

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



“Estudios de inhibición enzimática de productos sintéticos de tipo capsaicinoide mediante bioensayos *in vitro* y docking molecular”

Para obtener el grado de

Maestro en ciencias

Presenta

Q.F.B. Ricardo Yee Rodríguez

Tijuana B.C.

Noviembre 2021

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Folio No. 321
Tijuana, B.C., a 03 de noviembre del 2021

C. Ricardo Yee Rodríguez
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente.-

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción: TESIS


Es propuesto, por los C. Dr. Iván Córdova Guerrero y
Dra. Laura Janeth Díaz Rubio


Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al
tema: “Estudios de inhibición enzimática de productos sintéticos de tipo capsaicinoide
mediante bioensayos *in vitro* y docking molecular” el
cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

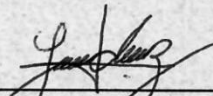
- I. Introducción.
- II. Generalidades.
- III. Metodologías.
- IV. Discusión de resultados.
- V. Conclusiones.
- VI. Bibliografía.
- VII. Anexos.

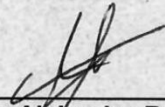


FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICA E INGENIERÍA
CAMPUS TIJUANA


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Sub-Directora


Dr. Iván Córdova Guerrero
Director de Tesis


Dra. Laura Janeth Díaz Rubio
Co-Directora de Tesis


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director Provisional

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A Mi familia. A cada miembro de mi familia ya que cada uno aportó en mi proceso de enseñanza, por todo el apoyo que me han brindado, y sé que me brindarán, por el apoyo durante mis estudios y mis investigaciones, por la buena educación que he recibido por parte de ellos, por los valores que me inculcaron y su forma de pensar. Gracias a mi familia he podido realizar este logro profesional, uno de los más que faltan, sin duda han sido una gran motivación, ya que sin ellos no hubiese podido alcanzar mis metas. Agradezco a cada uno de ustedes, por su manera de pensar y de ser, la cual ha formado gran parte de mí. A mis padres que me enseñaron todo lo que saben desde mis primeros pasos, a mis tíos y hermanos por todo lo bueno que me aportaron, por sus consejos y su apoyo.

A mi hija Amelia Yee, que es una fuente de motivación e inspiración para seguir adelante y proponerme metas, para poder compartir con ella todo lo que he hecho y hare.

Al Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales. Por todo lo que me han enseñado, por dejarme continuar mis estudios e investigaciones. Por aceptarme desde la primera vez ser parte del equipo de laboratorio cuando cursaba la licenciatura. Por las buenas experiencias y por todo lo que he aprendido en esta trayectoria. Desde que ingrese por primera vez en el laboratorio de química medicinal y productos naturales, cuando cursaba la licenciatura, ha sido una grandiosa experiencia, agradezco a cada miembro del laboratorio por todo su apoyo, especialmente al Dr. Iván Córdova, por dejarme ser parte de tan maravilloso equipo de investigación, y por aceptarme como tesista para formar parte del laboratorio, durante la licenciatura y ahora en la maestría, por sus consejos y su apoyo. Agradezco también al Dr. Eduardo Noriega por apoyarme en el proyecto, ya que él fue un parte crucial en mi formación, cuando recién cursaba como tesista en el laboratorio,

AGRADECIMIENTOS

desde que entre a realizar mi tesis en la licenciatura y ahora en la maestría, por ser un gran amigo. También agradezco, a la Dra. Laura Díaz Rubio por la ayuda durante el proyecto, por asesorarme y por su apoyo y su guía que me ayudaron mucho durante mi trayecto en mi formación profesional. También agradezco al M.C. Arturo Estolano por su gran apoyo en este proyecto, por sus consejos y su paciencia, por enseñarme y guiarme. Y a todo el equipo del laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales, a cada uno de ellos que aportaron algo en mí y espero también aportado algo en ellos.

Universidad Autónoma de Baja California. Agradezco a mi alma mater, ya que fue donde tuve la oportunidad de estudiar la licenciatura, y en ella desarrollarme profesionalmente. Por todo el apoyo de la universidad, así como sus docentes. A mis profesores y cada miembro de la universidad ya que me enseñaron no solo conocimiento, si no también valores. Agradezco también al programa MYDCI por dejarme formar parte del área de posgrado, y seguir con mis metas y proyectos.

A mis sinodales. Por todos sus consejos, sus observaciones, por su apoyo y su paciencia, por ayudarme a conseguir esta meta, gracias por todo su apoyo.

“La ciencia no es solamente compatible con la espiritualidad, sino que es una profunda fuente de espiritualidad”

Carl Sagan

RESUMEN

RESUMEN

En la presente tesis se muestra el trabajo de síntesis química de análogos de compuestos de tipo capsaicinoide, compuestos que se encuentran de forma natural en el fruto del género *Capsicum*, los cuales poseen actividades biológicas marcadas, para su posterior caracterización, y su evaluación mediante ensayos *in vitro* de inhibición de enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, además de establecer una relación estructura-actividad biológica con herramientas informáticas mediante el *docking molecular*.

En la **Introducción** se recopila información sobre el uso y la historia de los productos naturales, el cómo estos son una fuente natural de medicamentos, y como esto ha dado pauta para la síntesis y modificación de los compuestos orgánicos de origen natural para generar fármacos más potentes o con menores efectos secundarios.

En las **Generalidades** se presenta información destacada e importante sobre los capsaicinoideos, como son sus propiedades fisicoquímicas, propiedades farmacológicas, su síntesis y de su historia.

En la parte de **Metodología** se presenta el desarrollo de la síntesis de los compuestos, así como la ruta sintética usada, la caracterización de los compuestos mediante técnicas de espectroscopia de infrarrojo, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear de protón y carbono. Además de la evaluación biológica de inhibición enzimática de dichos compuestos y el *docking molecular*.

Finalmente, en la **Discusión** se presentará el análisis de los resultados obtenidos, de la síntesis química y la evaluación de inhibición enzimática para finalmente presentar las principales conclusiones obtenidas.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	XVII
TABLA DE ABREVIATURAS	XIX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XXII
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERALE Y PARTICULARES	13
GENERALIDADES	15
METODOLOGÍAS	38
METODOLOGÍA SINTÉTICA.....	39
METODOLOGÍA DE INHIBICION ENZIMÁTICA.....	53
METODOLIGÍA DOCKING MOLECULAR.....	57
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
SINTESIS Y CARACTERIZACION.....	61
INHIBICIÓN ENZIMÁTICA	81
ESTUDIO QUIMIOINFORMÁTICO.....	87
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	97
APENDICES.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de α -pineno y β -pineno.....	1
Figura 2. Estructura de la morfina.....	3
Figura 3. Reacción esquemática de la síntesis de heroína con anhídrido acético.....	4
Figura 4. Reacción de síntesis de Aspirina con anhídrido acético.....	6
Figura 5. Acoplamiento entre un ligando y su receptor.....	8
Figura 6. Estructura química de capsaicina.....	9
Figura 7. Reacción global de síntesis de capsaicinoides.....	11
Figura 8. Frutos del género <i>Capsicum</i>	15
Figura 9. Capsaicinoides del fruto <i>Capsicum</i>	16
Figura 10. Partes del fruto <i>Capsicum</i>	17
Figura 11. Ejemplos de algunos vainilloides.....	18
Figura 12. Estructura química de la capsaicina y sus tres regiones importantes (A) región aromática, (B) enlace amida y (C) cadena alifática.....	19
Figura 13. Estructura química de capsiato.....	20
Figura 14. Gas pimienta.....	21
Figura 15. Presentaciones farmacéuticas de capsaicina en crema y parches.....	22
Figura 16. Capsaicinoides sintetizados con DCC.....	31
Figura 17. Hidrólisis de acetilcolina.....	32
Figura 18. Sitio catalítico de AChE.....	33
Figura 19. Estructura química de Donezepilo, Galantamina, Rivastigmina.....	34
Figura 20. Estructura química de succinilcolina y butirilcolina.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 21. Sitios activos de AChE y BChE con sus respectivos ligandos.....	36
Figura 22. Estructura química de gas sarín y clorpirifós.....	37
Figura 23. Síntesis de cloruros	40
Figura 24. Síntesis de capsaicinoides CAPS 1 – CAPS 10	41
Figura 25. Modelo general de docking molecular.....	59
Figura 26. Compuestos sintetizados (CAPS 1 – CAPS 2).....	62
Figura 27. Compuestos sintetizados.....	65
Figura 28. Ampliación de espectro y estructura COSY.....	67
Figura 29. Ampliación de espectro HSQC.....	68
Figura 30. Ampliación de espectro y estructura CAPS 1.....	69
Figura 31. Estructura de CAPS 2 y CAPS 3.....	71
Figura 32. Compuesto CAPS 4 y ampliación de RMN- ¹³ C.....	72
Figura 33. CAPS 5 y ampliación de RMN- ¹ H.....	74
Figura 34. Estructura de CAPS 6.....	75
Figura 35. Estructura de CAPS 7.....	76
Figura 36. Estructura de CAPS 8 y ampliación de RMN- ¹ H.....	77
Figura 37. Estructura de CAPS 9 y ampliación de RMN- ¹ H.....	78
Figura 38. Estructura de CAPS 10 y ampliación de RMN- ¹ H.....	79
Figura 39. Acoplamiento molecular de CAPS con BChE	85
Figura 40. Acoplamiento molecular de capsaicina con AChE y BChE	87
Figura 41. Acoplamiento molecular de CAPS 8 con BChE.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 42. Acoplamiento de CAPS 5 con BChE.....	91
Figura 43. Estructura química de CAPS 2.....	93
Figura 44. Estructura química de CAPS 10.....	94
Figura 45. Estructura química de CAPS 8.....	94
Figura 46. Estructura química de CAPS 5.....	95
Figura 47. Espectro de RMN ^1H de CAPS 1.....	102
Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 1.....	103
Figura 49. Espectro de RMN ^1H experimento COSY de CAPS 1.....	104
Figura 50. Experimento de HSQC de CAPS 1.....	105
Figura 51. Espectro de experimento HMBC de CAPS 1.....	106
Figura 52. Espectro de masas de CAPS 1.....	107
Figura 53. Espectro de infrarrojo de CAPS 1.....	108
Figura 54. Espectro de RMN ^1H de CAPS 2.....	109
Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 2.....	110
Figura 56. Espectro de infrarrojo de CAPS 2.....	111
Figura 57. Espectro de masas de CAPS 2.....	112
Figura 58. Espectro de RMN ^1H de CAPS 3.....	113
Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 3.....	114
Figura 60. Espectro de infrarrojo de CAPS 3.....	115
Figura 61. Espectro de masas de CAPS 3.....	116
Figura 62. Espectro de RMN ^1H de CAPS 4.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 4.....	118
Figura 64. Espectro de infrarrojo de CAPS 4.....	119
Figura 65. Espectro de masas de CAPS 4.....	120
Figura 66. Espectro de RMN ^1H de CAPS 5.....	121
Figura 67. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 5.....	122
Figura 68. Espectro de infrarrojo de CAPS 5.....	123
Figura 69. Espectro de masas de CAPS 5.....	124
Figura 70. Espectro de RMN ^1H de CAPS 6.....	125
Figura 71. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 6.....	126
Figura 72. Espectro de infrarrojo de CAPS 6.....	127
Figura 73. Espectro de masas de CAPS 6.....	128
Figura 74. Espectro de RMN ^1H de CAPS 7.....	129
Figura 75. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 7.....	130
Figura 76. Espectro de infrarrojo de CAPS 7.....	131
Figura 77. Espectro de masas de CAPS 7.....	132
Figura 78. Espectro de RMN ^1H de CAPS 8.....	133
Figura 79. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 8.....	134
Figura 80. Espectro de infrarrojo de CAPS 8.....	135
Figura 81. Espectro de RMN ^1H de CAPS 9.....	136
Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 9.....	137
Figura 83. Espectro de infrarrojo de CAPS 9.....	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 84. Espectro de masas de CAPS 9.....	139
Figura 85. Espectro de RMN ^1H de CAPS 10.....	140
Figura 86. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 10.....	141
Figura 87. Espectro de infrarrojo de CAPS 10.....	142
Figura 88. Espectro de masas de CAPS 10.....	143

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Ruta sintética para la generación de vainillilamina.....	25
Esquema 2. Síntesis de análogos capsaicinoides usando cloruros de ácido (1) Cloruro de oleilo (2) Cloruro de palmitoilo y (3) Cloruro de benzoilo.....	26
Esquema 3. Síntesis de cloruro de ácido con cloruro de tionilo.....	27
Esquema 4. Mecanismo de reacción Schotten-Baumann.....	27
Esquema 5. Ruta sintética de capsaicinoides mediante bifase.....	28
Esquema 6. Síntesis de vainillilamina en dimetilformamida (DMF) y formato de amonio (HCOO ⁻ NH ₄).....	29
Esquema 7. Síntesis de capsaicinoides mediante DCC.....	29
Esquema 8. Mecanismo de DCC.....	30
Esquema 9. Etapas para la síntesis de análogos de capsaicinoides.....	39
Esquema 10. Mecanismo de reacción de Schotten-Baumann.....	66
Esquema 10. Reacción de Schotten-Baumann en un sistema de bifase.....	67
Esquema 11. Síntesis de CAPS.....	69
Esquema 12. Mecanismo de la técnica colorimétrica de inhibición enzimática	85
Esquema 13. Mecanismo de reacción de Schotten-Baumann.....	85

TABLA DE ABREVIATURAS

TABLA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
a.C.	Antes de Cristo
°C	Centígrados
kDa	Kilodaltons
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1
μM	Micromolar
mg	Miligramos
DE₅₀	Dosis efectiva media
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AcOH	Ácido acético
Zn	Zinc
DMF	N, N-dimetilformamida
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
BChE	Butirilcolinesterasa
BCh	Butirilcolina
Å	Ángstrom
XO	Xantina oxidasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ACN	Acetonitrilo
CPF	Cromatografía en capa fina
IR	Infrarrojo
RMN	Resonancia magnética nuclear
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
UV	Ultravioleta-visible

TABLA DE ABREVIATURAS

DMS	Dimetilsulfóxido
RMN-H^1	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN-C^{13}	Resonancia magnética nuclear de carbono
<i>m/z</i>	Masa /carga
M^+	Peso molecular
δ	ppm
mL	Mililitros

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cloruros de ácido utilizados, relación molar y porcentajes de rendimiento de capsaicinoides sintetizados.....	28
Tabla 2. Datos de CAPS 1.....	42
Tabla 3. Datos de CAPS 2.....	43
Tabla 4. Datos de CAPS 3.....	44
Tabla 5. Datos de CAPS 4.....	45
Tabla 6. Datos de CAPS 5.....	46
Tabla 7. Datos de CAPS 6.....	47
Tabla 8. Datos de CAPS 7.....	48
Tabla 9. Datos de CAPS 8.....	49
Tabla 10. Datos de CAPS 9.....	50
Tabla 11. Datos de CAPS 10.....	51
Tabla 12. Porcentajes de rendimientos.....	63
Tabla 13. Señales de RMN ^1H y ^{13}C de CAPS 1.....	69
Tabla 14. Señales de RMN ^1H y ^{13}C de CAPS 2 y CAPS 3.....	71
Tabla 15. Señales de RMN ^1H y ^{13}C de CAPS 5.....	74
Tabla 16. Resultados de inhibición enzimática de AChE y BchE por los análogos	81
Tabla 17. % de inhibición enzimática de AChE y BchE por los análogos a 187.5 $\mu\text{g/ml}$	83
Tabla 18. Interacciones con las enzimas AChE y BChE.....	88

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Desde que la humanidad tomó conciencia, el hombre ha utilizado herramientas de todo tipo para su propio beneficio, como herramientas mecánicas, pieles para protegerse e incluso el uso de plantas ya sea como alimento o como una fuente natural de compuestos o mezclas para distintos fines, como rituales, espirituales e incluso medicinales. Estos conocimientos fueron adquiridos de manera empírica, es decir a prueba y error, y el conocimiento acumulado de varias generaciones pasando de familia en familia, sucesivamente dieron lugar a un conjunto de conocimientos acumulados sobre los primeros remedios curativos y el uso de los productos naturales (metabolitos secundarios) como fuente natural de medicamentos. Con el paso de los años el uso del lenguaje y la escritura fueron más sofisticados y complejos por lo que permitió el registro y la divulgación de los productos naturales como fuente de medicamentos de una manera más extensa de los cuales se tienen registros; estos pueden ser de origen vegetal, animal o mineral. Por ejemplo, los primeros registros de la utilización de los productos naturales se presentaron en tablas de arcilla usada por Mesopotamia (2600 a.C.) en donde registraron el uso de aceites de *Cupressus sempervirens* (ciprés) y especies de *Commiphora* para tratar la tos, algunos resfriados y como antiinflamatorio, que aún se usan en la actualidad (Cortez-Gallardo, 2004). Hoy en día se sabe que el aceite de ciprés contiene sustancias orgánicas bioactivas como α -pineno y β -pineno (Figura 1.)

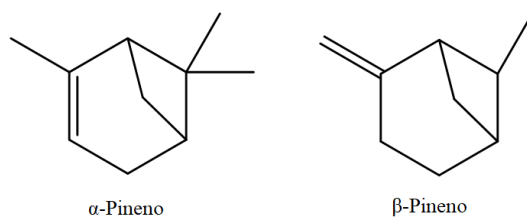


Figura 1. Estructuras de α -pineno y β -pineno.

INTRODUCCIÓN

El uso de productos naturales como medicamentos se ha descrito a lo largo de la historia, en diferentes presentaciones como remedios, aceites o preparados que contienen moléculas bioactivas. Así como los mesopotámicos, podemos encontrar diversas evidencias del uso de productos naturales en la historia de la humanidad, por ejemplo, el *Papiro de Ebers* (2900 a.C.) es un registro farmacéutico egipcio, que documenta más de 700 medicamentos a base de plantas que van desde píldoras, infusiones, hasta ungüentos. La *materia china médica* (1100 a.C.) (Wu Shi Er Bing Fang) que contiene 52 recetas, Shennong Herbal (100 a.C.) con 365 y Tang Herbal (659 d.C.) con 850, estos son algunos registros documentados de los usos naturales productos (Dias et al., 2012).

Los productos naturales han sido la fuente más exitosa de potenciales candidatos a medicamentos, ya que estos proporcionan una diversidad estructural única en comparación con la química combinatoria, además las plantas que generan estos productos naturales, son consideradas la fuente de compuestos químicos más importante que existe. En la naturaleza las plantas producen una gran cantidad de compuestos los cuales pueden tener o no un uso en el metabolismo principal del organismo, como los metabolitos secundarios que son los compuestos orgánicos provenientes del metabolismo secundarios, y no cumplen una función en el metabolismo principal ya que este si tiene una influencia directa en el desarrollo y crecimiento de un organismo, en el cual podemos encontrar aminoácidos, proteínas, ácidos grasos, azúcares y nucleótidos. Esto quiere decir que los metabolitos secundarios cumplen con otras funciones en el organismo y que su ausencia no es letal.

INTRODUCCIÓN

La evolución y adaptación tras millones de años permitió a la naturaleza generar diversos componentes bioactivos del metabolismo secundario, ya que estos generalmente tienen una marcada actividad biológica en organismos superiores como los mamíferos. Como estos metabolitos secundarios no son necesarios en el metabolismo principal de un organismo, estos cumplen otras funciones, algunas funciones conocidas de los metabolitos secundarios son insecticidas, repelentes, antimicrobianos, anti fúngicos, algunos funcionan como repelentes, y otros como atrayentes, incluso existen algunos que ayudan en la propagación de semillas (Dias et al., 2012). Estos metabolitos secundarios pueden estar presentes a lo largo de toda la vida de un organismo, o bien expresarse en diversas circunstancias, por ejemplo, ante algunos patógenos, por exceso de radiación ultravioleta, frente a alguna plaga.

Con el paso del tiempo el hombre se dio cuenta que estos productos naturales tienen propiedades biológicas importantes que, con el uso y desarrollo de la ciencia y el desarrollo más profundo de la química orgánica, se descubrió que estos metabolitos secundarios se pueden aislar y caracterizar. Por ejemplo, la investigación de *Papaver somniferum* resultó en el aislamiento de varios alcaloides, incluida la morfina (Figura 2), un fármaco comercialmente importante y muy famoso, que se reportó por primera vez en 1803.

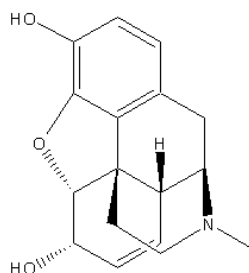


Figura 2. Estructura de la morfina

INTRODUCCIÓN

Un farmacéutico alemán, Friedrich Wilhelm Adam fue el primero en aislar el principio activo mayoritario del opio, tras una serie de 57 experimentos fue capaz de cristalizar un alcaloide de la resina secretada por *Papaver somniferum*, al que llamó *Principium somniferum* del latín productor del sueño, o morfina, nombre derivado de Morfeo el dios del sueño griego, por su capacidad de inducir el sueño. Fue en la década de 1870 que la morfina cruda derivada de la planta *P. somniferum* se hirvió en acético anhídrido (Ac_2O) para producir diacetilmorfina, conocida como heroína (Figura 3) y se descubrió que se convierte fácilmente en codeína (Gómez, 2006). Históricamente, está documentado que los sumerios y los antiguos griegos usaban extractos de amapola con fines medicinales, mientras que los árabes describieron el opio como una sustancia sumamente adictiva.

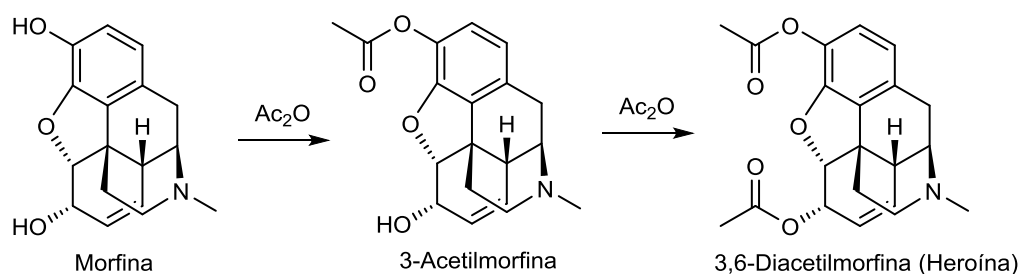


Figura 3. Reacción esquemática de la síntesis de heroína con anhídrido acético.

Originalmente el descubrimiento de la síntesis de heroína era con fines terapéuticos, ya que se quería sintetizar análogos menos potentes y adictivos como la codeína. Esta acetilación produjo un compuesto más potente que la morfina hasta en un 50%, que por sus características lo hacía más liposoluble, haciendo que incremente su entrada al sistema nervioso central. Inicialmente se comercializó con el nombre de “Heroína” por la compañía Bayer, como sedante y antitusígeno. Posteriormente se percató que producía una adicción

INTRODUCCIÓN

mucho más fuerte que la morfina, por lo que se tuvo que retirar del mercado. En el año de 1913 la compañía Bayer suspendió toda producción de este producto.

Si bien la modificación química de los productos naturales puede producir cambios que aumenten o potencialicen ciertos efectos deseados, también puede ser perjudicial al momento de modificar parte de la estructura original. Se pueden generar efectos secundarios más potentes y marcados, como es el caso de la morfina, donde se muestra que las modificaciones químicas pueden alterar los efectos farmacológicos en gran medida. Sin embargo, las modificaciones químicas también pueden ayudar a disminuir efectos secundarios, conservando el efecto deseado, tal es el caso del ácido salicílico. Se sabe que los salicilatos poseen acción analgésica, antiinflamatoria y antipirética, estas actividades ya eran conocidas por los egipcios. En el año 1862, un arqueólogo y comerciante en antigüedades inglés Edwin Smith, adquirió unos rollos de papiro correspondientes al año 1534 a.C. que constituían un tratado de medicina de la época "*Papiro de Smith*". En dicho tratado se establecen principalmente una serie de tratamientos quirúrgicos, que se acompañan con algunos métodos curativos a base de plantas medicinales. Una de ellas es la corteza del *Tyret*, o sauce blanco (*Salix alba L.*), que crece en los humedales del río Nilo; también se hacía mención del sauce y sus propiedades medicinales como en el *Papiro de Ebers*, que se mencionó anteriormente (Braña et al., 2005). En el año de 1853 un químico francés Charles Frederic Gerhardt consiguió acetilar el ácido salicílico (Figura 4), lo cual quedó en el olvido un tiempo. Años más tarde el trabajo sería retomado por el químico Félix Hoffman, cuyo padre padecía de reumatismo crónico tratado con ácido salicílico, el cual había destrozado su estómago ya que el ácido salicílico es muy ácido y tiende a afectar de manera grave las

INTRODUCCIÓN

mucosas del estómago provocando úlceras gástricas. Es por eso que Hoffman decide administrar el derivado del ácido salicílico a su padre, es entonces que así fue como el 10 de octubre de 1887, Hoffman describe la forma pura y estable del ácido acetil salicílico. Este, al tener esta modificación química, disminuyó la acidez del ácido salicílico y era más tolerado que este, pero conservando sus propiedades farmacológicas como su propiedad antiinflamatoria, antipirética y de analgesia. En el año de 1934, Bayer lo patenta dando lugar a el famoso medicamento conocido como Aspirina.

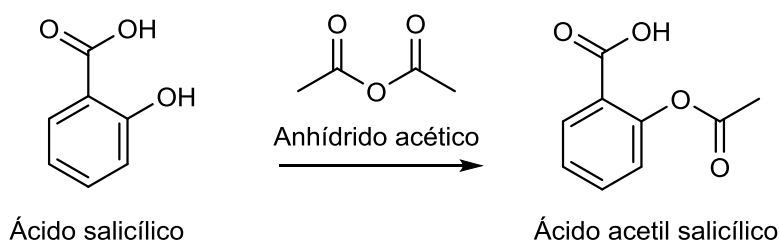


Figura 4. Reacción de síntesis de Aspirina con anhídrido acético

Estos han sido algunos ejemplos de cómo el uso de productos naturales junto con la química orgánica da paso a la investigación más profunda y científica sobre los productos naturales y su potencial uso como medicamentos, junto con las herramientas sintéticas para poder potenciar cierto efecto farmacológico, o bien disminuir los efectos secundarios de un compuesto orgánico en particular. Esto da lugar a la Química Medicinal, una rama de la química que tiene como finalidad el desarrollo, el diseño y la síntesis de nuevos candidatos a fármacos.

INTRODUCCIÓN

Existen diversas reacciones químicas que pueden sufrir estos metabolitos secundarios para cambiar su estructura original, desde acetilaciones, oxidaciones, metilaciones etc. para poder modificar nuestro compuesto original y a partir de las modificaciones hechas observar su actividad biológica y establecer relaciones entre grupos funcionales y actividades biológicas; esto se logra generando una serie de compuestos con cambios en su estructura y evaluando sus respectivas actividades biológica.

Con el avance de la tecnología se han creado softwares que pueden ayudarnos a predecir y entender cómo es que una sustancia química con modificaciones estructurales interacciona biológicamente en un receptor dado y a predecir su afinidad por cierto receptor, sus propiedades fisicoquímicas e incluso su disposición espacial. Todo esto mediante algoritmos y el uso de parámetros físicos e incluso cuánticos para poder calcular estas predicciones, y de esa forma entender como debido a nuestras modificaciones químicas de un compuesto, este está interaccionando en un sistema biológico simulado por ordenador.

El nombre que recibe el acoplamiento de un compuesto con una diana se conoce como *Docking molecular* o *Acoplamiento molecular* (Figura 5.) en el cual mediante estas herramientas informáticas se puede predecir la afinidad de una molécula con un receptor; un ejemplo sería la afinidad de un fármaco con una enzima.

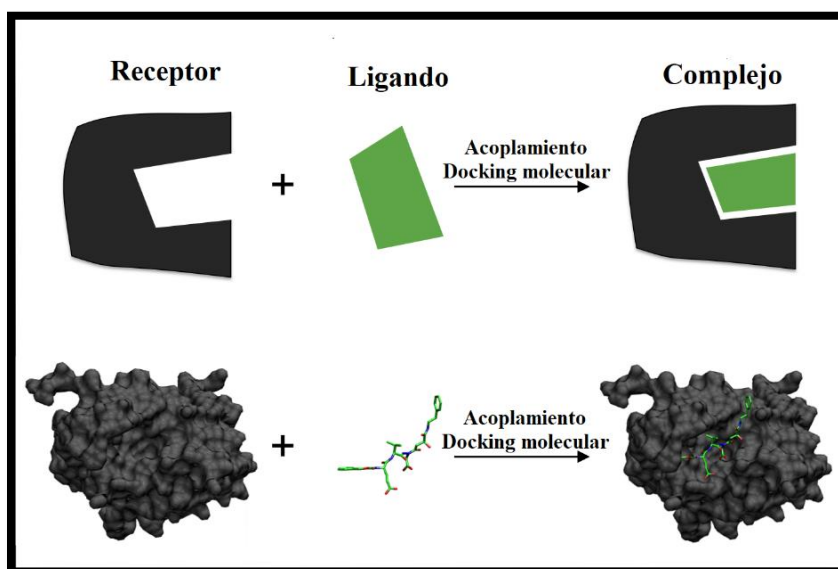


Figura 5. Acoplamiento entre un ligando y su receptor

Esto se puede realizar en diversos softwares para poder predecir estas interacciones y poder generar una serie de datos importantes que nos ayudan en este diseño de fármacos. En esta tesis se utilizará el software *UCSF Chimera* (University of California, San Francisco) junto con el algoritmo de acoplamiento molecular *AutoDock Vina* para poder generar computacionalmente la interacción ligando-receptor de los compuestos a sintetizar (Yang et al., 2012).

En la actualidad se hacen investigaciones de síntesis orgánica de productos naturales para descubrir sus múltiples aplicaciones, principalmente medicinales, junto con las herramientas computacionales que nos ayudan a entender mejor el funcionamiento y la relación estructura-actividad biológica. En la presente tesis se analizan nuevos análogos sintéticos de la capsaicina, conocidos como capsaicinoides, con perfil de actividad de inhibición enzimática de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, junto la utilización de un software para generar

INTRODUCCION

computacionalmente el *Docking molecular*, para ayudar a entender como interaccionan los análogos sintetizados con las enzimas.

La capsaicina (Figura 6.) es un producto natural, específicamente un metabolito secundario del fruto del chile, del género *Capsicum*, es la molécula responsable de la pungencia, sabor picante, ardor y comezón que causa el fruto del chile. Existen en la naturaleza compuestos análogos a la capsaicina, los cuales se conocen como capsaicinoides, estos son compuestos que guardan una relación estructural con la capsaicina y que tienen ligeras modificaciones en su esqueleto base.

Se han hecho investigaciones que demuestran que la capsaicina tiene numerosas propiedades farmacológicas, como la antiinflamatoria, antimicrobiana, anti fúngica, citotóxica e incluso la capacidad de inhibición enzimática de enzimas como acetilcolinesterasa (Orhan et al., 2007).

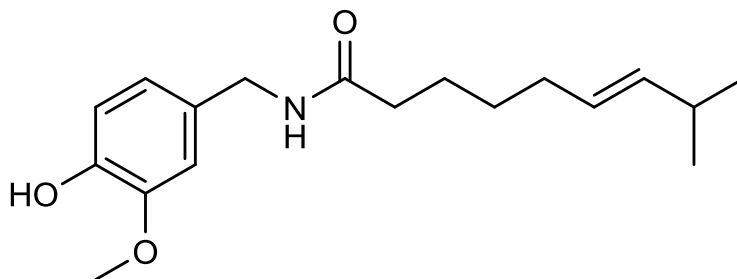


Figura 6. Estructura química de capsaicina

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La síntesis de análogos de tipo capsaicinoide permitirá la obtención de moléculas bioactivas con propiedades de inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

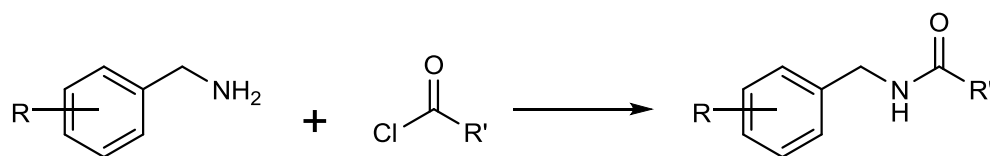


Figura 7. Reacción global de síntesis de capsaicinoides

**OBJETIVOS
GENERALES Y
PARTICULARES**

OBJETIVO GENERALE Y PARTICULARES

Objetivo general:

Obtener sintéticamente y evaluar la actividad inhibitoria de una serie de análogos de capsaicinoides frente a enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.

Objetivos particulares:

1. Sintetizar análogos de tipo capsaicinoide mediante reacciones de Schotten-Baumann.
2. Caracterizar estructuralmente los productos sintetizados mediante técnicas espectroscópicas y de espectrometría de masas.
3. Evaluar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa por los productos sintetizados.
4. Emplear herramientas quimioinformáticas para analizar la interacción ligando-receptor con las enzimas evaluadas.

GENERALIDADES

GENERALIDADES

Los chiles son muy populares alrededor del mundo, siendo estos utilizados mayormente en el área culinaria utilizados como condimento, o como parte esencial de ciertos platillos, aunque también poseen otras aplicaciones farmacológicas. El consumo del chile se ha llevado a cabo por mucho tiempo, algunos se remontan a más de 8000 años (entre 7000 y 6000 a.C.) por los habitantes de México, en el valle de Tehuacán, y los cultivos de chiles comenzaron alrededor de 5200-3400 a.C. siendo una de las plantas domesticadas más antiguas. La expansión de este fruto por el mundo comenzó con el descubrimiento del Nuevo mundo, a partir de donde se introdujo a Europa y su cultivo comenzó a expandirse a otras partes del mundo. El chile que es un fruto del género *Capsicum* (Figura 8.), es considerado uno de los alimentos más distribuidos a nivel global y que se encuentra en casi todos los países (Basith et al., 2016).



Figura 8. Frutos del género *Capsicum*

Las plantas del género *Capsicum* pertenecen a la familia de las Solanáceas, que comprende unos 110 géneros y 2480 especies, en donde también podemos encontrar a la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*), la berenjena (*Solanum melongena*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) entre otras

especies. El género *Capsicum* dentro de las solanáceas es el único capaz de producir capsaicinoides, metabolitos secundarios que son los responsables de la pungencia, el picor y ardor del chile. El capsaicinoide principal dentro del chile es la capsaicina, seguida de dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina y homocapsaicina (Figura 9.) de los cuales se han estudiado y encontrado diversas propiedades farmacológicas como antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno (Martínez, 2019). La capsaicina es el capsaicinoide más representativo ya que es el más abundante y de mayor concentración además de ser el más potente en cuanto a efectos de los capsaicinoides.

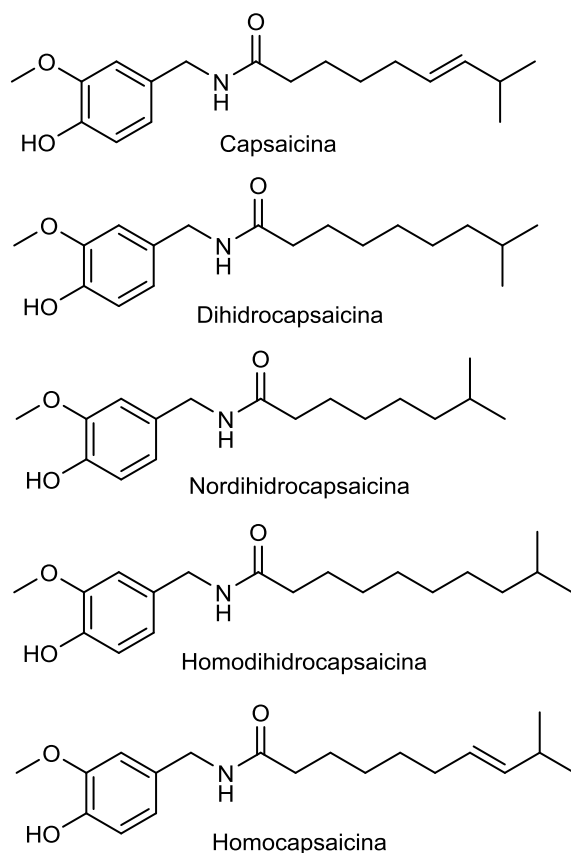


Figura 9. Capsaicinoides de frutos del género *Capsicum*

GENERALIDADES

Los capsaicinoides se cree que evolutivamente la planta los sintetiza para poder disuadir a diferentes mamíferos de comer sus frutos ya que esto dañaría a las semillas haciéndolas incapaces de germinar, esto les da una protección sobre los mamíferos. A diferencia de las aves, las cuales al ingerir este tipo de frutos no presentan los efectos pungentes e irritantes hacia este tipo de animales, se piensa que las aves funcionan como vectores, esto quiere decir que al no sentir los efectos de los capsaicinoides pueden alimentarse del fruto fácilmente, haciendo que las semillas tenga una mejor distribución geográfica, ya que investigaciones han demostrado que las semillas no se ven alteradas al pasar por el proceso de digestión de las aves reforzando esta teoría (Jordt et al., 2002).

Dentro del fruto del chile los capsaicinoides se encuentran en mayor concentración en la parte del fruto denominada placenta (Figura 10.) que es donde las semillas se unen a la parte superior del fruto. Se cree que los capsaicinoides se encuentran en esta parte mayormente concentrados debido a que por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas protege a las semillas de diversos microorganismos que pudieran afectar a las semillas, y se ha observado que los frutos no suelen tener afecciones por hongos o bacterias en la parte donde se concentran las semillas.

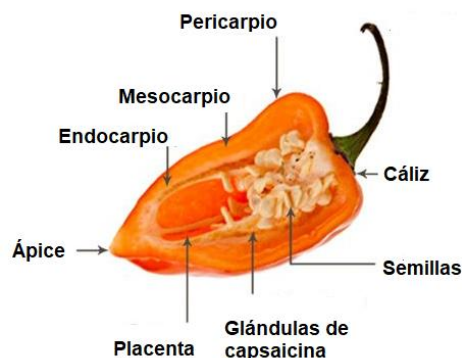


Figura 10. Partes de un fruto del género *Capsicum* de un chile

Propiedades químicas de la capsaicina

La capsaicina (trans-8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) es un alcaloide de tipo protoalcaloide extraído del fruto de plantas del género *Capsicum*; la capsaicina es un miembro de la familia de los vainilloides, que son compuestos orgánicos que contienen un núcleo similar a la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), este núcleo está presente en diversos compuestos como en la vainilla, el eugenol presente en el clavo, gingerol en el jengibre y la piperina presente en la pimienta negra (Figura 11.) Como en otros vainilloides esta característica es importante ya que el núcleo vainilloide le confiere propiedades biológicas (Morales et al., 2016).

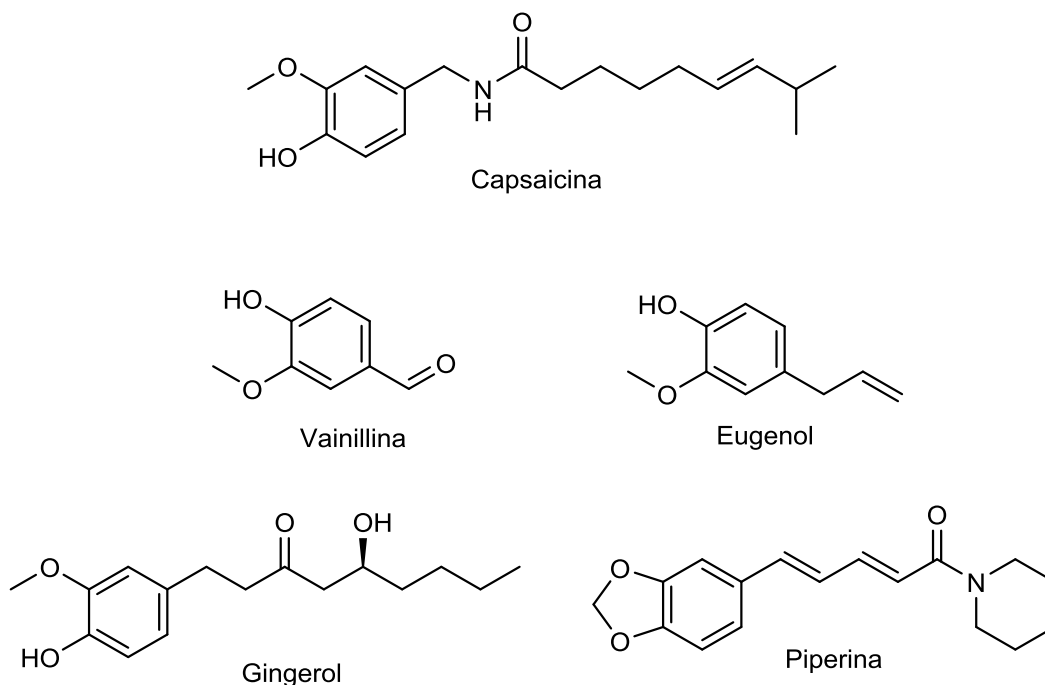


Figura 11. Ejemplos de algunos vainilloides

La capsaicina es de carácter lipofílico sin color y olor, además de cristalina en su forma pura, y pungente al contacto, con un punto de fusión de 62 a 65 °C y tiene un peso molecular de 305.4 kDa. No es soluble en agua, pero es soluble en solventes polares orgánicos como en los alcoholes y cuenta con una fórmula molecular de $C_{18}H_{27}NO_3$. La capsaicina comprende el 80-90% de los capsaicinoides encontrados en el fruto del chile en concentraciones de 0.1-1%. La capsaicina presenta una isomerización *trans/cis* debido a su doble enlace, pero siempre se encuentra en su forma *trans* ya que en su forma *cis* las cadenas hidrocarbonadas están muy cerca lo que causa que tengan repelencia entre sí (Luo et al., 2011). La estructura de la capsaicina consiste en tres regiones importantes en el grupo vainilloide el cual es el anillo aromático sustituido (**A**), un enlace químico de tipo amida (**B**), y una cadena alifática (**C**). Estas son las regiones en las que se divide la capsaicina (Figura 12.)

