



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGIA
APLICADA

**“Síntesis de derivados del naftaleno y determinación de su
efecto sobre la actividad de la enzima CYP2A5”**

T E S I S

Q U E PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN TECNOLOGÍA AVANZADA
P R E S E N T A:

ING. JAQUELINNE FLORES SALAS

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. María del Carmen Cruz López
Dr. Ricardo Pérez Pasten Borja



Tlaxcala

2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Puebla el día 11 del mes Febrero del año 2009, el (la) que suscribe Jaquelinne Flores Salas alumno (a) del Programa de Maestría en Tecnología Aplicada con número de registro B061091, adscrito a CIBA-IPN TLAXC., manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. María del Carmen Cruz López y cede los derechos del trabajo intitulado Síntesis de derivados del naftaleno y determinación de su efecto sobre la actividad de la enzima CYP2A5., al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ccruz25@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Nombre y firma

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del IPN unidad Tlaxcala y en los Departamentos de Química Orgánica y Toxicología Preclínica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, bajo la dirección de la **Dra. María del Carmen Cruz López** y el **Dr. Ricardo Pérez Pastén Borja**, con el financiamiento de proyectos de investigación de la Secretaria de Investigación y Posgrado (SIP20060371, SIP20070055, SIP20080966) del IPN. Así mismo, con el apoyo de la beca institucional para estudios de posgrado y del Programa Institucional para la Formación de Investigadores (PIFI) del IPN.

AGRADECIMIENTOS

La verdad es que después de este esfuerzo cuesta ordenar las ideas y probablemente no llegue a expresar con suficiente claridad la inmensa gratitud que siento.

Quiero agradecer, a la Dra. María del Carmen Cruz López, ante todo, haberme estimulado, a iniciar esta tesis y sobre todo haberme ayudado a llegar hasta el final. Pero también quiero agradecerle su apoyo durante estos años, su enérgico cariño y el tiempo que me ha dedicado. Trabajar junto a ella, supone un estímulo constante y una fuerte inacabable de aprendizaje.

Al Dr. Ricardo Pérez Pasten Borja, por su apoyo como asesor externo de esta tesis y por la oportunidad de introducirme en el mundo de las enzimas y su apoyo estadístico.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Joaquín Tamariz Mascarúa, por haberme permitido utilizar las instalaciones del laboratorio de Química Orgánica y además por sus sabios consejos para la realización de este proyecto.

A la Dra. Fabiola Jiménez Montejo, por su ayuda en la obtención de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear, parte fundamental para la realización de este trabajo, además de sus sabios consejos en la parte experimental.

Al M. en C. Rogelio y a la M. en C. Aurora por sus asesorías en el manejo de equipo HPLC.

A los miembros del jurado por sus atinadas observaciones y el tiempo invertido en la revisión de este trabajo: Dr. Joaquín Tamariz Mascarúa, Dr. Víctor Eric López y López, M. en C. Ángel Eduardo Absalón Constantino, Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi amor a mi esposo y a mis Padres que son la fuente de energía durante todos estos años de mi vida por su cariño, comprensión y apoyo. En todo momento los llevo conmigo.

A mis hermanas por la compañía y el apoyo que me brindaron. Sé que cuento con ellas siempre.

A Dios por llenar mi vida de dicha y bendiciones.

A la familia Román Salas por su apoyo.

No puedo olvidar a mis compañeros y amigos con los cuales he compartido incontables horas de trabajo. Gracias por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme.

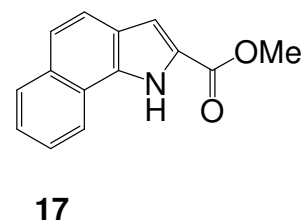
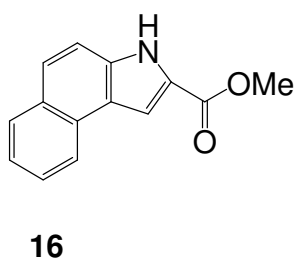
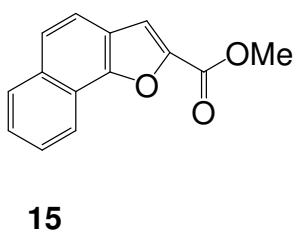
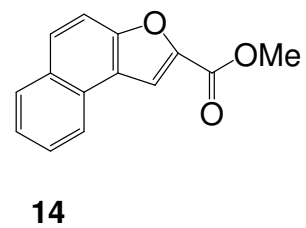
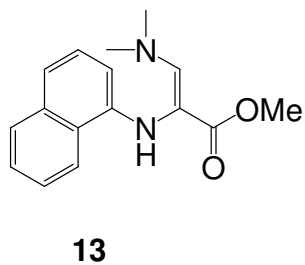
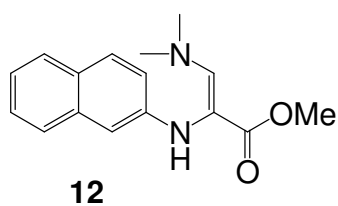
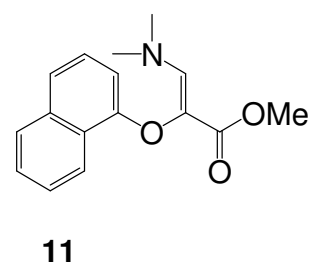
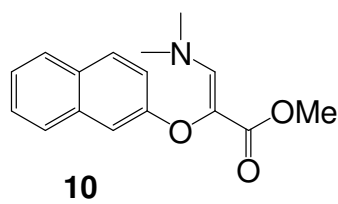
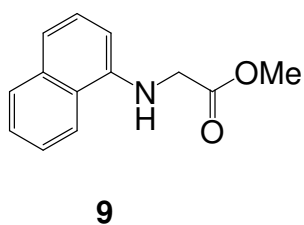
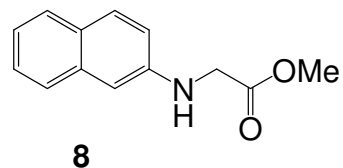
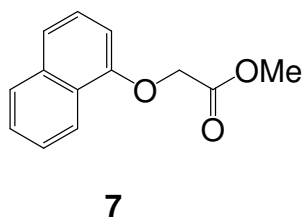
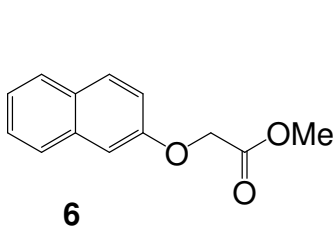
Gracias Pilly por tu amistad la cual no tiene precio, Aarón, Alberto, Alejandra, Cande, Eloy, Ehecatl, Fabiola, Jabel, Leonor, Máyela, Ogilbert, Selene, Teresa, Yessica, Esperanza.

INDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Efectos del tabaco sobre la salud	4
2.2 Dependencia a la nicotina y farmacología	4
2.3 Metabolismo de la nicotina	6
2.4 Terapias contra la adicción de nicotina	8
2.4.1 Tratamiento sustitutivo con nicotina	8
2.4.2 Bupropión	8
2.4.3 Tratamiento con Vareniclina	8
2.4.4 Tratamientos diversos	9
2.4.4.1 Vacunas	9
2.4.4.2 Uso de antidepresivos	9
2.4.4.3 Inhibidores de la monoaminoxidasa	10
2.4.4.4 Inhibidores de la recaptación de serotonina	10
2.4.4.5 Inhibición de la enzima hepática P450- 2A6 y 2A5	11
2.5 CYP2A6	12
2.5.1 CYP2A5	13
2.5.2 Inhibidores de CYP2A6 y CYP2A5	13
2.5.2.1 Derivados de naftaleno y quinolina	14
2.5.2.2 Benzaldehído y Feniletilamina	15
2.5.2.3 Derivados de lactonas	15
2.5.2.4 Derivados de organosulfurados	16
2.6 Síntesis de heterociclos derivados de naftaleno	17
2.7 Métodos para determinación de actividad sobre CYP2A6 o CYP2A5	19
3. Objetivos	21
3.1 Síntesis de ésteres metílicos 6-9 a partir de α , β -naftol y α , β -naftilamina	21
3.2 Síntesis de propenoatos de metilo 10-13 a partir de los ésteres metílicos 6-9	21
3.3 Síntesis de los compuestos heterocíclicos 14-17 , por ciclación intramolecular de los propenoatos 10-13	22
3.4 Evaluación biológica	22
4. Discusión y Resultados	23

4.1 Síntesis de los ésteres metílicos 6-9	23
4.2 Síntesis de propenoatos de metilo.....	30
4.2.1 Síntesis de (Z)-3-N, N-dimetilaminoacrilatos de metilo 10-13	30
4.3 Síntesis de índoles y benzofuranos.....	34
4.3.1 Síntesis de benzofuranos 14-15	34
4.3.2 Síntesis de índoles 16-17	38
4.4 Resultados de ensayo biológico	43
4.4.1 Validación del método Cromatográfico	43
4.4.2 Medición del efecto de los compuestos 6-17 sobre la actividad de CYP2A5 <i>in vitro</i> 45	
4.4.2.1 Efecto de compuestos 6-9 sobre la actividad de la CYP2A5.....	45
4.4.2.2 Efecto de enaminonas 10-13 sobre la actividad de la CYP2A5	47
4.4.2.3 Efecto de índoles 14-17 sobre la actividad de la CYP2A5	49
4.4.2.4 Estudio cinético de los compuestos 6, 8, 12 y 16	53
5. Conclusiones	57
6. Parte experimental.....	59
7. Bibliografía	81
8. Anexo1	87

COMPUESTOS SINTETIZADOS



ABREVIATURAS

AcOEt = Acetato de etilo

ACN = Acetonitrilo

Anh = anhidro

AlCl₃ = Tricloruro de aluminio

BrCH₂CO₂Me = Bromoacetato de metilo

CYP = Citocromo P450

ClCH₂CO₂Na = Cloroacetato de sodio

CH₂Cl₂ = Diclorometano

DMADMF = Dimetilacetal de la dimetilformamida

FMO = Flavin monooxigenasa

h = hora

HCl = Ácido clorhídrico

Kg. = Kilogramos

K₂CO₃ = Carbonato de potasio

KBr = Bromuro de potasio

KH₂PO₄ = Fosfato monopotásico

K₂HPO₄ = Fosfato dipotásico

L = Litros

min = minutos

mL = mililitros

NaOH = Hidróxido de sodio

Na₂SO₄ = Sulfato de sodio

NaHCO₃ = Bicarbonato de sodio

NH_4Cl = Cloruro de amonio

NADPH = Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato

PCR = reacción en cadena de la polimerasa

*p*TsOH = ácido *para*-toluensulfónico

seg = Segundos

TRN = Terapia de reemplazo nicotínico (TRN)

TPC = Tranilcipromina

μM = Micromolar

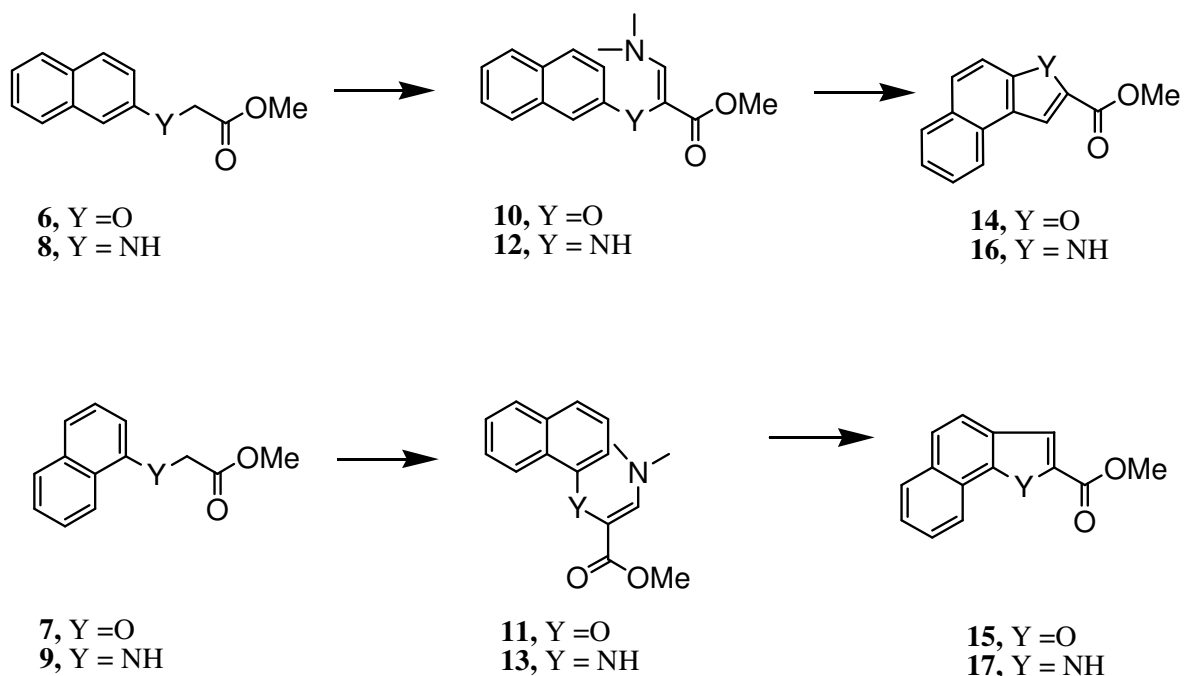
ZnCl_2 = Cloruro de zinc

RESUMEN

El tabaquismo es reconocido como un padecimiento crónico y adictivo, que anualmente mata aproximadamente a 4 millones de personas en el mundo. Además es uno de los factores de riesgo de morbilidad y mortalidad más prevaleciente. Por ello es importante inducir a los fumadores a abandonar el hábito y proporcionar asistencia en su esfuerzo. En la actualidad la terapia de reemplazo de nicotina es la forma más reconocida para el tratamiento, no obstante, la combinación de farmacoterapia con terapias no farmacológicas representa la forma más efectiva para ayudar a los fumadores.

La compulsión por el consumo de tabaco se atribuye a la adicción a la nicotina, ésta es metabolizada por la enzima hepática citocromo P450 2A6 (CYP2A6). Recientemente, la inhibición de esta enzima por compuestos químicos representa una alternativa potencial en la terapia anti-tabaco.

Debido a la importancia de la adicción a nicotina y con el propósito de identificar compuestos que muestren actividad inhibitoria sobre la enzima CYP2A6, en el presente trabajo se sintetizaron los benzofuranos e índoles derivados del naftaleno **14 – 17**. La metodología para la obtención de éstos consistió en la ciclación intramolecular, catalizada por ácidos de Lewis, de las enamionas **10-13**. Las enamionas se obtuvieron a su vez de los ésteres **6-9**.



Los compuestos **6-17** fueron evaluados en un modelo *in vitro*, utilizando fracción microsomal de hígado de ratón, usando la reacción de hidroxilación de cumarina como indicador de la actividad de la enzima CYP2A5.

Se aplicó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar la formación de 7-hidroxycumarina y se determinó la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) para cada uno de los compuestos sintetizados. Se observó que los ésteres metílicos **6-8** presentaron la menor actividad inhibitoria, mientras que los compuestos **14 a 17** resultaron ser los más activos. Se realizó la cinética completa de los compuestos **6, 8, 12 y 16** los cuales mostraron una inhibición competitiva, con una K_i de 0.43, 0.3, 0.35, 0.3 μM respectivamente, valores que son comparables a los reportados para fármacos utilizados como inhibidores de la enzima.

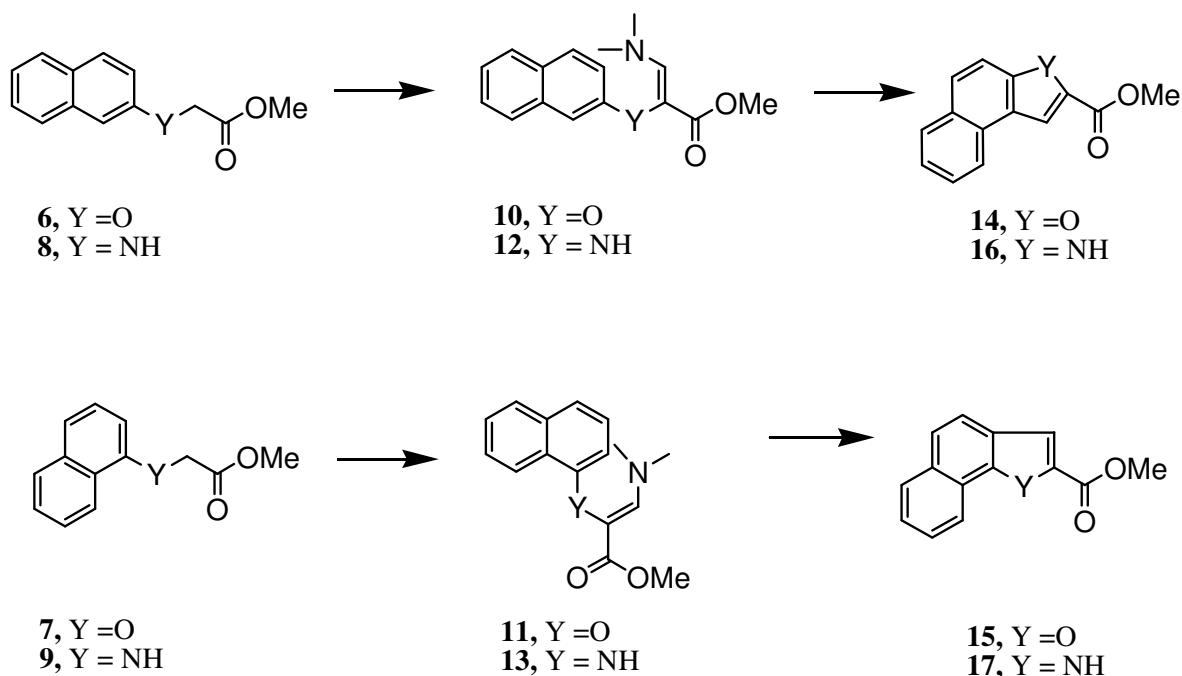
Si bien los compuestos evaluados presentan actividad inhibitoria sobre la enzima CYP2A5, es necesario hacer el ensayo sobre la enzima humana y determinar si el efecto es comparable.

ABSTRACT

Tobacco smoking is recognized as a chronic and recurrent addictive disease and kills 4 million people worldwide annually. Also is one of the world's most prevalent modifiable risk factors for morbidity and mortality. It is important encourage smokers to quit and assist in their smoking cessation attempts. Until recently nicotine replacement therapy (NRT) has been the only recognized form of treatment for smoking cessation. However the most effective approach assisting smokers in their quit attempts combines both pharmacotherapy and nonpharmacological interventions.

The compulsive nature of tobacco use is attributable to nicotine addiction. Nicotine is eliminated by metabolism through the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) enzyme in liver. Inhibition of CYP2A6 by chemical compounds may represent a potential supplement to anti-smoking therapy.

Due to the importance of addiction to nicotine and with the aim of identifying compounds that show inhibitory activity on CYP2A6 enzyme, in this work benzofurans and indols of the naphthalene derivative **14-17** were prepared. The methodology for obtaining them was the intramolecular cyclization catalyzed by Lewis acids of the enaminones **10-13**. The latter were obtained from the esters **6-9** the enaminones.



Compounds **6-17** were evaluated in an *in vitro* model using microsomal fraction of mouse liver, using the reaction of coumarin hydroxylation as indicator of the activity of the enzyme CYP2A5.

Applying a method of high-performance liquid chromatography (HPLC) to quantify the formation of 7-hydroxicumarina the Inhibitory Concentration 50 (IC₅₀) for each of the prepared compounds was determined. It was found that methyl esters **6-8** had the lowest inhibitory activity, while compounds **14-17** were the most active. We performed the complete kinetics of the compounds **6, 8, 12** and **16**, which showed a competitive inhibition with a Ki values of 0.43, 0.3, 0.35, and 0.3 μM, respectively, that are comparable to those reported for drugs used as inhibitors of enzyme.

Although the compounds tested, show inhibitory activity on CYP2A5 enzyme, it is necessary to do the essays on the human enzyme and to determine if the effect is comparable.



INTRODUCCION

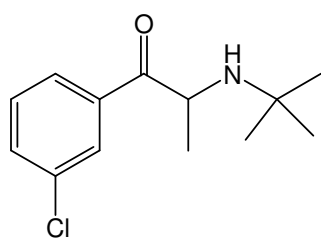
El uso del tabaco, especialmente fumar cigarrillos, es ampliamente reconocido por la comunidad médica como un importante problema de salud pública por que constituye la principal causa prevenible de enfermedad y muerte prematura, que involucra los diversos niveles de atención en salud, ocasionando con ello que recursos importantes sean destinados para su tratamiento.^{1,2}

El tabaquismo se asocia con una mayor incidencia de diferentes tipos de cáncer,³ enfermedades respiratorias y cardiovasculares, así como trastornos gastrointestinales y otras complicaciones médicas, ocasionadas principalmente por el humo del cigarro.⁴ Es una enfermedad a la que es más fácil definir como un síndrome de daño multisistémico, lentamente progresivo, asociado con la adicción a la nicotina.⁵

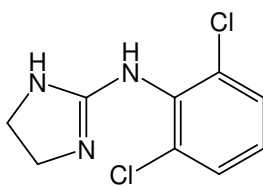
En México, la última Encuesta Nacional de Adicciones reporta que aproximadamente el 27.7% de personas de entre 12 y 65 años de edad, son fumadoras. Aunque se estima que más del 52.6% de la población está expuesto al humo de tabaco en el ambiente,⁶ y que el 18.4% son mujeres.⁷

Se ha estimado que aproximadamente el 33% de fumadores tiene el deseo de abandonar el consumo⁸ y a pesar de ello sólo el 5% logra su objetivo.⁹ Una posible explicación a este fenómeno es que la disminución o eliminación de la dependencia a nicotina requiere de una combinación de terapias farmacológica y no farmacológica como puede ser el cambio conductual.

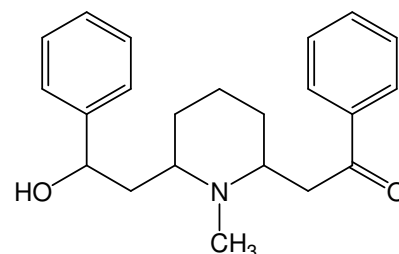
De las terapias farmacológicas para disminuir el consumo resaltan tres, la más frecuente y conocida es la terapia de reemplazo de nicotina (TRN). El uso de antidepresivos como el Bupropión (1),¹⁰ Clonidina (2),¹¹ Lobelina (3),¹² Rimonabant (4),¹³ y más recientemente Vareniclina (5).¹⁴ También se han desarrollado vacunas que han mostrado alguna efectividad.¹⁵



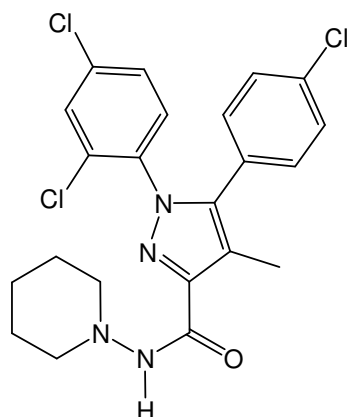
1



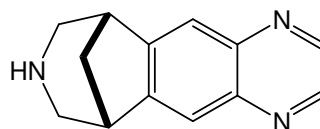
2



3



4

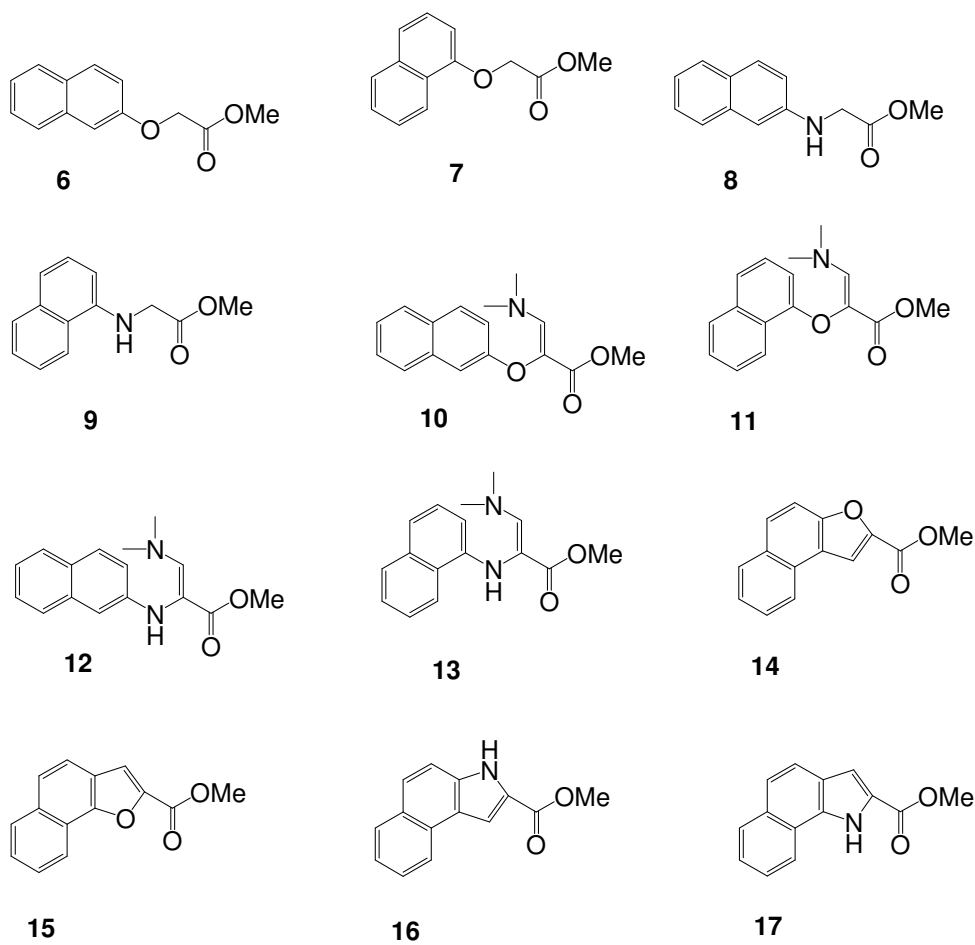


5

Desde hace algunos años, se encontró que el metabolismo de nicotina está estrechamente relacionado con el desarrollo de la adicción, ya que después de algunos estudios, se determinó que poblaciones de individuos con ciertas características genéticas no desarrollaban la dependencia a tabaco.¹⁶ Se encontró que la diferencia en el metabolismo de la nicotina entre poblaciones se debe a la presencia de un gen responsable de la síntesis de una enzima perteneciente a la familia de los citocromos, que está implicada en la oxidación de nicotina (CYP2A6).¹⁷ Esta es una enzima que presenta polimorfismos y se observó que las isoformas menos eficientes se asocian con una menor probabilidad de volverse dependiente, así como con una menor toxicidad cancerígena del tabaco.¹⁸ Lo que ha llevado a considerar que la inhibición de la enzima CYP2A6 representa una terapia que puede coadyuvar al tratamiento de dependencia a nicotina.¹⁹ A partir de esta observación, se han hecho diversos estudios para encontrar inhibidores de citocromo, encontrándose que los compuestos que han mostrado efecto inhibitorio sobre CYP2A6 son metoxalen, tranilcipromina y triptamina.²⁰

También se ha descrito la evaluación de diversos compuestos estructuralmente análogos a nicotina y de otros con características muy diversas como bencilaminas, y compuestos azufrados entre otros.²¹ No obstante y a pesar de que algunos de ellos han mostrado actividad inhibitoria sobre la enzima, no han demostrado ser específicos y presentan efectos colaterales no deseados. Un estudio teórico, permitió establecer que la presencia de un anillo aromático sustituido con grupos con alta densidad electrónica, eran potenciales inhibidores de la CYP2A6.²²

Por tal motivo, en este trabajo se llevó a cabo la síntesis de los ésteres metílicos **6-9**, acrilatos **10-13**, indoles y benzofuranos **14-17** derivados de naftaleno los cuales presentan características estructurales que potencialmente pueden presentar inhibición sobre la actividad de la enzima CYP2A6 presente en humanos. Sin embargo, en el presente trabajo se evaluó el efecto de los compuestos sobre la enzima CYP2A5 que es la isoforma presente en ratón.



2.

ANTECEDENTES

2.1 Efectos del tabaco sobre la salud

El principal efecto del tabaco en el organismo es sobre aquellos tejidos directamente expuestos al humo del cigarrillo. Ya que el humo está compuesto por numerosas sustancias carcinogénicas,²³ éstas pueden ser inhaladas o bien disueltas en la saliva, llegando al intestino donde son absorbidas, pasan a través del hígado a la circulación sistémica, razón por la que el uso de tabaco se ha relacionado con cáncer de pulmón, laringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, colon-recto, riñón, vejiga, aparato genital y órganos linfáticos.²⁴

2.2 Dependencia a la nicotina y farmacología.

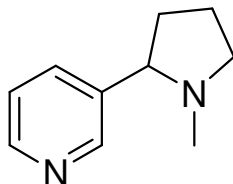
La nicotina es el principal componente del tabaco que establece y mantiene la adicción, es una sustancia agonista del receptor nicotínico de la acetilcolina en el sistema nervioso central.²⁵ Además, es un potente liberador presináptico de dopamina²⁶ en el sistema límbico y en la corteza cerebral. Estas acciones farmacológicas centrales y periféricas son responsables de que las personas fumadoras, tras el consumo de tabaco muestren una sensación de bienestar y disminución importante de la ansiedad y el apetito.²⁷

Los estudios muestran un síndrome generado por la disminución de nicotina que incluye síntomas como irritabilidad, falta de concentración, ansiedad, inquietud, aumento de hambre, depresión, conocido como síndrome de abstinencia a la nicotina (SAN).²⁸

La aparición del SAN es una de las principales causas de recaídas durante el proceso de abandono del tabaco y se ha demostrado que existe una disminución de los niveles de dopamina en el sistema dopaminérgico-mesolímbico, y la participación del sistema noradrenérgico.²⁹ Igualmente, se ha propuesto que existe una relación de éste con los niveles de cotinina en el organismo lo que está asociado con el grado de adicción.³⁰

La nicotina (**18**), es una amina terciaria compuesta por una piridina y un anillo de pirrolidina.^{31,32} El tabaco contiene el isómero *S*, sin embargo, se ha detectado en el humo del tabaco el isómero *R* hasta en un 10% de la nicotina presente y se sugiere que durante el proceso de combustión se produce una racemización.¹⁶ La nicotina *S* es mucho más potente que su

enantiómero.³³ Se trata de una base débil que a pH fisiológico permanece hasta un 31% sin ionizar y puede de esta forma atravesar las membranas celulares con mayor facilidad.^{16, 31}



Nicotina (18)

Al inhalarse el humo del cigarrillo, se consigue un pico plasmático de nicotina que alcanza su máximo nivel en menos de 10 min, obteniéndose concentraciones de hasta 25-50 ng/mL. Su vida media es corta, de 60 a 120 min, pudiendo acumularse en el organismo 8 h. El descenso de la concentración plasmática de nicotina ocurre en dos fases: una rápida que dura de 5-10 min, debida a su distribución en los tejidos orgánicos, y otra más lenta que dura 60 min, en la que se produce su metabolización.³⁴

La absorción de la nicotina puede llevarse a cabo a través de los plexos sublinguales y mucosa oral, pulmón, y piel, aunque en este caso la absorción es mínima.³⁵ Cuando la nicotina se absorbe a través del pulmón, en menos de 10-20 segundos se detecta en cerebro.³⁶ En esta rapidez de absorción radica en gran parte su potencial de generar adicción. Una vez que la nicotina llega al cerebro, atraviesa la membrana hematoencefálica, facilitando el transporte al interior de las células y la unión a los receptores, liberándose a continuación diversos neurotransmisores.³⁵

La nicotina se difunde fácilmente en tejido cerebral, donde se une a los receptores nicotínicos colinérgicos. A dosis más elevadas, la nicotina actúa directamente sobre el sistema nervioso periférico, produciendo estimulación ganglionar y la liberación de catecolaminas adrenérgicas.³⁷ Por su similitud estructural con la acetilcolina, actúa sobre los mismos receptores, originando una estimulación ganglionar primaria, pudiendo más tarde ocasionar una desensibilización secundaria, favoreciendo la aparición del fenómeno de la tolerancia, que se define como la necesidad de aumentar notablemente la cantidad de una sustancia para alcanzar el efecto deseado.³⁵

Una vez que alcanza las vías aéreas distales y los alvéolos, la nicotina sigue su camino de distribución por los diferentes tejidos y órganos, teniendo consecuencias en el sistema nervioso, además de efectos gastrointestinales, neuroendocrinos, cardiovasculares y sobre el metabolismo.^{16, 35}

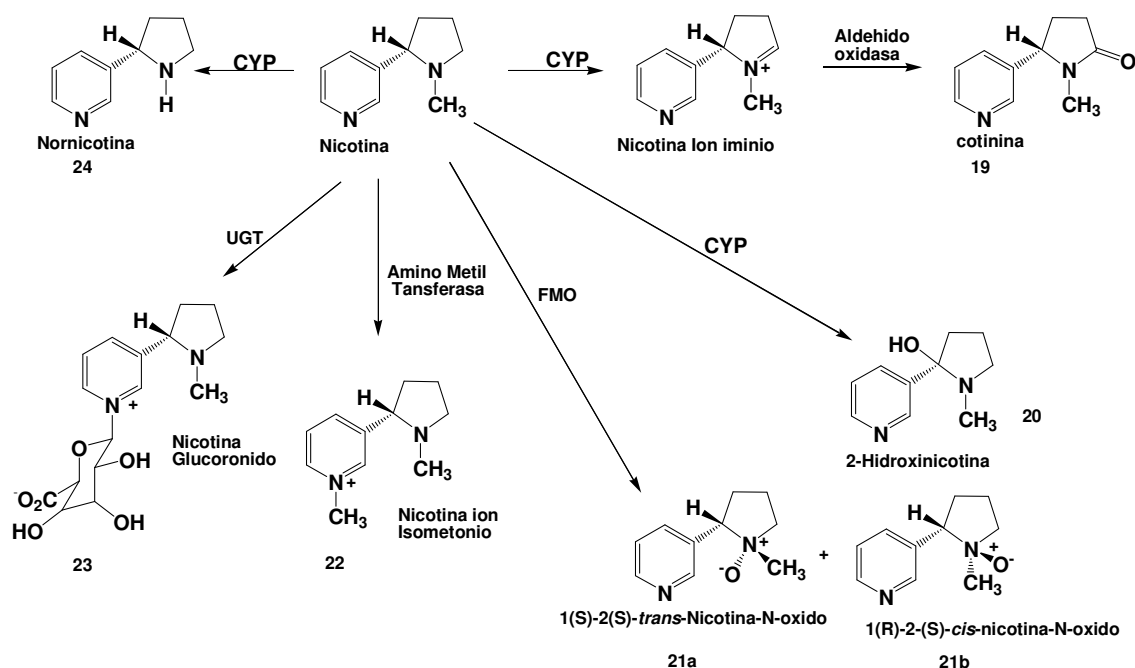
La nicotina entra en la circulación pulmonar y se distribuye ampliamente en los tejidos del cuerpo con un volumen de distribución de 2.0 a 3.0 L/kg. La unión a proteínas plasmáticas es despreciable con un promedio de 4.9% en los seres humanos.³⁸

La principal vía de eliminación es renal, ésta depende del pH y del volumen urinario, representando un 2 a 35% de su eliminación total.¹⁶ Uno de los principales metabolitos de la nicotina es la cotinina.^{39, 30, 24, 16, 3} Se trata de un producto farmacológicamente inactivo que debido a su larga vida media, se ha utilizado como una medida de la ingesta de nicotina en los fumadores de cigarrillos.³⁸

2.3 Metabolismo de la nicotina

El metabolismo de la nicotina tiene lugar principalmente en hígado, y en muy baja proporción en pulmones y riñón.⁴⁰ Diferentes modelos han sido desarrollados para estudiarlos, algunos de ellos incluyen el uso de células intactas y sistemas de hepatocitos aislados o bien los sistemas enzimáticos microsomales hepáticos.³⁶

La nicotina puede seguir diferentes rutas de transformación (Esquema 1) y se acepta actualmente que seis metabolitos son formados cuantitativamente,¹⁶ siendo el más abundante la cotinina (**19**)^{41,30,3} que representa alrededor del 70 al 80% de la nicotina absorbida.^{16,35}



Esquema 1. Metabolismo de nicotina

La transformación de nicotina a cotinina, se realiza en dos pasos.¹⁸ El primer paso es mediado por el Citocromo P450 2A6 (CYP2A6), para producir iones iminio, que se encuentran en equilibrio con 5-hidroxinicotina.^{16, 34, 36} El segundo paso es catalizado por un aldehído oxidasa citoplásmica, que finalmente da origen a la estructura de pirrolidina. El *N*-óxido de nicotina (**21**) es otro metabolito, aunque solo alrededor del 4 al 7% de la nicotina adsorbida por los fumadores se metaboliza a través de esta ruta. Esta conversión implica una flavin monooxigenasa (FMO),¹⁸ lo que da lugar a la formación de los isómeros 1'-(*R*)-2'-(*S*)-*cis* y 1'-(*S*)-2'-(*S*)-*trans*. Además de la oxidación del anillo de pirrolidina, el anillo de piridina de la nicotina es susceptible a una metilación del nitrógeno para formar el ion isometonio para generar el compuesto **22**. (Figura 1).^{42, 16}

El citocromo 2A6, pertenece a una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, que se localizan principalmente en tejidos hepáticos y algunas células cerebrales.⁴³ Participa en el metabolismo oxidativo de un gran número de sustancias exógenas y endógenas y es responsable de la inactivación de al menos el 70% de la nicotina por transformación en cotinina.^{44, 26} CYP2A6 constituye el 1-10% del total de

los citocromos hepáticos³⁶ y se sabe que cataliza la activación metabólica de varios precarcinógenos y premutágenos como aflatoxina B1, nitrosaminas y algunos fármacos.⁴⁵

2.4 Terapias contra la adicción de nicotina.

2.4.1 Tratamiento sustitutivo con nicotina.

La terapia de reemplazo nicotínico (TRN) consiste en la administración de nicotina por una vía diferente a la del consumo de tabaco, en una cantidad suficiente como para disminuir los síntomas del síndrome de abstinencia, pero insuficiente como para crear dependencia.¹⁰ La nicotina se puede administrar en forma de chicle,⁴⁶ parche,⁴⁷ spray nasal o inhalador.⁴⁸ A pesar de ser la principal terapia farmacológica, los resultados no son del todo satisfactorios.

2.4.2 Bupropión.

Bupropión (1) es el primer fármaco no nicotínico autorizado para el tratamiento de tabaquismo, fue aprobado en 1997 en EUA y en el 2000 en el Reino Unido.⁴⁹ Este compuesto ejerce su efecto por inhibición de reabsorción de dopamina en las vesículas neuronales sinápticas y es un débil inhibidor de liberación de noradrenalina, sin embargo presenta efectos laterales como insomnio y boca reseca que son característicos del síndrome de abstinencia.^{50, 26} Además puede actuar como inhibidor de algunas enzimas y ocasionar el incremento en los niveles plasmáticos de algunos fármacos como antidepresivos, antiarrítmicos y antipsicóticos. Por ello, a pesar de ser una terapia de bajo costo y eficiente no ha logrado superar el reemplazo de nicotina.³⁵

2.4.3 Tratamiento con Vareniclina.

Vareniclina (5) un compuesto que recientemente fue aprobado como fármaco para dejar de fumar, presenta un mecanismo de acción novedoso ya que resulta ser agonista y antagonista de receptores nicotínicos de acetilcolina y en un estudio clínico mostró mayor efectividad y tolerabilidad que el bupropión.^{51, 52, 26, 25}

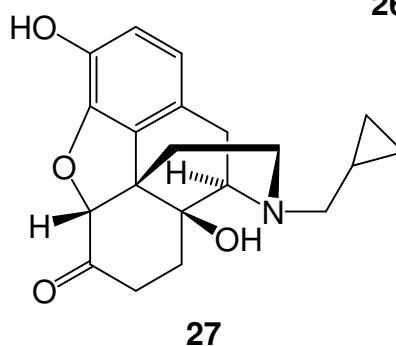
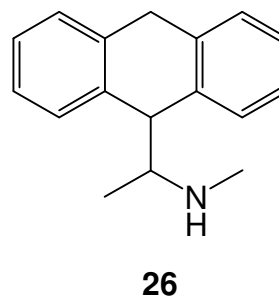
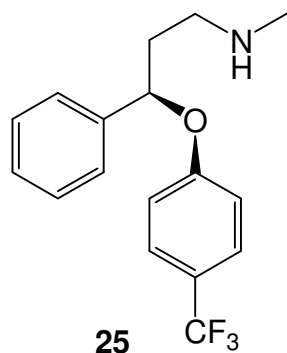
2.4.4 Tratamientos diversos.

2.4.4.1 Vacunas.

Al menos tres diferentes compañías han realizado estudios clínicos de fase 2 para diferentes vacunas antinicotínicas, mismas que se espera puedan ser comercializadas posteriormente. Generalmente, estas vacunas, están compuestas por nicotina, una proteína acarreadora y un aditivo.⁵³ Se ha propuesto que dicha formulación genera la producción de anticuerpos específicos para nicotina que fijarían a ésta, secuestrándola del plasma sanguíneo y evitando su efecto sobre el sistema nervioso central. También se ha observado una buena tolerancia, presentando como efecto adverso alguna reacción en la región de inoculación.⁵²

2.4.4.2 Uso de antidepresivos.

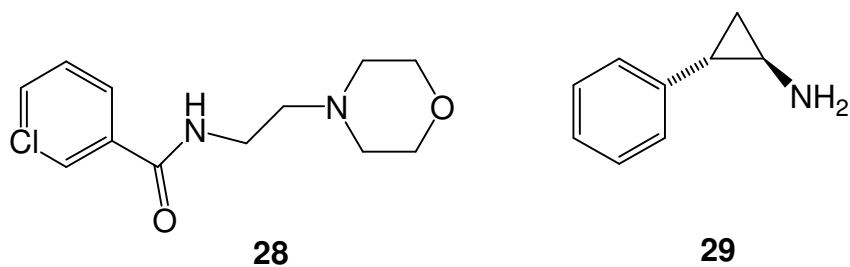
Además del bupropión, otros estimulantes del sistema nervioso central como fluoxetina (**25**), nortriptilina (**26**), clonidina (**2**)⁵⁴ y naltrexona (**27**),⁵⁵ que también son dopaminérgicos, se han postulado como alternativas para el tratamiento del tabaquismo. Sin embargo, no han sido aprobados porque en estudios clínicos no se ha observado un efecto real sobre la disminución de la adicción a nicotina.³⁵



2.4.4.3 Inhibidores de la monoaminoxidasa

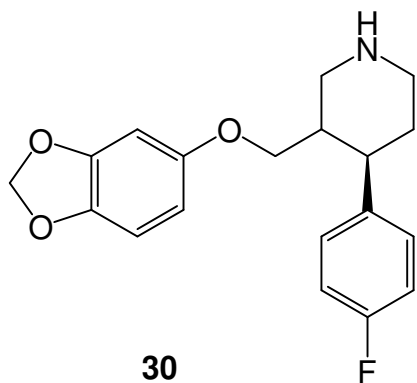
Los inhibidores de la monoaminoxidasa, al parecer están implicados en el mecanismo de la adicción, ya que son responsables de la degradación de dopamina y han sido ensayados en el tratamiento para el abandono del tabaco.^{56, 52, 26}

La moclobemida (**28**), un inhibidor reversible de la monoaminoxidasa A (RIMA), ha demostrado su eficacia en un ensayo clínico controlado con placebo.¹⁰ La tranilcipromina (**29**) también ha mostrado ser un potente inhibidor.¹⁷



2.4.4.4 Inhibidores de la recaptación de serotonina

Algunos compuestos como fluoxetina (**25**) o paroxetina (**30**), que son inhibidores de recaptación de serotonina, han sido utilizados en el tratamiento de la adicción a la nicotina, sin embargo, los resultados no son favorables ya que sólo ocasionan respuesta en pacientes con depresión.⁵⁷



2.4.4.5 inhibición de la enzima hepática citocromo P-450 2A6 y 2A5.

