.1. PhAR-DBH-Me 6.	28
12.1.2. PhAR-DOPA 7.....	29
12.1.3. PhAR-ETA 8.....	30
13. Discusión de resultados	31
13.1. Ricinoleato de metilo 9.	32
13.2. 12-fenilacetilricinoleato de metilo 10.....	33
13.3. Ácido 12-fenilacetilricinoleico 11.....	34
13.4. PhAR-DBH-Me 6 y PhAR-ETA 8.	35
13.5. PhAR-DOPA 7.....	36
13.6. Caracterización espectroscópica	37
14. Conclusión	38
15. Referencias	39
16. Anexos	42
16.1. Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear	42
16.1.1. Ricinoleato de metilo 9.	42
16.1.2. 12-fenilacetilricinoleato de metilo 10.....	44
16.1.3. Ácido 12-fenilacetilricinoleico 11.....	46
16.1.4. PhAR-DBH-Me 6.	48
16.1.5. PhAR-DOPA 7.....	49
16.1.6. PhAR-ETA 8.....	51
16.2. Espectrometría de Masas de Alta Resolución	53
16.2.1. PhAR-DOPA 7.....	53
16.2.2. PhAR-ETA 8.....	54



Abreviaturas, acrónimos, símbolos y fórmulas.

%	Por ciento de
°C	Grados centígrados
2-AG	2-araquidonil-glicerol
AcOEt	Acetato de etilo
AEA	<i>N</i> -araquidonil-etanolamida
AFA	Ácido fenilacético
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
Ca ²⁺	Ion calcio (II)
CB1	Receptor Cannabinoide 1
CB2	Receptor Cannabinoide 2
CCF	Cromatografía en capa fina
CH ₂ Cl ₂ / DCM	Diclorometano
Col.	Colaboradores
DBH Me	2-metil-(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano
DCC	<i>N,N</i> -diciclohexilcarbodiimida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DN	Dolor neuropático
EMAR	Espectrometría de Masas de alta resolución
Et ₃ N	Trietilamina
FAAH	Amidohidrolasa de ácidos grasos
g	Gramo (s)
h	Hora (s)
K ⁺	Ion potasio
KOH	Hidróxido de potasio
MAP quinasas	Vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos
MeOH	Metanol
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mmolar	Milimolar
MTBE	Metil-terbutil éter
PhAR-DBH-Me	(<i>R,Z</i>)-18-((1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-5-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il)-18-oxooctadec-9-en-7-il fenilacetato
Proteínas G	Proteína fijadora de nucleótido de Guanina
PvCl	Cloruro de pivaloilo
RCB/CB	Receptor (es) Cannabinoide (s)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Hidrogeno



SNC	Sistema nervioso central
THC	Delta-9-tetrahidrocannabinol
TMS	Tetrametilsilano
μL	Microlitro (s)



SÍNTESIS DE AMIDAS DERIVADAS DEL ÁCIDO 12-FENILACETILRICINOLEICO CON POTENCIAL EFECTO ANTI-ALODÍNICO.



1. Resumen

El dolor es una sensación desagradable que está relacionada con el daño en los tejidos del cuerpo, puede presentarse como el dolor neuropático (DN).¹ Para abordar este problema, se han desarrollado varios tratamientos, uno de los cuales se centra en la anandamida. La anandamida es una sustancia endógena, que se une a los receptores cannabinoides CB1 y CB2, se ha demostrado su capacidad de reducir este tipo de dolor. Teniendo en cuenta lo anterior, el equipo de investigación conformado por López-Ortiz M. y colaboradores.² desarrolló una serie de compuestos con potencial actividad sobre receptores cannabinoides. En este proyecto, se sintetizaron dos nuevos análogos de anandamida con el potencial de ser efectivas contra el dolor neuropático y el ya presentado por López-Ortiz M. y colaboradores.² La síntesis partió del aceite de ricino que es la fuente principal de ricinoleato de metilo. Mediante una transesterificación, fenilacetilación y una reacción enzimática quimioselectiva, se obtuvo el ácido 12-fenilacetilricinoleico, el cual se acopló a algunas aminas (DBH, dopamina y etanolamina.) Se logró la obtención satisfactoria de los compuestos; (R , Z)-18-((1 S ,4 S)-5-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il)- 18-oxooctadec-9-en-7-il fenilacetato (PhAR-DBH-Me) **6**, 2-fenilacetato de (R ,Z)-17-(3,4-dihroxifenetilcarbamoil)heptadec-9-en-7-ilo (PhAR-DOPA) **7** y 2-fenilacetato de (R , Z)-17-(2-hidroxietilcarbamoil)heptadec-9-en-7-ilo (PhAR-ETA) **8**, Todos los compuestos se caracterizaron mediante análisis de RMN H¹ y C ¹³ de las amidas **6**, **7** y **8**. Los compuestos finales fueron enviados para su evaluación farmacológica.



2. Introducción

A lo largo de su existencia el ser humano experimenta sensaciones desagradables donde muchas de ellas están asociadas con lesiones musculares, tales como las derivadas de caídas o golpes. Estos padecimientos se clasifican temporalmente en agudos, de corta duración y crónicos, siendo estos últimos aquellos que persisten por más de 3 o 6 meses, dependiendo de la gravedad y otros factores vinculados con aspectos mentales, emocionales y ambientales.

Cuando ocurren problemas directos en el sistema nervioso somatosensorial debido a lesiones mecánicas, ocupacionales, enfermedades o procesos oncológicos en los nervios periféricos, así como a enfermedades desmielinizantes, se manifiesta un tipo de dolor conocido como neuropático. Este fenómeno conlleva una pérdida significativa de calidad de vida para aquellos que lo padecen.

En el caso de daño neuronal, se generan modificaciones estructurales y funcionales en la vía nociceptiva, alterando los impulsos del dolor y dando lugar a sensaciones anómalas y un incremento en la percepción del dolor.

En este contexto, la anandamida emerge como un ligando endocannabinoide que se une a los receptores cannabinoides CB1 y CB2, demostrando su capacidad para reducir la ansiedad y el dolor.^{3,4}

En la búsqueda de soluciones farmacológicas innovadoras para abordar este desafío de salud, se han identificado a las amidas como posibles agentes terapéuticos para tratar los efectos alodínicos producidos por neuropatologías, investigación conformada por López-Ortiz M. y colaboradores.^{2, 5-7} En el marco de este proyecto, se propone la síntesis de tres nuevas amidas derivadas del ácido 12-fenilacetilricinoleico, las cuales podrían presentar una actividad similar o incluso superior a la de la anandamida en la supresión de la alodinia neuropática.



3. Marco teórico

3.1. Dolor

El dolor es un mecanismo de defensa fundamental para la supervivencia de los seres humanos y otros organismos. Su función principal es detectar y localizar los procesos que pueden dañar las estructuras corporales, permitiendo así una respuesta rápida para evitar un mayor deterioro. Sin embargo, el dolor es un fenómeno extremadamente complejo y multifacético que va más allá de su función de alarma biológica. En este texto, explicaremos en profundidad la naturaleza del dolor y sus dimensiones tanto físicas como emocionales.¹

Aunque el dolor suele estar asociado con una lesión o patología, es importante destacar que no siempre es así. El dolor puede ser experimentado de manera subjetiva, lo que significa que una persona puede sentir dolor incluso en ausencia de una lesión física evidente. Esta característica subjetiva del dolor hace que su estudio y tratamiento sean aún más desafiantes, ya que no siempre es posible correlacionar la intensidad del dolor con la gravedad.

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) ha proporcionado una definición que aborda tanto la naturaleza sensorial como emocional del dolor. Según la IASP, el dolor es "Una experiencia sensorial y emocional desagradable, relacionada con lesión tisular real o potencial en términos de daño tisular". Esta definición destaca que el dolor no es simplemente una respuesta física ante un estímulo nocivo, sino que también involucra una dimensión emocional significativa. Las emociones asociadas al dolor pueden incluir ansiedad, miedo, angustia y sufrimiento.^{1, 8}

Además, es importante comprender que el dolor no es una experiencia uniforme para todos. La percepción del dolor puede variar ampliamente de una persona a otra debido a factores genéticos, psicológicos, sociales y culturales. Lo que puede ser tolerable para una persona puede ser insoportable para otra.

En la búsqueda de alivio del dolor, se han desarrollado numerosas estrategias y tratamientos a lo largo de la historia de la medicina. Estos incluyen desde analgésicos



simples hasta terapias más avanzadas, como la estimulación eléctrica y la terapia cognitivo-conductual. Sin embargo, el tratamiento del dolor sigue siendo un desafío, especialmente cuando se trata de dolor crónico, que puede persistir durante meses o incluso años.^{1, 8-9}

Hay diferentes tipos de dolor, clasificándose de múltiples formas para describirlo según la duración, origen o la causalidad.^{1, 10}

- Según su duración:
 - Dolor agudo: por ser de corta duración, por lo general, tiende a estar fácilmente identificado en una ubicación específica, desaparece con la curación del tejido afectado
 - Dolor crónico: que se prolongan por más de 3 o 6 meses, relacionándose con alguna afección crónica, no se puede prevenir y algunos factores afectivos, psicológicos y ambientales repercuten en él.
- Según su origen:
 - Dolor nociceptivo: el dolor nociceptivo generalmente se origina por la actividad de los receptores del dolor (nociceptores) a causa de una lesión o enfermedad que impacta en estructuras corporales tales como la piel, músculos, tendones y ligamentos, así como en huesos y articulaciones.
 - Dolor neuropático:
El dolor neuropático se describe como el dolor que proviene de una afección o daño en el sistema nervioso periférico o central relacionado con la percepción somatosensorial.
Se caracteriza por sensaciones anormales como ardor, hormigueo, pinchazos o choques eléctricos. A menudo es crónico y puede persistir incluso después de que la lesión inicial haya sanado. Este tipo de dolor es causado por afecciones como neuropatía diabética.



- Según su localización:
 - Dolor somático: El dolor somático es un tipo de dolor que se origina en las estructuras superficiales del cuerpo, como la piel, los músculos, los huesos y las articulaciones. Se caracteriza por ser bien localizado y puede ser causado por lesiones traumáticas o afecciones médicas que afectan estas áreas. El dolor somático suele sentirse como un dolor agudo o punzante en la zona afectada
 - Dolor visceral: El dolor visceral es un tipo de dolor que se origina en los órganos internos del cuerpo, como el corazón, el hígado, los riñones o el intestino. A diferencia del dolor somático, es más difuso y suele ser mal localizado, lo que significa que es difícil precisar su ubicación exacta. Este tipo de dolor puede ser causado por enfermedades de los órganos internos y se describe a menudo como una sensación de presión, distensión o cólico.

3.1.1. Mecanismo del dolor

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable que puede variar en intensidad y duración. Se origina a nivel periférico debido a diversos estímulos que causan lesiones tisulares. Estos estímulos pueden ser de naturaleza mecánica, térmica, química o pueden implicar la acción de sustancias inflamatorias. Cuando se produce una lesión tisular o un daño en el cuerpo, se inicia una cascada de eventos bioquímicos y neurológicos que culminan en la percepción del dolor.^{11, 12}

Uno de los principales actores en la generación y transmisión del dolor son las prostaglandinas. Estas son sustancias químicas liberadas como parte de la respuesta inflamatoria del organismo. Las prostaglandinas tienen la capacidad de activar los nociceptores, que son receptores sensoriales especializados en detectar estímulos dolorosos. Estos nociceptores son responsables de transmitir la información sobre el dolor desde el lugar de la lesión hasta el sistema nervioso central.^{11, 12}

En el proceso de transmisión del dolor, se distinguen dos tipos principales de fibras nerviosas: las fibras A delta y las fibras C.^{11, 12}



Las fibras A delta son gruesas y mielinizadas, lo que significa que están recubiertas por una capa de mielina y son capaces de transmitir señales de dolor de manera rápida. Estas fibras son responsables de la percepción del dolor agudo, como el que se siente inmediatamente después de un corte o una quemadura.

Por otro lado, las fibras C son más delgadas y no están mielinizadas, lo que las hace más lentas en la transmisión de señales. Estas fibras son responsables de transmitir el dolor de tipo quemante y persistente, como el que se experimenta en casos de inflamación crónica o daño tisular prolongado. La información llega al sistema nervioso central (SNC) en la médula espinal, concretamente a las astas posteriores de la vía sensitiva, que reciben señales provenientes de los nociceptores, enviadas por la vía espinotalámica hasta el tálamo, el principal integrador de información del SNC, dirige la información a una parte específica de la corteza cerebral, que reacciona y manda una respuesta de defensa o inhibitoria.

Concretamente la transmisión del dolor se divide en 4 fases:⁸

- Transducción: proceso donde por un estímulo nociceptivo es convertido a una señal eléctrica, esta genera indicadores de dolor (enrojecimiento, hinchazón)
- Transmisión: la señal eléctrica es transmitida a la médula espinal, al tálamo y finalmente a la corteza cerebral a través de las fibras C y fibras A delta, como se muestra en la figura 1
- Interpretación cerebral: el tálamo da la interpretación a estos estímulos dentro de la corteza cerebral y da la interpretación de las sensaciones del dolor.
- Modulación: aquí se dan los cambios una vez recibida la respuesta lo que permite que esta señal sea inhibida por medio de neurotransmisores que actúan en la capa superficial de la médula espinal.

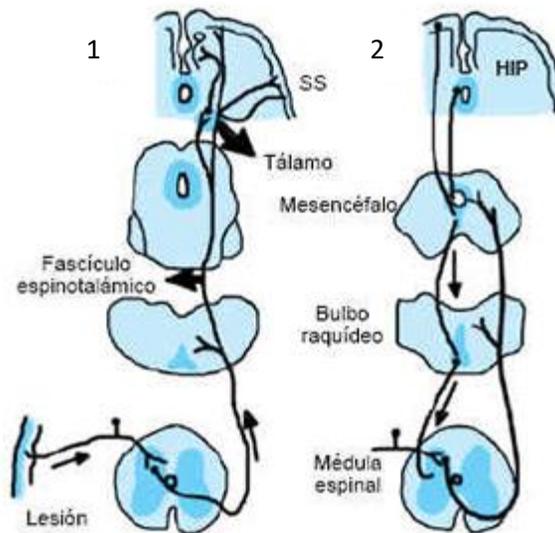


Figura 1. 1) Transmisión del dolor. 2) Modulación del dolor.⁸

3.1.2. Dolor neuropático.

El dolor neuropático (DN) es una experiencia sensorial y emocional desagradable que impacta en la calidad de vida, la salud general y emocional, definiéndose concretamente como un dolor causado por una lesión o enfermedad en el sistema nervioso somatosensorial.¹³ Perdiendo con el tiempo la índole de un dolor agudo para convertirse en uno permanente, por tanto, es un dolor crónico y patológico.¹²

Su clasificación se da en DN periférico y DN central siendo las principales afecciones del periférico las lesiones mecánicas, funcionales, infecciones, así como procesos oncológicos de los nervios periféricos, y en la central las lesiones e infartos medulares, así como enfermedades desmielinizantes.¹²

3.1.3. Mecanismo periférico de la vía nociceptiva en DN

Al producirse algún daño neuronal, aparecen cambios estructurales y funcionales en la vía nociceptiva que alteran el proceso de los impulsos dolorosos y esto termina en la permanencia del dolor de forma anómala y excesiva, sin estímulo o respuesta por mecanismos que no originan dolor (alodinia). Por tanto hay una hipersensibilidad en las



neuronas nociceptivas, provocando dolor ante estímulos que deberían de estar bajo el umbral de dolor.

