

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Sección de Químicas



TESIS DOCTORAL

**Preparación y estudio de n-halógeno-acetil-arilalquilaminas
como inhibidores de catecol-o-metiltransferasa**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Francisca González Muñoz

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322350565

T1

547

547

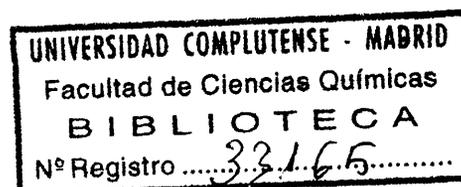
**PREPARACION Y ESTUDIO DE N-HALOGENO-
ACETIL-ARILALQUILAMINAS COMO INHIBIDO
RES DE CATECOL-O-METILTRANSFERASA.**

Francisca González Muñoz

TESIS

*Presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias,
Sección de Químicas, por*

FRANCISCA GONZALEZ MUÑOZ



Este trabajo ha sido realizado en la Sección de Enzimoquímica, Departamento de Productos Naturales, del Instituto de Química Orgánica General (Centro Nacional de Química Orgánica) del Patronato de Investigación Científica y Técnica "Juan de la Cierva" del C.S.I.C., bajo la supervisión del Profesor Dr. M. Lora Tamayo, director del Centro y la dirección de los Profesores de Investigación Drs. E. Fernández Álvarez, Jefe del Departamento, y C. Elorriaga Realde, que nos propusieron el tema. A ambos nuestro más sincero agradecimiento.

Asimismo, agradecemos al Ministerio de Educación y Ciencia la ayuda económica recibida a través de la concesión de una de las Becas de Formación de Personal Investigador, durante el período 1969-1971; a mis compañeros de la Sección su ayuda en la resolución de diversos problemas, y al personal del Departamento de Análisis y Técnicas Instrumentales del Instituto, que dirige el Profesor Dr. J. Calderón, su colaboración en la realización de microanálisis y registro de espectros.

Madrid, Febrero de 1972

INDICE

PARTE I

OBJETIVOS Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO	Pág.
Introducción.....	1
Aminas biógenas.....	2
Catecol-O-metiltransferasa.Aspectos gene- rales.....	7
Inhibidores de catecol-O-metiltransferasa	
I.-Inhibidores reversibles.....	11
II.-Inhibidores irreversibles y plan de trabajo.....	16

PARTE II

TEORIA Y DISCUSION DE METODOS Y RESULTADOS	
Preparación de aril-alquilaminas.....	22
Acilación de aminas.....	28
Introducción de diferentes halógenos.....	34
Protección del grupo catecol.....	35
DISCUSION GENERAL DE ESTRUCTURAS:ESPECTROS IR Y RMN.	
I.-Discusión de espectros IR.....	39
II.-Discusión de los espectros de resonancia magnética nuclear.....	41

PARTE EXPERIMENTAL	Pág
METODOS GENERALES Y ORIGEN COMERCIAL DE LOS PRODUCTOS.....	44
Preparación de aril-alquilaminas.....	45
Preparación de N-acetil-arilalquil- aminas.....	57
Preparación de N-cloroacetil-aril- alquilaminas.....	62
Preparación de N-iodoacetil-aril- alquilaminas.....	70
Preparación de N-bromoacetil-arilal- quilaminas.....	75

PARTE III

ESTUDIOS SOBRE INHIBICION DE CATECOL-O-ME-
TILTRANSFERASA POR N-HALOGENOACETIL-ARIL-
ALQUILAMINAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS.

METODOS PARA LA DETERMINACION DE CATECOL-
O-METILTRANSFERASA:

a) Métodos fluorométricos.....	80
b) Métodos que emplean isótopos ra- diactivos.....	82
c) Métodos colorimétricos.....	83

	Pág.
Determinación de COMT con pirocatecolftaleina como sustrato.....	85
PARTE EXPERIMENTAL	
Material utilizado y métodos generales...	89
Preparación de pirocatecolftaleina.....	90
Preparación de catecol-O-metiltransferasa	91
Preparación de ioduro de S-adenosilmetionina.....	93
Ensayo de inhibidores de COMT.....	96
Tablas de ensayo de los productos sintetizados como inhibidores de COMT.....	100
RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSION	
Compuestos del grupo I	107
Compuestos del grupo II	111
Compuestos del grupo III	113
Compuestos del grupo IV	118
TABLAS EXPERIMENTALES DE ESPECTROS IR Y RNM	119
RESUMEN Y CONCLUSIONES	156
BIBLIOGRAFIA.....	163

PARTE I

INTRODUCCION Y OBJETO DEL TRABAJO

INTRODUCCION

Creemos de interés comenzar esta memoria con una consideración general de las razones que nos han movido a centrar nuestra atención en la síntesis de N-halogenoacetil-arilalquilaminas y al estudio de su actividad "in vitro" como inhibidores de catecol-O-metiltransferasa, como índice previo de su posible interés como agentes psicótrópos.

Para ello, comentaremos en primer lugar el papel de las aminas biógenas como responsables de la regulación del tono psíquico de los individuos. Posteriormente revisaremos el estado actual de conocimientos sobre la enzima catecol-O-metiltransferasa, así como los métodos empleados para determinar la actividad de esta enzima. Consideraremos también los inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa, en cuanto a lo que se refiere a su estructura química y a sus efectos fisiológicos. A la vista de todos estos antecedentes concluiremos esta parte con una exposición de nuestro plan de trabajo.