Trabajos recientes se han enfocado a la inhibición de una enzima del grupo de citocromos P450 que participa en el metabolismo de la nicotina como un intento para dejar de fumar.⁵⁸ La determinación de la inactivación de nicotina juega un papel muy importante, ya que la nicotina produce la dependencia al tabaco.⁴¹

Las variaciones de esta enzima están implicadas en el metabolismo rápido o lento de la nicotina.⁵⁹ Se han realizado estudios *in vivo* utilizando cumarina y nicotina como sustratos encontrando que hay una gran variabilidad interindividual en la actividad de CYP2A6.⁶⁰ Esta variabilidad condiciona la conducta hacia el tabaco, como puede ser la capacidad de iniciar el hábito y volverse dependientes del tabaco.⁶²

Los fumadores que metabolizan lentamente la nicotina mantienen unas concentraciones más elevadas de nicotina en sangre.⁶² Trabajos recientes demuestran que sujetos con alelos inactivos de la CYP2A6 compensan la disminución del metabolismo de la nicotina reduciendo el número de cigarrillos fumados por día.⁶³

De este modo la inhibición de CYP2A6 podría disminuir el metabolismo de la nicotina, así como también la exposición al monóxido de carbono.⁶⁴ La administración de fármacos inhibidores de la CYP2A6 podría plantearse como opción terapéutica que modulara la actividad de esta enzima y utilizarse en el tratamiento de la adicción al tabaco así como también en la reducción de daños en el cuerpo.⁶⁵

La administración conjunta de inhibidores de la CYP2A6 reduciría el metabolismo hepático de la nicotina e incrementaría su biodisponibilidad, con lo que disminuiría la dosis oral necesaria para alcanzar unos valores terapéuticos sin provocar efectos secundarios.⁶⁶

2.5 CYP2A6.

De acuerdo con la definición actual, si la frecuencia de una variante genética es superior al uno por ciento, se llama polimorfismo genético.⁶⁷ Muchos de los genes de citocromo P450 presentes en el metabolismo de medicamentos son altamente polimórficos, por ello causan pronunciada variabilidad interindividual en el metabolismo de medicamentos utilizados clínicamente.^{68,69}

Inicialmente tres alelos de CYP2A6 fueron identificados: de tipo salvaje (CYP2A6 * 1)⁷⁰ y dos alelos defectuosos (CYP2A6 * 2 y CYP2A6 * 3).^{71,63} También se han descrito otros alelos inactivos comunes en individuos de Asia,⁷² Japon,⁷³ Korea,⁷⁴ Caucasia,⁷⁵ donde las partes o todo el gen CYP2A6 es inactivo (CYP2A6 * 4A, y 4B * 4C *),⁶¹ se ha encontrado también que CYP2A6*7, CYP2A6*11, CYP2A6*9, CYP2A6*8 y CYP2A6*10 presentan una disminución en la actividad enzimática.⁷³ Recientemente, informaron de un alelo híbrido CYP2A7, (CYP2A6 * 12) que lleva un cruce en el intrón 2.⁶¹ Se reportaron otros alelos que poseen sustitución en un solo aminoácido G5R (CYP2A6 * 13), S29N (CYP2A6 * 14), K194E (CYP2A6 * 15), y R203S (CYP2A6 * 16).⁶² Se han hecho estudios tratando de explicar la inactivación de CYP2A6, encontrándose que la sustitución de diferentes aminoácidos puede alterar su funcionamiento. Así, se demostró que con el producto de PCR de la variación de arginina (R) 128 por glutamina (Q) da lugar al gen inactivo CYP2A6*6, dado que la glutamina es potencialmente un residuo neutral en contraste con la arginina cargada positivamente, tal sustitución puede afectar a la transferencia electrónica y/o a la estructura terciaria y, por consiguiente, causar una alteración crítica en la función catalizadora de CYP2A6.⁷³

Por dichas razones se ha reportado que el genotipo CYP2A6 podría ser de suma importancia en la disminución del hábito de fumar, debido a que CYP2A6 juega un papel importante en el metabolismo de la nicotina *in vivo*,⁷⁶ debido a que individuos homocigotos presentan solo el 15% de los niveles de nicotina en la orina comparados con sujetos que tienen un gen activo cuando fuman el mismo número de cigarrillos, de esta manera los individuos homocigotos muestran tener una reducción en el riesgo de cáncer en el pulmón.¹⁶

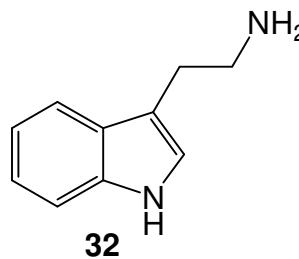
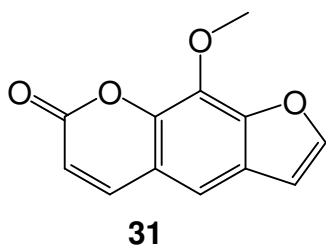
Otros P450s tal como CYP2B6 puede, sin embargo, catalizar la C-oxidación de nicotina pero con una muy baja afinidad. Por otro lado, la enzima CYP2A5 de ratón también cataliza el metabolismo de varias toxinas y se sabe que es la contraparte de la enzima CYP2A6 humana.⁷⁷

2.5.1 CYP2A5

CYP2A5 es una enzima homóloga de CYP2A6,⁷⁸ que actúa en el metabolismo de sustancias tóxicas como nitrosaminas, aflatoxinas y nicotina.⁷⁹ Es una isoforma de la subfamilia CYP2A en roedores con una homología del 82% con la enzima humana y es frecuentemente usada para estudios *in vitro*.⁸⁰

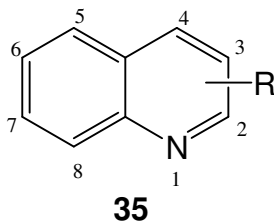
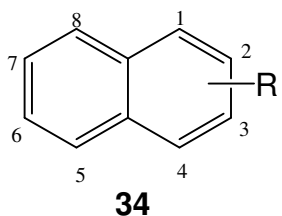
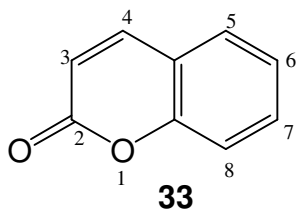
2.5.2 Inhibidores de CYP2A6 y CYP2A5

Algunos grupos de investigación han realizado estudios sobre la actividad inhibitoria sobre las enzimas CYP2A6 o CYP2A5 de diferentes compuestos, lo que ha llevado a proponer relaciones estructura-actividad preliminar.⁷⁸ Sin embargo, debido a la diversidad de compuestos evaluados no ha sido posible generalizar las características necesarias para observar actividad inhibitoria. Actualmente, algunos de los mejores inhibidores de esta enzima son metoxalen (**31**), tranilcipromina (**29**), triptamina (**32**)²⁰ y cumarina (**33**), aunque cabe mencionar que no son altamente específicos y algunos de ellos inhiben a otros citocromos P450.¹⁷ En los siguientes párrafos se describen brevemente algunos de los estudios para identificar inhibidores de las enzimas CYP2A5 y CYP2A6.



2.5.2.1 Derivados de Naftaleno y Quinolina

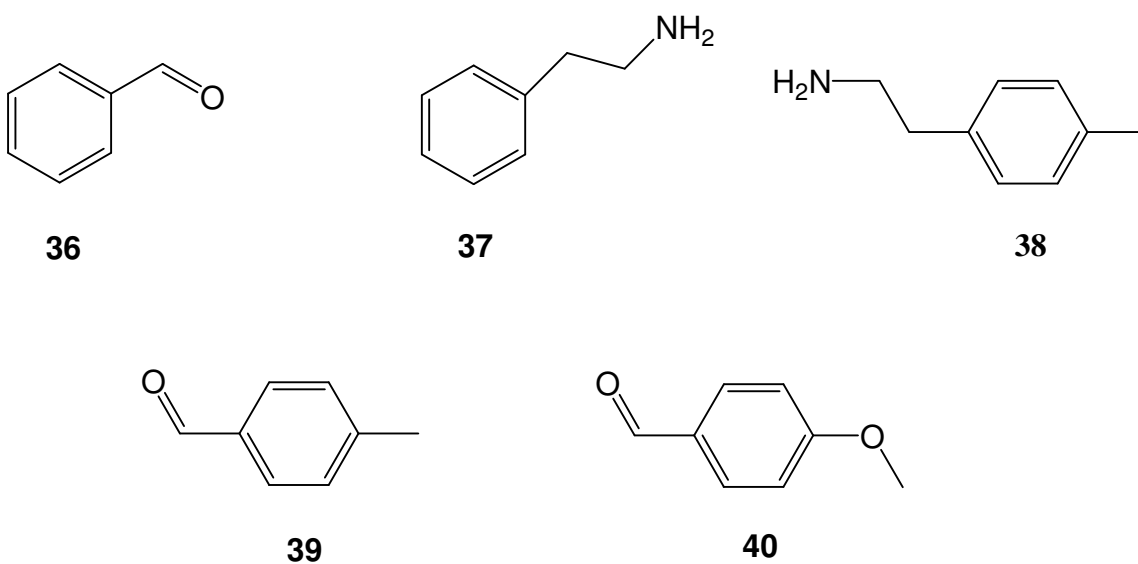
Juvonen y colaboradores reportaron la evaluación de diferentes derivados de naftaleno como posibles inhibidores de las enzimas CYP2A5 y CYP2A6.⁷⁸ Los compuestos evaluados fueron naftalenos monosustituídos con grupos metilo, metoxilo o hidroxilo, o también bromo y cloro, en las posiciones C-2 a C-7; disustituídos con grupo metilo en posición C-2, y en C-7 con sustituyentes como Cl, CO₂H. De 26 compuestos evaluados, encontraron que la presencia de un halógeno o grupo metilo en la posición C-2 del naftaleno incrementa la actividad inhibitoria sobre las enzimas CYP2A5 y CYP2A6.^{22, 80}



También evaluaron diferentes derivados de quinolina (**34**), de igual manera observaron un efecto del sustituyente y posición relativa de éste sobre la actividad enzimática similar a lo observado para los derivados del naftaleno (**35**).⁸¹

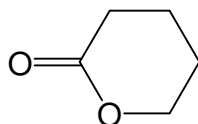
2.5.2.2 Benzaldehído y Feniletilamina

Otro estudio importante es el realizado por Rahnasto y colaboradores, en donde tomaron derivados de benzaldehído (**36**) y feniletilamina (**37**) para determinar su efecto sobre las enzimas CYP2A. Observaron que compuestos como 2-(*p*-tolil)-etilamina (**38**), 4-metilbenzaldehído (**39**) y 4-metoxibenzaldehído (**40**) inhiben fuertemente a CYP2A6, mostrando una constante de inhibición K_i , con valores de 0.23, 0.36 y 0.73 respectivamente.⁶⁹

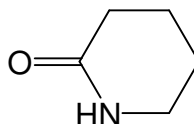


2.5.2.3 Derivados de lactonas

También se han evaluado compuestos cuya estructura principal es la tetrahidropiranona (**41**). Esta lactona fue un débil inhibidor de ambas enzimas (CYP2A5 y CYP2A6) y se demostró que al incrementarse el tamaño del anillo se disminuye la actividad, incrementándose la IC_{50} . Asimismo, la presencia de un sustituyente en la posición C-5 o C-6 pareciera incrementar la actividad de este tipo de compuestos.⁶⁸ De igual manera, se evaluaron las piperin-2-onas (**42**), observándose en este caso que el cambio de heteroátomo incrementa la actividad inhibitoria.



41



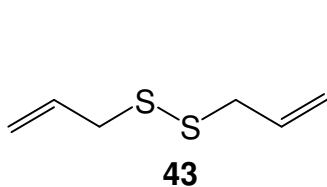
42

2.5.2.4 Derivados de organosulfurados

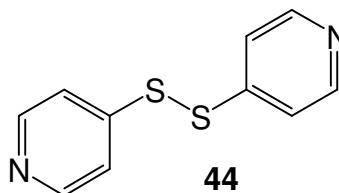
Debido a la escasa especificidad de los inhibidores como metoxalen (**31**), y tranilcipromina (**29**), algunos autores han llevado a cabo investigaciones sobre compuestos estructuralmente más simples y ajenos a los inhibidores reconocidos, dentro de estas sustancias cabe resaltar a los compuestos azufrados y particularmente disulfuros.

Se evaluaron 22 compuestos azufrados, entre ellos el alildisulfuro (**43**), un componente del aceite de ajo, el cual mostró actividad inhibitoria de CYP2A5 y los autores sugieren que este compuesto ofrece potencialmente quimioprotección hacia la carcinogénesis inducida por el humo del tabaco.²¹

Otro resultado sobresaliente de este estudio, es que los disulfuros aromáticos análogos a **44**, inhiben más potentemente la enzima CYP2A6, a diferencia de los compuestos con cadena alifática.²¹



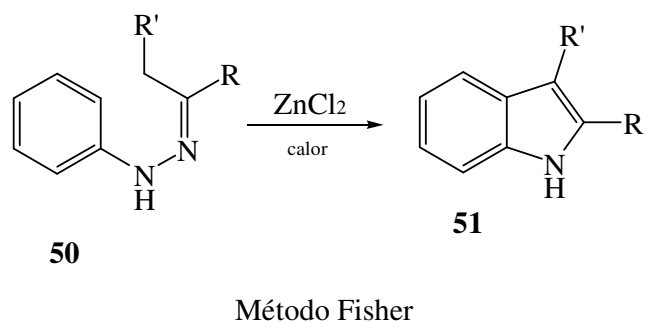
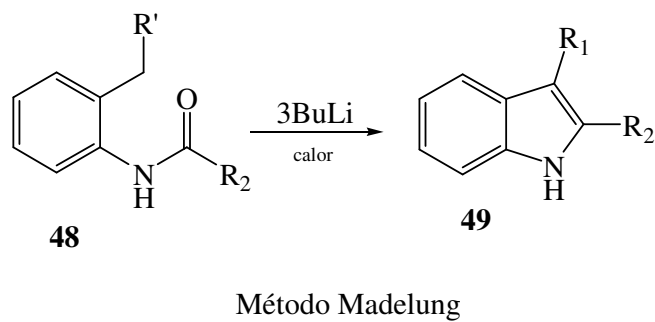
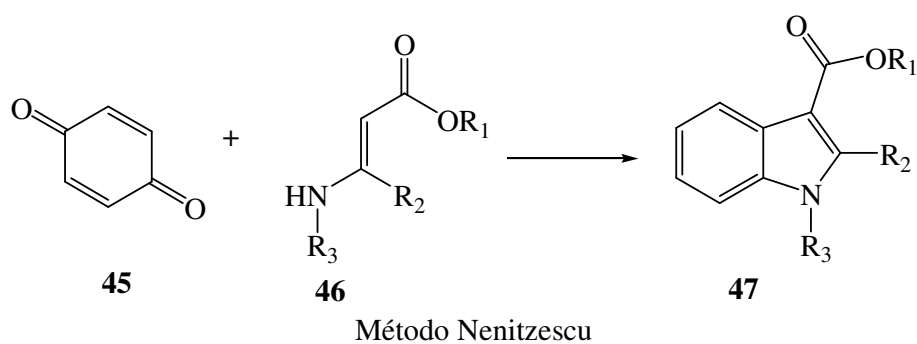
43



44

2.6 Síntesis de heterociclos derivados de naftaleno.

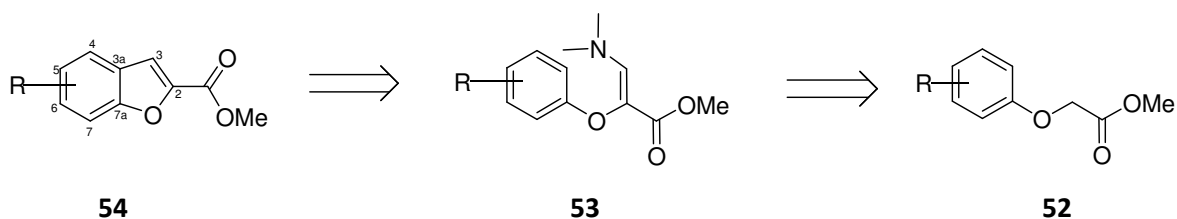
En el presente trabajo, se plantea la obtención de benzofuranos e índoles derivados de naftaleno. Existen en la literatura un número considerable de estrategias sintéticas para la obtención de estos heterociclos. En el caso de índoles, algunas de las más importantes y frecuentemente utilizadas son la síntesis de Fisher,⁸² Madelung,⁸³ Nenitzescu.⁸⁴



Esquema 2. Métodos de síntesis para la obtención de índoles.

El núcleo de benzofurano se encuentra frecuentemente en sustancias naturales, debido a su importancia biológica se han desarrollado diversas rutas sintéticas para su obtención. Los métodos para la síntesis de éstos, son aún más diversos y pueden clasificarse de acuerdo al tipo de enlace formado en la construcción del heterociclo, siendo particularmente uno de los más versátiles el que implica la formación del enlace C3-C3a como etapa importante.⁸⁵

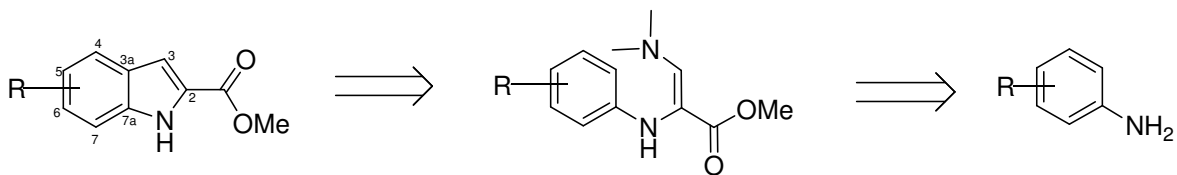
Tamariz y colaboradores han reportado la ciclación intramolecular tipo Friedel-Crafts de 2-ariloxi-3-dimetilaminopropenoatos de metilo, empleando ácidos de Lewis como catalizadores para la obtención de benzofuranos en buen rendimiento y encontraron que la ciclación se ve favorecida con la presencia de grupos electrodonadores en el anillo aromático.⁸⁶



Esquema 3. Síntesis de benzofuranos a partir de aminopropenoatos

Dicha estrategia consta de tres etapas (Esquema 3) a partir del fenol que por tratamiento con bromoacetato de etilo, permite la obtención de los ésteres **52**, que al hacerse reaccionar con el dimetilacetal de la dimetilformamida (DMADMF) a 90 °C da como producto los 2-ariloxi-3-dimetilaminopropenoatos **53**. Estos últimos por ciclación intramolecular generan los benzofuranos **54**.

De manera similar Cruz y Tamariz⁸⁶ obtuvieron indoles a partir de arilaminas, en buenos rendimientos (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis de índoles a partir de aminas

En el presente trabajo se utilizará la metodología mostrada en el Esquema 3, para la obtención de derivados de naftaleno.

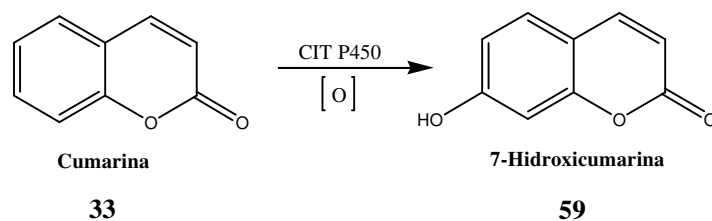
2.7 Métodos para determinación de actividad sobre CYP2A6 o CYP2A5.

En la literatura se han descrito diferentes métodos para determinar el efecto de sustancias sobre los citocromos 2A6 y 2A5. Las variaciones son abundantes, pero en general el principio básico es la determinación de productos de hidroxilación y/o disminución del sustrato que en este caso es cumarina, utilizando técnicas cromatográficas y métodos de detección diversos como flurometría, absorción al UV.

En el presente trabajo se utilizará la técnica descrita por Zhang y colaboradores, utilizando la fracción microsomal de hígado de ratón y cuantificando la hidroxilación de cumarina (Esquema 5) como indicador de la actividad de la enzima CYP2A5.¹⁷

La reacción de oxidación multifásica transcurre como sigue: la cumarina reacciona con la forma oxidada del citocromo P-450 (Fe³⁺) para formar un complejo enzima-sustrato; la reductasa acepta un electrón del NADPH que a su vez reduce al complejo oxidado del citocromo P-450-sustrato; el complejo citocromo P-450-sustrato reducido (Fe²⁺) reacciona

con el oxígeno molecular y con un segundo electrón del NADPH donado a través de la reductasa para formar oxígeno activado; en las fases finales se libera un átomo de oxígeno en forma de agua, y otro se transfiere al sustrato; una vez liberado el sustrato sometido a oxidación, el enzima oxidado (citocromo P-450) se regenera.



Esquema 5. Reacción de 7-Hidroxilación de cumarina.

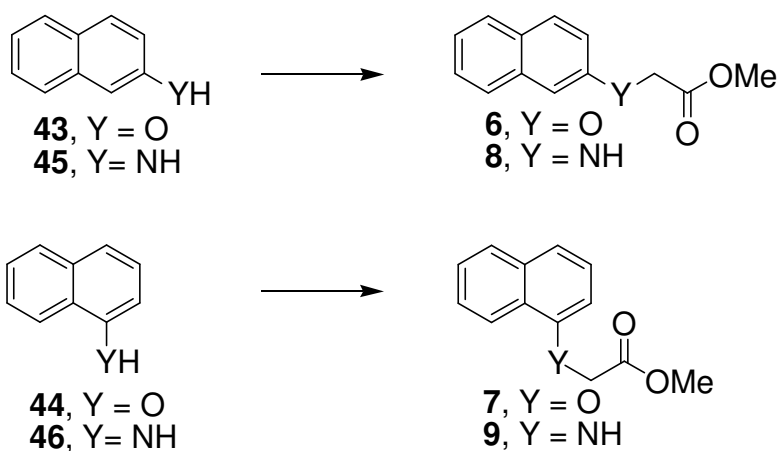
3. OBJETIVOS

General.

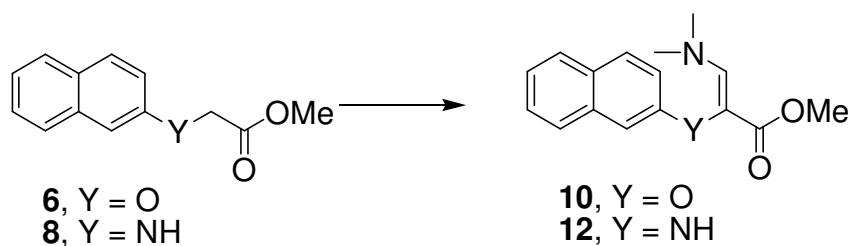
Sintetizar compuestos heterociclos del naftaleno y evaluar su potencial como inhibidores de la enzima CYP2A5 en un modelo *in vitro*.

Objetivos específicos.

3.1 Obtención de los ésteres metílicos **6-7** a partir de α - β -naftol, y la formación de ésteres metílicos **8-9** a partir de α - β -naftilamina respectivamente.

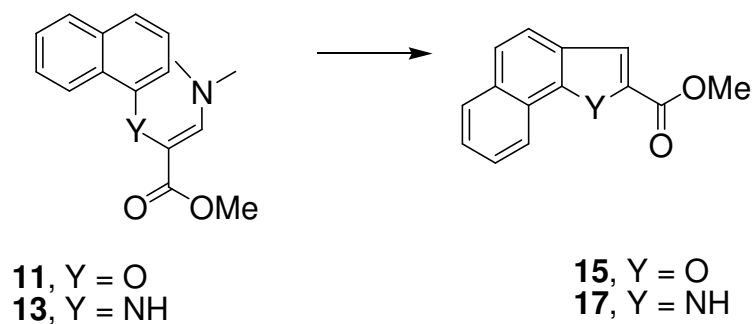
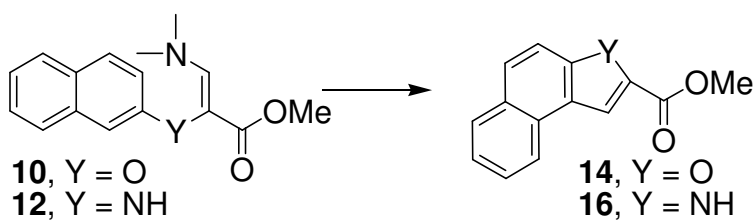


3.2 Sintetizar los 3-dimetilaminopropenoatos **10-13** a partir de los ésteres metílicos **6-9**.





3.3 Sintetizar los compuestos heterocíclicos **14-17**, por ciclación intramolecular de los propenoatos **10-13** bajo catálisis con ácidos de Lewis.



3.4 Evaluar el efecto inhibitorio de los compuestos sintetizados sobre la enzima CYP2A5, en un modelo in vitro, utilizando microsomas aislados de hígado de ratón.

4. DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Síntesis de los ésteres metílicos 6-9.

La estrategia general para la preparación de los ésteres metílicos **6-9** consistió en hacer reaccionar el naftol o naftilamina correspondiente con bromoacetato de metilo en condiciones básicas, como se muestra en el Esquema 6. En el caso de los compuestos **6** y **7**, éstos se obtuvieron alternativamente en dos etapas, primero se preparó el ácido a partir de naftol y cloroacetato de sodio y posteriormente se esterificó con metanol en presencia de ácido *para*-toluensulfónico (p-TOH) como catalizador como se ejemplifica en el Esquema 7. En la tabla 1, se presentan los rendimientos y puntos de fusión de los ésteres.

Esquema 6. Síntesis de ésteres de naftol y naftilamina **6-9**.

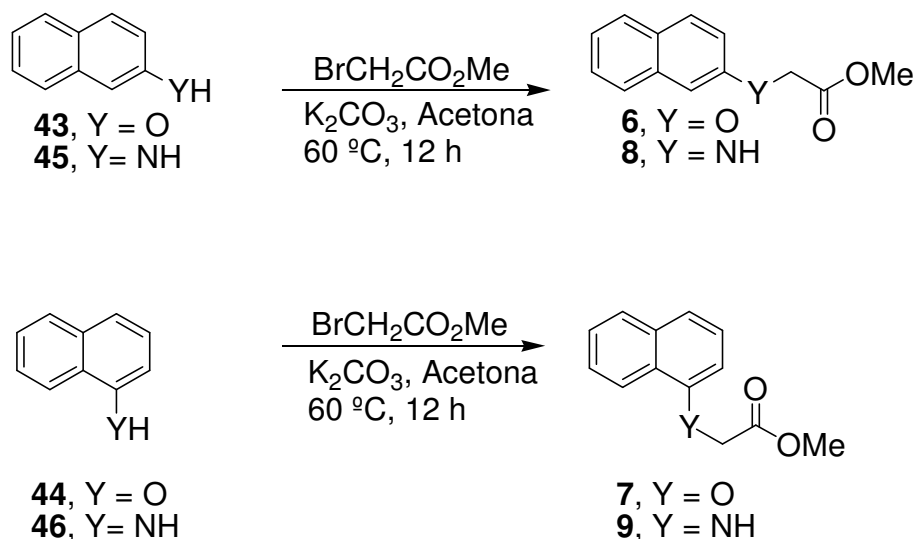
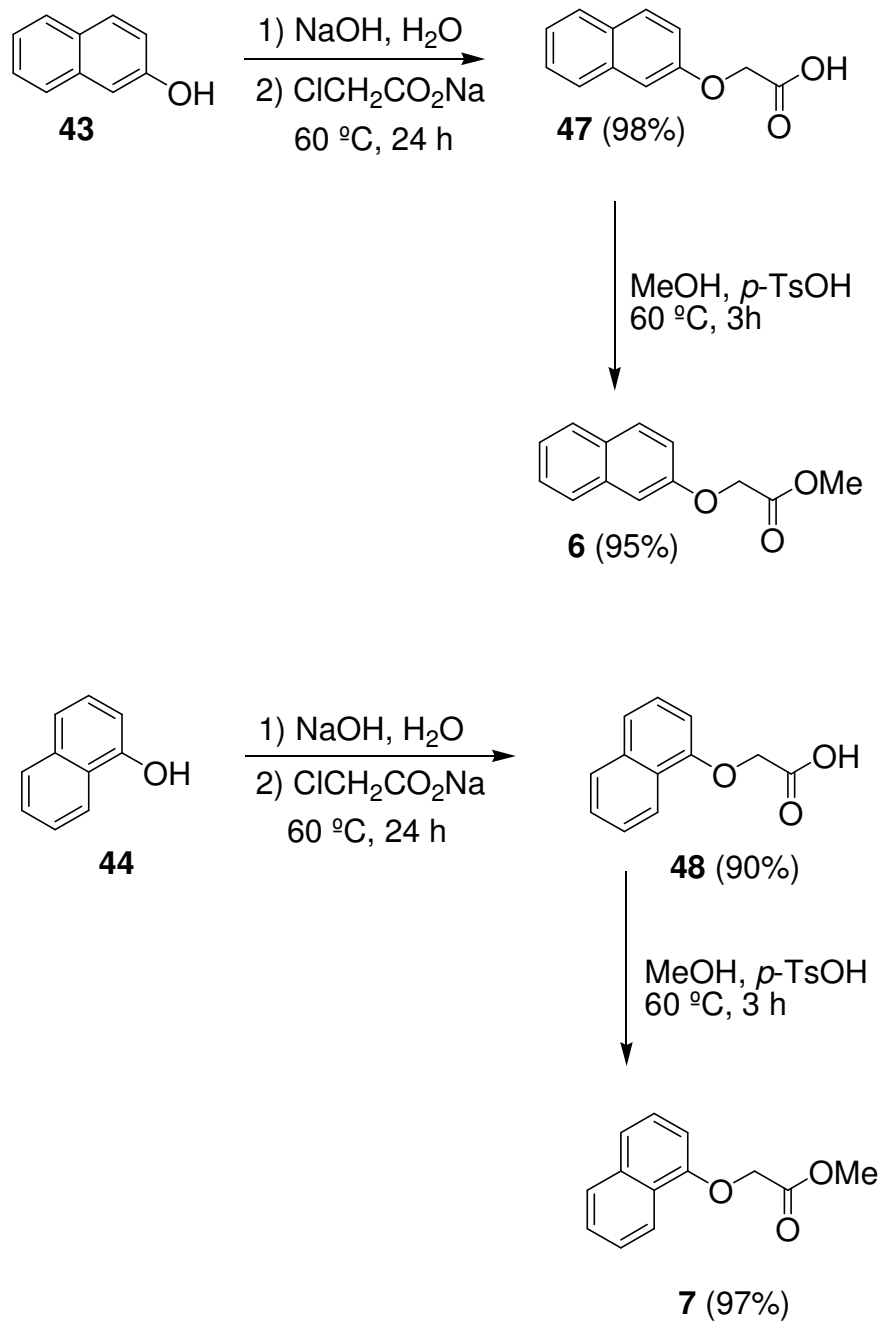


Tabla 1. Rendimientos y puntos de fusión de los ésteres metílicos **6-9**.

Compuesto	Rendimiento (%)	Pf $^\circ\text{C}$ (lit) ^{ref}
6	91	77-78 (76-77) ⁸⁶
7	97	37-38 ⁸⁷
8	71	69
9	56	70-72 (72-74) ⁸⁷

Esquema 7.



Como se puede observar en el Esquema 7, el rendimiento de la reacción de *O*-alquilación, así como el obtenido en la esterificación es casi cuantitativo. Por lo que esta alternativa es comparable con la obtención directa por tratamiento del naftol con bromoacetato de metilo.

La obtención en dos etapas puede ofrecer ventajas si se considera la síntesis a gran escala, ya que se utiliza agua como disolvente y reactivos de más bajo costo como el hidróxido de sodio y metanol.

Los ésteres **6-9**, así como los ácidos **47** y **48**, fueron caracterizados mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), de infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM). Para aquellos compuestos no descritos en la literatura, fueron obtenidos los datos de análisis elemental o bien masas de alta resolución (EMAR).

Se describe la caracterización estructural del ácido **48**.

El espectro de IR del compuesto **48** (Figura 1) muestra una banda de absorción en 1743 cm^{-1} correspondiente a la tensión C=O de un ácido carboxílico y la presencia de una banda ancha del grupo hidroxilo entre $3445\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$. Esto se confirmó en el espectro de RMN de ^{13}C en donde se observa una señal en 169.6 ppm que corresponde al carbonilo del ácido. En la Figura 2 se muestra el espectro de RMN ^1H donde se observa una señal simple en 4.93 ppm que integra para dos protones y que se asignó al metileno de la cadena acetoxílica. A campo bajo, se observan las señales de los protones aromáticos: en primer lugar, una señal doble en 6.91 ppm con $J = 7.5\text{ Hz}$ que corresponde al protón 2. En 7.39 ppm un triplete con $J = 8.1\text{ Hz}$ que fue asignado al protón H-3; una señal múltiple entre $7.48\text{-}7.54\text{ ppm}$ que integra para 3 protones fue atribuida a H-4, H-6 y H-7. En $7.82\text{ a }7.89\text{ ppm}$ se observa un multiplete que fue asignado a H-5 y finalmente entre $8.31\text{-}8.37\text{ ppm}$ se aprecia la señal correspondiente a H-8. En el espectro de masas de **48**, se observó un pico con $m/z\ 202$ que corresponde al ión molecular para un compuesto con fórmula $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3$, y esto es congruente con la estructura.

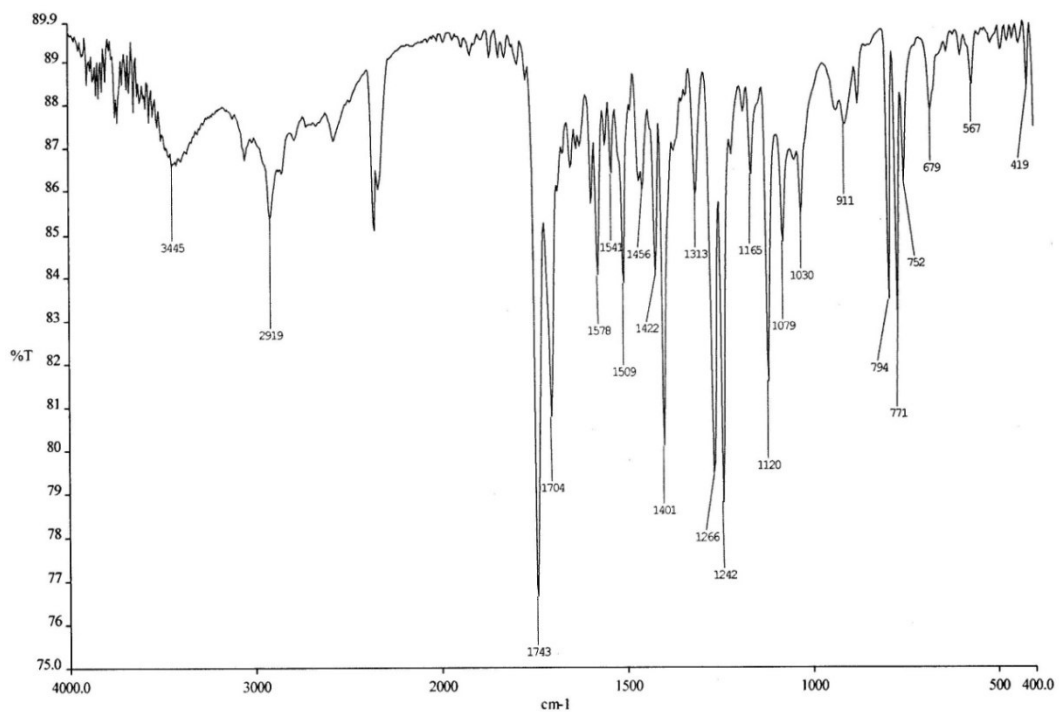


Figura 1. Espectro de IR de **48**.

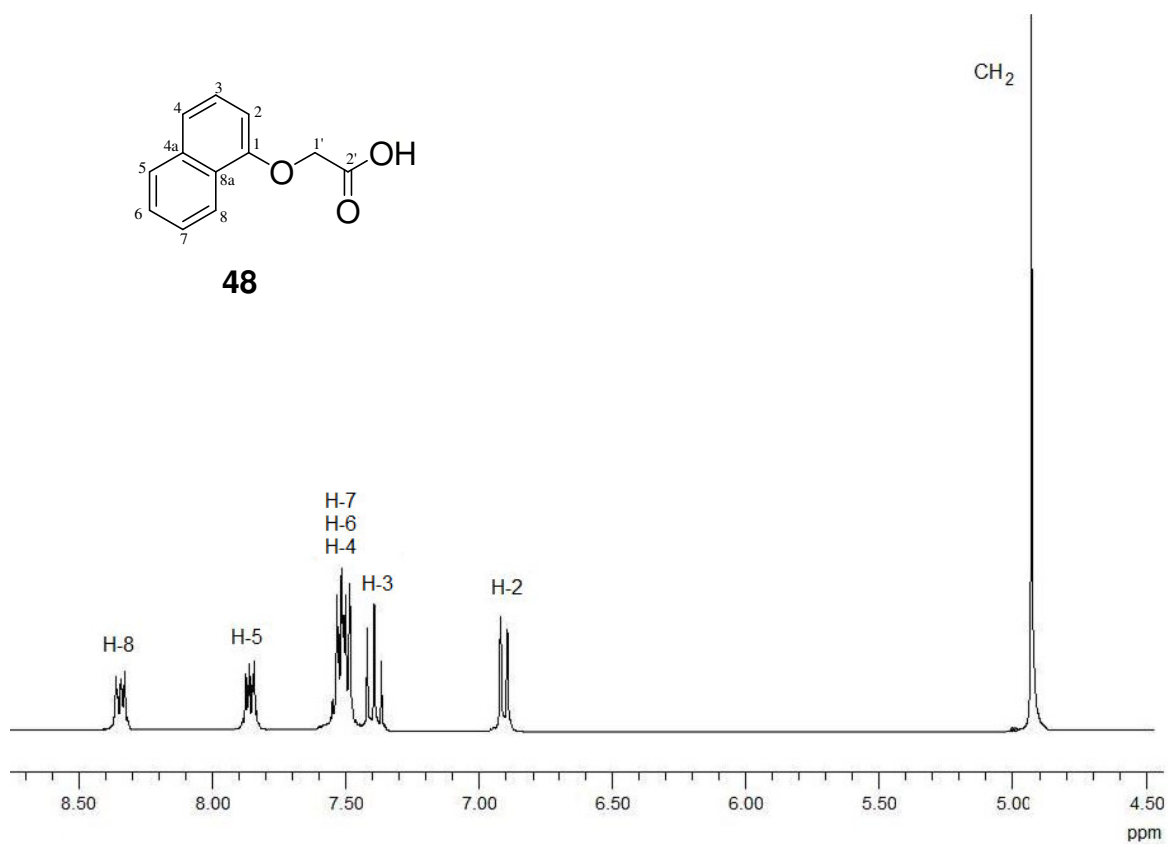


Figura 2. Espectro de RMN ^1H de **48** (300 MHz, CDCl_3).

De los ésteres metílicos sintetizados, sólo el compuesto **8** no se encuentra descrito en la literatura. Dado que se tiene como estructura base el anillo de naftaleno, sustituido en la posición 1 o 2 por el grupo hidroxilo o amino, los espectros guardan cierta semejanza, sin embargo, son diferenciables, ya que la forma de las señales y desplazamientos se modifican al cambiar el heteroátomo presente.

Se describe el análisis de los datos espectroscópicos que llevó a establecer la estructura del éster **8**.

En el espectro de IR (Figura 3) se observa la banda característica de la vibración N-H en 3391 cm^{-1} y la banda intensa en 1733 cm^{-1} , atribuible a la tensión del C=O de la cadena acetoxílica. Su estructura se confirma al observarse en el espectro de RMN ^1H (Figura 4) una señal simple en 3.75 ppm que corresponde a los tres protones del metoxilo (OCH₃), un singulete en 3.96 ppm atribuible a los protones del grupo metileno CH₂, y una señal ancha en 4.47 que integra para un protón y que se debe a la presencia de la cadena acetoxílica unida al núcleo de naftilamina. Las señales de los protones aromáticos localizados en 6.70 ppm (H-3), 6.90 ppm (H-1), 7.17-7.23 ppm (H-6), 7.32-7.38 ppm (H-7), 7.58-7.68 ppm (H-8) fueron asignadas con la ayuda de los experimentos bidimensionales HMQC (Figura 6) y HMBC (Figura 7). En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 5) se observa una señal en 65.5 ppm correspondiente al metoxilo CH₂O y la señal 169.3 ppm al grupo carbonilo C=O. El espectro de EM muestra un fragmento de m/z 215, congruente con la fórmula C₁₃H₁₃NO₂ que corresponde al compuesto **8**.

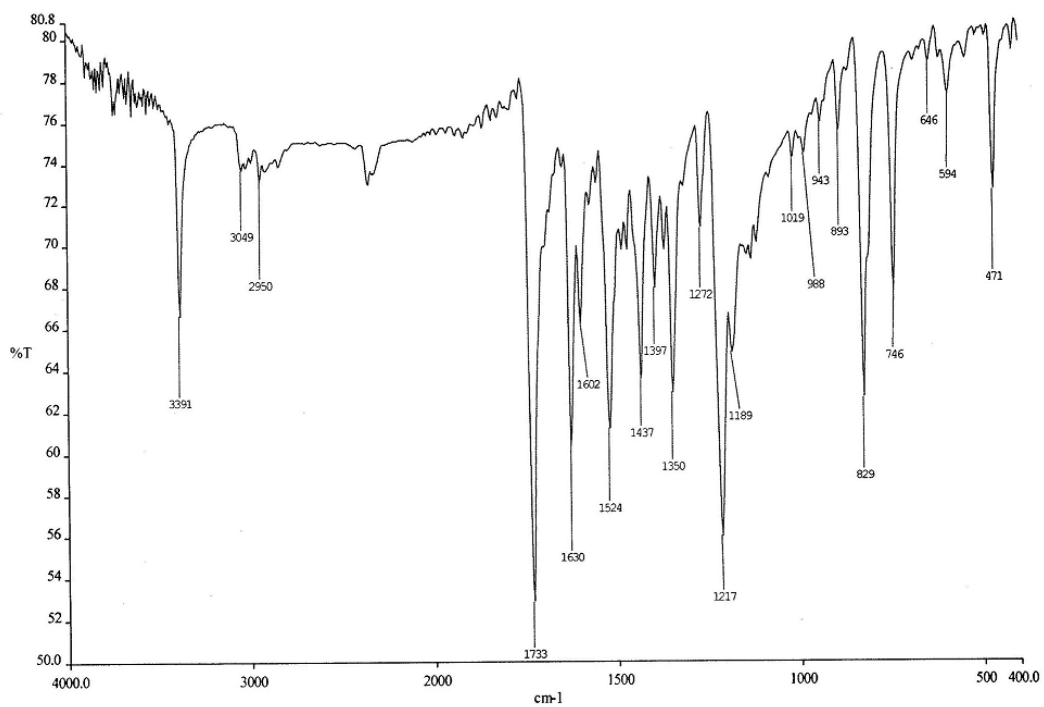


Figura 3. Espectro de IR de **8**.

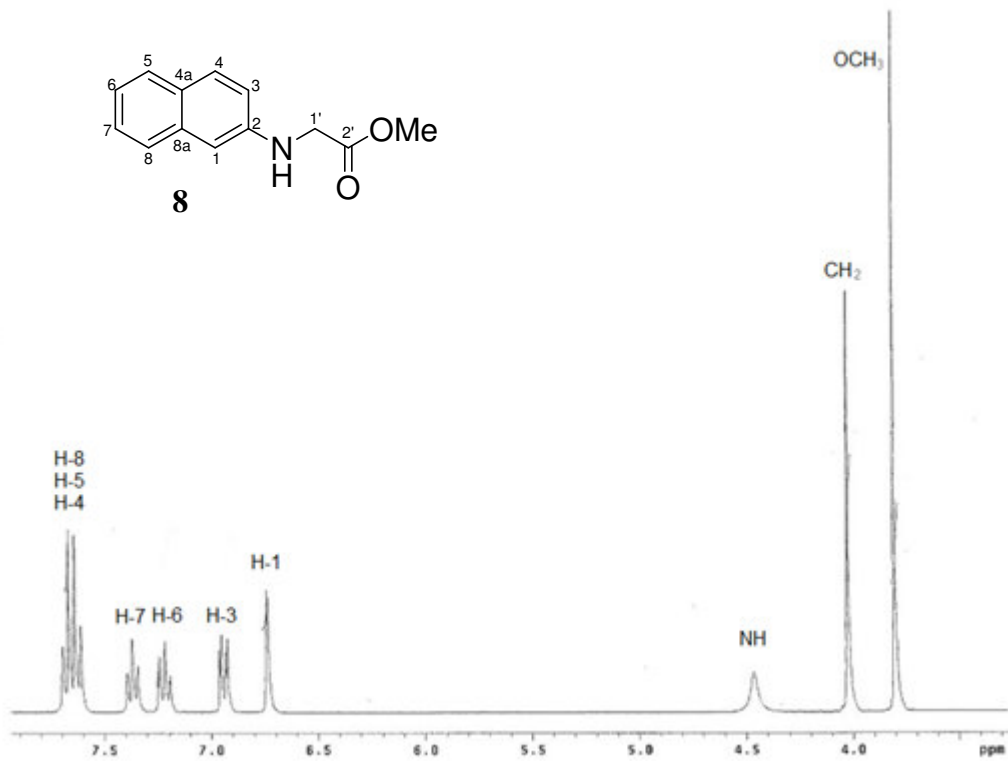


Figura 4. Espectro de RMN ^1H de **8** (300 MHz, CDCl_3).

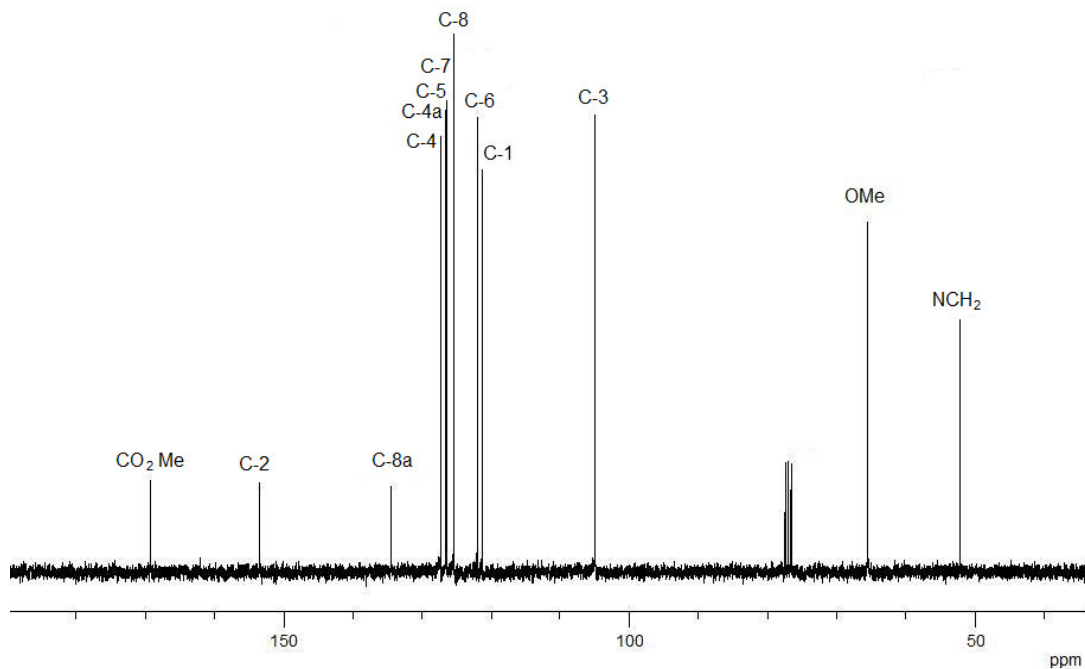


Figura 5. Espectro de RMN de ^{13}C de **8**.

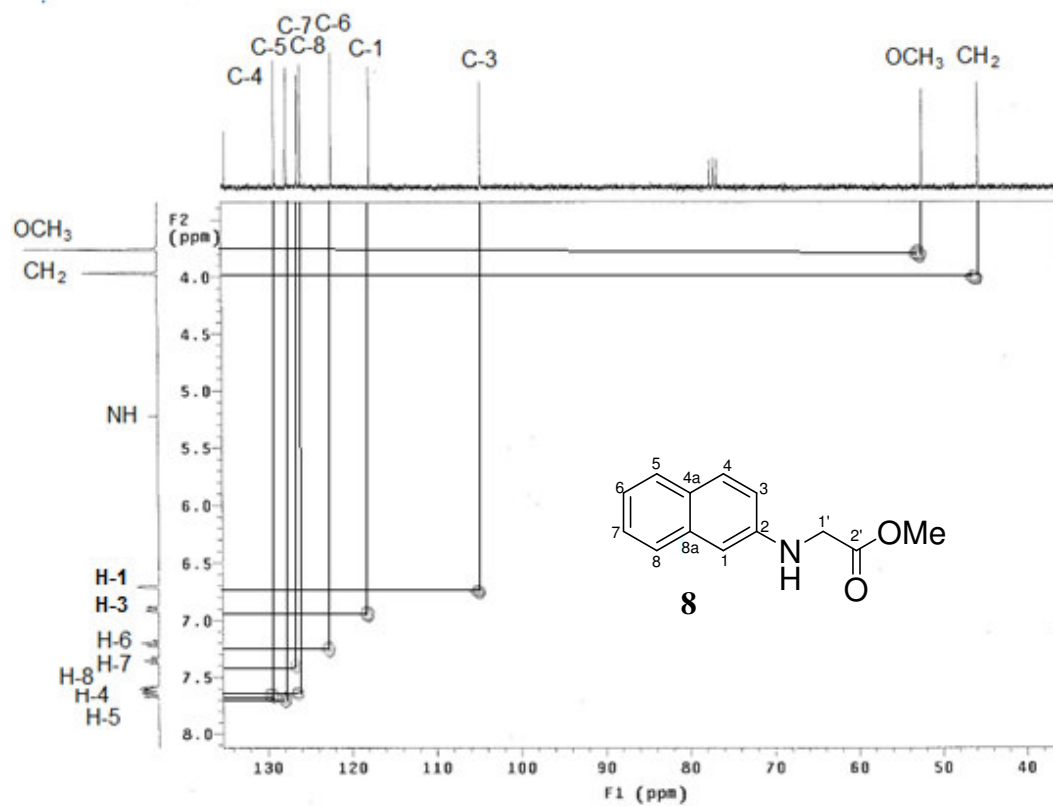


Figura 6. Espectro bidimensional HMQC de **8**.