El proceso del DN se da en tres fases.

1. Reacción inflamatoria e inmunológica. Tras la lesión nerviosa, hay una reacción inflamatoria e inmunológica liberando glóbulos blancos, alcanzando el máximo en semanas posteriores a la lesión y persistiendo por más de dos meses perpetuando la reacción neuro inflamatoria.
2. Neurogénesis anormal. Tras la lesión nerviosa, algunos axones se degeneran y forman tumores (neuromas) causando generación de mayor número de mensajes nociceptivos lo que contribuye a incrementar impulsos dolorosos.
3. Alteraciones en estructuras moleculares. Al alterarse la síntesis de proteínas en las neuronas primarias se da la hipersensibilidad de estas o de otras con sales iónicas, por ende, a mayor número de canales el umbral el dolor baja y se produce una hiperactividad en las neuronas dañadas.¹

3.2. Cannabinoides

Al hablar de cannabinoides nos referimos a toda aquella especie química lipídica perteneciente al grupo de terpenofenoles que independientemente de su origen o estructura, se enlace con los receptores cannabinoides. La principal fuente de cannabinoides de origen natural (fitocannabinoides) es la planta del *Cannabis Sativa*, también conocida como cáñamo o marihuana, la cual contiene cerca de 400 compuestos químicos de los cuales unos 60 son cannabinoides, entre todos estos se encuentra al *delta-9-tetrahidrocannabinol* (Δ^9 THC) mostrado en la figura 2 es el más abundante y estudiado por ser el responsable de efectos psicoactivos.^{14,15}

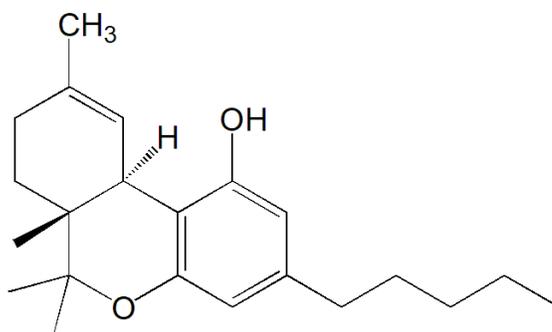


Figura 2. Estructura química del delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC) 1.

En la comunidad científica se ha divulgado su uso del Δ^9 THC como analgésico y antiespasmódico, desde hace más de 4000 años.¹⁶ Pero hasta el año 1964, se aisló y se comenzó a estudiar el comportamiento farmacológico, encontrando que este era responsable de los efectos psicoactivos de la marihuana.¹⁵

3.2.1. Sistema endocannabinoide

Tiempo después del aislamiento se identificaron receptores, surgiendo así el sistema endocannabinoide, el cual es un sistema neuromodulador del metabolismo, que se compone de receptores cannabinoides (CB o RCB), endocannabinoides también llamados ligandos, así como enzimas de recaptación, proteínas de biosíntesis, transporte y degradación.¹⁷⁻¹⁹

3.2.2. Receptores cannabinoides

Los receptores cannabinoides que hasta la fecha se han identificado son dos: el receptor CB1 y el receptor CB2 que se diferencian en la secuencia de aminoácidos dentro de su conformación,¹⁷ además de los mecanismos de señalización, distribución tisular y la sensibilidad a los agonistas y antagonistas, donde ellos pueden tener preferencia por uno u otro.²⁰



3.2.3. Receptor CB1

Este es el receptor acoplado a proteína G más abundante en las terminaciones nerviosas excitatorias e inhibitorias, y se encuentra localizado preferentemente en el sistema nervioso central²¹ en varias regiones, principalmente en las neuronas del cerebro, la médula espinal, teniendo grandes concentraciones en el hipotálamo, hipocampo, corteza frontal, ganglios basales, cerebelo, etc. siendo zonas que modulan el dolor, el procesamiento de la memoria y de movimientos. Su ubicación explica los efectos de su activación dando lugar a los efectos psicológicos, motores, en la circulación, así como sobre la memoria, el aprendizaje y su actividad como anticonvulsivante.¹⁵ También se encontraron los receptores CB1 en el centro y las periferias de las fibras C y fibras A. Esto ayuda a saber que tan efectivos son sus agonistas en el dolor neuropático producido por descargas irregulares de las fibras A.¹⁵

3.2.4. Receptor CB2

Este receptor se manifiesta en las células del sistema inmune, localizadas en células mieloides, macrófagos, monocito, y en menos cantidad en órganos como el hígado, una de sus principales funciones es la regulación de este sistema, puesto que, a diferencia de los CB1, no causan efectos psicológicos, convirtiéndose cada vez más en blanco de investigación.^{15, 17, 22}

La activación de los receptores produce la antinocicepción, la cual se refiere a la reversión o alteración de los aspectos sensoriales de la intensidad del dolor.²³

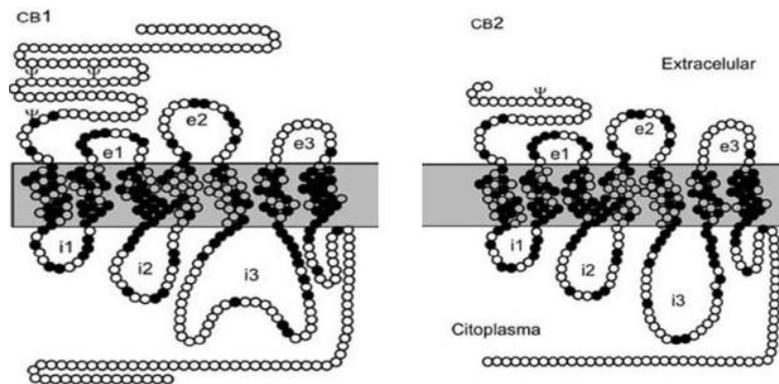


Figura 3: Estructura de los receptores cannabinoides tipo 1 y 2.

1) Receptor endocannabinoide CB1. 2) Receptor endocannabinoide CB2²⁴

3.2.5. Endocannabinoides

Se le conoce por endocannabinoide a cualquier molécula con características lipídicas perteneciente al grupo de los terpenofenoles y que es generada en el organismo.¹⁸ También son llamados como ligandos que es la denominación que recibe una molécula capaz de interactuar con un receptor.²⁵ Tras el descubrimiento de los receptores CB1 y CB2 se suponía la existencia de ligandos endógenos que fueran específicos para ellos, esto fue lo que motivó a realizar investigaciones en materia, fue hasta el año 1992 cuando se logró la extracción y purificación de un endocannabinoide encontrado en la zona cerebral en humanos y otros animales.¹⁵

A este nuevo ligando se la bautizó como anandamida, que es la *N*-araquidonil-etanolamida (AEA), tres años después se informó de otro compuesto de interés llamado 2-araquidonilglicerol (2-AG),²⁶ los cuales son derivados del ácido araquidónico que es un ácido graso polinsaturado el cual tiene relación con las prostaglandinas, encargadas de la respuesta inflamatoria y al dolor.^{15, 17}

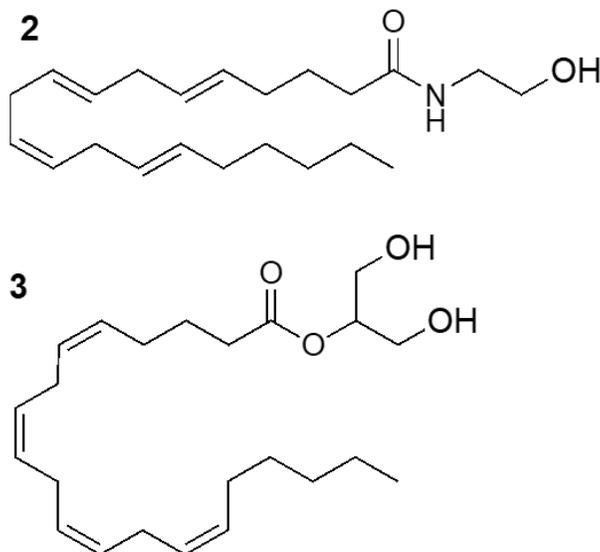


Figura 4. Estructura química de la anandamida (AEA) 2. El 2-araquidonil-glicerol (2-AG) 3.

3.2.5.1. Anandamida

La anandamida es un ligando endógeno a los receptores CB, está se identificó por primera vez en el cerebro porcino en 1992 por Devane et. Al.^{3, 4} Mediante espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN), los estudios realizados indican que tenía un efecto característico de los cannabinoides psicotrópicos lo que sugiere que este funciona como un cannabinoide endógeno. La anandamida, llamada químicamente *N*-araquidonil-etanolamida, esta proveniente del ácido araquidónico, qué dentro de su estructura contiene un grupo amida llamado etanolamida. Su síntesis se da mediante la hidrolisis de la *N*-araquidonil fosfatidiletanolamina, catalizado por una fosfolipasa, cuando el cuerpo requiere que esta sea liberada se hace mediante los canales de calcio. Una vez liberada se ancla a los receptores CB, afectando las regiones del cerebro que influyen en el placer, la memoria, el pensamiento, la concentración, el movimiento, la coordinación y la percepción del tiempo, el espacio y el dolor.²⁷

Una vez efectuada su función pasa a ser hidrolizada por la enzima amidohidrolasa de ácido graso (FAAH, *Fatty-acid amide hydrolase*) por ello su vida media es muy corta, dificultando así su aislamiento.^{28, 29}



3.2.5.2. Liberación de endocannabinoides.

A través de múltiples vías se liberan los endocannabinoides fuera de las células después de su producción, para activar los receptores CB1 y CB2, lo cual puede generar como respuesta una elevación en los niveles de calcio intracelular (Ca^{2+}) o la activación de receptores metabotrópicos. Los ligandos acoplados a CB regularán aspectos en las funciones del cerebro como la memoria, el aprendizaje, la transmisión sináptica y diferentes formas de la plasticidad a corto y largo plazo, además de influir en procesos de desarrollo y crecimiento, como la sinapsis y neurogénesis. Otras funciones biológicas moduladas por los endocannabinoides incluyen la ansiedad, el apetito, la inflamación y el dolor. Los endocannabinoides son diferentes de los neurotransmisores clásicos, ya que no se almacenan en vesículas, una vez liberados permanecen unidos a la membrana debido a su lipofilia, por lo que pueden llevarse de vuelta al interior celular a través de un complejo mecanismo de transporte de membrana con alta afinidad a la membrana celular y se degradan rápidamente al tener un efecto localizado y transitorio.¹⁷

3.2.5.3. Mecanismo de acción de los endocannabinoides.

El principal mecanismo de acción de ambos receptores consiste en el acoplamiento a proteínas G_i que al activarse inhibe la acción de la adenilato-ciclasa disminuyendo la síntesis de AMPc. Esto modula la capacidad de fosforilación de proteínas quinasas dependientes de AMPc y la activación de la vía de las MAP quinasas. Además, la activación de CB1 también induce la inhibición de canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q y un aumento de la conductancia del K^+ . Frecuentemente, estos receptores se localizan en terminaciones nerviosas regulando la liberación de otros neurotransmisores y protegiendo así frente a la sobre activación o sobre inhibición provocada por estos. Una vez cumplida su función, los endocannabinoides son reabsorbidos al espacio intracelular mediante un transportador de transducción de señales mediado por la membrana e hidrolizados por la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH, *Fatty-acid amide hydrolase*).

3.3. Ácido ricinoléico

La higuierilla es una planta que pertenece al género *Ricinus Lineus* que es abundante en toda la República Mexicana, siendo esta originaria de África y de la India, creciendo en regiones templadas y cálidas. Su importancia radica en que de las semillas de los frutos se extrae el aceite de ricino, específicamente de la especie *Ricinus communis* y es esta la que produce un aceite en mayor cantidad y calidad.^{30, 31}

En el mercado se conoce comúnmente con el nombre de aceite de higuierilla, de castor, de ricino o de palma christi, tiene usos variados por parte de diferentes industrias, como la jabonera, lubricantes, adhesivos, entre otras. Su aspecto se describe como un líquido viscoso, amarillento, transparente, verde pálido o rojizo, de olor y sabor característico, siendo soluble en solventes orgánicos.^{30, 31}

Este se compone de ácidos grasos en forma de triacilgliceroles, predominando el triacilglicérido del ácido ricinoléico en alrededor del 87% (figura 6).

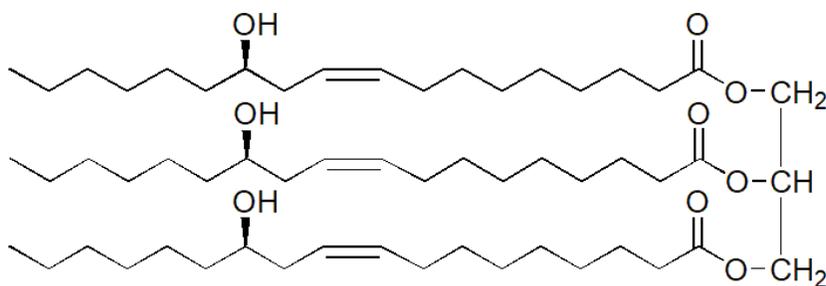


Figura 6. Estructura del triacilglicérido del ácido ricinoleico 4.

La molécula de triacilglicerol está conformada por unidades del ácido ricinoleico, (figura 7) el cual posee 18 átomos de carbono, con tres grupos funcionales altamente reactivos siendo estos: el hidroxilo en el carbono 12, el doble enlace en carbono 9, y el grupo ácido carboxílico en el carbono 1.^{30, 31}

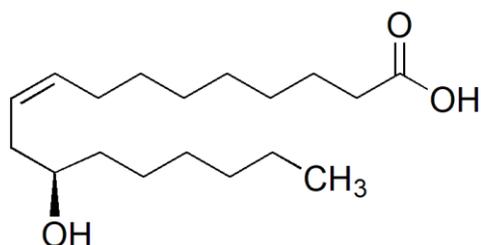


Figura 7. Estructura del ácido ricinoleico **5**.

3.3.1. Derivados del ácido ricinoleico con actividad cannabinoide

Recientemente se han desarrollado un cannabinoide sintético a partir de la molécula del ácido ricinoleico que tiene una estructura similar a la anandamida (AEA), esta es una amida diazabíciclica que lleva por nombre *(R,Z)*-18-((1*S*,4*S*)-5-metil-2,5-diazabíciclo[2.2.1]heptan-2-il)-18-oxooctadec-9-en-7-il fenilacetato (PhAR-DBH-Me) **6** (figura 8), a la cual se probaron sus efectos sobre algunas variables fisiológicas, revelando que posee actividad cannabinoide y que dicho efecto está mediado por el receptor CB1. Esta investigación es un parteaguas para el desarrollo de nuevas amidas las cuales podrían tener una mejor capacidad de suprimir la alodinia neuropática.^{2, 5-7}

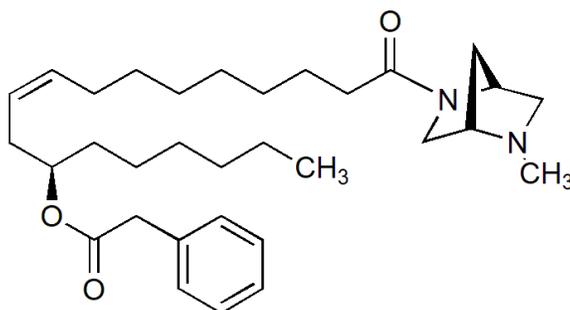


Figura 8. Estructura del *(R,Z)*-18-((1*S*,4*S*)-5-metil-2,5-diazabíciclo[2.2.1]heptan-2-il)-18-oxooctadec-9-en-7-ilfenilacetato (PhAR-DBH-Me) **6**.