AMINAS BIOGENAS

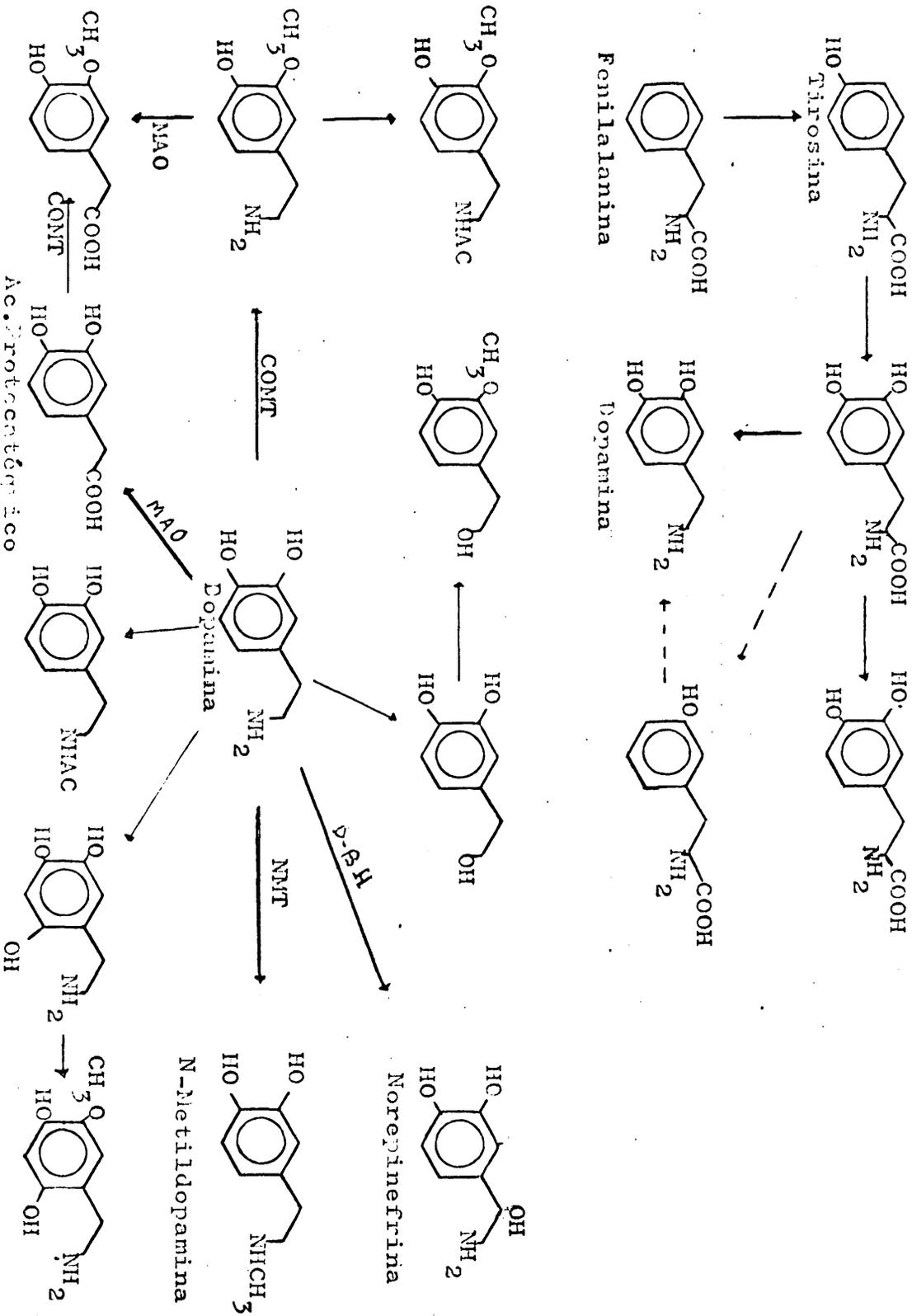
Los trabajos realizados en los últimos años en el campo de la neuroquímica fueron confiriendo una importancia progresiva a las aminos biógenas del sistema nervioso central. Hoy día, estas aminos biógenas ocupan un lugar clave en la bioquímica del cerebro y sus funciones, hallándose enfocada gran parte de la investigación actual en este campo hacia la búsqueda y estudio de sustancias que interfieran con su biosíntesis, almacenamiento y metabolismo. Las aminos biógenas agrupan tres tipos de sustancias(1):

- a) Catecolaminas, (dopamina, norepinefrina, epinefrina etc.)(2)
- b) Serotonina y compuestos afines.
- c) Histamina y compuestos análogos.

En realidad estos tres tipos de compuestos tienen bastante en común, en lo que se refiere a su biosíntesis y metabolismo. La principal ruta de biogénesis de estos compuestos es la descarboxilación de aminoácidos aromáticos. La amina así formada puede sufrir cierto número de modificaciones o bien ser almacenada en ciertas partículas celulares para su posterior utilización. Nos ocuparemos aquí solamente de las catecolaminas, ya que son las aminos biógenas más directamente relacionadas con nuestro trabajo.