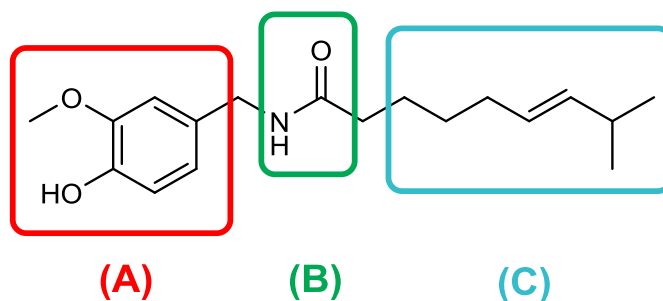


Figura 12. Estructura química de la capsaicina y sus tres regiones importantes (A) región aromática, (B) enlace amida y (C) cadena alifática.

Los capsaicinoides de origen natural contienen estas tres regiones importantes en su estructura química, lo que le confieren esas propiedades biológicas. Aunque varían un poco en cuanto a su longitud de cadena alifática, así como en su saturación, conservan el anillo

aromático (**A**), en enlace amida (**B**) y la cadena alifática (**C**), siendo esta última la región que más varía en los capsaicinoides. El anillo en (**A**), es esencial para una potente actividad agonista, y el grupo fenólico 4-OH en análogos de capsaicina es de particular importancia ya que las propiedades donador / aceptor de enlaces H del grupo fenol son clave para diversas actividades biológicas. Se requiere un grupo hidrófobo, por ejemplo, una cadena de octilo o un grupo o grupo bencilo sustituido, para una alta potencia. Óptimamente, dichos grupos alquilo están sustituidos en la posición *p* (para) por pequeños restos hidrófobos. Por otro lado, (Barbero et al. 2010) informaron sobre la importancia de las longitudes de las cadenas laterales para la bioactividad de capsaicinoides, que fue mayor entre 8 y 9 átomos de carbono.

Existen otro grupo de moléculas presentes de forma natural en el género *Capsicum* que también poseen propiedades similares y estructuras químicas muy parecidas a los capsaicinoides. Son los capsinoides que, a diferencia de los capsaicinoides, poseen un enlace químico de tipo éster en lugar de un enlace amida. Estos metabolitos secundarios muestran efectos similares a los capsaicinoides pero en menor grado, ya que por ejemplo son menos pungentes, y en medios acuosos tienen a descomponerse, esto quiere decir que se hidrolizan fácilmente. El capsinoide más representativo de este grupo es el capsiato, que guarda una estrecha relación estructural a la capsaicina (Figura 13.).

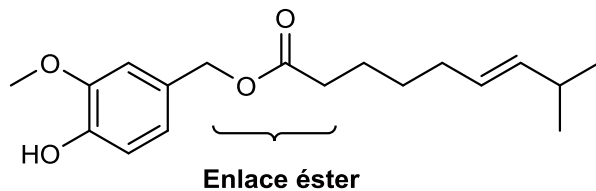


Figura 13. Estructura química de capsiato

Propiedades biológicas de los capsaicinoides

Los capsaicinoides, además de su uso culinario se han utilizado en una amplia gama de otras aplicaciones incluyendo la disuasión de insectos, productos de defensa personal conocido como el gas pimienta (Figura 14.), también como repelente de ardillas, lociones protectoras para repeler a los tiburones, armas químicas y una gran cantidad de aplicaciones medicinales (Shaherin et al., 2016).

En la medicina tradicional, el chile es consumido por personas en países tropicales para tolerar el calor, ya que la capsaicina aumenta la vasodilatación de la piel y la transpiración provocando una mayor pérdida de calor. Otras aplicaciones medicinales populares incluyen tratamientos para la tos, dolor de garganta, amigdalitis, úlceras gástricas, dolor de espalda, cólera, gota, retención de agua, reumatismo, calambres, diarrea, dispepsia y dolor de muelas, estimulación del apetito y restauración del crecimiento del cabello, esta última siendo muy popular ya que se encuentra en presentaciones como los shampos, ya que se sabe que la capsaicina aumenta el flujo sanguíneo en el área donde se aplica, con un aumento de la temperatura lo que estimula a los folículos capilares (Basith et al.,2016)



Figura 14. Gas pimienta

GENERALIDADES

Diversas investigaciones han demostrado que la capsaicina y sus análogos capsaicinoides poseen actividad biológica, la más conocida es la actividad analgésica y el capsaicinoide más estudiado es la capsaicina, se ha demostrado que la capsaicina por vía oral y vía tópica ayuda a reducir la inflamación y la hiperalgesia química como en la artritis reumatoide, la osteoartritis, la fibromialgia, ya que reduce el escozor y la inflamación, actualmente se encuentra en forma farmacéutica de pomadas y parches (Figura 15.) para tratar estos padecimientos (Evangelista et al., 2015). El efecto analgésico de la capsaicina está mediado por el Receptor Potencial Transitorio miembro de la subfamilia Vainilloide 1, conocido como TRPV1 por sus siglas en inglés, que pertenecen a los receptores de canales catiónicos. La capsaicina es un agonista de estos receptores, la unión a los receptores TRPV1 desencadena una cantidad de eventos moleculares que conllevan a la disminución de sustancia “P” (una proteína que funciona como neurotransmisor y modulador del dolor), y una desensibilización de neuronas sensoriales que conducen a su actividad analgésica. Los receptores TRPV1 son receptores intramembranales no específicos, altamente distribuidos en tejidos como el riñón, la vejiga, el cerebro, son permeables para iones sodio y calcio, que responden también a las temperaturas altas (arriba de 43 C°), estimulación dolorosa, acidez (protones) y osmolaridad (Hayman et al., 2008).



Figura 15. Presentaciones farmacéuticas de capsaicina en crema y parches

La capsaicina ha sido estudiada por su efecto gastroprotector, ya que diversas investigaciones sugieren que, a ciertas dosis, la capsaicina protege al sistema gastrointestinal de diversos agentes irritantes. Por ejemplo, un estudio realizado por Gyula et al. (2004) demostró que a bajas concentraciones (0.13–160 μM) en ratas, la capsaicina protege la mucosa del estómago contra la ulceración por etanol, mientras que cuando se administran dosis altas en concentraciones de 1 a 2 mg / ml en estómagos de rata, empeora el daño a la mucosa gástrica causado por etanol o aspirina utilizado. En un estudio con 84 sujetos humanos sanos, se descubrió que la capsaicina tenía propiedades protectoras contra la gastropatía asociada a etanol e indometacina (un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), con una dosis DE_{50} de 400 mg de capsaicina. Una posible explicación es que la capsaicina media el efecto antiulceroso mediante vasodilatación y aumento del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica y esto está mediado por óxido nítrico liberado por acción de los receptores TRPV1, ya que las células gástricas contienen estos receptores. En este estudio se demostró que la capsaicina a dosis bajas tiene un efecto gastroprotector, por lo que posiblemente la ingestión concurrente de alimentos picantes que contienen capsaicina puede reducir la incidencia de ulceración gástrica en pacientes que toman AINES.

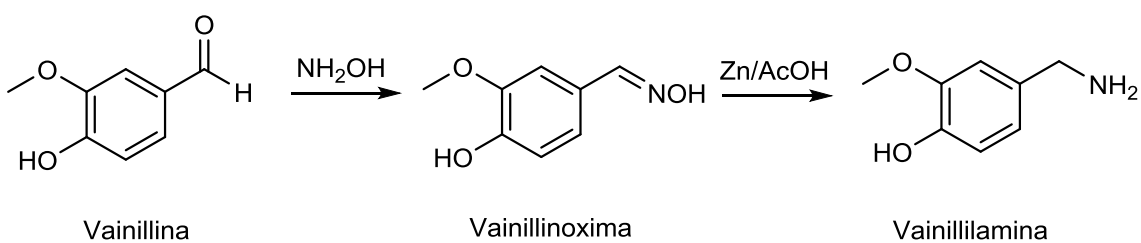
La obesidad está involucrada en el desarrollo de trastornos relacionados como la diabetes, hiperlipidemia, hígado graso y enfermedades cardiovasculares (Zhang et al., 2013), la capsaicina se ha estudiado en parte para observar los efectos que tiene sobre el incremento del metabolismo y el gasto de energía, hay investigaciones que indican que los receptores TRPV1 al interactuar con su agonista la capsaicina están involucrados en el gasto de energía y pueden representar una estrategia potencial para tratar la obesidad. La capsaicina

puede regular la energía y el metabolismo reduciendo el peso del tejido adiposo y aumentando la oxidación de lípidos, así como la termogénesis. Zhang et al., 2013 descubrieron que el tratamiento con capsaicina inhibía la adipogénesis de preadipocitos *in vitro* y previno la obesidad inducida por una dieta alta en grasas. Por otra parte, la crónica activación del receptor TRPV1 por la capsaicina en la dieta redujo el depósito de lípidos en el hígado, reduciendo la obesidad abdominal.

En un estudio realizado por Ilkay et al. (2007) en donde se utilizaron trece diferentes alcaloides, entre ellos la capsaicina, se evaluaron *in vitro* sus actividades de inhibición enzimática frente a las enzimas Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa. Estas dos enzimas son de importancia médica ya que algunos tratamientos para el Alzheimer están enfocados en la inhibición enzimática de estas dos enzimas, ya que ayudan en la reducción de la actividad colinérgica, mejorando la calidad de vida de las personas que sufren esta condición. Los alcaloides fueron evaluados a una concentración de 1 mg/ml, en donde solo la capsaicina fue significativamente activa obteniendo valores de un porcentaje de inhibición enzimática para Acetilcolinesterasa de 62.7 ± 0.79 % y para Butirilcolinesterasa de 75.3 ± 0.98 % respectivamente, siendo superados únicamente por el control Galantamina (99.8 ± 0.31 % y 80.3 ± 1.14 %) respectivamente, que es un inhibidor selectivo de estas enzimas. Debido a esto, se concluyó que la capsaicina tiene un potencial de inhibición enzimática frente a estas dos enzimas y se sugieren estudios a futuro para poder investigar a fondo el mecanismo por el cual actúa sobre estas enzimas.

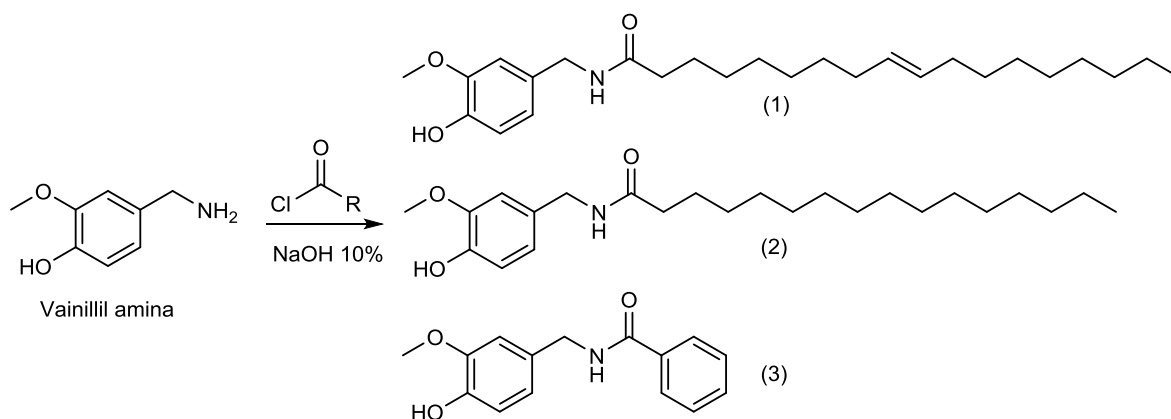
Síntesis de capsaicinoides

Se han descrito diversos métodos para la síntesis de análogos capsaicinoides; una parte fundamental es la generación de aminas bencílicas ya que son un precursor de los capsaicinoides, donde una de las rutas sintéticas para la obtención de aminas bencílicas es partiendo de vainillina. Abubakar et al. en el año 2018 realizaron una síntesis de análogos capsaicinoides donde partieron de vainillina para generar un intermediario oxima, haciendo reaccionar vainillina con hidroxilamina (NH_2OH), para posteriormente llevar a cabo una reducción por Zinc (Zn) y Ácido acético (AcOH) que da lugar a una amina primaria (Esquema 1.).



Esquema 1. Ruta sintética para la generación de vainillilamina

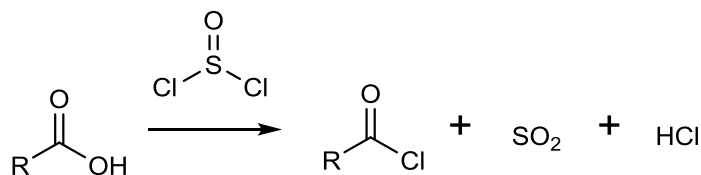
Una vez sintetizada la amina se hizo reaccionar con diferentes cloruros de ácido, como lo fueron cloruro de oleilo, cloruro de benzoilo y cloruro de palmitoilo. Estos diferentes cloruros de ácido se pusieron a reaccionar con vainillilamina en una solución acuosa de hidróxido de sodio al 10% para obtener una serie de capsaicinoides sintéticos (Esquema 2.). Estas reacciones para la generación de amidas a partir de aminas y cloruros de ácido son bastante conocidas y tienen como nombre reacciones de Schotten-Baumann.



Esquema 2. Síntesis de análogos capsaicinoides usando cloruros de ácido (1) Cloruro de oleilo (2) Cloruro de palmitoilo y (3) Cloruro de benzoilo

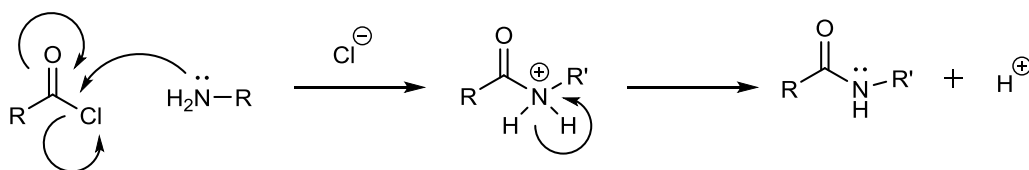
Estos análogos sintetizados fueron realizados para demostrar una rápida, selectiva y sencilla síntesis de análogos capsaicinoides además de una reducción de oximas a aminas utilizando reactivos de bajo costo como el zinc, obteniendo buenos rendimientos de 82% para el análogo sintetizado con cloruro de oleilo, 81% de rendimiento para el análogo sintetizado con cloruro de palmitoilo y 74% de rendimiento para el análogo sintetizado con cloruro de benzoilo respectivamente.

Por otro lado, los cloruros de ácido alifáticos son fácilmente sintetizados a partir de ácidos carboxílicos y reactivos como el cloruro de tionilo, son reacciones bien conocidas con buenos porcentajes de rendimiento. Por ejemplo, en el año de 1948 Zuffanti S. realizó la síntesis de cloruro *o*-toluico a partir de ácido *o*-toluico, haciendo reaccionar el ácido únicamente con cloruro de tionilo obteniendo un porcentaje de rendimiento del 91%. El uso de cloruro de tionilo para poder generar cloruros de ácido (Esquema 3.) es bastante utilizado ya que los subproductos que se generan son gases.



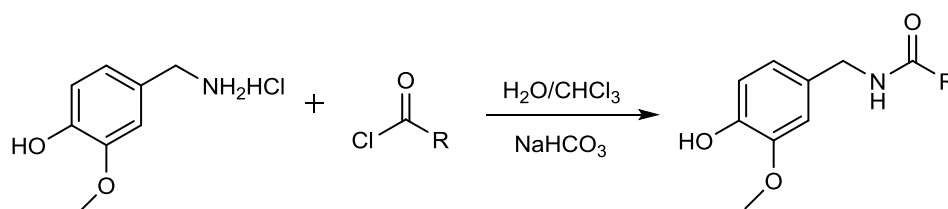
Esquema 3. Síntesis de cloruro de ácido con cloruro de tionilo

Como se mencionó anteriormente las reacciones para generar amidas a partir de aminas y cloruros de ácido se denominan reacciones de Schotten-Baumann y generalmente se llevan a cabo en medios básicos, ya que uno de los subproductos en estas reacciones es la generación de ácido clorhídrico (HCl), por lo cual una base ayuda a neutralizar este ácido que se libera. El mecanismo se lleva a cabo por un ataque nucleofílico por parte de la amina el cual se lleva a cabo en el carbonilo, posteriormente desplazaría el cloro (Cl) ya que es un buen grupo saliente, y una vez condensada la amida el par de electrones migraría de nuevo hacia el nitrógeno liberando H^+ por lo que un medio básico neutralizaría el ácido que se esté generando en la reacción (Esquema 4.)



Esquema 4. Mecanismo de reacción Schotten Baumann

Un trabajo realizado por Bo Wang et al., 2009 en el cual se realizó la síntesis de doce análogos sintéticos capsaicinoides se utilizó vainillilamina en forma de clorhidrato, ya que comercialmente así es como se consigue vainillilamina debido a que en esta forma es más estable, la cual se puso a reaccionar con diferentes cloruros de ácido en un medio bifásico de agua y cloroformo (Esquema 5.). Este procedimiento fue eficiente y sencillo para la síntesis de análogos capsaicinoides, con altos porcentajes de rendimiento y productos de alta pureza obtenidos después de un sencillo work-up, con rendimientos altos los cuales oscilaron entre 93% para el más bajo y 96% para el más alto respectivamente (Tabla 1.).

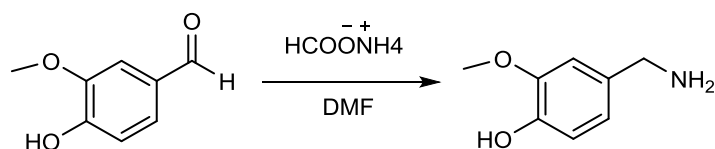


Esquema 5. Ruta sintética de capsaicinoides mediante bifase

Corrida	Cloruro de ácido	RCOCl/Vainillilamina·HCl Relación	Rendimiento %
1	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COCl	1:1	96
2	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COCl	1:1	95
3	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COCl	1:1	95
4	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COCl	1:1	95
5	CH ₃ (CH ₂) ₈ COCl	1:1	95
6	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₆ COCl	1:1	95
7	CH ₃ (CH ₂) ₆ COCl	1:1	94
8	CH ₃ (CH ₂) ₄ COCl	1.01:1	94
9	CH ₃ (CH ₂) ₂ COCl	1.16:1	93
10	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COCl	1:1	96
11	C ₆ H ₆ COCl	1:1	96
12	2-ClC ₆ H ₆ COCl	1:1	94

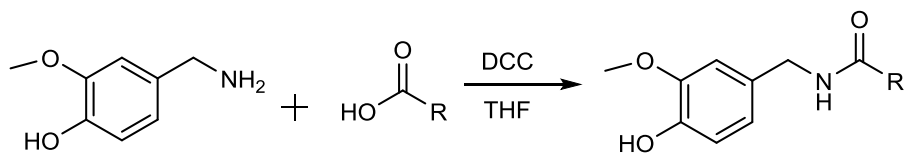
Tabla 1. Cloruros de ácido utilizados, relación molar y porcentajes de rendimiento de capsaicinoides sintetizados

En un trabajo realizado por Santos et al. 2012 donde se estudió la actividad antimicrobiana de análogos sintéticos capsaicinoides y extractos de *Capsicum annuum* para ver su actividad frente a *Streptococcus mutans*, que es la bacteria causante de la carie dental, se sintetizaron 3 diferentes capsaicinoides. Para ello se realizó la síntesis de vainillilamina (Esquema 6) a partir de vainillina y formato de amonio disuelta en dimetilformamida (DMF) en reflujo, esta reacción es conocida como reacción de Leukart.



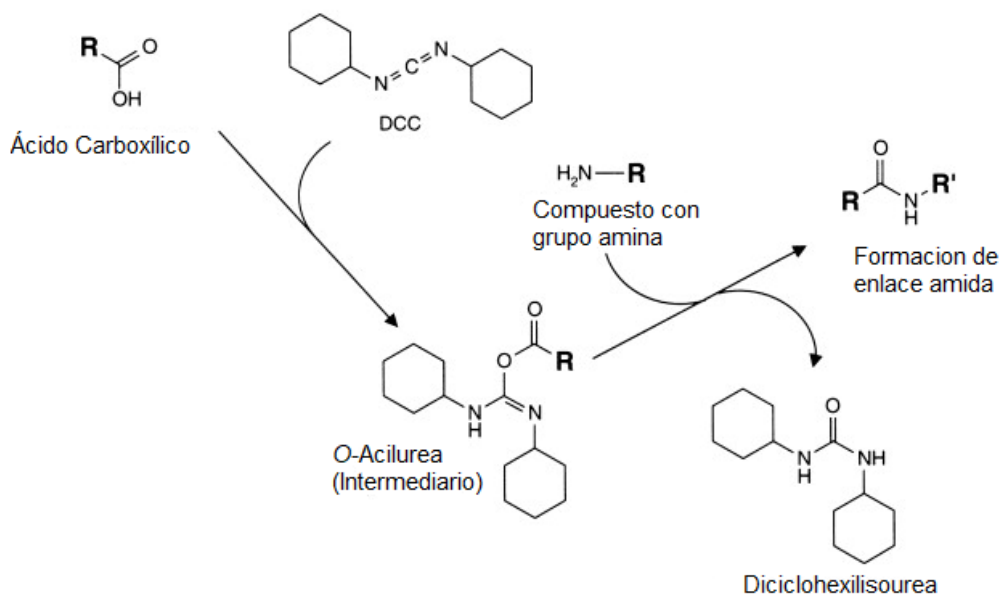
Esquema 6. Síntesis de vainillilamina en dimetilformamida (DMF) y formato de amonio ($\text{HCOO}^-\text{NH}_4^+$)

Posteriormente para la reacción de condensación y generar el enlace amida, se utilizó DCC (Diciclohexilcarbodiimida) en THF (tetrahidrofurano) para la generación de amidas. Esta es otra ruta sintética para generar capsaicinoides (Esquema 7) en donde se parte de la amina y un ácido carboxílico.



Esquema 7. Síntesis de capsaicinoides mediante DCC.

La dicitlohexilcarbodiimida (DCC) es un reactivo que se usa para la síntesis de amidas y ésteres. En el caso de la síntesis de amidas, la DCC reacciona con el ácido carboxílico para producir un intermediario *O*-Acilurea, posteriormente el intermediario reacciona con la amina, generando lo que es la amida y como subproducto la dicitlohexilisourea (Esquema 8).



Esquema 8. Mecanismo de DCC

Empleando esta metodología en este trabajo se sintetizaron cuatro capsaicinoides diferentes en los cuales cambiaron no solo la parte alifática, sino que también la parte aromática. Se sintetizó un capsaicinoide de tipo feniletilamina, también se invirtió el grupo amida quedando opuesto el enlace, donde la cadena alifática es donde se encuentra la parte más cercana al grupo amino y el anillo aromático más cercano al carbonilo (Figura 16). Cabe mencionar que los compuestos sintetizados en este trabajo tuvieron una buena actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, debido a que pudieron inhibir el crecimiento de estas bacterias

superando incluso al control, por lo que se sugiere continuar la investigación de este tipo de análogos de capsaicinoides.

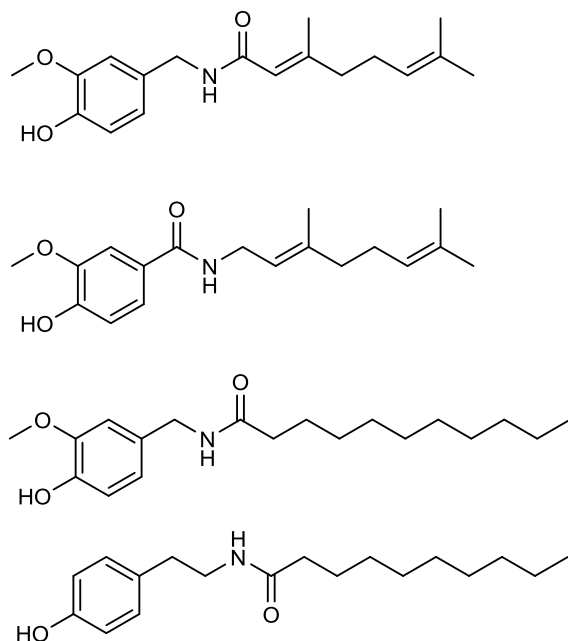


Figura 16. Capsaicinoides sintetizados con DCC

Enzima Acetilcolinesterasa

Las colinesterasas son una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en colina y ácido acético, esto es una reacción necesaria ya que permite que una neurona colinérgica regrese a su estado inicial después de la activación (Figura 17). La enzima acetilcolinesterasa (AChE) se encuentra altamente distribuida en muchos tipos de tejidos conductores como los músculos, los nervios, fibras motoras y sensoriales. La enzima existe en diferentes formas moleculares las cuales poseen propiedades catalíticas similares, pero difieren en su ensamblaje oligomérico y su modo de unión a la superficie de la membrana (Mirjana et al., 2013).

GENERALIDADES

La enzima AChE está presente en la mayoría de los seres vivos, se encuentra en invertebrados como los insectos; en caso de los mamíferos, específicamente en el cerebro la mayor parte de la enzima AChE se presenta como tetramérica. La ACh es un neurotransmisor que tiene un papel importante en la actividad neuromuscular, ya que en la unión neuromuscular interviene en el nervio motor y el musculo esquelético y en la sinapsis del sistema nervioso central (Covolic et al., 2013).

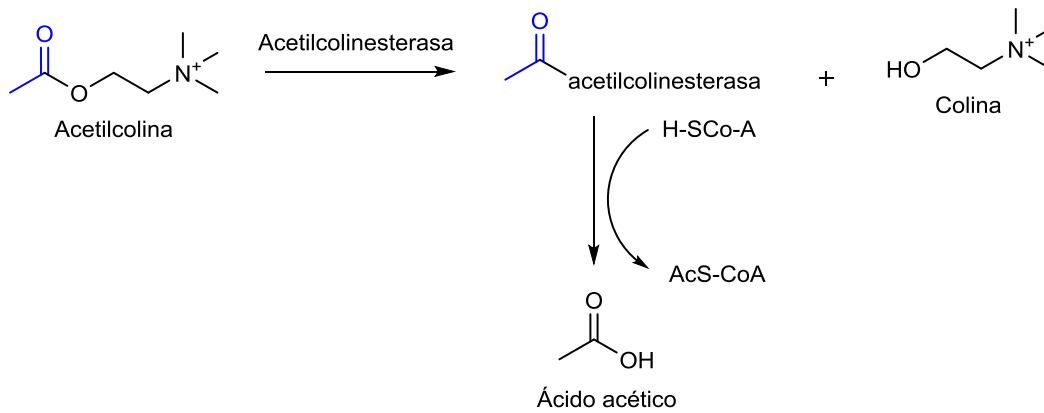


Figura 17. Hidrólisis de acetilcolina

La función principal de AChE es la terminación del impulso de transmisión en la sinapsis colinérgica hidrolizando rápidamente a ACh, su función es tan notoria que AChE puede hidrolizar 25000 moléculas de ACh por segundo. La enzima AChE tiene una forma elipsoidal con unas dimensiones de 45 x 60 x 65 Ångstroms (Å), la enzima es una proteína de tipo α/β que contiene un centro mixto de 12 hojas β rodeada por 14 hélices α ; el sitio activo catalítico de la enzima está localizado a 4 Å del fondo de la enzima y comprende dos subsitios, los cuales son el subsitio aniónico y el subsitio estérico que es la parte en donde se cataliza la

reacción y donde se une la ACh, respectivamente. El subsitio estérico es el lugar en donde ACh se hidroliza en acetato y colina; esta parte contiene sitios catalíticos similares a otras hidrolasas, estos residuos de aminoácidos en el caso de AChE de *Tetronarce californica* son serina 200, histidina 440 y glutamato 327. Además, los aminoácidos forman un sitio de unión periférico aniónico (PA) en el cual las interacciones catión- π con la parte positivamente cargada de ACh ayudan a guiar la molécula al sitio catalítico; y un sitio oxianiónico en donde se encuentran residuos de aminoácidos que forman puentes de hidrógeno con el grupo carbonilo de ACh (Figura 18) Snezana et al., 2018.

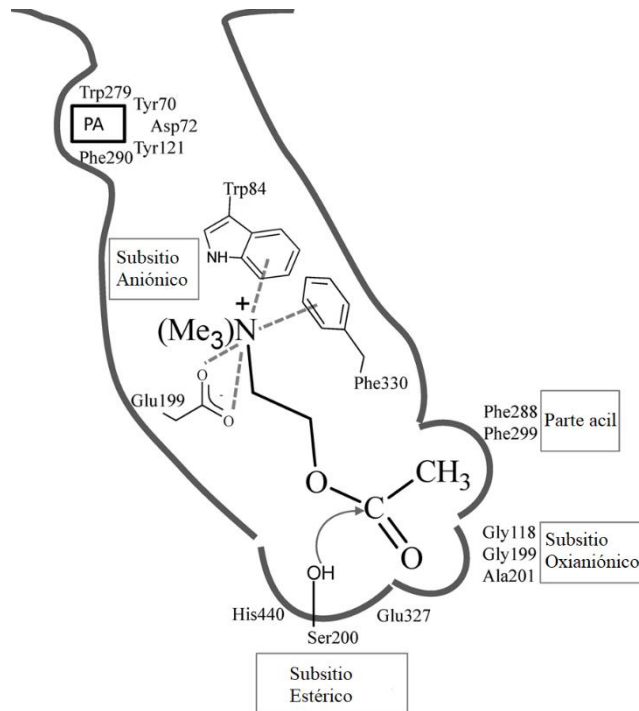


Figura 18. Sitio catalítico de AChE

Los inhibidores de AChE se clasifican en dos grupos: reversibles e irreversibles, esto quiere decir que existen inhibidores de AChE que generan enlaces no covalentes con la enzima y

permiten regresar a su forma normal después de un tiempo, y los irreversibles los cuales se unen covalentemente a la enzima, lo que genera un cambio estructural inhabilitando a la enzima. Los inhibidores reversibles tienen aplicaciones farmacológicas ya que los irreversibles generalmente tienen a ser tóxicos. Algunos inhibidores de AChE reversibles son utilizados para el tratamiento de diversos padecimientos como miastemia gravis, glaucoma, como antídoto en una sobredosis con anticolinérgicos y para el tratamiento de Alzheimer. El Alzheimer es un trastorno neurológico progresivo, esta enfermedad es un tipo de demencia caracterizada por la pérdida de memoria y habilidades intelectuales que dificultan la vida cotidiana. Esta enfermedad está asociada con la pérdida de neuronas colinérgicas y la disminución de los niveles de ACh, por lo que los inhibidores de esta enzima aumentan la concentración de ACh disponibles en la sinapsis, lo que retrasa este proceso en las etapas tempranas haciendo que las personas que tienen esta enfermedad tengan una mejora cognitiva. El Alzheimer no tiene cura, pero se ha demostrado que el uso de inhibidores de AChE ayuda para el tratamiento de esta enfermedad (Cheung et al., 2012). Existen diferentes inhibidores de AChE, los más utilizados para este padecimiento son donezepilo, galantamina, rivastigmina (Figura 19).

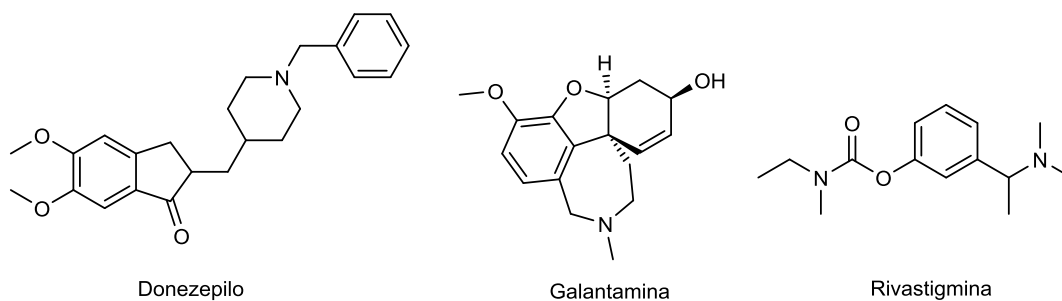


Figura 19. Estructura química de Donezepilo, Galantamina y Rivastigmina

Enzima Butirilcolinesterasa

La enzima butirilcolinesterasa (BChE), también llamada pseudocolinesterasa o colinesterasa plasmática o sérica, está presente en los vertebrados al igual que la acetilcolinesterasa, pero mayormente en plasma y de ahí su nombre. Esta enzima al igual que AChE cataliza la reacción de acetilcolina en colina y ácido acético pero en menor eficiencia, además tiene como sustratos otros ésteres ya que también cataliza la reacción de hidrólisis de butirilcolina y succinilcolina (Figura 20). Se sabe que la enzima BChE actúa como regulador junto con la enzima AChE para poder regular el exceso de acetilcolina en las terminaciones nerviosas evitando efectos deletéreos, además se ha demostrado que la enzima BChE también puede actuar hidrolizando ésteres y ácidos carboxílicos hidrofílicos o hidrofóbicos exógenos, además de ésteres de ácido fosfórico, por lo que se ha aceptado que la enzima BChE pudiera tener un papel en la desintoxicación de sustancias nocivas exógenas como venenos (Rosenberry et al., 2017). En su sitio catalítico, al igual que la enzima AChE contiene un residuo de serina el cual es vital para la reacción de hidrólisis del sustrato; contiene además la llamada triada catalítica que consta de residuos aminoácidos de serina, histidina y glutamato localizados en el fondo de la hendidura de la enzima.

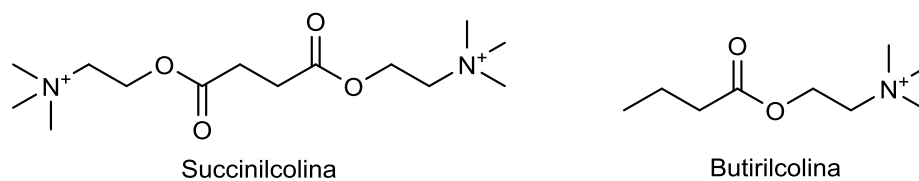


Figura 20. Estructura química de Succinilcolina y Butirilcolina

El sitio activo de la enzima BChE humana está representada en la figura 22 en forma tridimensional por su superficie y la hendidura o cavidad y, los residuos de aminoácidos del sitio catalítico en forma de esferas y línea. El sitio catalítico de la enzima es virtualmente parecido al de la enzima AChE por lo que se asemejan en un 60% estas dos partes de la enzima; en la (Figura 21) podemos observar una comparación de los sitios activos de las dos enzimas **(A)** AChE y **(B)** BChE humanas en complejo con acetilcolina y butirilcolina respectivamente, en donde se pueden resaltar la parte aromática los residuos de la cavidad de unión a colina en el sitio A representado en color amarillo. Residuos del sitio PA ubicados en el borde del desfiladero está en verde. Las moléculas de agua estructural conservadas están representadas en esferas rojas y la red densa de enlaces de hidrógeno del sitio A representado en color amarillo los cuales se remarcan con líneas punteadas.

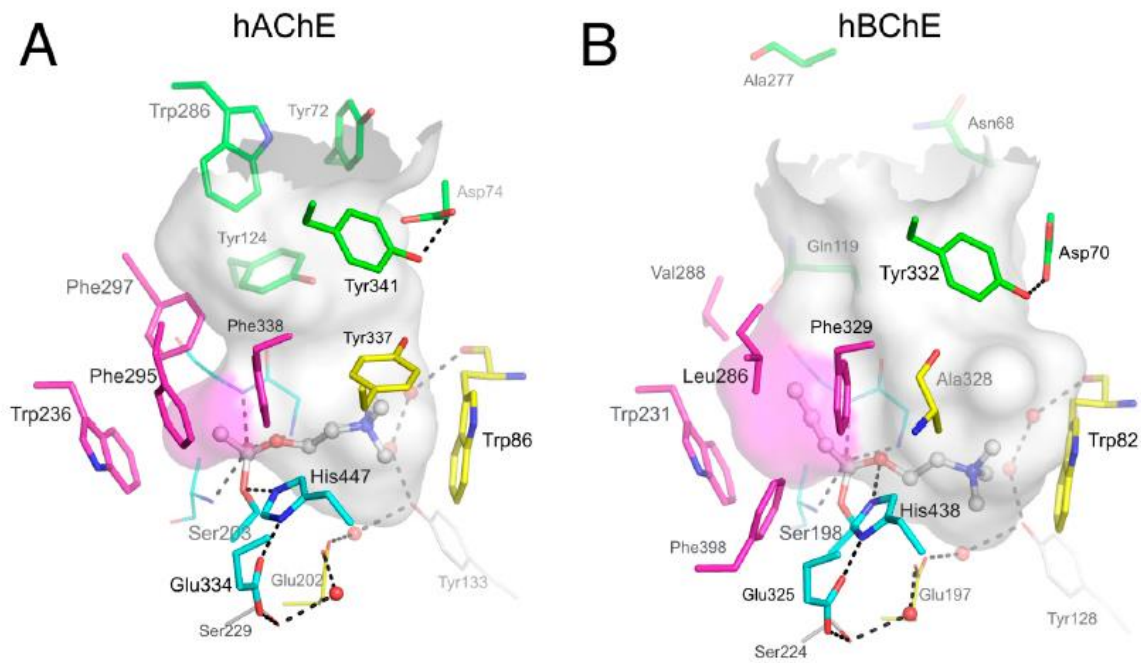


Figura 21. Sitios activos de AChE y BChE con sus respectivos ligandos acetilcolina y butirilcolina.

GENERALIDADES

Una comparación cercana del enzima muestra que la mayoría de las diferencias en la especificidad de la unión de los ligandos entre las enzimas surgen en las diferencias del número de residuos de aminoácidos aromáticos en la cavidad; entre los diez aminoácidos que interactúan con el ligando en AChE solo 4 permanecen en el sitio de BChE los cuales son Tyr 332, Tyr 341 en el sitio P, y Trp 82, Phe 329.

La actividad de la enzima BChE al igual que AChE es inhibida irreversiblemente por compuestos organofosforados tales como el agente nervioso sarín y algunos plaguicidas como el clorpirifós (Figura 22). En el sitio activo de la enzima, la serina se modifica covalentemente al reaccionar con agentes organofosforados inactivando la enzima BChE.

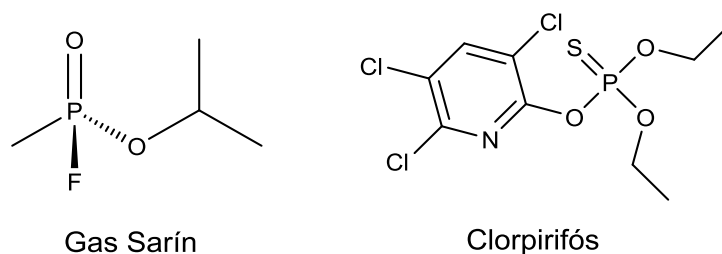
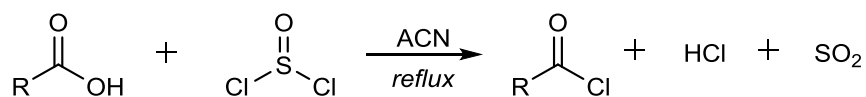


Figura 22. Estructura química de Gas sarín y Clorpirifós

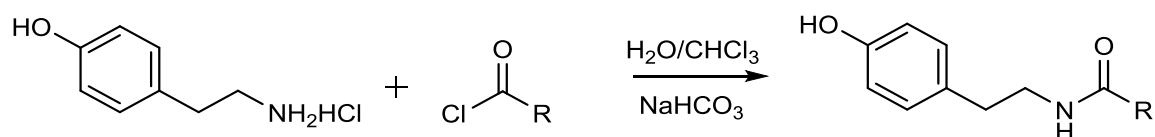
METODOLOGÍA SINTÉTICA

La síntesis de los análogos de tipo capsaicinoide se llevó a cabo en dos etapas generales, la primera consistió en la síntesis de cloruros de ácido y la segunda etapa en la formación de la amida.

Etapa 1. Síntesis de cloruros de ácidos



Etapa 2. Síntesis de amidas



Esquema 9. Etapas para la síntesis de análogos de capsaicinoides

Síntesis de cloruros de ácido

Para la síntesis de los diferentes capsaicinoides, primero fue necesaria la generación de cloruros de ácido, para ello se disolvió el ácido carboxílico correspondiente en acetonitrilo (ACN), inmediatamente se adiciono 1.5 equivalentes de cloruro de tionilo y la mezcla se mantuvo en reflujo y agitación constante durante 2 horas. Pasado este tiempo se eliminó totalmente el solvente a presión reducida y el crudo de reacción se re disolvió en diclorometano para ser utilizado en el momento en la segunda etapa sintética. Se sintetizaron un total de 10 cloruros de ácido (Figura o esquema X).