4. Planteamiento del problema

El padecer un dolor neuropático o es un tema de importancia ya que la afección se da directamente sobre los nervios y eso dificulta que un fármaco de tipo AINE bloqueé la señal del dolor, en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del dolor en investigaciones previas realizadas por López-Ortiz M y colaboradores,¹²⁻¹⁵ se propone la síntesis de diferentes amidas derivadas del ácido 12-fenilacetilricinoleico para su evaluación como potenciales fármacos para el tratamiento de neuropatologías.

5. Pregunta del problema

¿Es posible sintetizar amidas a partir de aceite de ricino como posibles fármacos para el tratamiento del dolor neuropático?

6. Pregunta de investigación

¿Es posible sintetizar amidas a partir de aceite de ricino como potenciales fármacos para el tratamiento del dolor neuropático?

7. Objetivos

General:

- Sintetizar y caracterizar amidas **6**, **7** y **8** derivadas del ácido 12-fenilacetilricinoleico como potenciales supresores del efecto alodínico (figura 9).

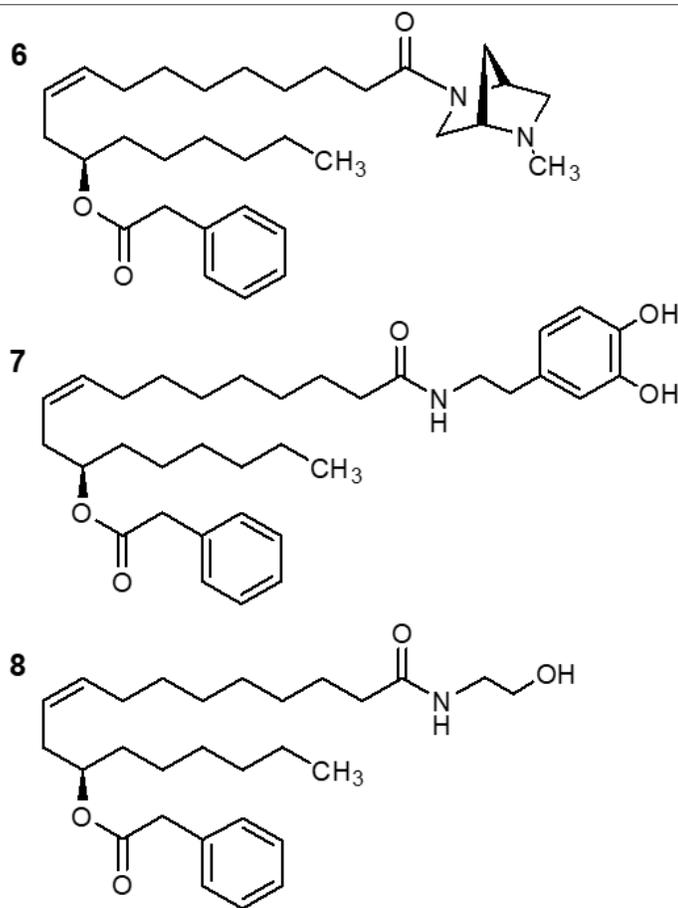


Figura 9. Compuestos propuestos para su preparación, (R , Z)-18-((1 S, 4 S)-5-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il)-18-oxooctadec-9-en-7-il fenilacetato (PhAR-DBH-Me) **6**, 2-fenilacetato de (R , Z)-17-(3,4-dihidroxifenetilcarbamoil)heptadec-9-en-7-ilo (PhAR-DOPA) **7**, y 2-fenilacetato de (R , Z)-17-(2-hidroxietilcarbamoil)heptadec-9-en-7-ilo (PhAR-ETA) **8**.

Específicos:

- Desarrollar una ruta sintética para la síntesis de los compuestos derivados del ácido 12-fenilacetilricinoleico mostrados en la figura 9.
- Caracterizar mediante técnicas espectroscópicas para asegurar la identidad de los compuestos purificados mostrados en la figura 9.



8. Método

8.1. Técnicas, materiales o instrumentos

El curso de las reacciones se verificó mediante cromatografía en capa fina (CCF), empleando cromatofolios de gel de sílice Alugram® SIL G/UV254 Macherey-Nagel como fase estacionaria; los reveladores que serán utilizados son: radiación ultravioleta 254/366 nm, yodo soportado sobre gel de sílice.

Los productos obtenidos se caracterizaron utilizando Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C (RMN ^1H y RMN ^{13}C respectivamente) utilizando un equipo JEOL Eclipse a 300 MHz, que tendrá como referencia interna tetrametilsilano (TMS), los disolventes que serán utilizados son agua y cloroformo deuterados. Adicionalmente, se realizará Espectrometría de Masas de Alta Resolución de los compuestos finales (EMAR).

Los reactivos empleados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich® y los disolventes fueron destilados antes de usar, secando al diclorometano con carburo de calcio, así como el material utilizado y manteniendo una atmósfera de N_2 , para conservar las condiciones anhidras dentro del sistema.



8.2. Reactivos y materias primas

- Aceite de ricino
- Cloruro de pivaloilo
- 4-Dimetilaminopiridina
- Hidróxido de potasio
- Novozym 435
- Etanolamina
- Sulfato de sodio anhidro
- Clorhidrato de Dopamina
- 2-Metil-(1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano
- Ácido fenilacético
- N,N-Diciclohexilcarbodiimida
- Trietilamina
- Ácido acético
- Sulfato de sodio anhidro
- Sílice flash para columna (malla 220-440)
- Celita

8.3. Disolventes

- Acetato de etilo
- Agua
- Heptano
- Acetona
- Diclorometano anhidro
- Metanol
- Cloroformo
- Metil terbutil éter

8.4. Cristalería

- Cámaras de elución
- Columna de fraccionamiento
- Embudos
- Embudos de separación
- Matracas bola
- Matracas Erlenmeyer
- Pipetas
- Frascos de diferentes tamaños
- Refrigerantes
- Viales
- Cabeza de destilación
- Cola de destilación
- Columnas para cromatografía
- Matracas bola de tres bocas
- Matracas Kitasato
- Vasos de precipitado



8.5. Materiales y equipos

- Algodón
- Balanza analítica; Denver Instrument TP-3102
- Mangueras de látex
- Parrilla de agitación; Heidolph instruments; Agitador magnético MR Hei-Tec con calefacción.
- Agitadores magnéticos
- Pinzas de tres dedos
- Rotavapor; Heidolph basis hei-vap value
- Soporte universal
- Anillo metálico
- Bomba de vacío; Vacubrand MZ 1C
- Agitador orbital; Heidolph inkubator 1000
- Lámpara de UV; UVGL-58
- Septum de goma
- Micropipetas; Gilson pipetman
- Papel filtro de diferente poro.

8.6. Variables

- Masa molar
- Volumen
- Concentración
- Temperatura
- Velocidad de reacción
- pH

9. Hipótesis

Es posible sintetizar amidas derivadas del ácido 12-fenilacetilricinoleico a partir del aceite de ricino, con potencial efecto supresor alodínico.

10. Diseño de estudio

- Finalidad del estudio: Descriptivo
- Secuencia temporal: Longitudinal
- Control de la asignación de los factores de estudio: Experimental
- Inicio del estudio: Prospectivo

11. Procedimiento

La síntesis partió del aceite de ricino que es la fuente principal del ácido ricinoleico, base para la síntesis de los compuestos. Mediante una transesterificación, fenilacetilación y una reacción enzimática regioselectiva, junto con la introducción de diversas aminas **12**, **13**, **14**, obteniendo las amidas **6**, **7** y **8** derivadas del ácido 12-fenilacetilricinoleico como potencial supresor del efecto alodínico.

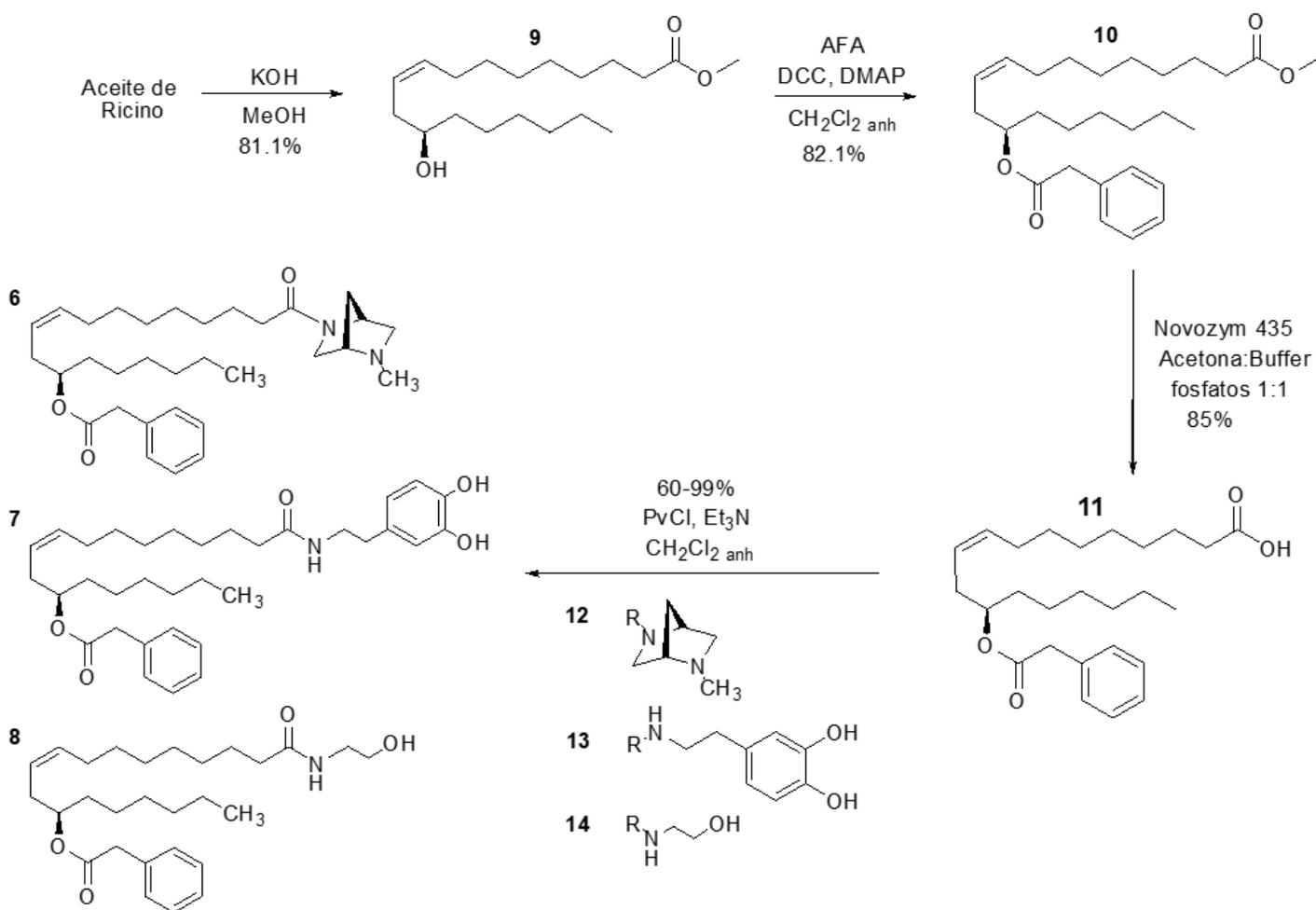
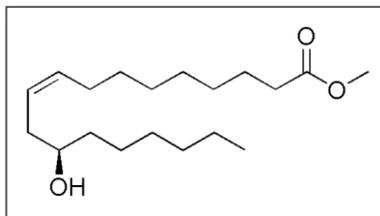


Figura 10. Ruta general de síntesis para la obtención de análogos.

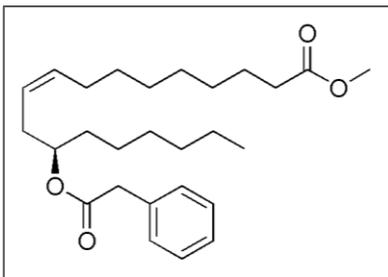
11.1. Metodología

11.1.1. Ricinoleato de metilo 9.



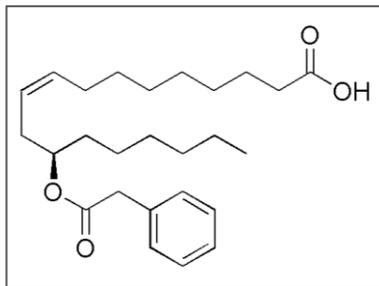
En un matraz esférico de 250 mL (previamente secado en una estufa), provisto de agitación magnética, se disolvieron 20 g de aceite ricino en 50 mL de metanol, se agregaron 50 mg de KOH y se calentó a reflujo con agitación constante por 30 min verificando el término de reacción por CCF (Hep-MTBE;85:15 v/v). La mezcla se neutralizó con ácido acético y se concentró en el rotavapor hasta sequedad. Al remanente se le realizó una extracción con heptano (3 x 15 mL). La fase orgánica de heptano se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó hasta sequedad, obteniendo 16.07 g de producto crudo, el cual fue purificado por cromatografía en columna con (Sílice Flash, fase móvil: Hep-MTBE;95:5 v/v), obteniendo 13.65 g de producto puro (81.1 % de rendimiento).

11.1.2. 12-Fenilacetilricinoleato de metilo 10.



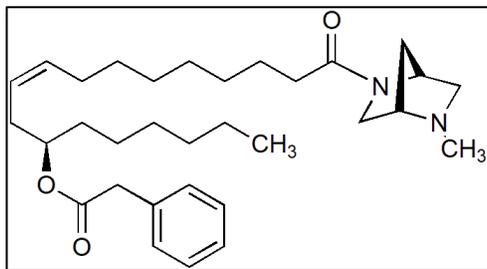
En un matraz esférico de tres bocas de 250 mL (previamente secado en una estufa), provisto de agitación magnética y bajo atmósfera de N_2 , se disolvieron 5 g de ricinoleato de metilo **4**, en 100 mL de diclorometano anhidro. La mezcla se enfrió a 0 °C y posteriormente se adicionaron 3.3 g de *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 190 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y 2.18 g de ácido fenilacético, dejándose en agitación constante por 24 h. El término de reacción se verificó mediante CCF (Hep-MTBE;85:15 v/v). La mezcla de reacción se filtró, se evaporó, se resuspendió en heptano y se dejó en refrigeración por 24 horas. La mezcla fue filtrada para eliminar el ácido fenilacético excedente. El filtrado se concentró a sequedad en el rotavapor, para obtener 6.1 g de crudo de la reacción, el cual se purificó por cromatografía en columna (Sílice Flash, fase móvil Hep-AcOEt;85:15 v/v), obteniendo 5.66 g como producto puro (82.1 % de rendimiento).