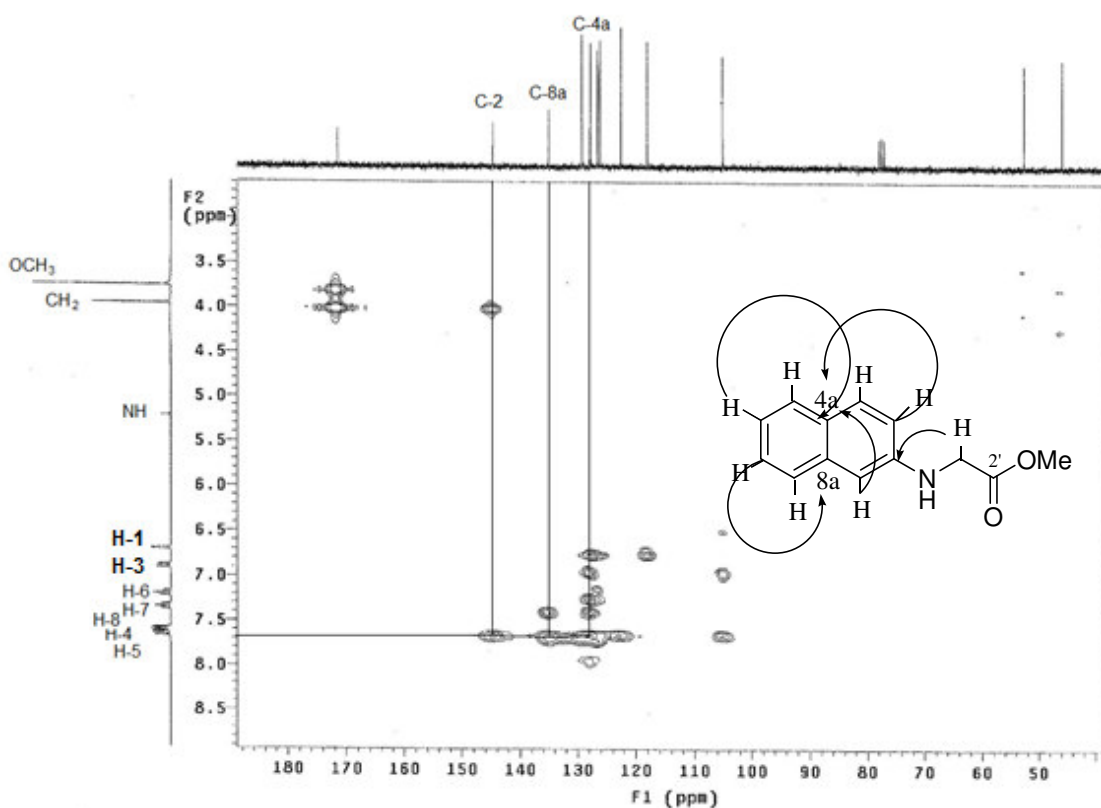


Figura 7. Espectro bidimensional HMBC de **8**.

4.2 Síntesis de propenoatos de metilo.

4.2.1 Síntesis de (Z)-3-*N,N*-dimetilaminoacrilatos de metilo **10-13**

Los acrilatos **10-13** se obtuvieron por tratamiento del éster metílico correspondiente con el *N,N*-dimetilacetal de la dimetilformamida (DMADMF) bajo condiciones térmicas por 24 h, como se ilustra en el Esquema 8. Los rendimientos van de moderados a buenos y se resumen en la Tabla 2. Cabe mencionar que fue necesario el uso de un exceso de acetal (2 eq mol) para que la reacción ocurra. Los compuestos **11**, **12** y **13** no se encuentran descritos en la literatura.

Esquema 8

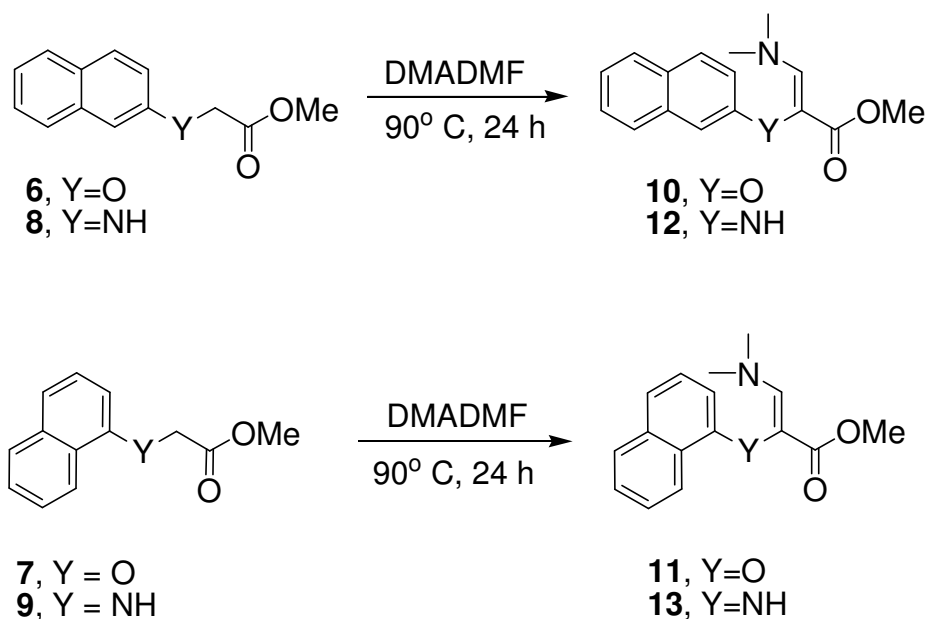


Tabla 2. Rendimientos y puntos de fusión de los dimetilaminopropenoatos **10-13**.

Compuesto	Rendimiento %	Pf °C (lit) ^{ref}
10	98	121-122 (120-121) ⁸⁸
11	92	141-142
12	35	186-188
13	49	191-192

En la tabla anterior, puede notarse que para el caso de los acrilatos derivados de la naftilamina, el rendimiento es bajo y esto se explica por la reactividad mayor de la enaminona generada, dificultándose la purificación bajo las condiciones utilizadas.

La caracterización de estos compuestos se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas. Como ejemplo, se describe el espectro de RMN ¹H del compuesto **12** (Figura 8), en donde pueden observarse a campo alto una señal en 3.03 ppm que integra para 6 protones y que se asignó al grupo dimetilamino; además es apreciable una señal simple en 3.62 ppm debida al grupo metoxilo y en 4.81 ppm la señal ancha característica del protón de amina secundaria. En 7.47 ppm una señal simple, que integra para un protón se asignó al protón vinílico de la

enaminona. Además son apreciables las señales de protones aromáticos de multiplicidad variable. En trabajos previos de síntesis de dimetilaminoacrilatos análogos, se observó que estos compuestos presentan equilibrios conformacionales y se ha determinado por irradiación de la señal del grupo dimetilamino que preferentemente se encuentran en forma *s-trans*. En RMN ^{13}C (Figura 9), la señal en 169.6 ppm correspondiente al carbonilo que junto con la señal en 51.2, debida al grupo metoxilo, y la señal en 126.0 ppm, generada por el protón vinílico, confirman la presencia de la enaminona. El espectro de EM presenta un fragmento con m/z de 270 que corresponde al ión molecular del compuesto **12**. Para la asignación de algunas señales de protón y carbono, se utilizaron experimentos de correlación heteronuclear como HMQC y HMBC (Figura 10 y 11).

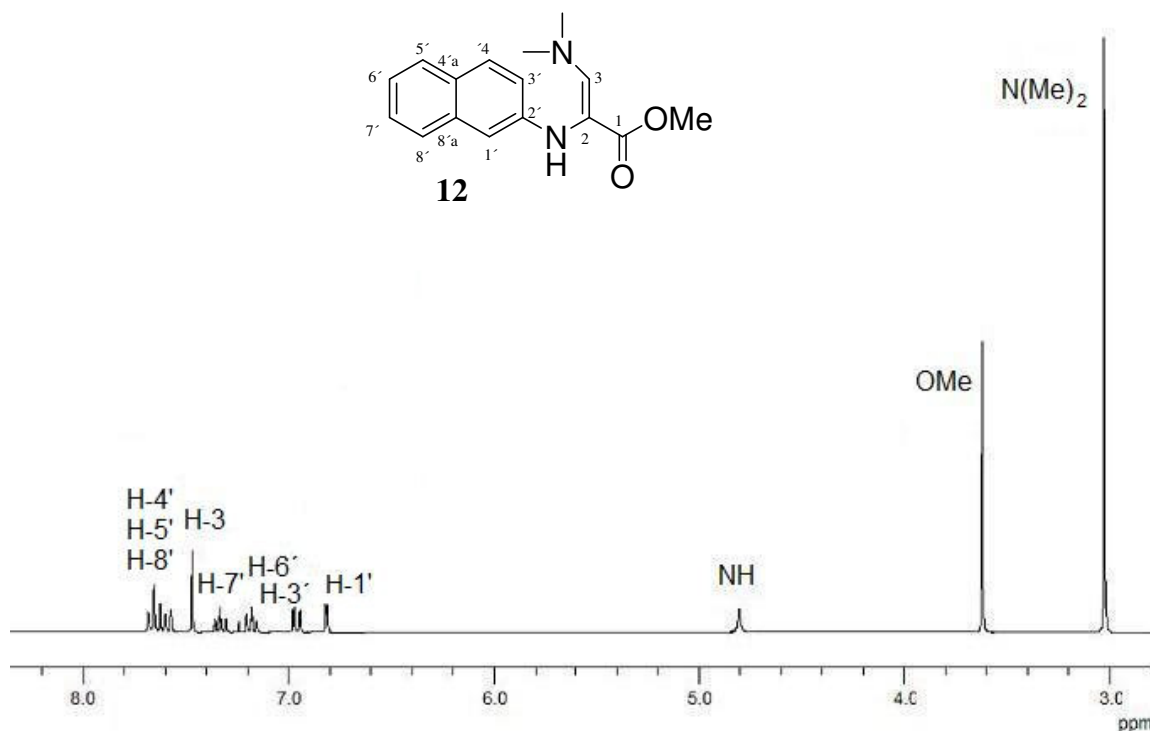


Figura 8. Espectro de RMN ^1H de **12** (300 MHz, CDCl_3).

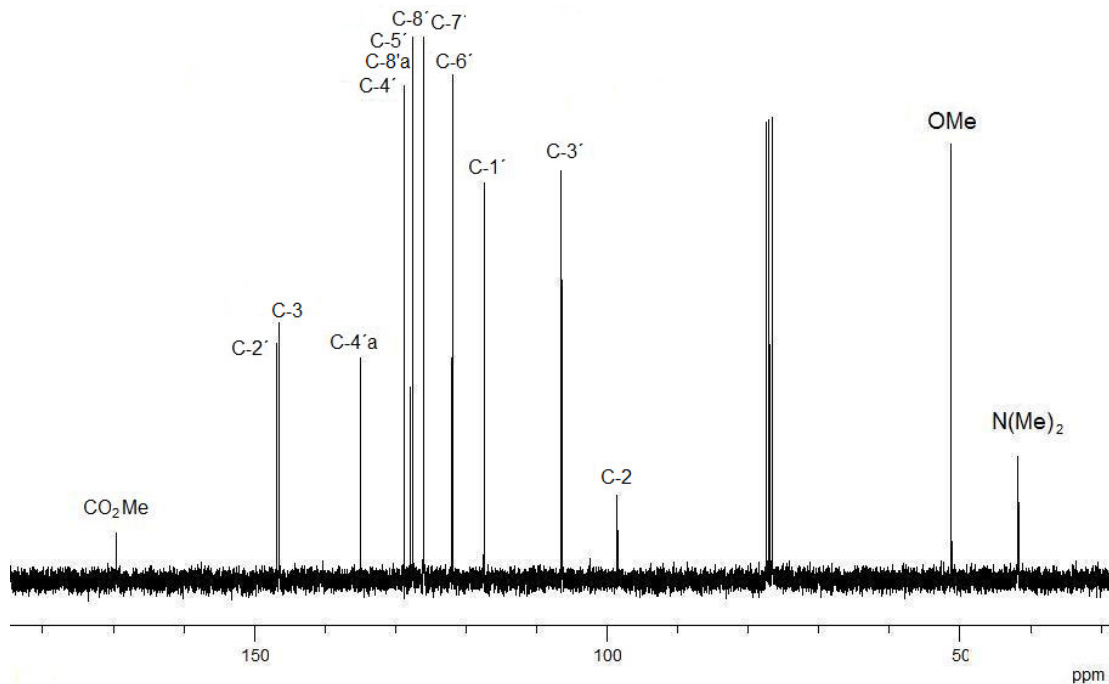


Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **12**.

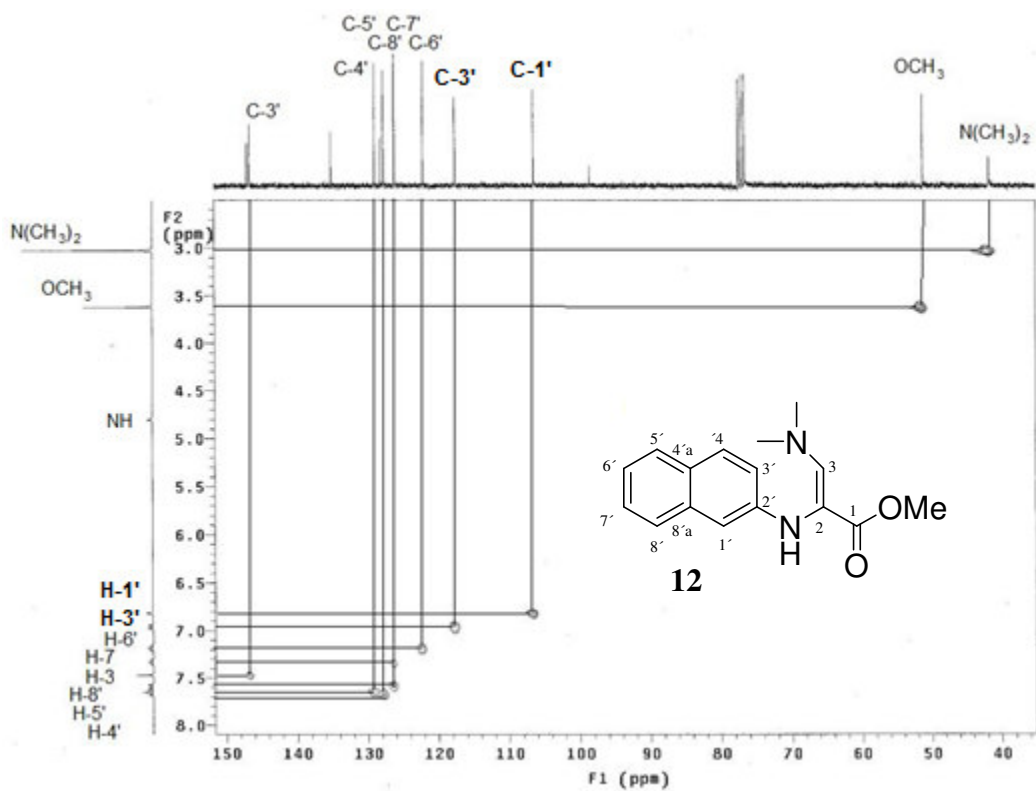


Figura 10. Espectro de correlación heteronuclear HMQC de **12**.

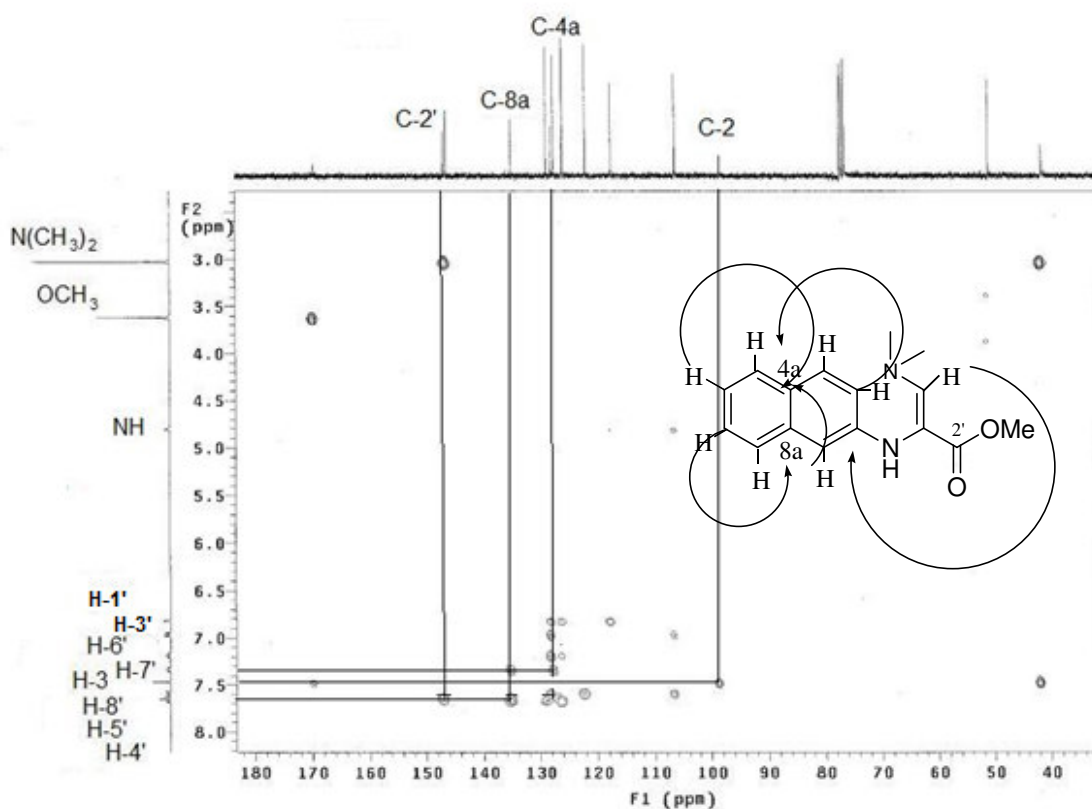
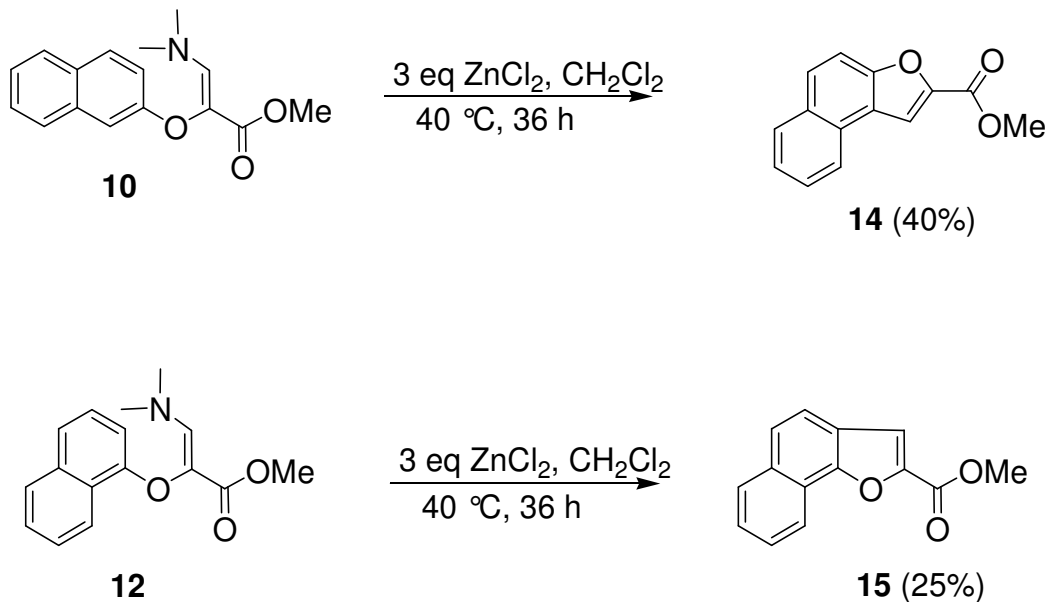


Figura 11. Espectro de correlación heteronuclear HMBC de **12**.

4.3 Síntesis de índoles y benzofuranos

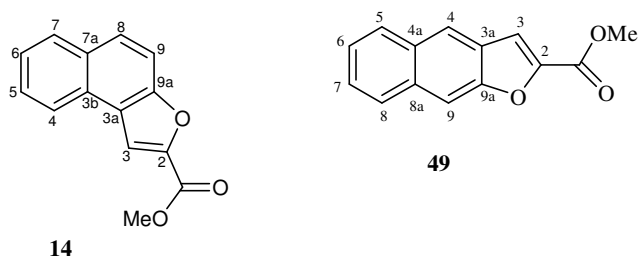
4.3.1 Síntesis de benzofuranos 14-15.

Los benzofuranos **14** y **15** se obtuvieron por ciclación intramolecular de los propenoatos **10** y **11**. El proceso consiste en una reacción tipo Friedel-Crafts catalizada con ZnCl_2 en presencia de diclorometano. En el Esquema 9 se muestran las condiciones de reacción para llevar a cabo el proceso. En este trabajo sólo se evaluaron como catalizadores AlCl_3 y ZnCl_2 , sin embargo, con el primer catalizador los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que sólo se formaban trazas del compuesto heterocíclico y se observaron otros subproductos además de la materia prima. Por el contrario con el uso del catalizador de Zn, fue posible obtener en rendimientos bajos los productos **14** y **15**.



Esquema 9. Ciclación de los dimetilaminoacrilatos **10** y **11**.

Cabe mencionar que para el caso del compuesto **10**, existía la posibilidad de obtener dos regiosómeros como resultado de la formación del enlace C3-C1' (**14**) o bien C3-C3' (**49**). Sin embargo, en el crudo de la reacción no se apreciaron señales que indicarán la presencia de mezclas y las señales observadas en los espectros obtenidos corresponden al regiosómero angular **14**. Por lo que podemos decir que la reacción de ciclación es regioselectiva.



La preparación y caracterización de los compuestos **14-15** se encuentran descritas en la literatura.⁸⁶

Para el producto **15** el espectro de RMN ^1H (Figura 12) muestra a campo alto la señal debida al grupo metoxilo con un desplazamiento de 4.0 ppm, se observa entre 7.54 - 7.73 ppm un multiplete que integra para cinco protones H-3, H-4, H-5, H-8, H-7, de las cuales pudieron ser asignadas inequívocamente sus carbonos empleando HMQC (Figura 14). En 7.93 ppm y 8.46 ppm se observan dos señales dobles las cuales fueron asignadas a los protones H-6 y H-9 respectivamente. En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 13), la señal en 159.8 ppm que corresponde al grupo carbonilo del grupo ester y la señal en 52.3 ppm se le atribuye al grupo metoxilo. Los experimentos HMQC y HMBC (Figura 14 y Figura 15) fueron necesarios para la asignación total.

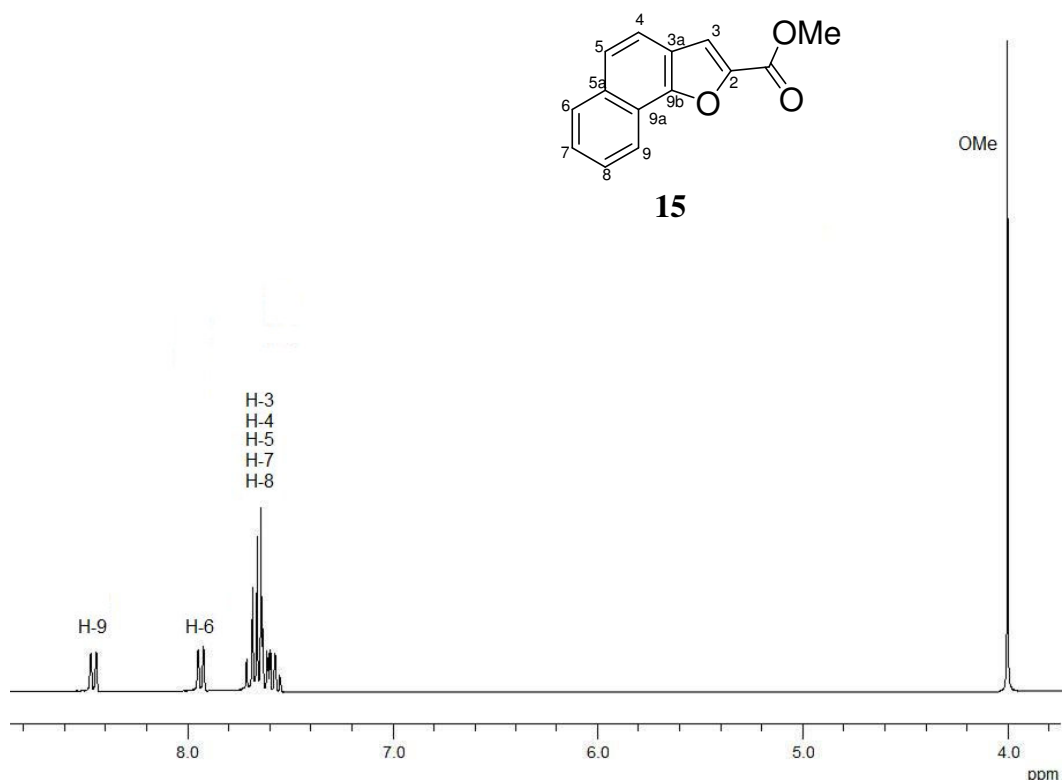


Figura 12. Espectro de RMN ^1H de **15** (300 MHz, CDCl_3)

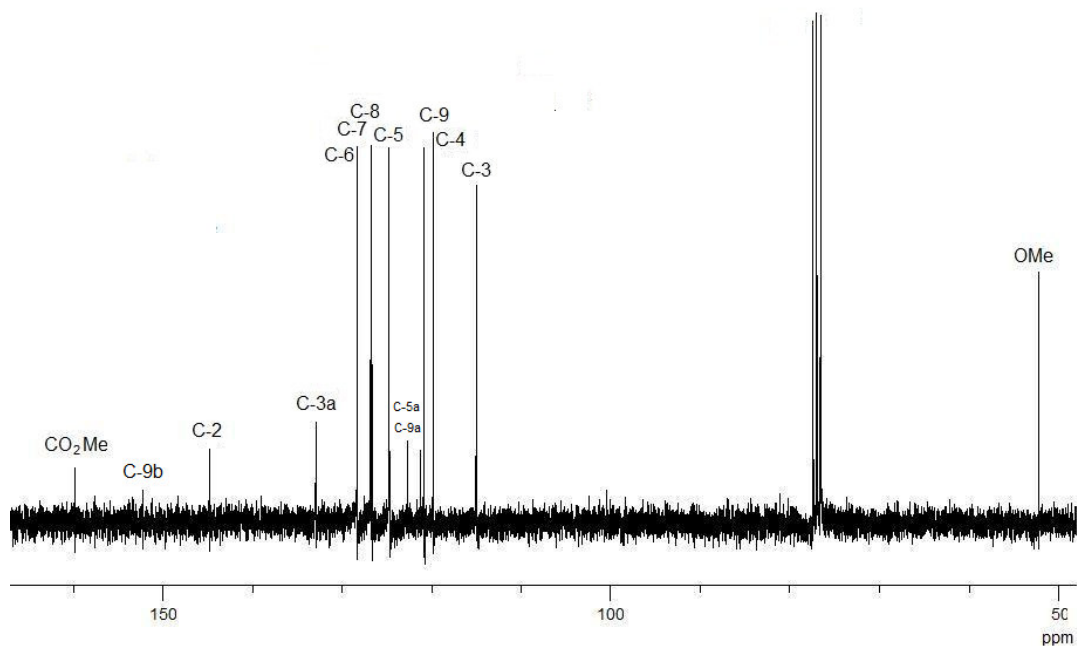


Figura 13. Espectro de RMN¹³C de 15

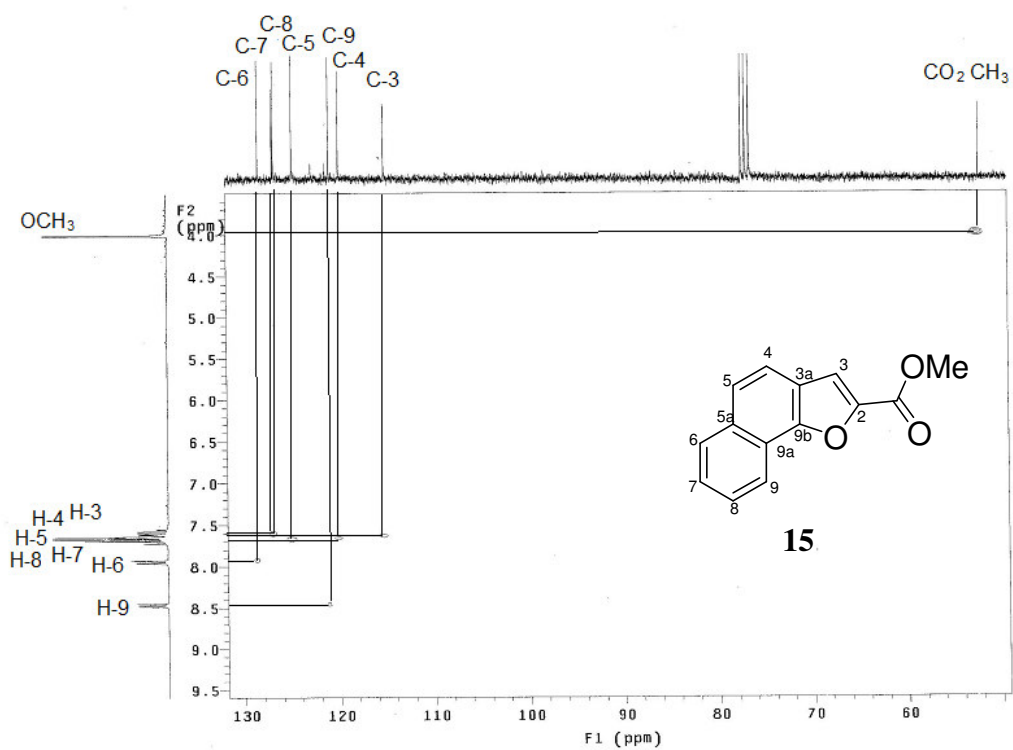


Figura 14. Espectro bidimensional HMQC de 15.

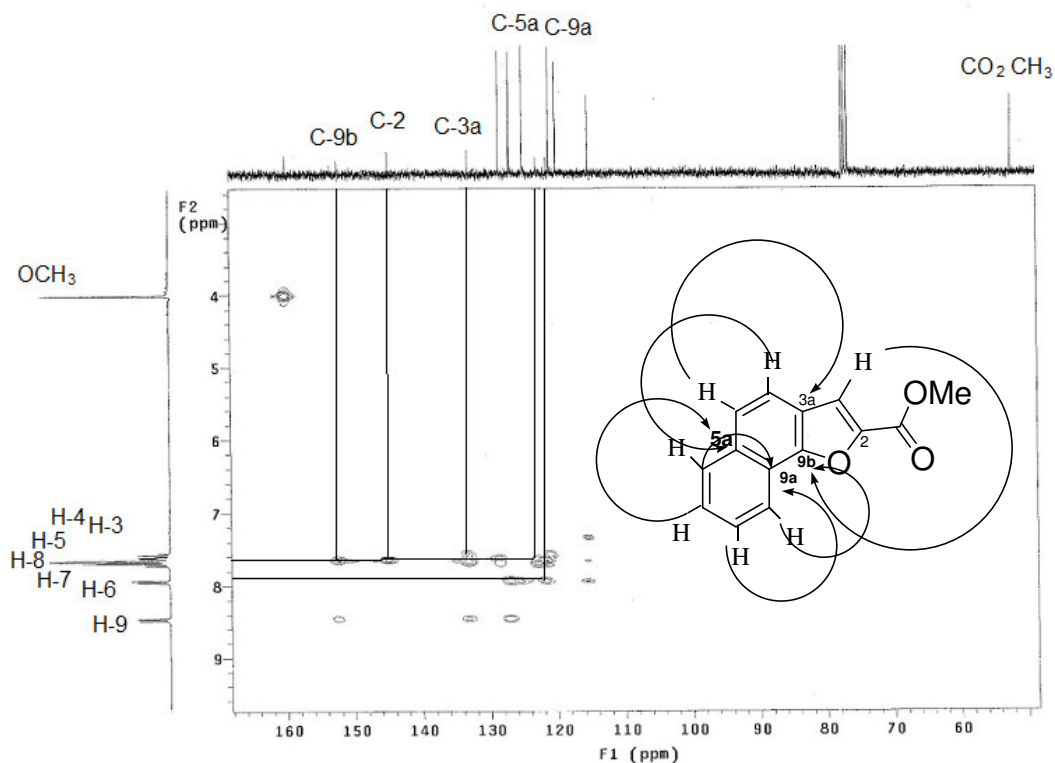
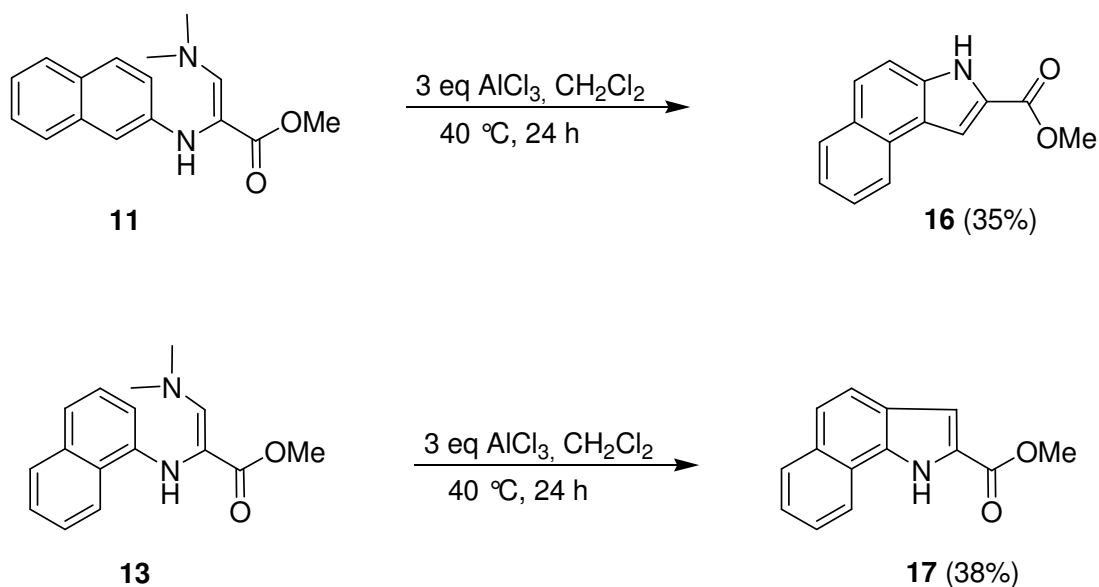


Figura 15. Espectro bidimensional HMBC de **15**.

4.3.2 Síntesis de índoles **16** y **17**.

De manera análoga, los índoles **16** y **17** se prepararon por tratamiento de los dimetilaminoacrilatos **11** y **13** con AlCl_3 en diclorometano. Cabe mencionar que el uso de ZnCl_2 , no dio buen resultado ya que a pesar de incrementar el tiempo de reacción y temperatura no se observó la formación de los productos de ciclación. En el Esquema 10, se presentan los resultados al utilizar AlCl_3 y como puede notarse los rendimientos son bajos, aunque resultan mayores que los reportados en la literatura.⁸⁸ También es notorio que el tiempo de reacción es menor que para la obtención de sus análogos benzofuranos, lo que sugiere una mayor reactividad de las enaminonas **11** y **13**. Asimismo, no se observó la presencia del otro posible regioisómero en la reacción de ciclación de **11**.

Esquema 10



Se describe la elucidación estructural de **17** como ejemplo. El espectro de IR del compuesto **17** (Figura 16) presenta la banda de adsorción en 3320 cm⁻¹ debida al NH y en 1686 cm⁻¹ la banda de absorción asignada al carbonilo del grupo éster. Los espectros de RMN ¹H (Figura 17) y de RMN ¹³C (Figura 18) con apoyo de los espectros bidimensionales HMQC (Figura 19) y HMBC (Figura 20) dieron información suficiente para la caracterización completa del indol **17**. En 3.90 ppm, se observa una señal simple que integra para 3 protones, la cual fue asignada al grupo metilo del grupo éster. A campo bajo, se observa en 7.32 ppm un singulete que integra para 1 protón, y que se atribuyó a H-3. Entre 7.53-7.59 ppm, se observa un multiplete que integra para tres protones H-5, H-7 y H-8. En 7.45 ppm, 7.95 ppm y 8.54 ppm, se observan tres señales dobles las cuales fueron asignadas a H-6, H-9 y H-4, respectivamente. Finalmente, en 11.62 ppm, aparece la señal ancha característica al protón del NH del indol. En el espectro de RMN ¹³C (Figura 11), la señal en 162.1 ppm aparece la señal que corresponde al grupo carbonilo del grupo éster, y la señal en 51.61 ppm se le atribuye al grupo metoxilo.

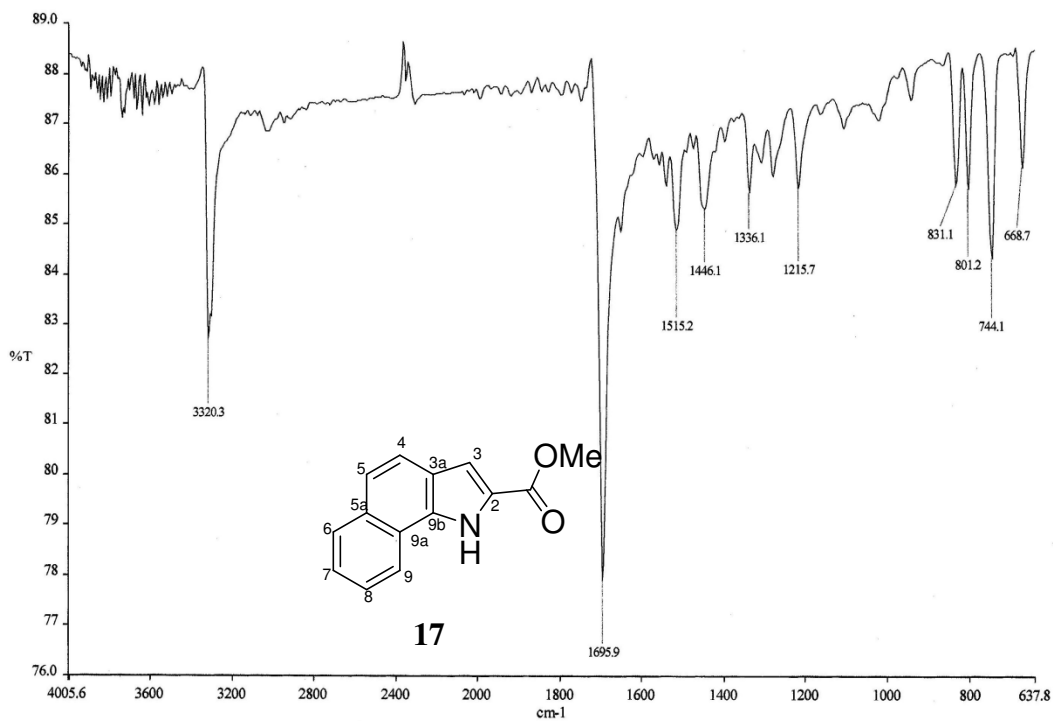


Figura 16. Espectro de IR de 17.

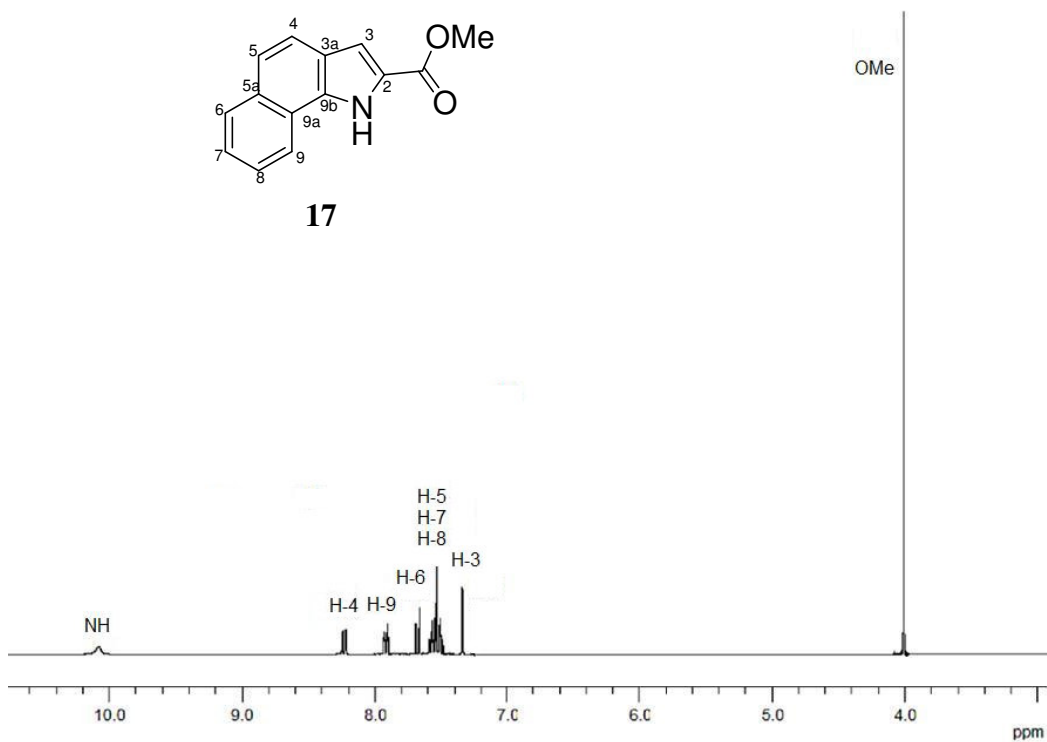


Figura 17. Espectro de RMN ^1H de 17 (300 MHz, CDCl_3).

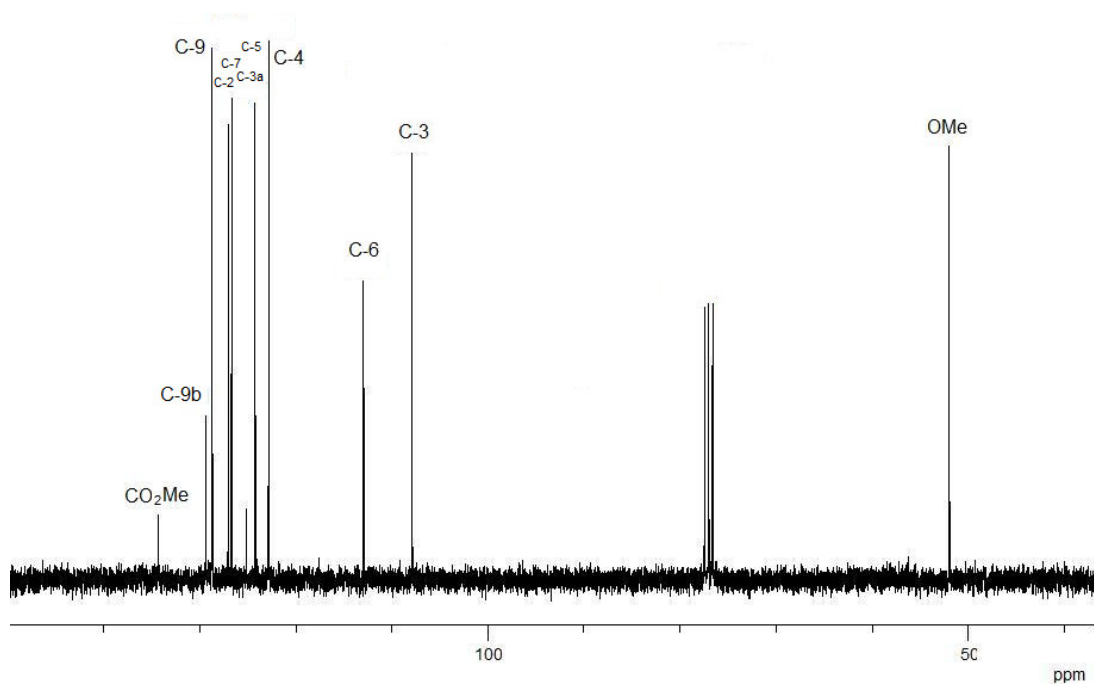


Figura 18. Espectro de ^{13}C de 17.

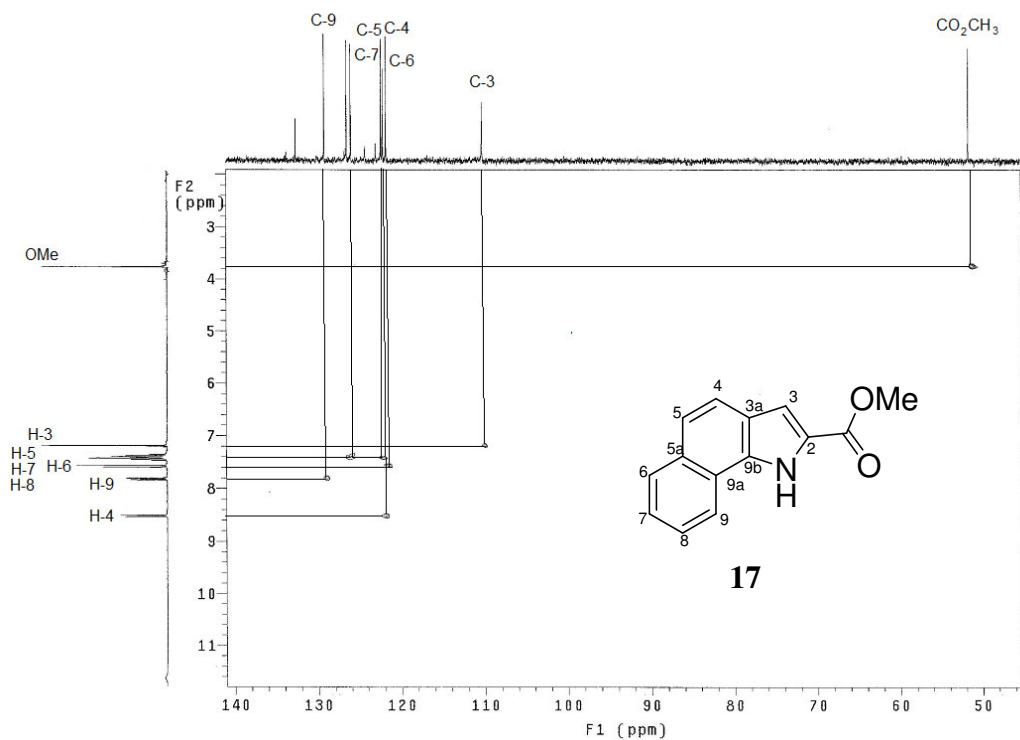


Figura 19. Espectro bidimensional HMQC de 17.