En 1947, Gurin y Delluva(3) y posteriormente Udenfriend y col.(4) aislaron epinefrina de animales a los que habían administrado fenilalanina. Estos estudios confirmaron el papel de este aminoácido esencial como precursor de las catecolaminas. La figura(1) presenta un esquema de biosíntesis y metabolismo de estas aminos biógenas.

FIGURA I .



Esquema de biosíntesis y metabolismo de 5,4-dihidroxifenililetilamina (dopamina)

La transformación de fenilalanina en tirosina, catalizada por la fenilalaninahidroxilasa, y su posterior conversión en dopa ha sido demostrada "in vitro" y también en animales vivos (4). La conversión de dopa en otros catecoles también ha sido demostrada "in vitro", habiéndose aislado después de la incubación, 3,4-dihidroxifeniletamina (dopamina), norepinefrina y ácido 3,4-dihidroxifenilacético. "In vivo", además de los metabolitos anteriores, se aislaron también ácido dihidroxifenilpiruvico, 3-hidroxifenilacético y 3-metoxi-4-hidroxifenilacético. La dopa descarboxilasa o descarboxilasa de aminoácidos aromáticos es la enzima que cataliza la conversión de dopa en dopamina, habiendo sido muy estudiada en especies y tejidos diferentes y su papel en la biosíntesis de catecolaminas ha sido recientemente revisado (5). La enzima que cataliza la conversión de dopamina en norepinefrina es la dopamina- β -hidroxilasa, que es inhibida por varios derivados de feniletamina. La biotransformación de norepinefrina y epinefrina ha sido estudiada extensamente por Kirsner y col. (6), Axelrod y col. (7) y Schayer (8) y revisada posteriormente por otros muchos autores.

Estas catecolaminas, una vez producidas, ejercen su acción y posteriormente son destruidas por uno de estos dos mecanismos:

- a) Desaminación oxidativa catalizada por monoaminoxidasa (MAO)
- b) O-Metilación, catalizada por catecol-O-metiltransferasa (COMT)

Las aminas biógenas poseen un amplio campo de acción cuyo alcance y transcendencia apenas si ha comenzado a vislumbrarse. Se les atribuye el papel de neurotransmisores análogo al desempeñado por la acetilcolina. Desde luego, de alguna manera directa o indirecta, controlan la presión arterial, las contracciones del útero y de los músculos lisos, el rit-

mo cardíaco y de manera especial son responsables del tono psíquico de los individuos.

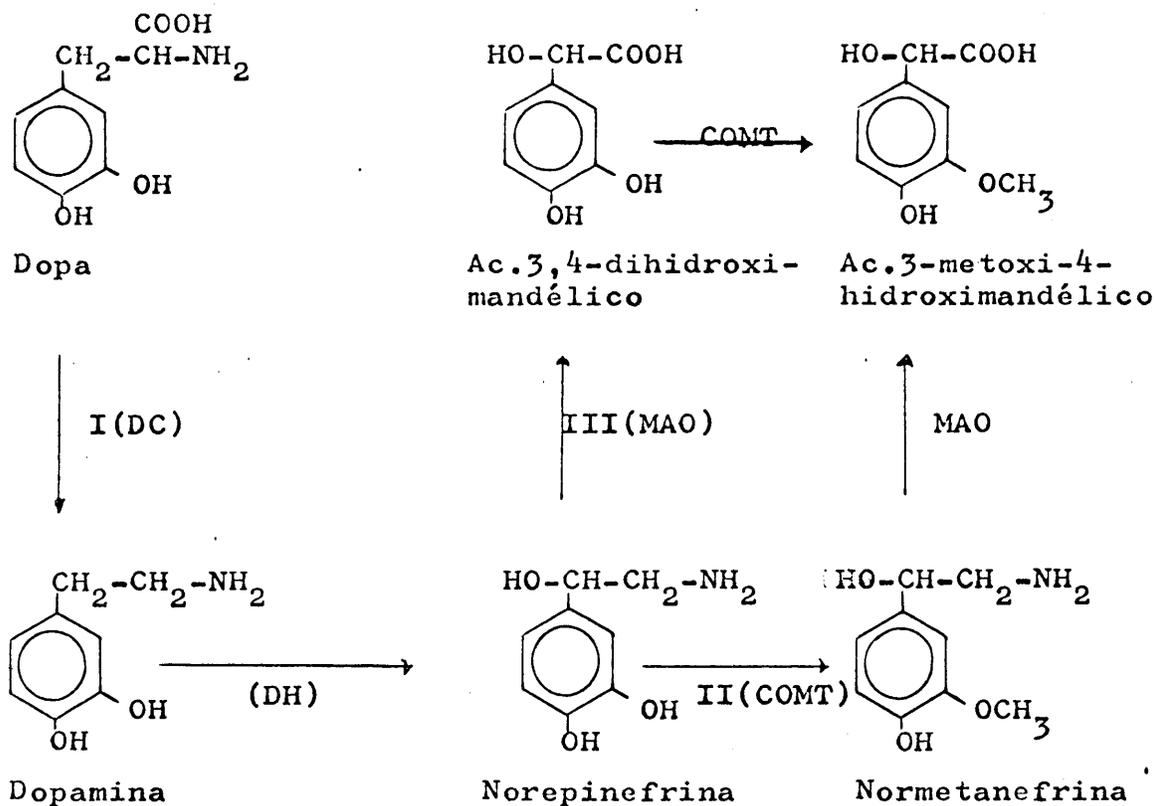
Existen muchas dudas en lo que se refiere a la distribución de todas estas funciones entre las diferentes aminas. La opinión más generalizada atribuye a las catecolaminas el control de la presión sanguínea, mientras la serotonina sería la principal responsable del tono psíquico de los individuos. De todas formas, sea cual sea la amina básicamente responsable en cada caso, el hecho observado es que una elevación en el nivel normal de estas aminas en el organismo produce estados de excitación, supraactividad, agitación e histeria, mientras que un descenso del mismo conduce a aberraciones mentales, representadas por depresiones más o menos agudas, apatía y estupor. Facilmente puede comprenderse el interés que presenta la búsqueda de sustancias que interfieran de algún modo el metabolismo de estas bioaminas y que permitan así la regulación de sus niveles.