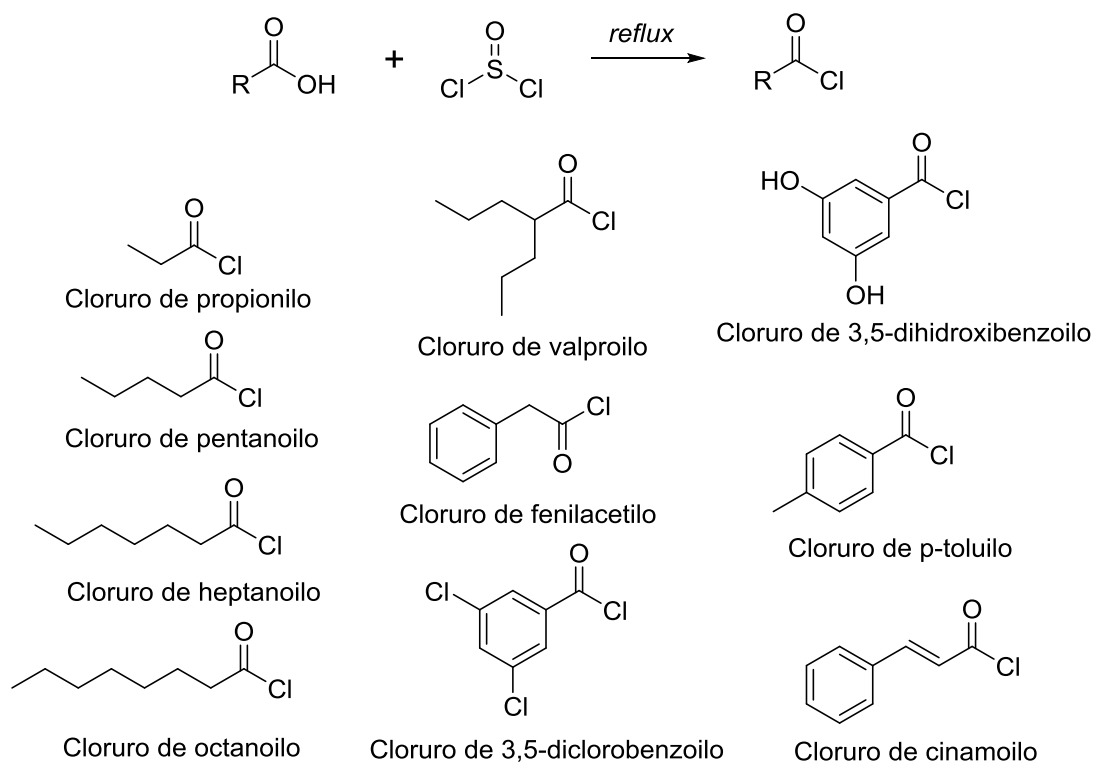


Figura 23. Síntesis de cloruros

Síntesis de capsaicinoides

Para la segunda etapa sintética se llevó a cabo una reacción de Schotten-Baumann de tipo bifase reportada por Bo Wang et al., 2009. Se disolvió el clorhidrato de tiramina en agua (10 ml) y se adicionaron 3.2 equivalentes de NaHCO_3 , esta mezcla se mantuvo en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron a la solución 10 mL de diclorometano y se mantuvo la agitación otros 15 minutos. Pasado el tiempo, se adicionaron lentamente 2 Eq del cloruro de ácido correspondiente previamente sintetizado disuelto en diclorometano. La reacción se mantuvo por una hora bajo las mismas condiciones de

temperaturas antes mencionadas y se monitoreo mediante cromatografía de capa fina (CCF) hasta observar la formación del producto. Para el proceso de purificación se realizaron extracciones con diclorometano para la obtención de la fase orgánica (FO), la cual fue lavada con HCl al 2% y una solución saturada de NaCl. La FO se secó con sal anhidra y se eliminó el solvente a presión reducida para finalmente purificar mediante cromatografía en columna con silica gel como fase estacionaria y una fase móvil de *n*-hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones. Se sintetizaron un total de 10 análogos de capsaicinoide etiquetados como CAPS1 – CAPS10 (Figura o esquema X).

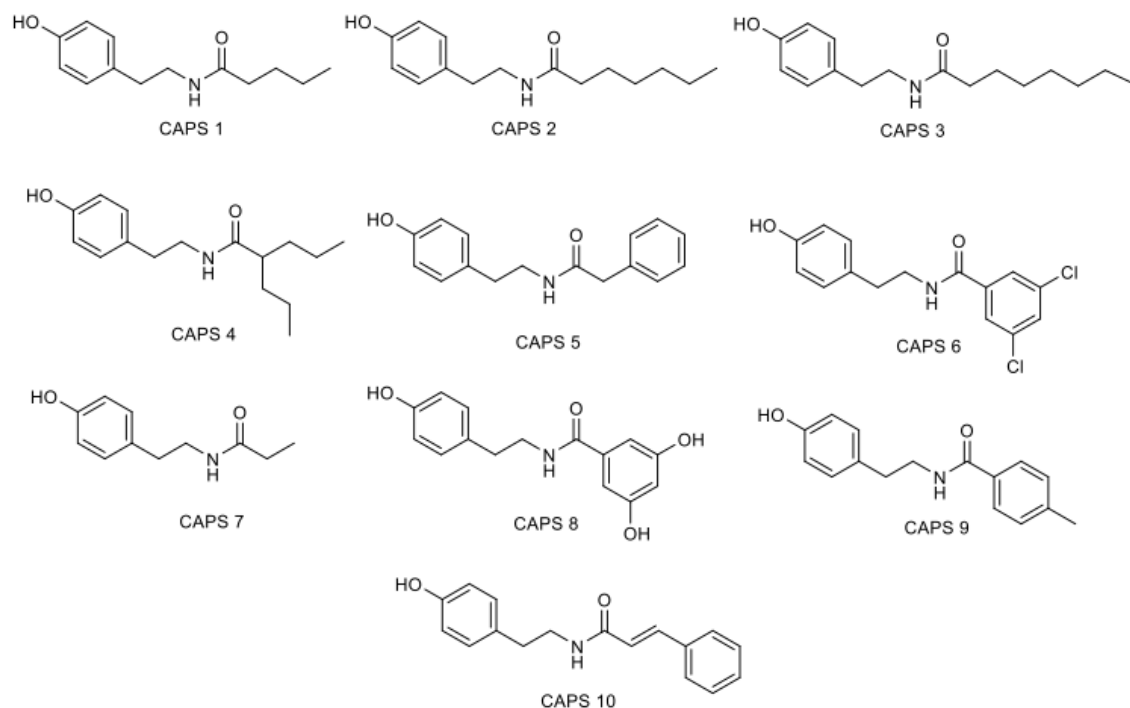
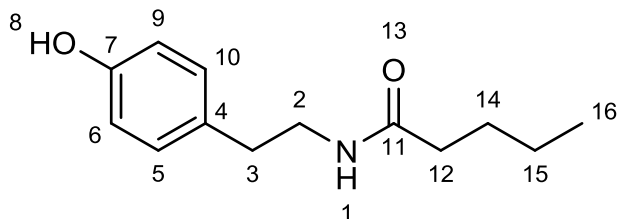
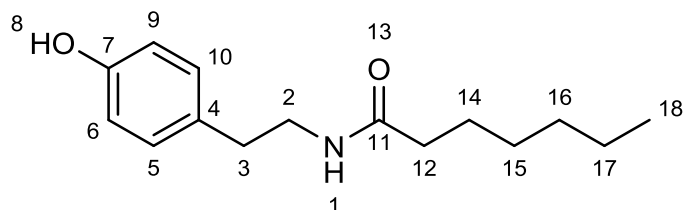


Figura 24. Síntesis de capsaicinoides CAPS1 – CAPS10



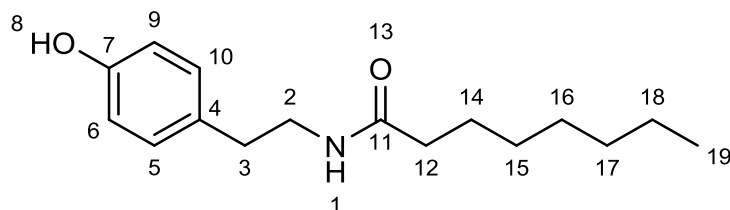
Nombre: CAPS 1	
Fórmula y peso molecular:	C ₁₃ H ₁₉ NO ₂ , 221.30 g/mol
IR (cm ⁻¹):	3287, 2960, 2860, 1639, 1515, 1462, 1371, 1233, 1109, 826
EM <i>m/z</i> :	221 (M ⁺), 192, 164, 121, 107, 85, 77, 65, 57, 41, 30
¹ H RMN (400 MHz, Cloroformo- <i>d</i>) δ:	7.49 (s, 1H), 6.97 (d, 2H), 6.79 (d, 2H), 5.69 (t, <i>J</i> = 5.9 Hz, 1H), 3.45 (q, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H), 2.69 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 2.12 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 1.54 (p, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 1.27 (h, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 0.85 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 3H).
¹³ C RMN (400 MHz, Cloroformo- <i>d</i>) δ:	174.16 (C-11), 155.47 (C-7), 129.98 (C-4), 129.86 (C-5, C-10), 115.87 (C-6, C-9), 41.11 (C-2), 36.71 (C-12), 34.91 (C-3), 28.0 (C-14), 22.48 (C-15), 13.90 (C-16)

Tabla 2. Datos de CAPS 1



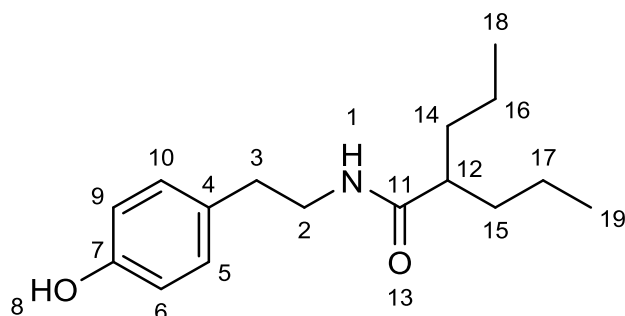
Nombre: CAPS 2	
Fórmula y peso molecular:	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂ , 249.35 g/mol
IR (cm ⁻¹):	3293, 2926, 2861, 1636, 1512, 1462, 1237, 737
EM <i>m/z</i> :	249 (M ⁺), 206, 192, 164, 119, 107, 85, 77, 57, 43, 30
¹ H RMN (400 MHz, Cloroformo- <i>d</i>) δ:	7.39 (s, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.79 (s, 2H), 5.66 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 3.45 (q, <i>J</i> = 5.7, 7.0 Hz, 2H), 2.70 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 2.11 (t, 2H), 1.56 (p, 2H), 1.28 – 1.20 (m, 6H), 0.84 (t, 3H).
¹³ C RMN (400 MHz, Cloroformo- <i>d</i>) δ:	174.14 (C-11), 155.46 (C-7), 130.0 (C-4), 129.86 (C-5, C-10), 115.87 (C-6, C-9), 41.10 (C-2), 37.03 (C-12), 34.93 (C-3), 31.66 (C-15), 29.07 (C-16), 25.91 (C-14), 22.66 (C-17), 14.19 (C-18)

Tabla 3. Datos de CAPS 2



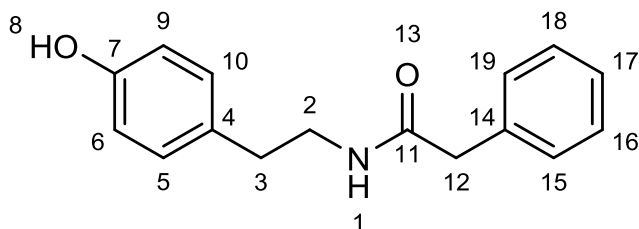
Nombre: CAPS 3	
Fórmula y peso molecular:	$C_{16}H_{25}NO_2$, 263.38 g/mol
IR (cm^{-1}):	3295, 2928, 1641, 1550, 1512, 1458, 1388, 1245, 834
EM m/z :	263 (M^+), 234, 206, 192, 145, 127, 121, 119, 107, 91, 77, 57, 42
1H RMN (400 MHz, Cloroformo- d) δ :	7.68 (s, 1H), 6.97 (d, 2H), 6.78 (d, 2H), 5.70 (d, $J = 6.7, 18.8$ Hz, 1H), 3.45 (q, $J = 5.2, 6.9$ Hz, 2H), 2.69 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.11 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.56 (p, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.29 – 1.18 (m, 8H), 0.84 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H).
^{13}C RMN (400 MHz, Cloroformo- d) δ :	174.25 (C-11), 155.55 (C-7), 129.90 (C-4), 129.84 (C-5, C-10), 115.88 (C-6, C-9), 41.13 (C-2), 37.01 (C-12), 34.92 (C-3), 31.83 (C-14), 29.35 (C-15), 29.12 (C-16), 25.95 (C-17), 22.76 (C-18), 14.22 (C-19)

Tabla 4. Datos de CAPS 3



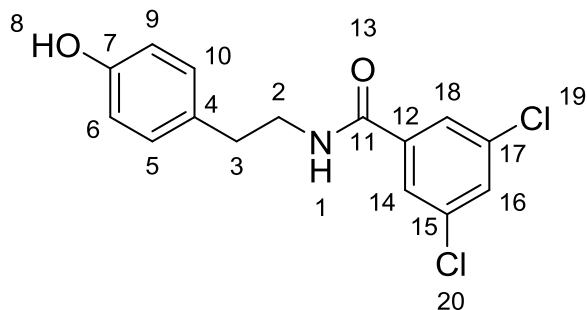
Nombre: CAPS 4	
Fórmula y peso molecular:	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂ , 263.38 g/mol
IR (cm ⁻¹):	3303, 3093, 2866, 1806, 1633, 1566, 1442, 1377, 1247, 799
EM <i>m/z</i> :	263 (M ⁺), 234, 220, 207, 192, 164, 144, 120, 107, 91, 57, 41
¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i>) δ:	¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 9.11 (s, 1H), 7.77 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 6.97 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 6.69 – 6.62 (m, 2H), 3.21 (dd, <i>J</i> = 13.6, 6.7 Hz, 1H), 2.58 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 2.09 (dt, <i>J</i> = 9.4, 4.8 Hz, 1H), 1.48 – 1.32 (m, 1H), 1.16 (td, <i>J</i> = 14.0, 5.9 Hz, 4H), 0.82 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 6H).
¹³ C RMN (400 MHz, Cloroformo- <i>d</i>) δ:	173.76 (C-11), 149.40 (C-7), 136.46 (C-4), 129.65 (C-5, C-10), 121.66 (C-9, C-6), 40.47 (C-2), 35.10 (C-3), 29.72 (C-12), 27.74 (C-14, C-15), 9.84 (C-16, C-17), 9.06 (C-18, C-19)

Tabla 5. Datos de CAPS 4



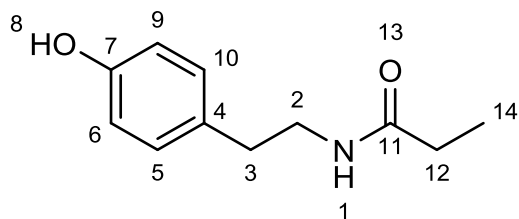
Nombre: CAPS 5	
Fórmula y peso molecular:	C ₁₆ H ₁₇ NO ₂ , 255.32 g/mol
IR (cm ⁻¹):	3231, 2925, 1745, 1644, 1517, 1220, 1191, 829
EM <i>m/z</i> :	255 (M ⁺), 236, 165, 136, 120, 107, 91, 77, 63, 41, 28
¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i>) δ:	9.13 (s, 1H), 8.01 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 7.33 – 7.23 (m, 2H), 7.22 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 6.99 – 6.91 (m, 2H), 6.70 – 6.61 (m, 2H), 3.33 (s, 2H), 3.21 (q, 1H), 2.58 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H).
¹³ C RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i>) δ:	170.37 (C-11), 156.08 (C-7), 136.95 (C-14), 129.94 (C-4), 129.92 (C-5, C-10), 129.42 (C-15, C-19), 128.59 (C-16, C-18), 126.71 (C-17), 115.54 (C-6, C-9), 42.93 (C-12), 41.11 (C-2), 34.76 (C-3).

Tabla 6. Datos de CAPS 5



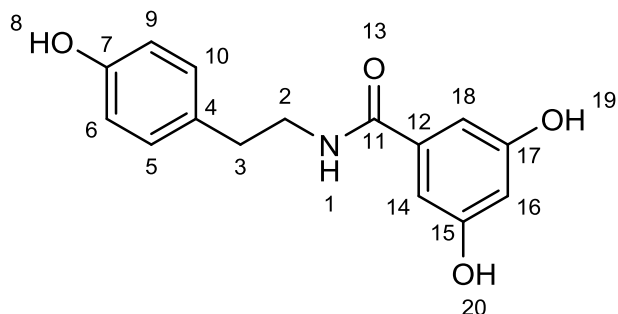
Nombre: CAPS 6	
Fórmula y peso molecular:	C ₁₅ H ₁₃ Cl ₂ NO ₂ , 309.3 g/mol
IR (cm ⁻¹):	3298, 3069, 2939, 1885, 1647, 1553, 1317, 1229, 1096, 805
EM <i>m/z</i> :	309.05 (M ⁺), 277, 228, 202, 177, 173, 122, 107, 91, 77, 55
¹ H RMN (400 MHz, DMSO) δ:	9.16 (s, 1H), 8.73 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 7.83 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 2H), 7.78 (t, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H), 7.03 (dd, 2H), 6.69 (dd, 2H), 3.43 (q, 1H), 2.73 (t, 2H).
¹³ C RMN (400 MHz, DMSO) δ:	163.81 (C-11), 156.16 (C-7), 138.28 (C-12), 134.72 (C-15, C-17), 130.94 (C-16), 129.96 (C-5, C-10), 129.81 (C-4), 126.47 (C-14, C-18), 115.62 (C-6, C-9), 41.88 (C-2), 34.52 (C-3).

Tabla 7. Datos de CAPS 6



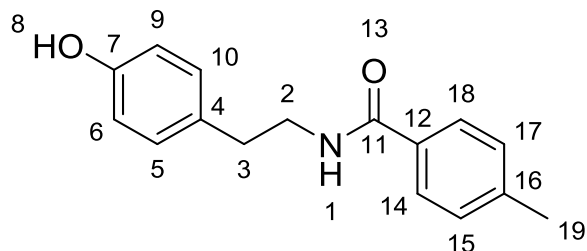
Nombre: CAPS 7	
Fórmula y peso molecular:	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ , 193.11 g/mol
IR (cm ⁻¹):	3314, 2972, 2940, 1756, 1645, 1512, 1459, 1353, 1191, 1141, 823
EM <i>m/z</i> :	193 (M ⁺), 164, 122, 121, 119, 107, 91, 77, 52, 30
¹ H RMN (400 MHz, Cloroformo- <i>d</i>) δ:	9.20 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 6.98 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 6.68 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 3.24 – 3.14 (m, 1H), 2.58 (dd, <i>J</i> = 8.3, 6.7 Hz, 2H), 2.05 (q, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 0.98 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 3H)
¹³ C RMN (400 MHz, Cloroformo- <i>d</i>) δ:	173.18 (C-11), 156.08 (C-7), 130.01 (C-4), 129.87 (C-10, C-11), 115.54 (C-9, C-6), 40.95 (C-2), 34.90 (C-3), 29.00 (C-12), 10.43 (C-14)

Tabla 8. Datos de CAPS 7



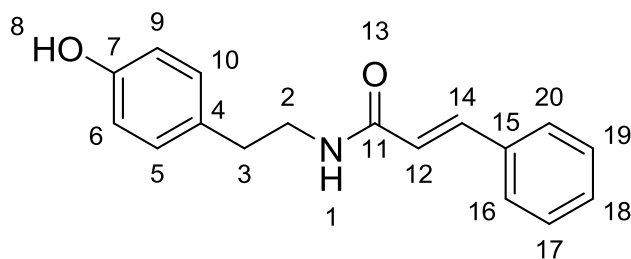
Nombre: CAPS 8	
Fórmula y peso molecular:	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄ , 273.29 g/mol
IR (cm ⁻¹):	3278, 2940, 1712, 1571, 1506, 1450, 1350, 1224, 1135, 991, 823
EM <i>m/z</i> :	-
¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ:	9.40 (s, 2H), 9.13 (s, 1H), 8.23 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 7.05 – 6.95 (m, 2H), 6.72 – 6.61 (m, 5H), 6.34 (s, OH), 3.40 – 3.30 (m, 4H), 2.69 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H).
¹³ C RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ:	166.87 (C-11), 158.64, (C-15, C-17), 156.03 (C-7), 137.45 (C-12), 130.10 (C-4), 129.92 (C-5, C-10), 115.57 (C-6, C-9), 105.85 (C-14, C-18), 105.40 (C-16), 14.58 (C-2), 34.73 (C-3)

Tabla 9. Datos de CAPS 8



Nombre: CAPS 9	
Fórmula y peso molecular:	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄ , 255.32 g/mol
IR (cm ⁻¹):	3320, 2928, 2866, 2680, 2598, 1603, 1550, 1500, 1441, 1297, 1247, 1182, 811
EM <i>m/z</i> :	255 (M ⁺), 224, 181, 137, 136, 120, 119, 91, 77, 65
¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ:	δ 9.15 (s, 1H), 8.41 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 7.74 (dd, 2H), 7.26 (dd, 2H), 7.03 (dd, 2H), 6.69 (dd, 2H), 3.41 (q, <i>J</i> = 5.8 Hz, 2H), 2.73 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H).
¹³ C RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ:	166.46 (C-11), 156.09 (C-7), 141.29 (C-16), 132.38 (C-12), 130.09 (C-4), 129.94 (C-5, C-10), 129.22 (C-15, C-17), 127.59 (C-14, C-18), 115.60 (C-6, C-9), 41.67 (C-2), 34.86 (C-3), 21.38 (C-19).

Tabla 10. Datos de CAPS 9



Nombre: CAPS 10	
Fórmula y peso molecular:	$C_{15}H_{15}NO_4$, 267.13 g/mol
IR (cm^{-1}):	3417, 3267, 2925, 2852, 1665, 1612, 1503, 1436, 1341, 1224, 979, 770
EM m/z :	267.13 (M^+), 194, 161, 149, 148, 131, 120, 103, 77, 76, 51
1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ :	9.16 (s, 1H), 8.13 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.59 – 7.52 (m, 2H), 7.47 – 7.33 (m, 4H), 7.07 – 6.99 (m, 2H), 6.74 – 6.66 (m, 2H), 6.63 (dd, $J = 15.8$ Hz, 1H), 3.39 – 3.31 (m, 2H), 2.67 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H).
^{13}C RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ :	165.34 (C-11), 156.13 (C-7), 138.94 (C-14), 135.43 (C-15), 129.96 (C-4), 129.93 (C-5, C-10), 129.84 (C-18), 129.38 (C-17, C-19), 127.95 (C-16, C-20), 122.81 (C-12), 115.61 (C-6, C-9), 41.19 (C-2), 34.84 (C-3).

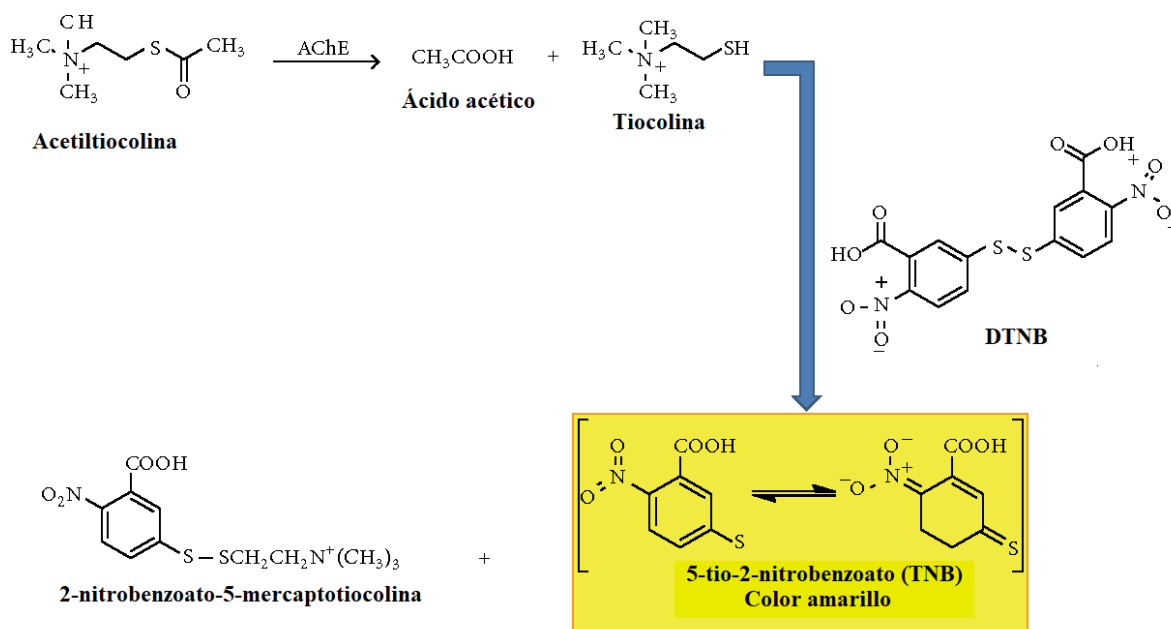
Tabla 11. Datos de CAPS 10

METODOLOGÍA DE
INHIBICIÓN
ENZIMÁTICA

METODOLOGÍA DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

La actividad inhibitoria se determinó empleando una metodología colorimetría de Ellman, la cual se fundamenta en la reacción entre acetiltiocolina que al ser hidrolizada por la enzima AChE forma ácido acético y tiocolina, la tiocolina reacciona con el DTNB (5,5'-Ditiobis 2-Ácido nitrobenzoico) formando un compuesto de color amarillo (TNB) por lo que la actividad de la enzima está relacionada directamente con el cambio de color la cual se mide espectrofotométricamente.



En el caso de la inhibición de butirilcolinesterasa el sustrato utilizado corresponde a butirilcolina.

Procedimiento:

1. Se utilizó una placa de 96 pozos en la cual se colocaron 75 μL de amortiguador Trizma- HCl (50 mM, pH 8).
2. Se adicionaron en el primer pozo 75 μL de compuesto a evaluar y se realizaron diluciones seriadas, obteniendo concentraciones finales entre 187.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador y DMSO a concentración final máxima de 0.15%.
3. En cada pozo se agregaron 25 μL de una solución de acetilcolina o butirilcolina en una concentración de 15 mM en amortiguador (concentración final de 1.5 mM) seguido de 125 μL de una solución de DTNB (ácido-5,5-ditio-2-nitrobenzoico) conocido como reactivo de Ellman, en una concentración de 3 mM en amortiguador (final de 1.5 mM).
4. Con un espectrofotómetro se midió la absorbancia en un lector de placas a 405 nm cada 45 segundos por triplicado.
5. Se adicionan a cada pozo 25 μL de una solución de enzima acetilcolinesterasa o butirilcolinesterasa según corresponda a 2 U/mL en amortiguador adicionado con albúmina sérica bovina 0.1 mg/mL
6. Se midió la absorbancia cada 45 segundos durante cinco veces bajo las mismas condiciones de la primera lectura.
7. Seis pozos de cada placa fueron utilizados como control del 100% de la actividad enzimática.

El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [1 - (A \text{ muestra} / A \text{ control})] \times 100$$

En donde:

A Muestra = diferencia de absorbancia entre el tiempo 0 y el tiempo 225 segundos en presencia de cualquier compuesto prueba o inhibidor.

A control = diferencia de absorbancia entre el tiempo 0 y el tiempo 225 segundos del control del 100% de actividad enzimática.

Los % de inhibición enzimática se graficaron contra la concentración para la obtención de la concentración de la concentración inhibitoria media (**CI₅₀**).

El ensayo se realizó por triplicado utilizando galantamina como control positivo, además de incluir capsaicina grado reactivo con fines comparativos.

METODOLOGÍA DOCKING MOLECULAR

Se utilizaron los programas **Chimera** y **Autodock Vina** y el algoritmo para cálculo de cargas Gasteiger para generar el acoplamiento molecular “Docking molecular” de los compuestos capsaicinoides sintetizados con los sitios activos de las enzimas, para ello se utilizaron los modelos tridimensionales de las enzimas Acetilcolinesterasa (AChE) proveniente de *Tetronarce californica* 1GQS, Butirilcolinesterasa (BChE) humana 6ESJ las cuales se obtuvieron del banco de datos de proteínas por sus siglas en inglés (PDB), y se descargan en formato (.pdb).

Se utilizó el programa **ChemDraw** para poder dibujar computacionalmente las moléculas, editarlas y así poder procesarlas en los programas para generar el Docking molecular. En el programa ChemDraw se pueden dibujar las moléculas y copiar para utilizar en formato de Especificación de introducción lineal molecular simplificada por sus siglas en inglés “SMILES”, las cuales son utilizadas para describir la estructura de una molécula usando cadenas lineales codificadas, este formato se puede importar a diversos programas de edición molecular incluyendo a Chimera y Autodock Vina.

Se utilizó el programa de interfaz gráfica de usuario "AutoDock Tools" para preparar, ejecutar y analizar las simulaciones de acoplamiento. Se agregaron cargas atómicas unidas, e hidrógenos al receptor para la preparación de proteínas en la simulación de acoplamiento. Se asignaron cargas de tipo Gasteiger y luego se fusionaron los hidrógenos no polares. Para preparar el acoplamiento por AutoDock se requiere un mapa de cuadrícula (Grid) precalculados presente la proteína que se acopla, ya que almacena la energía potencial que surge, esta cuadrícula debe rodear la región del sitio activo en la enzima

con un tamaño de cuadrícula de 40x40x40, una vez señalada en la región de acoplamiento se guardan los valores de los ejes X, Y y Z en formato de texto (.txt) para utilizarlo posteriormente. Con estos parámetros asignados se utiliza la sección de comando (cmd) de la computadora y se introducen las variables mediante comandos para poder generar el acoplamiento molecular, el código que se utiliza el siguiente comando (*C:\User\win\Desktop\Docking>"C:\Program Files <x86>\The scripps Research Institute\Vina\vina.exe" --receptor --ligand --config --log --output*) en donde el receptor sería la proteína a utilizar en formato (.pdbqt), el ligando la molécula en formato (.pdbqt), la configuración es el mapa de cuadrícula precalculado "Grid" donde se desplegaban los ejes X, Y y Z del sitio activo de la enzima en formato (.txt), en el apartado "--log" es donde se muestran los resultados en formato (.txt) y finalmente "--output" es nuestro archivo de visualización tridimensional de acoplamiento molecular. Los resultados están en base a las energías de unión del acoplamiento molecular entre la enzima y el ligando las cuales se representan en kcal/mol.

Las energías de unión, así como la visualización tridimensional e interacciones cercanas que muestran los diferentes aminoácidos circundantes en la región de acoplamiento molecular son parte de los resultados que nos arrojará el estudio de acoplamiento molecular, y en el cual podemos visualizar diferentes interacciones con el compuesto como son regiones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones de tipo π - π , el formato que despliega el acoplamiento molecular es (.pdbqt) el cual es tridimensionalmente visible en el programa Chimera.

En manera resumida y como se ve en la figura 38 tenemos que descargar y editar nuestros blancos que serían las enzimas en formato (.pdbqt) de la página Proteína Data Bank, se construye nuestro ligando en ChemDraw y se exporta a Chimera donde se edita, una vez editados y preparados nuestros blanco y ligandos se utiliza el programa AutoDock Tools y se introducen las variables en comando, posteriormente nos arrojará los resultados.

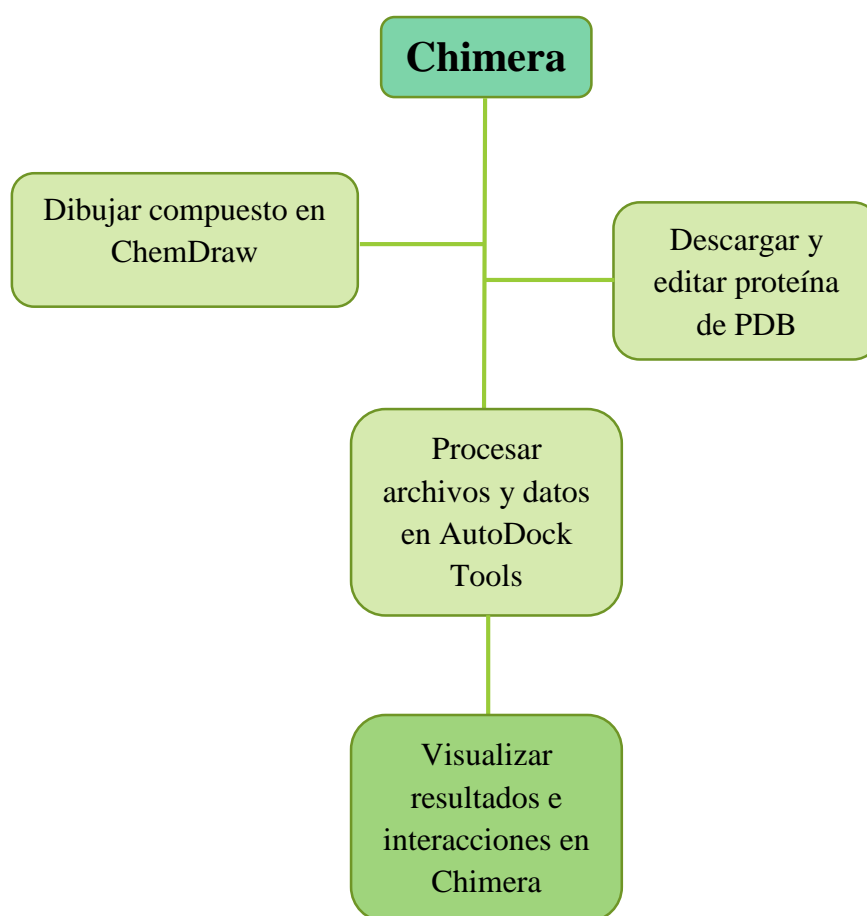
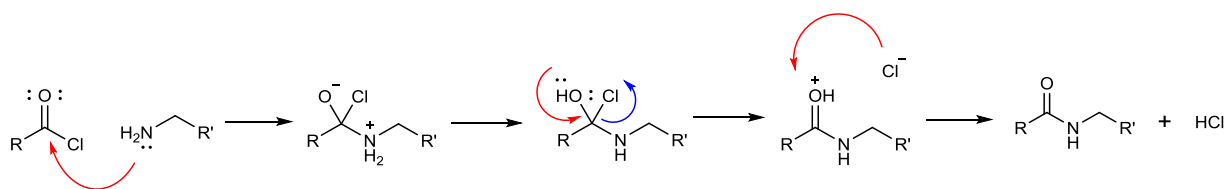


Figura 25. Modelo general de docking molecular

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Síntesis y caracterización de capsaicinoides

Para la síntesis de los diferentes productos de tipo capsaicinoide se utilizó la reacción de Schotten-Baumann la cual consiste en la reacción de una amina libre, generalmente de tipo primaria, con cloruro de ácido en un medio de carácter básico, ya que este facilita la disponibilidad de la amina para que actúe como un buen nucleófilo y poder unirse al compuesto carbonílico, desplazando el grupo cloro para poder condensarse y generar el enlace amida. En este tipo de reacción el utilizar un medio básico neutraliza el ácido clorhídrico que se forma de la condensación, evitando así que este pudiera hidrolizar el enlace formado (Esquema 13).



Esquema 13. Mecanismo de reacción de Schotten-Baumann

La síntesis de los 10 capsaicinoides se realizó bajo las mismas condiciones de reacción, partiendo de tiramina como base y variando los sustituyentes presentes en los cloruros de ácido, encontrando cadenas *n*-alifáticas con diferente longitud (3, 5, 7 y 8 átomos de carbono), además de utilizar un isómero de ocho carbonos derivado del ácido valproico, esto con el fin de identificar mediante los experimentos *in vitro* e *in silico* la influencia de cadenas ramificadas sobre la actividad. También se emplearon sustituyentes con anillos aromáticos con la finalidad de tener compuestos funcionalizados con grupos arilos y observar las posibles interacciones π con aminoácidos. Se incluyeron también sistemas aromáticos con

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

anillos aromáticos con sustituyentes de diferente naturaleza química, por ejemplo, el CAPS 8 que presenta en su estructura grupos electrodonadores (3,5-dihidroxi) y el CAPS 6 con grupos electroattractores (3,5-dicloro). Dentro de los compuestos también se sintetizó uno con sistema α , β -insaturado (CAPS 10) generado a partir de ácido cinámico. Los compuestos carbonílicos α , β -insaturados son de importancia biológica ya que se encuentran en varias moléculas bioactivas, además de ser reactivos ya que presentan resonancia y pueden ser fácilmente susceptible a ataques nucleofílicos (Amslinger et al., 2010).

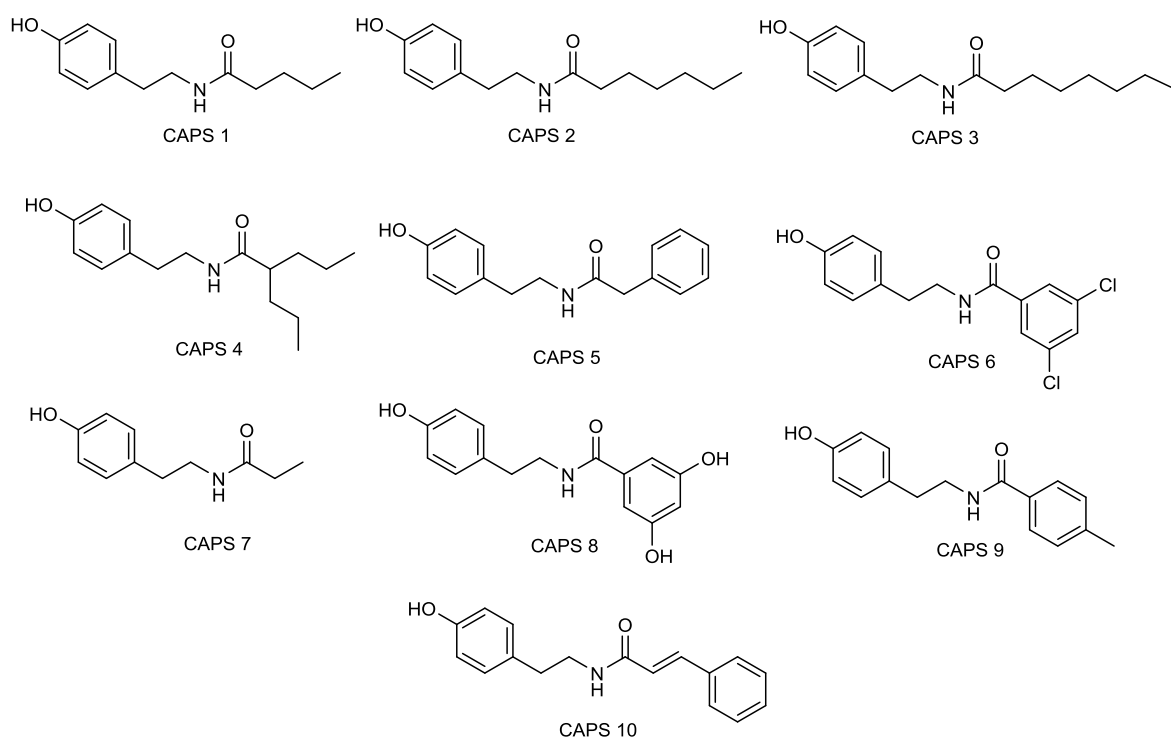


Figura 26. Compuestos sintetizados (CAPS1 – CAPS10)

La síntesis química de los capsaicinoides se llevó a cabo con la técnica de bifase con un sistema H_2O - CHCl_3 o CH_2Cl_2 , a pH básico utilizando bicarbonato de sodio. Mediante esta

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

síntesis fue posible la obtención de productos con rendimientos que oscilan entre 30% el más bajo y 87% el más alto (ver tabla 12).

Fue el compuesto sintetizado con una cadena alifática de tres carbonos etiquetado como CAPS 7 el que presentó el rendimiento más bajo (30%), mientras que la molécula sintetizada con un rendimiento de 87% fue el que tenía como sustituyente una cadena alifática de 7 carbonos (CAPS 2).

Tabla 12. % de rendimiento de los compuestos sintetizados

Compuesto	Sustituyente	Rendimiento (%)
CAPS 1	Cloruro de pentanoilo	76
CAPS 2	Cloruro de heptanoilo	87
CAPS 3	Cloruro de octanoilo	83
CAPS 4	Cloruro de valproilo	46
CAPS 5	Cloruro de fenilacetilo	78
CAPS 6	Cloruro de 3,5-dicloro benzoilo	50
CAPS 7	Cloruro de propionilo	30
CAPS 8	Cloruro de 3,5-dihidroxibenzoilo	66
CAPS 9	Cloruro de <i>p</i> -toulilo	68
CAPS 10	Cloruro de cinamoilo	71

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los compuestos fueron sintetizados bajo las mismas condiciones de reacción, partiendo de tiramina como base y variando los sustituyentes al momento de sintetizar los cloruros de ácido. Los haluros de ácido fueron sintetizados y utilizados al momento en la reacción de Schotten-Baumann, esto con el fin de evitar la degradación de los mismos y evitar posibles contaminantes en los compuestos.