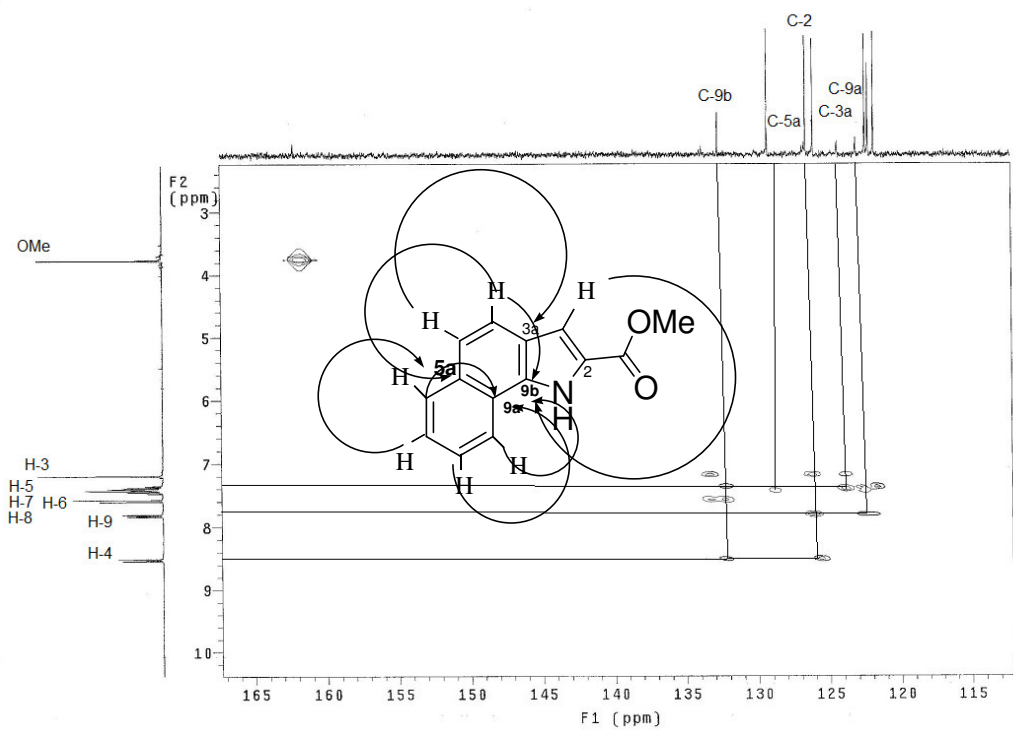


Figura 20. Espectro bidimensional HMBC de 17.

4.4 Resultados de ensayo biológico

Se determinó la actividad de la enzima CYP2A5 en la fracción microsomal de hígado de ratón. Teniendo en cuenta que la cumarina es un sustrato natural de CYP2A5 y que el producto de reacción es la hidroxilación de la misma en la posición 7, se decidió medir la actividad en términos de producción de 7-hidroxycumarina por minuto, para lo cual se aplicó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna de gel de sílice C-18, fase móvil de H₂O/CH₃CN/MeOH y se midió la absorción al UV. Los resultados fueron analizados mediante los programas Sigma Plot versión 11 y GraphPad Prism 5.

Los resultados de actividad se expresaron como porcentajes de inhibición de la enzima obtenidos a la concentración de 18 μM, y mediante la linearización apropiada se determinó la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀).

4.4.1 Validación del método Cromatográfico.

Se utilizó un sistema de fase inversa, con una columna de sílice C18 y como fase móvil la mezcla acetonitrilo – agua – metanol (25:75:0.1), flujo de 1 mL/min, y se midió la absorción al UV a 320 nm. En estas condiciones la cumarina y la 7-hidroxycumarina (7-HC) presentaron un pico agudo de buena resolución en un tiempo de retención de 12.3 y 6.79 minutos respectivamente, como se muestra en las Figuras 21A y 21B.

Figura 21 A

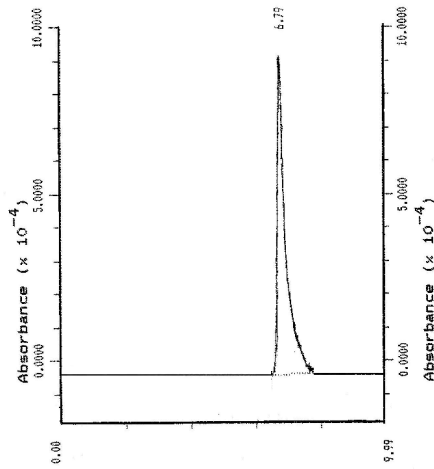


Figura 21 B

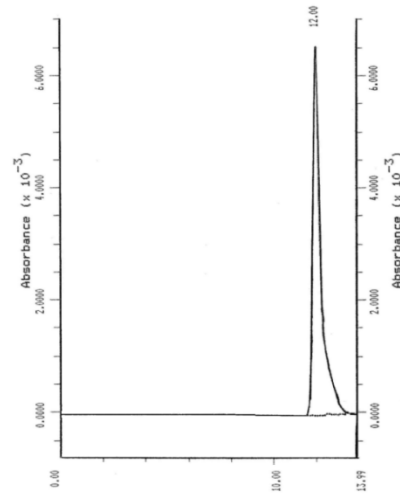


Figura 21. Perfil cromatográfico de (A) 7-Hidroxycumarina en metanol 20% (6.79 min) y (B) Cumarina en metanol al 20% (12 min)

Para establecer la linealidad (proporcionalidad entre la concentración y la señal medida) (Figura 21) se realizaron 4 diluciones independientes y representativas de las concentraciones: 1, 2, 3 y 4 μM de 7-HC. Cada muestra se inyectó por triplicado. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.998 ($n=12$); ecuación de la recta $y = 0.097x - 0.014$.

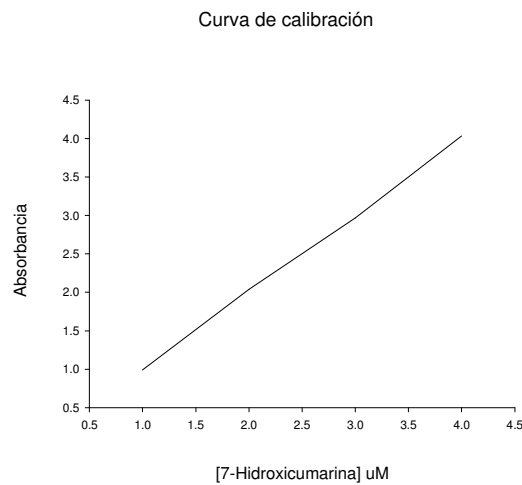


Figura 22. Linealidad del patrón de Cumarina obtenido por HPLC.

El límite de cuantificación (LC) fue calculado con base en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la ecuación de linealidad del método, obteniéndose valores de 1.3 $\mu\text{M}/\text{mL}$.

La exactitud del método se determinó mediante un análisis de 4 muestras a diferentes concentraciones, estimando el porcentaje de recuperación de la 7-HC. Para ello, se realizaron las determinaciones por triplicado de cada muestra de fracción de microsomal inactiva enriquecida con 7-HC a concentraciones de 1, 2, 3 y 4 μM respectivamente, el análisis se realizó por triplicado. Se obtuvo un coeficiente de variación de 4.4 % y el recobro, que es la cantidad de 7-HC recuperada de cada muestra después de la extracción, fue del 92.5 % \pm 2 (se expresa en % de la cantidad de 7-HC medida u observada, con respecto a la cantidad de 7-HC nominal o esperada).

4.4.2 Medición del efecto de los compuestos 6-17 sobre la actividad de CYP2A5 *in vitro*.

Una vez establecido la validez del método y que permitía una recuperación mayor al 90% se llevó a cabo la determinación del efecto de cada uno de los compuestos sintetizados sobre la actividad de la enzima. Todos los compuestos se evaluaron en un rango de concentraciones de 20 a 500 μM .

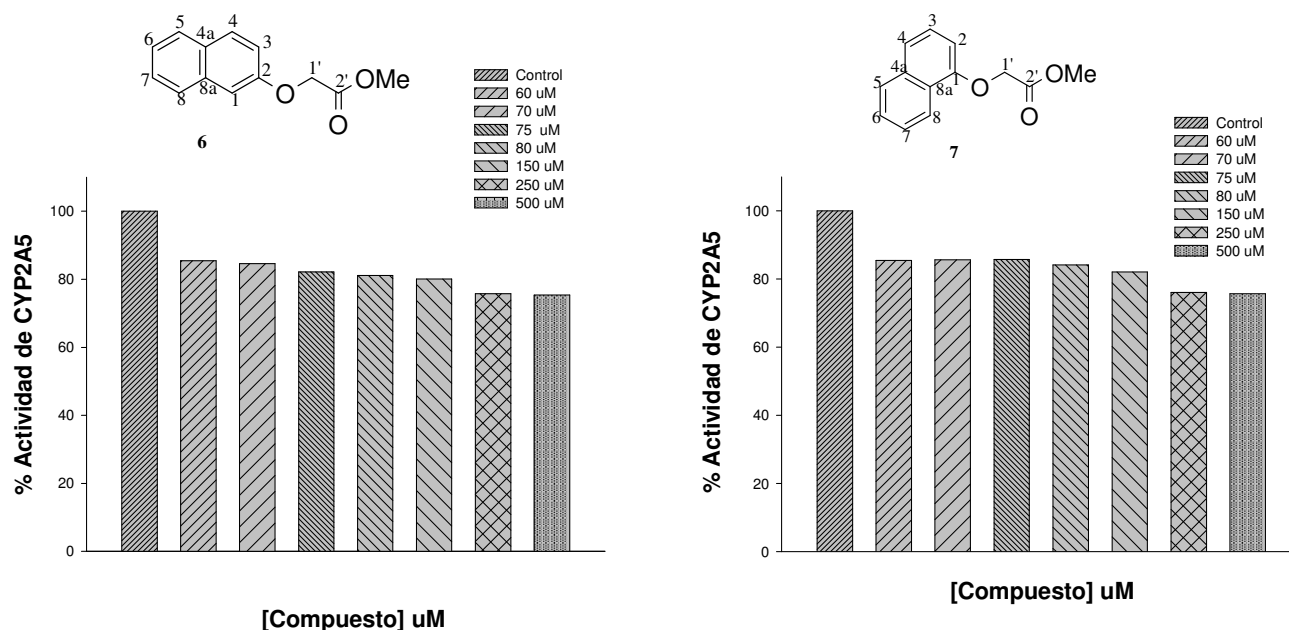
A partir de la integración de las áreas bajo la curva de Abs/min y la interpolación en la gráfica de linealidad del método se obtuvo la concentración del producto formado. Se estimó el % de inhibición con respecto a la concentración del producto formado por la enzima activa sin inhibidor. Aplicando el método Probit a partir de la linearización de los datos de Concentración vs % inhibición, se calculó la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) para cada uno de los compuestos.

4.4.2.1 Efecto de compuestos 6-9 sobre la actividad de la CYP2A5.

Hasta el momento, no hay reportes en la literatura que describan el efecto de los compuestos 6 a 9 o análogos sobre la enzima CYP2A5, por lo tanto no se cuentan con datos

para fines comparativos. Sin embargo, Juvonen *et al.* reportaron 28 compuestos, algunos derivados de naftaleno que presentaron actividad inhibitoria. Igualmente, Ranhnasto *et al.* realizó un estudio de modelado de la enzima basado en las características estructurales que hizo notar Juvonen, llegando a establecer que un buen inhibidor puede ser una molécula plana que tenga dos grupos que puedan formar puentes de hidrógeno.

En la Figura 22, se muestra el porcentaje de actividad de la enzima, en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos **6-9**. Se observa que el porcentaje de actividad de CYP2A5 se encuentra en 80-85% para los compuestos **6**, **7**, **8** y en un porcentaje mucho menor el compuesto **9**. También es apreciable que en el caso del compuesto **9**, parece existir una relación dosis-efecto que no se aprecia en los compuestos **6-8**. Asimismo, se observa que este grupo de compuestos exhibe una actividad inhibitoria débil con un valor de $CI_{50} > 1000 \mu M$, siendo **9** el que presenta mayor actividad inhibitoria con una CI_{50} de $70.3 \mu M$ (Tabla 3), lo que sugiere que la posición relativa de la cadena acetoxilica y el sustituyente en el anillo de naftaleno influye sobre la afinidad con la enzima y este favoreciendo la interacción con el sitio activo.



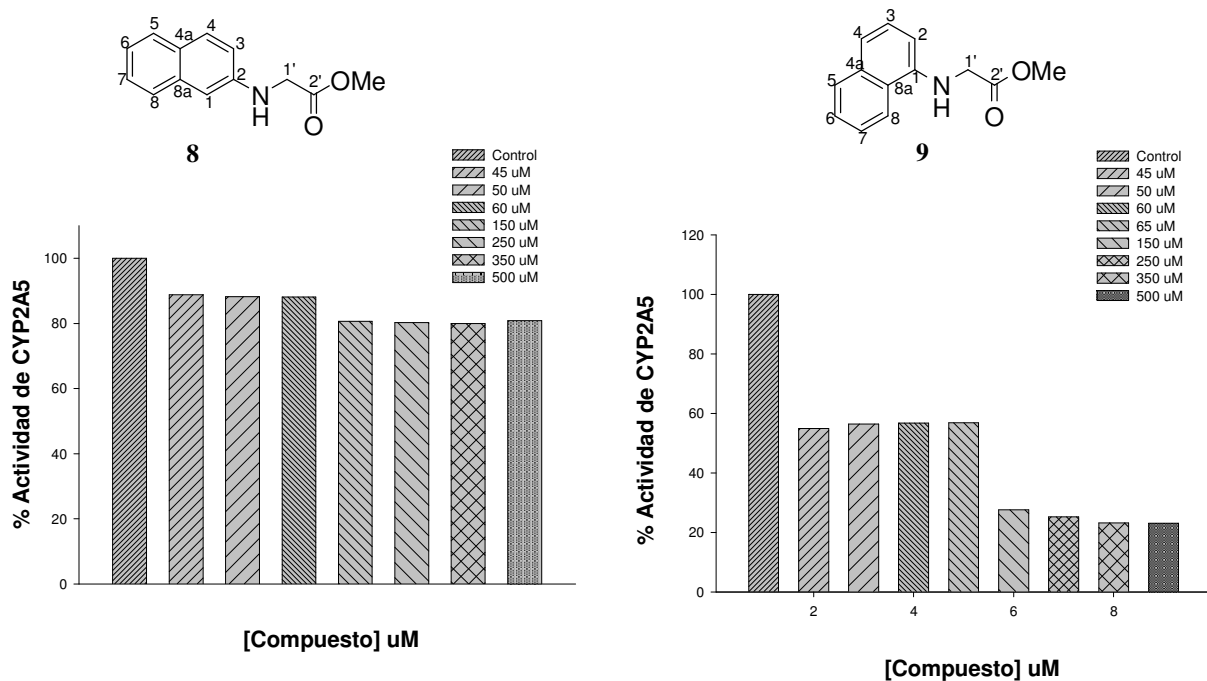


Figura 22. Efecto de compuestos esterificados **6-9** sobre la actividad de la CYP2A5.

4.4.2.2 Efecto de enaminonas **10-13** sobre la actividad de la CYP2A5.

La Figura 23 muestra los perfiles de inhibición de los derivados del naftaleno **10-13**, que se obtienen en un intervalo de 40 a 500 μ M.

En el caso del compuesto **10**, se aprecia una relación inversa dosis-efecto, ya que a la concentración más baja evaluada se observó la mayor inhibición. Caso contrario para su isómero posicional **11**, para el que se determinó que a mayor dosis se incrementa la inhibición. Lo anterior nos podría indicar que ahora la conformación de la estructura causa un efecto sobre el reconocimiento por el sitio activo de la enzima. Esta misma tendencia se aprecia en las gráficas para los compuestos **12** y **13** derivados de naftilamina, lo que reafirma que el grupo dimetilaminoacrilato en la posición 2, favorece la interacción con el sitio activo.

Para estos compuestos los valores de CI_{50} se ven disminuidos en comparación con los ésteres metílicos **6-9**. El compuesto **12** exhibe un potente efecto inhibitorio para CYP2A5

($CI_{50} = 0.42 \mu\text{M}$), en comparación con los compuestos **10** ($CI_{50} = 125.17$), **11** ($CI_{50} = 28.71$), **13** ($CI_{50} = 4.61$). Como se notó, la presencia del grupo amino favorece el reconocimiento por la enzima, ya que los valores de CI_{50} para **12** y **13** son menores que para sus análogos oxigenados **10** y **11**.

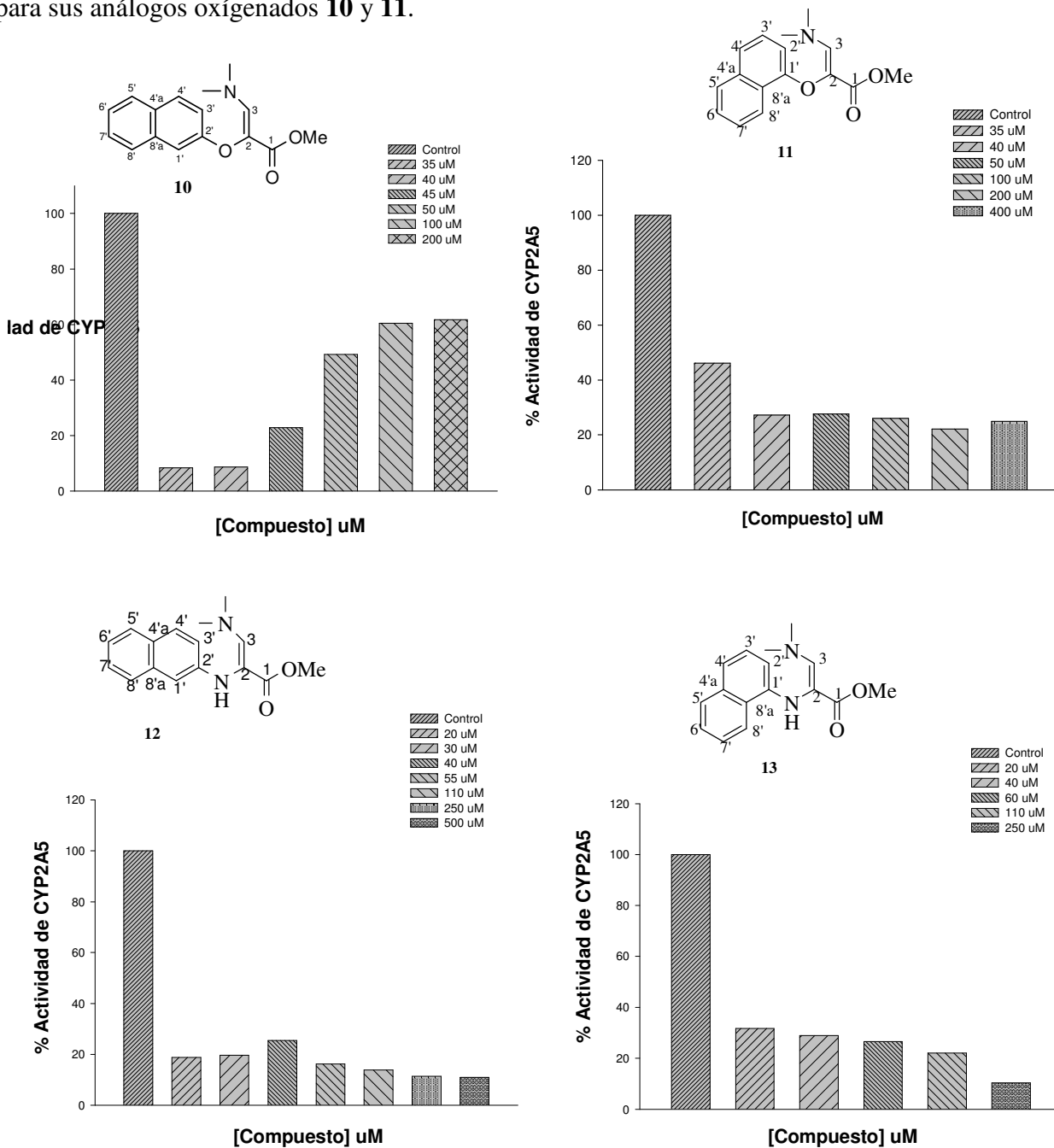
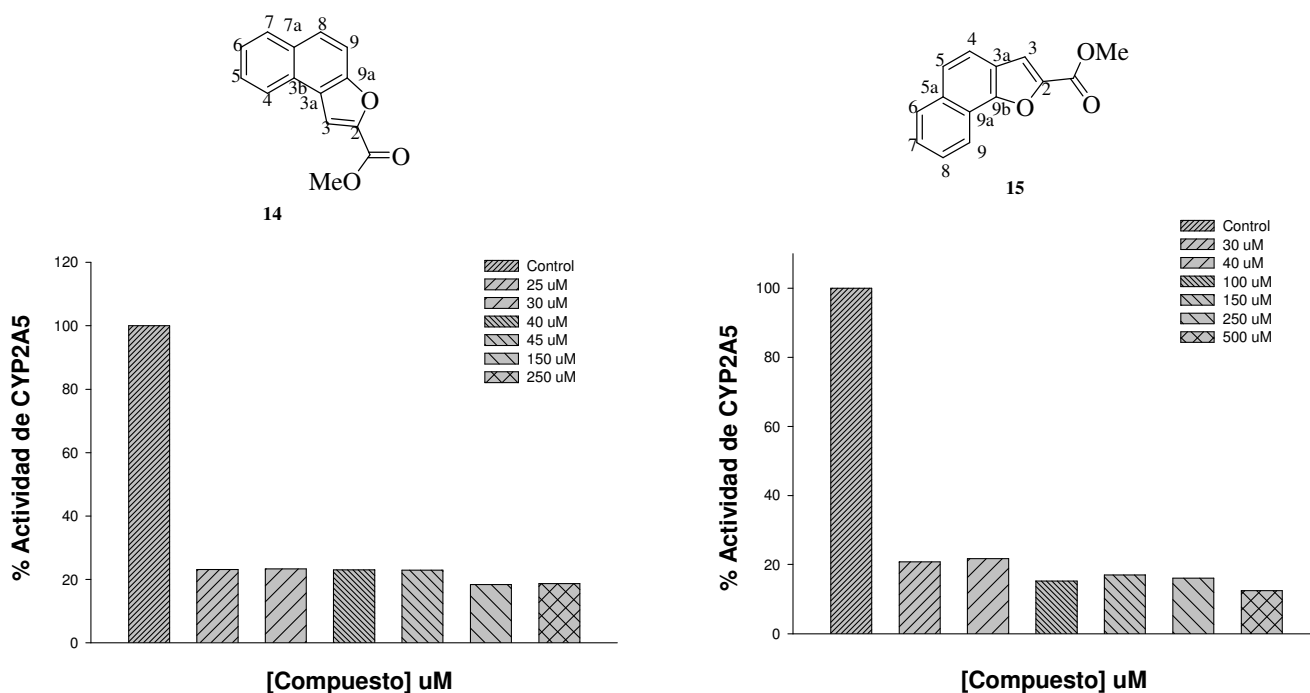


Figura 23. Efecto de los compuestos 10-13 sobre la actividad de la CYP2A5.

4.4.2.3 Efecto de indoles y benzofuranos 14-17 sobre la actividad de la CYP2A5.

En el caso particular de los compuestos **14-17** que incluyen benzofuranos e indoles derivados de naftaleno, las gráficas de actividad vs concentración mostradas en la Figura 24, permiten observar que los benzofuranos presentan un mayor efecto inhibitorio ya que a concentraciones bajas generan el 80% de inhibición, notándose que al parecer hay saturación de la enzima a partir de dicha concentración y no se aprecia una relación dosis efecto, por lo que sería necesario hacer el experimento a concentraciones menores a 35 μM . Nuevamente, es apreciable que para el caso de los derivados de naftilamina, parece existir una relación dosis-efecto, siendo más claro para el compuesto **16**, logrando una inhibición del 90%.

Con respecto a los isómeros 1 vs 2, es apreciable que para el caso del benzofurano no hay diferencias notables, ya que se observa el mismo porcentaje de inhibición. Sin embargo, para los indoles **16** y **17**, se nota una mayor actividad para el caso del compuesto derivado de la 2-naftilamina.



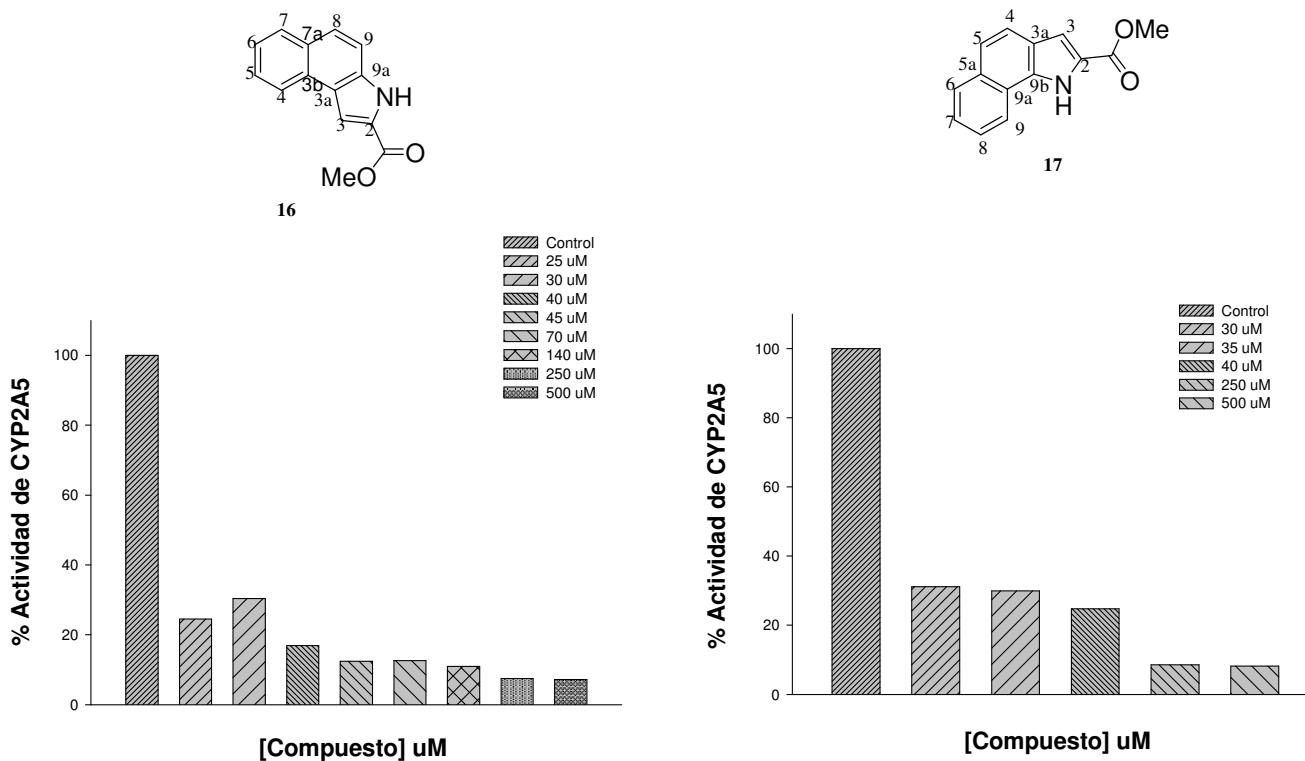
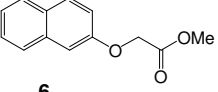
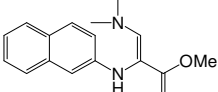
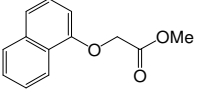
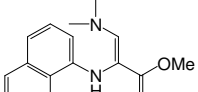
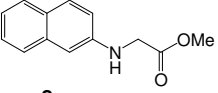
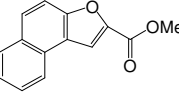
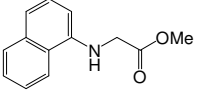
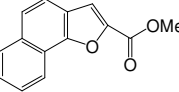
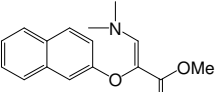
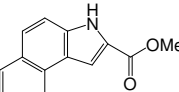
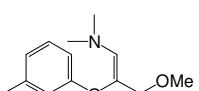
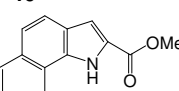


Figura 24. Efecto de índoles y benzofuranos **14-17** sobre la actividad de la CYP2A5.

De esta familia podemos observar que la mayor potencia inhibitoria la presenta el compuesto **14** con una CI_{50} de $0.0087 \mu\text{M}$ y que el compuesto con menor actividad de esta serie fue **17** con una CI_{50} de $3.9 \mu\text{M}$. Podemos destacar que esta serie de compuestos presentaron mejor actividad inhibitoria en comparación con la serie de ésteres y enaminonas, a excepción del compuesto **12** el cual muestra una mejor actividad que los índoles **16** y **17**, estos a su vez resultaron menos activos que los benzofuranos **14** y **15**.

Tabla 3. CI_{50} derivados de Naftaleno.

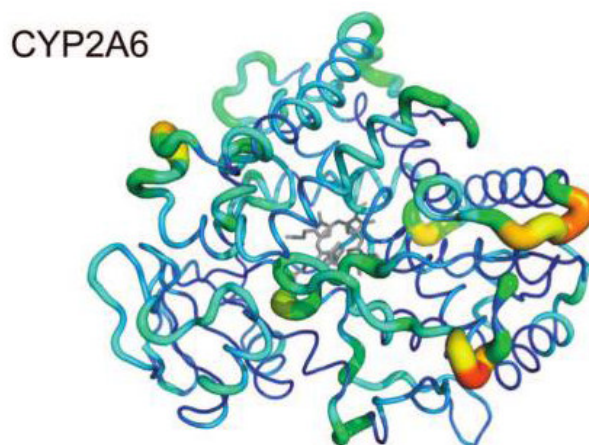
Compuesto	IC_{50}	Compuesto	IC_{50}
 6	22,319.85	 12	0.42
 7	22,613.33	 13	4.61
 8	46,427.79	 14	0.0087
 9	70.3	 15	0.042
 10	125.17	 16	1.85
 11	28.71	 17	3.9

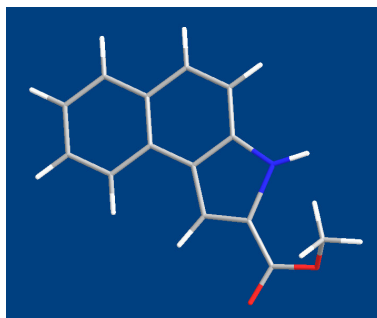
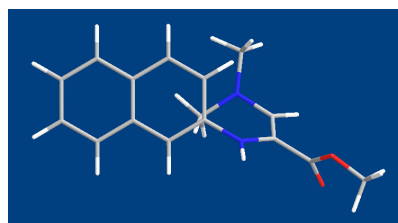
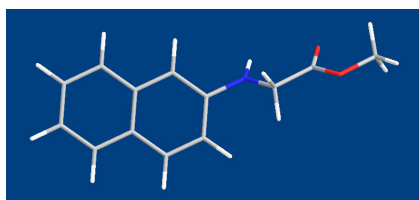
En la actualidad hay diversas investigaciones que nos permiten comparar la afinidad de la enzima por los compuestos sintetizados en este trabajo, ya que la triptamina, compuesto reportado como uno de los mejores inhibidores de la enzima CYP2A6 tiene un valor de CI_{50} de 0.8,⁸⁹ sin embargo los compuestos **12**, **14** y **15** presentaron valores de $CI_{50} = 0.42$ μ M, 0.0087 μ M y 0.042 μ M respectivamente por lo que muestran una mayor actividad inhibitoria. Por otra parte, estudios similares con el naftaleno, 1-naftol y 2-naftol reportan CI_{50} de 25 μ M, 130 μ M y 140 μ M respectivamente, lo cual nos permite establecer que la introducción de un heterociclo adicional como en **14** y **15**, potencia la actividad inhibitoria.

Estudios de modelado molecular de CYP2A6 han demostrado, que los principales residuos del sitio activo del enzima son Phe181, Gln74, y His437. His437 y Gln74, en particular, forman enlaces de hidrógeno con el sustrato, mientras que Phe181 forma interacciones π - π con el sistema aromático del sustrato⁹¹⁻⁹⁴. Por ello, es posible establecer que en el caso de los compuestos evaluados en el presente trabajo, la presencia del anillo aromático es suficiente para lograr una interacción con la enzima y observar su inhibición como resalta para el caso de los ésteres. No obstante también es apreciable, que la presencia del grupo amino incrementa la interacción ya que el valor de K_i se disminuye.

Se esperaba que los compuestos **10-13** que poseen un grupo amino adicional, presentaran una mayor actividad inhibitoria, resultado que no fue observado y una posible explicación es que la conformación de la molécula es crucial para el reconocimiento, ya que si bien los dimetilaminopropenoatos tienen una mayor densidad electrónica y la presencia de un grupo adicional con posibilidad de formar puentes de hidrógeno, la disposición espacial de los mismos le impide establecer de manera eficiente dichas interacciones.

Por ello es que al ocurrir la ciclación, la molécula recupera cierta planaridad en su estructura y el grupo éster se encuentra con mayor disposición para establecer la interacción como puede notarse en el valor de K_i mostrado en la tabla 8.





4.4.2.4 Estudio cinético de los compuestos **6**, **8**, **12**, y **16**

Se decidió estimar el tipo de inhibición presentada para alguno de los compuestos evaluados, para ello se calcularon las constantes de inhibición (K_i). Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 4. La representación gráfica tipo Lineweaver-Burk (Figura 25) sugiere que el tipo de inhibición presentada por los compuestos **6**, **8**, **12** y **16**, es de tipo competitivo.

Mediante la linearización se encontró que el mejor ajuste para la inhibición de **16** y **6** es de tipo competitiva con una constante de inhibición K_i de $0.3 \mu\text{M}$ y $0.43 \mu\text{M}$ respectivamente (Tabla 4). El doble recíproco indica que el mejor ajuste para la inhibición de **8** y **12** es de tipo no-competitivo con K_i de $0.3 \mu\text{M}$ y $0.35 \mu\text{M}$ respectivamente, probablemente los compuestos **8** y **12** se estén fijando a sitios de la enzima diferentes al centro activo, propiciando un cambio en la velocidad de reacción sin cambiar la afinidad aparente de unión de la enzima por el sustrato.

De acuerdo al estudio de Gotoh,⁷⁸ hay seis sitios de reconocimiento de sustrato en la secuencia de aminoácidos de CYP2, con esto podría explicarse el comportamiento de los compuestos **8** y **12**. Se sugiere que la inhibición puede llevarse a cabo por diferentes modelos: 1) Inhibidor (I) y Sustrato (S) se excluyen mutuamente por impedimento estérico, 2) I y S comparten un sitio de unión en la enzima, 3) el sitio de unión para I y S es el mismo o 4) la unión del inhibidor causa un cambio conformacional en la enzima que distorsiona el sitio de unión del sustrato. En estudios previos se han estudiado compuestos como: furanocumarinas, miconazol y derivados de lactona mostrando resultados de CI_{50} de 0.59-538 μ M, resultando los valores ser muy cercanos a los obtenidos en este estudio.

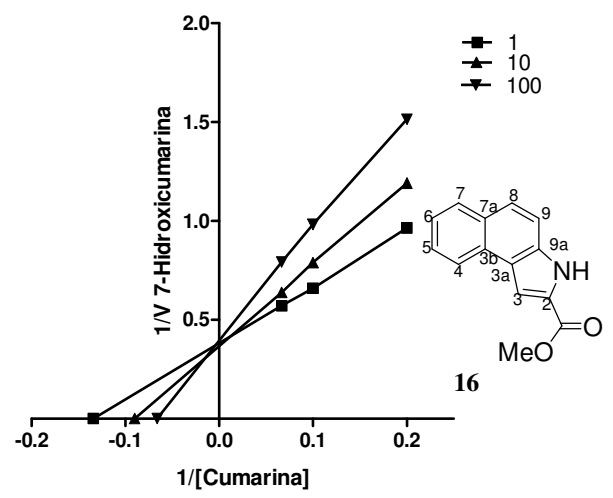
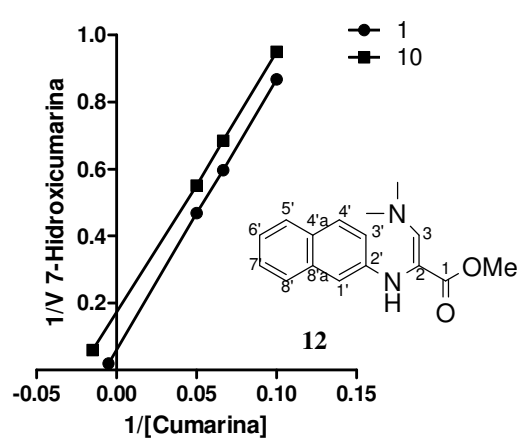
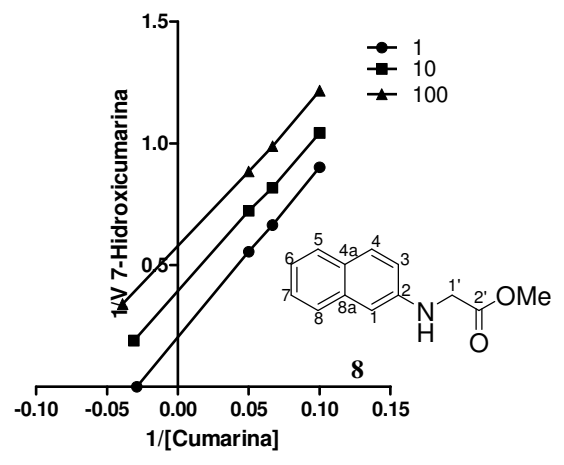
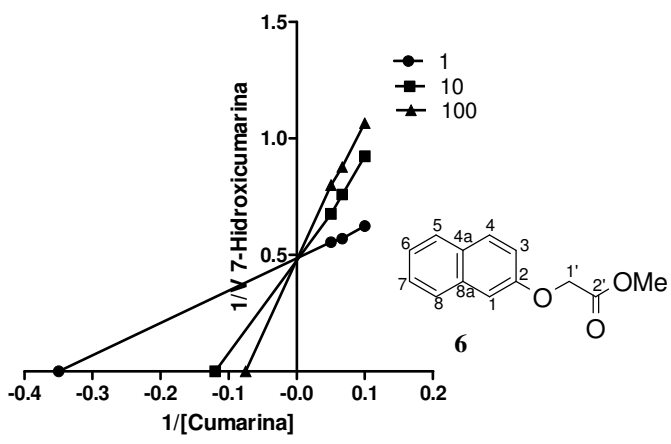
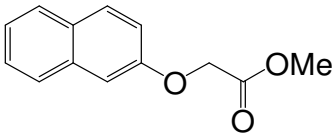
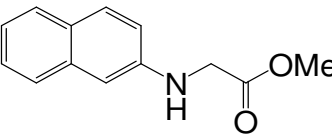
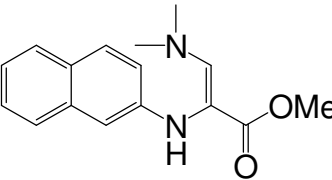
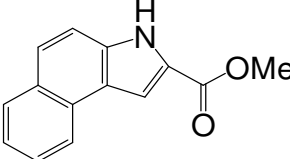


Figura 25. Efecto inhibitorio de los compuestos 6, 8, 12 y 16.

Tabla 4. Valores de K_i y tipo de inhibición de **6**, **8**, **12** y **16**.

Compuesto	Estructura	Tipo de Inhibición	K_i (μM)
(Naftalen-2 iloxi)- acetato de metilo	 <p style="text-align: center;">6</p>	Competitiva	0.43
(Naftalen-2-ilamino)- acetato de metilo	 <p style="text-align: center;">8</p>	No- competitiva	0.3
3-dimetilamino-2- (naftalen-2-ilamino)- acrilato de metilo	 <p style="text-align: center;">12</p>	No- competitiva	0.35
3H-Benzo[e]indol-2- carboxilato de metilo	 <p style="text-align: center;">16</p>	Competitiva	0.3

5. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 4 derivados heterocíclicos (**14-17**) de naftaleno, mediante ciclación intramolecular tipo Friedel-Crafts de los propenoatos **10 – 13**, en rendimientos bajos, aunque comparables con algunos reportados en la literatura para compuestos análogos.
- Se sintetizaron los dimetilaminoacrilatos **10-13** en rendimientos moderados a buenos. Estos compuestos no están reportados en la literatura.
- Se prepararon a partir de naftilamina y naftol los ésteres **6-9** en buenos rendimientos.
- Se evaluó el efecto de los compuestos **6-17** sobre la enzima CYP2A5.

La evaluación del efecto sobre la enzima CYP2A5 de los compuestos **6-17** permite establecer:

- Que los compuestos **6-8** presentan la actividad inhibitoria más baja de la serie de compuestos evaluada en este estudio.
- Se determinaron las CI_{50} para todos los compuestos sintetizados y se estableció que los heterociclos **14-17** presentan la mejor actividad inhibitoria de los compuestos probados, cuya potencia es comparable con inhibidores publicados por otros autores.
- Se observa que la presencia del nitrógeno vs oxígeno unido al anillo aromático, influye sobre la actividad inhibitoria. De igual manera, la posición del mismo también influye sobre el efecto.
- El tipo de inhibición de acuerdo a la K_i calculada para los compuestos **6**, y **16** sugieren un tipo de inhibición competitiva, mientras que para **8** y **12** la inhibición resulta ser de tipo no-competitiva.

En general, puede concluirse que se sintetizaron 12 compuestos, 6 de los cuales no han sido reportados previamente en la literatura, a los cuales se les determinó el efecto sobre la enzima CYP2A5. Encontrándose que los compuestos heterocíclicos presentan un efecto

inhibitorio interesante a dosis bajas, mostrando una inhibición competitiva en el modelo utilizado.

Se sugiere llevar a cabo la evaluación de los compuestos más activos en la enzima humana, para establecer si presentan el mismo comportamiento y una vez realizado este estudio, determinar los posibles efectos tóxicos. Todo ello con el fin de identificar sustancias que puedan ser utilizadas en la terapia para dejar de fumar.

6. Parte Experimental

La determinación de los puntos de fusión se realizó en un aparato **Electrothermal** de capilar y son reportados sin corrección.

Los espectros de infrarrojo (**IR**) se obtuvieron en un espectrofotómetro **Perkin Elmer 2000** Serie **FT-IR** a través de la técnica ATR fueron adquiridos en película o pastilla de KBr.

Los Espectros de resonancia magnética nuclear protónica (**RMN-1H**) a 300 MHz y Carbono¹³ (**RMN-13C**) a 74.5 MHz se determinaron en un espectrómetro **VARIAN MERCURY 300**. Los desplazamientos químicos (δ) están dados en partes por millón (ppm) empleando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, se emplearon disolventes deuterados: cloroformo (CDCl₃), acetona (acetona-d₆) y dimetilsulfoxido (DMSO-d₆). En algunos casos fue necesaria la obtención de experimentos bidimensionales de correlación como COSY (Correlated Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

Abreviaturas empleadas en RMN:

a = ancha.

d = señal doble

dd = señal doble de doble

ddd = doble de doble de dobles

dt = señal doble de triple

m = señal múltiple

q = señal cuádruple

s = señal simple

t = señal triple

Los espectros de masa (**EM**) se obtuvieron en un equipo **HEWLETT-PACKARD GC/MS-5971** (Mass Selective Detector) y en un equipo **Finnigan Trace GC Ultra Polaris Q**, utilizando la técnica de impacto electrónico (IE) a 70 eV y la descripción de los mismos está dada por: m/z, intensidad relativa, indicando al ión molecular como M+ y al fragmento más abundante como PB (pico base).

Los datos de masas de alta resolución (**EMAR**) fueron obtenidos por la técnica de impacto electrónico (IE) en un espectrofotómetro **JEOL JMS-Ax 505 HA** y **JEOL GCMate II TSS2000**.

Las cromatografías en capa fina (**ccf**) se hicieron en placas de sílica gel **E. MERC 60F-254**, y se reveló con luz ultravioleta de longitud de onda alta. La cromatografía en columna (**cc**) se empleó sílica gel en una relación 20 g de sílica/ 1 gramo de crudo de reacción.

La purificación se realizó por cromatografía en columna utilizando como soporte gel de sílice **Natland** mallas 200-300 y 230-400.

La descripción de los espectros es de la manera siguiente:

IR (fase): en cm⁻¹.

RMN-1H (disolvente): desplazamiento químico (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz (*J*), número de protones, asignación).

RMN-13C (disolvente): desplazamiento químico (asignación).

EM (electrovolts) m/z (intensidad relativa).

EMAR (técnica, ión molecular) masa calculada: masa observada. (Hasta 4 decimales). 109

El cloruro de zinc (ZnCl₂*) activado y seco, se obtuvo por tratamiento de 10 g de ZnCl₂ con 1 g de zinc metálico y 100 mL de dioxano a 150 °C durante 24 h, se dejó enfriar, se filtró y secó a vacío.

El tricloruro de aluminio (AlCl₃) se empleó directo del frasco.

El diclorometano (DCM), se destiló sobre hidruro de calcio.

La dimetilformamida (DMF) seca se obtuvo directo del frasco.

Método general 1. Obtención de Naftiloxiacetatos de metilo.

El correspondiente ácido fenoxiacético se mezcló con 10% en peso de ácido *p*-toluensulfónico (*p*TsOH) y metanol anhidro 10 ml/g, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a reflujo por 24h. La mezcla se filtró y se removió el metanol a vacío. El residuo de reacción se disolvió en acetato de etilo y se lavó con una solución de bicarbonato de sodio hasta pH neutro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10 g/g de muestra y como fase móvil hexano/AcOEt (9:1).

Método general 2. Obtención de acetatos de metilo.