El punto de partida de nuestro trabajo es el hecho de que las catecolaminas se producen continuamente en el organismo, pero, al mismo tiempo, son eliminadas de modo también continuo. Ante este hecho, debe admitirse que su nivel representa la resultante estacionaria de un equilibrio dinámico entre su velocidad de formación y su velocidad de eliminación. Es evidente que para que un determinado nivel se mantenga, ambas velocidades deben ser idénticas.

Tanto la naturaleza de las reacciones que conducen a la formación o a la eliminación de las catecolaminas como sus velocidades respectivas están catalizadas por enzimas concretas, por lo que se presenta la posibilidad de regular cualquiera de estas velocidades de reacción mediante modificación de la actividad de la enzima implicada. Naturalmente, el bloqueo de una de estas enzimas representa la supresión de un paso metabólico completo.

Una inhibición moderada de su actividad representaría una reducción parcial de la velocidad de este paso metabólico. En cualquier caso, el nivel de las catecolaminas podrá ser mantenido, o modificado a voluntad, si se logra un control de las enzimas responsables de estas reacciones y por tanto de las velocidades de cada una de las reacciones de formación y de eliminación.

Son varias las enzimas que intervienen en estos procesos:



- (DC) Dopadescarboxilasa
- (COMT) Catecol-O-metiltransferasa
- (MAO) Monoaminoxidasa
- (DH) Dopamina- β -hidroxilasa

Figura (2)

En la figura(2) representamos los pasos metabólicos más directamente relacionados con la aparición y desaparición de las catecolaminas, eligiendo como tipo representativo la norepinefrina.

Logicamente, el bloqueo de la descarboxilasa debe suprimir el paso metabólico(I), quedando impedida la formación de catecolamina. Sin embargo, por mantenerse las vías de eliminación, desaparecerá progresivamente la amina existente, o cualquier dosis administrada. Su nivel descenderá en el organismo hasta desaparición total de la catecolamina. Por otra parte, si el sistema de producción de catecolamina actúa normalmente y se cortan los pasos metabólicos(II) y (III), las catecolaminas que continuamente se forman no podrán ser eliminadas y su nivel se elevará progresivamente en el organismo. Cualquier dosis administrada tendría un efecto más duradero. Bloqueos parciales de los pasos metabólicos, pueden permitir la regulación del sistema hasta alcanzar el nivel deseado.

Nuestro trabajo actual va orientado a conseguir la regulación de la actividad de una de las enzimas mencionadas, concretamente la catecol-O-metiltransferasa(COMT), como contribución al trabajo global que debe incluir estudios similares con cada una de las enzimas relacionadas con estos procesos. En este sentido, centramos nuestra atención en la búsqueda de inhibidores eficaces de COMT. A continuación discutimos el estado actual de este problema y los posibles avances que, según nuestra tesis, pueden conseguirse.

CATECOL-O-METILTRANSFERASA

1.- Aspectos generales

El conocimiento de la catecol-O-metiltransferasa es

relativamente reciente. Hasta 1957 se creía que la acción fisiológica de la adrenalina y noradrenalina era terminada por la acción de la monoaminoxidasa (MAO), la cual metaboliza las aminas endógenas por desaminación oxidativa. Sin embargo al disponer de potentes inhibidores de MAO y administrarlos a los animales, no se prolongaba la acción fisiológica de la adrenalina, lo cual estaba en contradicción con lo esperado teóricamente (9). Estos resultados sugerían la existencia de otra amina capaz de metabolizar las catecolaminas por una ruta distinta.

Axelrod se basó en la aparición normal de productos O-metilados en la orina, (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), los cuales procedían de O-metilación de catecolaminas, y en resultados como el de Armstrong (18), quien encontraba que los individuos que padecían tumores que segregaban adrenalina eliminaban en orina grandes cantidades de ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (vainillinmandélico). La aparición de estos compuestos O-metilados, como metabolitos finales en orina, unido a la existencia ya entonces conocida de enzimas N-metilantes que utilizan S-Adenosilmetionina como donador de grupo metilo, sugirieron a Axelrod la posible existencia de una enzima capaz de metilar el hidroxilo fenólico de las catecolaminas, usando el mismo donador de metilo.

La búsqueda de la enzima dió su fruto cuando Axelrod (19) incubó adrenalina con S-Adenosilmetionina y un homogeneizado de hígado y comprobó que la adrenalina desaparecía. Pudo identificar el producto de su metabolismo, que resultó ser la metanefrina (meta-metoxi-adrenalina). Con esto, ya en 1957, quedó establecida la existencia de una enzima O-metilante, que existe en el hígado y que metaboliza adrenalina utilizando S-Adenosilmetionina como donador de grupo metilo.