11.1.3. Ácido 12-fenilacetilricinoleico 11.



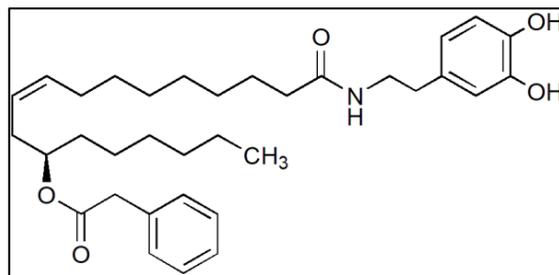
En un frasco de fermentación con sello hermético de 500 mL se disolvieron 5.66 g 12-fenilacetilricinoleato de metilo en una solución 1:1 de acetona: buffer de fosfatos pH 7.4 (30 mmolar) a esta mezcla se le agregó 500 mg de enzima Novozym 435. El frasco se colocó en un agitador orbital a 38 °C por 24 h. El término de reacción se verificó mediante CCF (Hep-AcOEt;8:2 v/v). Se filtró la enzima y se concentró en el rotavapor hasta eliminar completamente la acetona. Al residuo acuoso se extrajo con cloroformo (3x100 mL); La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a presión reducida, obteniendo 5.34 g del crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna (Sílice Flash, fase móvil: Hep-AcOEt;95:5 v/v), obteniendo 4.65 g de producto puro (85 % de rendimiento).

11.1.4. PhAR-DBH-Me 6.



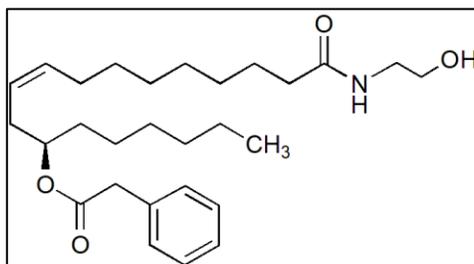
En un matraz esférico de 100 mL provisto de agitación magnética y en condiciones anhidras, se agregó 1.5 g de ácido 12-fenilacetilricinoleico disueltos en 60 mL de diclorometano anhidro, adicionando 1.6 mL de trietilamina. La mezcla se enfrió a 0 °C, y se le añadió lentamente 0.48 mL de cloruro de pivaloilo, dejándose en agitación constante por 30 min. Posteriormente se agregaron 0.42 mL de DBH Me, dejando en agitación constante por 24 h. El término de reacción se verificó mediante CCF (Hep-AcOEt;8:2 v/v). Se realizaron lavados con salmuera (3x10 mL), y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, y concentró en el rotavapor a sequedad, para obtener 2 g del crudo de reacción, el cual se purificó por cromatografía en columna (Sílice Flash, fase móvil: DCM-MeOH;95:5 v/v), obteniendo 1.0 g de producto puro (54.7% de rendimiento).

11.1.5. PhAR-DOPA 7.



En un matraz esférico de 100 mL provisto de agitación magnética y en condiciones anhidras, se agregó 2 g de ácido 12-fenilacetilricinoleico disueltos en 60 mL de diclorometano anhidro, adicionando 2.14 mL de trietilamina. La mezcla se enfrió a 0 °C, y se le añadió lentamente 620 µL de cloruro de pivaloilo, dejándose en agitación constante por 30 min. Posteriormente se agregaron 950 mg de dopamina HCl, dejando en agitación constante por 24 h. El termino de reacción se verificó mediante CCF (Hep-AcOEt 8:2 v/v). La mezcla de reacción se concentró en el rotavapor a sequedad, obteniendo 5.12 crudo de reacción, el cual se purificó mediante cromatografía en columna (Sílice Flash, fase móvil DCM-MeOH;95:5 v/v), obteniendo 1.75 g de producto puro (66 % de rendimiento).

11.1.6. PhAR-ETA 8.

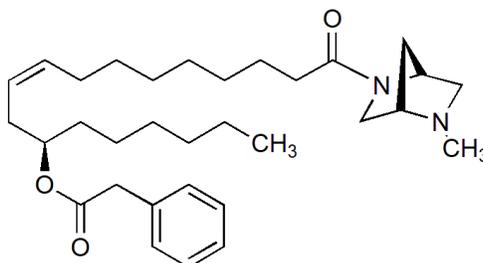


En un matraz esférico de 100 mL provisto de agitación magnética y en condiciones anhidras, se agregó 1.35 g de ácido 12-fenilacetilricinoleico disueltos en 60 mL de diclorometano anhidro, adicionando 0.76 mL de trietilamina. La mezcla se enfrió a 0 °C, y se le añadió lentamente 420 µL de cloruro de pivaloilo, dejándose en agitación constante por 30 min. Posteriormente se agregaron 0.22 mL de etanolamina, dejando en agitación constante por 24 h. El termino de reacción se verificó mediante CCF (Hep-AcOEt;8:2 v/v). A esta mezcla se le realizaron lavados con salmuera (3x10 mL), secando sobre sulfato de sodio anhidro, filtrando y concentrando en el rotavapor a sequedad, para obtener 1.94 g del crudo de reacción, el cual se purificó por cromatografía en columna (Sílice Flash, fase móvil: DCM-MeOH;95:5 v/v), obteniendo 1.48 g como producto puro (99.4% de rendimiento).

12. Resultados

12.1. Propiedades de los compuestos

12.1.1. PhAR-DBH-Me 6.

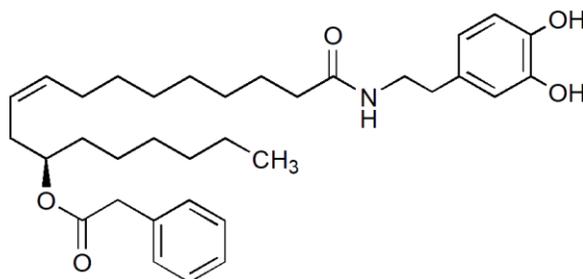


Rendimiento global: 13.59%

Líquido con apariencia aceitosa ligeramente amarillo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.36 – 7.19 (m, 5H), 5.48 – 5.37 (m, 1H), 5.32 – 5.20 (m, 1H), 4.87 (m, 1H), 4.75 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.22 (s, 1H), 3.72 – 3.53 (m, 3H), 3.45 (s, 1H), 3.35 – 3.20 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.58 (dd, *J* = 63.5, 9.7 Hz, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.34 – 2.06 (m, 4H), 1.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.80 (dd, *J* = 41.5, 9.9 Hz, 1H), 1.57 (dd, *J* = 36.4, 7.3 Hz, 4H), 1.41 – 1.06 (m, 17H), 0.86 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H).

12.1.2. PhAR-DOPA 7.



Rendimiento global: 16.39%

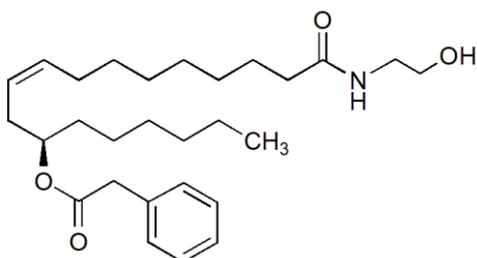
Líquido con apariencia aceitosa ligeramente amarillo.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.34 – 7.20 (m, 5H), 6.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.54 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 5.73 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 5.48 – 5.36 (m, 1H), 5.31 – 5.25 (m, 1H), 4.86 (m, 1H), 3.59 (s, 2H), 3.46 (dd, $J = 13.0, 6.8$ Hz, 2H), 2.67 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.35 – 2.19 (m, 2H), 2.13 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.60 – 1.47 (m, 4H), 1.32 – 1.15 (m, 16H), 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 174.48, 171.91, 144.59, 143.33, 134.34, 132.92, 130.62, 129.38, 128.66, 127.17, 124.16, 120.48, 115.55, 115.22, 77.48, 76.84, 74.97, 41.93, 41.08, 36.90, 35.03, 33.65, 31.99, 31.82, 29.61, 29.24, 29.19, 29.16, 27.39, 25.82, 25.34, 22.66, 14.20.

EMAR (DART, M^+)= calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{NO}_5$ [$\text{M}+1$] 552.3689 g/mol, encontrado 55.3674 g/mol para $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{NO}_5$ [$\text{M}+1$]

12.1.3. PhAR-ETA 8.



Rendimiento global: 24.66%

Líquido con apariencia aceitosa ligeramente amarillo.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.32 – 7.20 (m, 5H), 6.29 (s, 1H), 5.42 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 5.26 (dd, *J* = 6.8, 5.7 Hz, 1H), 4.85 (q, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.71 – 3.66 (m, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.42 – 3.35 (m, 2H), 2.26 (m, 4H), 1.95 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.59 (dd, *J* = 14.7, 7.3 Hz, 2H), 1.49 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.33 – 1.19 (m, 24H), 0.84 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃, δ ppm): 180.29, 178.70, 171.55, 134.40, 132.73, 129.32, 128.57, 127.06, 124.24, 77.16, 74.65, 62.40, 42.55, 41.86, 34.21, 33.65, 29.59, 29.25, 29.18, 29.16, 27.61, 27.38, 25.28, 24.88, 22.61, 14.15.

EMAR (DART, M⁺)= calculado para C₂₈H₄₅NO₄ [M+1] 460.3426 g/mol encontrado 460.3442 g/mol para C₂₈H₄₅NO₄ [M+1]

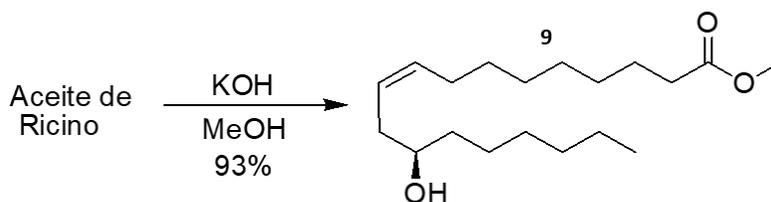


13. Discusión de resultados.

A lo largo del estudio experimental se observaron y presentaron diversas situaciones las cuales se identificaron como áreas de oportunidad para mejorar la síntesis, tomando siempre como base si es posible sintetizar las amidas **6**, **7** y **8** como posibles fármacos para el tratamiento del efecto alodínico, donde la amida **6** previamente ya evaluada farmacológicamente,² se encontró que esta tenía un respuesta a la inhibición de la alodinia pero de una forma poco efectiva, en busca de mejorar este efecto se eligieron las aminas **13** y **14**, la primera se eligió con el fundamento de que la dopamina es un neurotransmisor y que su introducción en la estructura del ácido 12- fenilacetilricinoleico haría que la amida formada (**7**) pudiera tener un mejor efecto antialodínico. La amina **14** se eligió con base a qué en la estructura del endocannabinoides (anandamida) se encuentra una etanolamina haciendo así que al sintetizar la amida **8** estas tengan una gran similitud y por consecuente pudiese mejorar su inhibición alodínica.

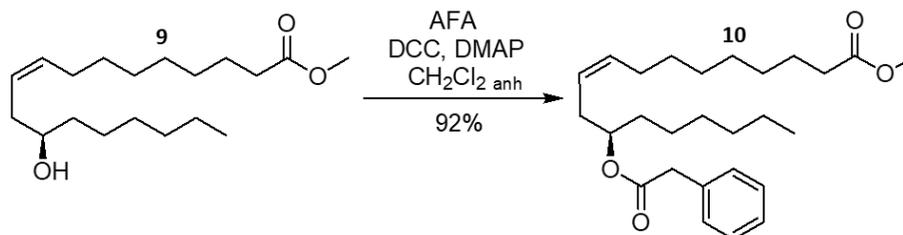
Una vez analizadas las diferentes opciones y seleccionado las mejores opciones se comenzó con la experimentación utilizando como base la información presente en fuentes bibliográficas de la síntesis del compuesto PhAR-DBH-Me **6**,^{2,5-7} buscando siempre la optimización en la ruta sintética, en la purificación, así como en la caracterización espectroscópicas para asegurar la identidad de los compuestos.

13.1. Ricinoleato de metilo 9.



Empleando la metodología base³² la reacción de transesterificación con metanol bajo la acción de un catalizador básico, como lo es el hidróxido de potasio (KOH) se perfila como la principal forma para obtener esteres de ácidos grasos.^{33, 34} Al reaccionar el triglicérido con el alcohol provoca la ruptura de este, que se favorece con el KOH, generándose así el ricinoleato de metilo (éster de ácido) y glicerina. El rendimiento obtenido fue del 81.1%, al ser muy bueno y no tener dificultades para ejecutarse no se realizó modificación a la metodología.

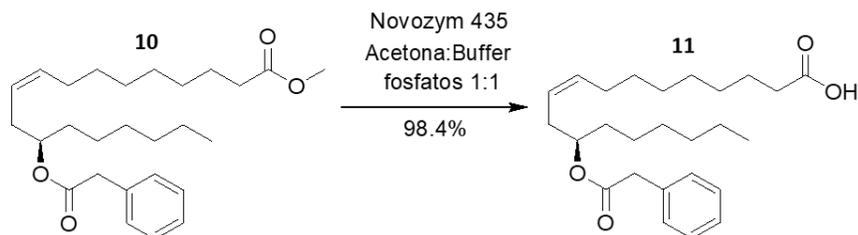
13.2. 12-fenilacetilricioleato de metilo 10.



La realización de la reacción de fenilacetilación o reacción de Steglich se planteó con base a lo publicado por I. Regla y colaboradores³² Ajustando la cantidad utilizada, logrando reducir tanto la DMAP como la DCC, donde la DCC actúa como agente de acoplamiento activando al grupo carboxílico para la reacción con la amina y la DMAP, como catalizador para mejorar la eficiencia en esta reacción y la reducción de subproductos que no deseamos. También se cambió el medio de suspensión Hexano–AcOEt por solo heptano; la finalidad de esta suspensión fue precipitar el exceso de ácido fenilacético.

La importancia de mantener la reacción en condiciones anhidras toma gran relevancia aquí, ya que la DCC puede reaccionar con el agua para formar la N,N-diciclohexilurea.³⁵ Para asegurar que esto no sucediera, la reacción se mantuvo en condiciones anhidras. Se secó todo el material de vidrio previo a su uso en una estufa a 120 °C. El diclorometano se secó previamente con carburo de calcio, y se desplazó el aire del medio con una atmósfera de N₂.

13.3. Ácido 12-fenilacetilricinoleico 11.