En un matraz se mezclan 1.0 eq. molar de la naftilamina o naftol correspondiente, 1.5 eq. molares de carbonato de potasio K_2CO_3 y 10 ml de acetona por gramo de naftilamina. La reacción se agitó a una temperatura de 50°C por media hora y se le adicionó 1.2 eq. molares de bromoacetato de metilo ($BrCH_2CO_2Me$) se mantuvo en agitación constante durante 12 hrs. La mezcla se filtro y se removió el disolvente con vacío. El residuo orgánico se purifico mediante cromatografía en columna (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt).

Método general 3. Obtención de (Z)-3-dimetilaminoacrilatos de metilo.

En un matraz se mezclaron 1.0 eq. molar del fenoxiacetato de metilo o del fenilamioacetato de metilo con 1.5 eq. molares del dimetilacetal de la dimetilformamida (DMADMF). La reacción se agitó a una temperatura de 90 °C por 24 hrs. La mezcla obtenida se filtro, removiendo el disolvente al vacío. El residuo se purifico mediante cromatografía en columna (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt).

Método general 4. Obtención de benzofuranos.

Se mezclan en un matraz 1.0 eq. molar de Naftiloxiacrilato de metilo, con 3.0 eq. molares de $ZnCl_2$ anhidro y 10 ml de diclorometano x gramo de compuesto. La reacción se agitó a una temperatura de 40°C por 24 h. Se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en 50 ml de AcOEt, la fase orgánica fue lavada con una solución saturada de NH_4Cl (2 x 10 ml). Finalmente se eliminó el residuo de agua con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente fue removido

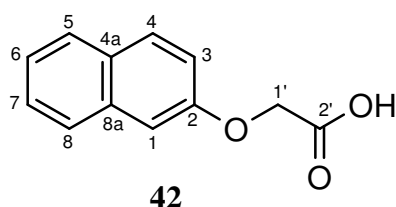
al vacío y el residuo purificado mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt)).

Método general 6. Obtención de indoles.

Se mezclaron 1 eq. Molar del naftilaminoacrilato de metilo correspondiente con 3.0 eq. molares de AlCl_3 anhidro. y 10 ml de diclorometano x g de acrilato. La reacción se mantuvo en agitación, la mezcla se lavó con una solución saturada de NH_4Cl (2 x 20 ml). El extracto acuoso se lavó con AcOEt (2 x 10 ml). Los extractos orgánicos se reunieron y secaron con Na_2SO_4 anhidro y se removió el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt)).

6.1.- Preparación de Naftol [2,1-*b*] furan-2-carboxilato de metilo (14).

6.1.1.- Acido 2-Naftiloxiacético (42).



A 5 g (34.7 mmol) de 2-naftol suspendidos en 20 mL de agua, se adicionó una solución de 2.0 g (50 mmol) de NaOH y 5 mL de agua. Esta mezcla se agitó a 60 °C durante 30 min. Se adicionaron 4.77 g (41.70 mmol) de $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{Na}$. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante por 12 h a 60°C, se dejó enfriar y se le adicionó lentamente HCl 2M hasta pH=2. Esta mezcla se extrajo con AcOEt (5 x 10 ml). La fase orgánica se reunió, y fue secada con Na_2SO_4 anhidro y el exceso de disolvente se removió a vacío.

El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt, 8:2) para obtener 4.9 g (98%) de 42 como un sólido color blanco: R_f 0.37 (hexano/AcOEt/ CH_3COOH 8:2:0.5); p.f. 156-157 °C (hexano/AcOEt 4:6); [lit.⁶⁶ 154 °C].

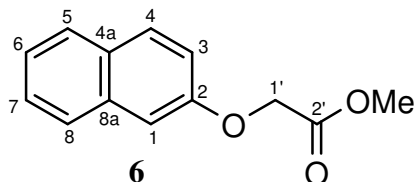
IR (KBr): 3445-2300, 1739, 1627, 1598, 1508, 1468, 1428, 1389, 1361, 1250, 1217, 1183, 1120, 1076, 960, 902, 840 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, acetona- d_6): δ 4.85 (s, 2H, CH_2), 5.35 (sa, 1H, OH), 7.23 (dd, $J = 9.0$ Hz, 2.7 Hz, 1H, H-3), 7.29 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-1), 7.35 (ddd, $J = 8.1$ Hz, 6.9 Hz, 1.5 Hz, 1H, H-6), 7.45 (ddd, $J = 8.1$ Hz, 6.9 Hz, 1.5 Hz, 1H, H-7), 7.77 - 7.86 (m, 3H, H-4, H-5, H-8).

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3): δ 66.3 (CH_2), 108.8 (C-1), 120.4 (C-3), 125.6 (C-6), 128.2 (C-8), 128.7 (C-5), 129.4 (C-7), 131.1 (C-4a), 131.3 (C-4), 136.4 (C-8a), 157.9 (C-2), 171.2 (CO_2Me).

EM (70 eV) m/z 202 (M^+ , 60), 157 (15), 143 (58), 129 (33), 115 (100), 89 (6) 77 (3).

6.1.2.- 2-Naftiloxiacetato de metilo (6).



Siguiendo el método general 2, se mezclaron 4.9 g (24.2 mmol) de **42**, 0.49 g de ácido *p*-toluensulfónico (*p*TsOH) en 49 ml de metanol, para obtener 4.5 g (91 %) de **6** como un sólido color blanco: Rf. 0.72 (hexano/AcOEt 8:2); p.f. 77-78 °C (hexano/AcOEt 8:2); [lit.⁶⁶ 76-77 °C].

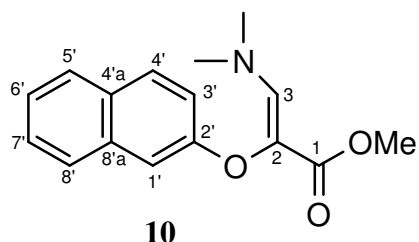
IR (KBr): 1758, 1629, 1599, 1508, 1470, 1435, 1388, 1257, 1208, 1173, 1121, 1075, 836, 746 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 3.82 (s, 3H, OCH_3), 4.75 (s, 2H, CH_2), 7.07 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-1), 7.23 (dd, $J = 8.8$ Hz, 2.6 Hz, 1H, H-3), 7.3-7.39 (m, 1H, H-6), 7.41-7.48 (m, 1H, H-7), 7.72 (da, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-8), 7.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 8.7 Hz, 2H, H-4, H-5).

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3): δ 52.3 (OCH_3), 65.3 (OCH_2), 107.0 (C-1), 118.6 (C-3), 124.1 (C-8), 126.6 (C-6), 126.8 (C-5), 127.6 (C-7), 129.4 (C-4a), 129.7 (C-4), 134.2 (C-8a), 155.6 (C-2), 169.3 (CO_2Me).

EM (70 eV) m/z 216 (M^+ , 100), 157 (55), 143 (44), 129 (90), 115 (100), 89 (10), 77 (13).

6.1.3.- (Z)-3-dimetilamino-2-(2-Naftiloxi) acrilato de metilo (10).



Usando el método general 4, se mezclaron 1 g (4.9 mmol) de 6 con 0.88 g (7.39 mmol) de DMADMF. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt 8:2) para obtener 0.98 g (98 %) de 10 como un sólido color blanco R_f 0.5 x 3 (hexano/AcOEt 8:2); p.f. 122 °C (hexano/AcOEt 7:3). [lit. ref.⁶⁶ 120-121 °C].

IR (KBr): 1697, 1629, 1509, 1462, 1433, 1389, 1356, 1299, 1249, 1211, 1162, 1120, 1085 846, 749 cm^{-1} .

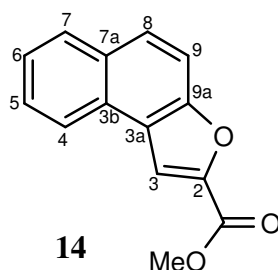
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 2.98 (s, 3H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.63 (s, 3H, OCH_3), 7.22 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-1'), 7.24 (s, 1H, H-3), 7.27 (m, 1H, H-3'), 7.34 (td, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 1H, H-6'), 7.43 (td, $J = 8.1$ Hz, 1.2 Hz, H-7'), 7.71 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-8'), 7.78 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-4', H-5').

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3): δ 42.2 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, 51.2 (OCH_3), 108.8 (C-1'), 114.9 (C-2), 117.7 (C-3'), 123.8 (C-6'), 126.3 (C-8'), 126.3 (C-5'), 127.6 (C-7'), 129.4 (C-4'a), 129.6 (C-4'), 134.4 (C-8'a), 139.8 (C-3), 157.2 (C-2'), 166.6 (CO_2Me).

EM (70 eV) m/z 271 (M^+ , 12), 240 (10), 212 (100), 194 (21), 184 (21), 165 (9), 155 (30), 153 (80), 141 (11), 127 (17), 116 (9), 84 (48), 56 (33), 44 (23), 42 (38).

EMAR (IE, M^+) calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$: 271.1208. Observado: 271.1204.

6.1.4.- Naftol [2,1-b] furan-2-carboxilato de metilo (14).



Empleando el método 5, se mezclaron 0.5 g (1.8 mmol) de **10** con 0.75 gr (5.53 mmol) de ZnCl₂ y 50 ml de diclorometano. La reacción se agitó a una temperatura de 40°C por 24 h. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt 9:1) para obtener 0.196 g (39%) de **14** como un sólido color blanco: *Rf* 0.3 (hexano/AcOEt 8:2); p.f. 118-119 °C (hexano/AcOEt 7:3).

IR (KBr): 1729, 1585, 1551,1438, 1331,1283, 1225, 1206, 1170, 1115, 976, 824,762 cm⁻¹.

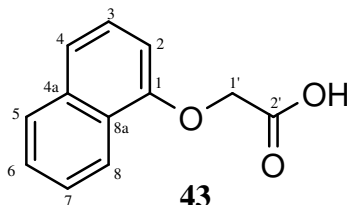
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 4.00 (s, 3H,OCH₃), 7.50 – 7.57 (m, 1H, H-5), 7.60 – 7.67 (m, 1H, H-6), 7.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-9), 7.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-8), 7.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7), 8.0 (s, 1H, H-3), 8.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-4).

RMN ¹³C (75.4 MHz, CDCl₃): δ 52.3 (CO₂CH₃), 112.7 (C-9), 113.0 (C-3), 122.7 (C-7a), 123.3 (C-4), 125.4 (C-6), 127.3 (C-5), 127.9 (C-3b), 129.0 (C-7), 129.2 (C-8), 130.4 (C-3a), 144.7 (C-2), 154.0 (C-9a), 159.8 (CO₂Me).

EM (70 eV) *m/z* 227 (M⁺ + 1, 100), 196 (41), 169 (25), 140 (42).

6.2.- Obtención de Naftol [1,2-*b*]furan-2-carboxilato de metilo (**15**).

6.2.1.- Acido 1-Naftoxiacético (**43**).



Siguiendo el método descrito para la obtención de **42**, se mezclaron 5 g (34.7 mmol) de 1-naftol con 2.0 g (50 mmol) de NaOH y 4.77 g (41.7 mmol) de ClCH₂CO₂Na. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt 8:2). Obteniéndose 4.5 g (90%) de **43** como un sólido de color blanco. *Rf* 0.37 (hexano/AcOEt/CH₃COOH 8:2:0.5); p.f. 196-197 °C (hexano/AcOEt 4:6); [lit.⁶⁵ 192 °C]

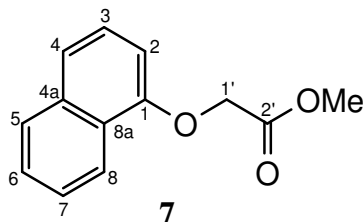
IR (KBr): 3445, 2919, 1743, 1704, 1578, 1509, 1422, 1401, 1266, 1242, 1120, 1079, 794, 771 cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 4.93 (s, 2H,CH₂), 6.91 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-2), 7.39 (t, *J* = 8.1 Hz, 8.1 Hz, 1H, H-3), 7.46 – 7.56 (m, 3H, H-4, H-6, H-7), 7.82 – 7.89 (m, 1H, H-5), 8.31 – 8.37 (m, 1H, H-8).

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3): δ 65.0 (OCH_2), 105.4 (C-2), 121.1 (C-3), 122.3 (C-8), 125.6 (C-4), 125.8 (C-8a), 126.2 (C-7), 126.8 (C-6), 127.7 (C-5), 135.0 (C-4a), 154.0 (C-1), 169.6 (CO_2OH).

EM (70 eV) m/z 202 (M^+ , 100), 144 (30), 143 (100), 115 (83).

6.2.2.- 1-Naftiloxiacetato de metilo (7).



Siguiendo el método 2, se mezclaron 8.48 g (41.9 mmol) de **43** con 0.848 g de *p*TsOH y 84 ml de metanol. Obteniéndose 8.2 g (97%) de **7** como un sólido de color blanco. *R*_f 0.75 (hexano/AcOEt 8:2); p.f. 37-38 °C (hexano/AcOEt 8:2).

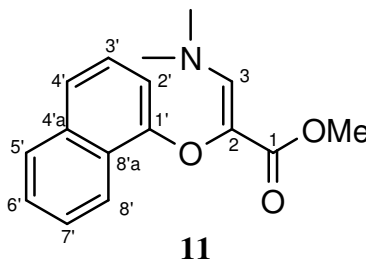
IR (KBr): 1761, 1581, 1509, 1463, 1437, 1399, 1275, 1212, 1158, 1118, 1077, 1030 793, 772 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 3.79 (s, 3H, OCH_3), 4.79 (s, 2H, CH_2), 6.68 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-2), 7.32 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-3), 7.43 – 7.52 (m, 3H, H-4, H-6, H-7), 7.75 – 7.81 (m, 1H, H-5), 8.32 – 8.40 (m, 1H, H-8).

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3): δ 52.2 (OCH_3), 65.5 (CH_2), 104.9 (C-2), 121.3 (C-3), 122.0 (C-8), 125.4 (C-7, C-8a), 125.5 (C-6), 126.6 (C-5), 127.3 (C-4), 134.5 (C-4a), 153.6 (C-1), 169.3 (CO_2Me).

EM (70 eV) m/z 216 (M^+ , 100), 143 (100), 129 (20), 115 (70).

6.2.3.- (Z)-3-Dimetilamino-2-(1-Naftiloxi)acrilato de metilo (11).



Siguiendo el método 4, se mezclaron 2.5 g (11.56 mmol) de **7** con 2.06 g (17.34 mmol) de DMADMF. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt 8:2). Obteniéndose 2.3 g (92%) de **11** como un sólido de color blanco. *Rf* 0.52 (hexano/AcOEt 8:2 x 2); p.f. 141-142 °C (hexano/AcOEt 7:3).

IR (KBr): 1697, 1629, 1509, 1433, 1356, 1299, 1249, 1211, 1162, 1120, 1085, 959, 846 cm^{-1} .

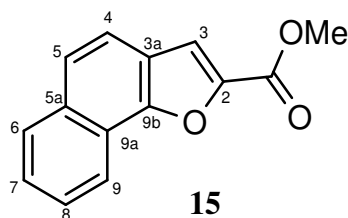
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 2.91 (s, 3H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.60 (s, 3H, OCH_3), 6.84 (dd, $J = 7.5$ Hz, 0.9 Hz, 1H, H-2'), 7.25 (s, 1H, H-3), 7.33 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-3'), 7.41 – 7.51 (m, 3H, H-4', H-6', H-7'), 7.76 - 7.84 (m, 1H, H-5'), 8.31 – 8.34 (m, 1H, H-8').

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3): δ 42.0 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 51.0 (OCH_3), 106.8 (C-2'), 114.8 (C-2), 120.9 (C-3'), 121.9 (C-8', C-4), 125.0 (C-7', C-8a), 125.3 (C-2,5), 125.8 (C-7'), 126.3 (C-6'), 127.4 (C-5'), 134.6 (C-4a), 139.6 (C-3), 154.9 (C-1'), 166.5 (CO_2Me).

EM (70 eV) m/z 271 (M^+ , 10), 212 (100), 197 (9), 184 (24), 167 (15), 153 (29), 141 (12), 127 (9), 116 (8), 84 (21), 77 (1).

EMAR (**IE**, M^+) calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$: 271.1208. Observado: 271.1204.

6.2.4.- Naftol [1,2-b] furan-2-carboxilato de metilo (**15**).



Siguiendo el método general 5 para la obtención de benzofuranos, se mezclaron 0.5 g (1.8 mmol) de **11** con 0.75 g (5.5 mmol) de ZnCl_2 y 50 ml de diclorometano. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt 9:1). Obteniéndose 0.028 g (5.6 %) de **15** como un sólido de color blanco. *Rf* 0.6 (hexano/AcOEt 8:2); p.f. 97-98 °C (hexano/AcOEt 7:3).

IR (KBr): 3423, 2954, 1721, 1552, 1517, 1439, 1324, 1197, 1096, 977, 830, 737 cm^{-1} .

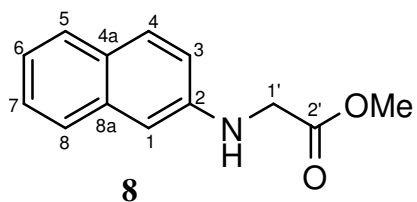
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 4.00 (s, 3H, OCH_3), 7.54-7.73 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-7, H-8), 7.93 (s, $J = 7.5$, 1H, H-6), 8.46 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-9).

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3): δ 52.3 (CO_2CH_3), 115.1 (C-3), 119.9 (C-4), 120.9 (C-9), 121.3 (C-9a), 122.8 (C-5a), 124.7 (C-5), 126.7 (C-8), 126.8 (C-7), 128.3 (C-6), 133.0 (C-3a), 144.8 (C-2), 152.3 (C-9b), 159.9 (CO_2Me).

EM (70 eV) m/z 227 (M^+ , 100), 212 (100), 196 (40), 169 (26), 140 (42).

6.3.- 3H-Benzo[e]indol-2-carboxilato de metilo (16).

6.3.1.- 2-Naftilaminoacetato de metilo (8)



Siguiendo el método 2, se mezclaron 1 g (6.9 mmol) de **2-naftilamina** con 1.43 g (10.3 mmol) de K_2CO_3 y 10 ml de acetona y 1.26 g (8.3 mmol) de $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$. El residuo orgánico se purificó mediante cromatografía en columna (4 g/g de muestra, (hexano/ AcOEt 8:2), para obtener 0.64 g (64%) de **8** como un sólido color amarillo: R_f . 0.55 (hexano/ AcOEt 8:2); p.f. 69 °C (hexano/ AcOEt 8:2)

IR (KBr): 3391, 1733, 1630, 1602, 1524, 1437, 1397, 1350, 1217 1189, 829, 746 cm^{-1}

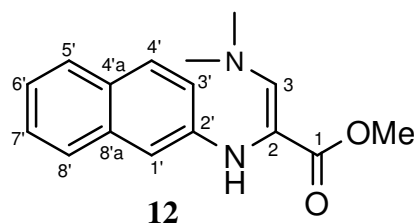
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.96 (s, 2H, NCH_2), 4.47 (s, 1H, NH), 6.70 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, H-3), 6.90 (dd, $J = 8.7$ Hz, 2.1 Hz, 1H, H-1), 7.17 – 7.23 (m, 1H, H-6), 7.32-7.38 (m, 1H, H-7), 7.58 – 7.68 (m, 3H, H-4, H-5, H-8).

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3): δ 45.4 (NCH_2), 52.1 (OCH_3), 104.5 (C-1), 117.7 (C-3), 122.2 (C-6), 125.9 (C-8), 126.3 (C-7), 127.5 (C-5), 127.7 (C-4a), 134.9 (C-8a), 144.5 (C-2), 171.4 (CO_2Me).

EM (70 eV) m/z 215 (M^+ , 19), 156 (100), 129 (46), 128 (2), 77 (3).

EMAR (IE, M^+) calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2$: 215.09463 Observado: 215.09468

6.3.2.- (Z)-3-Dimetilamino-2-(2-naftilamino) acrilato de metilo (12)



Se mezclaron 1 g (4.6 mmol) de 8 con 2.0 ml (6.9 mmol) de DMADMF. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt 8:2) para obtener 0.35 g (35%) de 12 como un sólido color amarillo *R_f* 0.75 (hexano/AcOEt 8:2); p.f. 179-180 °C (hexano/AcOEt 1:1).

IR (KBr): 3351, 1682, 1629, 1520, 1430, 1393, 1288, 1215, 1183, 1083 cm⁻¹.

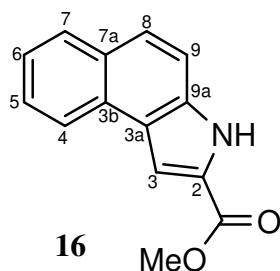
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 3.03 (s, 3H, N(CH₃)₂), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 4.81 (s, 1H, NH), 6.81 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-3'), 6.97 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2.4 Hz, 1H, H-1'), 7.18 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 6.9 Hz, 1.2 Hz, 1H, H-6'), 7.33 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 6.9 Hz, 1.2 Hz, 1H, H-7'), 7.47 (s, 1H, H-3), 7.57 – 7.69 (m, 3H, H-4', H-5', H-8').

RMN ¹³C (75.4 MHz, CDCl₃): δ 41.8 (N(CH₃)₂), 51.2 (OCH₃), 98.5 (C-2), 106.4 (C-1'), 117.5 (C-3'), 122.0 (C6'), 126.0 (C-3), 126.1 (C-8'), 127.6 (C-7'), 128.0 (C-5'), 128.9 (C-4'a), 135.0 (C-4'), 146.5 (C-8'a), 146.9 (C-2'), 169.6 (C-1).

EM (70 eV) *m/z* 270 (M⁺, 12), 239 (10), 210 (39), 168 (10), 142 (10), 129 (49), 83 (7), 57 (88), 42 (100).

EMAR (IE, M⁺) calculado para C₁₆H₁₈N₂O₂: 270.13683 Observado: 270.13686

6.3.3.- 3H-Benzo[*e*]indol-2-carboxilato de metilo (16)



Se mezclaron 0.5 g (1.85 mmol) de 12 con 0.74 g (5.5 mmol) de AlCl₃ anhidro y 5.0 ml de diclorometano. La mezcla se dejó reaccionar por 36 h. El residuo se purificó mediante

cromatografía en columna de gel de sílice (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt 9:1), para obtener 0.18 g (36%) de 16 como un sólido color blanco: R_f 0.5 (hexano/AcOEt 8:2); p.f. 184-185 (hexano/AcOEt 6:4).

IR (KBr): 3312, 1686, 1511, 1434, 1366, 1254, 1195, 936, 803, 754 cm^{-1} .

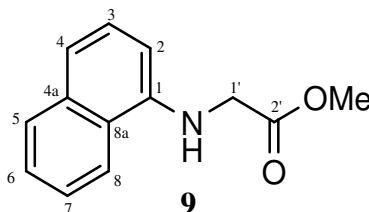
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 4.0 (s, 3H, OCH_3), 7.42-7.59 (m, 1H, H-6), 7.52 (d, $J = 0.9$ Hz, H-3), 7.59 (dt, $J = 1.2$ Hz, 1.2 Hz, 1.5 Hz, 2H, H-7, H-8), 7.70 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-4), 7.74 (dd, $J = 0.9$ Hz, 0.9 Hz, 1H, H-5), 7.89 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-9), 8.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6), 9.63 (sa, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ : 51.9 (CO_2CH_3), 107.9 (C-3), 112.9 (C-4), 122.8 (C-8), 122.9 (C-7a), 124.3 (C-3a), 125.2 (C-6), 126.71 (C-5), 127 (C-7), 128.7 (C-4), 128.8 (C-2), 134.3 (C-1), 162.46 (COO).

EM (70 eV) m/z 226 (M^+ , 100), 213 (53), 194 (51), 184 (5), 169 (53), 140 (20).

6.4.- Obtención de 1H-Benzo[g]indol-2-carboxilato de metilo (17)

6.4.1.- 1-Naftilaminoacetato de metilo (9)



Siguiendo el método 2, se mezclaron 5 g (34.5 mmol) de 1-naftilamina con 7.14 g (51.7 mmol) de K_2CO_3 , 50 ml de acetona, y 6.3 g (41.4 mmol) de $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$. El residuo orgánico se purificò mediante cromatografía en columna (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt 8:2). Obteniéndose 2.8 g (56%) de **9** como un sólido de color amarillo. R_f 0.675 (hexano/AcOEt 8:2); p.f. 70-72 $^\circ\text{C}$ (hexano/AcOEt 8:2); [lit.⁶⁷ 72-74 $^\circ\text{C}$].

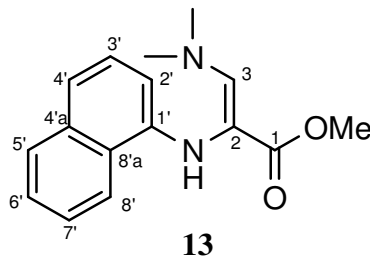
IR (KBr): 3422, 1742, 1583, 1530, 1483, 1437, 1409, 1341, 1224, 1209, 1141 786, 769 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 3.76 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.99 (s, 2H, CH_2), 4.86 (s, 1H, NH), 6.41 (dd, $J = 6.9$ Hz, $J = 0.9$ Hz, 1 H, H-2), 7.36-7.22 (m, 2H, H-3,H4), 7.48 – 7.38 (m, 2H, H-6,H-7), 7.8-7.73 (m, 1H, H-5), 7.92-7.83 (m, 1H, H-8).

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3): δ 45.6 (CO_2CH_3), 52.2 (CH_2), 104.3 (C-2), 118.1 (C-4), 119.9 (C-8), 123.23 (C8a), 124.9 (C-7), 125.8 (C-6), 126.3 (C-3), 128.5 (C-5), 134.1 (C4a), 142.1 (C-1), 171.4 (C2').

EM (70 eV) m/z 215 (M^+ , 23), 156 (95), 129 (100), 102 (1), 77 (3).

6.4.2.- (Z)-3-Dimetilamino-2-(naftalen-1-ilamino)-acrilato de metilo (13)



Siguiendo el método 4, se mezclaron 2 g (9.3 mmol) de 9 con 1.66 g (13.95 mmol) de DMADMF. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt 9:1). Obteniéndose 0.49 g (49%) de 13 como un sólido de color amarillo. R_f 0.32 (hexano/AcOEt 8:2); p.f. 186-188 °C (hexano/AcOEt 8:2).

IR (KBr): 3359, 1682, 1604, 1522, 1401, 1288, 1218, 1134, 1084, 772 cm^{-1} .

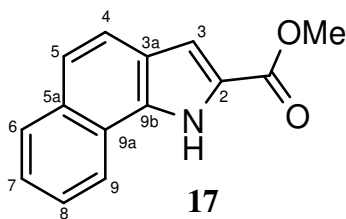
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 2.96 (s, 3H, NCH_3), 3.62 (s, 3H, CO_2CH_3), 5.36 (s, 1H, NH), 6.59 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-2'), 7.35-7.22 (m, 2H, H-4', H-3), 7.55-7.38 (m, 3H, H-3', H-6', H-7'), 7.83-7.75 (m, 1H, H-5'), 7.98-7.89 (m, 1H, H-8').

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3): δ 41.7 (NCH_3), 51.2 (CO_2CH_3), 98.3 (C2), 106.7 (C2'), 118.1 (C4'), 120.1 (C8'), 123.6 (C3), 124.6 (C8'a), 125.5 (C7'), 126.5 (C6'), 128.5 (C3'), 134.38 (C5'), 143.9 (C4'a), 145.69 (C1'), 169.4 (C1).

EM (70 eV) m/z 270 (M^+ , 26), 210 (81), 195 (100), 181 (13), 168 (38), 154 (16), 129 (11), 73 (6).

EMAR (IE, M^+) calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$: 270.13683 Observado: 270.136864.

6.4.3.- 1H-Benzo[g]indol-2-carboxilato de metilo (17).



Siguiendo el método 5, se mezclaron 0.8 g (2.96 mmol) de **13** con 1.2 g (8.8 mmol) de AlCl_3 y 8.0 ml de diclorometano. Se dejó reaccionar por 12 h, el residuo fue purificado mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10 g/g de muestra, (hexano/AcOEt 9:1), obteniéndose 0.3 g (37%) de **17** como un sólido de color amarillo. *R_f* 0.5 (hexano/AcOEt 8:2); p.f. 210-212 °C (hexano/AcOEt 7:3).

IR (KBr): 3320, 1696, 1515, 1446, 1336, 1215, 831, 801, 744, 669 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 3.90 (s, 3H, CO_2CH_3), 7.32 (s, 1H, H-3), 7.53 – 7.9 (m, 3H, H-5, H-7, H-8), 7.45 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-6), 7.95 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-9), 8.54 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4').

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ : 51.61 (CO_2CH_3), 110.3 (C-3), 121.7 (C-9a), 122 (C-4), 122.3 (C-5), 122.9 (C-8), 124.2 (C-7), 124.2 (C-6), 125.9 (C-9), 126.4 (C-2), 126.5 (C-3a), 129.1 (C-5a), 132.54 (C-9b), 162.1 (COO).

EM (70 eV) m/z 226 (M^+ , 40), 193 (100), 165 (76), 139 (18), 127 (1).

6.5 Evaluación de la actividad inhibitoria de los compuestos 6-17.

6.5.1- Material Químico.

(Naftalen-2 iloxi)-acetato de metilo (**6**), 3-Dimetilamino-2-(naftalen-2-iloxi)-acrilato de metilo (**10**), Naftol [2,1-b]furan-2-carboxilato de metilo (**14**), (Naftalen-1-iloxi)-acetato de metilo (**7**), 3-Dimetilamino-2-(naftalen-1-iloxi)-acrilato de metilo (**11**), Naftol [1,2-b]furan-2-carboxilato de metilo (**15**), (Naftalen-2-ilamino)-acetato de metilo (**8**), 3-dimetilamino-2-(naftalen-2-ilamino)-acrilato de metilo (**12**), 3H-Benzo[e]indol-2-carboxilato de metilo (**16**), (Naftalen-1-ilamino)-acetato de metilo (**9**), 3-Dimetilamino-2-(naftalen-1-ilamino)-acrilato de metilo (**13**), 1H-Benzo[g]indol-2-carboxilato de metilo (**17**). Los compuestos fueron solubilizados en etanol, y la concentración de etanol fue de 5% en todas las incubaciones.

6.5.2.- Material Biológico

6.5.2.1 Obtención de fracción microsomal.

Para la obtención de la fracción microsomal se utilizaron ratones de 25-30 gr los cuales se indujeron con 150 mg/kg pirazol en solución salina por tres días consecutivos, los cuales se sacrificaron 24 hrs después de la última administración Ranhnasto *et. al.* El pirazol se administró a fin de aumentar la producción de enzimas hepáticas. El uso de microsomas hepáticos de ratón como fuente de enzimas se justifica por el hecho de que la reacción de 7-hidroxilación de cumarina es llevada a cabo en forma selectiva por el enzima CYP2A5.

El procedimiento se describe a continuación:

La preparación y utilización del sobrenadante hígado de ratón se llevo a cavo a 9000g (S-9).

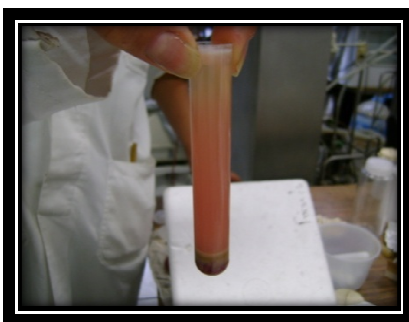
- ♦ Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.
- ♦ Asépticamente se quitaron los hígados de cuatro ratones. Los tejidos se lavaron en frio con buffer de fosfato de potasio estéril 0,1 M (pH 7,4). (Se añadió 120-175 ml de 0,1 M de KH_2PO_4 a 500 ml de 0,1 M K_2HPO_4 a pH 7,4). Se secaron con gasa estéril y pesaron.
- ♦ Añadir 2 volúmenes de 0,1 M buffer de fosfato de potasio (pH 7.4). Los hígados de ratón se cortaron en trozos con tijeras estériles.



- ♦ Homogeneizar (en hielo), si fue necesario, se dividió la preparación en porciones lo suficientemente pequeñas conforme el volumen del homogenizador y luego se mezclaron todas las porciones en un solo tubo.



- ♦ Se decantaron 30 ml en tubos para centrifugar.
- ♦ Se centrifugaron por 20 min a 9000 g a 4°C.
- ♦ Se retiró cuidadosamente el sobrenadante S-9 con pipeta estéril: evitando la capa de lípidos en la superficie. Se descartó el precipitado.
- ♦ Se mezclaron todos los sobrenadantes S-9 en un vaso de precipitado. Se colocaron alícuotas de 1 ml en tubos. Las alícuotas se mantuvieron a -70 °C.



6.5.2.2 Reacción de hidroxilación de cumarina.

Los ensayos se llevaron a cabo con la fracción microsomal de la cepa C57BL/6J, obtenida en la Central de Espectroscopia de Biotecnología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en solución buffer (pH 7,4) de Tris-HCl 25 mM a 37 ° C, agitando con 1 mM NADPH. Para cada sustrato, los experimentos preliminares se realizaron para determinar si la formación de producto es lineal con respecto al tiempo, y

las concentraciones de proteínas microsomales. El porcentaje de conversión del sustrato no superó el 15% del total añadido.

Ensayo 7-Hidroxilación de cumarina

El volumen de incubación contenía 25 mM de una solución buffer (pH 7,4) de Tris-HCl, 0-20 μ M de cumarina, 0.2 mg/ml de proteínas microsomales y 1 Mm de NADPH. La reacción fue iniciada por la adición de NADPH, se incubó a 37 °C durante 10 min. y se detuvo con la adición de CH₂Cl₂/ AcOEt 1:1, la mezcla obtenida se agitó por 10 min. (1500 g), posteriormente se realizó la extracción del producto. Las muestras se reconstituyeron con 300 μ L de metanol 30% antes de ser inyectadas en HPLC (columna ODS dp 5 μ ; 4.6 mm X 25 cm; UV 320 nm; ACN / agua / ácido acético (25:75:0.1, v / v / v) en 1 ml / min). La formación del metabolito se identifico a partir de una curva estándar de una concentración conocida del metabolito (7-hidroxycumarina).

6.5.2.3 Desarrollo del método analítico

Con base en la literatura se decidió utilizar una fase móvil ACN / agua / ácido acético (25:75:0.1, v / v / v), buscando definir la composición más adecuada para la fase móvil y el flujo de la columna. La linealidad del método se determinó por medio de una curva de calibración con concentraciones entre 1-4 μ M, cada una analizada por triplicado de 7-HC.

Se solubiliza 1 mg. 7-HC en 10 ml de metanol, esta solución se lleva a las concentraciones antes mencionadas.

Con los datos se determinó:

- ♦ La ecuación de la recta (pendiente e intervalo).
- ♦ El coeficiente de correlación r, coeficiente de determinación r^2 .
- ♦ Coeficiente de variación (C.V.).

Tabla 5. Áreas obtenidas en linealidad del método

x[μ M]	y (absorbancia)
1	0.08
1	0.09
1	0.08
2	0.19
2	0.18
2	0.18
3	0.26
3	0.28
3	0.28
4	0.38
4	0.37
4	0.38

Tabla de área promedio	
x[μ M]	y (absorbancia)
1	0.082
2	0.18
3	0.27
4	0.38

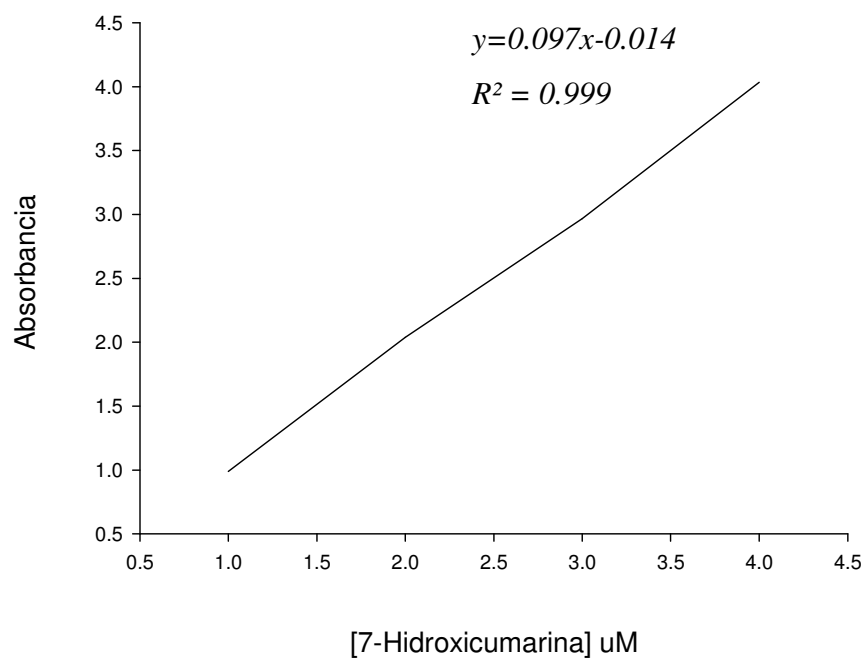
Tabla 6. Cálculos estadísticos en linealidad del método

Muestra	x[μ M]	y (absorbancia)	x ²	y ²	f(x/y)
1	1	0.082	1	0.007	0.082
2	1	0.085	1	0.007	0.085
3	1	0.078	1	0.006	0.078
4	2	0.188	4	0.035	0.377
5	2	0.184	4	0.034	0.368
6	2	0.179	4	0.032	0.357
7	3	0.263	9	0.069	0.789
8	3	0.281	9	0.079	0.844
9	3	0.277	9	0.077	0.831
10	4	0.382	16	0.146	1.527
11	4	0.373	16	0.139	1.493
12	4	0.377	16	0.142	1.508
Σ	30	2.751	90	0.77	8.34
				Promedio f =	0.69511
				Desv. Estándar f =	0.563276785

b1=	0.072
b0=	0.047
r ² =	0.987
sb1=	0.0026
sy/x=	0.00997
sb0=	0.00705
CV y/x=	4.4
LC	1.39

Gráfica de Linealidad del método

Curva de calibración



Precisión

Se evaluó la repetibilidad del método y la reproducibilidad.

La repetibilidad del método se determinó analizando por triplicado cuatro soluciones que contenían el 100% de la concentración de trabajo por un mismo analista en un mismo día.

La reproducibilidad se determinó analizando en sextuplicado una solución que contenía el 100% de la concentración de trabajo, en diferentes días.

Sensibilidad

Se determinó el límite de detección (L.D.)

Para determinar este parámetro se prepararon soluciones con concentraciones conocidas, analizándolas cada una por triplicado.

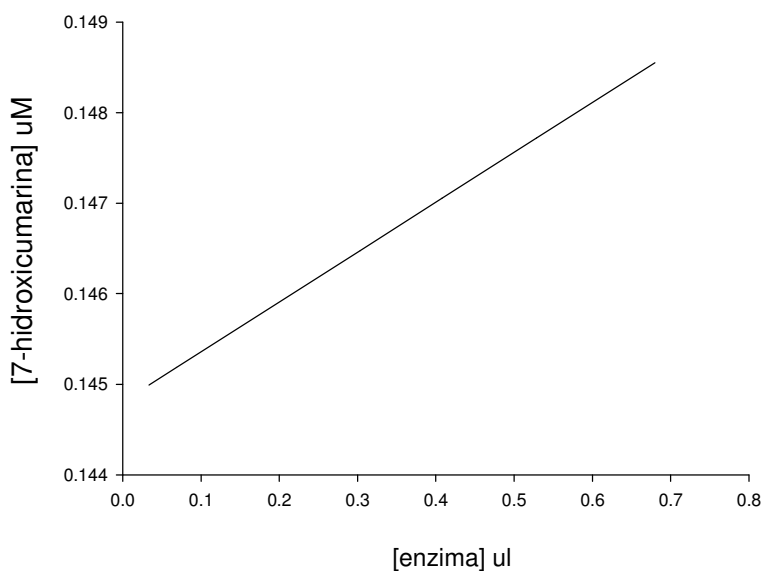
Efecto de la concentración del enzima sobre la concentración del sustrato.

Se realizó la variación de concentración de enzima de 25-150 μl de fracción microsomal en 1 ml de solución Tris-HCl, se utilizó una concentración constante de sustrato (cumarina) (18 μM), utilizando la misma metodología de reacción de la 7-Hidroxycumarina a pH y temperatura constantes.

Tabla 7. Áreas obtenidas

x[enzima] μl	[μM]	Y	X
25	18	0.034	0.144
50	18	0.069	0.145
75	18	0.30	0.146
100	18	0.41	0.147
125	18	0.53	0.147
150	18	0.68	0.1485

Efecto de la concentración de enzima



6.5.2.4 Ensayo *in vitro* de inhibición de CYP2A5.

Ensayo con ésteres 6-9.

Bajo las condiciones descritas para el ensayo, los resultados del análisis por HPLC para el caso del compuesto **9**, se identificaron tres picos los cuales representan a 7-HC, Cumarina y 1-Naftilaminoacetato de metilo con tiempos de retención de 6.64, 13.48 y 21.91 min respectivamente.

A partir de los datos de absorbancia de 7-HC y con las concentraciones del compuesto a evaluar, se realiza el cálculo para la obtención del % de inhibición (Tabla 8) y la CI₅₀ datos estadísticos presentados en el anexo 2.

Tabla 8. Datos utilizados para calcular el porcentaje de inhibición ocasionada por **9**.

[compuesto] μM	[7-Hidroxicumarina] μM	% inhibición	% actividad
0	4.22	0	100
45	2.71	45.14	54.86
50	2.79	43.57	56.43
60	2.80	43.29	56.71
65	2.81	43.16	56.84
150	1.36	72.45	27.55
250	1.25	74.76	25.24
350	1.15	76.79	23.21
500	1.14	76.93	23.07

Ensayo con enaminonas 10-13

Siguiendo la metodología establecida para los ésteres, se realizó el ensayo de inhibición enzimática por las enaminonas, utilizando 20-500 μM de (Z)-3-Dimetilamino-2-(2-naftilamino) acrilato de metilo (**12**), identificando tres picos correspondientes a 7-HC, Cumarina y compuesto **12**.

Se obtuvieron datos de absorbancia para el cálculo del % de inhibición (Tabla 9) y CI_{50} .

Tabla 9. Datos utilizados para calcular el porcentaje de inhibición ocasionada por **12**.

[compuesto] μM	[7-Hidroxicumarina] μM	% inhibición	% actividad
0	2.48	0	100
20	0.93	81.2	18.8
30	0.97	80.4	19.6
40	1.38	72.0	28.0
55	0.80	83.8	16.2
110	0.68	86.2	13.8
250	0.56	88.6	11.4
500	0.54	89.1	10.9

Ensayo con índoles y benzofuranos 14-17

Siguiendo la metodología establecida para los ésteres, se realizó el ensayo de inhibición enzimática por las enaminonas, utilizando 27-250 μM de Naftol [2,1-*b*] furan-2-carboxilato de metilo (**14**), identificando tres picos correspondientes a 7-HC, Cumarina y compuestos **14**.

Se obtuvieron datos de absorbancia para el cálculo del % de inhibición (Tabla 10) y CI_{50} .

Tabla 10. Porcentaje de inhibición de **14**.

[compuesto] μM	[7-Hidroxicumarina] μM	% inhibición	% actividad
0	2.48	0.00	100
25	1.14	76.89	23.11
30	1.15	76.68	23.32
40	1.14	76.97	23.03
45	1.13	77.10	22.90
150	0.91	81.65	18.35
250	0.92	81.34	18.66

7. BIBLIOGRAFIA

1. American Collage of Chest Physician, American Thoracic Society, Asia Pacific Society of Respirology, Canadian Thoracic Society, European Respiratory Society, International. Smoking and health: a physician's responsibility. A statement on the joint committee on smoking and health. *Eur. Respir. J.*, 8:1808-1811 (1995).
2. Rabines J. A. O. Factores de riesgo para el consumo del tabaco en una población de adolescentes escolarizados. *Tesis UNMSM*.
3. Raunio H., Pokela N., Puhakainen K., Rahnasto M., Mauriala T., Auriola S., Juvonen R.O. Nicotine metabolism and urinary elimination in mouse: *in vitro* and *in vivo*. *Xenobiotica*, Vol. 38, No.- 1, 2008, 34-47.
4. Tyndale R. F. and Sellers M. E. Variable CYP2A6-Mediated nicotine metabolism alters smoking behavior and risk. *Drug. Metab. Rev.*, 2001 29:548-552.
5. Sansores H. R., D, Venegas R. A., Martínez E. M., Sandoval A. R. Tratamientos para dejar de fumar, disponibles en México. *Sal. Púb. Méx.* 2002 vol.44, suplemento 1.
6. Conyer T. R., Morales K. P., Gutiérrez M. J. Panorama epidemiológico del Tabaquismo en México. *Sal. Púb. Méx.* 2001 vol. 43.
7. Kuri M.P.A., González R. J.F., Hoy M.J., Cortés R. M. Epidemiología del tabaquismo en México. *Sal. Púb. Méx.* 2006 vol.48, suplemento 1.
8. Lara R. G. A., Espinosa M. A. M., Sansores H.R., Morales R. N., Ramírez V. A. Conocimientos de un grupo de médicos mexicanos sobre tratamiento farmacológico para dejar de fumar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* Vol. 15-número 3. Sep 2002 pp. 143-148.
9. Villalbí J. El tabaco como problema de salud pública. *Informe Sespas* 2002.
10. Sampablo L. I., Angrill P.J. Actualización en el tratamiento del tabaquismo. *Arch Bronconeumol* 2004 40(3):123-32.
11. Sáiz M.P.A., Portilla G.G.P., Martínez B.S., Bascarán F.T., Paredes O.B., Bobes G.J. Tratamiento farmacológico. Psicofármacos. *Adicciones* (2004), Vol. 16, Supl. 2
12. Benwell E.M.M., Balfour J.K.D. The influence of lobeline on nucleus accumbens dopamine and locomotor responses to nicotine in nicotine-pretreated rats. *J Pharmacol* (1998) 125, 1115 - 1119.
13. Segovia J. Resúmenes de los ensayos clínicos presentados en la 53 Sesión Científica Anual del American College of Cardiology. *Rev Esp Cardiol* 2004;57(5):417-32.
14. Allende S. Nicotina y Adicción un enfoque molecular del tabaquismo. *Facultad de Ciencias Médicas*.
15. Siu E.C.K., Tyndale R.F. Non-Nicotinic Therapies for Smoking Cessation. *Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007. 47:541-64.
16. Hukkanen J., Jacob P., Benowitz L.N. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 2005 57:79-115.
17. Messina E.S., Tyndale R.F., Sellers E.M. A Major Role for CYP2A6 in Nicotine C-Oxidation by Human Liver Microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1608-1614, 1997.