Una vez descubierta la existencia de la enzima O-meti-

lante era lógico aislarla de los tejidos y estudiar sus propiedades. Fué el mismo Axelrod quien, en 1958, aisló de hígado de rata una fracción que era portadora de la actividad enzimática, preparación que puede considerarse la primera de esta enzima, y realizó con ella un primer estudio de propiedades (20).

La preparación de esta fracción suponía una purificación de unas 20 veces, con un rendimiento del 30 al 50% y comprendía los pasos siguientes: homogeneización del tejido con ClK isotónico, centrifugación del precipitado formado, ajuste del sobrenadante a pH 5,0 con ácido acético 1M y separación del precipitado por centrifugación; fraccionamiento del sobrenadante entre 30-50% de saturación con sulfato amónico, diálisis y absorción-elución sobre gel de fosfato cálcico.

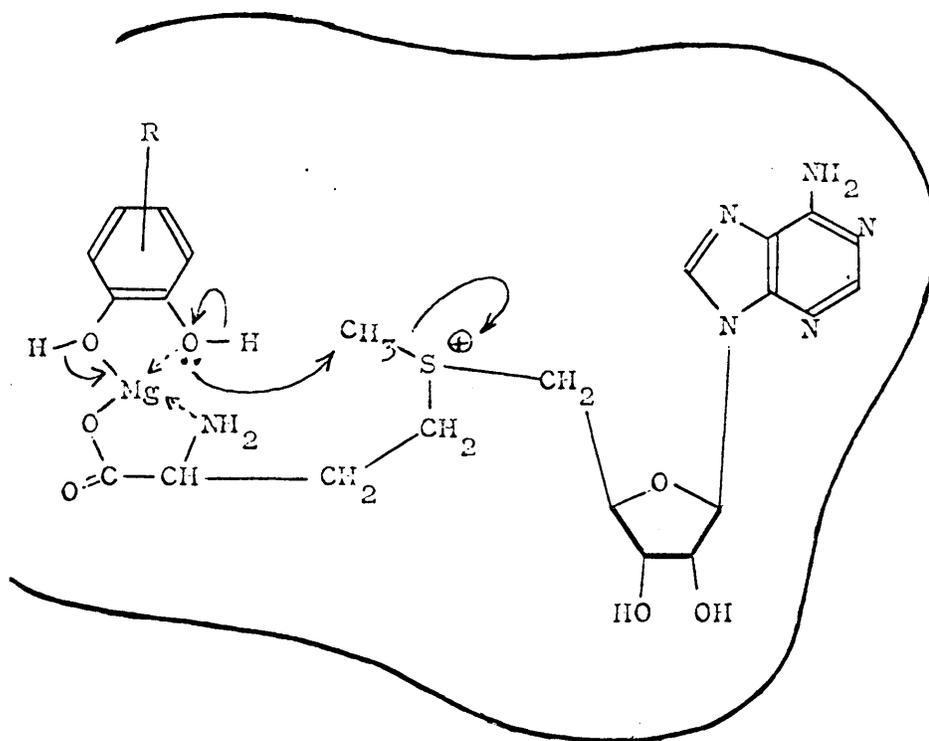
En el estudio de propiedades (21) encontró que la enzima requiere S-Adenosilmetionina (S-AMe) y un metal divalente, siendo los más activos Co^{2+} , Mn^{2+} y menos activos Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} y Ni^{2+} . El Ca^{2+} y Sn^{2+} no producen activación. Como metales trivalentes ensayó Fe^{3+} y Al^{3+} , los cuales no producen activación. Las preparaciones eran estables, por lo menos durante tres meses, si se almacenaban a -10°C . La actividad no se afecta en condiciones anaerobias y no se logra activación con glutation.

La enzima se inactiva por p-cloromercuribenzoato o por ácido iodoacético. Encuentra un pH óptimo de acción entre 7,5 y 8,2 con tampón de fosfato 0,1M. La K_m para epinefrina resulta ser de $1,2 \cdot 10^{-4}$ M. Sirven como sustratos de la enzima los catecoles en general, pero no los monofenoles ni los difenoles no catecólicos.

Estudia en rata la distribución de la actividad en hígado, riñón, bazo, intestino delgado, pulmón, cerebro, corazón y músculos, encontrando máxima actividad en hígado, aunque ex-

ceptuando el músculo, existe cierta actividad en todos los tejidos estudiados. Entre las especies estudiadas, la mayor actividad corresponde a rata, siguiendole vaca, cerdo, ratón, cobaya, hombre, gato y conejo.

Sin que exista ninguna comprobación experimental, Axelrod (22) sugiere que el metal divalente sirve como quelante para ligar el sustrato, el cofactor y la proteína enzimática, proponiendo el siguiente esquema para el complejo:



e indicando que el grupo OH catecólico en posición 3 es fuertemente nucleófilo y ataca al carbono del grupo metilo de la

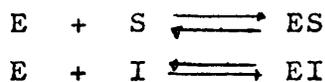
S-Adenosilmetionina.