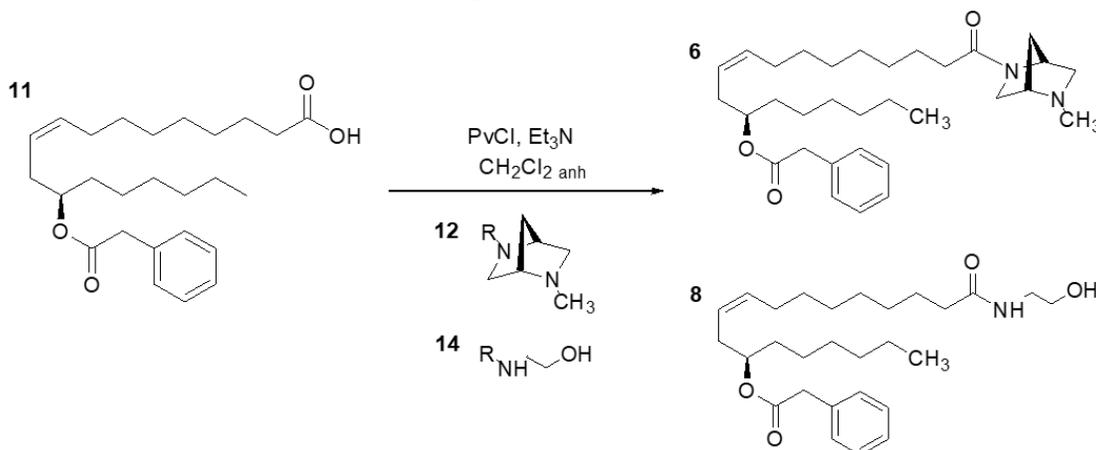
Posterior a la purificación del 12-fenilacetilricinoleato de metilo se realizó una hidrólisis quimioenzimática quimioselectiva, tomando como base lo descrito por G. Appendino y col.^{36, 37} en la cual hace hidrólisis en el éster metílico para generar al ácido carboxílico que es crucial en la amidación.

La necesidad de que fuera una reacción quimioenzimática quimioselectiva, surgió por el problema que genera una hidrólisis común, en la cual no se puede controlar selectivamente donde se produce. Cuando nos referimos a una reacción quimioenzimática quimioselectiva, estamos hablando de la participación crucial de una enzima en la transformación del compuesto. Esta enzima no solo acelera la reacción, sino que también tiende a mejorar la selectividad y favorecer una ruta específica de reacción. En otras palabras, tiene la capacidad de elegir 'selectivamente' entre diferentes grupos funcionales para generar el producto deseado.

Que se clasifique de esta manera implica que dependa directamente de variables externas como la temperatura, el pH, la solubilidad que hacen que se favorezca o no la interacción entre los reactivos, por lo que fue de suma importancia cuidar estos aspectos para que reaccionen en su totalidad, por ello se utilizó la acetona como cosolvente del 12-fenilacetilricinoleato de metilo, y este fuera soluble en la fase acuosa donde se encontraba la enzima Novozym 435, la temperatura se estableció en el agitador orbital la cual le proporcionaba una temperatura adecuada y una agitación constante, para obtener el pH óptimo la fase acuosa era una solución amortiguadora de fosfatos el cual promueve la interacción de la enzima con el ácido.

La purificación es completamente indispensable, pues de no hacerla en la amidación se generan productos con polaridad similar que son difíciles de eliminar.

13.4. PhAR-DBH-Me 6 y PhAR-ETA 8.

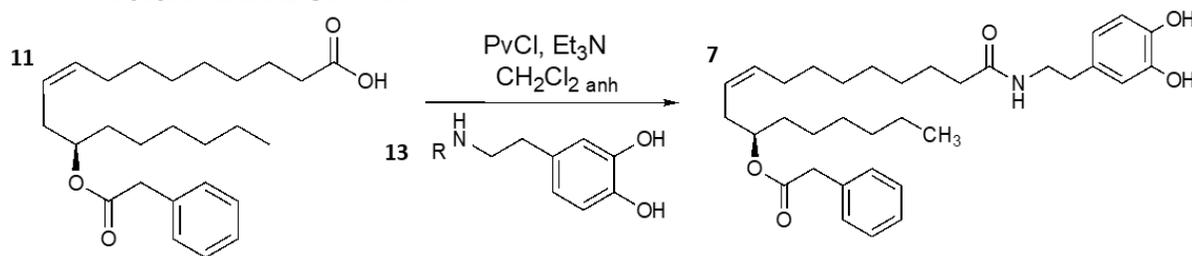


Continuando con las próximas reacciones, estas se realizaron siguiendo la misma metodología presentada por López-Ortiz M y colaboradores.² y manteniendo las condiciones anhidras descritas, con la única diferencia de utilizar una amina diferente, la etanolamina y el 2-metil-(1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (DBH Me).

Las principales modificaciones de las técnicas originales se dieron por diversos inconvenientes, principalmente en los lavados del crudo. El eliminar las sales formadas y el exceso de trietilamina el crudo de reacción es líquido lo que hace más manejable el compuesto al ser aplicado en la cromatografía en columna lo que permite su purificación. El contratiempo que generaban los lavados era la formación de una emulsión, que se dificulta romper de forma mecánica, por lo que se optó por filtrar sobre celita, esto garantizando la separación de las fases.

El rendimiento global obtenido para el compuesto **6** fue de 13.6 % y para el compuesto **8** de 24.7%, resultando este último en el mejor rendimiento de todos los compuestos obtenidos.

13.5. PhAR-DOPA 7.



Esta reacción se colocó en condiciones anhidras, al igual que las amidas **12** y **14**, pues la presencia agua podría interactuar con los reactivos descomponiendo al cloruro de pivaloilo y, en consecuencia, reduciendo el rendimiento, ya que el PvCl desempeña un papel crucial en una reacción de amidación al activar el ácido carboxílico, formando un anhídrido mixto que mejora la reactividad, este anhídrido mixto facilita la acilación de aminas. Para garantizar que la reacción se lleve a cabo y el ácido se neutralice se utiliza un exceso de trietilamina. Siguiendo como se indica el procedimiento presentado por López-Ortiz M. y colaboradores permitió su purificación.² Sin embargo, la purificación puede realizarse de la forma en la que la metodología base lo indica, pero se tiene que contemplar una pérdida pequeña del producto puro, al realizar los lavados correspondientes para eliminar el exceso de trietilamina del crudo de reacción. En cambio, si no se realizan, el rendimiento aumenta en pequeña proporción, pero al ser producto de una reacción ácido-base puede presentarse como una sal que presenta el problema de ser un crudo pastoso de difícil aplicación en la cromatografía por columna, que se solucionó suspendiendo o disolviendo en 0.5 mL de la fase móvil.

Un aspecto de vital importancia para una reacción donde uno de los reactivos es el clorhidrato de dopamina, es mantenerla protegida de la luz, pues su exposición a esta acelera su degradación. Para evitarlo, se solucionó protegiendo constantemente el matraz de reacción con aluminio, así como en la purificación, la columna y las fracciones resultantes. Si se falla en la protección de la luz aumenta la posibilidad de generar productos de degradación por la reacción radicalaria del catecol, mirándose al formarse una especie química de color rojizo oscuro, siendo esta la 1,2-benzoquinona.³⁸

13.6. Caracterización espectroscópica

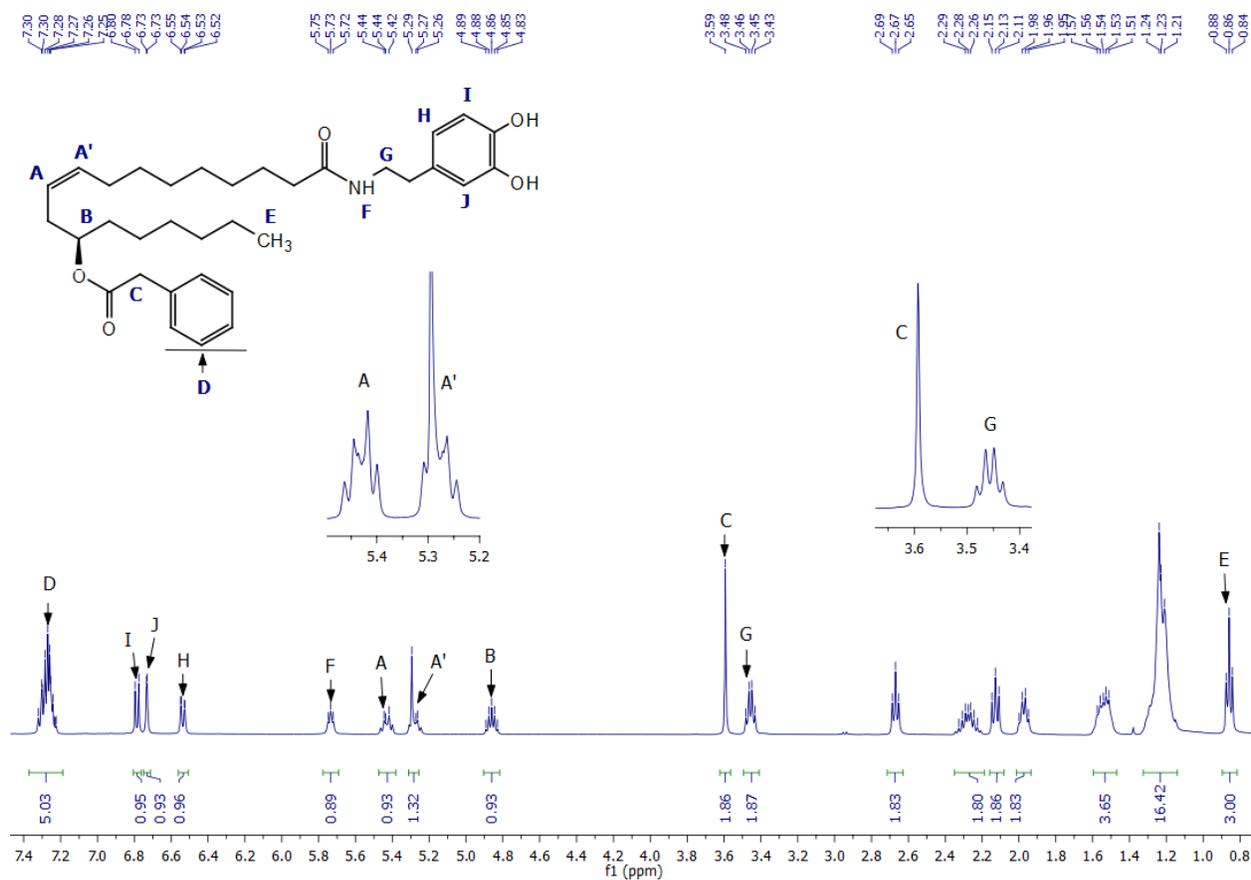


Figura 10. Espectro de ^1H -RMN. PhAR-DOPA 7.

La caracterización de las dos nuevas amidas se realizó con ayuda de la Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Espectrometría de Masas de Alta Resolución (EMAR).

En el espectro de RMN- ^1H , PhAR-DOPA se observan las diferentes señales características de la molécula. Teniendo un multiplete en la letra D, a 7.26 ppm que integra para 5H, siendo una señal representativa de los hidrógenos aromáticos, que por conteo se deduce que son los hidrógenos aromáticos del fenil acetato, así como dos multipletes que se encuentran próximos en las letras A y A' en 5.40 ppm y 5.26 ppm, los cuales integran juntos para 2H, y que por la zona se infiere que sean los hidrógenos del alqueno, otro fragmento de suma relevancia es específicamente la identificación de los hidrógenos del carbono quiral el cual se concluye a que fuera la señal que aparece en la



letra B, en 4.84 ppm integrando para 1H, así como una señal triple perteneciente al metilo terminal que se encuentra en la letra E, a 0.84 ppm y que integra exactamente para 3H. Cada una de estas señales se encuentran en los diferentes espectros de Resonancia Magnética Nuclear realizados a los productos, y que varían un poco es su desplazamiento debido a las diferentes interacciones que tengan con la amida.

La síntesis de las dos nuevas amidas derivadas del ácido 12-fenilacetilricinoleico se confirmó de forma definitiva mediante una Espectrometría de Masas de Alta resolución.

HRMS de PhAR-DOPA 7 .		
Masa calculada	Masa experimental	Diferencia de masas
552.3689 g/mol	552.3674 g/mol	-2.66 ppm
HRMS de PhAR-ETA 8 .		
Masa calculada	Masa experimental	Diferencia de masas
460.3426 g/mol	460.3442 g/mol	3.35 ppm

Tabla 1. Espectrometría de masas de alta resolución del compuesto

Como se puede apreciar la diferencia de masas es menor a 5 ppm, lo cual nos reafirma que los compuestos sintetizados son los deseados.

14. Conclusión

Se logró la síntesis de las amidas **6**, **7** y **8** mediante la modificación y desarrollo de metodologías sintéticas empleadas en el grupo de investigación con un rendimiento global que va del 13-16%



15. Referencias

1. Del Arco, J. Tema 1. Fisiopatología, clasificación y tratamiento farmacológico. *Curs. Bás. Dolor*. 29th ed.: Farmacia Profesional; Vol. 29; **2015**. pp. 36-43.
2. López, O. M. Chemoenzymatic synthesis and cannabinoid activity of a new diazabicyclic amide of phenylacetylricinoleic acid. *Bio. Med. Che. Lett.* **2010**, 20(1), 3231-3234.
3. Devane, W. Aislamiento y estructura de un componente del cerebro que se une al receptor cannabinoide. *Sci.* **1992**, 258(5090),13-67.
4. Crawley, J. N. Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pha. Bio. Beh.* **1993** Diciembre; 46(4), 967-972.
5. Melgar, F. R. Synthesis of Novel Derivatives of (1S,4S)-2,5-Diazabicyclo [2.2.1] heptane and Their Evaluation as Potential Ligands in Asymmetric Catalysis. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1(4), 655-672.
6. Costa, B. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, 143(2), 247-250.
7. Quiñonez, B. G. Antiallodynic effect of PhAR-DBH-Me involves cannabinoid and TRPV1 receptors. *Pharm. Res. Perspect.* **2020**, 8(5),1-12.
8. J. W. Bases fisiopatológicas del dolor. *Acta Med. Perú.* **2023**; 24(2),105-108.
9. Romera, E. Neurofisiología del dolor. *Rev. Soc. Esp. Dolor.* **2000**; 7(II),11-17.
- 10 Cecil, R. L. Tratado de Medicina Interna. 24th ed. Goldman L, editor. Philadelphia: Elsevier Saunders, **2012**.
- 11 Melzack R WP. Pain mechanisms: a new theory. *Sci.* **1965**, 150(3699), 971-979.
- 12 Woolf, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain.* **2011**, 152(3),1-31.
- 13 Alcántara A. *Clínicas G.* [En línea].; 2019 [citado el 2022 Septiembre 25]. Disponible en: <https://bit.ly/3UBaKp4>.
- 14 Covarrubias, N. T. Uso medicinal de la Marihuana Medical use of marijuana. *Anest. Mex.* **2019**, 3(2), 49-58.