-
18. Oscarson M. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug. Metab.* **2001** 29:91–95.
 19. Sellers E.M., Kaplan H.L., Tyndale R.F. Inhibition of cytochrome P450 2A6 increases nicotine's oral bioavailability and decreases smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**.
 20. Zhang W., Kilicarlan T., Tyndale F. R, and Sellers M. E. Evaluation of Methoxsalen, Tranlycypromine, and Tryptamine as Specific and Selective CYP2A6 Inhibitors in Vitro. *Drug Metab Dispos. Rev.* **2001** 26:897–902.
 21. Fujita K., Kamataki T. Screening of organosulfur compounds as inhibitors of human CYP2A6. *Drug Metab Dispos.* **2001**. 29:983-989.
 22. Rahnasto M., Raunio H., Poso A., Wittekindt C., Juvonen O.R. Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis of Inhibitors of the Nicotine Metabolizing CYP2A6 Enzyme. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 440-449.
 23. Stephen S.H. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Pharmacol Exp Ther*, Volume 91, Number 14 Pp. 1194-1210. **1999**.
 24. Karaconji B.I. Facts about nicotine toxicity. *Arh Hig Rada Toksikol.* **2005** Dec; 56(4):363-71.
 25. Orive G.J.I, Reina S.S., Esteban J.J., Trullén P.A., Ferrero B.M.,C.A., Ruiz J. De la neurobiología de la adicción a la nicotina al tratamiento del tabaquismo. *Progresos terapéuticos. Prevención del tabaquismo* vol. 8 núm. 3 **2006**.
 26. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther* April **2008**. Vol. 83 number 4.
 27. Campos A.A. Dependencia de nicotina, aproximación a su manejo farmacológico. *Revista colombiana de psiquiatría* **2002** vol. XXXI No-1.
 28. Torrecilla G.M., Barrueco F.M., Jiménez R., Hernández M., González B. Ayudar al fumador. Tratar el tabaquismo. *Medifam.* **2001**. Vol. 11. Num. 4.
 29. Jiménez T. L., Bascarán F. T., Portila G. G.P., Sáiz M. P.A., Bousoño M. La nicotina como droga. *Adicciones* **2004**, Vol. 16, Supl. 2.
 30. Bao Z., Yang H.X., Ding X., Prabhu S., and Hong J.Y. Metabolism of nicotine and cotinina by human cytochrome P450 2A13. *Drug Metab Dispos.* Vol. 33: 258-261, **2005**.
 31. Chamizo M., Muñoz N.A., Psicofarmacología de la nicotina y conducta adictiva. *Trastornos Adictivos* **2005**;7(3):137-52.
 32. Isomura S., Wirsching P., Janda D.K. An Immunotherapeutic Program for the Treatment of Nicotine Addiction: Hapten Design and Synthesis. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66 (12), 4115-4121.
 33. Sang B. P., Jacob P., Benowitz N.L, Cashman R.J. Stereoselective Metabolism of (S) -(-) -Nicotine in Humans: Formation of trans-(S)-(-)-Nicotine N-1'-Oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**,6, 880-888.
 34. Stratton K., Shetty P., Wallace R., Bondurant S. Clearing the Smoke: Assessing the Science Base for Tobacco Harm Reduction. *Nat. Acad. Press Washington*, **2001** D.C. ISBN: 0-309-51184-4, 656 pages.
 35. Barrueco F., Hernández M., Torrecilla García. Manual de Prevención y Tratamiento del tabaquismo. **2006** *GlaxoSmithKline, S.A.*
-

-
36. Tutka P., Mosiewicz J., Wielosz M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacological Reports*. **2005**, 57, 143-153.
 37. Fernández A.L. La nicotina como factor de riesgo en patología vascular. *Anales de cirugía y vascular*, **2003**; 9(1): 18-47.
 38. Desiree D.E. Analysis of the possible therapeutic use of CYP2A6 inhibition with methoxalen in smoking cessation. Department of Pharmacology, University of Toronto. **2001**.
 39. Peamkrasatam S., Sriwatanakul K., Kiyotani K., Fujieda M., Yamazaki H., Kamataki K., Yoovathaworn K. In vivo evaluation of coumarin and nicotine as probe drugs to predict the metabolic capacity of CYP2A6 due to genetic polymorphism in thais. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 21 (6): 475-484, **2006**.
 40. Moyer P.T, Charlson R.J., Enger J.R., Dale C.L., Ebbert O.J., Schroeder R.D., Hurt D.R. Simultaneous Analysis of Nicotine, Nicotine Metabolites, and Tobacco Alkaloids in Serum or Urine by Tandem Mass Spectrometry, with Clinically Relevant Metabolic Profiles. *Clinical Chemistry* 48, No. 9, **2002**.
 41. Nakajima M., Tsuyoshi Y. Interindividual Variability in Nicotine Metabolism: C-Oxidation and Glucuronidation. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* **2005**. 20 (4): 227-235.
 42. Park B.S., Jacob P., Benowitz L.N., Cashman R.J. Stereoselective Metabolism of (S)-(-)-Nicotine in Humans: Formation of trans-(S)-(-)-Nicotine N-1'-Oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, 6, 880-888.
 43. Turpeinen M. Cytochrome P450 enzymes in vitro, in vivo and in silico studies. *Acta Univ. Oul.* **2006**. D 895.
 44. Trullén P.A., Bartolomé C.B., Barrueco M., Herrero I., Jiménez C.A.. Nuevas perspectivas en el diagnóstico y evolución del consumo de tabaco: marcadores de exposición. *Prevención del tabaquismo* vol. 8 nº 4, **2006**.
 45. Kitagawa K., Kunugita N., Kitagawa M., Kawamoto T. CYP2A6*6, a Novel Polymorphism in Cytochrome P450 2A6, Has a Single Amino Acid Substitution (R128Q) That Inactivates Enzymatic Activity. *J Pharmacol Exp Ther*, February 16, **2001**.
 46. San Cornelio G.J.M., Fernández B.J., San Cristóbal de Lorenzo S.E. Tratamiento psicofarmacológico de la dependencia nicotínica. *Gac Med Bilbao* **2000**; 97: 87-92.
 47. Eric T., Miquin L. R., Ernst M., Lud C. J., Pickworth B.W., Heishman S. J., Schroeder R.J. Safety and efficacy of the nicotine Patch and gum for the treatment of adolescent tobacco addiction. *Pediatrics*. Vol.115, No-4, **2005**.
 48. Barbado A. J.A., Cañones G. P.J., Fernández C.A., Goncalves E. F., Rodríguez S. J.J., De la Serna, J. M., Vola C. Trastornos por sustancias de abuso (I): Tabaquismo. *Medicina*, **2002**; 46: 617-621
 49. Centro Regional de Farmacovigilancia de Castilla y León. Boletín. Número diecinueve. Diciembre **2003**.
 50. McRobbie H., Thornley S. La importancia de tratar la dependencia tabáquica. *Rev Esp Cardiol* **2008**; 61: 620 – 628.
 51. Foulds J. The neurobiological for partial agonist treatment of nicotine dependence: varenicline. *Journal compilation*. May **2006**, 60, 5, 571–576.
 52. Siu E.C.K. Tyndale R.F. Non-nicotinic therapies for smoking cessation. *Rev. Pharmacol Toxicol.* **2007**. 47:541-64.
-

-
53. Wayne D. Hall. Will Nicotine Genetics and a Nicotine Vaccine Prevent Cigarette Smoking and Smoking-Related Diseases? *PLoS Medicine*. 2005. Volume 2. Issue 9.
 54. Gourlay SG, Stead LF, Benowitz N. Clonidine for smoking cessation (Review). *The Cochrane Library*. 2009, Issue 1.
 55. Hutchison K.E., Monti M.P., Rohsenow D.J., Swift R.M., Colby M.S., Maryann Gnyes M., Niaura S.R., Sirota D.A. Effects of naltrexone with nicotine replacement on smoking cue reactivity: preliminary results. *Psychopharmacology*. Volume 142, Number 2 / febrero de 1999.
 56. Fowler J.S., Volkow N.D., Wang G.J., Pappas N., Logan J., Macgregor R., Alexoff D., Shea C., Schlyer D., Wolf A.P., Warner D., Zezulkova I., Cilento R. Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. *Nature* 379, 733 - 736 (22 February 1996).
 57. Zhang W., Carter P.A., Shaw J., Chernet E., Phebus L., Wong D.T., Perry W.K. Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. *Psychopharm*. Vol. 160, num. 4. Abril 2002.
 58. Kandel B.D., Mei-Chen Hu, Schaffran C., Udry R.J., and Benowitz L.N. Urine Nicotine Metabolites and Smoking Behavior in a Multiracial/Multiethnic National Sample of Young Adults. *Am J Epidemiol* 2007;165:901–910.
 59. O'Loughlin J., Paradis G., Kim W., Difranza J., Meshefedjian G., McMillan D.E., Wong S., Hanley J., Tyndale R.F. Genetically decreased CYP2A6 and the risk of tobacco dependence: a prospective study of novice smokers. *Tabacco control* 2004; 13: 422-428.
 60. Ariyoshi N., Miyamoto M., Umetsu Y., Kunitoh H., Dosaka A. H., Sawamura Y., Yokota J., Nemoto N., Sato K., Kamataki T. Genetic polymorphism of CYP2A6 gene and tobacco-induced lung cancer risk in male smokers. *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention*. Vol. 25, 890-894, 2002.
 61. Oscarson M, Gullstén H, Rautio A, Bernal ML, Sinues B, Dahl ML, Stengård JH, Pelkonen O, Raunio H, Ingelman-Sundberg M. Genotyping of human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6), a nicotine C-oxidase. *Febs Lett*. 1998 Nov 6; 438(3):201-5.
 62. Kiyotani K, Yamazaki H, Fujieda M, Iwano S, Matsumura K, Satarug S, Ujjiin P, Shimada T, Guengerich FP, Parkinson A, Honda G, Nakagawa K, Ishizaki T, Kamataki T. Decreased coumarin 7-hydroxylase activities and CYP2A6 expression levels in humans caused by genetic polymorphism in CYP2A6 promoter region (CYP2A6*9). *Pharmacogenetics*. 2003 Nov; 13(11):689-95.
 63. Kyoko Kitagawa K., Naoki Kunugita N., Masatoshi Kitagawa M, Kawamoto T. CYP2A6*6, a Novel Polymorphism in Cytochrome P450 2A6, Has a Single Amino Acid Substitution (R128Q) That Inactivates Enzymatic Activity. *The J of Biol Chem*. Vol. 276, No. 21, 2001. Issue of May 25, pp. 17830–17835.
 64. Yano K.J., Denton T.T., Cerny A.M., Zhang X., Johnson F.E., Cashman R.J. Synthetic Inhibitors of Cytochrome P-450 2A6: Inhibitory Activity, Difference Spectra, Mechanism of Inhibition, and Protein Cocrystallization. *J. Med. Chem*. 2006, 49, 6987-7001.
 65. Rahnasto M., Wittekindt C., Juvonen R.O., Turpeinen M., Petsalo A., Pelkonen O., Poso A., Stahl G., Ho"ltje H-D., Raunio. Identification of inhibitors of the nicotine

-
- metabolising CYP2A6 enzyme an in silico approach. *The Pharmacol Journal* (2008) 8, 328–338.
66. Yano H.J., Hsu M., Griffin J.K., Stout D.C., Johnson F.E. Structures of human microsomal cytochrome P450 2A6 complexed with coumarin and methoxsalen. *Nature structural and molecular biology*. Vol. 12 No. 9, 2005.
67. Castro R.F., Violán S.J., Gallego R.J.C. Variabilidad genética en la susceptibilidad y en la gravedad de la neumonía. *Arch Bronconeumol*. 2005;41(Supl 5):21-9
68. Nakajima M., Yoshida R., Fukami T., Mcleod H. L., Yokoi T. Novel human CYP2A6 alleles confound gene deletion analysis. *Febs Letters* 569, 2004, 75-81.
69. Glisovic T., Söderberg M., Christian K., Lang M., Raffalli M.F. Interplay between transcriptional and post-transcriptional regulation of CYP2A5 expression. *Biochem Pharmacol* 65, 2003, 1653-1661.
70. Rao Y., Hoffmann E., Zia M., Bodin L., Zeman M., Sellers E.M., Tyndale R.F. Duplications and defects in the CYP2A6 gene: identification, genotyping, and in vivo effects on smoking. *Mol. Pharmacol*. 58:747-755, 2000.
71. Rautio A. Polymorphic CYP2A6 and its clinical and toxicological significance. *The J Pharmacogenomics* (2003) 3, 6–7
72. Minematsu N., Nakamura H., Furuuchi M., Nakajima T., Takahashi S., Tateno H., Ishizaka A. Limitation of cigarette consumption by CYP2A6*4, *7 and *9 polymorphisms. *Eur Respir J* 2006; 27: 289–292.
73. Fujieda M., Yamazaki H., Saito T., Kiyotani K., Gyamfi A. M., Sakurai , Dosaka H., Sawamura Y., Yokota J., Kunitoh H., Kamataki T. Evaluation of CYP2A6 genetic polymorphisms as determinants of smoking behavior and tobacco-related lung cancer risk in male Japanese smokers. *Carcinogenesis* vol.25 no.12 pp.2451--2458, 2004.
74. Yoshida R., Nakajima M., Watanabe Y., Kwon JT., Yokoi T. Genetic polymorphisms in human CYP2A6 gene causing impaired nicotine metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 2002 Nov; 54(5):511-7.
75. Haberl M, Anwald B, Klein K, Weil R, Fuss C, Gepdiremen A, Zanger UM, Meyer UA, Wojnowski L. Three haplotypes associated with CYP2A6 phenotypes in Caucasians. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Sep; 15 (9):609-24.
76. Oscarson M., Roman A. McLellan A.R., Gullstén H., Agúndez A.G.J., Benítez J., Rautio A., Raunio H., Pelkonen O., Sundberg I.M. Identification and characterisation of novel polymorphisms in the CYP2A locus: implications for nicotine metabolism. *Febs Letters* 460 (1999) 321-327.
77. Yamanaka H., Nakajima M., Fukami T., Sakai H., Nakamura A., Katoh M., Takamiya M., Yasuhiro Aoki Y., Tsuyoshi Yokoi T. CYP2A6 and CYP2B6 are involved in nornicotine formation from nicotine in humans: interindividual differences in these contributions. *Drug Metab Dispos*. 33:1811–1818, 2005.
78. Juvonen R.O., Gynther J., Pasanen M., Alhava E., Poso A. Pronounced differences in inhibition potency of lactone and non-lactone compounds for mouse and human coumerin 7-hydroxylase (CYP2A5 and CYP2A6). *Xenobiotica*, 2000, vol. 30, No-1, 81-92.
79. Rahnasto M., Raunio H., Poso A., Juvonen R.O. More potent inhibition pf human CYP2A6 than mouse CYP2A5 enzyme activities by derivates of phenylethylamine and benzaldehyde. *Xenobiotica*, 2003, vol. 33, No- 5, 529-539.
-

-
80. Asikainen A., Tarhanen J., Poso A., Pasanen M., Alhava E., Juvonen O.R. Predictive value of comparative molecular field analysis modelling of naphthalene inhibition of human CYP2A6 and mouse CYP2A5 enzymes. *Toxicology in Vitro* 17. **2003**. 449–455.
 81. Hirano Y., Mizutani. T. Study of inhibition of CYP2A6 by some drugs derived from quinoline. *Pharmacy and Pharmacol.* **2003**, 55: 1667-1672.
 82. Wagaw S., Yang B.H., Buchwald S.L. A Palladium-Catalyzed Strategy for the Preparation of Indoles: A Novel Entry into the Fischer Indole Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 6621-6622.
 83. Madelung, W.; **912**, 45, 1128.
 84. C. D. Nenitzescu, *Bull. Soc. Chim. Romania* **11**, 37 (1929).
 85. Kadieva M.G., Oganessian E.T. Methods for the synthesis of benzofurano derivatives (Review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Vol. 33. No. 11, **1997**.
 86. a) M. Del Carmen Cruz, J. Tamariz. *Tetrahedron*, 61 (2005) 10061-10072. b) M. Del Carmen Cruz, J. Regioselective and Versatile Synthesis of Indoles via Intramolecular Friedel-Crafts Heteroannulation of Enaminones. *Synlett*. 2006; 17 (5)
 87. Prodeep Phukan, Jakkam Madan Mohan and Arumugam Sudalai. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 3685-3689.
 88. Benjamin J. Stokes, Huijun Dong, Brooke E. Leslie, Ashley L. Pumphrey and Tom G. Driver*. Intramolecular C-H Amination Reactions: Exploitation of the Rh₂(II)-Catalyzed Decomposition of Azidoacrylates. *J. Chem. Soc.* **2007**, 129, 7500-7501.
 89. Higashi. Inhibitory Effects of Neurotransmitters and Steroids on Human CYP2A6. *Drug Metab Dispos.* 35:508–514, **2007**.

ANEXO 1

ESPECTROS

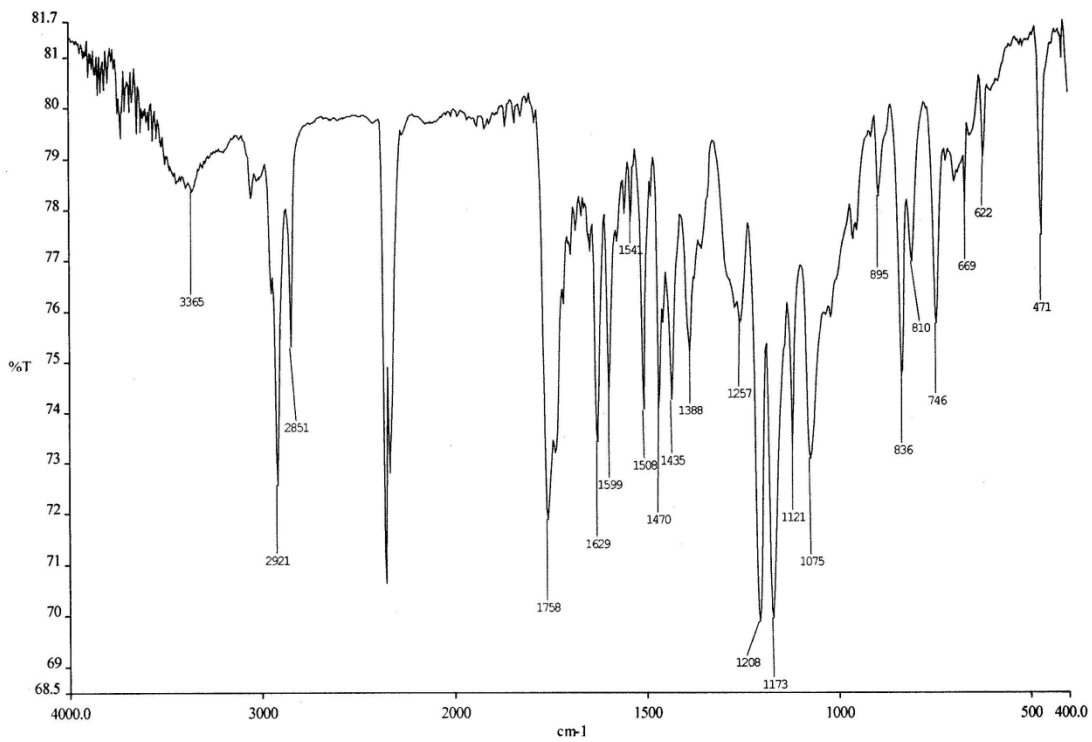


Figura 1. Espectro de IR de 6.

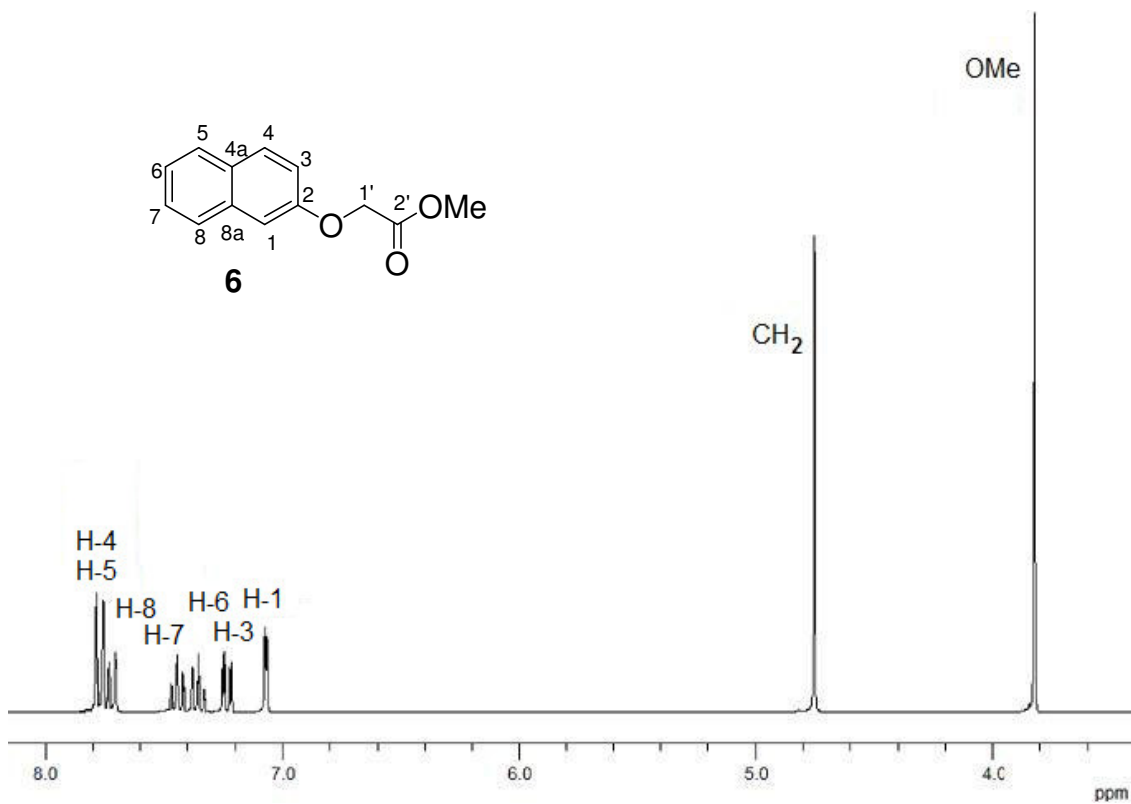


Figura 2. Espectro de RMN ^1H de 6 (300 MHz, CDCl_3).

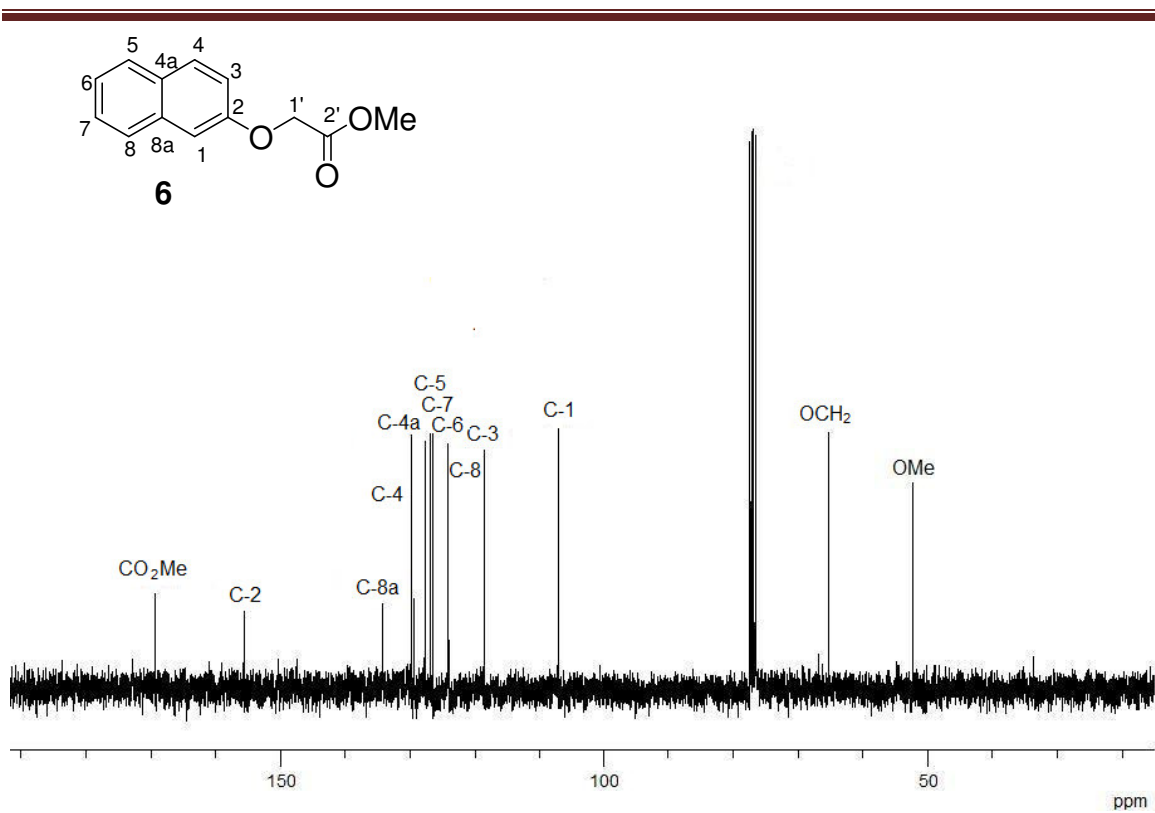


Figura 3. Espectro de ¹³C de **6**.

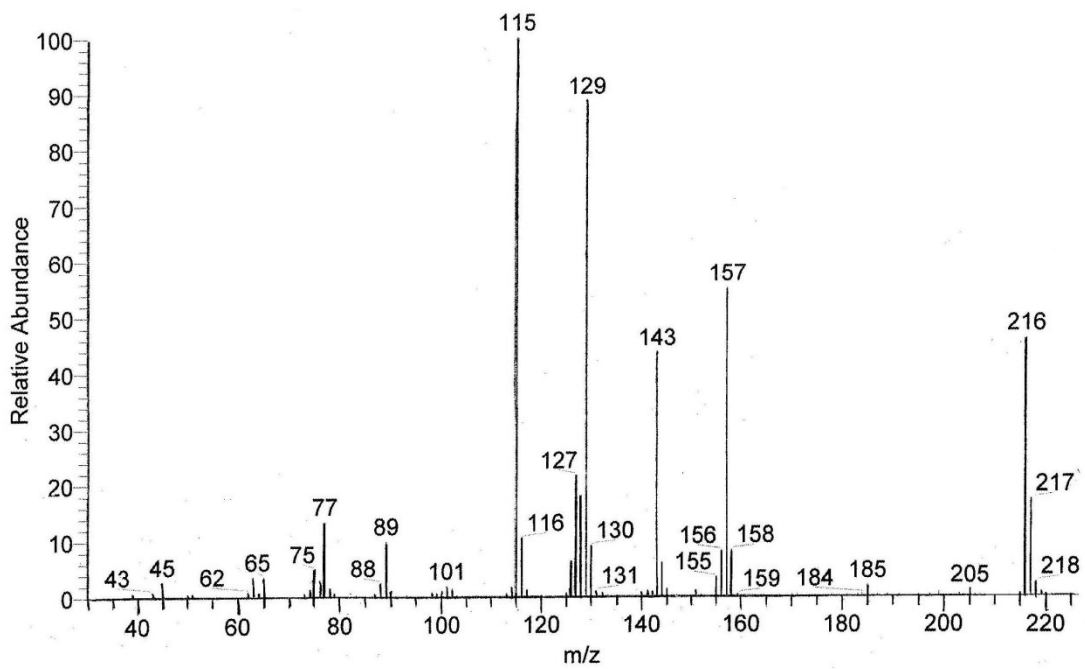


Figura 4. Espectro de Masas de **6**.

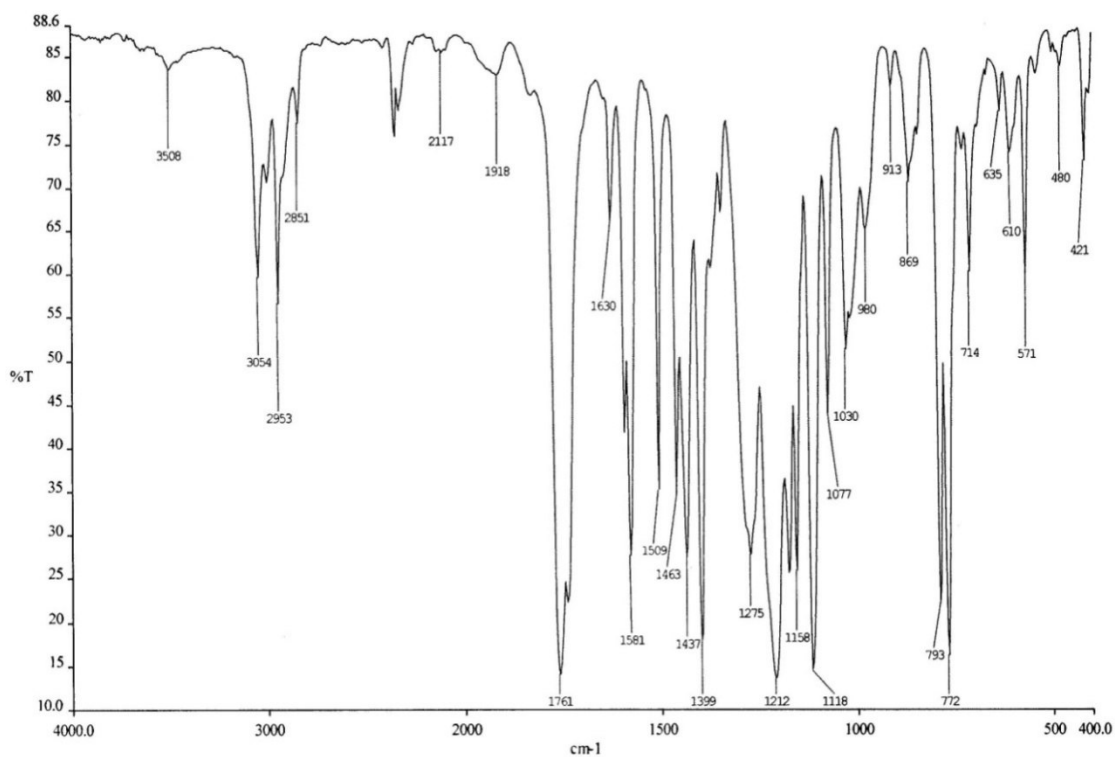


Figura 5. Espectro de IR de 7.

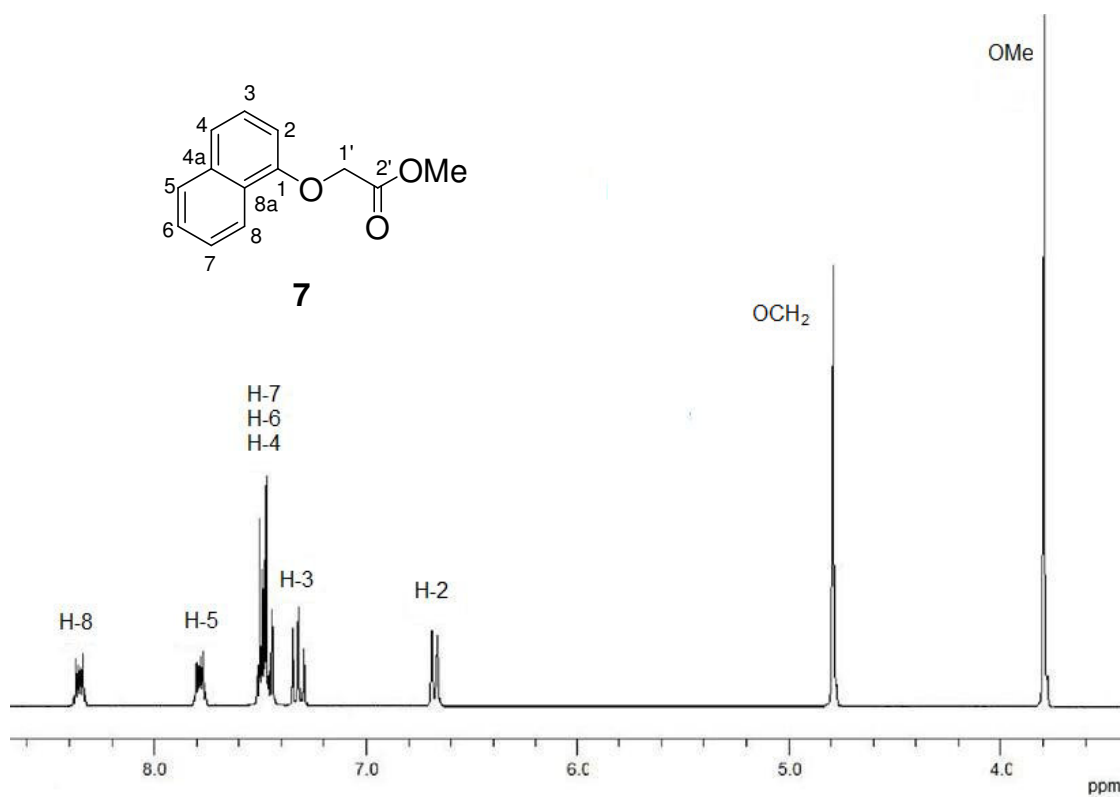


Figura 6. Espectro de RMN ^1H de 7 (300 MHz, CDCl_3)

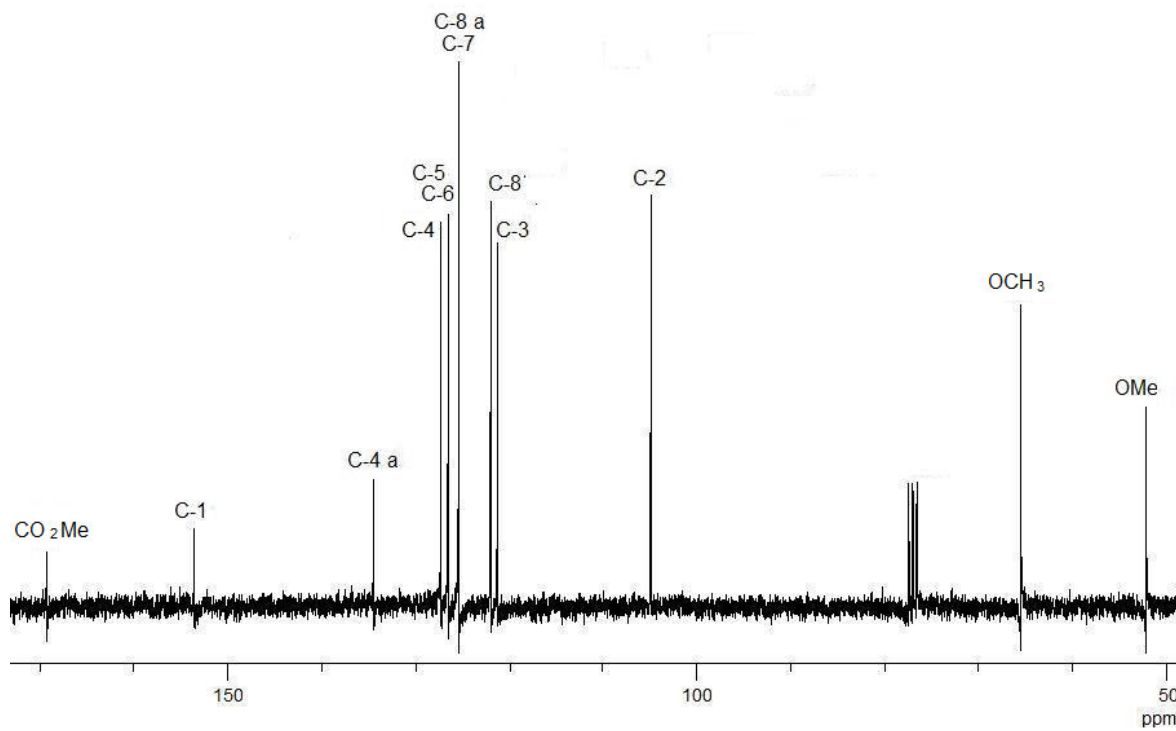


Figura 7. Espectro de ^{13}C de 7.

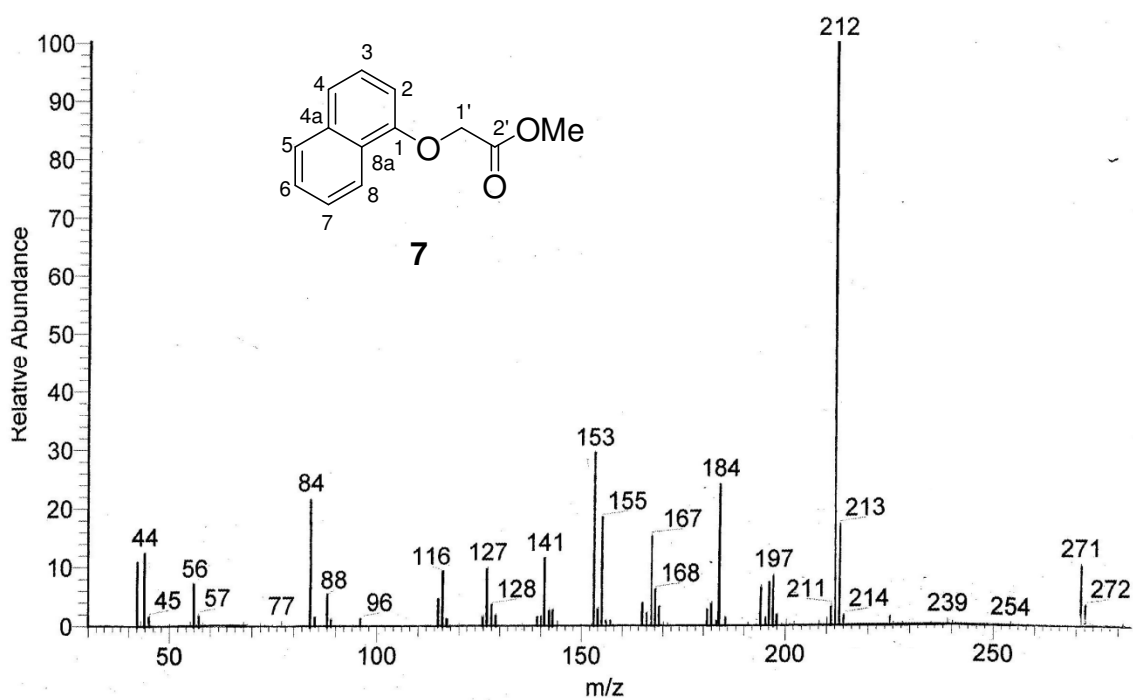


Figura 8. Espectro de Masas de 7.

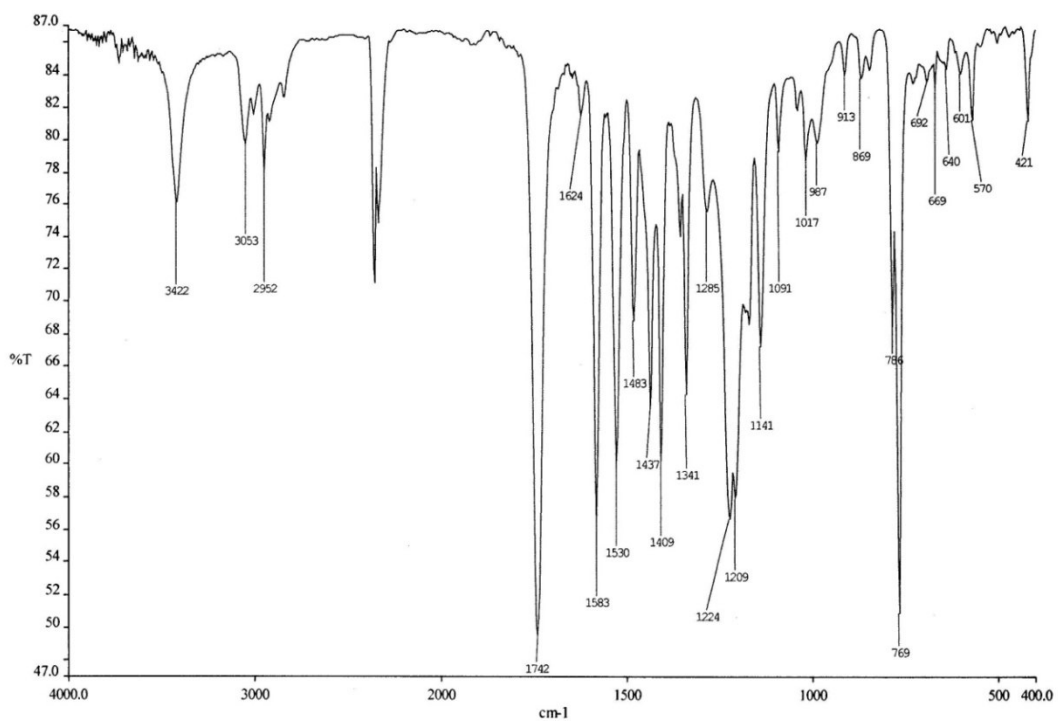


Figura 9. Espectro de IR de **8**.

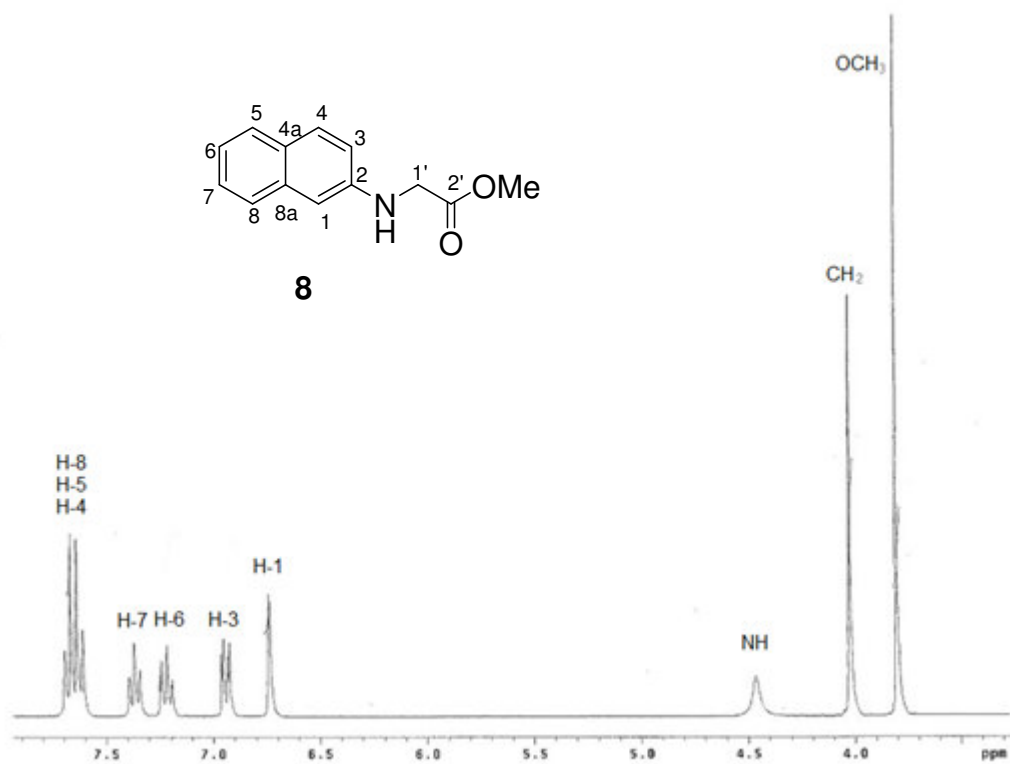


Figura 10. Espectro de RMN ^1H de **8** (300 MHz, CDCl_3).

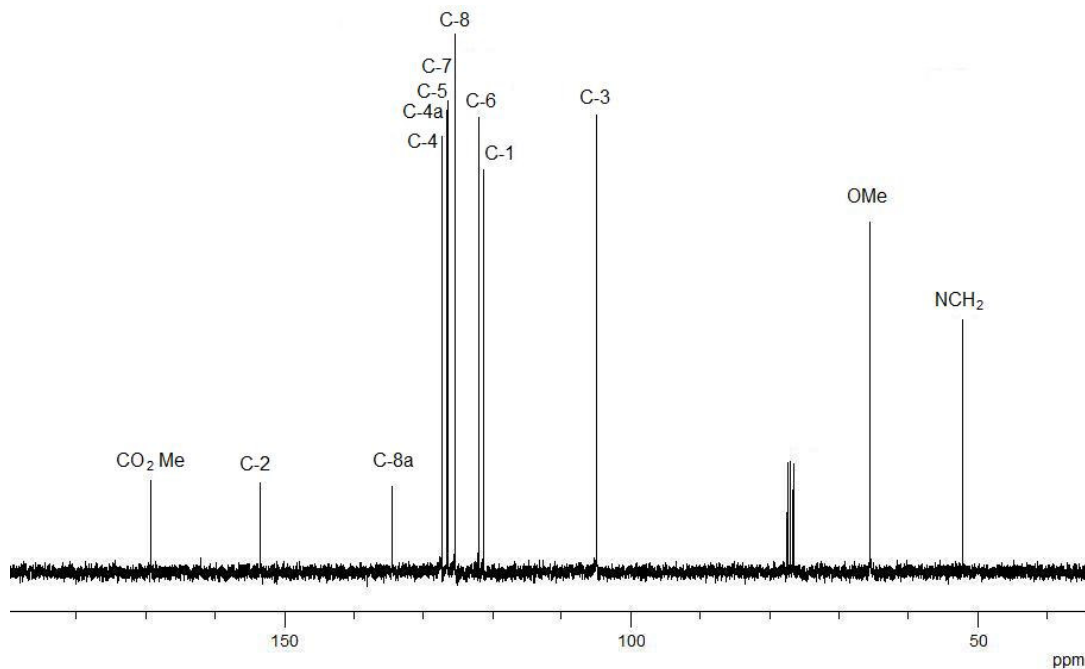


Figura 11. Espectro de ¹³C de 8.