Los trabajos posteriores de purificación, que pueden considerarse importantes, son los realizados por Anderson (23) y Assicot(24). El primero de ellos logra una purificación de unas 200 veces respecto al homogeneizado de hígado, pero con un rendimiento tan bajo como el 10% y obteniendo en electroforesis un mínimo de ocho componentes protéicos. El segundo obtiene una purificación de 450 veces, con un rendimiento del 12% y encuentra una sola banda en electroforesis. Ambos autores indican que la enzima purificada resulta extraordinariamente inestable.

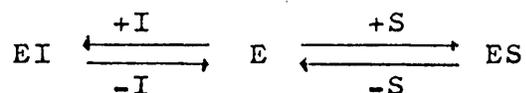
2.- Inhibidores de catecol-O-metiltransferasa

a) Inhibidores reversibles

Tanto los inhibidores de COMT hasta ahora conocidos, como cierto tipo de los preparados por nosotros deben ser inhibidores reversibles. El modo de acción que puede esperarse para estos inhibidores consiste en una competencia con el sustrato natural en su tendencia a asociarse al centro activo de la enzima. Esta acción se basa en su afinidad por el centro activo y la consecuente formación de un complejo reversible del inhibidor(I) con la enzima(E), del mismo tipo que el formado por el sustrato(S) con la enzima.



Colocada la enzima en presencia de inhibidor y sustrato simultaneamente, la situación de competencia puede representarse por las ecuaciones siguientes:



Para inhibir la enzima por acción de un inhibidor en presencia del sustrato será necesario que se forme el complejo EI y no se forme el complejo ES. Es decir, será necesario desplazar el sistema en el sentido de máxima formación del complejo EI. Las dos causas capaces de producir este efecto de desplazamiento son:

1)-Que la afinidad del sustrato para la enzima sea mucho menor que la afinidad del inhibidor para la enzima. En este caso, y en igualdad de concentraciones de sustrato e inhibidor, se formará preferentemente el complejo EI.

2)-Teniendo en cuenta que los equilibrios anteriores están regidos por la Ley de Acción de Masas serán dependientes de las concentraciones de las especies que intervienen. En consecuencia, si la concentración de inhibidor es mucho mayor que la concentración de sustrato, se formará preferentemente el complejo EI aún suponiendo la misma afinidad para ambos compuestos.

El efecto final dependerá de las dos causas indicadas. Mediante el empleo de una concentración suficiente de inhibidor se pueden desplazar los equilibrios de forma que toda la enzima se encuentre en la forma EI, e impedir el acceso del sustrato al centro activo de la enzima. Esta posibilidad, teóricamente aplicable, presenta ya inconvenientes en experiencias "in vitro", debidas principalmente a las limitaciones que impone la solubilidad del inhibidor, la cual puede ser muy variable según la naturaleza del compuesto. Para aplicar este criterio "in vivo", aparecen inconvenientes adicionales. En efecto, la gran concentración de inhibidor requerida debe mantenerse en todo el organismo (a no ser que el inhibidor se concentre en determinadas regiones del mismo y estas regiones correspondan a la localización de COMT). El empleo de altas concentraciones de inhibidor queda también

muy limitado por la toxicidad y los efectos secundarios del inhibidor. Pero además hay que considerar la tendencia del organismo a eliminar el inhibidor administrado, mediante sus mecanismos de desintoxicación. Si se desea una acción biológica prolongada, será necesario administrar el inhibidor continuamente, de modo que se mantenga la concentración requerida durante todo el período de tratamiento.

Quedando limitada la concentración posible de inhibidor, es lógico que solo tendrán un cierto interés farmacológico, aquellos inhibidores que presenten una afinidad por el centro activo de la enzima muy superior a la que presentan los propios sustratos naturales. Si se tiene en cuenta que los sustratos naturales poseen la estructura ideal para ser atacados por la COMT, parece difícil que la afinidad de estos sustratos pueda ser rebasada y más que lo sea en alta proporción. Sin embargo, se conocen inhibidores de cierta potencia y la investigación actual, en este campo, continúa centrandose fundamentalmente sobre dos características exigidas a los compuestos:

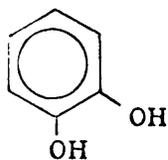
1º) Mayor potencia, que equivale a decir menor concentración de inhibidor para alcanzar la inhibición deseada.

2º) Menor toxicidad.

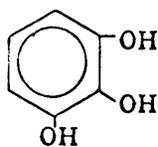
Pero por muy satisfactoria que sea la solución de este problema los inhibidores deberán ser administrados continuamente, con una frecuencia que dependerá de la velocidad con que son eliminados por el organismo. Y en cualquier caso la toxicidad por pequeña que sea actuará de modo crónico. Varias clases de compuestos han sido estudiados "in vitro" e "in vivo" como inhibidores de esta enzima. El efecto inhibitor de estas sustancias fué comparado con el del pirogalol,

utilizado como sustancia patrón en las determinaciones.