- 15 Mayorga, F. Los endocannabinoides: una opción terapéutica para el tratamiento del . cáncer. *VITAE*. **2008**, 16(2), 259-267.
- 16 Ramos, J. A, Fernandez, J. Uso de los cannabinoides a través de la historia. *Adicc.* . **2000**, 2(19), 19-30.
- 17 Grotenhermen, F. Cannabinoids. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2022**, . 4(5), 507-530.
- 18 Soria, L. D. El Sistema de Endocannabinoides como regulador de la lipogénesis y . su posible modulación por la mangiferina. *Rev. Biomed.* **2019**, 30(2),83-102.
- 19 Grotenhermen, F. Pharmacology of cannabinoids. *Neuroendocrinol. Lett.* **2023**, . 25(1-2), 14-23.
- 20 Howlett, A. C. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Lipid Mediat.* **2022**, 68, . 619-31.
- 21 Sagredo O. Efectos farmacológicos y fisiológicos del consumo de cannabis. *Trast.* . *Adict.* **2011**, 13(3), 94-96.
- 22 Grotenhermen, F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clin.* . *Pharmacokinet.* **2003**, 42(4), 327-60.
- 23 Scherrmann, J. M. Antinociception. Springer eBooks. [En línea].; 2010 [cited 2023 . Septiembre 14. Disponible en: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-540-68706-1_1455.
- 24 Abood, M. M. Molecular Neurobiology of The Cannabinoid Receptor. *Int. Rev.* . *Neurobiol.* **1996**, 39, 197-221.
- 25 cun. www.cun.es. [En línea].; 2022 [citado el 2022 Septiembre 25]. Disponible en: . <https://bit.ly/3Sv6R38>.
- 26 Mechoulam, R. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine . gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 50(1), 83-90.
- 27 ¿Cómo produce sus efectos la marihuana? Investigación. nida.nih.gov [En línea]. ; . 2021. [citado el 2022 Septiembre 25]. Disponible en: <https://nida.nih.gov/publications/research-reports/marijuana/how-does-marijuana-produce-its-effects>
- 28 Estrada, J. A. Endocannabinoid Receptors in the CNS: Potential Drug Targets for . the Prevention and Treatment of Neurologic and Psychiatric Disorders. *Curr. Neuropharmacol.* **2020**, 18(8), 769-787.

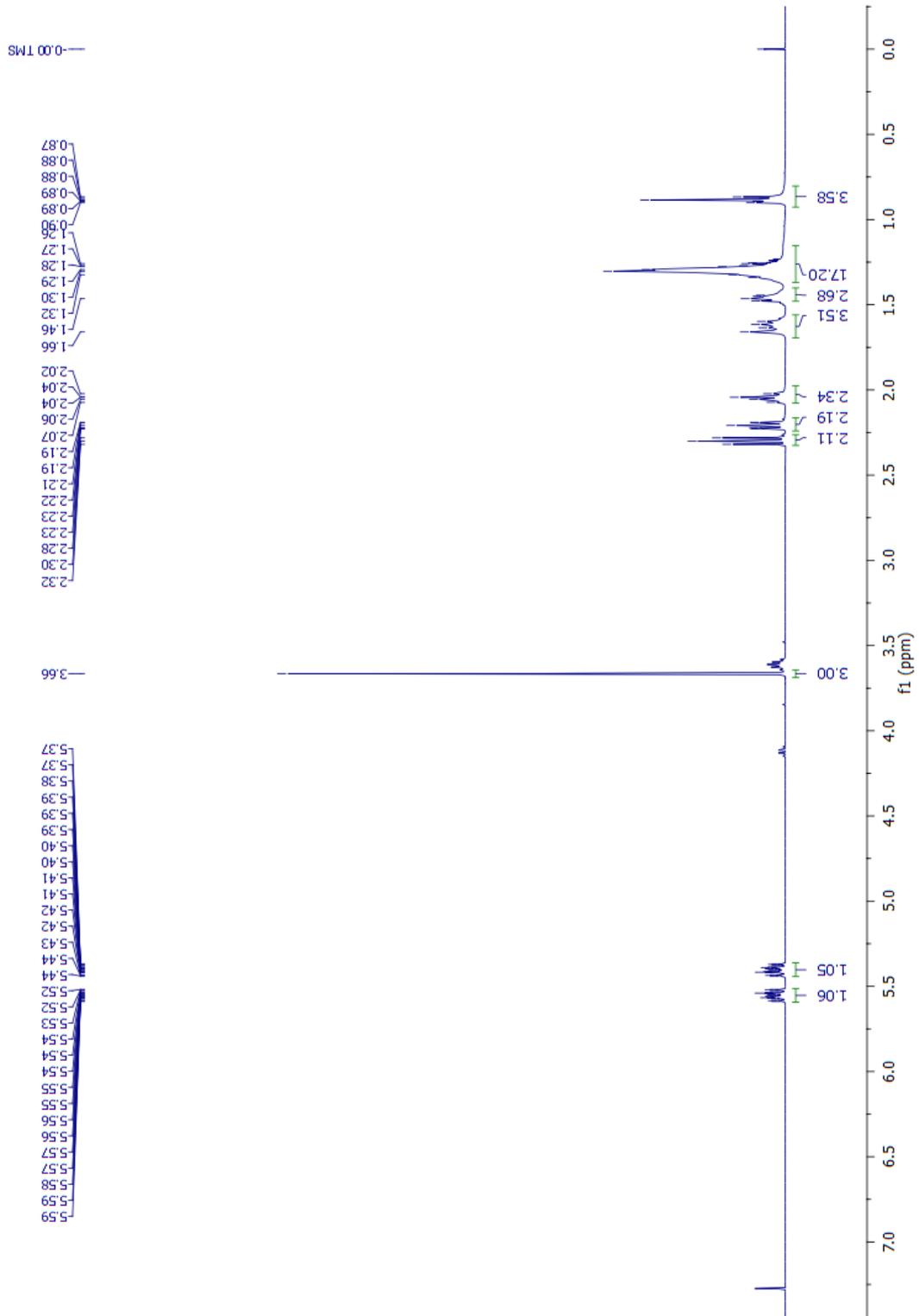


- 29 Di Marzo, V. Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **2002**, 66(2-3), 377-91.
- 30 Flores, A. L. Análisis del aceite de ricino de diferentes muestras de higuierilla de distintas zonas del país. [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química; 1976.
- 31 Facmed UNAM. Aceite de ricino. [En línea]. [citado el 2022 Septiembre 25] Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmd/gi_2k8/prods/PRODS/Aceite%20de%20ricino.htm.
- 32 Castillo, E. Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Phenylacetylriinvanil: An Ultrapotent Capsaicinoid. *LETTER*. **2008**, (18), 2869-2873.
- 33 PEREZ, S. G, AGUILERA, L, CASTANEDA, M. Condiciones del proceso de transesterificación en la producción de biodiésel y sus distintos mecanismos de reacción.. [En línea].; 2023 [citado el 2023 Octubre 21. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2022000100311].
- 34 Marcano, L. Estudio de la obtención de biodiesel a partir de productos secundarios de la reacción de transesterificación de aceites residuales de cocina. *Rev. Fac. Ing. Univ. Cent. Venez*. **2014**, 29(1), 67-74.
- 35 Fernandes, B. Reducción selectiva del producto de esterificación de la epiandrosterona como intermediario clave para el acoplamiento con aminoácidos. [Tesis de licenciatura]. Venezuela: Univ. Cent. Venez. Facultad de Ciencias. 2015.
- 36 Appendino, G. Development of the First Ultra-Potent “Capsaicinoid” Agonist at Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) Channels and Its Therapeutic Potential. *ASPET*. **2005**, 312(2), 561-570.
- 37 Appendino, G. First “hybrid” ligands of vanilloid TRPV1 and cannabinoid CB2 receptors and non-polyunsaturated fatty acid-derived CB2-selective ligands. *FEBS Letters*. **2006**, 580(2), 568-574.
- 38 LIAO, C. C. Masked o-Benzoquinones in Organic Synthesis. [En línea].; 2002 [citado el 2023 Noviembre 4] Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/ar000194n>.

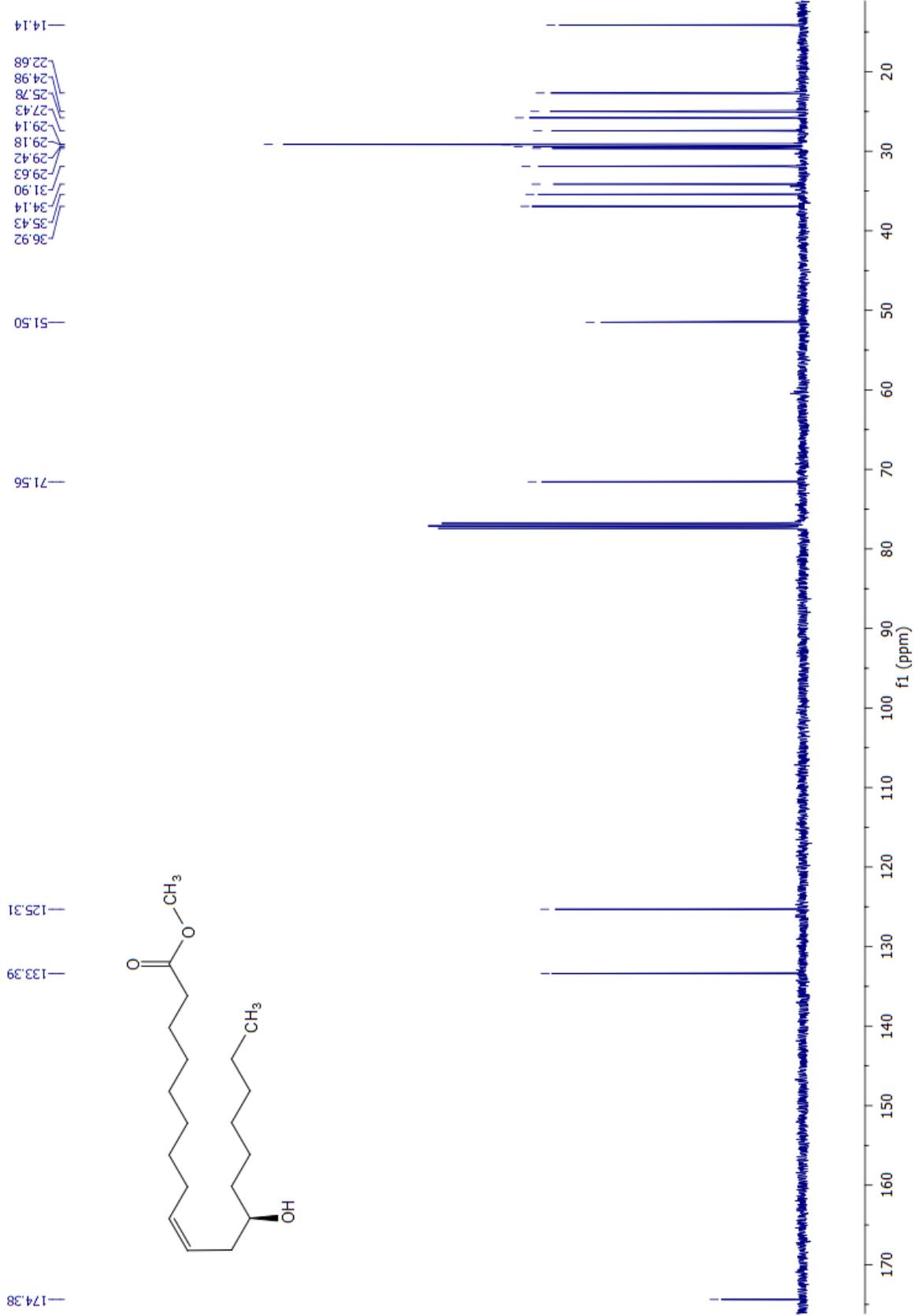
16. Anexos

16.1. Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

16.1.1. Ricinoleato de metilo 9.

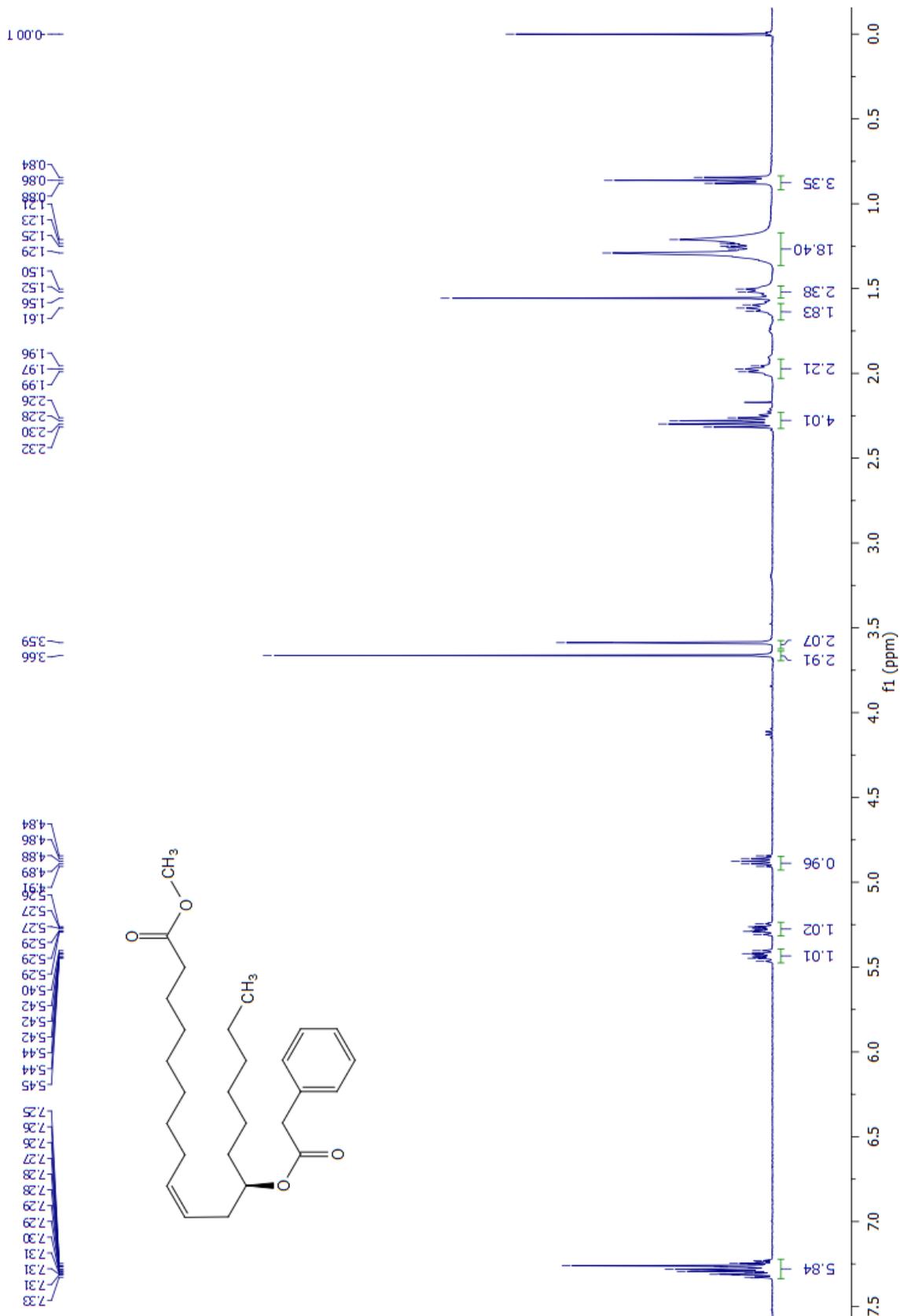


Anexo 1. Espectro de RMN-¹H del ricinoleato de metilo 9.