En la obtención de los compuestos sintetizados se utilizaron diferentes sustituyentes, donde las cadenas alifáticas fueron variando en longitud; se utilizaron diferentes cadenas alifáticas desde tres carbonos, cinco carbonos, siete carbonos y ocho carbonos de longitud, además de utilizar un isómero de ocho carbonos que fue el sustituyente valproilo, esto con el fin de poder tener diferentes cadenas alifáticas y observar las diferencias de interacciones existentes entre una cadena con mayor y menor tamaño. Además, en los compuestos sintetizados se emplearon también sustituyentes con anillos aromáticos, esto con el fin de tener compuestos con estos grupos funcionales arilos, y observar las posibles interacciones π que pudieran existir con aminoácidos aromáticos. En los compuestos sintetizados con sistemas aromáticos estos presentaban sustituyentes con diferentes naturalezas química. Por ejemplo, CAPS 8 tiene como sustituyentes grupos electrodonadores, presentando hidroxilos en las posiciones 3 y 5 del anillo aromático. Dentro de los compuestos también se sintetizó uno con sistema carbonílico α , β -insaturado, el compuesto CAPS 10 el que fue sintetizado a partir de ácido cinámico el cual contiene este grupo. Los compuestos carbonílicos α , β -insaturados son de importancia biológica ya que se encuentran en varias moléculas bioactivas, además presentan cierta reactividad ya que en estos grupos se observa resonancia y pueden ser fácilmente susceptible a ataques nucleofílicos (Amslinger et al., 2010).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la siguiente imagen (Figura 27) se muestran todos los diez compuestos sintetizados, así como sus diferentes sustituyentes mencionados anteriormente.

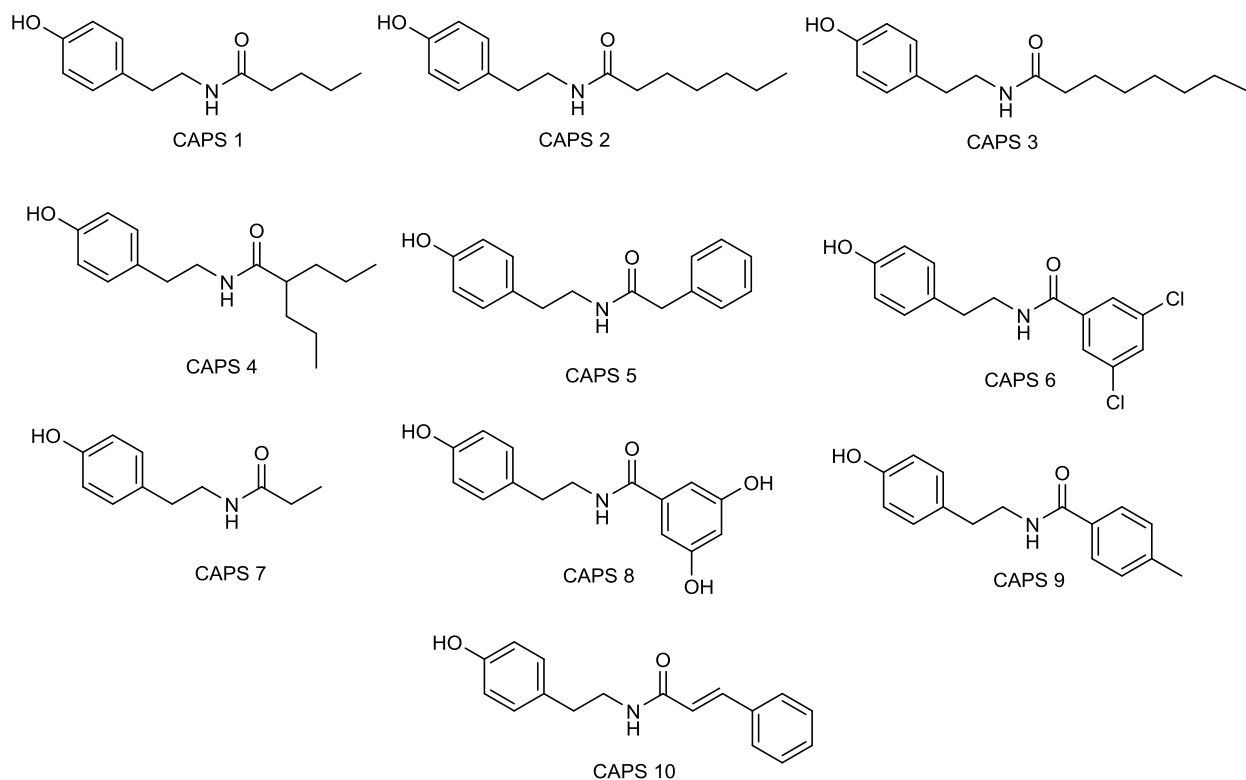


Figura 27. Compuestos sintetizados

En cuanto a la caracterización estructural de estos productos se utilizó espectroscopia de infrarrojo, espectrometría de masas, y resonancia magnética nuclear de protón y carbono. Todos los análogos sintetizados presentan características estructurales similares y comparten señales entre ellos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el caso de la espectroscopia de infrarrojo se observaron señales comunes entre los compuestos como los grupos carbonilos. Empezando con el compuesto CAPS 1 se observaron las señales del carbonilo a 1639.25 cm^{-1} , un doblamiento del enlace N-H en la amida a 1515.62 cm^{-1} , un estiramiento por parte de la parte fenólica (O-H) a 3287.65 cm^{-1} , la presencia de una banda característica del enlace π aromático (C=C) a 1462.63 cm^{-1} , así como una banda a 1233.03 cm^{-1} característica del estiramiento carbono oxígeno (C-O). De la parte alquílica se observaron señales a 2960.92 cm^{-1} y 2860.83 cm^{-1} correspondiente a señales sp^2 y sp^3 .

En el caso de los resultados por espectrometría de masas de CAPS 1, se detectó el ion molecular (M^+) de 221 m/z correspondiente al peso molecular del compuesto, un pico base de 120 m/z . En resonancia magnética nuclear de protón ($RMN-H^1$), en la parte alquílica se observaron la presencia de un triplete a campo alto $\delta\ 0.85$ correspondiente al metilo en la posición 16 (CH_3), así como la presencia de un sextuplete $1.27\ \delta$, un pentuplete 1.54 , y un triplete 2.12 correspondiente a los metilenos de la parte alifática con posición en 12, 14 y 15 (CH_2) en la figura 28. En campo más bajo, comparado con las señales previamente mencionadas se encuentran las señales de los metilenos correspondientes en la parte de la tiramina a $\delta\ 2.69$ en forma de triplete y $\delta\ 3.45$ formando un cuarteto lo cual nos indica que está acoplado al hidrógeno del nitrógeno N-H de la amida. En $\delta\ 5.69$ se observa la presencia de un triplete correspondiente al hidrógeno de la amida, entre $\delta\ 6.79-6.97$ la presencia de los hidrógenos aromáticos, y a campo más bajo un singulete correspondiente al hidrogeno fenólico de la molécula.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Continuando el caso del compuesto CAPS 1 se le realizaron diferentes experimentos de RMN- ^1H , tal es el caso del experimento de tipo COSY espectroscopia de correlación, por sus siglas en inglés (Correlation Spectroscopy). En este experimento se pudo apreciar las relaciones de los protones vecinales, tal es el caso de 15 con 16, 14 con 15 y 12 con 14 respectivamente, estos protones pertenecen a la cadena alifática. También se observó los protones vecinales relacionados 3 y 2 respectivamente (Figura 28.)

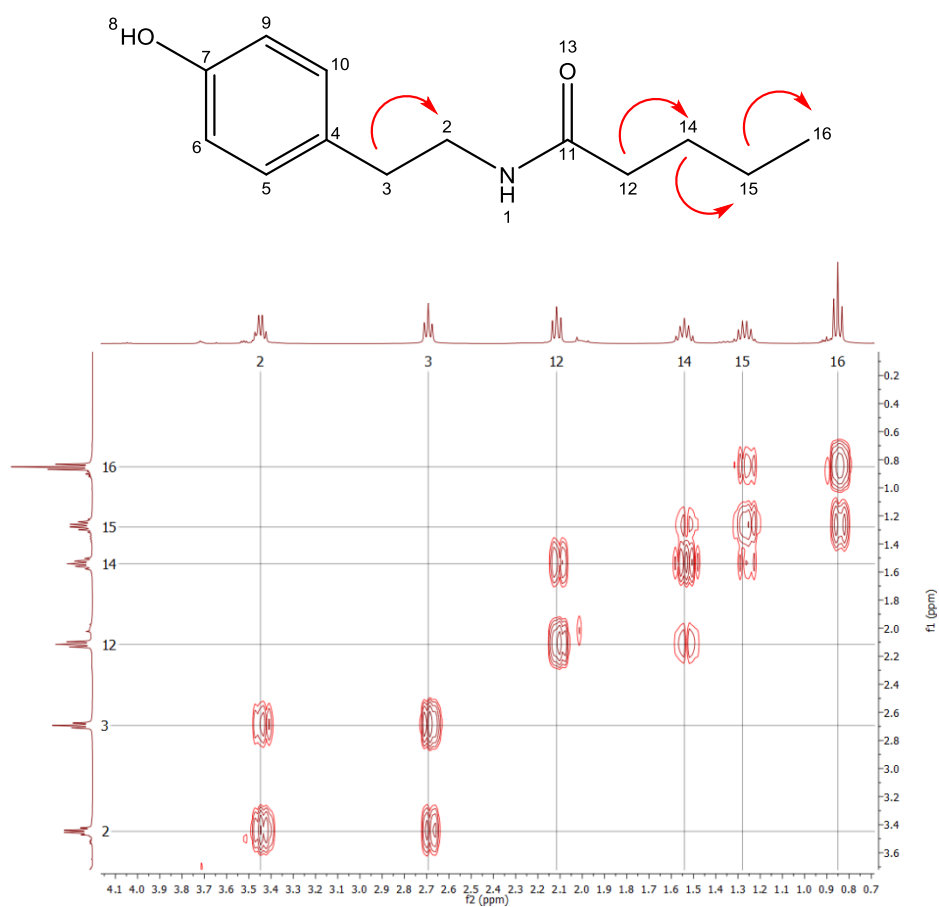


Figura 28. Ampliación de espectro COSY

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El experimento correlación heteronuclear HSQC del compuesto CAPS 1 se observaron los protones relacionados directamente a los carbonos para poder realizar la correcta asignación de los mismo y poder confirmarlo con HMBC. En el caso de HMBC mostro las correlaciones a 3 enlaces del protón H-16 con C-15 y C-14. También se observaron correlaciones de los protones a 3 enlaces con H-15 con C-16, C-14 y C-12. De igual manera las correlaciones del protón H-2 con C-3, el espectro que está aquí abajo etiquetado como Figura 29.

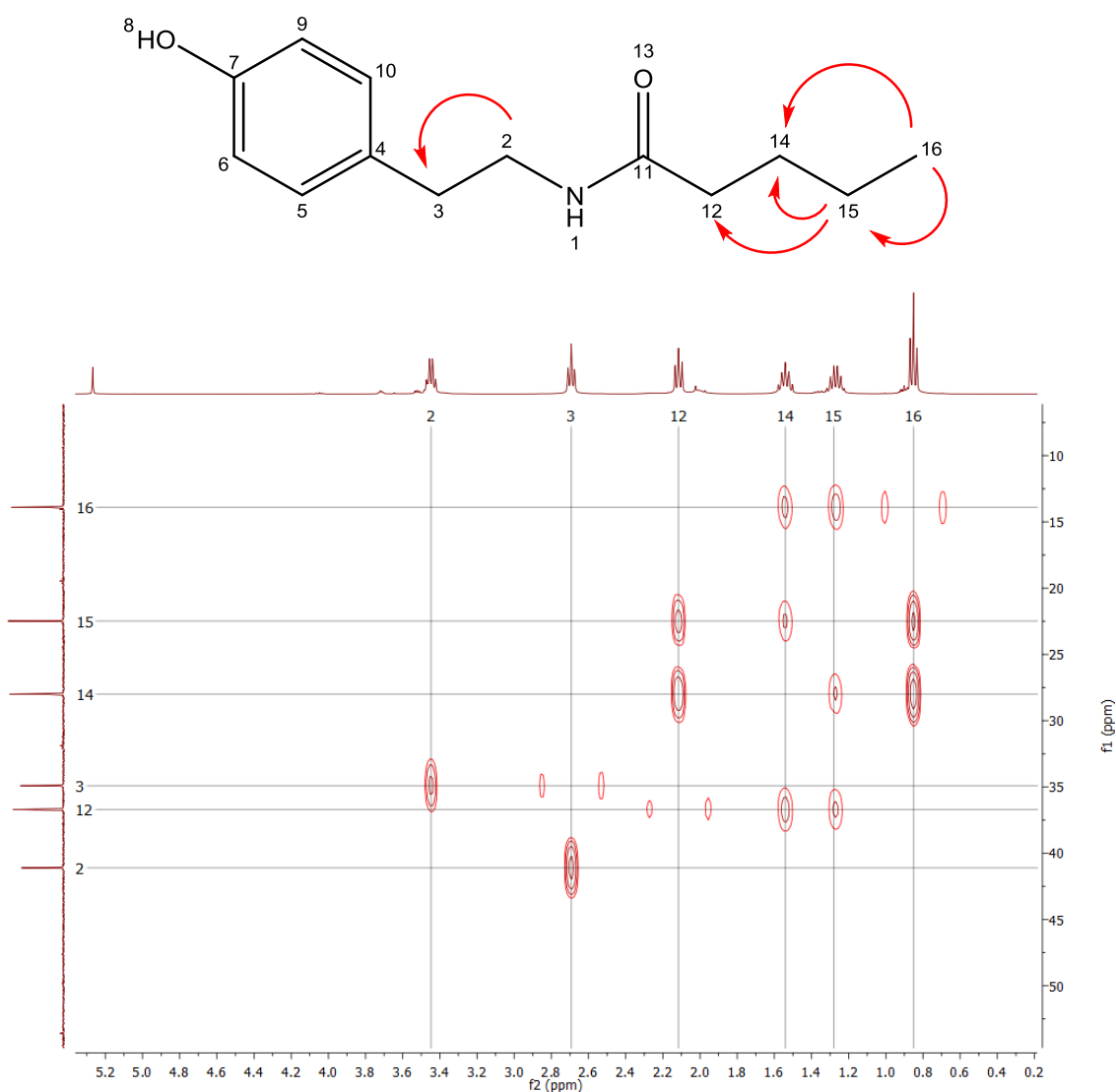
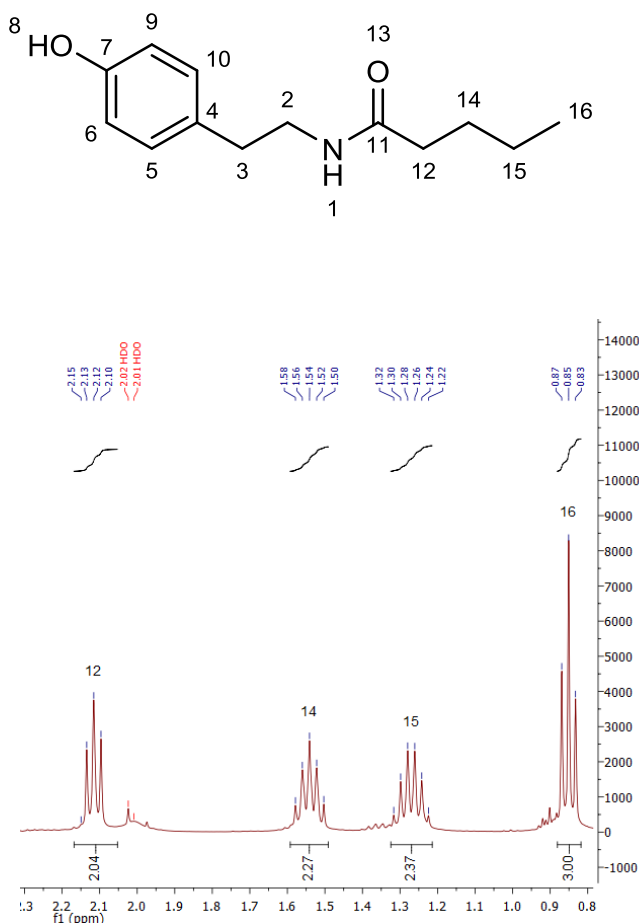


Figura 29. Ampliación de espectro HSQC

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Siguiendo en resonancia magnética nuclear de carbono (RMN- C^{13}), se observaron los diferentes 13 carbonos del compuesto. En campo bajo podemos observar el carbono del carbonilo que esta desprotegido a 174.16 δ (posición 11), también se observa el carbono 7 a un campo más bajo δ 155.47, los carbonos 10,5 y 4 a δ 129.86, los carbonos 10 y 5 son químicamente iguales por lo que corresponde la señal a los dos, el carbono 4 se encuentra ligeramente desplazado a δ 129.98, además de los carbonos 6 y 9 a δ 115.87. Los demás carbonos se observaron a campo alto ya que están protegidos al ser parte de una cadena alifática.

Figura 30. Ampliación de espectro y estructura CAPS 1.



Asignación	$\Delta\delta$ ppm (H)	$\Delta\delta$ ppm (C)
1	5.69 (t, 1H)	-
2	3.45 (c, 2H)	41.11
3	2.69 (t, 2H)	34.91
4	-	129.98
5	6.97 (d, 1H)	129.86
6	6.78 (d, 1H)	115.87
7	-	155.47
8	7.49 (s, 1H)	-
9	6.78 (d, 1H)	115.87
10	6.97 (d, 1H)	129.86
12	2.12 (t, 2H)	36.71
13	-	-
14	1.54 (p, 2H)	28.0
15	1.27 (h, 2H)	22.48
16	0.85 (t, 3H)	13.90

Tabla 13. Señales RMN H^1 y C^{13} CAPS 1

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los demás compuestos caracterizados presentaron señales muy parecidas, ya que son análogos se verán presente algunas señales en común. En el caso de CAPS 2 y CAPS 3 son muy parecidos entre sí ya que la única diferencia son el aumento de la cadena alifática, uno de 7 carbonos y otro de 8. En las señales por infrarrojo no hubo mucha diferencia entre estos dos compuestos, ambos presentan señales de estiramiento O-H a 3290 cm^{-1} así como doblamiento de N-H a 1550 cm^{-1} y la señal representativa de carbonilo C=O a 1641 cm^{-1} . Dentro de la caracterización por espectrometría de masas se observaron los pesos moleculares en relación masa/carga de CAPS 2 y CAPS 3 de 249 g/mol y de 263 g/mol respectivamente, así como un patrón de fragmentación muy parecido entre CAPS 1, 2 y 3 ya que comparten una relación estructural estrechamente cercana de una diferencia tan solo de uno a dos metilenos, por lo que vemos fragmentos similares en los tres diferentes espectros, como un pico base de 120 m/z , un fragmento de 107 m/z , otro de 77 m/z . En resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H) se pueden observar algunos picos similares, aunque la diferencia de estos metilenos entre las moléculas hace que a campo alto se observen diferencias en cuanto al número de multipletes. En el caso de CAPS 3 se puede observar la diferencia de un metileno (CH_2) lo que se observa como un aumento en el número de protones del multiplete a $\delta\ 1.29$ que integra para 8 protones, ya que los protones con enumeración 15, 16, 17 y 18 tienen un ambiente químico similar. En el caso de CAPS 2 solo se observa una disminución en el número de protones de las regiones 14, 15 y 16, que integra para 6 protones. Para los experimentos por resonancia magnética nuclear de carbono (RMN- ^{13}C), los espectros entre sí son muy similares, lo que destaca es la diferencia de 1 carbono entre CAPS 2 y CAPS 3.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el compuesto CAPS 2 el carbono del metilo (18) se encuentra a campo alto δ 14.19, mientras que en el caso de CAPS 3 se encuentra una señal extra correspondiente del metilo (19) a δ 14.22. En estos dos compuestos no se observan diferencias significativas ya que la diferencia estructural es tan solo de un metileno.

Figura 31. Estructura de CAPS 2 y CAPS 3

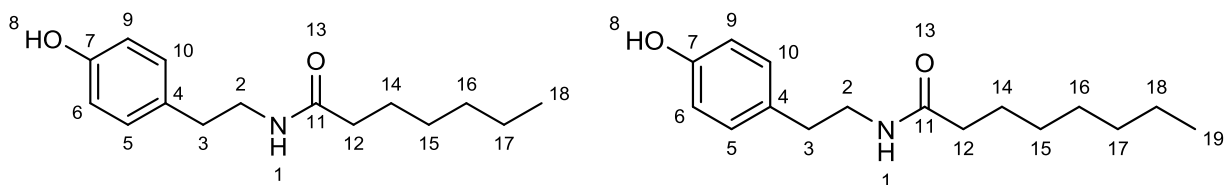


Tabla 14. Señales de RMN ^1H y ^{13}C de CAPS 2 y CAPS 3

Asignación	$\Delta\delta$ ppm (H)	$\Delta\delta$ ppm (C)
1	5.64 (t, 1H)	-
2	6.95 (c, 2H)	41.10
3	6.98 (t, 2H)	34.93
4	-	130
5	7.02 (d, 2H)	129.86
6	6.83 (d, 2H)	115.87
7	-	155.46
8	7.39 (s, 1H)	-
9	6.83 (d, 2H)	115.87
10	7.02 (d, 2H)	129.86
12	2.18 (t, 2H)	37.03
13	-	-
14	1.62 (p, 2H)	25.91
15	1.32 (m, 6H)	31.66
16	1.32 (m, 6H)	29.07
17	1.32 (m, 6H)	22.66
18	0.95 (t, 3H)	14.19

Asignación	$\Delta\delta$ ppm (H)	$\Delta\delta$ ppm (C)
1	5.81 (m, 1H)	-
2	3.45 (c, 2H)	41.14
3	2.69 (t, 2H)	34.92
4	-	129.90
5	7.01 (d, 2H)	129.84
6	6.82 (d, 2H)	115.88
7	-	155.55
8	7.68 (s, 1H)	-
9	6.82 (d, 2H)	155.88
10	7.01 (d, 2H)	129.84
12	2.11 (t, 2H)	37.01
13	-	-
14	1.56 (p, 2H)	25.95
15	1.29 (m, 8H)	29.35
16	1.29 (m, 8H)	29.12
17	1.29 (m, 8H)	31.83
18	1.29 (m, 8H)	22.76
19	0.95 (t, 3H)	14.22

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el caso de CAPS 4, al ser un análogo de CAPS 3, ya que el número de carbonos e hidrógenos es igual solo que en este compuesto la cadena hidrocarbonada está ramificada, los desplazamientos químicos serán un poco diferentes. En infrarrojo se puede observar las características señales de estiramiento O-H a 3303 cm^{-1} , señales características de un carbonilo C=O a 1633 cm^{-1} , un estiramiento N-H a 1566 cm^{-1} y un estiramiento C-O a 1247 cm^{-1} . Dentro de espectrometría de masas se observan el ion molecular correspondiente al peso del compuesto de 263 m/z . En este compuesto, en la caracterización por resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H) se observan a campo alto la parte ramificada de la molécula, en este caso se puede apreciar el triplete a $\delta\ 0.82$ que integra a 6 protones ya que los hidrógenos enumerados como (18 y 19) son químicamente iguales por lo que están agrupados en esta señal, a $\delta\ 1.24$ se observa un multiplete que integra para 4 protones en estas posiciones (16 y 17), y finalmente los metilenos (14 y 15) en un multiplete desplazado a $\delta\ 1.26$ con integración para 4 protones y el metino (12) a $\delta\ 2.09$ para 1 protón respectivamente. Estos metilenos (16, 17, 14 y 15) se agrupan de igual forma ya que en esta parte la molécula es simétrica. En RMN- ^{13}C se puede observar cómo es que estos metilenos (16, 17, 14 y 15) de igual forma se agrupan, generando señales en donde estas pertenecen a dos carbonos similares.

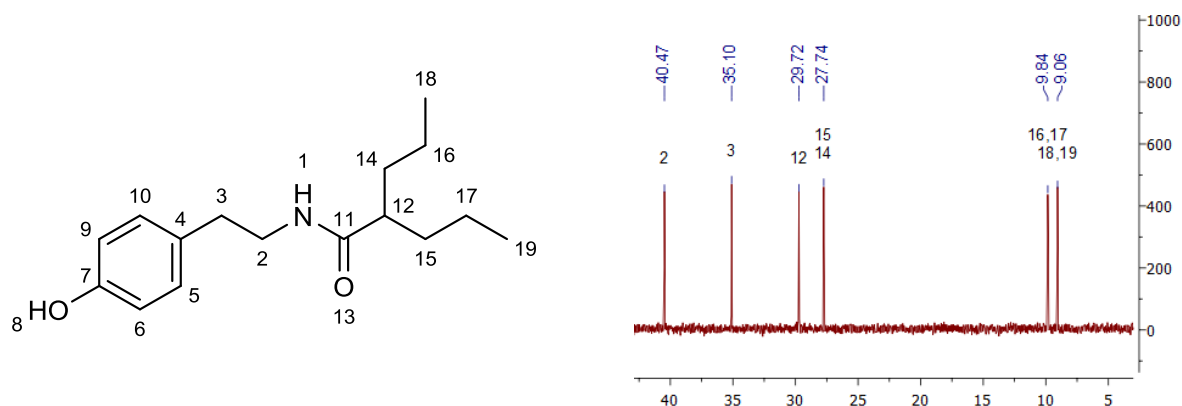


Figura 32. Compuesto CAPS 4 y ampliación de RMN- ^{13}C

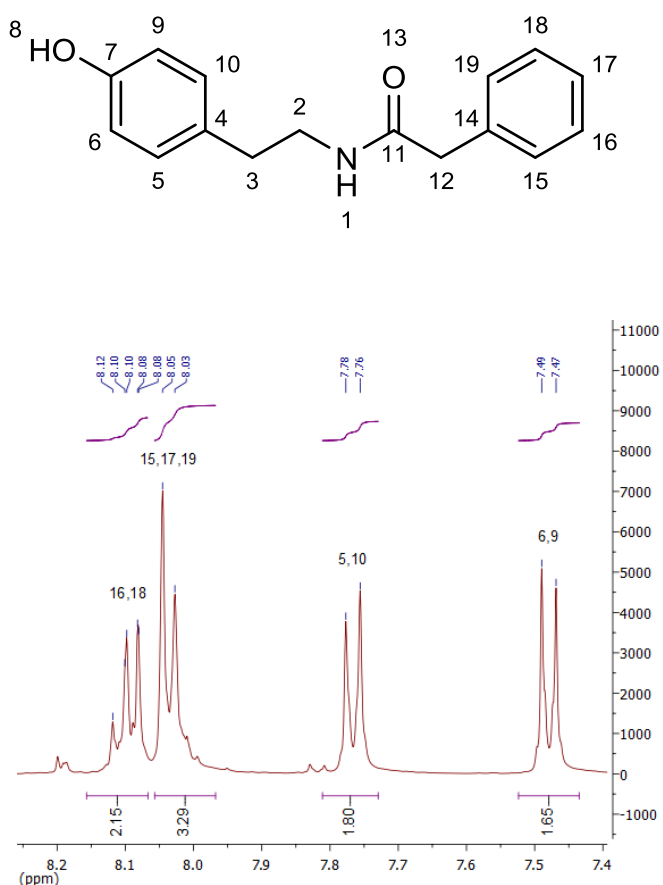
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Analizando el resto de los compuestos en el caso de CAPS 5, se observaron señales en infrarrojo en 3271 cm^{-1} pertenecientes al estiramiento O-H, además de señales como sp^2 a 2925 cm^{-1} , la típica señal de carbonilo C=O a 1644 cm^{-1} , doblamiento N-H a 1517 cm^{-1} , señales de alquenos aromáticos a C=C 1442 cm^{-1} , y estiramiento de C-O a 1220 cm^{-1} . Dentro de lo que es espectrometría de masas se observó un ion molecular de 255 m/z correspondiente al peso molecular del compuesto, además de un pico base de 120 m/z . En este compuesto, el sustituyente que presenta es un grupo fenilácetico, por lo que tiene un grupo aromático sustituyente además de un metileno, por lo que en resonancia magnética se verá distinto a los compuestos anteriores, que eran compuestos con cadenas alifáticas. Para el caso de resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H) se observaron solo 3 señales a campo alto, los grupos metilenos (2, 3 y 12) de la molécula, a $\delta\ 3.40$ se observa un triplete que integra para 2 protones correspondiente al metileno con designación (3). A campo más bajo $\delta\ 4.08$ un cuarteto que integra para 2 protones correspondiente al metileno con numeración (2) que se está acoplando con el hidrógeno del nitrógeno, y seguido a $4.16\ \delta$ el singulete del metileno (12) que integra para 2 protones, estos fueron las señales que se encontraban más apantalladas correspondiente con las partes alquílicas de la molécula. A campo más bajo se puede observar señales a $7.48\ \delta$ en forma de doblete que corresponden a los protones 6 y 9, seguido de un doblete a $7.77\ \delta$ correspondiente a los protones 5 y 10. A campo más bajo se observa un doblete correspondiente a los protones 15, 17 y 19 que integran a 3 protones, seguido de un triplete a $8.16\ \delta$ correspondiente a los protones 16, y 18 que integran a 2 protones respectivamente, todo esto en la zona aromática.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En resonancia magnética nuclear de carbono (RMN- ^{13}C) se puede observar el carbono del grupo carbonilo a 170.37 δ a un campo mayor de desprotección, también los carbonos de la parte aromática correspondiente al sustituyente fenilacético, se puede observar una señal a 136.95 δ correspondiente al carbono número 14, además de las señales de los carbonos 19 y 15 a 129.42 δ , los carbonos 18 y 16 a 128.59 δ seguido del carbono 17 a 126.71 δ que nos confirman la presencia de este sustituyente aromático.

Figura 33. CAPS 5 y ampliación de RMN- ^1H



Asignación	$\Delta\delta$ ppm (H)	$\Delta\delta$ ppm (C)
1	8.83 (t, 1H)	-
2	4.08 (c, 2H)	41.11
3	3.40 (t, 2H)	34.76
4	-	129.92
5	7.77 (d, 2H)	129.94
6	8.16 (d, 2H)	115.54
7	-	156.08
8	9.95 (s, 1H)	-
9	7.48 (d, 2H)	115.54
10	7.77 (d, 2H)	129.94
12	4.16 (s, 2H)	42.93
13	-	-
14	-	136.95
15	8.04 (d, 3H)	129.42
16	8.16 (d, 2H)	128.59
17	8.04 (d, 3H)	126.71
18	8.16 (d, 2H)	128.59
19	8.04 (d, 3H)	129.42

Tabla 15. señales de RMN- ^1H y ^{13}C de CAPS 5

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El compuesto CAPS 6 presenta una sustitución 3, 5 con grupos cloros, en este compuesto se observaron señales de infrarrojo en 1644.07 cm^{-1} perteneciente a la señal del carbonilo, se observó una señal a 1547.98 cm^{-1} perteneciente al estiramiento N-H del grupo amida, una señal para el grupo hidroxilo a 3294.56 cm^{-1} y se apreciaron señales aromáticas en 1449.06 cm^{-1} . En espectrometría de masas se observó un ion molecular de 309 m/z perteneciente al peso del compuesto además de un pico base de 120 m/z . En RMN- ^1H se observa dos señales a campo alto pertenecientes a los metilenos con asignación (2 y 3), a $\delta\ 2.73$ se observa un triplete que integra a dos protones correspondiente al metileno (3), y a campo más bajo un cuarteto $\delta\ 3.43$ que integra a 2 protones correspondiente al metileno (2). Se puede observar las señales correspondientes a la zona aromática sustituida con los grupos cloro, el protón con asignación (16) a $\delta\ 7.78$ que integra un protón, y las demás asignaciones (14 y 18) a $\delta\ 7.83$ que integra para dos protones en forma de doblete, estos dos protones son químicamente similares por lo que se obtiene una señal para ambos. En RMN- ^{13}C se observan los carbonos (2 y 3) a $\delta\ 34.52$ y $\delta\ 41.88$ respectivamente, también se aprecian los carbonos (15 y 17) a $\delta\ 134.72$ ya que son químicamente similares se observó una señal, de igual manera los carbonos (14 y 18) se observaron a $\delta\ 126.47$.

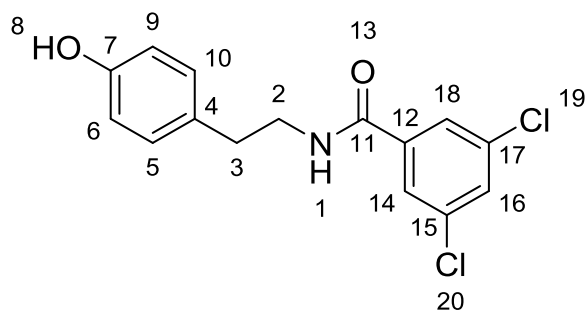


Figura 34. Estructura de CAPS 6

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Siguiendo con el análisis el compuesto CAPS 7 que es el que tiene es sustituyente más pequeño de 3 carbonos, en el cual se observaron señales de infrarrojo en 3282.61 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo hidroxilo -OH, una señal a 2930.47 cm^{-1} perteneciente al estiramiento C-H. La señal del carbonilo a 1631.76 cm^{-1} y una señal de doblamiento N-H de la amida a 1519.07 cm^{-1} respectivamente. En espectrometría de masas se observó un ion molecular de 193 m/z correspondiente al peso molecular de la estructura y un pico base de 122 m/z . En RMN- ^1H se observó un triplete a $\delta\ 0.98$ que integra para 3 protones correspondiente al metilo con asignación (14), posteriormente a campo más bajo se puede observar un cuarteto a $\delta\ 2.04$ que integra para 2 protones correspondiente al metileno con asignación (12), a un campo más bajo se observan los demás metilenos (2 y 3) en forma de cuarteto y triplete respectivamente a $\delta\ 3.19$ y $\delta\ 2.58$ integrado a dos protones cada uno. En RMN- ^{13}C se observan el carbón del metilo (14) a $\delta\ 10.43$, el carbón del metileno (12) a $\delta\ 29.0$ y los demás metilenos en campo alto el carbón con asignación (3) a $\delta\ 34.90$ y el carbón (2) a $\delta\ 40.95$.

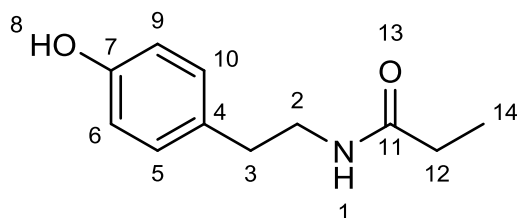


Figura 35. Estructura de CAPS 7

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El compuesto CAPS 8 en infrarrojo se observa una señal prominente perteneciente a los grupos O-H a 3278 cm^{-1} , una señal perteneciente al grupo carbonilo a 1571 cm^{-1} , una señal perteneciente al doblamiento N-H a 1506 cm^{-1} , una señal a 1450 cm^{-1} perteneciente al doble enlace aromático C=C y una señal ancha a 1224 cm^{-1} perteneciente al estiramiento C-O. En espectrometría de masas no se puede observar ningún ion molecular debido al método tal vez por el número de hidroxilos en la molécula se necesite de otra metodología. En resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H) se observa en la región aromática a campo alto con respecto a los demás δ 6.34 un singlete perteneciente a la región aromática con enumeración 16 integrando a un protón, seguido a campo más bajo un triplete a 6.66 δ que integra a los protones (6, 9, 14 y 18) con integración de 4 protones, estos se encuentran adyacentes a los grupos hidroxilos por lo que se encuentran menos apantallados. En campo más bajo podemos encontrar las señales pertenecientes a los protones de los hidroxilos, a 9.13 δ un singlete perteneciente a la posición (8) que integra a 1 protón, y a 9.40 δ otro singlete perteneciente a los hidroxilos 19 y 20 que integran a 2 protones respectivamente. Estos hidroxilos absorben a campo más bajo ya que son los menos apantallados de la molécula. En RMN- ^{13}C las señales que destacan son la de los carbonos 16 desplazado a 105.40 δ , los carbonos 14 y 18 desplazados a 105.85 δ , y el carbono 12 a 137.45 δ .

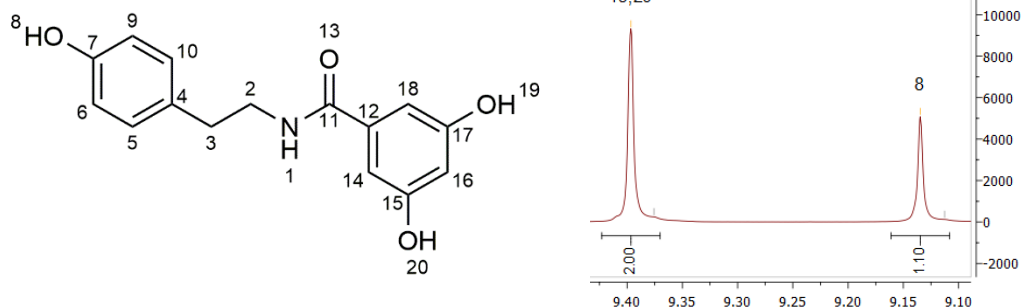


Figura 36. Estructura de CAPS 8 y ampliación de RMN- ^1H

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para el compuesto CAPS 9 mediante espectrometría de masas se pudo observar el ion molecular de 255 m/z correspondiente al del compuesto, así como un pico base de 119 m/z . En infrarrojo se observaron las señales características de un carbonilo C=O a 1603 cm^{-1} , estiramiento de carbono oxígeno C-O a 1297 cm^{-1} y C-N a 1247 cm^{-1} . Este compuesto contiene un sustituyente derivado del ácido *p*-toulíco por lo que contiene un sistema aromático y un metilo. En RMN- ^1H se puede observar la presencia de un singlete a campo alto δ 2.35 que integra para 3 protones pertenecientes a este metilo con designación (19) esto son los hidrógenos más apantallados por lo que encuentran en esta zona. Seguido a campo más bajo podemos encontrar los metilenos 3 y 2, desplazados a 2.73 δ y 3.41 δ formando un cuarteto y un triplete respectivamente, ambas señales integrando para dos protones cada uno. Además de las señales de los protones (14, 18 y 15, 17) los cuales forman parte del sistema aromático del sustituyente, se encuentran a δ 7.74 y δ 7.26 formando dos dobletes que integran a los dos protones cada uno. En RMN- ^{13}C se observó la presencia del carbono de este metileno a 21.38 δ , además de los carbonos pertenecientes a la parte aromática a 129.22 δ y 127.59 δ de los carbonos (14,18 y 15,17), respectivamente.

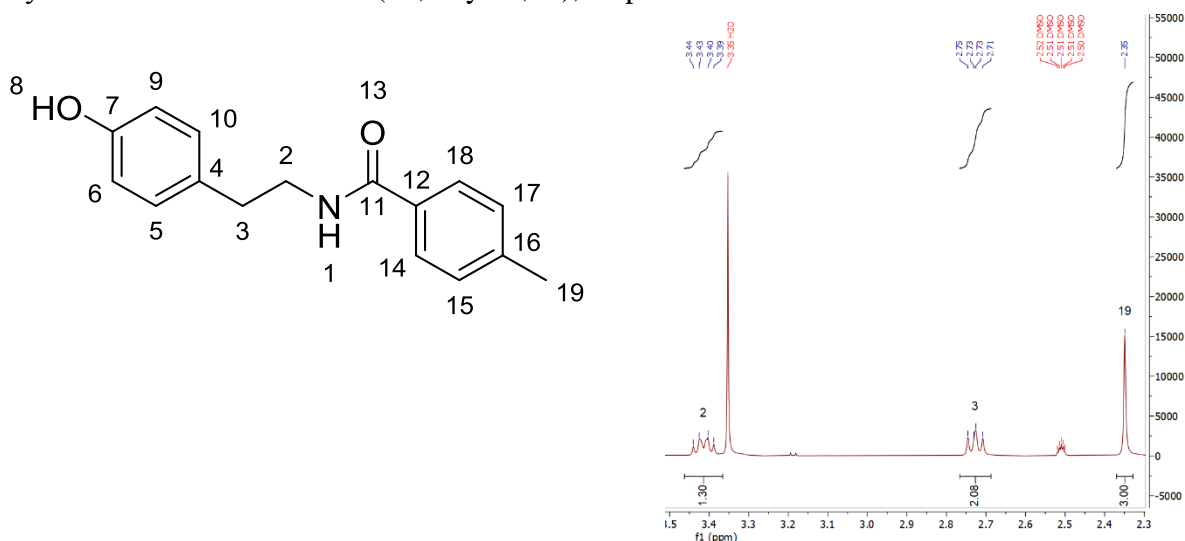


Figura 37. Estructura de CAPS 9 y ampliación de RMN- ^1H

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El último compuesto es CAPS 10 presenta un doble enlace además de un grupo arilo. Dentro de espectrometría de masas se observó un ion molecular de compuesto de $267 m/z$ correspondiente al peso del compuesto. En infrarrojo se observa una señal a 1665 cm^{-1} del grupo carbonilo, una señal de N-H a 1533 cm^{-1} , y una señal a 1650 cm^{-1} perteneciente al grupo alqueno. En RMN- ^1H se observa las señales de los protones (17, 18 y 19) que se juntan con el protón (14), dando una integración de 4 en forma de multiplete desplazado a $\delta 7.47$. El protón 12 se encuentra a 6.74δ en forma de doblete integrando para un protón. De este anillo de la parte aromática se encuentra a 7.59δ en forma de doblete que integra a dos protones. A campo alto se observa la presencia de los protones perteneciente a los metilenos (3 y 2) a $\delta 2.67 \delta$ y $\delta 3.39$ respectivamente integrado para los dos protones; la señal del metileno (2) se encuentra solapada con la señal de la presencia de H_2O . En RMN- ^{13}C se observó la señal de carbono de los carbonos 12 y 14 a 122.81δ y 138.94δ respectivamente además de los carbonos de la parte aromática, los carbonos 16 y 20 a 127.95δ , los carbonos 17 y 19 a 129.38δ , el carbono 18 a 129.84δ y el carbono 15 a 135.43δ , además de las señales pertenecientes al resto de la molécula lo que nos confirma la estructura correcta del compuesto.