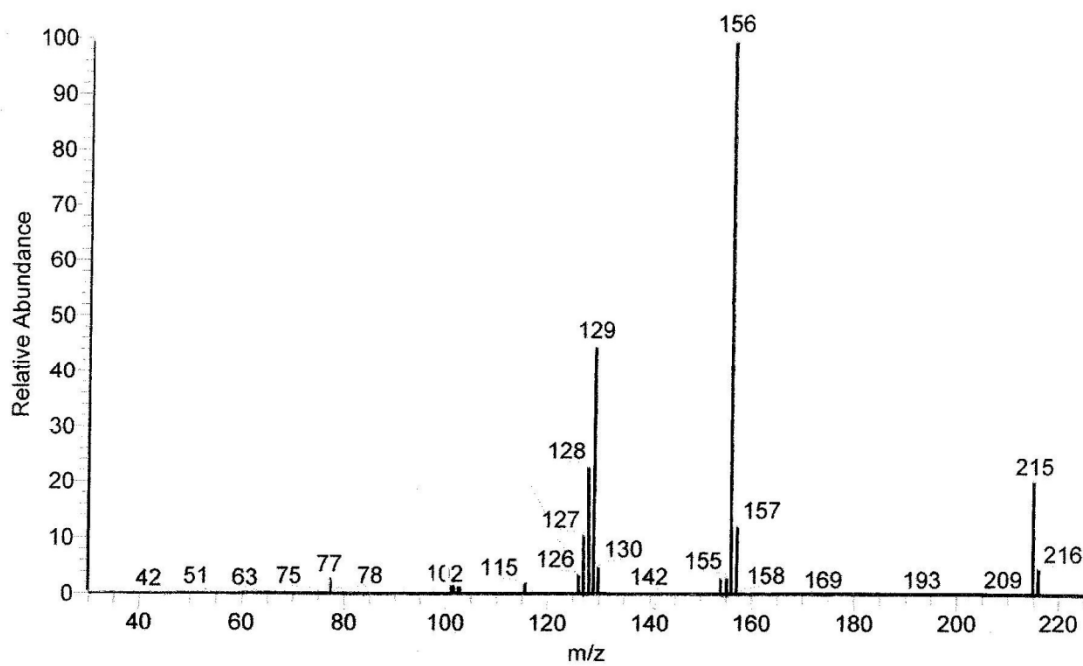


Figura 12. Espectro de Masas de 8.

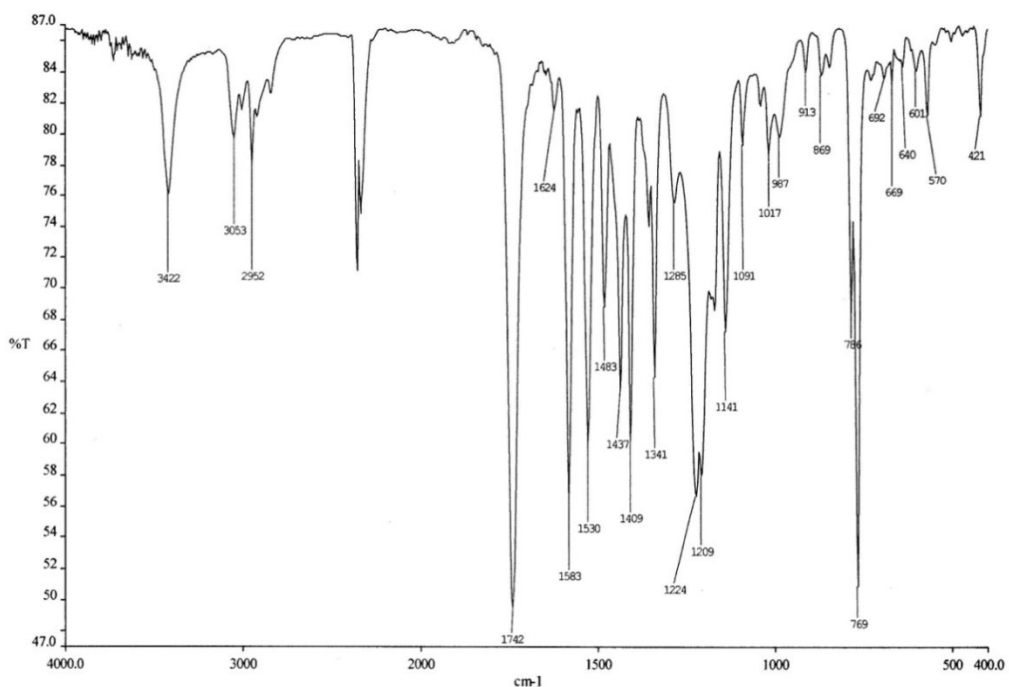


Figura 13. Espectro de IR de **9**.

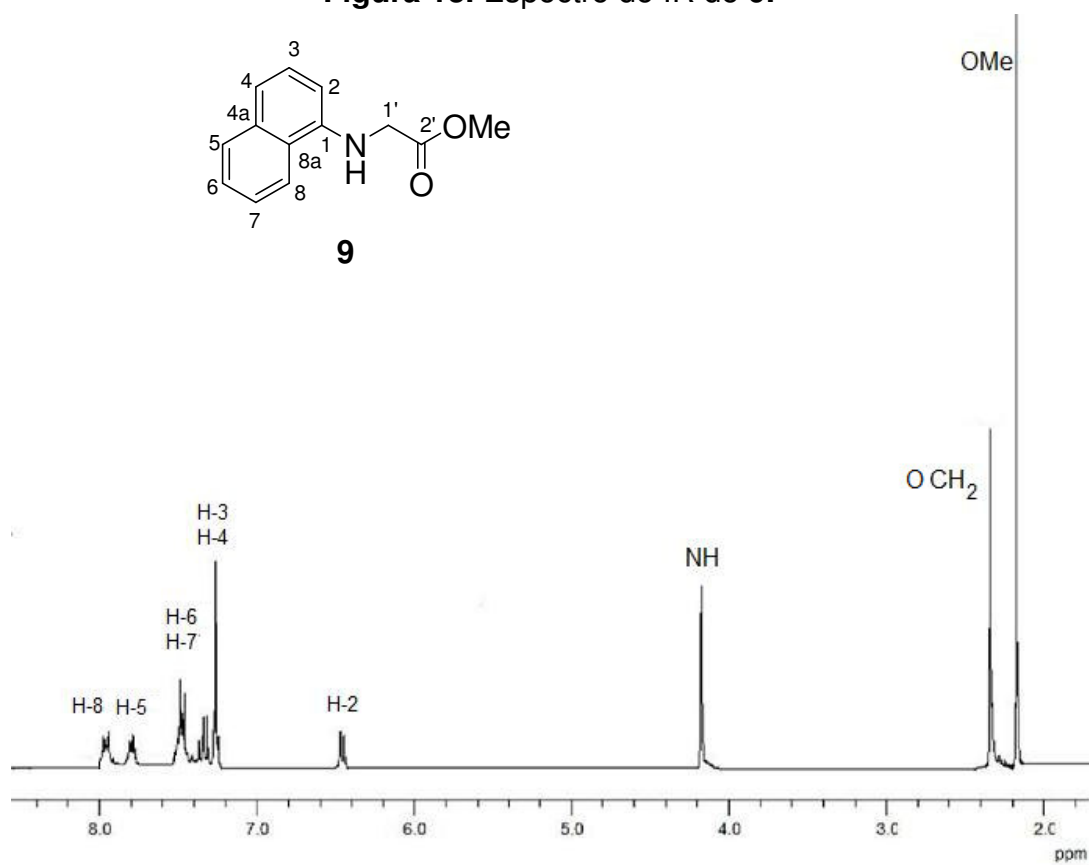


Figura 14. Espectro de RMN ^1H de **9** (300 MHz, CDCl_3)

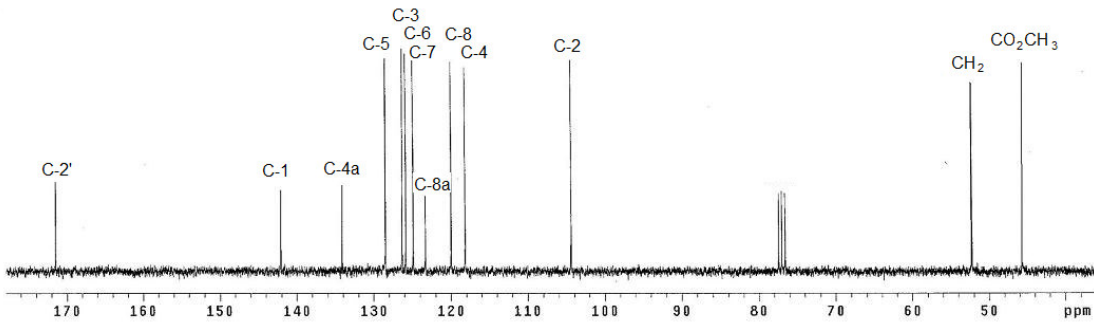


Figura 15. Espectro de ^{13}C de **9**.

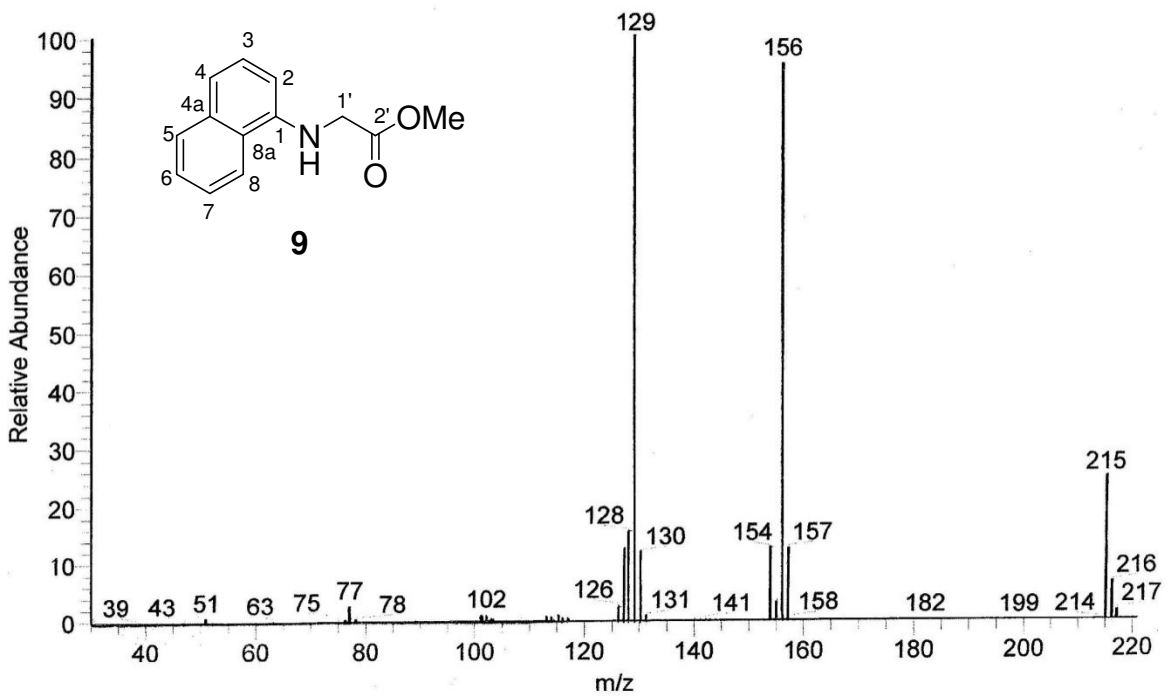


Figura 16. Espectro de Masas de **9**.

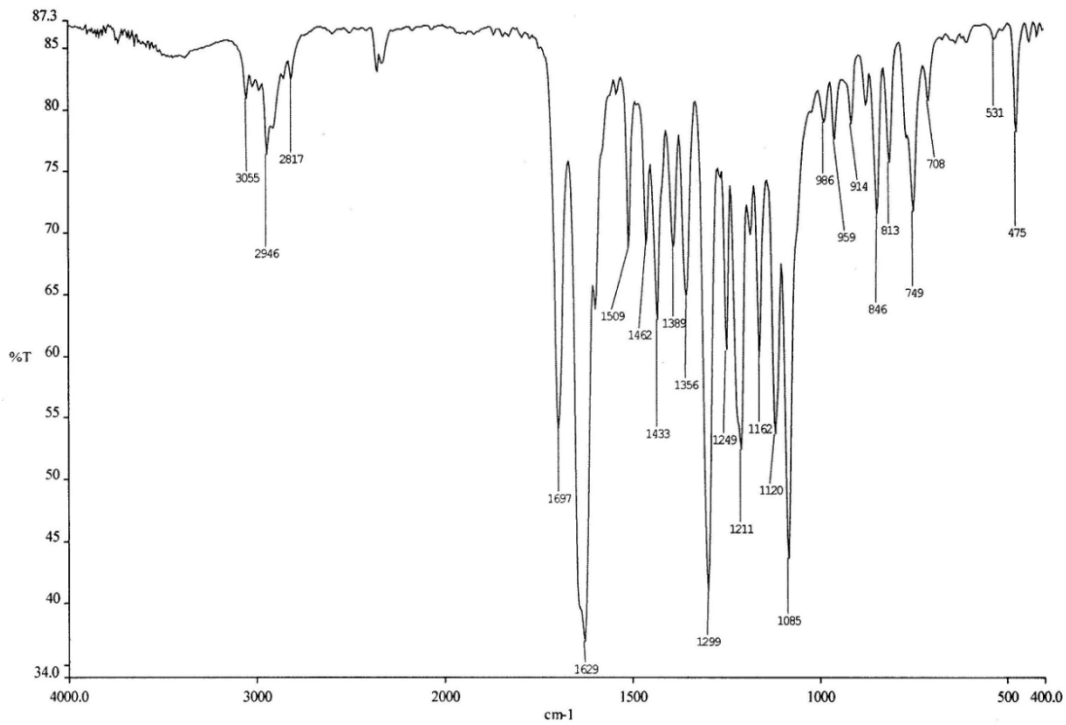


Figura 17. Espectro de IR de **10**.

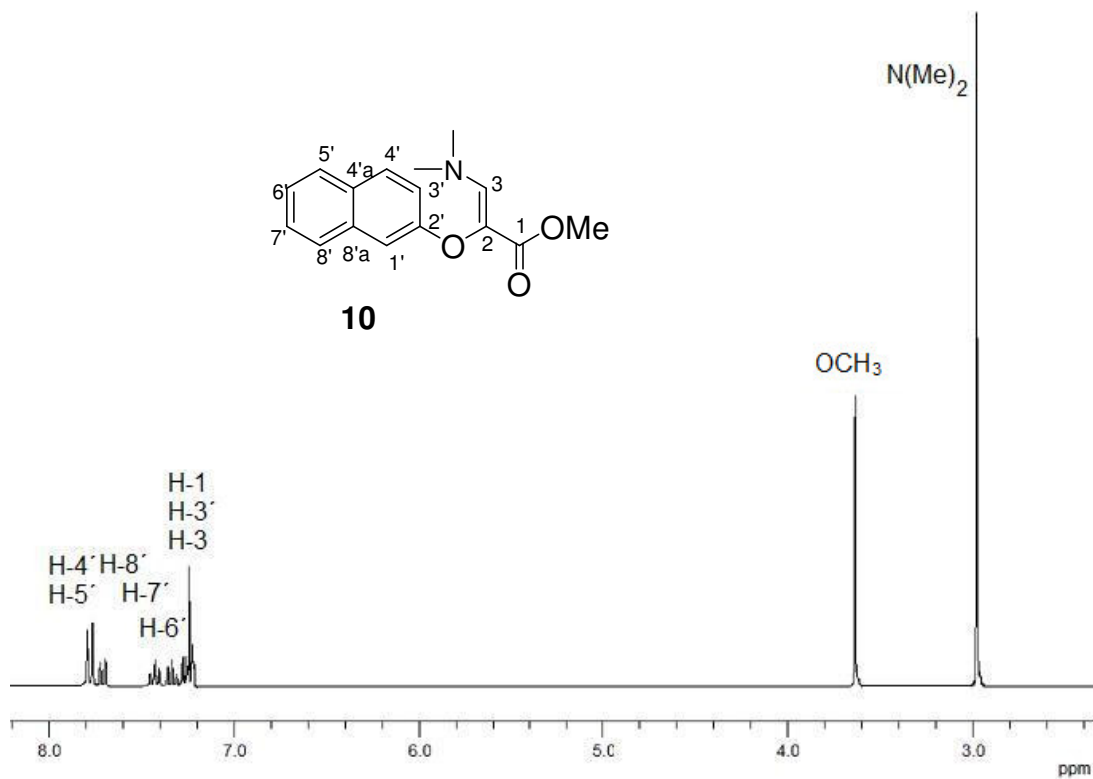


Figura 18. Espectro de RMN ^1H de **10** (300 MHz, CDCl_3).

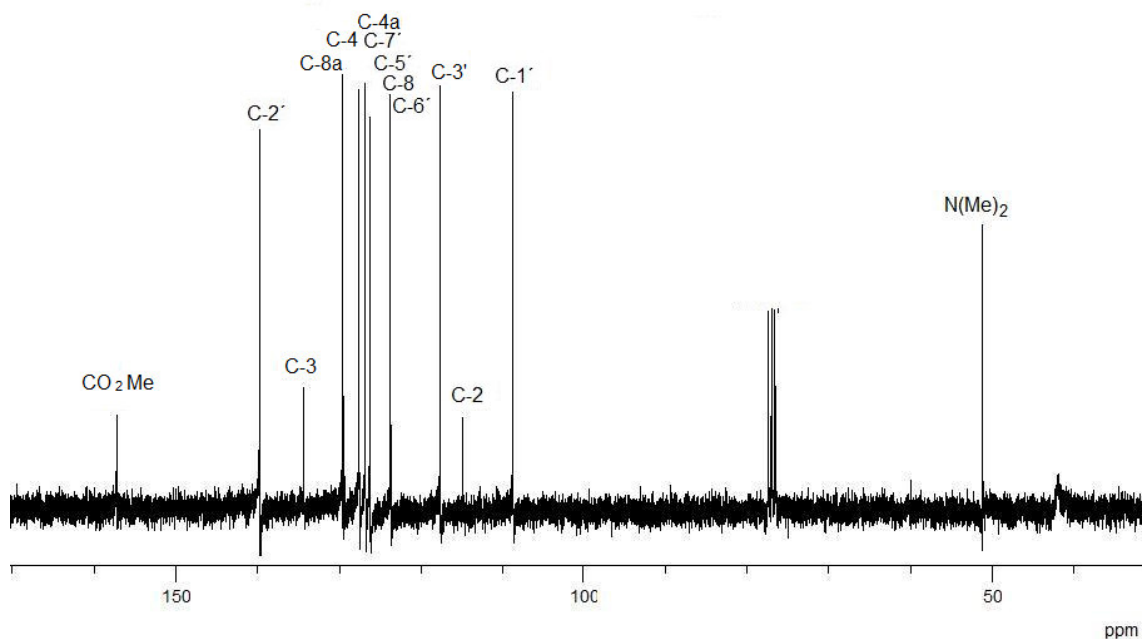


Figura 19. Espectro de ^{13}C de 10.

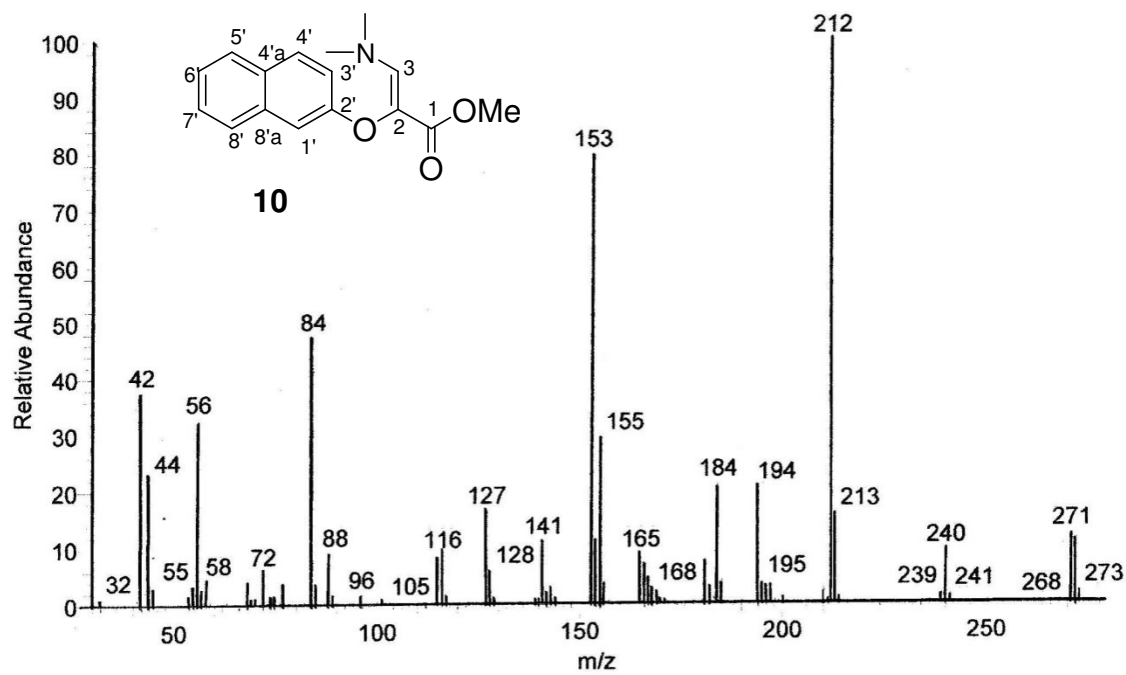


Figura 20. Espectro de Masas de 10.

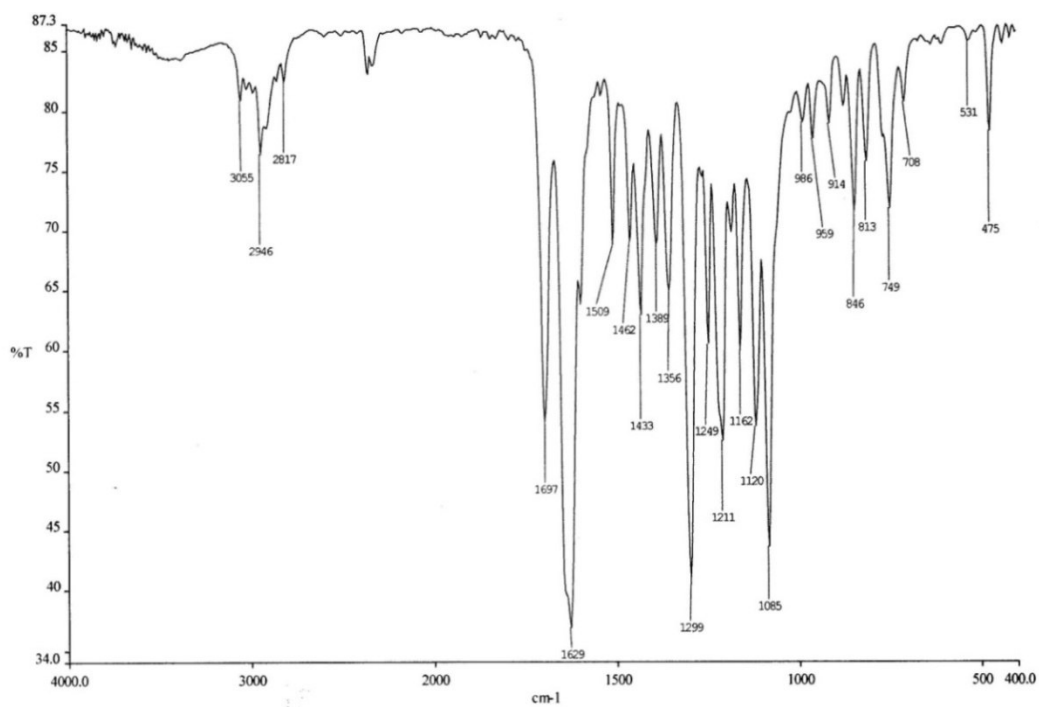


Figura 21. Espectro de IR de 11.

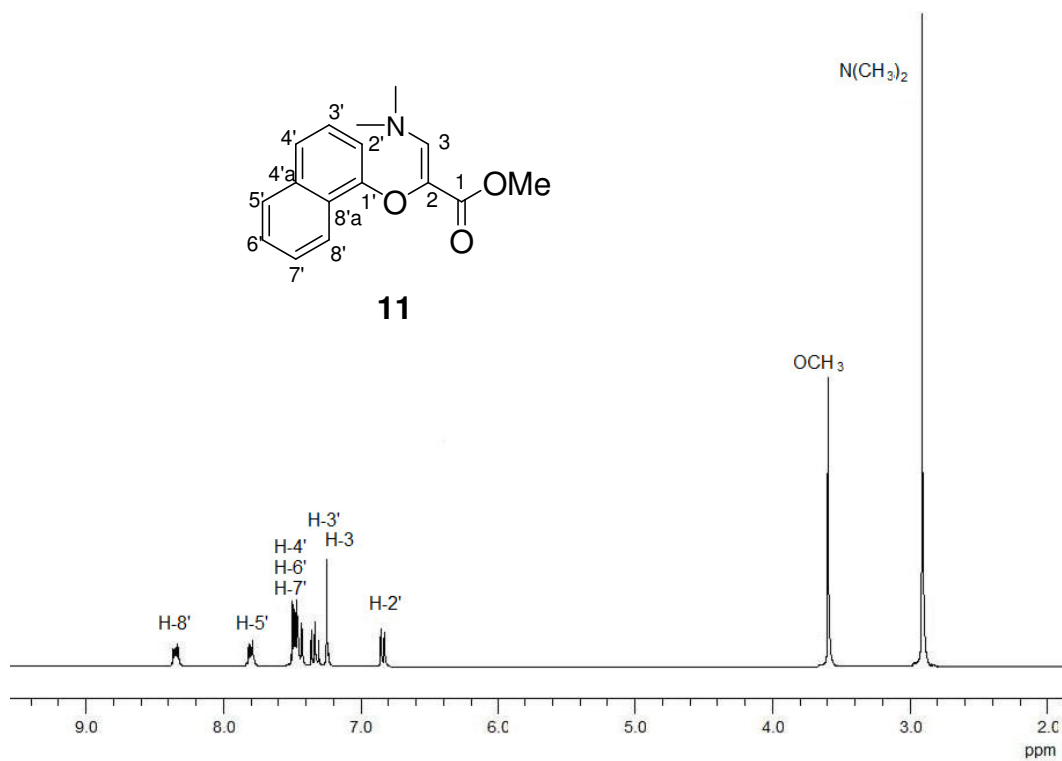


Figura 22. Espectro de RMN ^1H de 11 (300 MHz, CDCl_3).

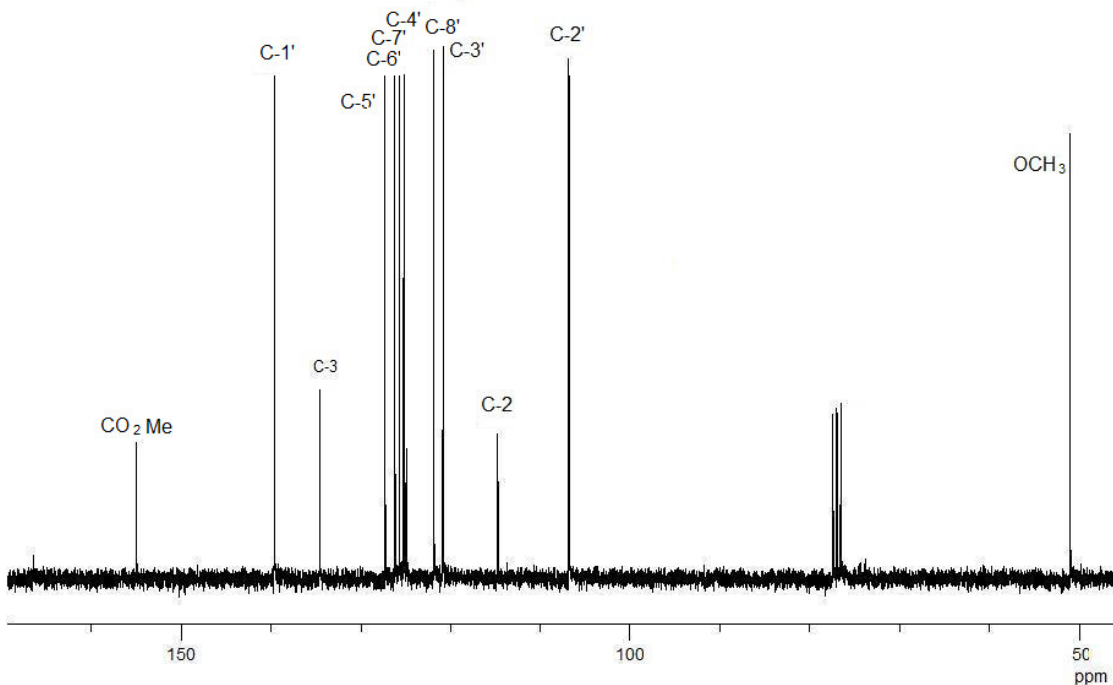


Figura 23. Espectro de ^{13}C de 11.

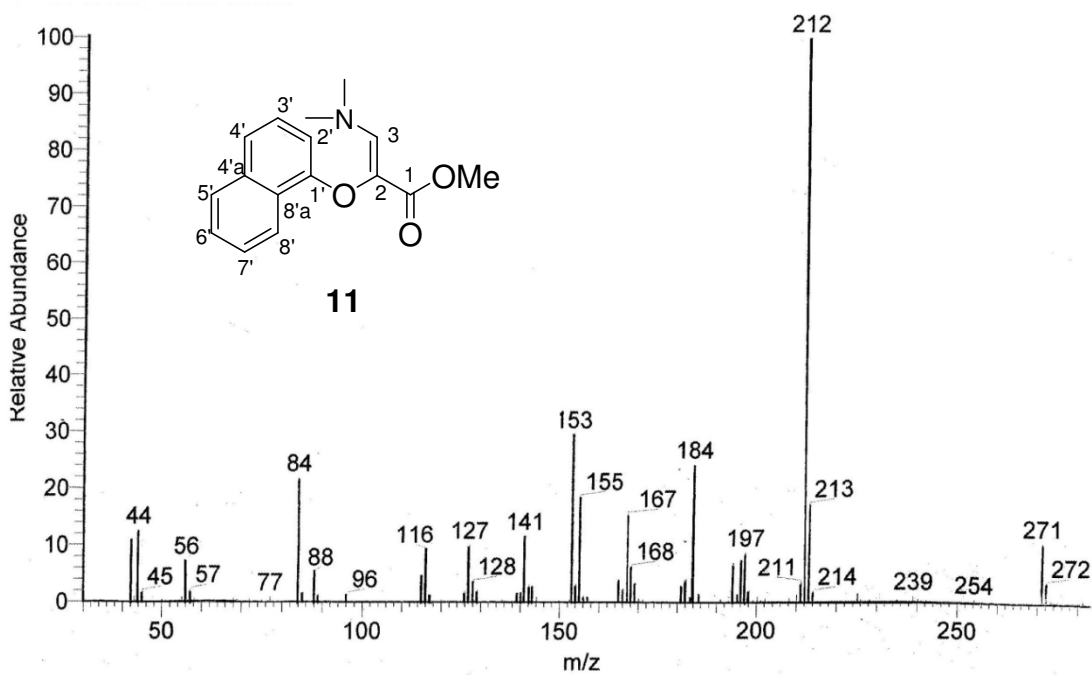


Figura 24. Espectro de Masas de 11.

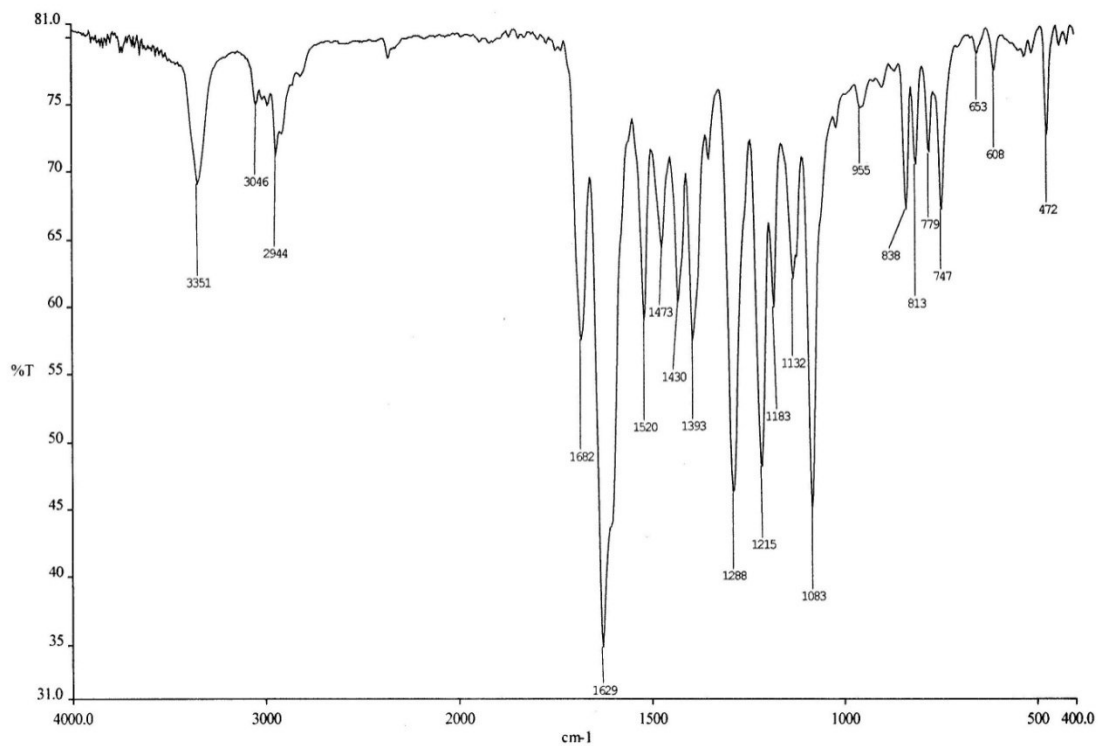


Figura 25. Espectro de IR de **12**.

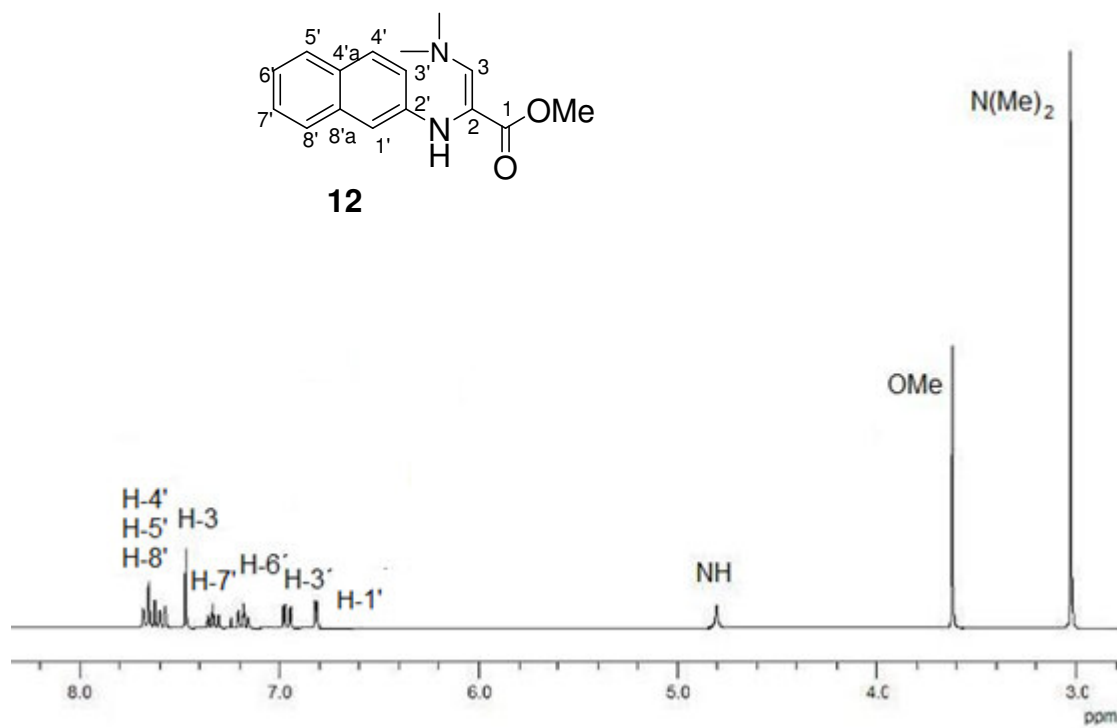


Figura 26. Espectro de RMN ^1H de **12** (300 MHz, CDCl_3).

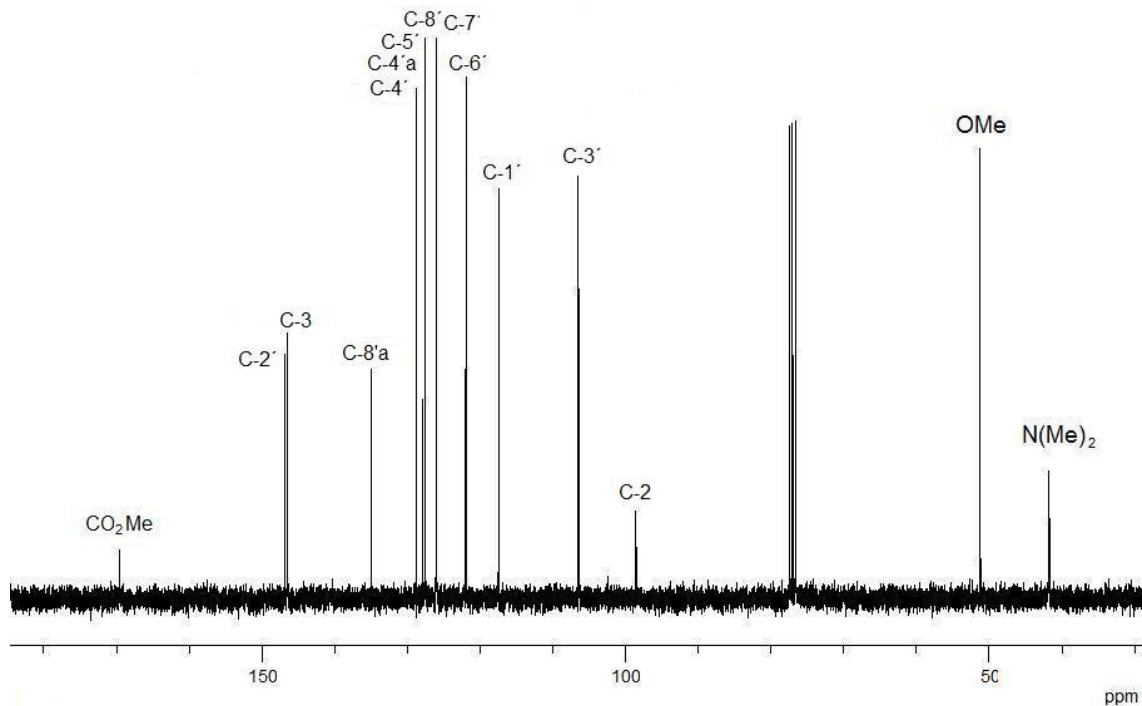


Figura 27. Espectro de ^{13}C de 12.

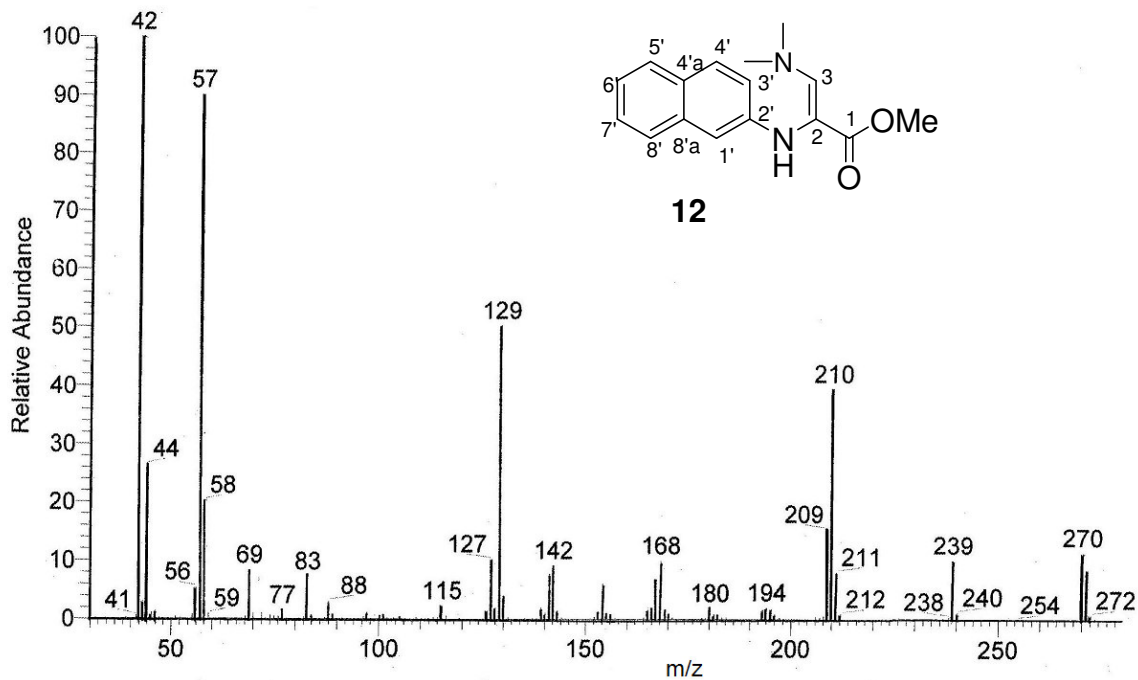


Figura 28. Espectro de Masas de 12.

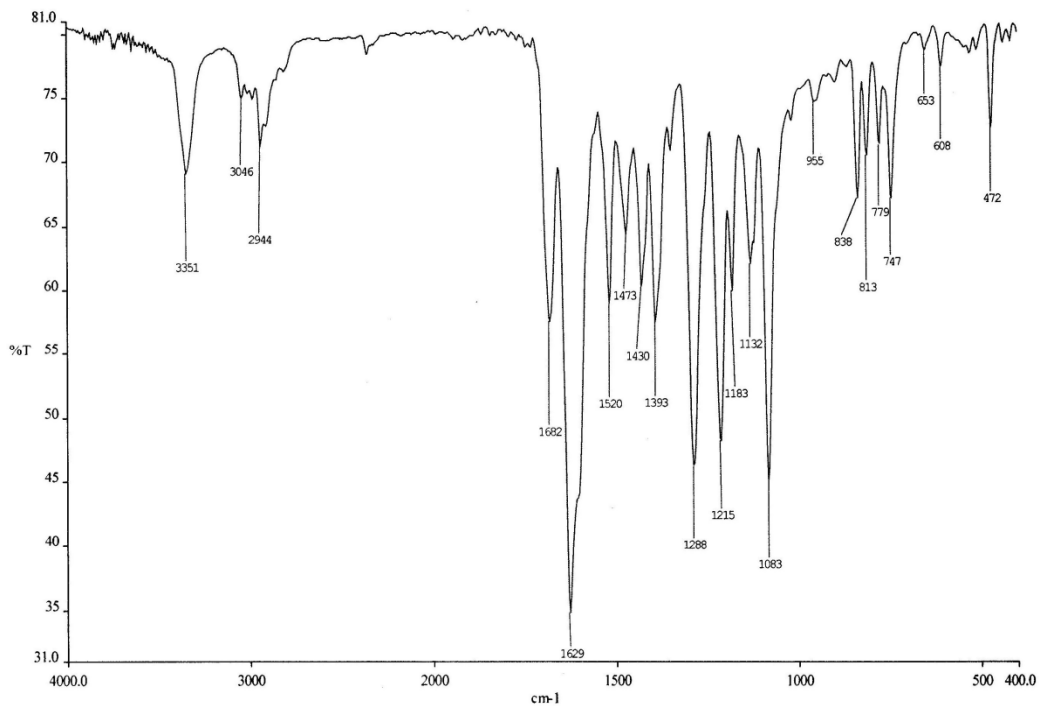


Figura 29. Espectro de IR de **13**.

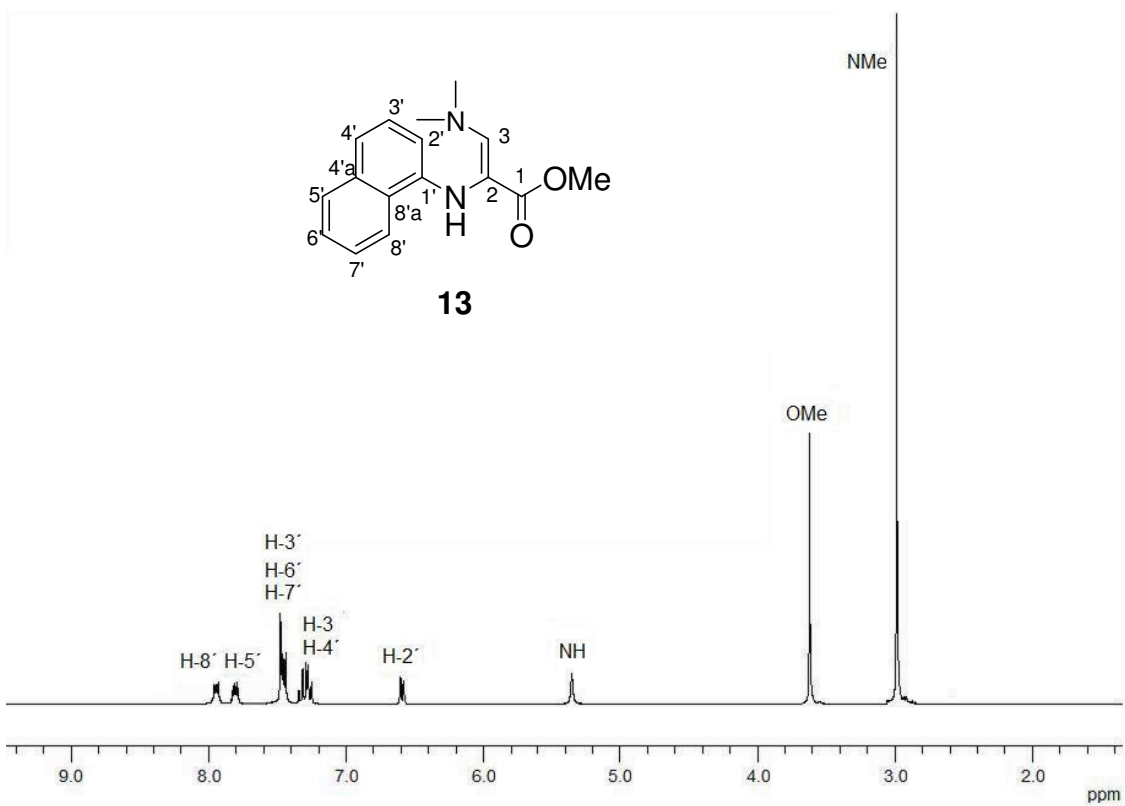


Figura 30. Espectro de RMN ^1H de **13** (300 MHz, CDCl_3).