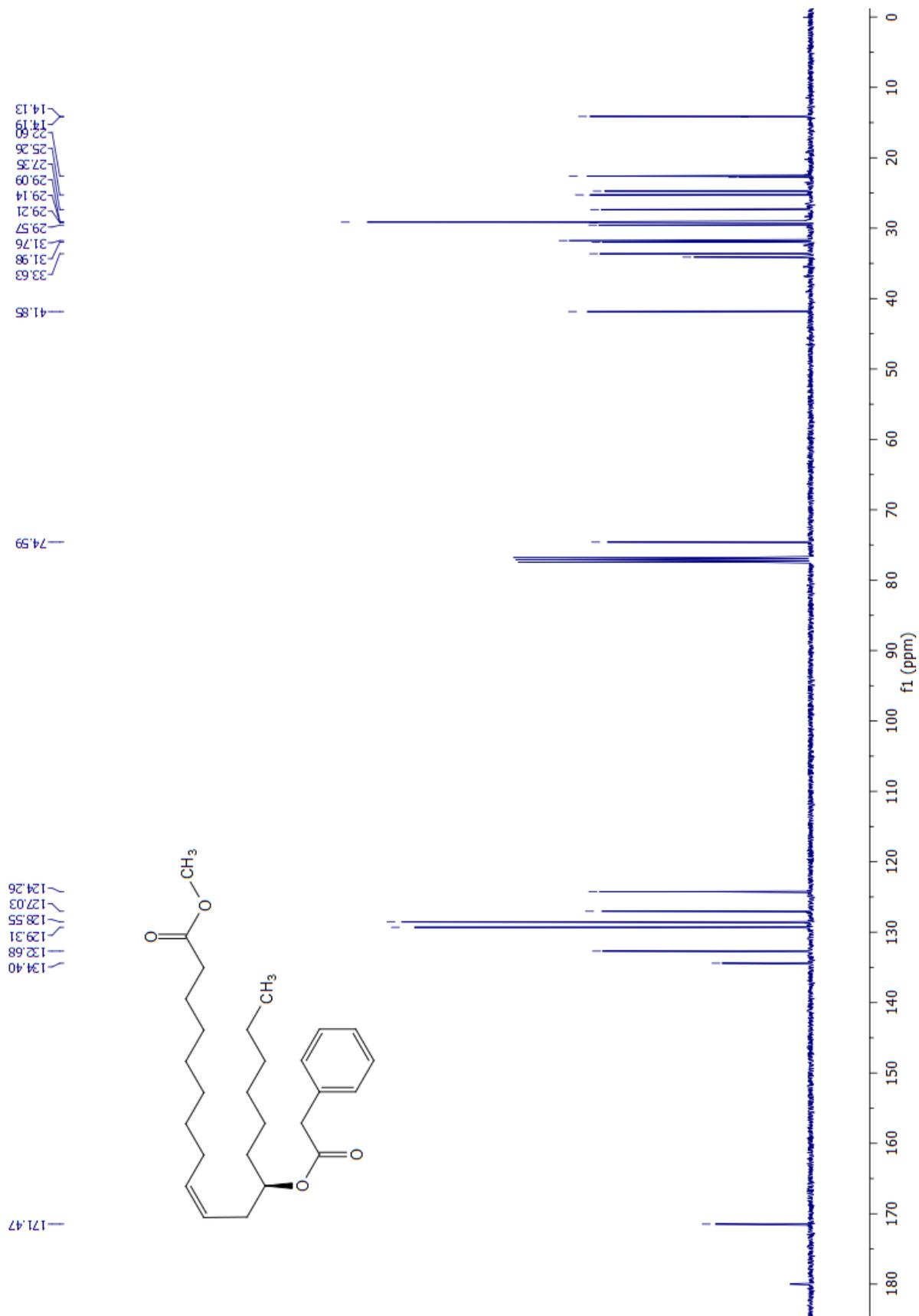


Anexo 2. Espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ del ricinoleato de metilo 9.

16.1.2. 12-fenilacetilricioleato de metilo 10.

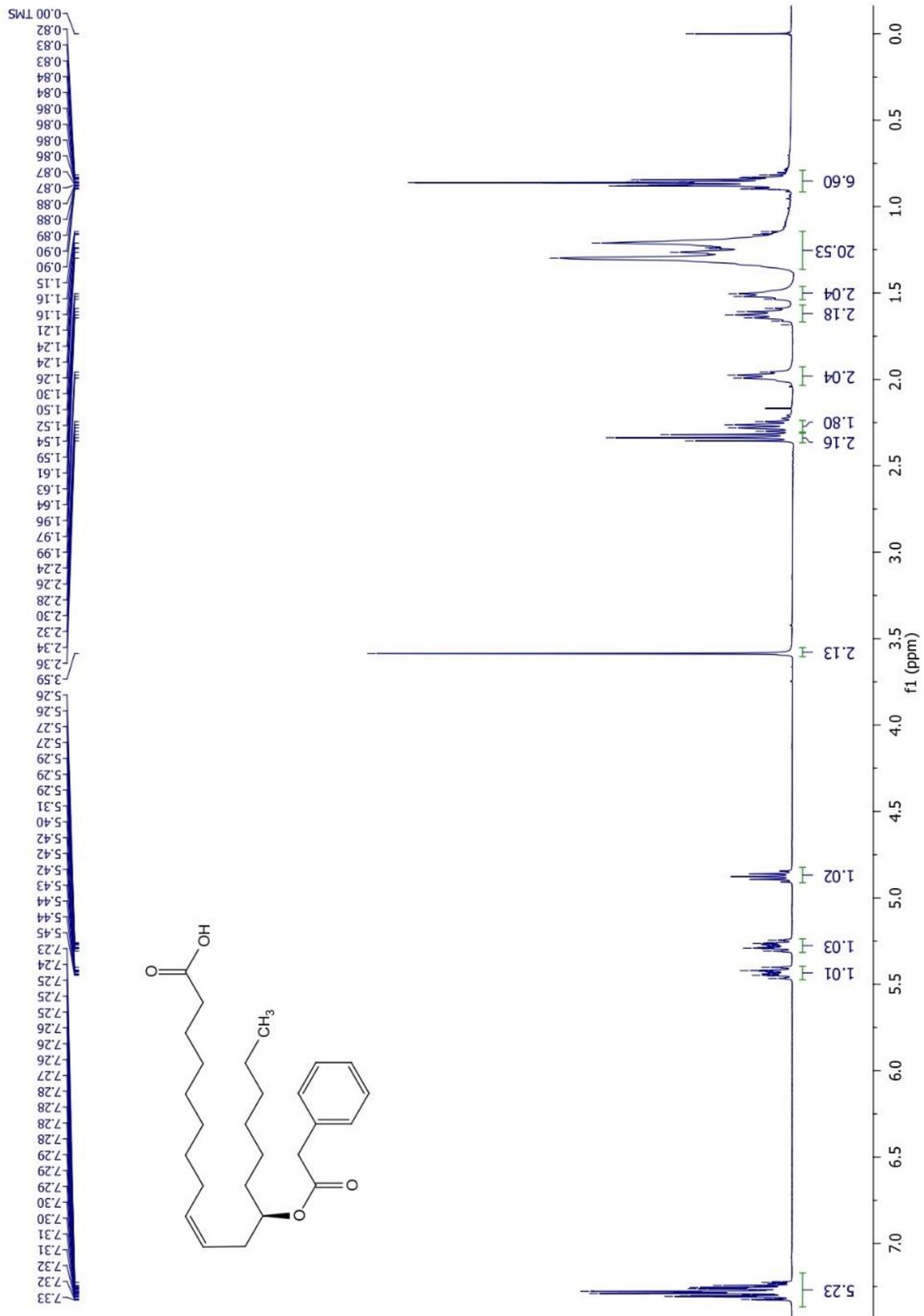


Anexo 3. Espectro de RMN-¹H del 12-fenilacetilricinoleato de metilo 10.

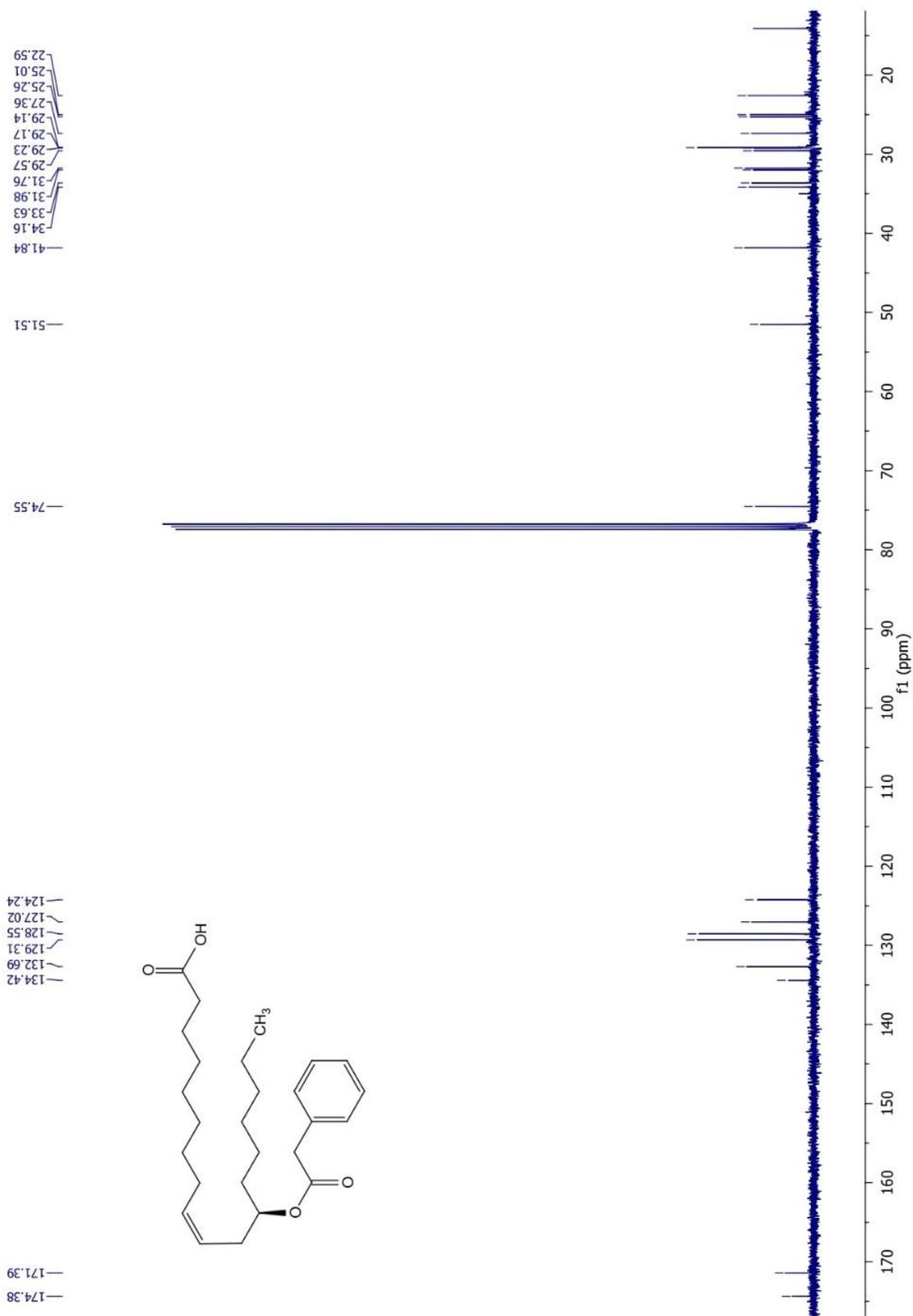


Anexo 4. Espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ del 12-fenilacetilricinoleato de metilo 10.

16.1.3. Ácido 12-fenilacetilricinoleico 11.

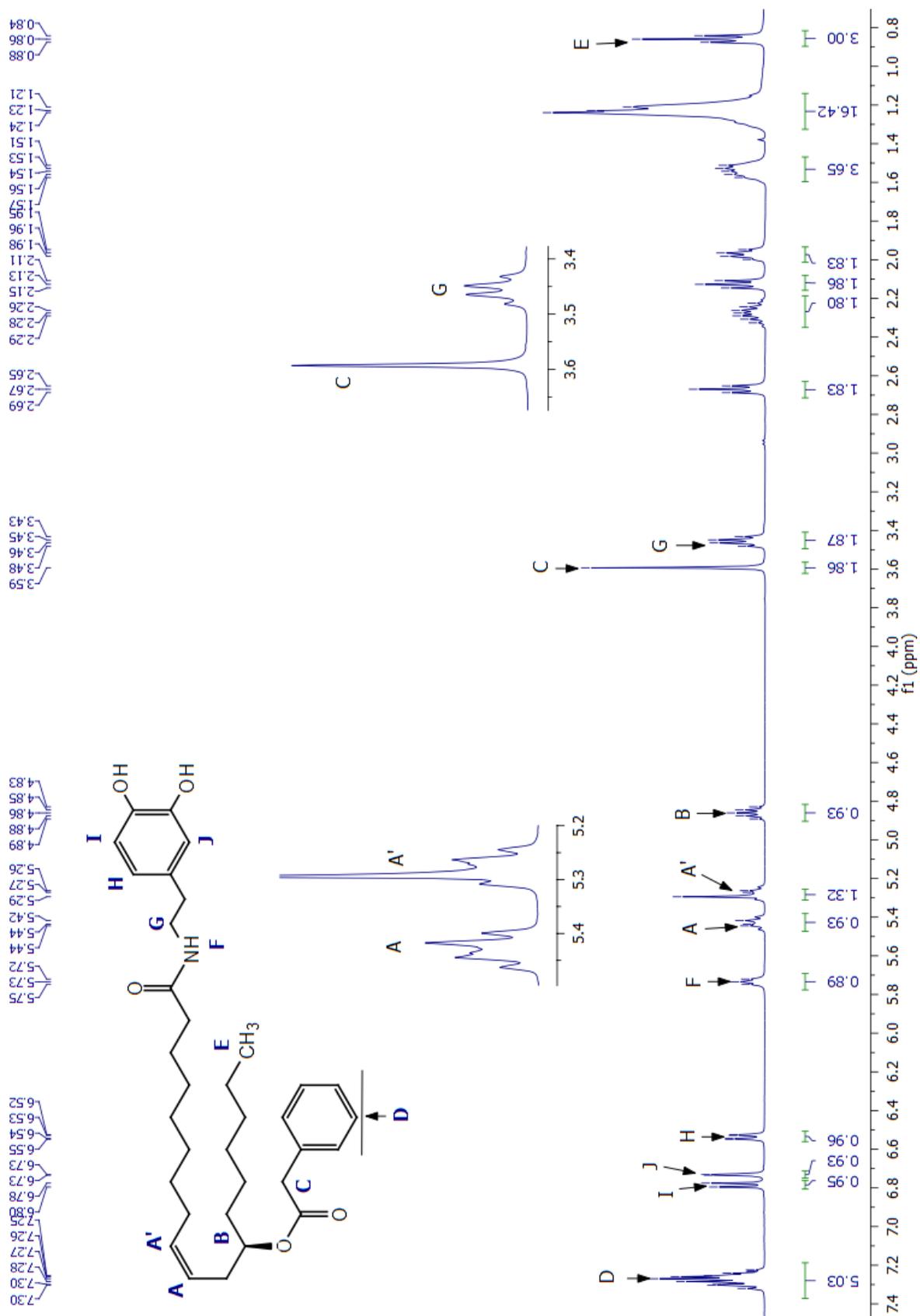


Anexo 5. Espectro de RMN-¹H del ácido 12-fenilacetilricinoleico 11.