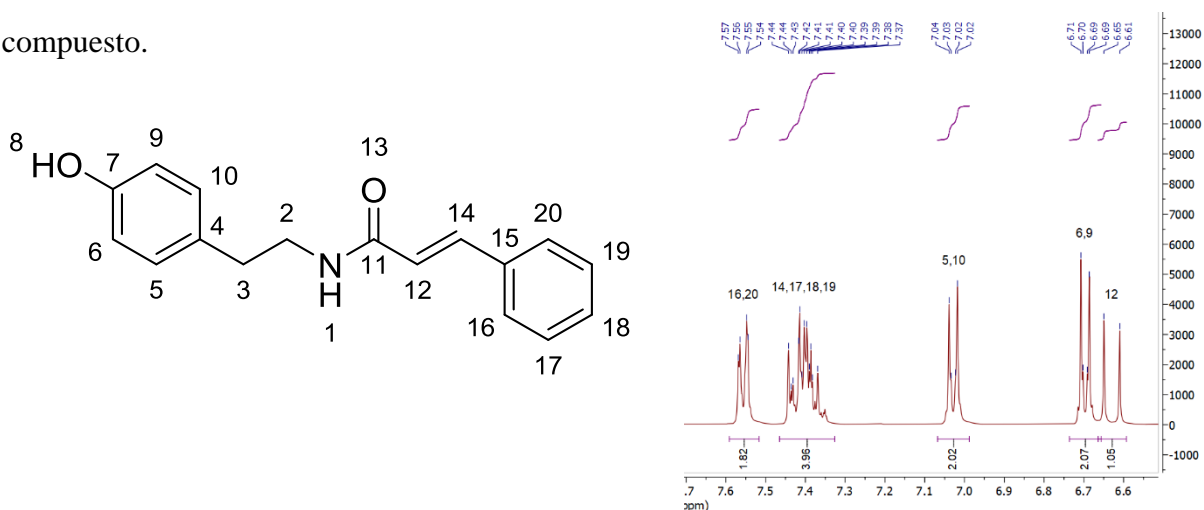


Figura 38. Estructura de CAPS 10 y ampliación de RMN- ^1H

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

DISCUSIÓN DE RESULTADOS INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Los diferentes análogos sintetizados fueron evaluados para su capacidad inhibitoria de las colinesterasas acetilcolina y butirilcolina. Los resultados se pueden observar en la tabla X.

Tabla 16. Resultados de inhibición enzimática de AChE y BchE por los análogos
(expresados en CI_{50})

Compuesto	Acetilcolinesterasa		Butirilcolinesterasa	
	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	D. st	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	D. st
CAPS 1	>187.5		>187.5	
CAPS 2	>187.5		>187.5	
CAPS 3	>187.5		>187.5	
CAPS 4	>187.5		>187.5	
CAPS 5	>187.5		>187.5	
CAPS 6	>187.5		>187.5	
CAPS 7	>187.5		>187.5	
CAPS 8	>187.5		>187.5	
CAPS 9	>187.5		>187.5	
CAPS 10	>187.5		>187.5	
Capsaicina	>187.5		58.18	5.65
Galantamina	0.707	0.04	14.85	0.96

DISCUSIÓN DE RESULTADOS INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Los resultados de inhibición de AChE y BChE muestran que todos los compuestos sintetizados obtuvieron valores de CI_{50} mayores a 187.5 $\mu\text{g/mL}$, a diferencia del control positivo evaluado de galantamina con una CI_{50} de 0.7 $\mu\text{g/mL}$. Haciendo mención del control de capsaicina grado reactivo utilizado, no mostro actividad contra la enzima acetilcolinesterasa, sin embargo, si presento una CI_{50} de 58.18 $\mu\text{g/mL}$ para butirilcolinesterasa, casi cuatro veces más respecto al control positivo (14.85 $\mu\text{g/mL}$). Todos los capsaicinoides fueron evaluados a una concentración máxima de 187.5 $\mu\text{g/mL}$ para ambas enzimas, sin embargo, ninguno mostró efecto inhibitorio significativo, de tal forma que en la tabla 7 se desglosan los porcentajes de inhibición que presentaron los diferentes CAPS a la máxima concentración evaluada.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Tabla 17. % de inhibición enzimática de AChE y BchE por los análogos a 187.5 µg/ml

Compuesto	Acetilcolinesterasa		Butirilcolinesterasa	
	% de inhibición	D. st	% de inhibición	D. st
CAPS 1	6.61	0.32	22.33	2.75
CAPS 2	17.2	5.03	18.20	2.55
CAPS 3	1.07	0.26	14.41	2.55
CAPS 4	0.00	0.00	28.83	6.98
CAPS 5	6.21	0.98	36.94	2.38
CAPS 6	7.59	2.93	7.80	0.65
CAPS 7	1.58	0.25	5.20	3.71
CAPS 8	0.00	0.00	13.76	5.70
CAPS 9	7.25	1.46	4.95	0.52
CAPS 10	4.43	0.52	39.24	7.68
Capsaicina	15.68	3.39	---	---

Haciendo una comparación de estos porcentajes, es posible distinguir una mayor selectividad de los análogos hacia la inhibición de la enzima butirilcolinesterasa con valores mínimos de ~5% (CAPS 9) pero máximos de 39% (CAPS 10), a diferencia de la enzima acetilcolinesterasa en donde el valor máximo de inhibición fue del compuesto CAPS 2 con solo 17%.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Analizando primeramente los resultados de inhibición de AChE, el mejor valor fue el mostrado por CAPS 2 con 17.2% el cual presenta como grupo R una cadena alifática de 7 átomos de carbono. Por otro lado, fueron CAPS 4 y CAPS 8 los que no mostraron ningún efecto. En el caso del CAPS 4 (derivado de ácido valproico), se podría pensar que las ramificaciones afectan negativamente la actividad. Algo importante a resaltar es el hecho de que CAPS 2 supero al control de capsaicina, la cual tuvo 15.68%.

Respecto a la enzima butirilcolinesterasa, fueron CAPS 10 y CAPS 5 los que mostraron un mayor porcentaje de inhibición (39.2 y 36.9 % respectivamente), ambos presentando anillos aromáticos sin ningún sustituyente como grupo R. Por el contrario, fueron CAPS 9, CAPS 7 y CAPS 6 (4.9, 5.2 y 7.8% respectivamente) los que presentaron más baja inhibición.

Intentando establecer una relación entre los resultados *in-vitro* con los del estudio quimioinformático, la capsaicina obtuvo un valor de -8.2 kcal/mol para AChE y con un valor de -7.7 kcal/mol para BChE se esperaría un mejor resultado para la enzima AChE, aunque no fue el mejor valor en relación con todos los compuestos, fue la que obtuvo el mejor resultado en el estudio de inhibición enzimática para la enzima BChE. Si bien los compuestos no superaron el control, los resultados del estudio quimioinformático nos arrojaron datos favorables de docking molecular, por ejemplo, para el compuesto CAPS 5 era el que tenía un mejor valor de energía de unión a la enzima BChE de -7.9 kcal/mol que comparada con capsaicina que obtuvo un valor de -7.7 kcal/mol esperaríamos un resultado similar entre CAPS 5 y capsaicina los cuales en el ensayo de inhibición obtuvieron resultados diferentes.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Las interacciones más importantes observadas por capsaicina y BChE que se observaron en el estudio quimioinformático fueron de puente de hidrógeno con Glutamato 197 con respecto a la parte fenólica del compuesto a una distancia de 2.99 Å así como interacciones de tipo π - π con el anillo aromático y Triptófano 82 y posibles interacciones hidrofóbicas con Leucina 286, es posible que la cadena alifática y el doble enlace estén influyendo en este resultado y aunque no se observe una interacción con el metoxilo de la capsaicina puede que este influyendo al momento de la inhibición enzimática.

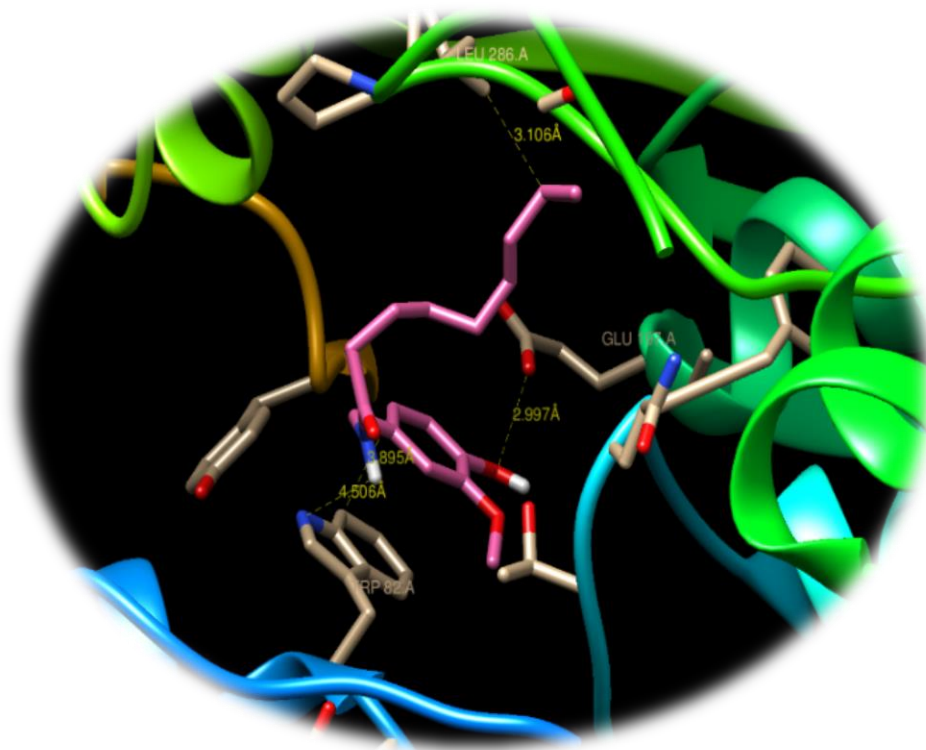


Figura 39. Acoplamiento molecular de CAPS con BChE

Se recomienda realizar más estudios, así como análogos para poder establecer una clara relación entre las estructuras y la inhibición enzimática.

DISCUSIÓN DE
RESULTADOS ESTUDIO
QUIMIOINFORMÁTICO

DISCUSIÓN DE RESULTADOS ESTUDIO QUIMIOINFORMÁTICO

Se realizaron estudios quimioinformáticos a los diez compuestos sintetizados, además de utilizar a la capsaicina con el fin de poder observar las diferencias que existen ya que es el compuesto de referencia. La capsaicina obtuvo un valor de -8.2 kcal/mol para el ensayo con la enzima acetilcolinesterasa, en este ensayo se pudieron observar diferentes interacciones, como dos puentes de hidrógeno con Serina 200 respecto a la parte del hidroxilo y metoxilo de la molécula a una distancia de 3.03 y 2.97 Å. Además, se puede observar otra interacción de tipo puente de hidrógeno con el residuo Tirosina 121 a una distancia de 3.13 Å con respecto al hidrógeno unido al nitrógeno perteneciente al enlace amida, además se observan posibles interacciones hidrofóbicas en la periferia con los residuos Tirosina 334, Fenilalanina 330 y 331; en la imagen inferior se muestra el complejo entre capsaicina en color rosa y AChE. En el caso de la enzima butirilcolinesterasa la capsaicina obtuvo un valor de -7.7 kcal/mol y las interacciones que se observaron con la enzima fueron de puente de hidrógeno con Glutamato 197 con respecto a la parte fenólica del compuesto a una distancia de 2.99 Å así como interacciones de tipo π - π con el anillo aromático y Triptófano 82 y posibles interacciones hidrofóbicas con Leucina 286 (Figura 40).

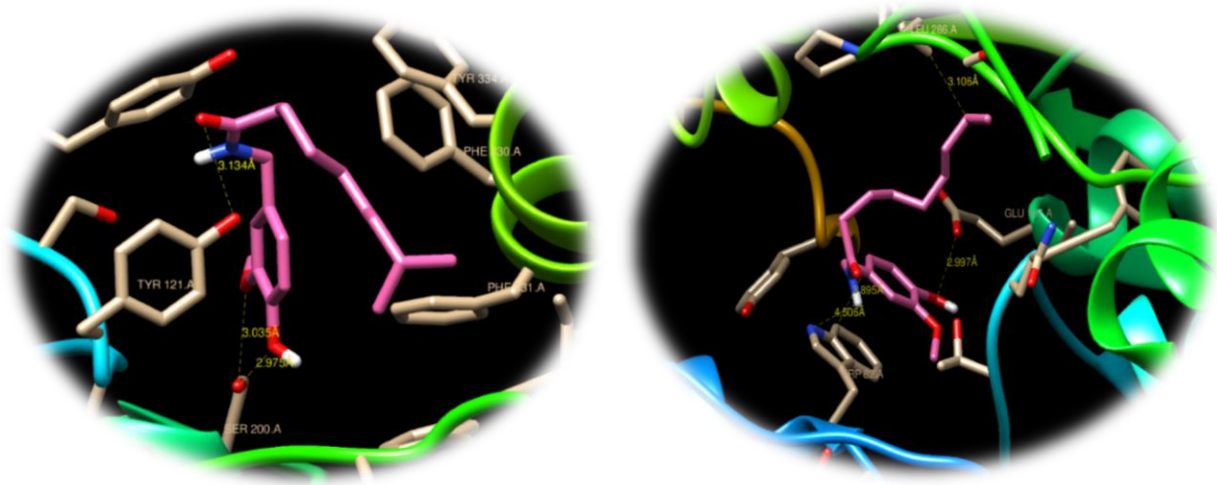


Figura 40. Acoplamiento molecular de capsaicina con AChE (derecha) y BChE (izquierda).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS ESTUDIO QUIMIOINFORMÁTICO

En la siguiente tabla se pueden apreciar las diferentes interacciones que se observaron en el complejo molecular, en color rosa se indican los puentes de hidrógeno, en color verde interacciones de tipo π - π y de color negro interacciones hidrofóbicas.

Compuestos	Interacciones con AChE	Interacciones con BChE
CAPSAICINA	SER 200, TYR 121 PHE 330, PHE 331	GLU 197, TRP 82, LEU 286
CAPS 1	SER 200, ASN 85, ASP 72, TRP 84	TYR 332, TRP 82
CAPS 2	ASN 85, ASP 72, SER 200, HIS 440 TRP 84, TYR 442	TYR 332, TRP 82
CAPS 3	TYR 121, LEU 332, TRP 84	TYR 332, TRP 82
CAPS 4	SER 122, SER 200, PHE 330, PHE 331	TYR 440, HIS 438, TRP 82
CAPS 5	SER 122, TYR 121 SER 200, TRP 84, PHE 330	TYR 440, TYR 332, TRP 82
CAPS 6	SER 122, TRP 84,	TYR 440, PHE 329, ASP 70, TYR 332
CAPS 7	SER 122, TYR 121, SER 200, TRP 84	TYR 440, TYR 332, TRP 82, ALA 328
CAPS 8	SER 122, TYR 121, ASP 72, TYR 442, ASN 85, TRP 84	TRP 82, HIS 438
CAPS 9	ASP 72, TYR 334	TYR 332, TRP 82
CAPS 10	TYR 121, TRP 279	TYR 440, TYR 332, TRP 82

Tabla 18. Interacciones con las enzimas AChE y BChE.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS ESTUDIO QUIMIOINFORMÁTICO

Los diez compuestos sintetizados presentaron interacciones diferentes entre sí; los compuestos presentaron por lo menos una interacción de tipo puente de hidrógeno lo cual es posible gracias a que comparten en común un grupo hidroxilo y un enlace amida los cuales pueden interactuar con diversos residuos de aminoácidos para formar estas interacciones. Las interacciones hidrofóbicas son las que se repitieron más después de los puentes de hidrogeno, la mayoría de los compuestos sintetizados contiene cadenas alifáticas o residuos de cadenas lo cual hace posible esta interacción, algunos varían entre longitud de cadena. La interacción por π - π es la menos frecuente, aunque todos tiene un sistema aromático con el cual puede existir algún tipo de interacción, es necesario que en el lugar donde se realice el acoplamiento molecular contenga residuos de aminoácidos aromáticos.

Los compuestos con mejor de energía de unión para el caso de AChE fue CAPS 8 el cual tuvo un valor de -9.2 kcal/mol lo cual representa un valor alto si se compara con el modelo de Capsaicina con un valor de -8.2 kcal/mol. En este compuesto se pudieron observar interacciones mayoritarias de puente de hidrógeno, esto debido a que es el compuesto con mayor cantidad de hidroxilos en su estructura, contiene tres grupos hidroxilos aromáticos con los cuales es posible formar puentes de hidrogeno. El hidroxilo en posición *para* de la molécula se encuentra formando un puente de hidrógeno con TRP 84 a 3.8 Å, el enlace amida se encuentra formando una interacción con los aminoácidos SER 122 a 2.87 Å y con ASN 85 a 3.8 Å los otros dos grupos hidroxilos de la molécula se encuentran interactuando con TYR 121 a 3.4 Å. En total se pudieron observar 4 interacciones por puente de hidrógeno en diferentes partes de la molécula, además una interacción de tipo π - π con TRP 84 a una distancia de 3.66 Å. Los enlaces de tipo puente de hidrógeno son importantes ya que ocurren

en la naturaleza de manera constante, si bien su fuerza es débil comparada con los enlaces covalentes, son interacciones que se observan en diferentes interacciones de proteínas con ligandos (Figura 41).

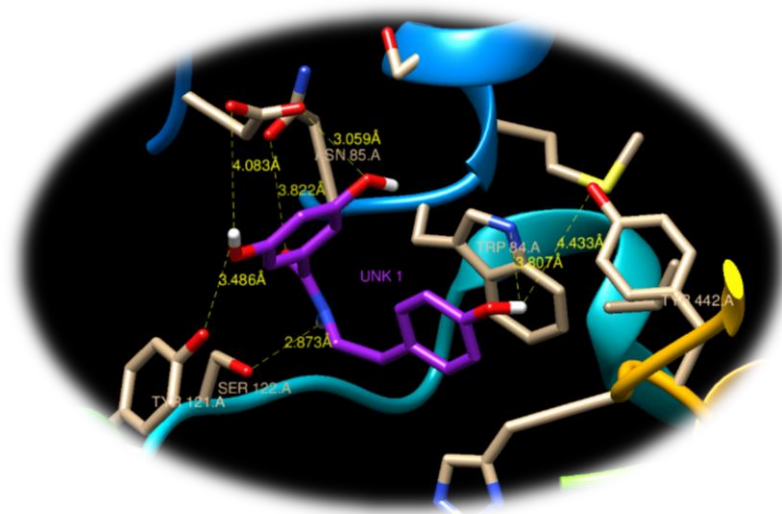


Figura 41. Acoplamiento molecular de CAPS 8 con AChE.

En el caso de la enzima BChE la molécula con mejor resultado fue CAPS 5, con un valor de -7.9 kcal/mol, se observan interacciones de tipo π - π con TYR 332 a una distancia de 3.67 Å y con TRP 82 a 3.80 Å y un puente de hidrógeno con TYR 440 a 2.95 Å. En este compuesto se presentaron dos interacciones de tipo π , este tipo de interacciones que se dan en este caso entre anillos aromáticos, causado por los orbitales presente en los anillos, estas interacciones le dan estabilidad al acoplamiento y aunque no son muy fuertes ayudan a mantener el complejo ligando-receptor.

Este tipo de interacciones es común encontrarlas en biomoléculas muy estables como ADN y ARN. Este compuesto es el que presentó más interacciones de este tipo por lo que posiblemente le estén dando mayor estabilidad y requiera menor energía al momento de realizar el acoplamiento molecular con la enzima, ya que se adapta mejor a la cavidad (Figura 44).

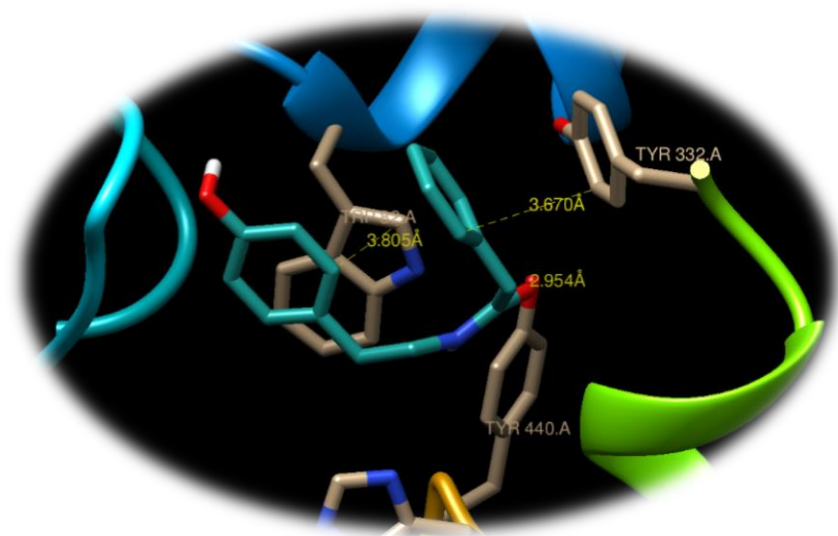


Figura 42. Acoplamiento molecular de CAPS 5 con BChE.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Con el análisis de resultados obtenidos del estudio sintético llevado a cabo en esta tesis, se establecen las siguientes conclusiones:

- De la ruta sintética propuesta se lograron obtener diez análogos de capsaicinoides (CAPS 1 – CAPS 10) con rendimientos entre 30-87%.
- Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados mediante técnicas de IR, CG-EM, RMN ^1H y RMN ^{13}C , confirmando sus estructuras.
- Los compuestos sintetizados fueron evaluados *in vitro* como inhibidores de dos colinesterasas: acetil y butirilcolinesterasa, encontrando que los análogos de capsaicinoides mostraron mayor selectividad hacia la inhibición de la enzima butirilcolinesterasa.
- En los estudios *in vitro* de inhibición enzimática, la capsaicina utilizada como control fue el compuesto con mayor actividad, esto podría deberse a la necesidad de una disustitución de tipo hidroxilo y metoxilo en la región aromática.
- Para la enzima acetilcolinesterasa, el análogo CAPS 2 fue el que mostró un mejor resultado con 17.2 % de inhibición a la concentración máxima evaluada de 187.5 $\mu\text{g/mL}$.

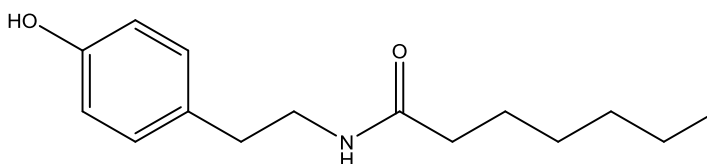


Figura 43. Estructura química de CAPS 2

CONCLUSIONES

- En la inhibición de la enzima butirilcolinesterasa fue el compuesto CAPS 10 con un porcentaje de 39.24 a la concentración máxima evaluada de 187.5 $\mu\text{g/mL}$.

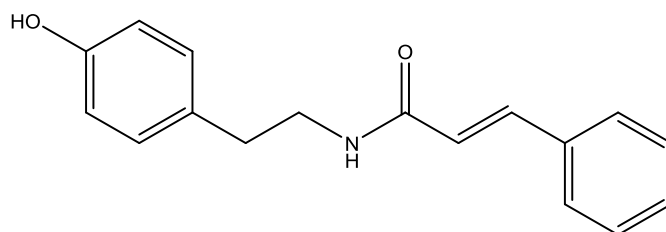


Figura 44. Estructura química de CAPS 10

- En el estudio quimioinformático el capsaicinoide que mostro mejor resultado para la enzima AChE fue CAPS 8, con un valor de energía de unión de -9.2 kcal/mol en donde se pudieron observar interacciones de tipo puente de hidrógeno con residuos de aminoácidos TRP 84, SER 122, TYR 121, ASP 72, TYR 442, ASN 85, además de una interacción de tipo π - π con TRP 84.

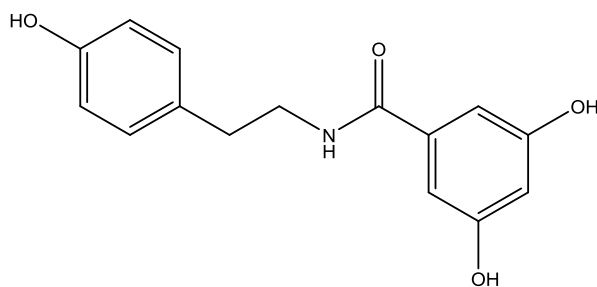


Figura 45. Estructura química de CAPS 8

CONCLUSIONES

- En el caso de la enzima BChE el compuesto con mejor resultado fue CAPS 5 el cual obtuvo un valor de energía de unión de -7.9 kcal/mol y se observaron diferentes interacciones, una de puente de hidrógeno con el residuo de aminoácido TYR 440, y dos interacciones de tipo π - π con TYR 332 y TRP 82.

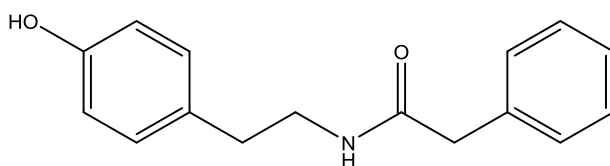


Figura 46. Estructura química de CAPS 5

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Cortez-gallardo, V., Macedo-ceja, J. P., & Arteaga-aureoles, G. (2004). *Farmacognosia_breve_historia* 15(2), 123–136.
2. Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303–336.
3. Gómez Aspe, R. (2006). Aislamiento de la morfina: 200 años de un descubrimiento fundamental para la química moderna. *Anales de La Real Sociedad Española de Química*, 102(2), 45–53.
4. Ravelo, Á. G., & Braun, A. E. (2009). Relevancia De Los Productos Naturales En El Descubrimiento De Nuevos Fármacos En El S. Xxi. *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 103(2), 409–419.
5. Braña, M. F., Del Río, L. A., Trives, C., & Salazar, N. (2005). La verdadera historia de la Aspirina. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 71(4), 813–819.
6. De Lourdes Reyes-Escogido, M., Gonzalez-Mondragon, E. G., & Vazquez-Tzompantzi, E. (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*, 16(2), 1253–1270.
7. Yang, Z., Lasker, K., Schneidman-Duhovny, D., Webb, B., Huang, C. C., Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Meng, E. C., Sali, A., & Ferrin, T. E. (2012). UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An integrated modeling system. *Journal of Structural Biology*, 179(3), 269–278.

8. Martínez, M. (2019). Los chiles, su importancia más allá de tenerlos en la mesa. Desde El Hervario CICY 11, 112, 108–112.
9. Luo, X. J., Peng, J., & Li, Y. J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology*, 650(1), 1–7.
10. Basith, S., Cui, M., Hong, S., & Choi, S. (2016). Harnessing the therapeutic potential of capsaicin and its analogues in pain and other diseases. *Molecules*, 21(8).
11. Sun, F., Xiong, S., & Zhu, Z. (2016). Dietary capsaicin protects cardiometabolic organs from dysfunction. *Nutrients*, 8(5), 1–13.
12. Jordt, S. E., & Julius, D. (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell*, 108(3), 421–430.
13. Barceloux, D. G. (2009). Pepper and Capsaicin (Capsicum and Piper Species). *Disease-a-Month*, 55(6), 380–390.
14. Morales Martínez, C. E., & Marquez Aguirre, A. L. (2016). The Prospective Antiobesity Effect of Capsaicin Synthetic Analogs: A Matter of Weight. *Medicinal Chemistry*, 06(05), 365–371.
15. Hayman, M., & Kam, P. C. A. (2008). Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia and Critical Care*, 19(5–6), 338–343.
16. Aliyu, A. O. C., & Abubakar, I. (2018). Synthesis of Some Capsaicin Analogues Using Fatty and Benzoic Acid- Chlorides. 5(10), 1–3.

17. Wang, B., Yang, F., Shan, Y. F., Qiu, W. W., & Tang, J. (2009). Highly efficient synthesis of capsaicin analogues by condensation of vanillylamine and acyl chlorides in a biphasic H₂O/CHCl₃ system. *Tetrahedron*, 65(27), 5409–5412.
18. Santos, M. M. P., Vieira-Da-Motta, O., Vieira, I. J. C., Braz-Filho, R., Gonçalves, P. S., Maria, E. J., Terra, W. S., Rodrigues, R., & Souza, C. L. M. (2012). Antibacterial activity of *Capsicum annum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. *Journal of Natural Medicines*, 66(2), 354–356.
19. Orhan, I., Naz, Q., Kartal, M., Tosun, F., Şener, B., & Choudhary, M. I. (2007). In vitro anticholinesterase activity of various alkaloids. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 62(9–10), 684–688.
20. Santos, M. M. P., Vieira-Da-Motta, O., Vieira, I. J. C., Braz-Filho, R., Gonçalves, P. S., Maria, E. J., Terra, W. S., Rodrigues, R., & Souza, C. L. M. (2012). Antibacterial activity of *Capsicum annum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. *Journal of Natural Medicines*, 66(2), 354–356.
21. Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335.
22. Kostić, D. A., Dimitrijević, D. S., Stojanović, G. S., Palić, I. R., Dordević, A. S., & Ickovski, J. D. (2015). Xanthine oxidase: Isolation, assays of activity, and inhibition. *Journal of Chemistry*, 2015.
23. Evangelista, S. Novel therapeutics in the field of capsaicin and pain. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2015, 8, 373-375.

24. Cheung, J., Rudolph, M. J., Burshteyn, F., Cassidy, M. S., Gary, E. N., Love, J., Franklin, M. C., & Height, J. J. (2012). Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(22), 10282–10286.
25. Kostić, D. A., Dimitrijević, D. S., Stojanović, G. S., Palić, I. R., Dordević, A. S., & Ickovski, J. D. (2015). Xanthine oxidase: Isolation, assays of activity, and inhibition. *Journal of Chemistry*, 2015.
26. Giulia Battelli, M., Polito, L., Bortolotti, M., & Bolognesi, A. (2016). Xanthine Oxidoreductase in Drug Metabolism: Beyond a Role as a Detoxifying Enzyme. *Current Medicinal Chemistry*, 23(35), 4027–4036.
27. Vijesh, A. M., Isloor, A. M., Telkar, S., Arulmoli, T., & Fun, H. K. (2013). Molecular docking studies of some new imidazole derivatives for antimicrobial properties. *Arabian Journal of Chemistry*, 6(2), 197–204.
28. Rosenberry, T. L., Brazzolotto, X., MacDonald, I. R., Wandhammer, M., Trovaslet-Leroy, M., Darvesh, S., & Nachon, F. (2017). Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study. *Molecules*, 22(12).
29. López-Durán, R. M., Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., Pérez-Aguilar, B., Salinas-Arreortua, N., Serrano, H., García-Suárez, M. D., Muñoz-Nava, H., Hernández-Hernández, Á., Vidal-Moreno, C., & Gómez-Olivares, J. L. (2018). La estructura y función de las colinesterasas: Blanco de los plaguicidas. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 34, 69–80.