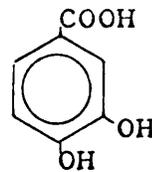
Ross y col.(25) han estudiado "in vitro" varios tipos de compuestos como inhibidores de COMT. A continuación formulamos algunos de los compuestos más importantes:



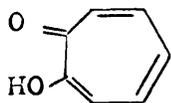
Catecol



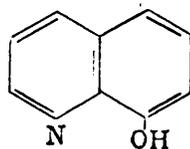
Pirogalol



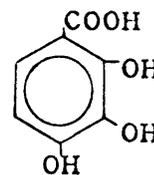
Ac. 3,4-dihidroxi-benzóico



Tropolona



8-Hidroxiquinoleina

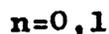
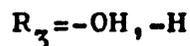
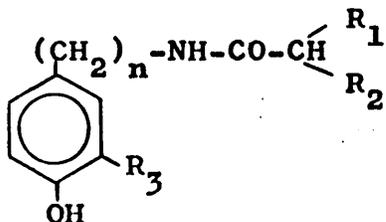


Ac. gálico

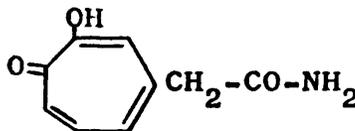
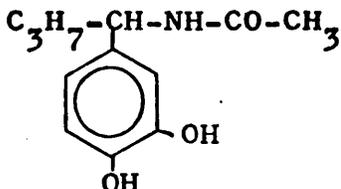
La introducción de sustituyentes en el anillo de catecol y pirogalol modifica considerablemente la capacidad de estos compuestos para inhibir la enzima. Así por ejemplo los ácidos 3,4-dihidroxi-benzóico y ácido gálico tienen un efecto inhibitor más pobre que sus análogos catecol y pirogalol.

Aunque estas estructuras han sido las más estudiadas, sin embargo otros muchos compuestos han sido probados como inhibidores de esta enzima. Carlsson y Corrodi(26) han sinte-

tizado una serie de amidas fenólicas y probado su actividad "in vitro.



Estos compuestos han resultado ser potentes inhibidores de COMT y además no son tóxicos "in vivo". Estos mismos autores han sintetizado una serie de dopacetamidas α -sustituidas y tropolonas sustituidas. Encuentran que el inhibidor más potente para la primera serie es la α -propil-3,4-dihidroxifenilacetamida y, para la serie de tropolonas, la 4-hidroxitropolonacetamida ha sido el inhibidor más potente (27)



También han sido probados una serie de hidroxibencenos (28) y flavonoides O-dihidroxisustituidos (29).

La analogía estructural de todos estos compuestos con los sustratos naturales sugiere que pueden actuar como inhibidores competitivos de COMT, desplazando al sustrato. Todos ellos son inhibidores reversibles, adoleciendo de los inconvenientes que hemos expuesto para este tipo de inhibidores. De estos compuestos ensayados "in vitro", solamente un redu-

cido número se han ensayado "in vivo". Son estos fundamentalmente: catecol, pirogalol y 4-metiltropolona(30).

En órganos periféricos las tropolonas tenían más alta potencia de inhibición, pero sin embargo fueron consideradas menos eficaces en cerebro. El pirogalol, el ester isopropílico del ácido gálico y la 2,3,4-trihidroxiacetofenona son los compuestos que resultaron ser más potentes inhibidores de COMT en cerebro. Alguno de los compuestos probados parece que intervienen en otros mecanismos, por ejemplo estimulación o bloqueo de los receptores β -adrenérgicos. La 4-metiltropolona se consideró tenía capacidad de bloqueo sobre los receptores β -adrenérgicos(30).

Resumiendo, el pirogalol y algunos de sus derivados son considerados "in vivo" como los más eficaces inhibidores de COMT en cerebro. Para inhibición en órganos periféricos las tropolonas son los más eficaces. El inconveniente que presentan estos compuestos es su elevada toxicidad, por lo que las dosis administradas deben ser pequeñas. Esto unido a que han de ser administrados continuamente, hace que no tengan aplicación en clínica.

b) Inhibidores irreversibles

Al hablar de inhibidores reversibles hemos comentado sus posibilidades y limitaciones. Estas últimas pueden resumirse así:

A) Si su afinidad por el centro activo de la enzima no es mucho mayor que la que poseen los sustratos naturales, la concentración de inhibidor necesaria para desplazar al sustrato, por la Ley de Acción de Masas, debe ser grande.

B) En casos particulares, su solubilidad puede representar

una limitación en la alta concentración necesaria.

C) Su toxicidad, puede representar también una limitación a la alta concentración necesaria y a la concentración que puede alcanzarse en el organismo.

D) El organismo eliminará más o menos rápidamente la droga administrada, por lo que, para mantener de modo continuo una concentración suficiente, sería necesario administrar el producto continuamente.

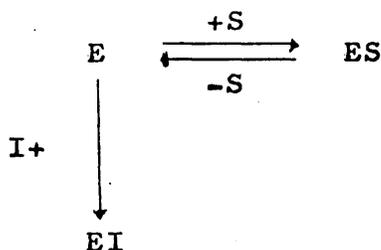
Todo ello hace que estos inhibidores reversibles sean útiles únicamente como instrumentos de trabajo para estudios metabólicos en animales de laboratorio, pero no resulten aplicables desde el punto de vista farmacológico o terapéutico.

En la idea de poder superar estas dificultades y de disponer de inhibidores más eficaces y que puedan tener interés en clínica, intentamos preparar inhibidores irreversibles y específicamente dirigidos al centro activo de la COMT, los cuales puedan presentar ventajas sobre los inhibidores reversibles, hoy conocidos, que hemos comentado anteriormente. Suponiendo que un inhibidor sea capaz de fijarse irreversiblemente a la proteína enzimática, de forma que su centro activo resulte inaccesible para el sustrato, la enzima quedará definitivamente bloqueada. La actividad enzimática solo podrá ser restablecida "in vivo" cuando el organismo sintetice nuevas moléculas de enzima. Indudablemente, su acción resultará más prolongada.