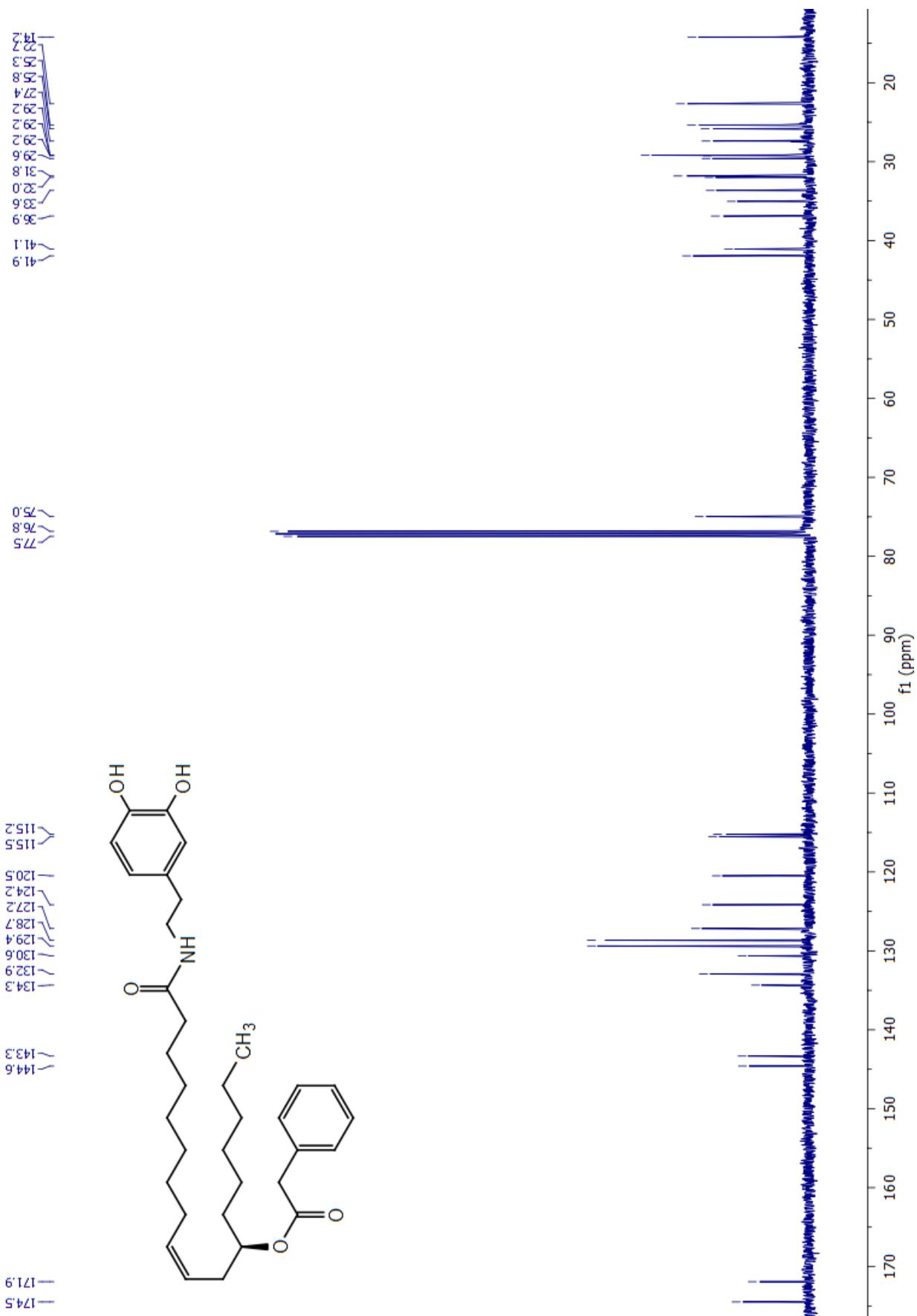


Anexo 6. Espectro de RMN-¹³C del ácido 12-fenilacetilricinoleico 11.

16.1.5. PhAR-DOPA 7.

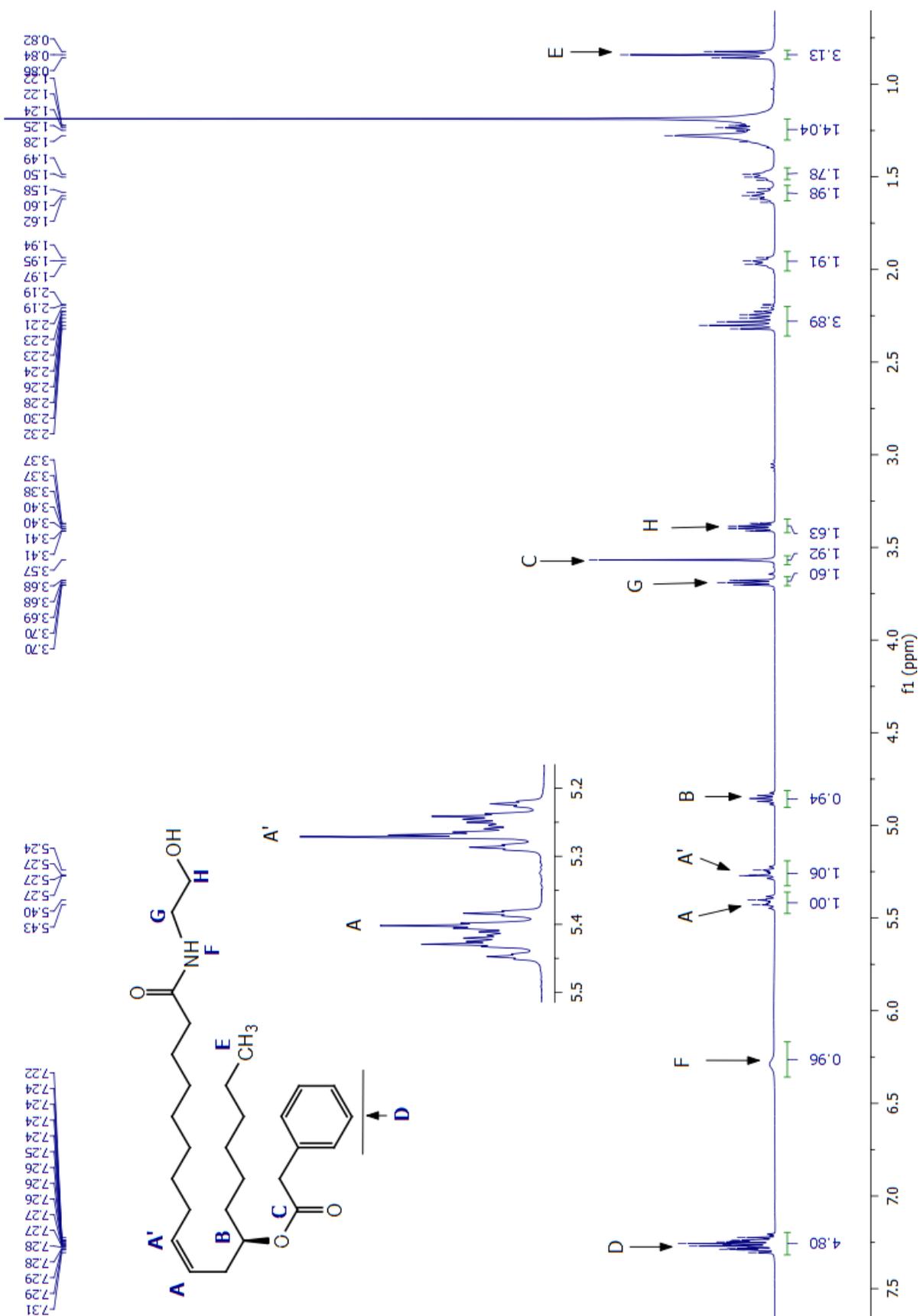


Anexo 8. Espectro de RMN-¹H del PhAR-DOPA 7.



Anexo 9. Espectro de RMN- ^{13}C del PhAR-DOPA 7.

16.1.6. PhAR-ETA 8.

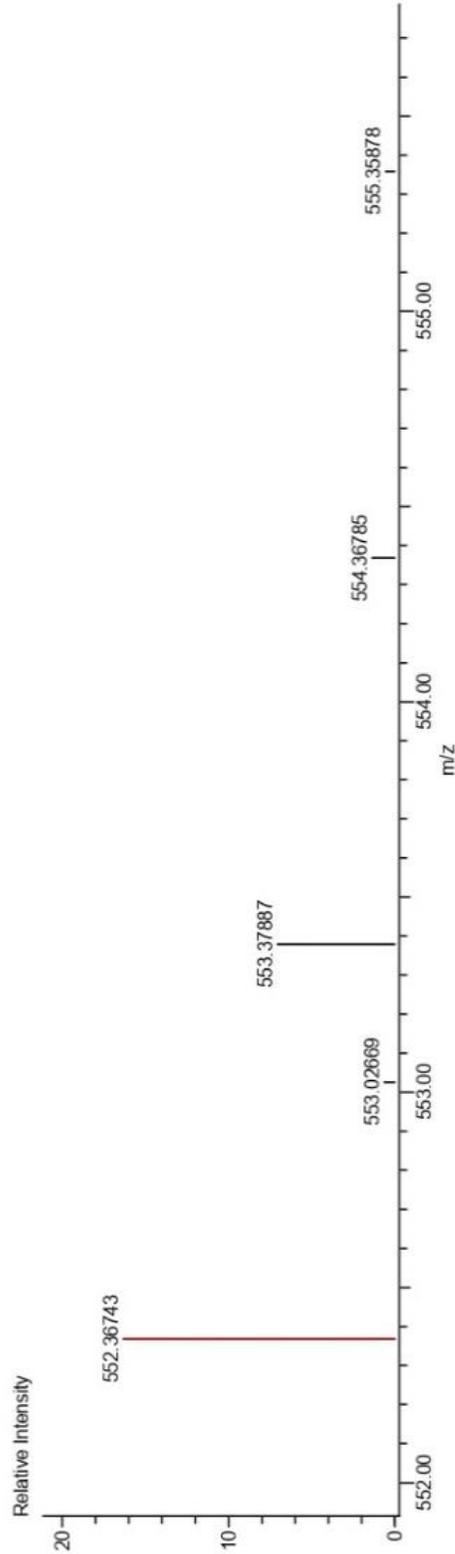


Anexo 10. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ del PhAR-ETA

16.2. Espectrometría de Masas de Alta Resolución

16.2.1. PhAR-DOPA 7.

Data: 2597_JGA-32
 Sample Name: Dr Cuevas Gabriel / Operador: Carmen Garcia
 Description:
 Ionization Mode: ESI+
 History: Determine m/z [Peak Detect [Centroid, 30, Area], Correct Base [Smooth [5]], Correct Base [5.0%], Average [MS], ...
 Charge number: 1
 Element: ^{12}C : 0 .. 40, ^1H : 0 .. 78, ^{14}N : 0 .. 2, ^{16}O : 2 .. 6
 Tolerance: 4.00 (mmu)
 Unsaturation Number: 0.0 .. 50.0 (Fraction: Both)
 Acquired: 10/9/2023 11:40:49 AM
 Operator: AccuTOF
 Mass Calibration data: cal-PEG-600-CG
 Created: 10/16/2023 7:03:17 PM
 Created by: AccuTOF



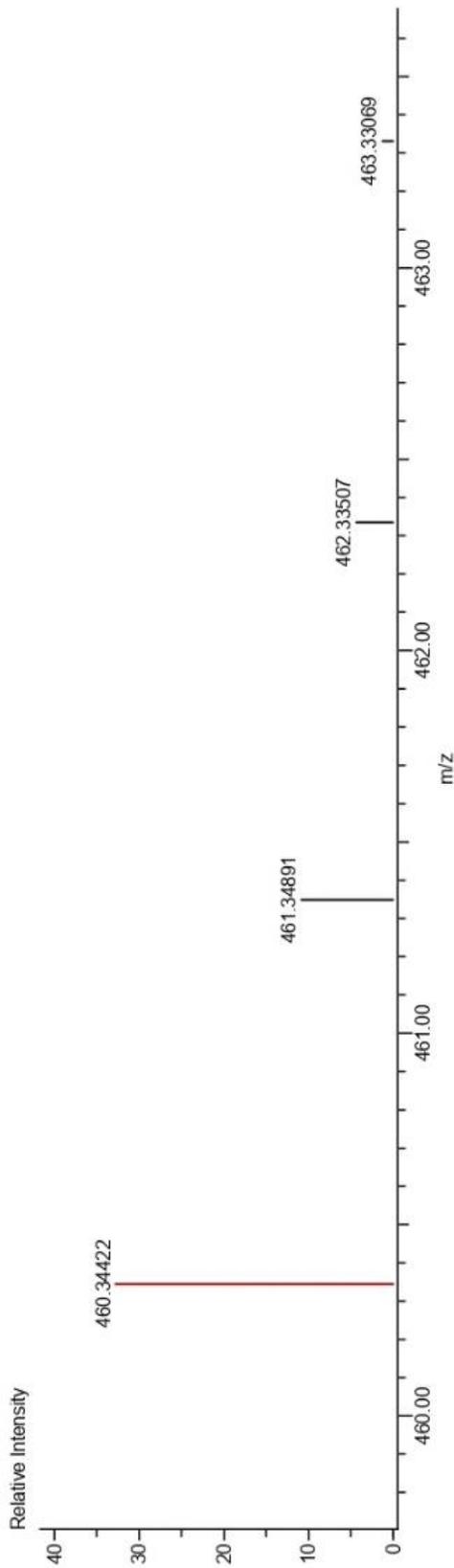
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
552.36743	45844.74	552.36890	-1.47	-2.66	$^{12}\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{N}_1\text{O}_5$	10.5

Anexo 12. Espectro de Masas de Alta Resolución del PhAR-DOPA 7.

16.2.2. PhAR-ETA 8.

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data: 2382_JGA-31
 Sample Name: DR. Cuevas Gabriel / Operador: Carmen Garcia
 Description:
 Ionization Mode: ESI+
 History: Determine m/z [Peak Detect[Centroid,30,Area],Correct Base[Smooth[5]],Correct Base[5.0%];Average(MS[...
 Created by: AccuTOF
 Created: 10/2/2023 4:24:26 PM
 Mass Calibration data: Cal_PEG_600
 Operator: AccuTOF
 Acquired: 9/19/2023 2:47:29 PM
 Charge number: 1
 Element: ¹²C: 0 .. 28, ¹H: 0 .. 50, ¹⁴N: 0 .. 1, ¹⁶O: 0 .. 5
 Tolerance: 5.00 (ppm), 5.00 .. 15.00 (mmu)
 Unsaturation Number: 0.0 .. 100.0 (Fraction: Both)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
460.34422	13737.99	460.34268	1.54	3.35	¹² C ₂₈ ¹ H ₄₆ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₄	6.5

Anexo 13. Espectro de Masas de Alta Resolución del PhAR-ETA 8.