APÉNDICES

Figura 47. Espectro de RMN ^1H de CAPS 1

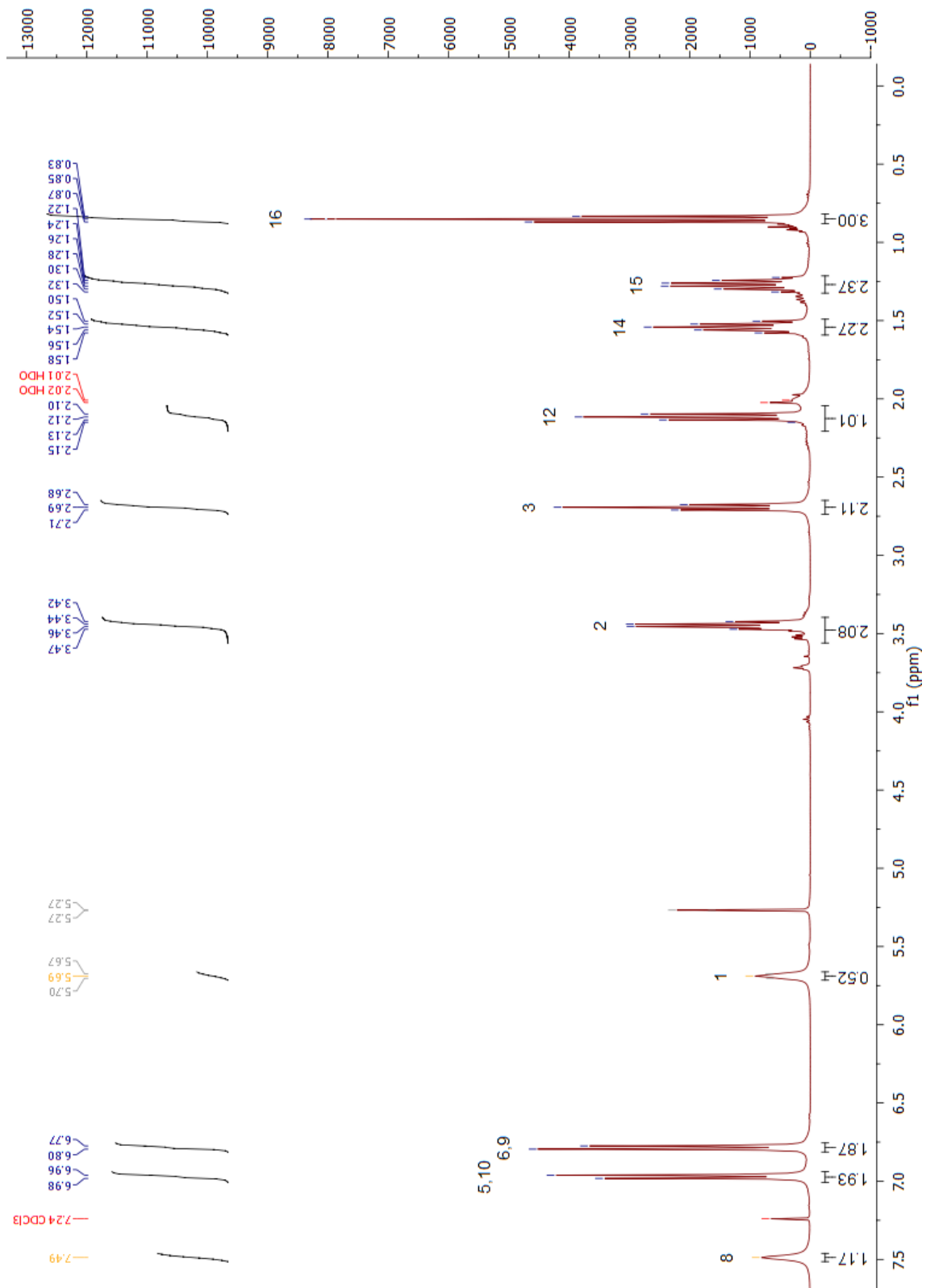


Figura 48. Espectro de RMN 13C de CAPS 1

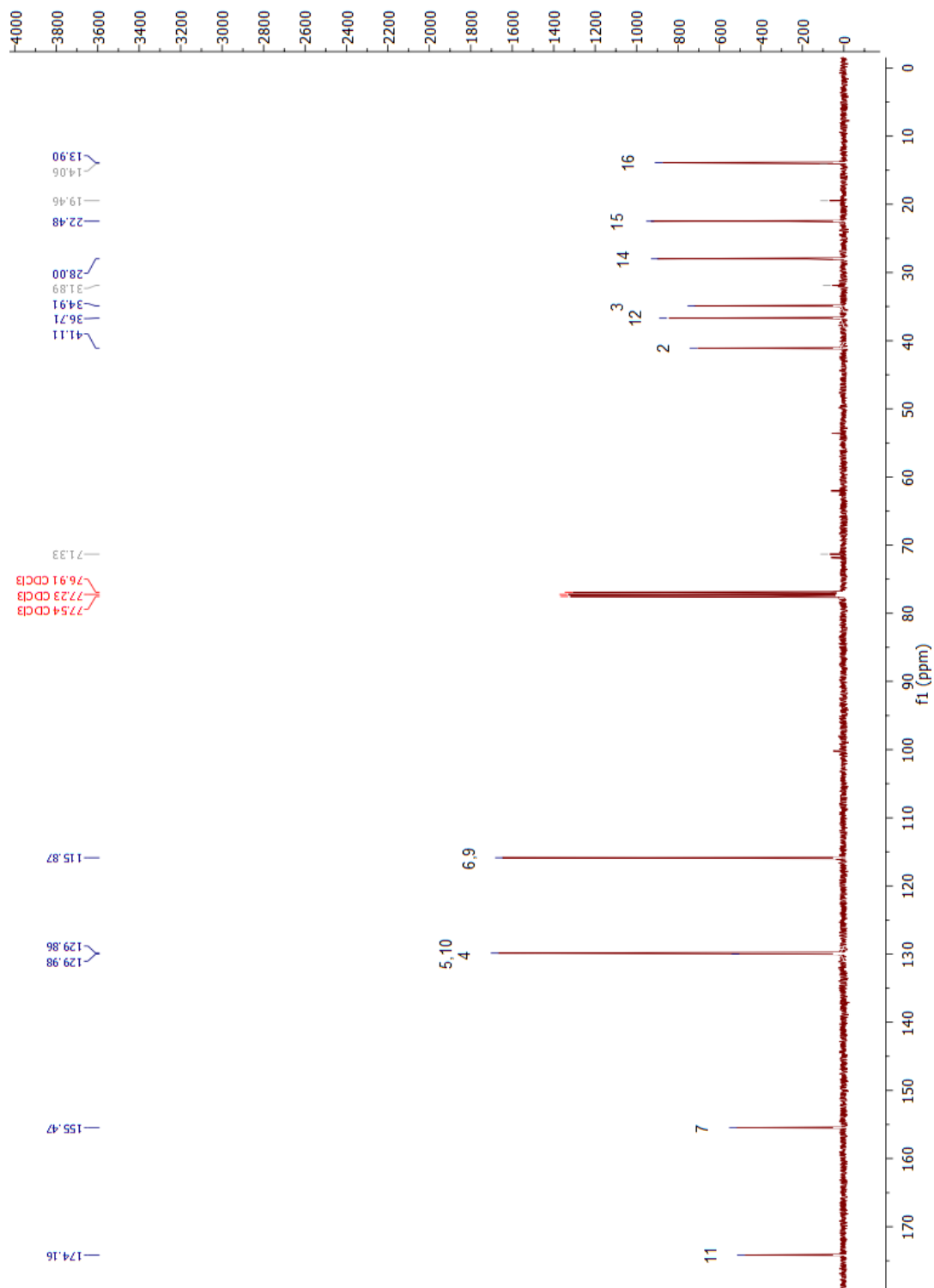


Figura 49. Espectro de RMN ^1H experimento COSY de CAPS 1

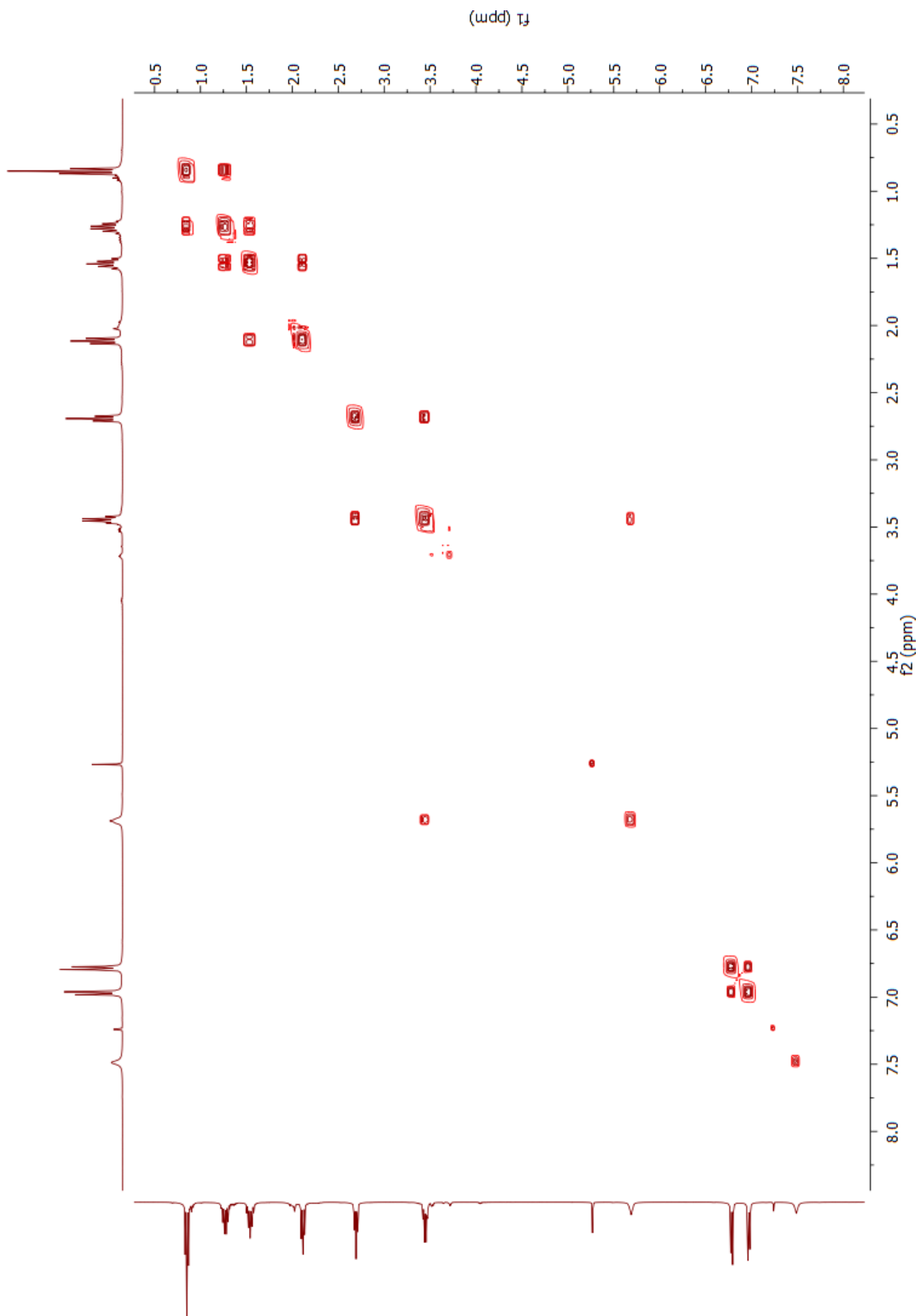


Figura 50. Espectro de experimento HSQC de CAPS 1

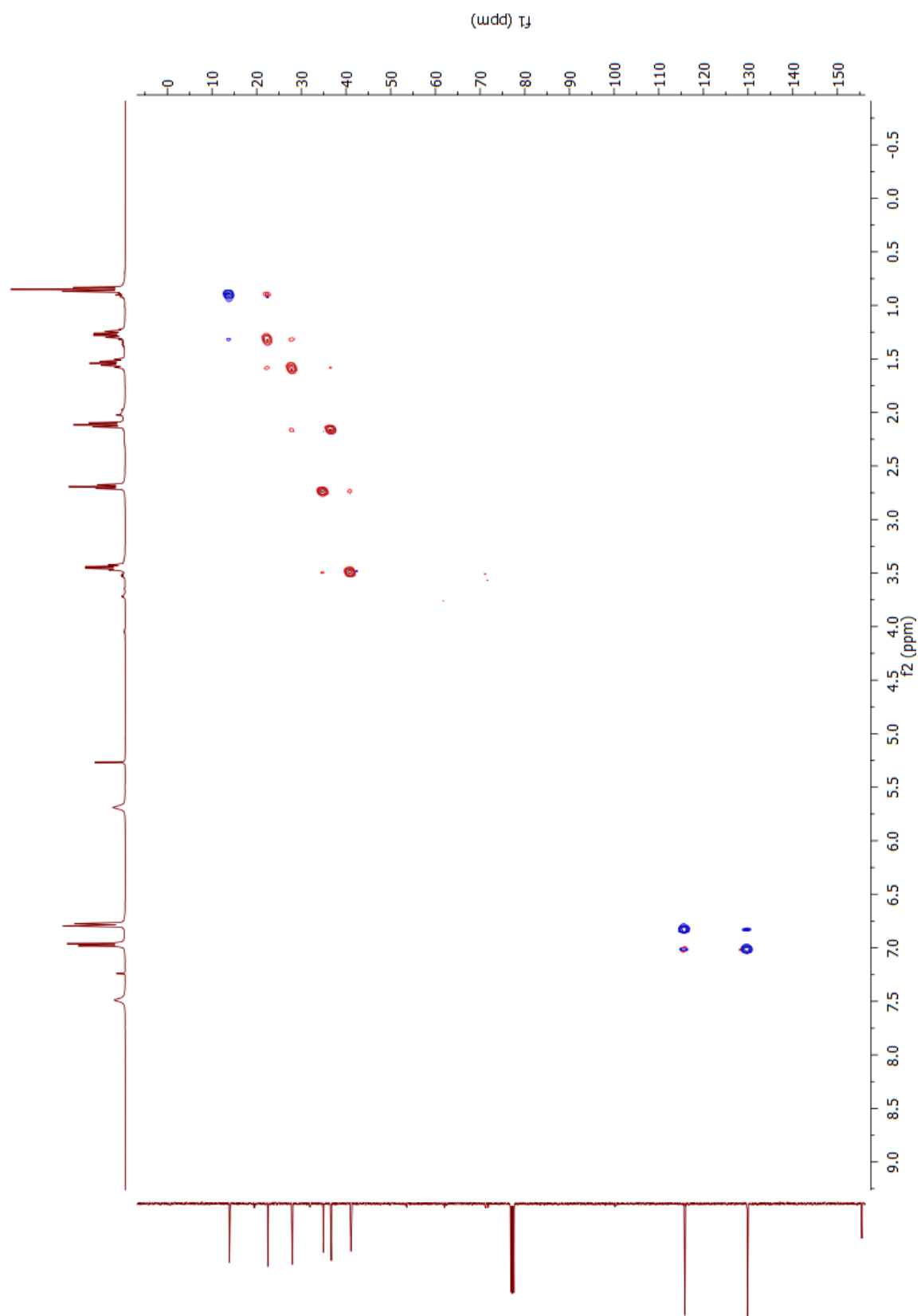


Figura 51. Espectro de experimento HMBC de CAPS 1

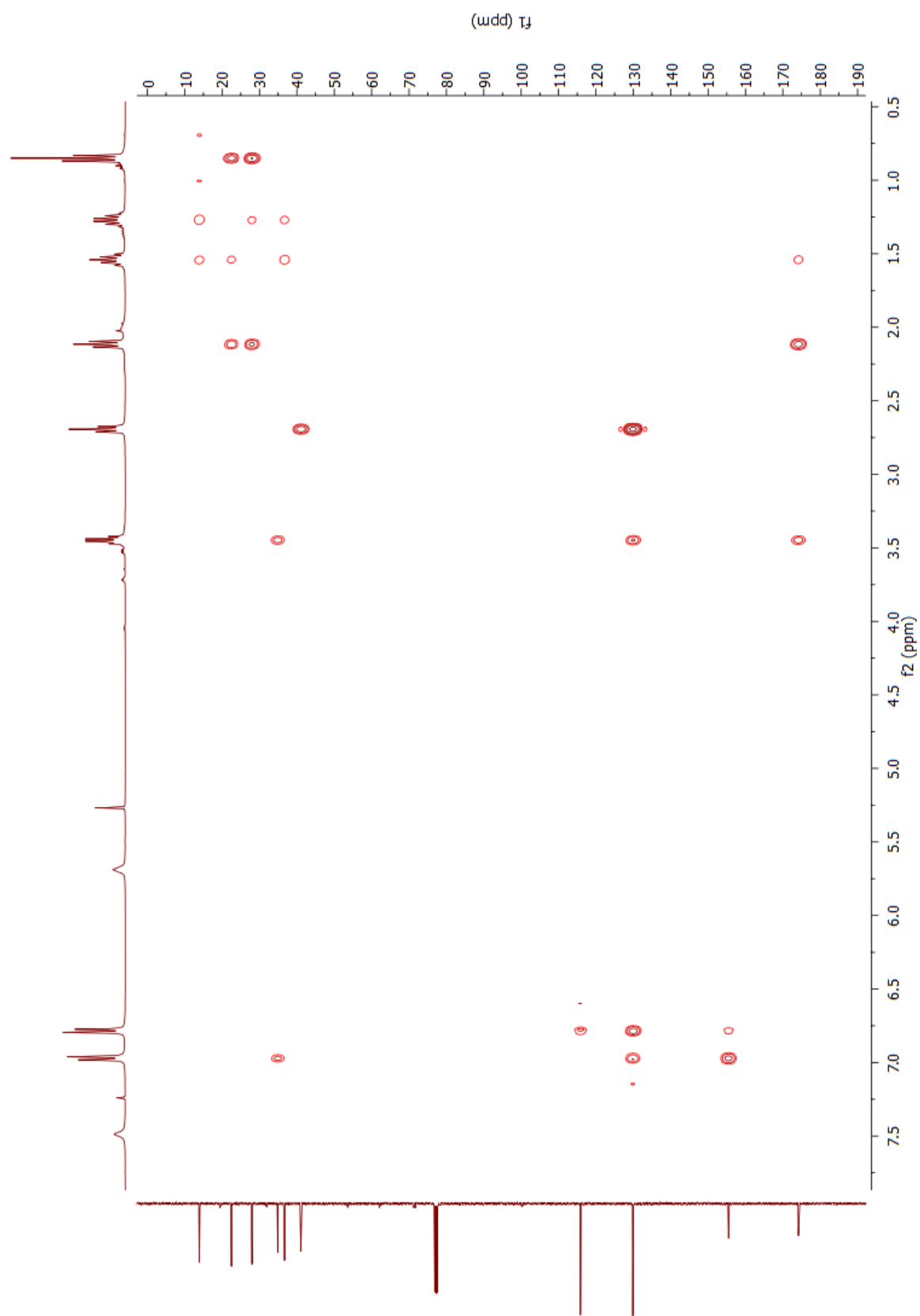


Figura 52. Espectro de masas de CAPS 1

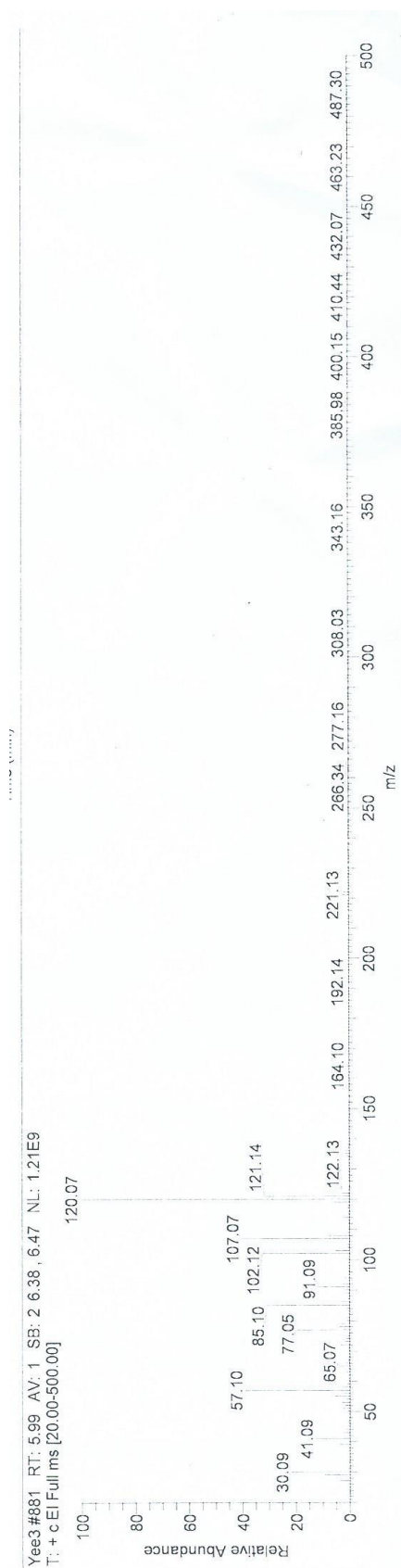


Figura 53. Espectro de infrarrojo de CAPS 1

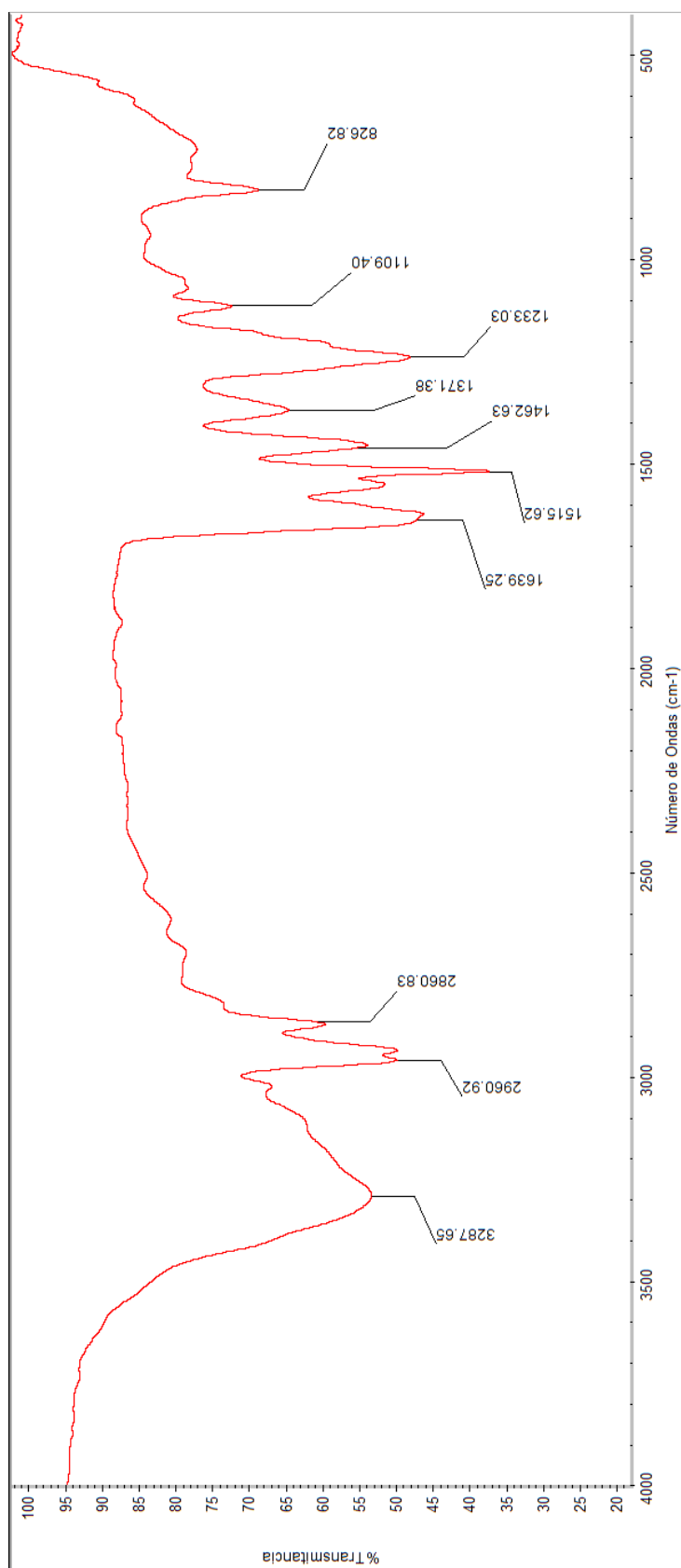


Figura 54. Espectro de RMN ^1H de CAPS 2

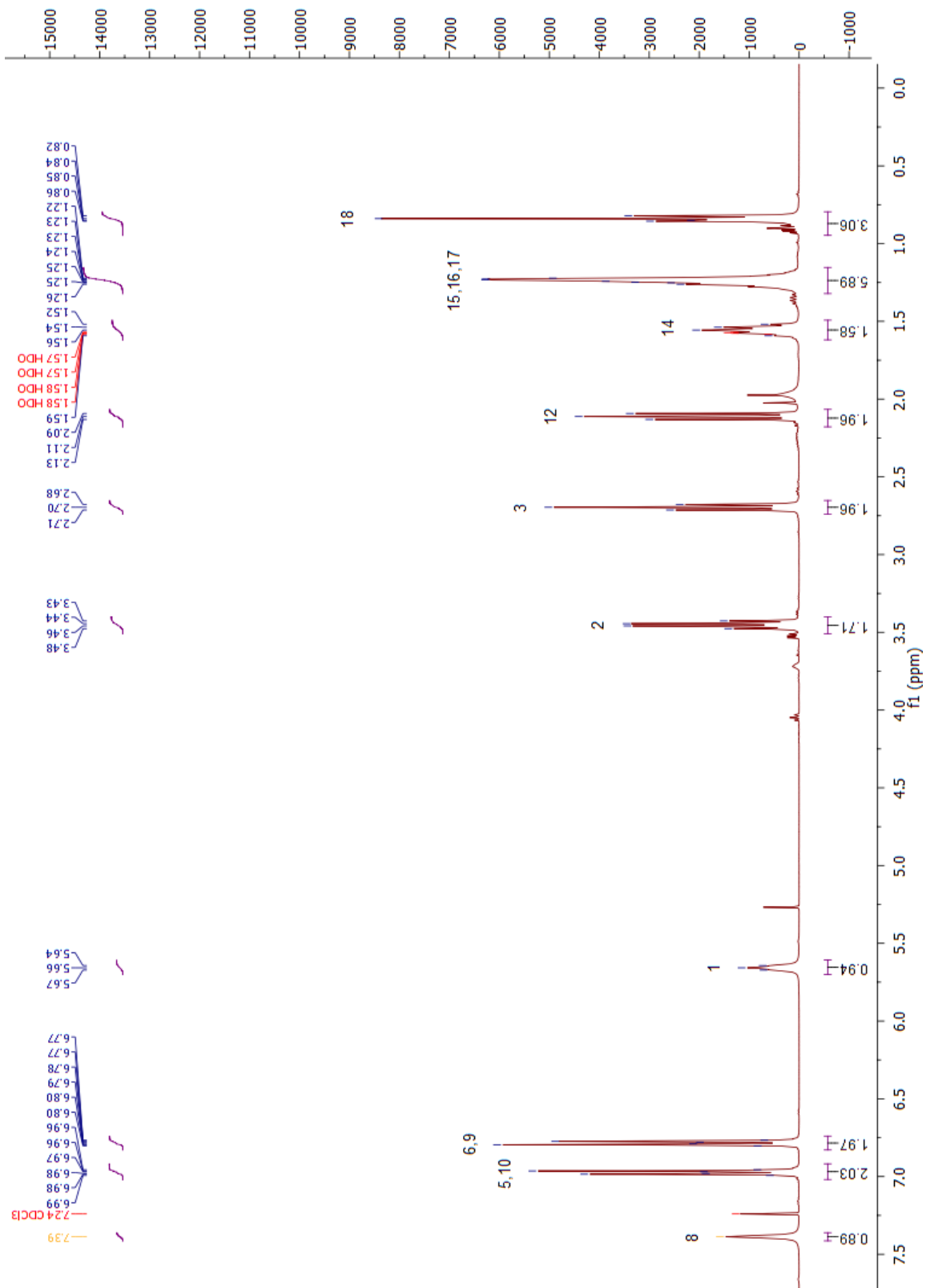


Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 2

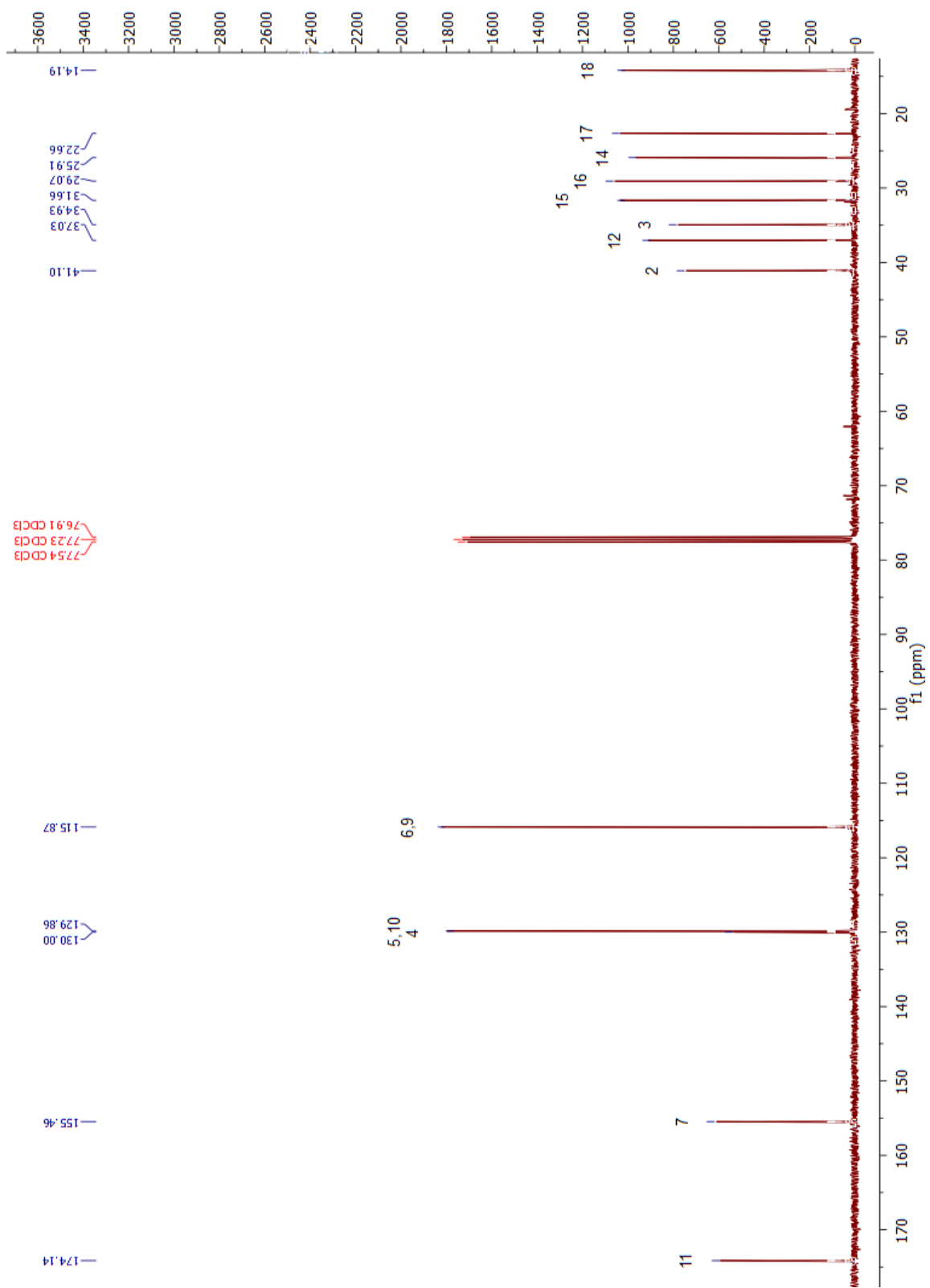


Figura 56. Espectro de Infrarrojo de CAPS 2

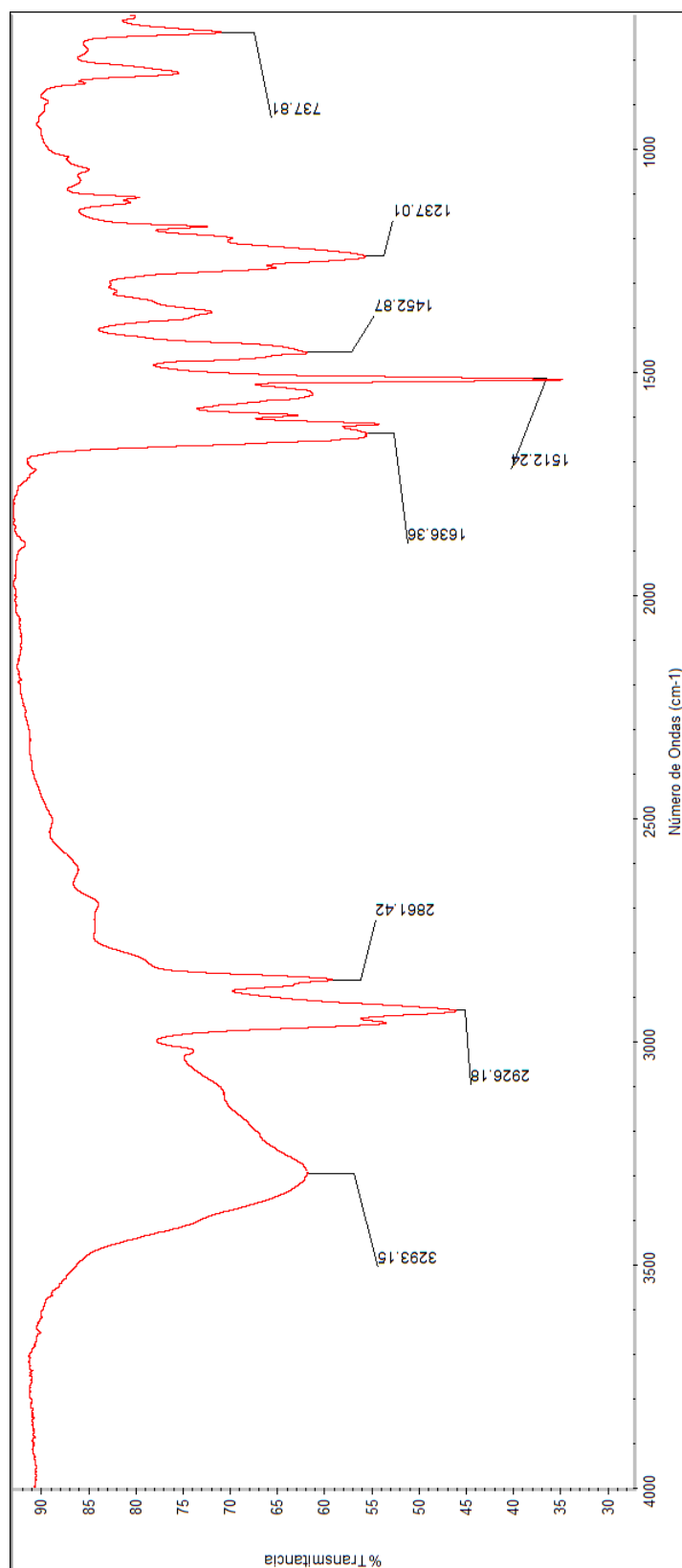


Figura 57. Espectro de masas de CAPS 2

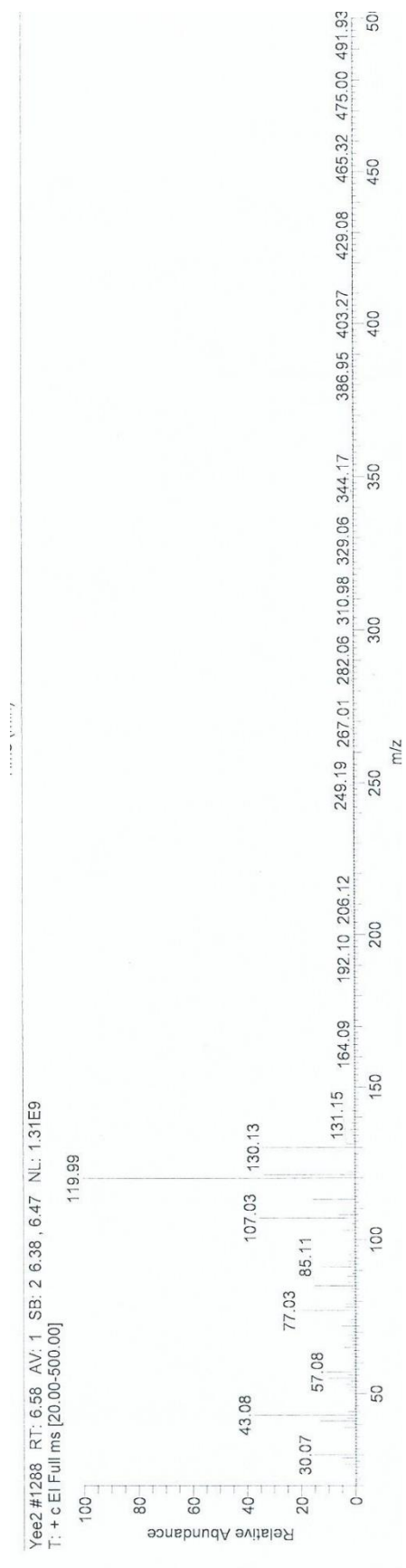


Figura 58. Espectro de RMN ^1H de CAPS 3

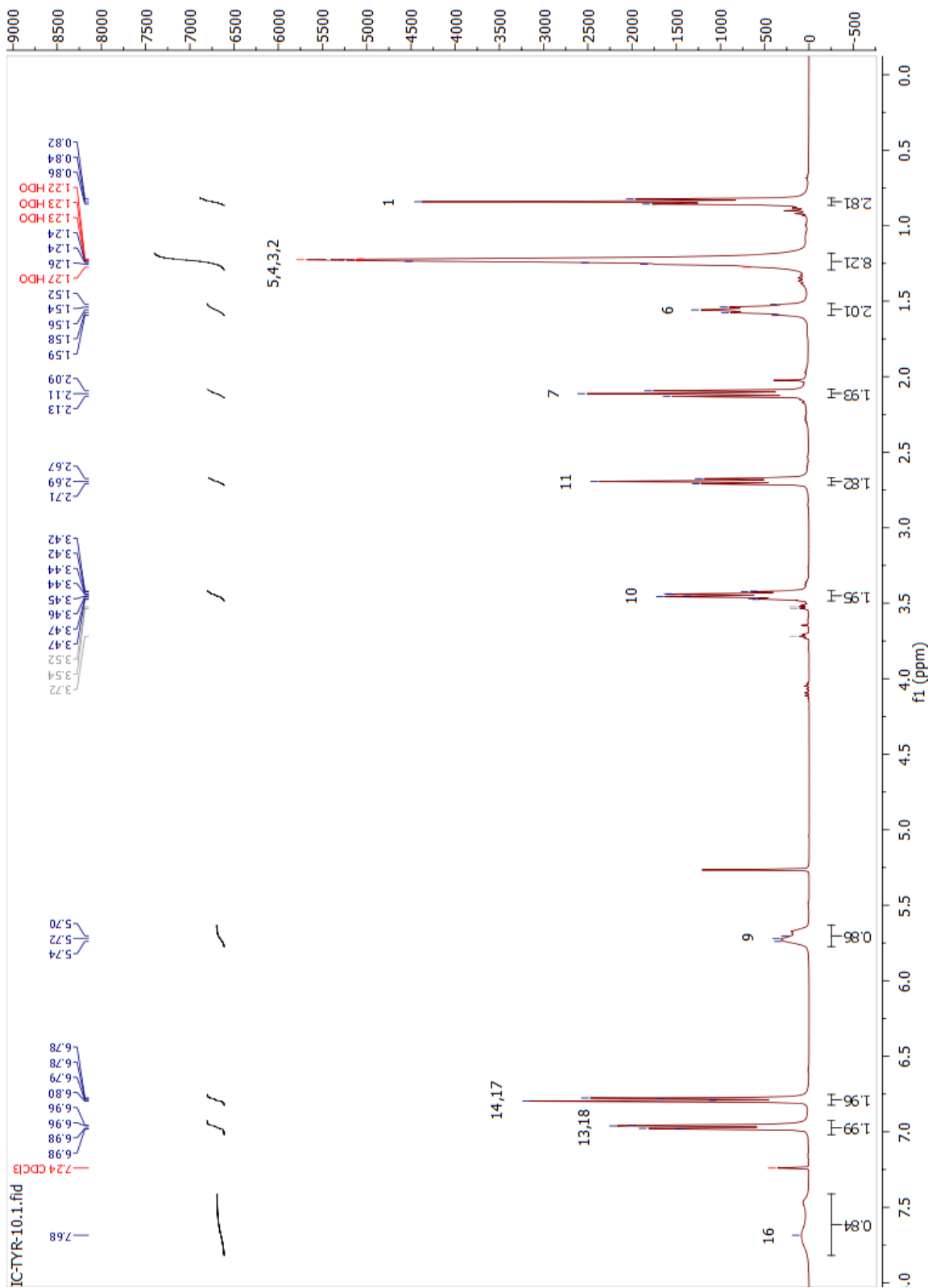


Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 3

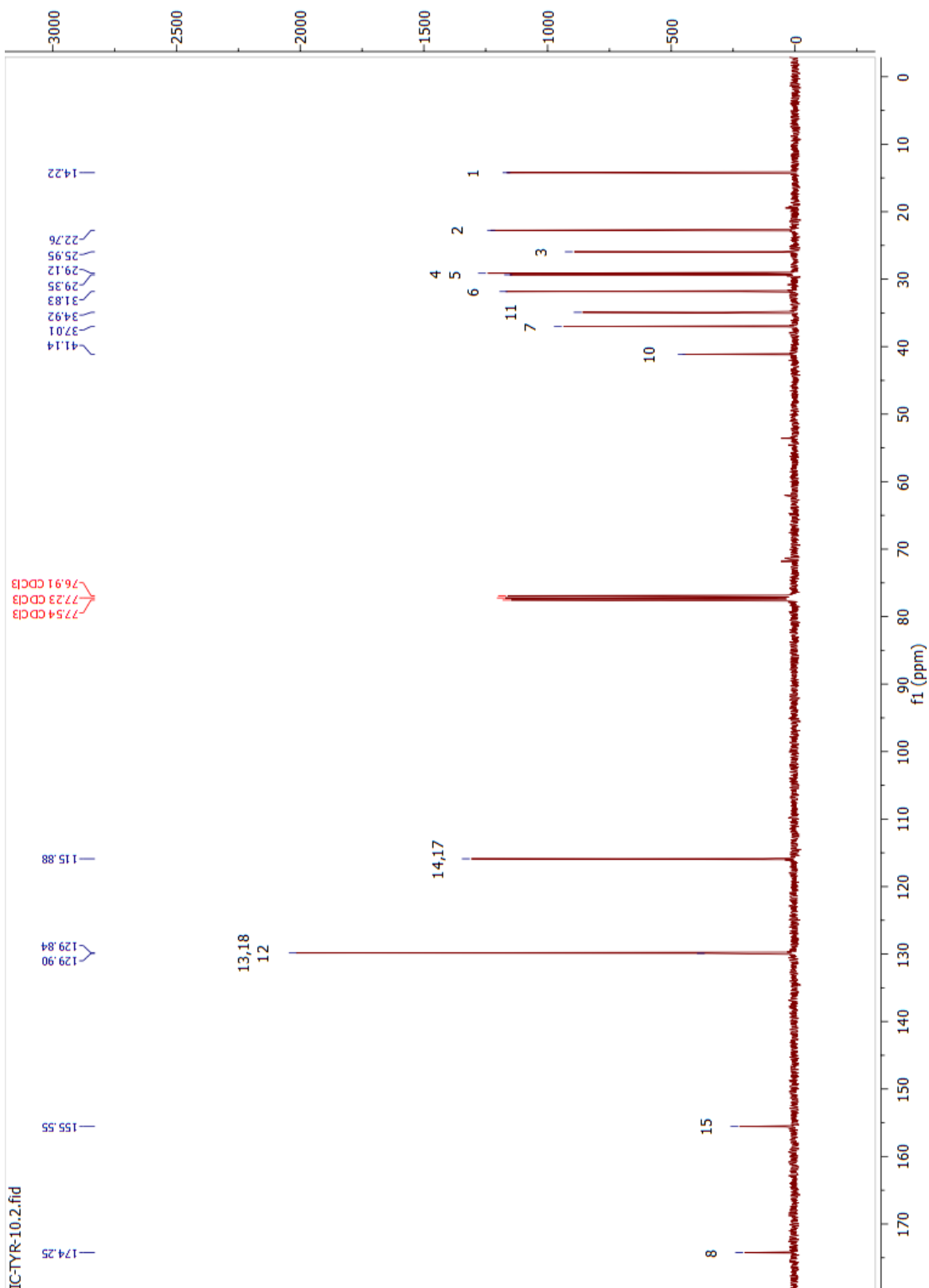