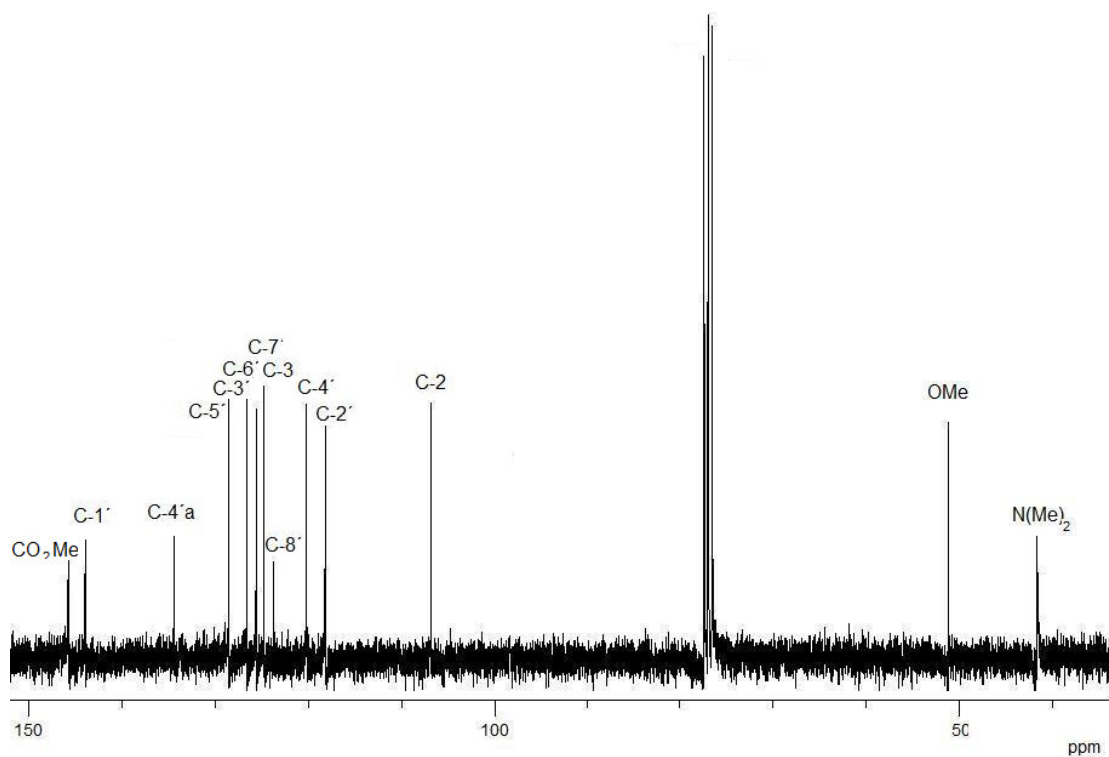


Figura 31. Espectro de ^{13}C de **13**.

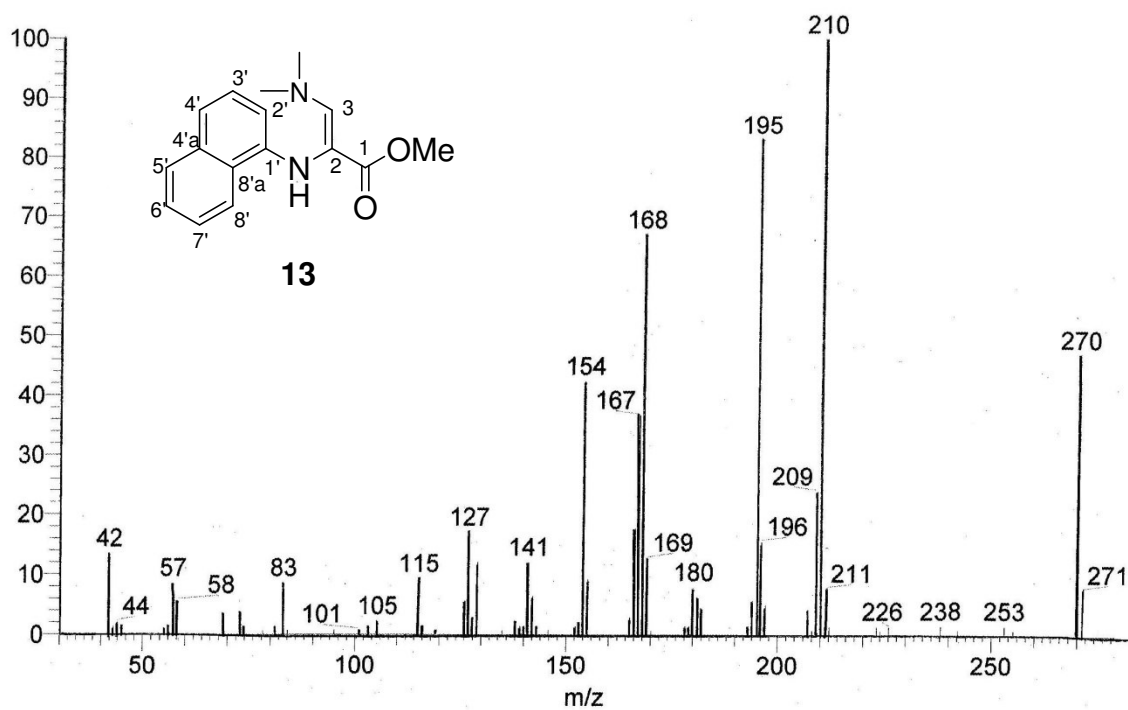


Figura 32. Espectro de Masas de **13**.

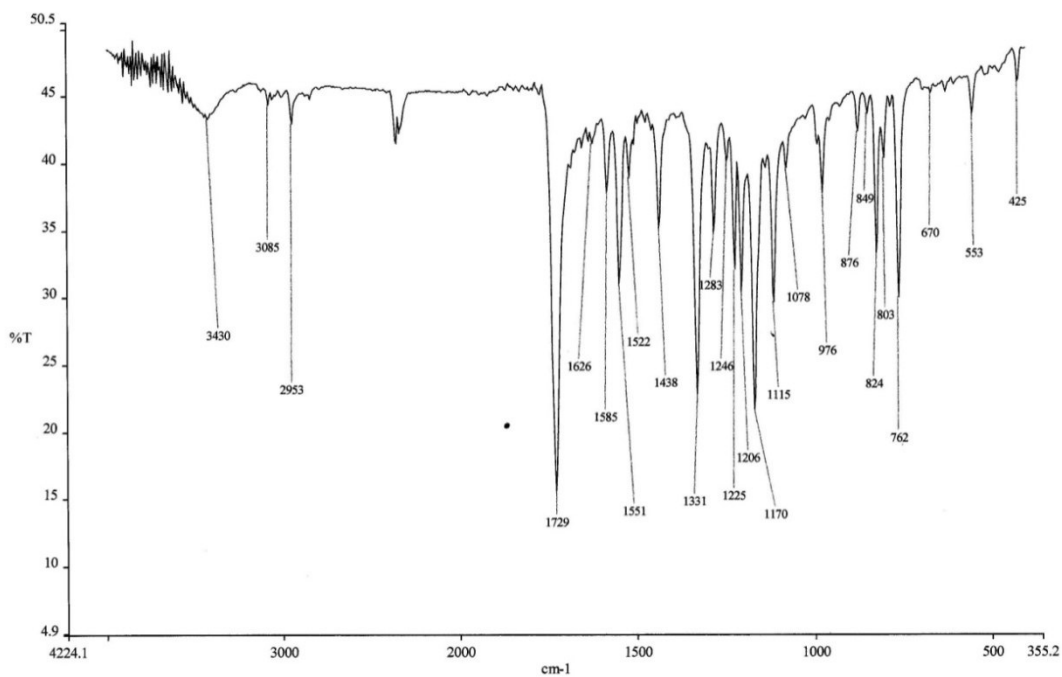


Figura 33. Espectro de IR de **14**.

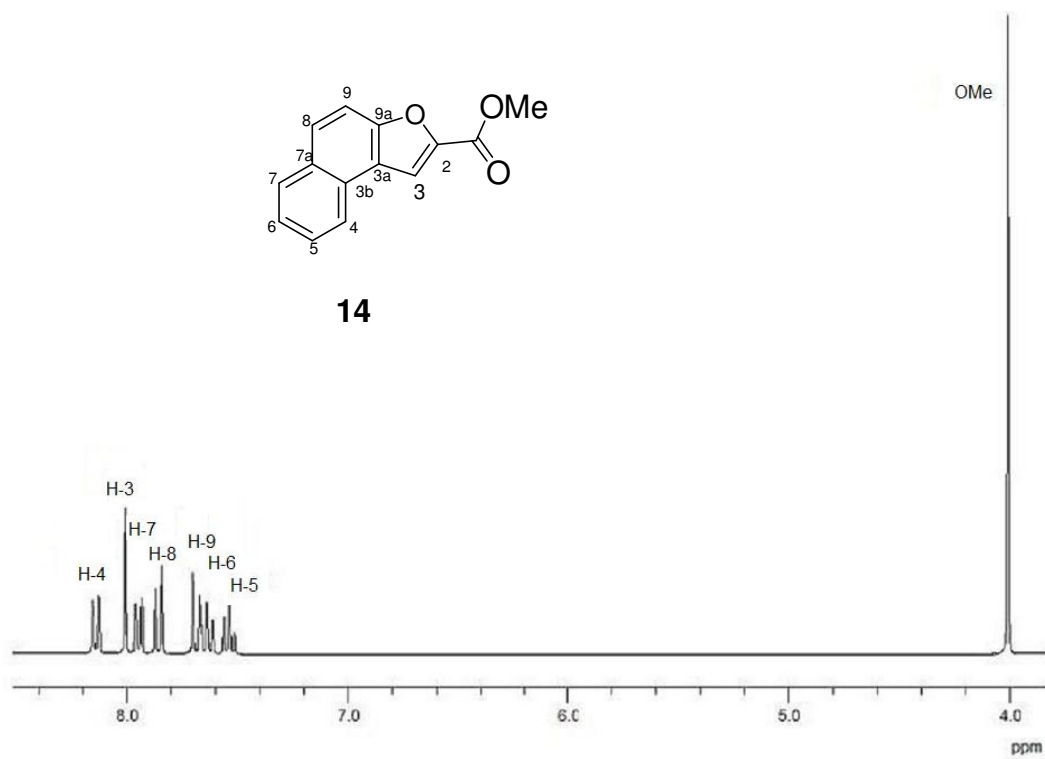


Figura 34. Espectro de RMN ^1H de **14** (300 MHz, CDCl_3).

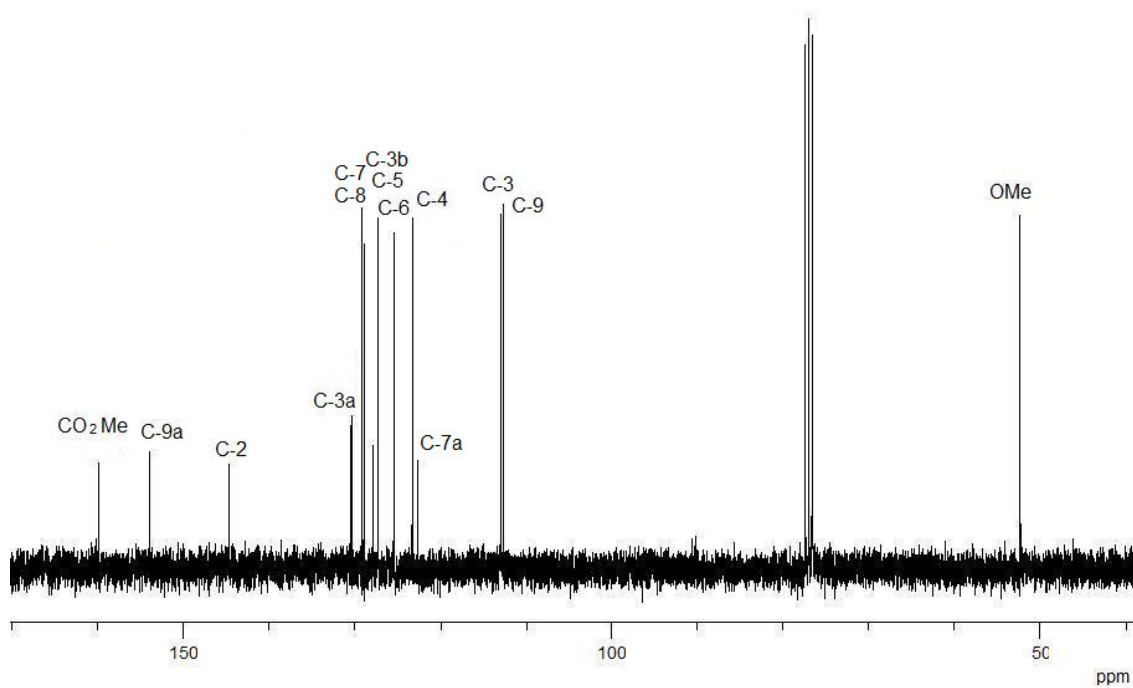


Figura 35. Espectro de ^{13}C de 14.

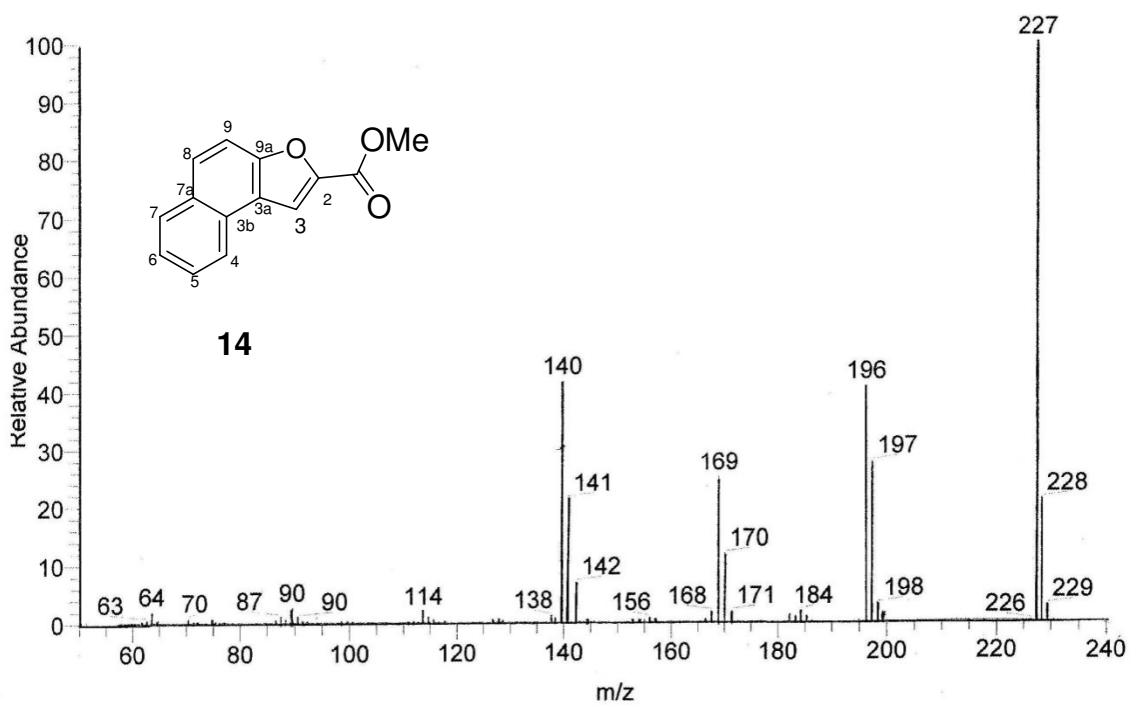


Figura 36. Espectro de Masas de 14.

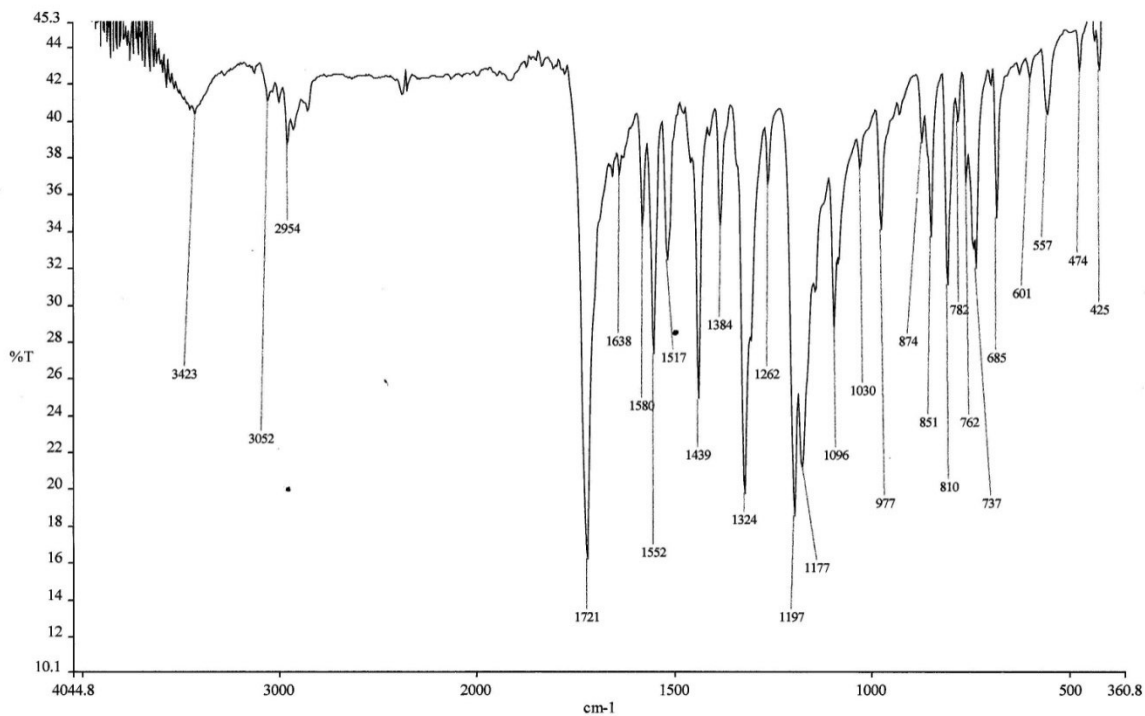


Figura 37. Espectro de IR de **15**.

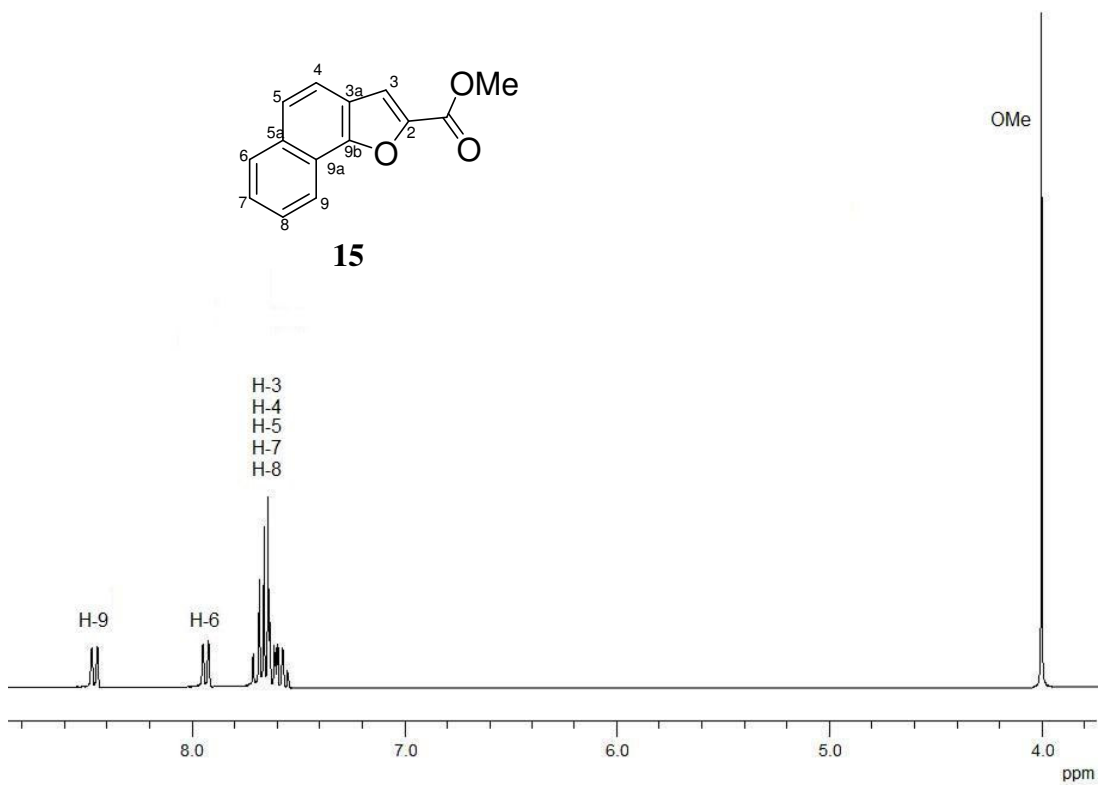


Figura 38. Espectro de RMN ^1H de **15** (300 MHz, CDCl_3).

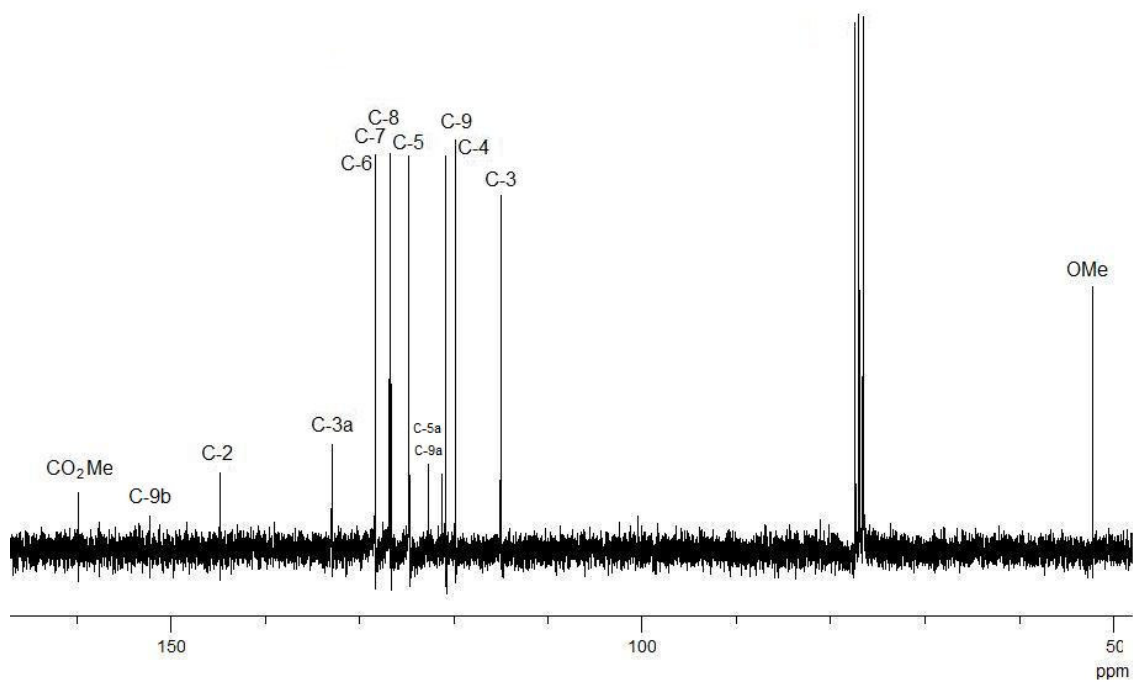


Figura 39. Espectro de ^{13}C de 15.

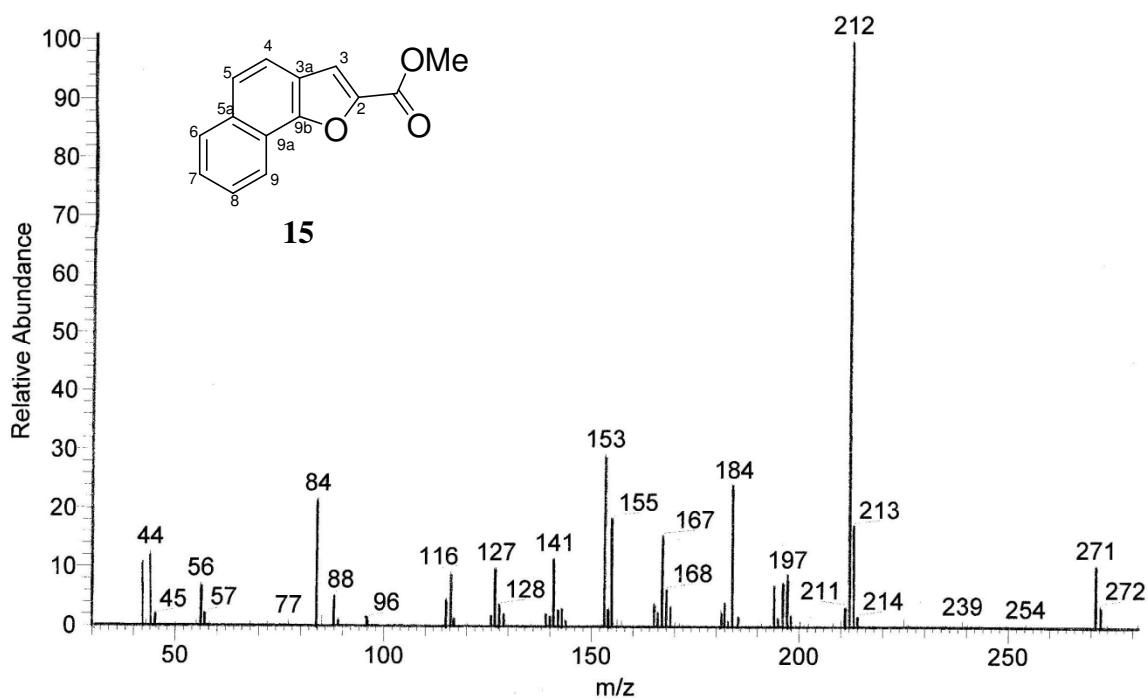


Figura 40. Espectro de Masas de 15.

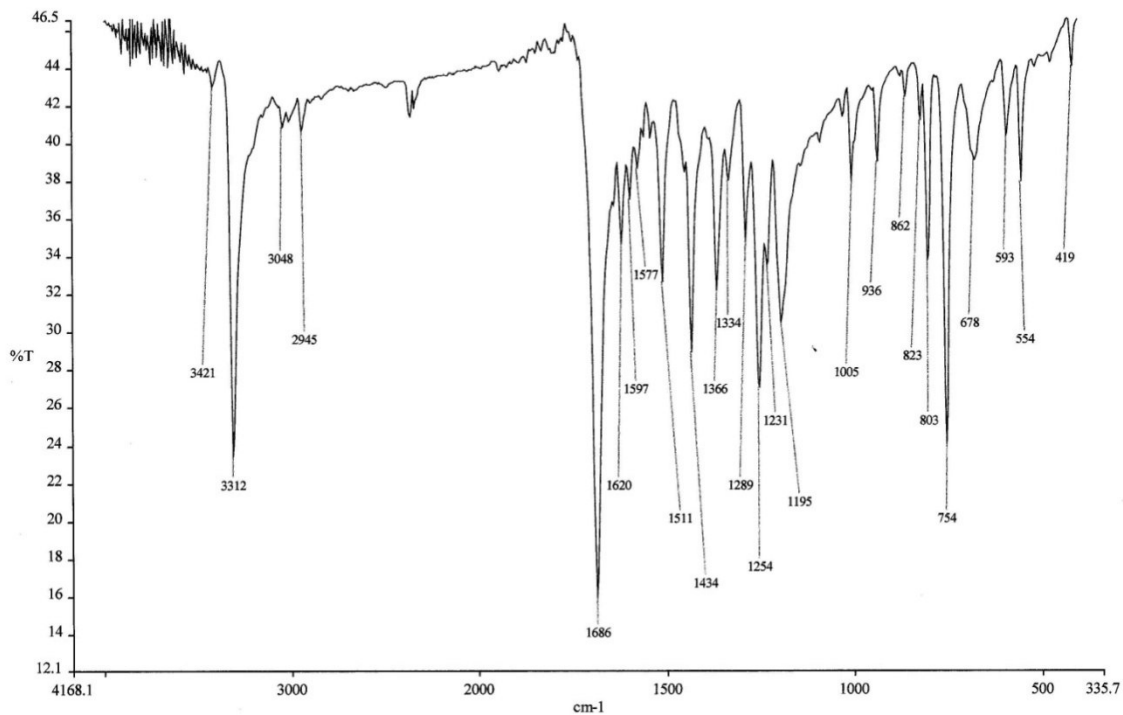


Figura 41. Espectro de IR de **16**.

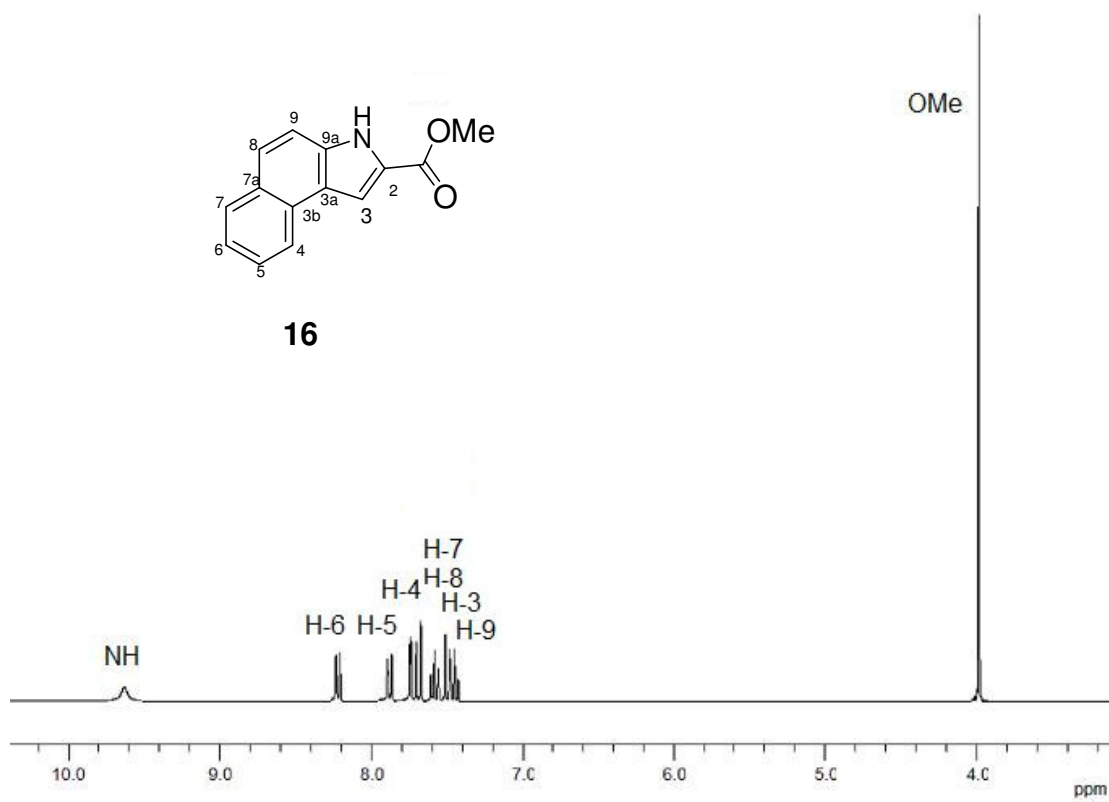


Figura 42. Espectro de RMN ^1H de **16** (300 MHz, CDCl_3).

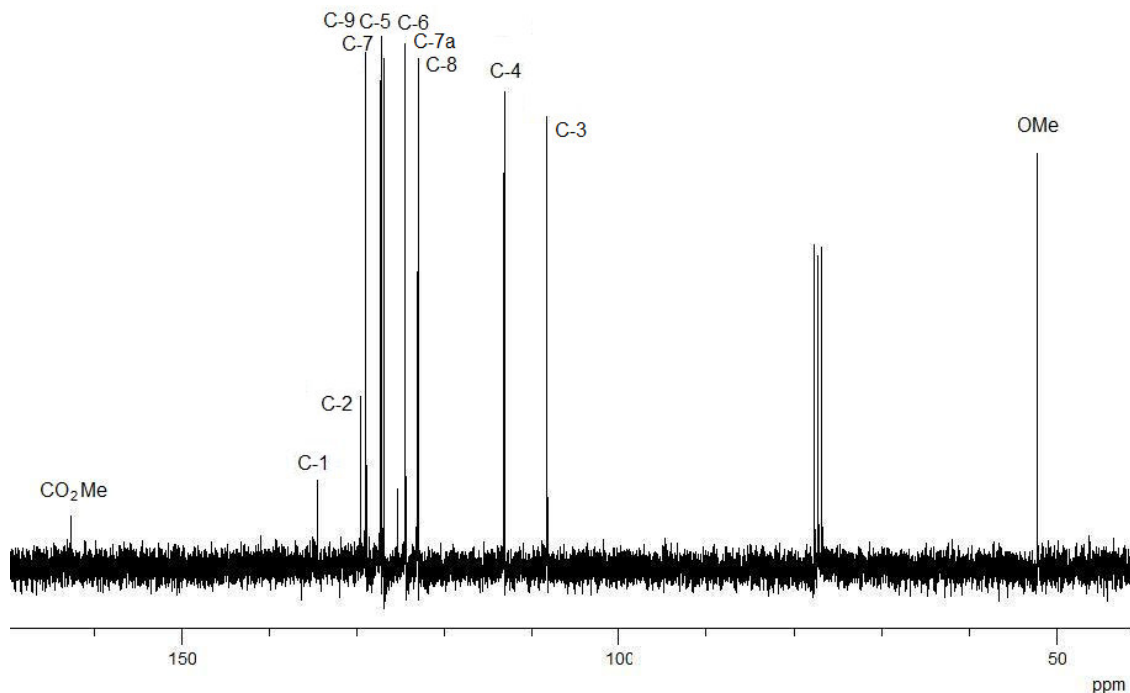


Figura 43. Espectro de ¹³C de 16.

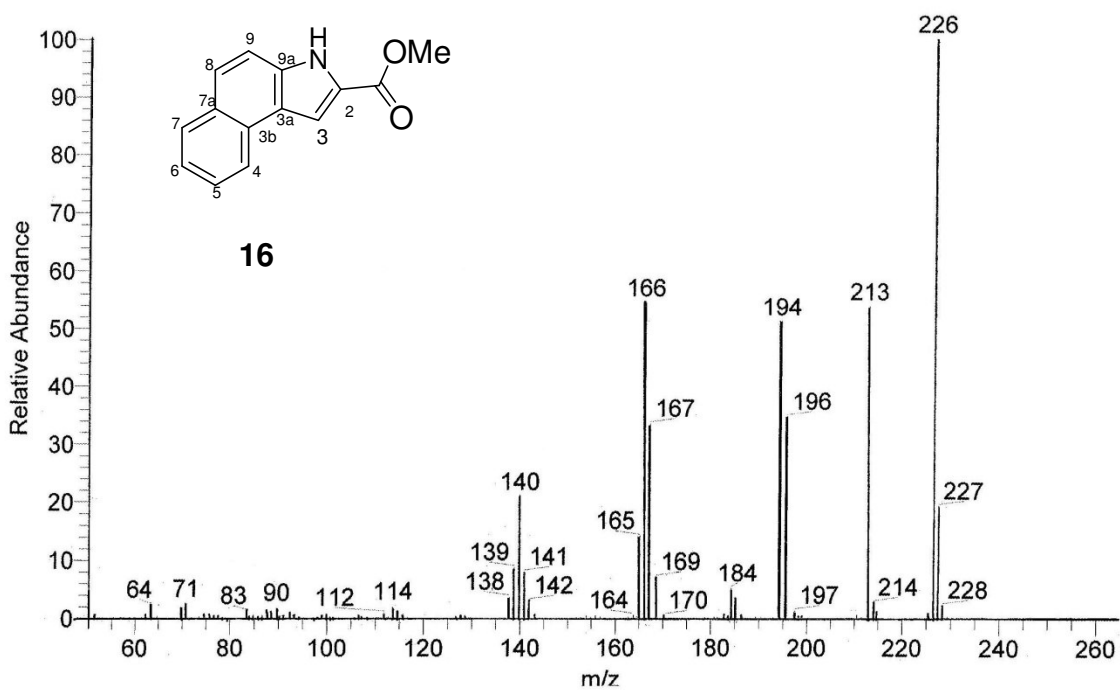


Figura 44. Espectro de Masas de 16.

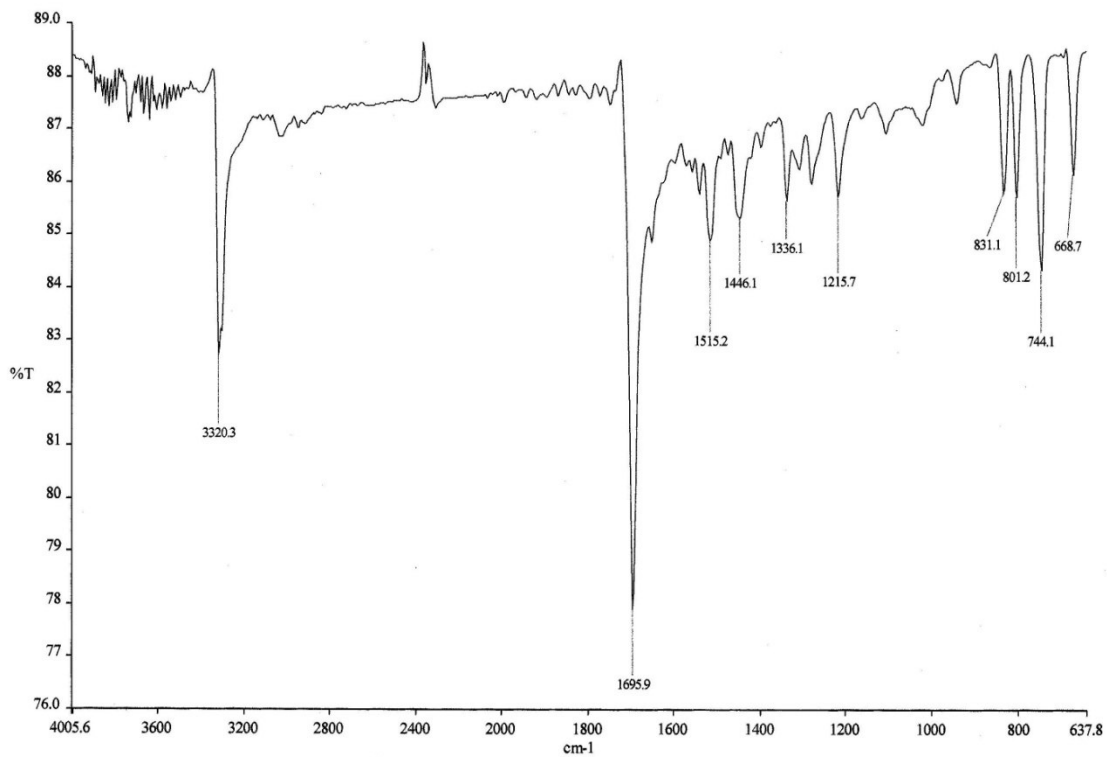


Figura 45. Espectro de IR de 17.

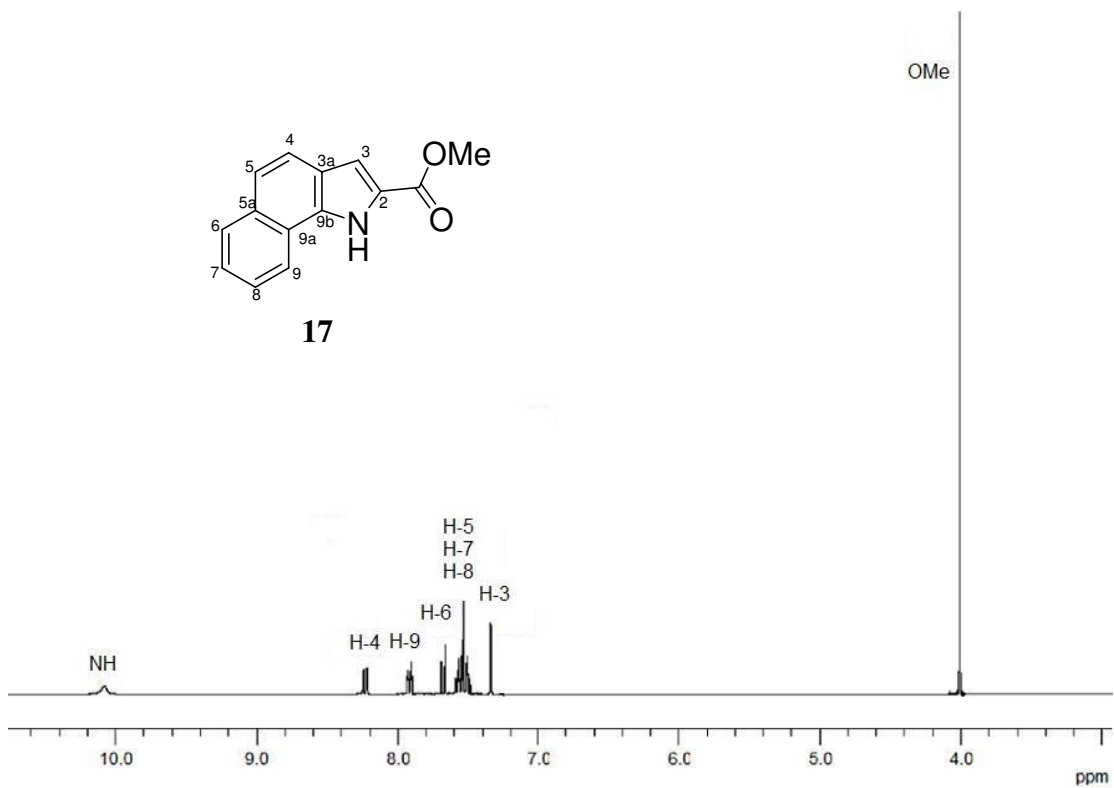


Figura 46. Espectro de RMN ^1H de **17** (300 MHz, CDCl_3).

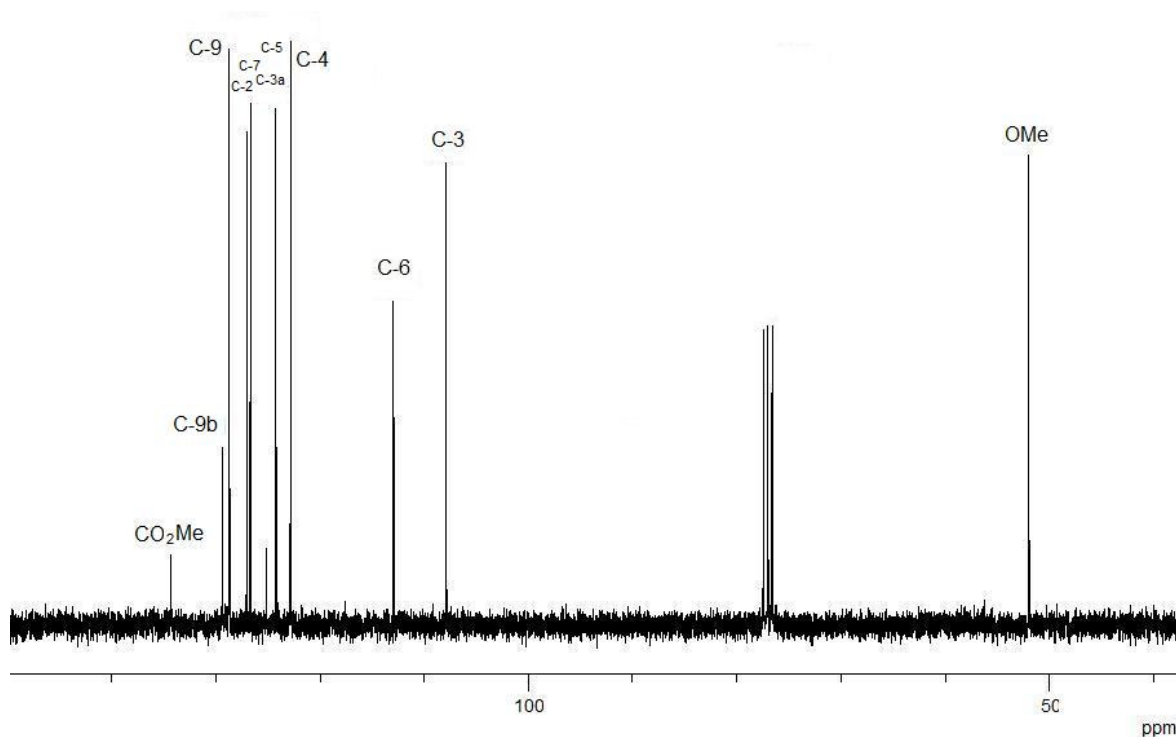


Figura 47. Espectro de ^{13}C de **17**.

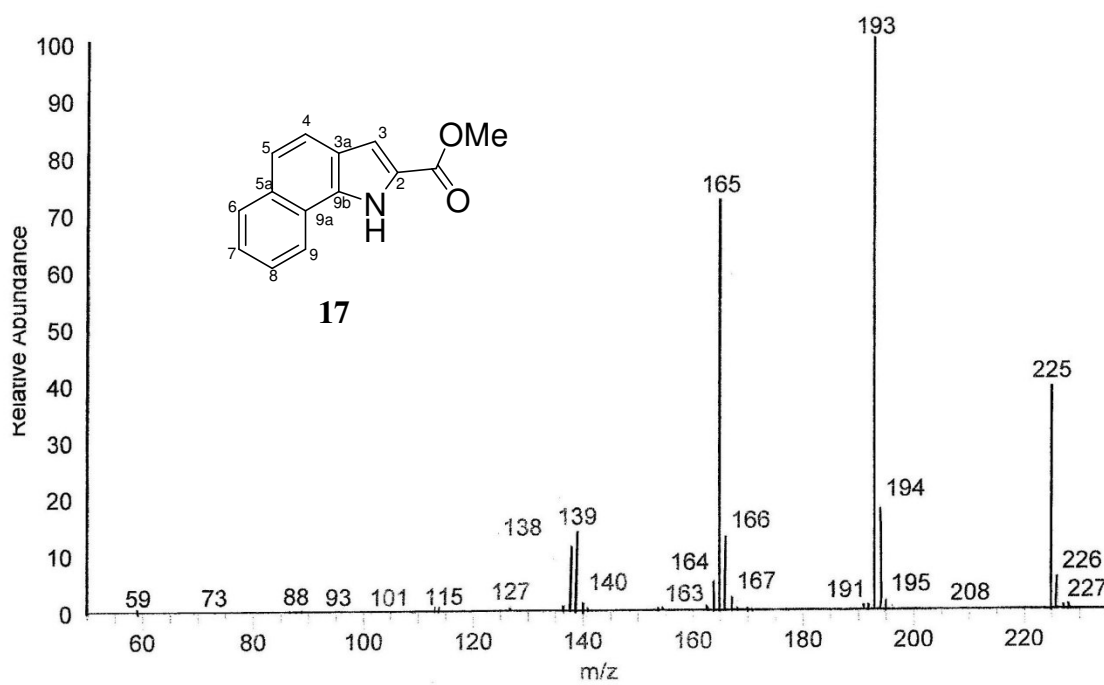


Figura 48. Espectro de Masas de **17**.