Figura 60. Espectro de infrarrojo de CAPS 3

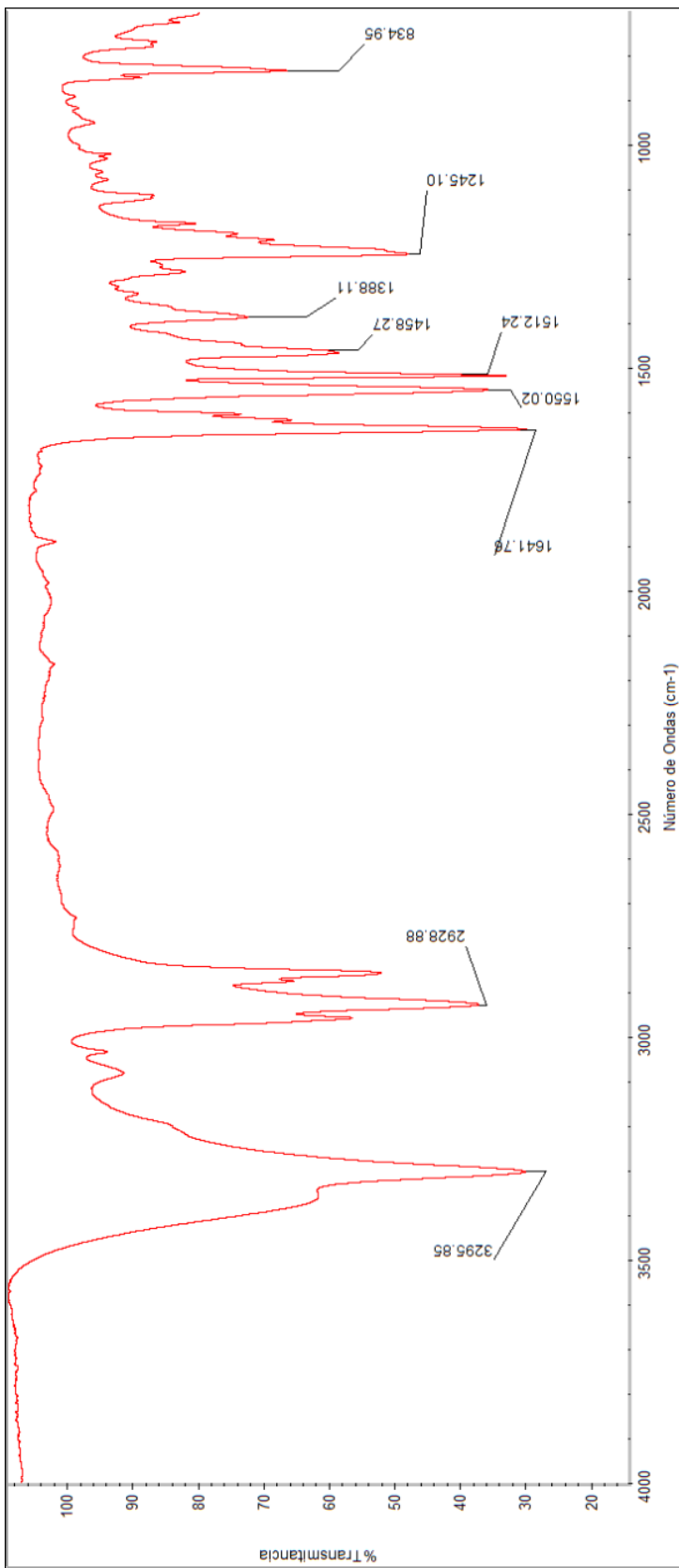


Figura 61. Espectro de masas de CAPS 3

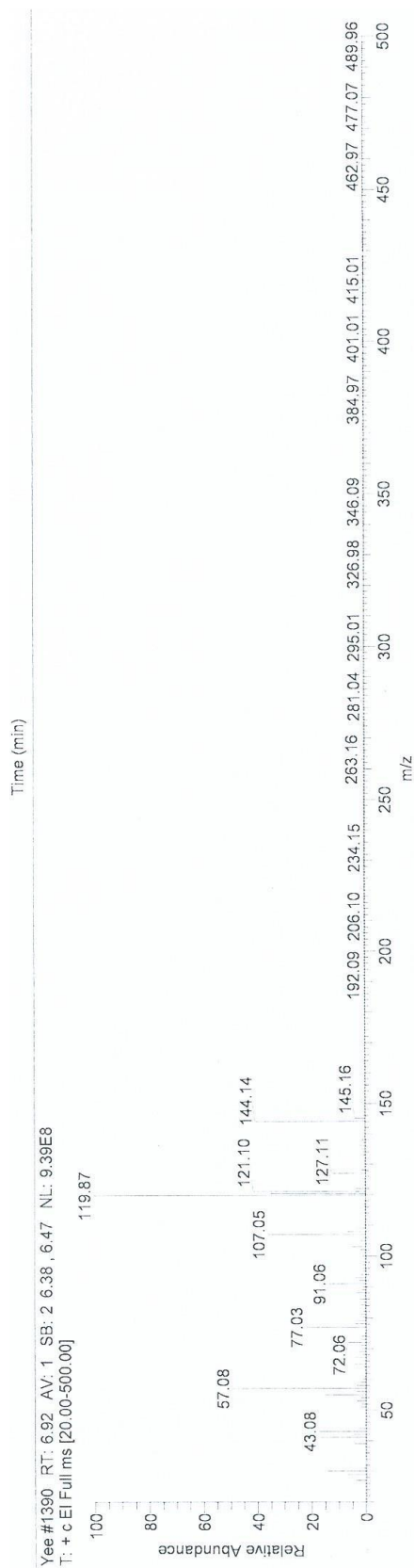


Figura 62. Espectro de RMN ^1H de CAPS 4

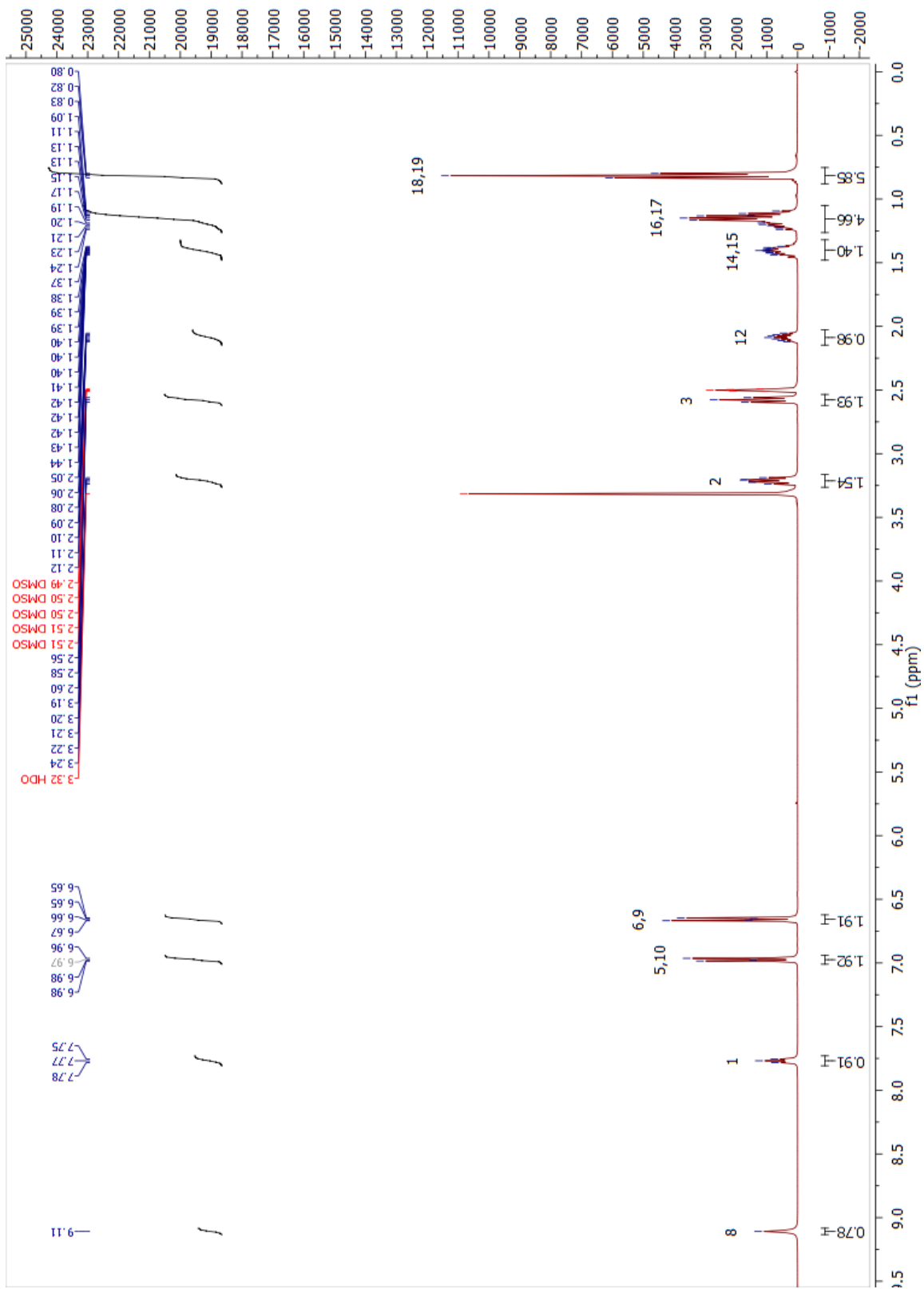


Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 4

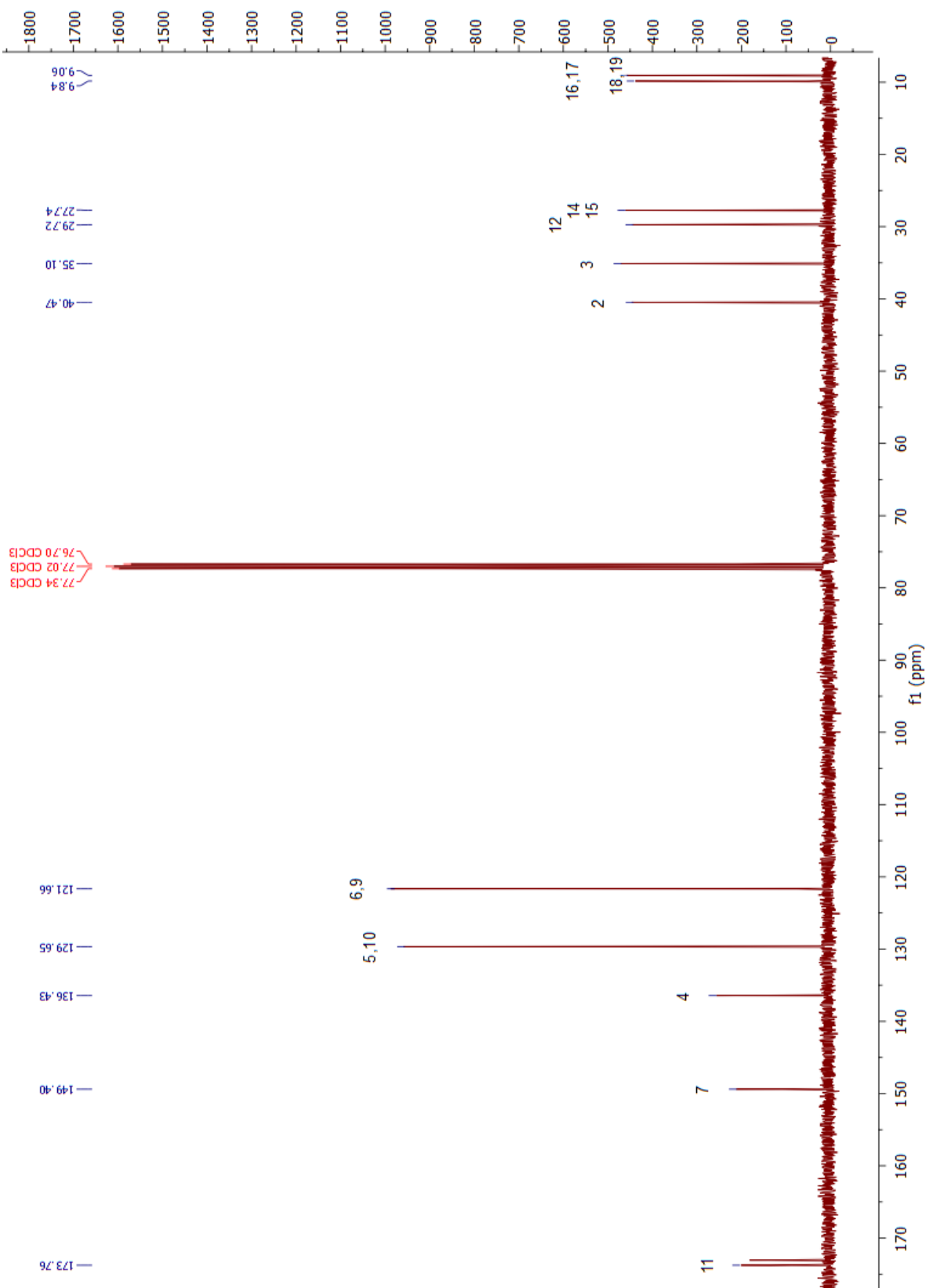


Figura 64. Espectro de infrarrojo de CAPS 4

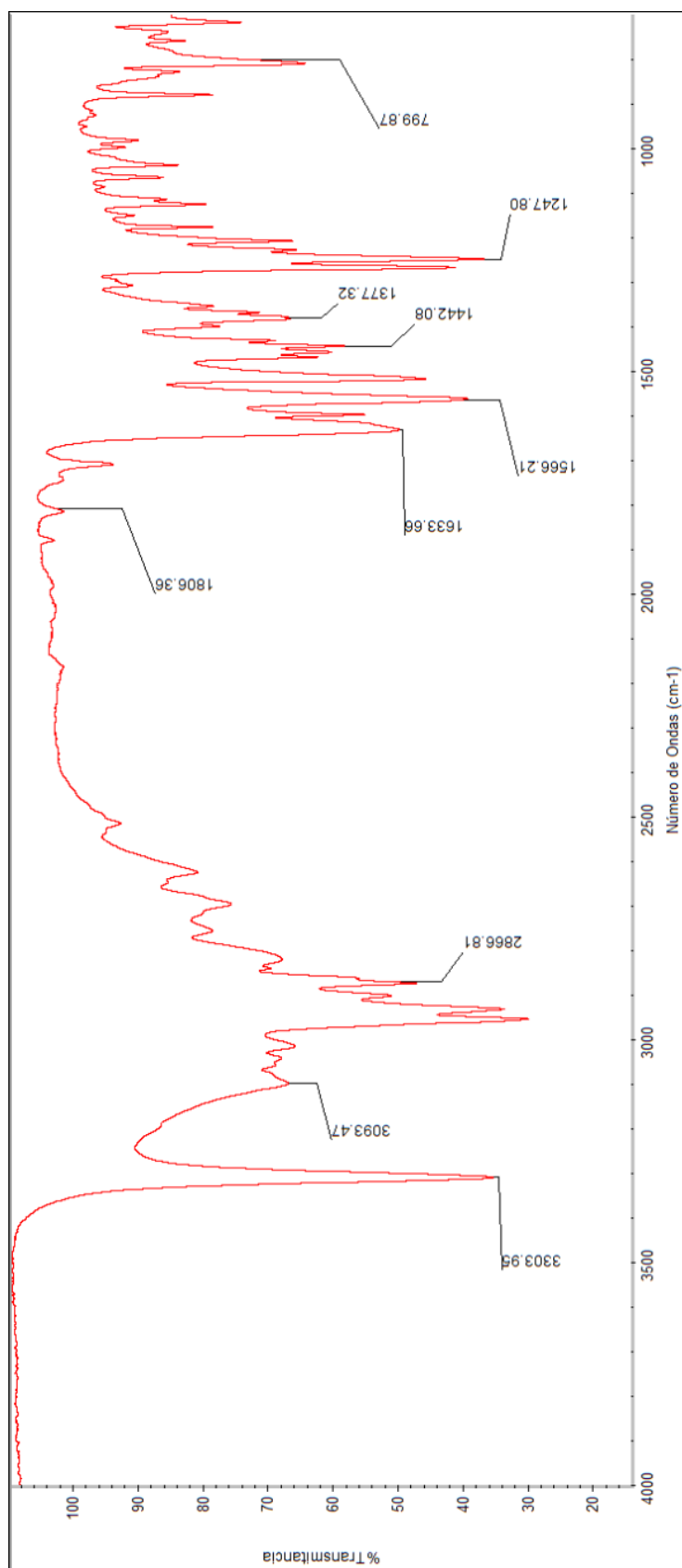


Figura 65. Espectro de masas de CAPS 4

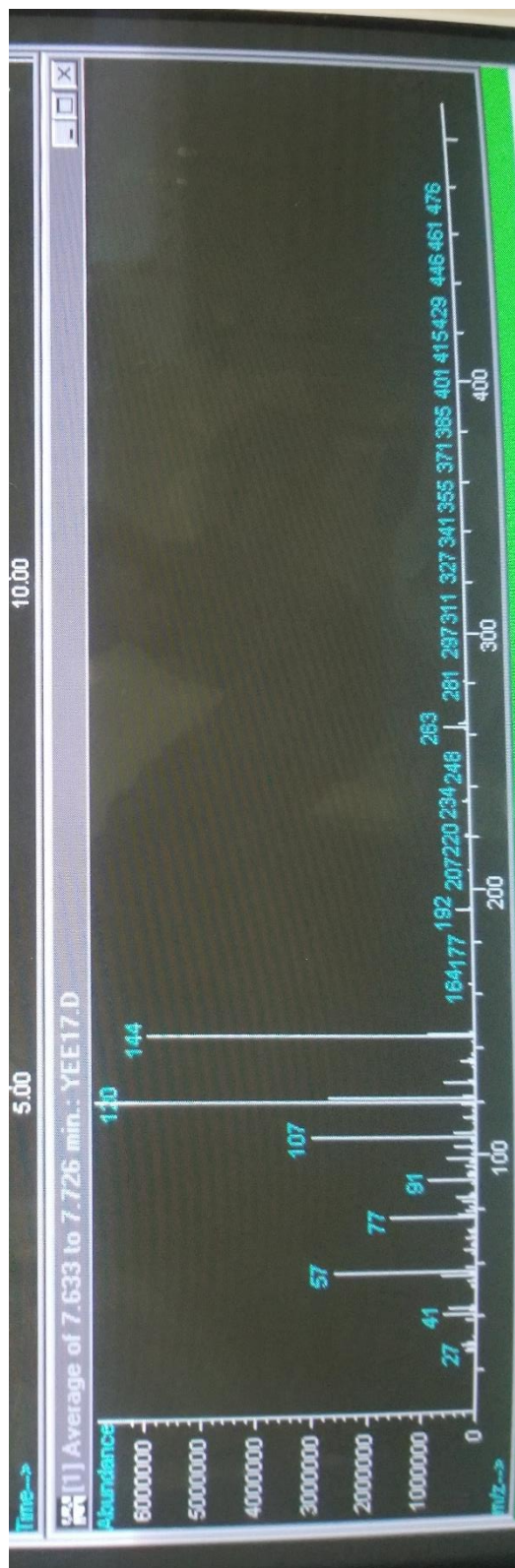


Figura 66. Espectro de RMN ¹H de CAPS 5

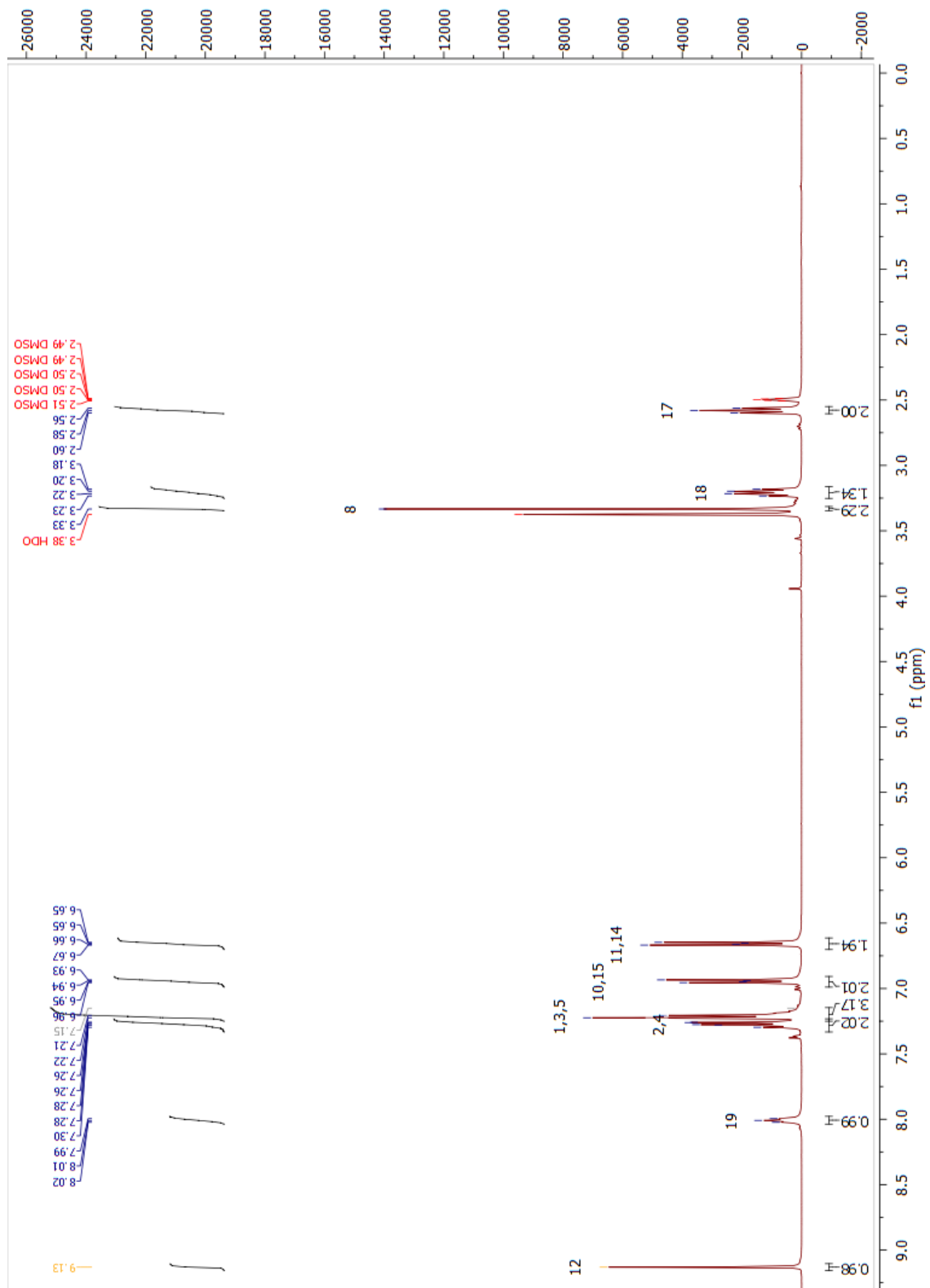


Figura 67. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 5

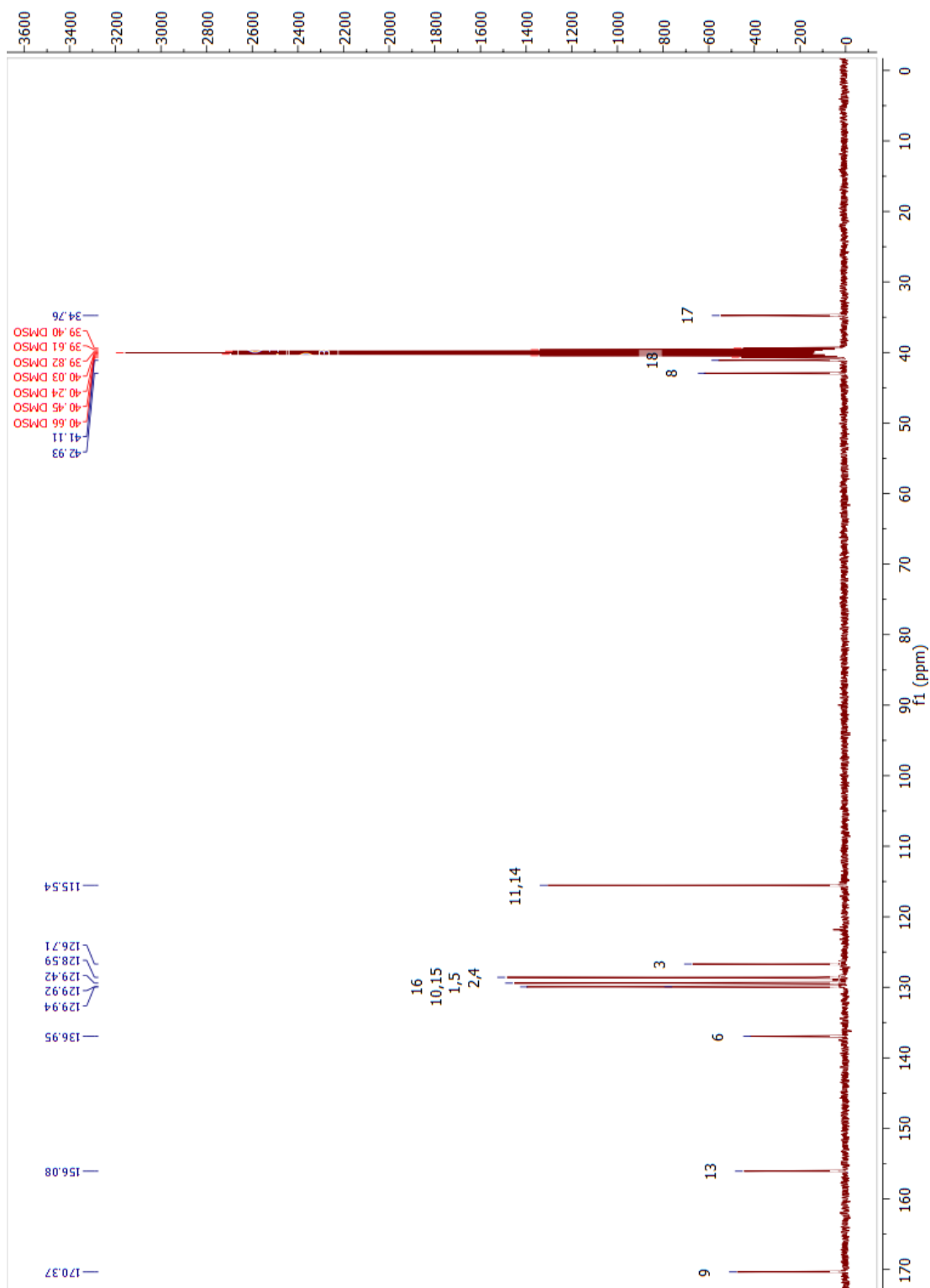


Figura 68. Espectro infrarrojo de CAPS 5

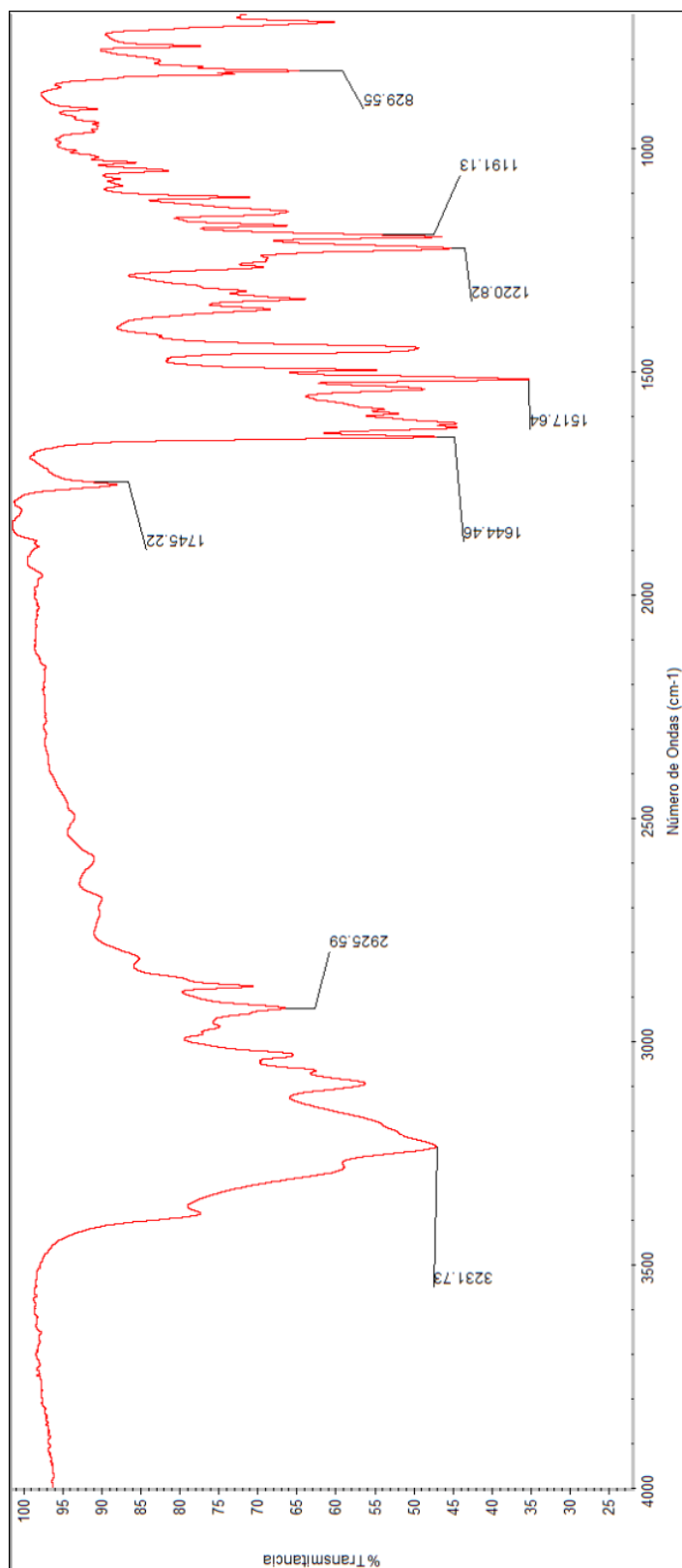


Figura 69. Espectro de masas de CAPS 5

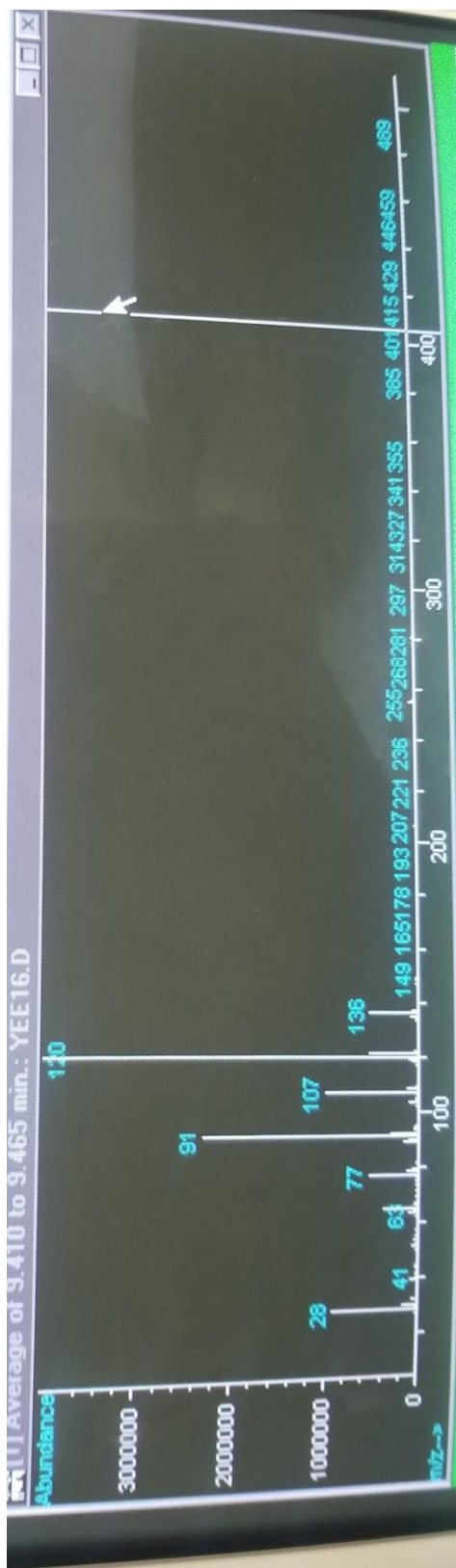


Figura 72. Espectro de infrarrojo de CAPS 6

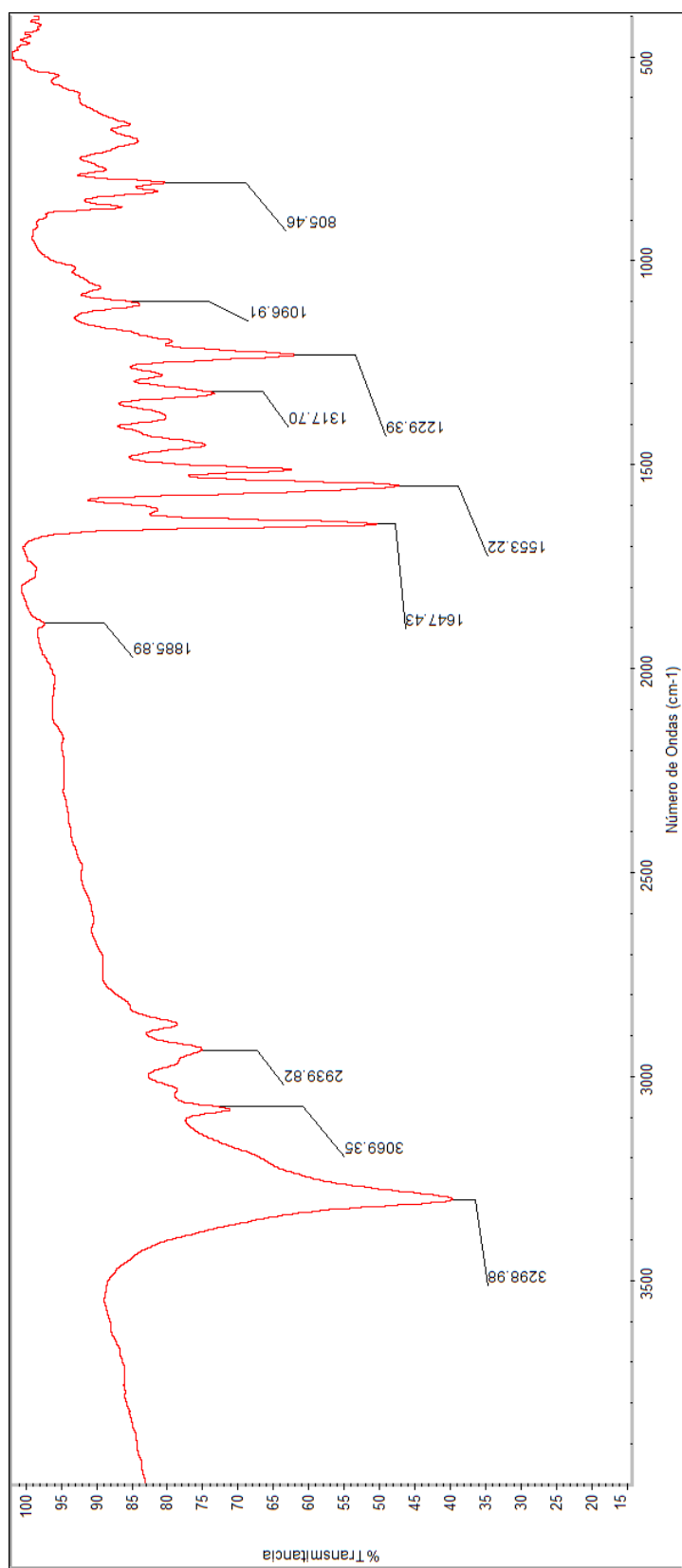


Figura 73. Espectro de masas de CAPS 6

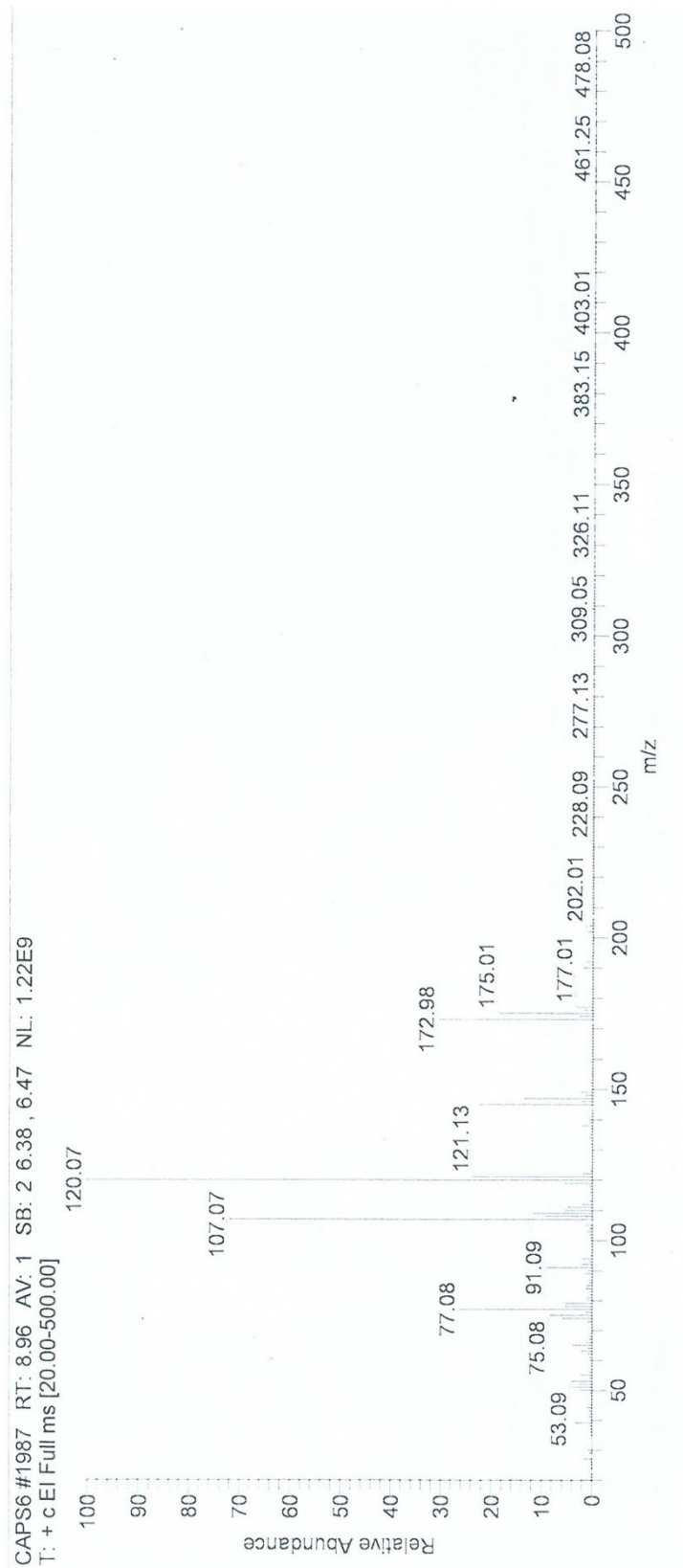


Figura 74. Espectro de RMN-¹H de CAPS 7

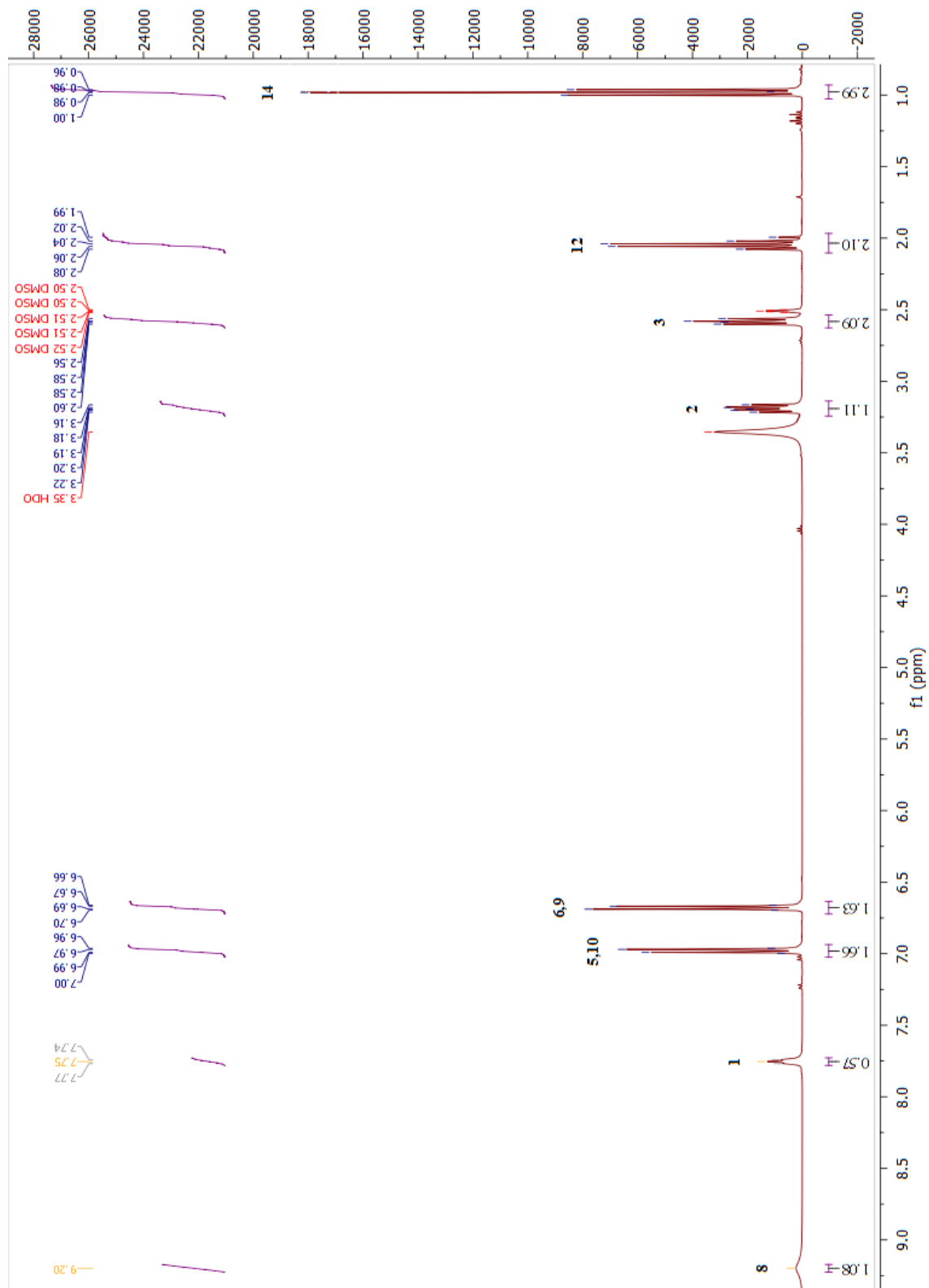


Figura 75. Espectro de RMN-¹³C de CAPS 7

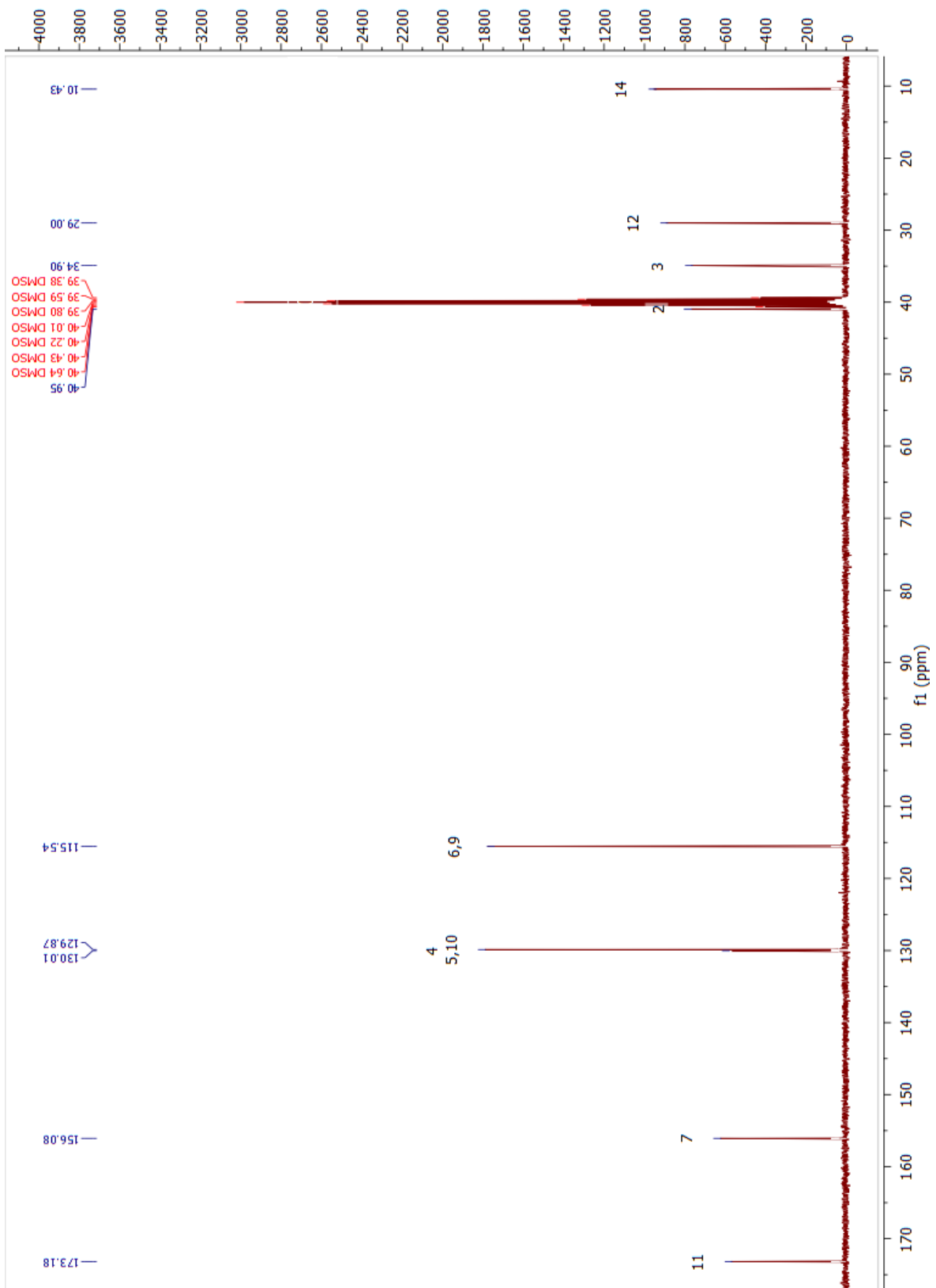


Figura 76. Espectro de infrarrojo de CAPS7

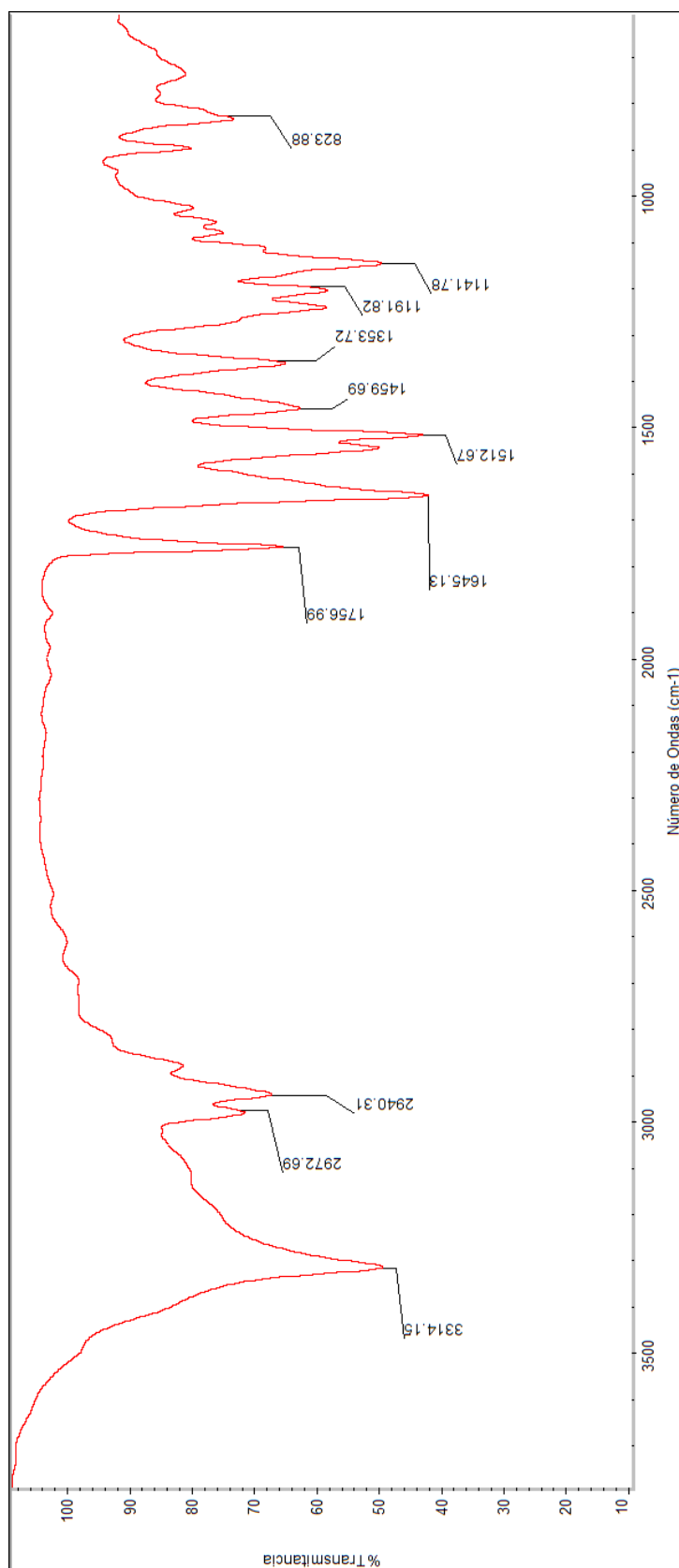


Figura 77. Espectro de masas de CAPS 7

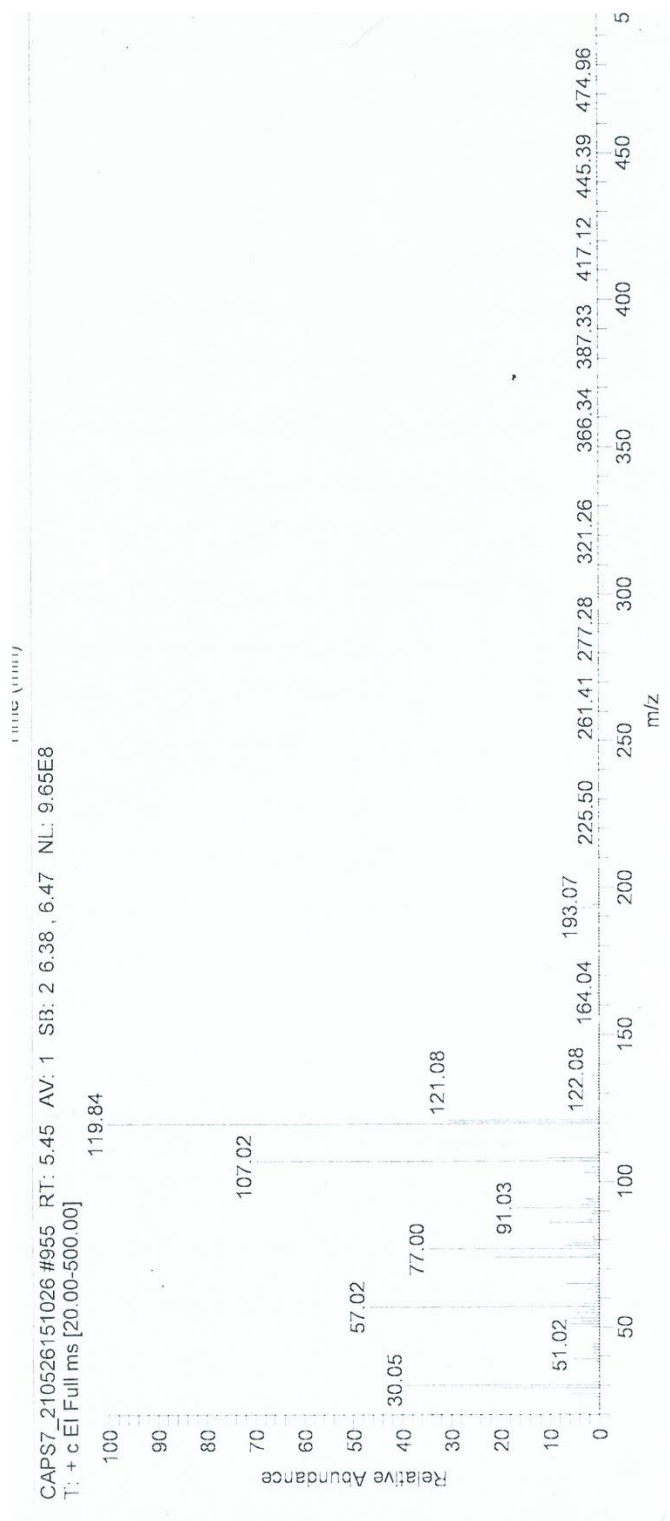


Figura 78. Espectro de RMN ¹H de CAPS 8

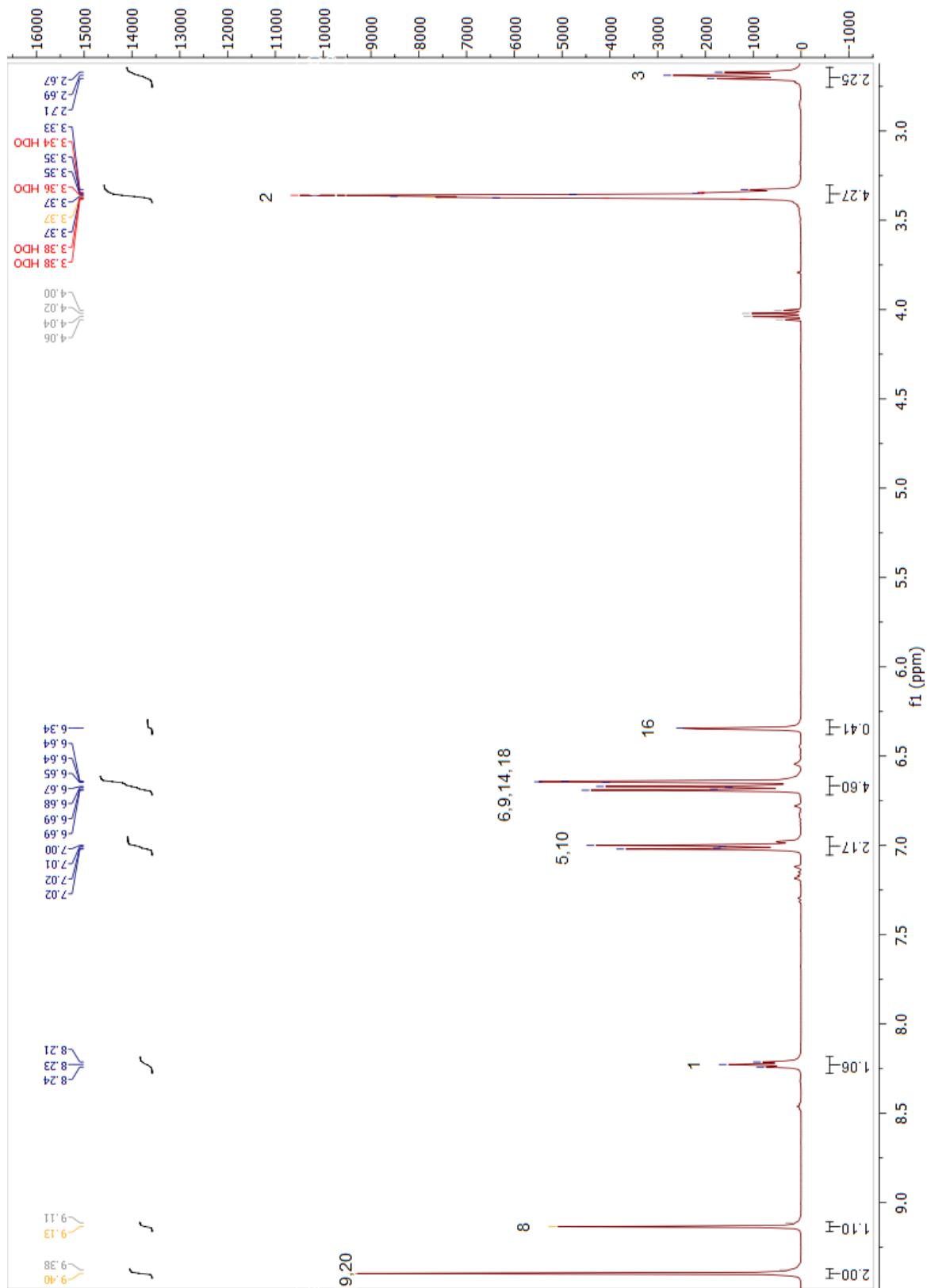


Figura 79. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 8

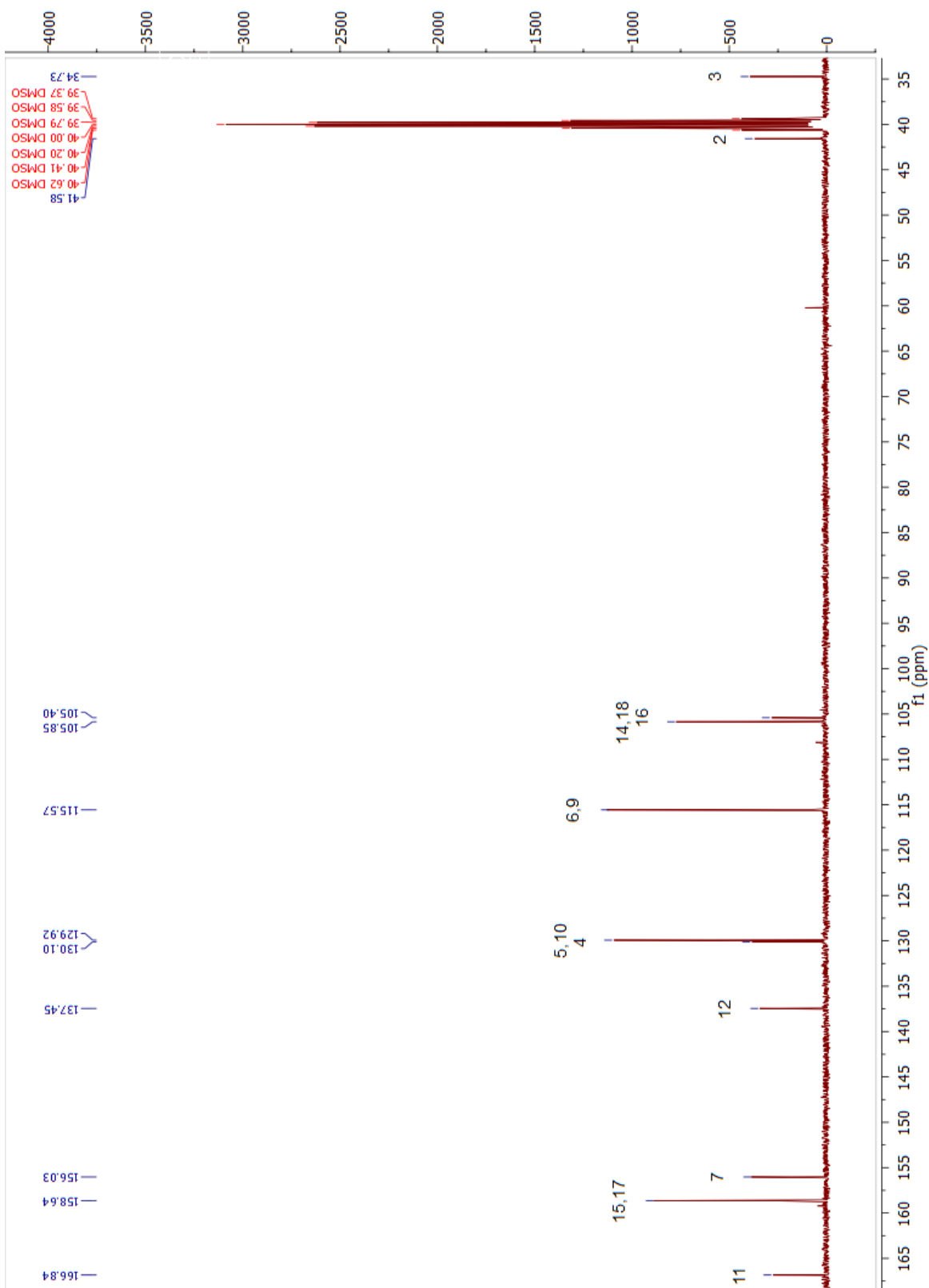


Figura 80. Espectro de infrarrojo de CAPS 8

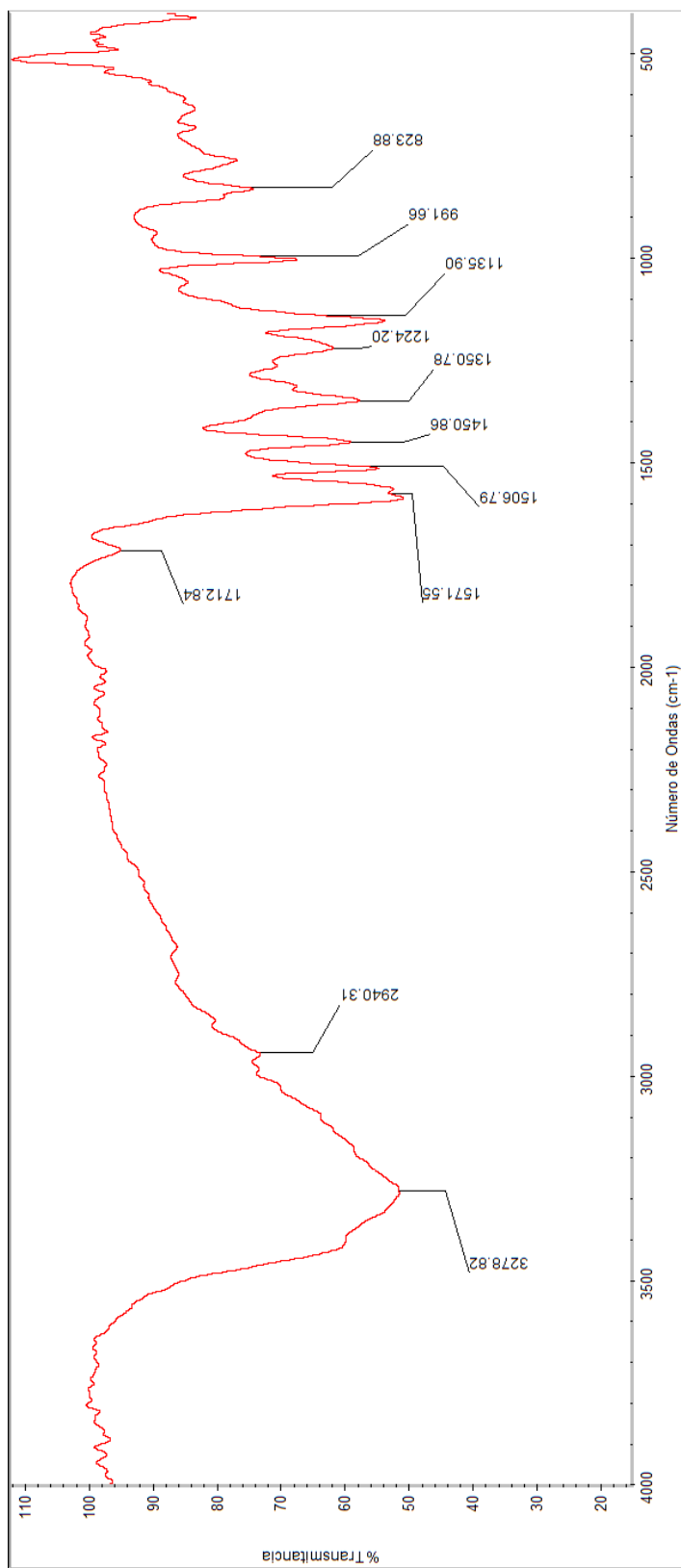


Figura 81. Espectro de RMN ¹H de CAPS 9

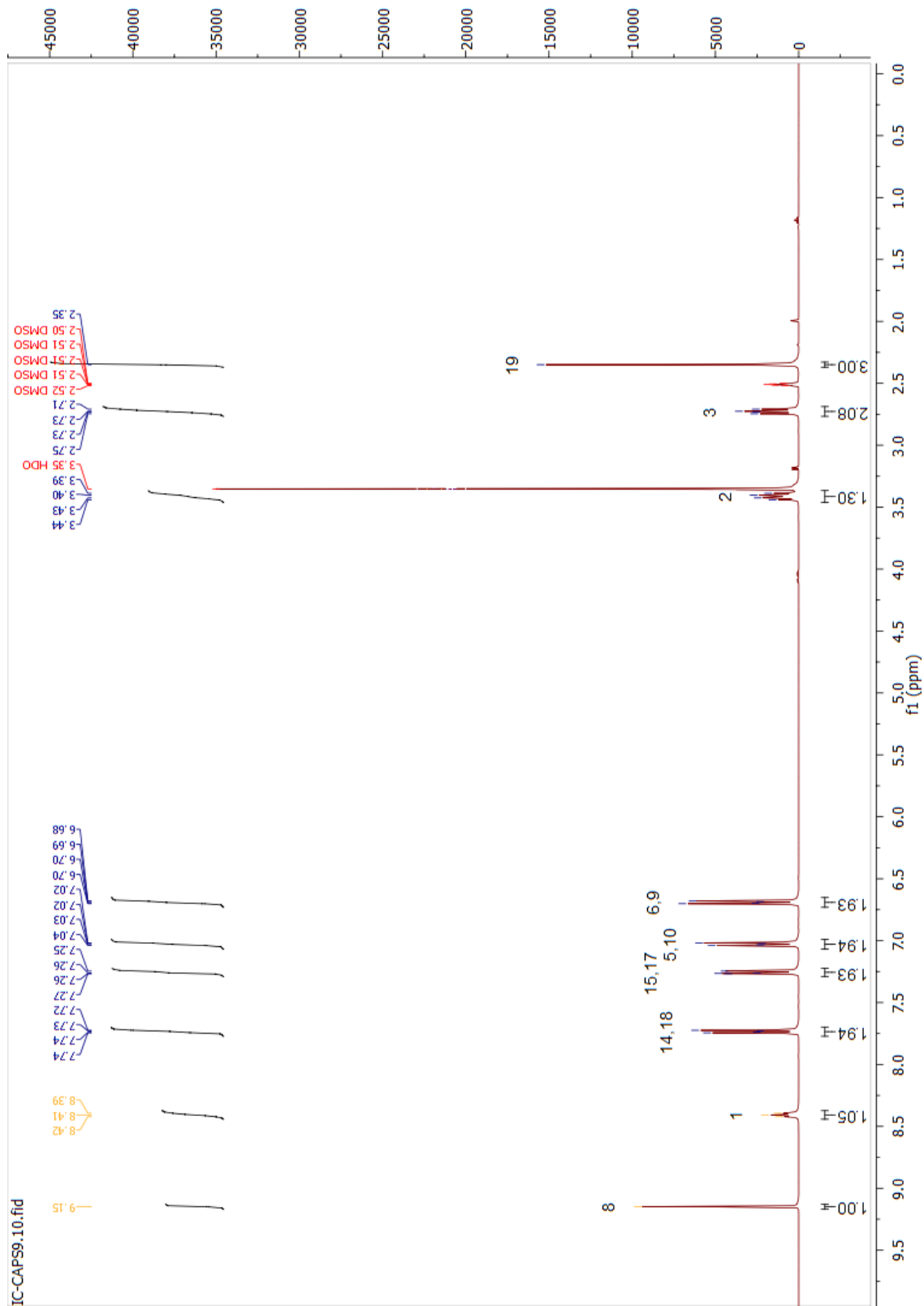


Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 9

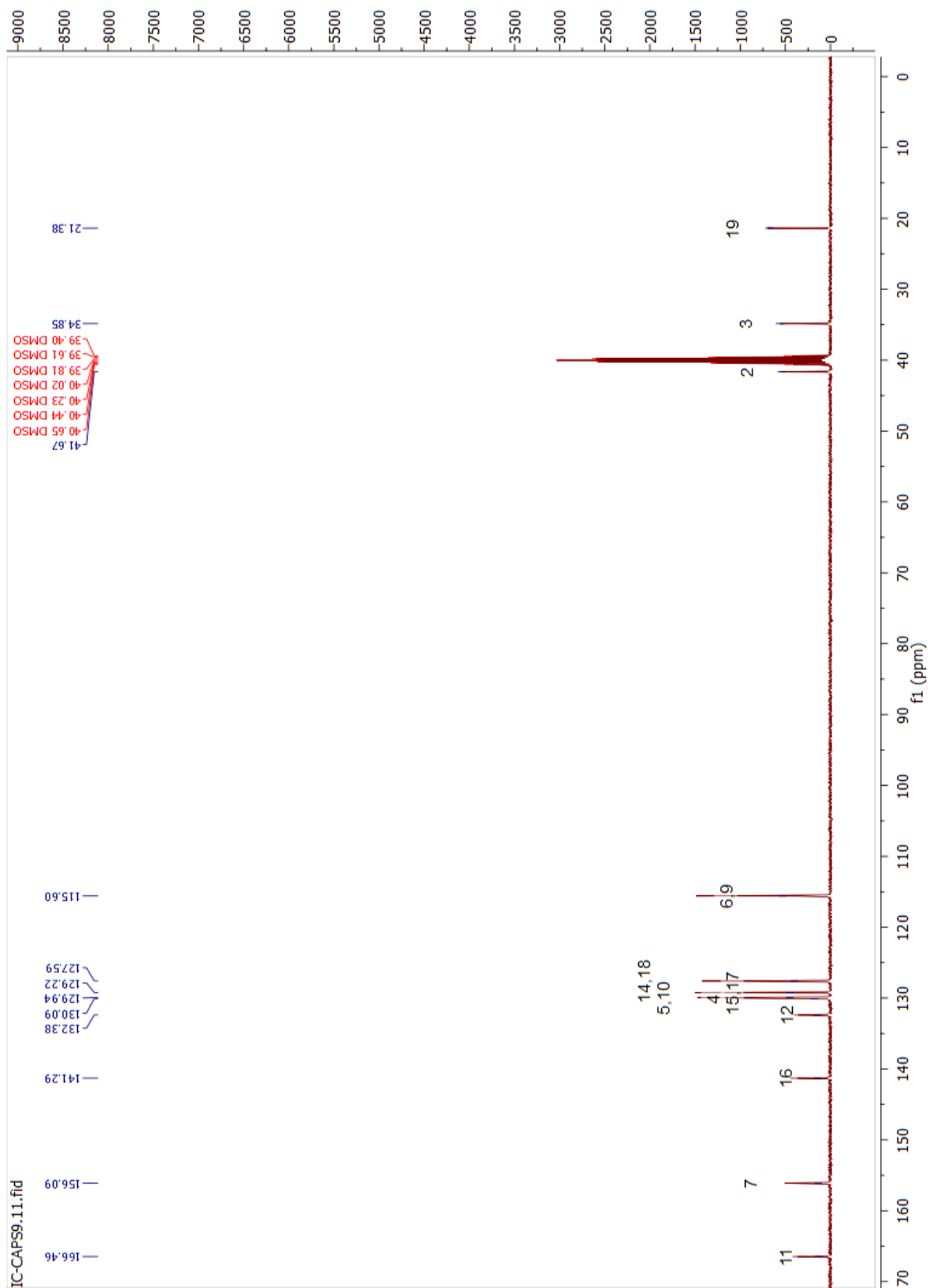


Figura 83. Espectro de infrarrojo de CAPS 9

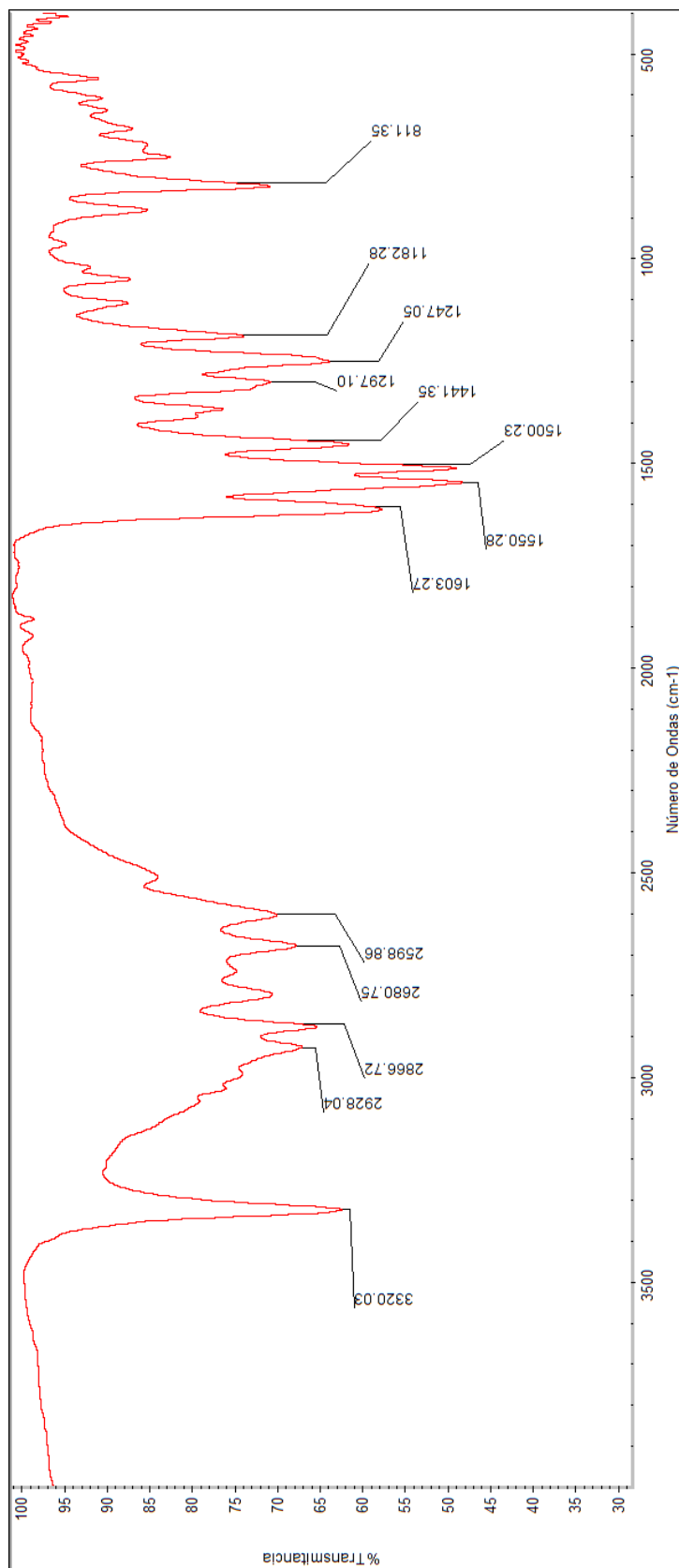


Figura 84. Espectro de masas de CAPS 9

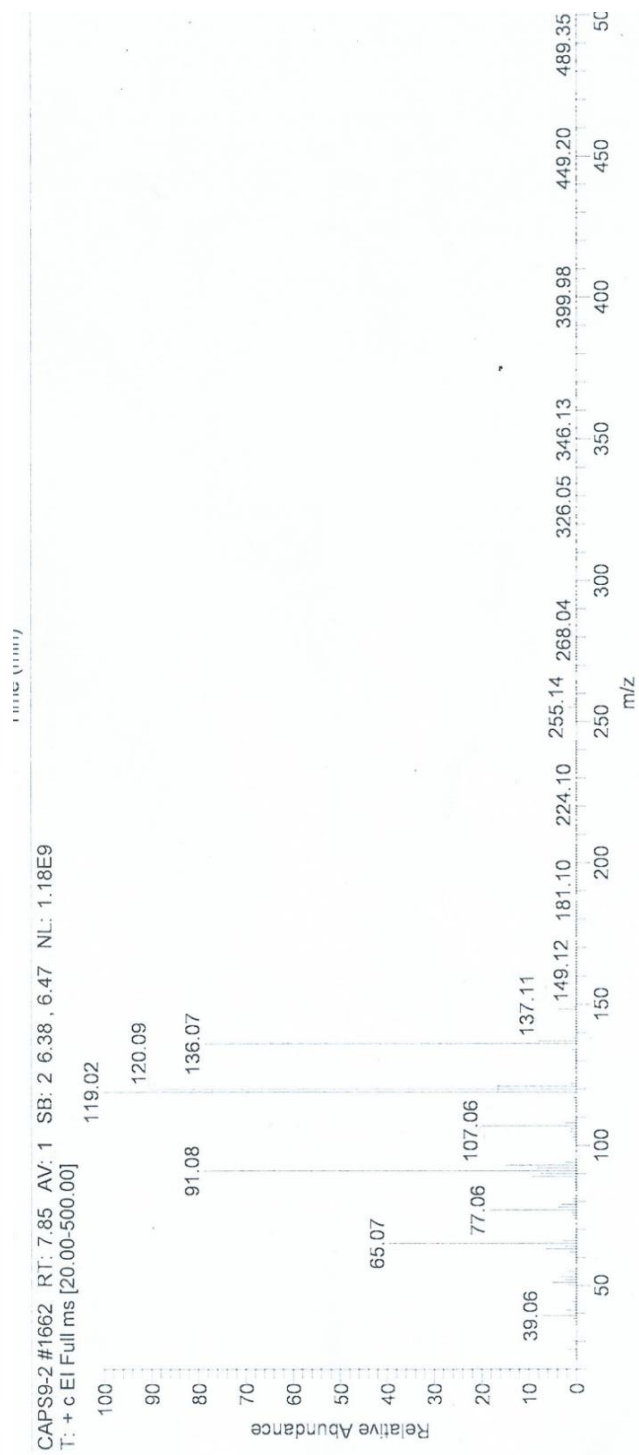


Figura 85. Espectro de RMN ^1H de CAPS 10

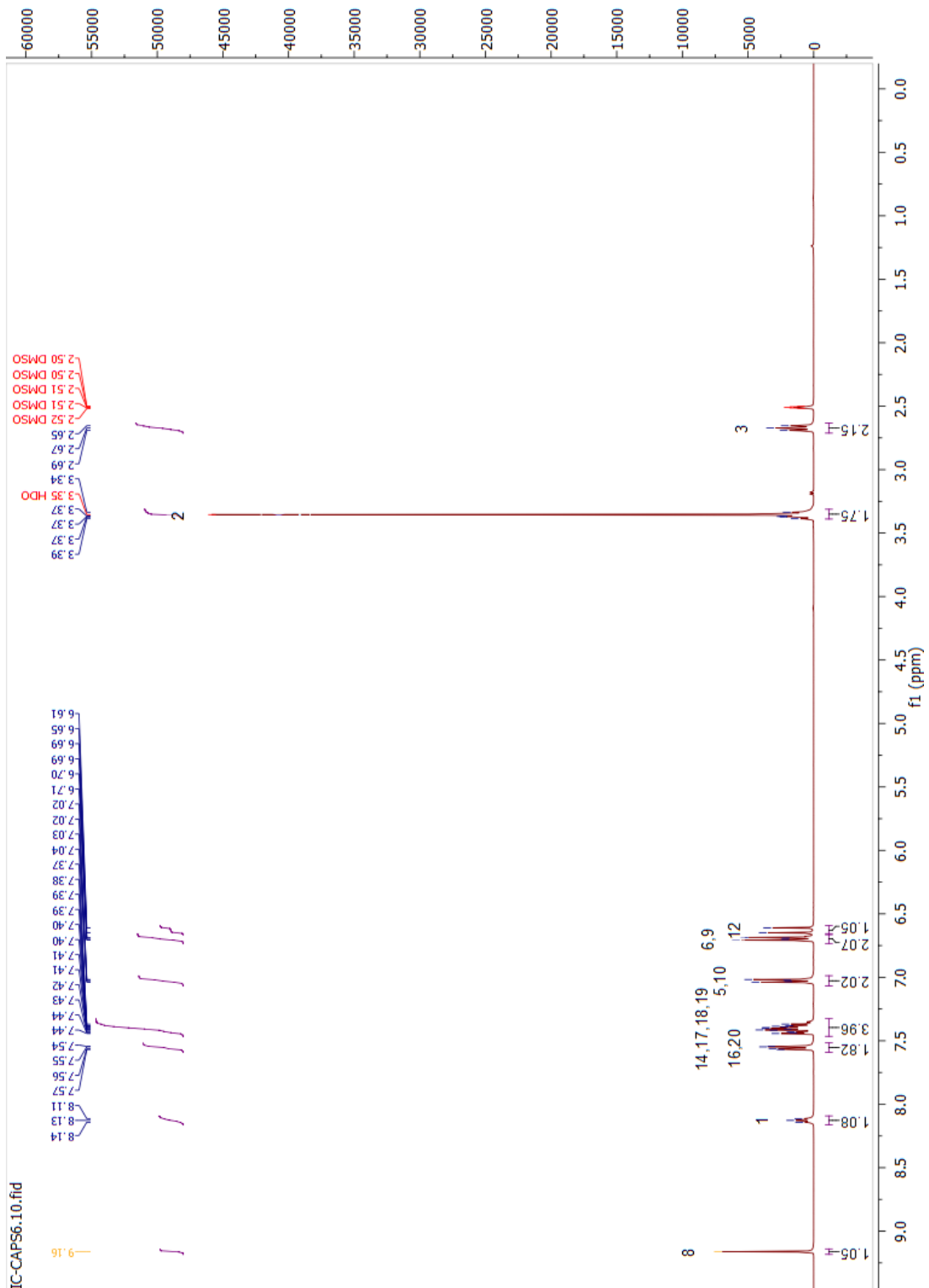


Figura 86. Espectro de RMN ^{13}C de CAPS 10

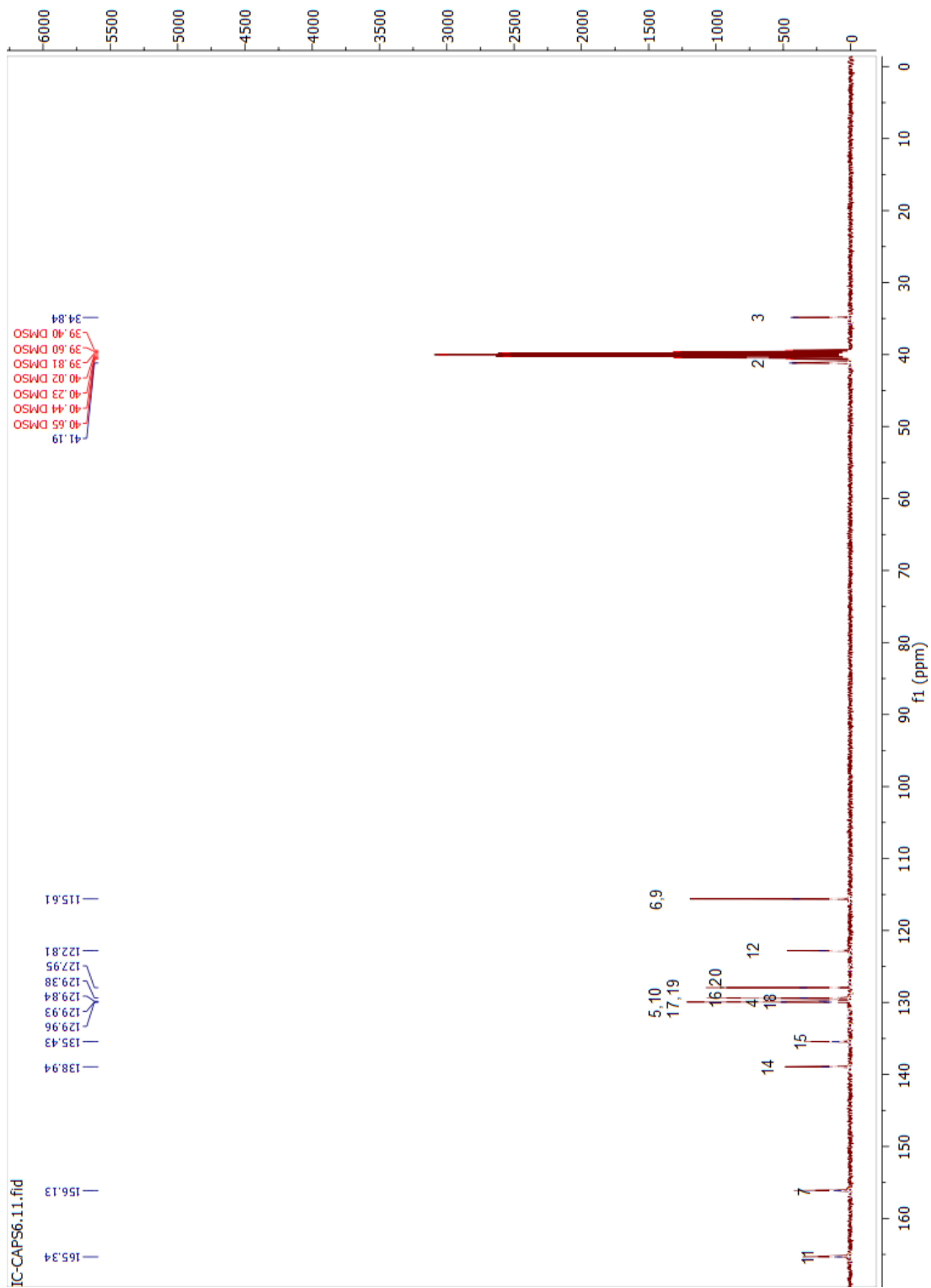


Figura 87. Espectro de infrarrojo de CAPS 10

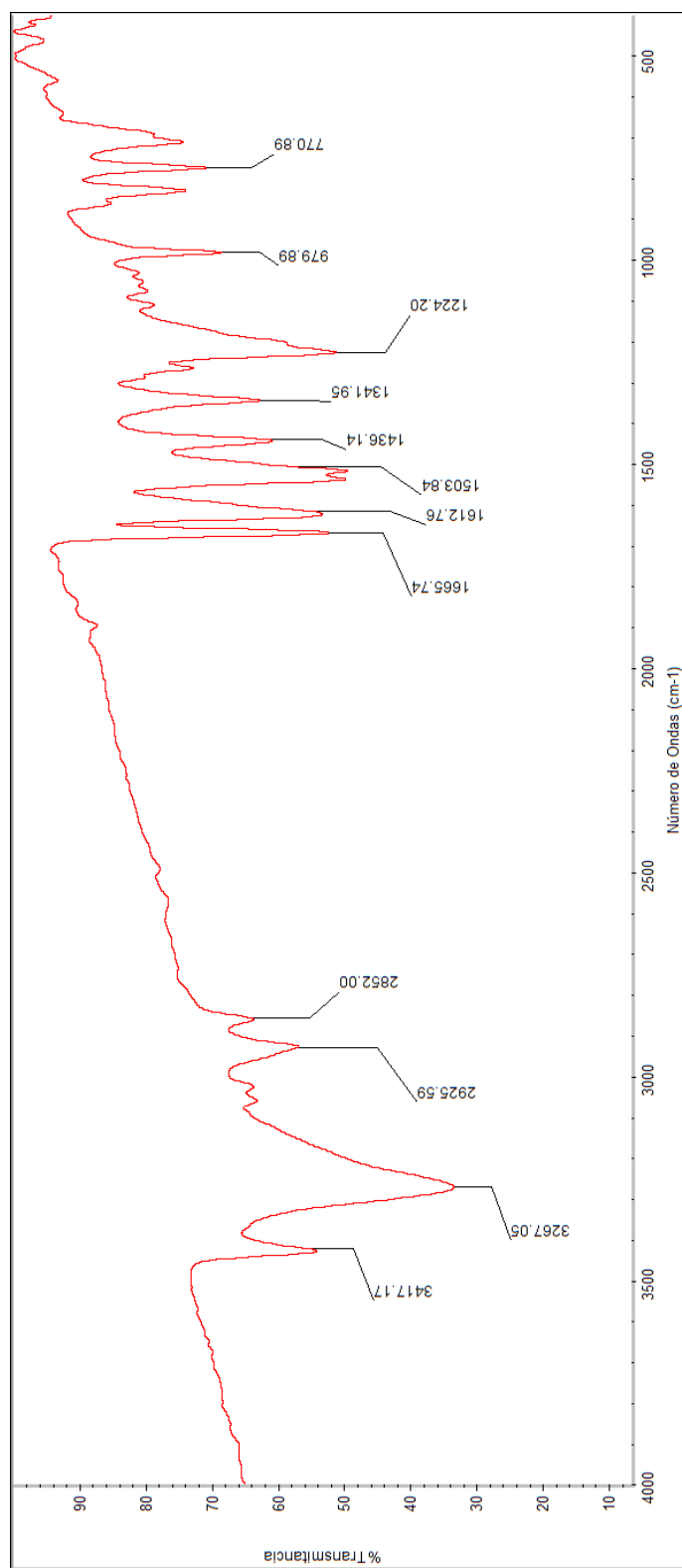


Figura 88. Espectro de masas de CAPS 10