Por otra parte, si el inhibidor se mantiene específica e irreversiblemente unido al centro activo, el organismo podrá desintoxicarse eliminando el inhibidor de todos sus líquidos biológicos, pero nunca podrá eliminarlo del centro activo de la COMT. Asimismo en esta situación concreta, el inhibidor mantendrá su acción específica sobre la enzima pero no tendrá

acción alguna sobre otros sistemas biológicos, quedando eliminada la toxicidad y por supuesto, posibles efectos secundarios.

También puede esperarse que el solo hecho de la irreversibilidad suponga, en sí, una mayor eficacia en el bloqueo del centro activo de la enzima. La eficacia será, sobre todo, importante en la competencia del inhibidor irreversible con el sustrato natural (S) cuya asociación a la enzima es un proceso reversible.



Aún en el caso de que el inhibidor tuviese menor afinidad que el sustrato para el centro activo de la enzima y aunque su concentración fuese pequeña, a efectos de la Ley de Acción de Masas, el sistema sería finalmente desplazado hacia la formación del complejo (EI) a causa de la competencia de la reacción irreversible con total eliminación de la enzima libre (E). La única condición necesaria sería que el inhibidor estuviese en la cantidad estequiométrica necesaria para bloquear todas las moléculas de enzima presentes o la proporción de moléculas deseada.

Este efecto final pudiera conseguirse también en varias etapas por administración repetida de pequeñas dosis, en el caso de que una elevada toxicidad del producto lo aconsejase o una escasa solubilidad lo impusiese. Teniendo en cuenta la afinidad específica del inhibidor por el centro ac-

tivo de la enzima, pudieran administrarse dosis que produzcan en el organismo una concentración mínima, no peligrosa. Si, después de que el organismo se ha desintoxicado, se repite la dosis, se irían bloqueando progresivamente un mayor número de moléculas de COMT, para las cuales los efectos serían acumulativos. Pudiera llegarse así a bloquear todas las moléculas de enzima e introducir en el organismo la cantidad necesaria de producto sin sobrepasar en ningún momento una pequeña concentración en los líquidos biológicos.

Para conseguir este fin planeamos estructuras que reúnan las características siguientes:

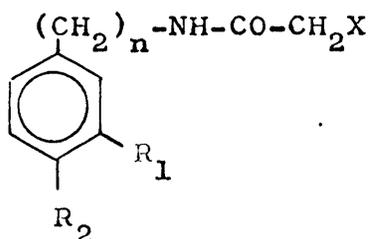
1º) Poseer una región que las haga análogas a los propios sustratos naturales, de modo que, como ellos, presenten afinidad por el centro activo de la enzima y puedan asociarse a él.

2º) Poseer un grupo reactivo a través del cual puedan unirse firmemente, mediante enlace covalente, a la misma proteína enzimática.

En el trabajo que presentamos preparamos estructuras cuya afinidad por el centro activo esté asegurada por su calidad de sustratos de la enzima y muestren además una forma y tamaño tan próximos como sea posible a los propios sustratos naturales. Para su unión irreversible a la proteína enzimática utilizamos un grupo alquilante, situado en el extremo de la cadena lateral flexible. En este caso, el grupo alquilante utilizado ha sido la agrupación $\text{-NH-CO-CH}_2\text{X}$, siendo X un halógeno.

Como no conocemos la distancia entre el centro activo de la COMT y los grupos funcionales de la proteína enzimática susceptibles de alquilación, creemos conveniente ensayar

cadena de longitudes variables. A este fin utilizamos cadenas con un número variable de eslabones metilénicos. A fin de poder establecer comparaciones y obtener datos que muestren la concordancia entre nuestra idea y los hechos reales, ampliamos este esquema molecular a una estructura más general. Así incluimos el hidrógeno entre las posibles variaciones de X y reemplazamos el grupo catecol por sustituyentes en posiciones 3,4 respecto a la cadena lateral, los cuales designaremos por R_1 y R_2 . Estos sustituyentes pueden ser iguales o diferentes $-H, -OCH_3$, u otros grupos, además de $-OH$ en el caso particular de los catecoles. Queda así la fórmula general para estos compuestos:



$$n=0,1,2 \text{ y } 3$$

$$X=Cl, Br, I, H$$

$$R_1 \text{ y } R_2 \text{ (iguales o diferentes)}$$

$$=-H, -OH, -OCH_3$$

Las series de compuestos que responden a la fórmula general dada permiten barajar una serie de características distintas, con las cuales pueden hacerse varias combinaciones. Una determinada combinación de estas características en un solo compuesto definirá su comportamiento frente a la enzima. Pero los compuestos programados por nosotros permiten estudiar cada una de estas características por separado, una a una, siguiendo un criterio analítico. En efecto, podemos man-

tener constantes dos de las tres variables ($n, X, R_1 - R_2$) y variar la tercera observando los efectos que esta variación produce.

PARTE II

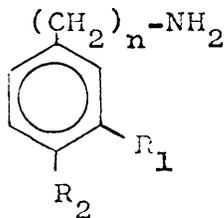
SINTESIS DE N-HALOGENOACETIL-ARILALQUILAMINAS

A) PARTE TEORICA

PREPARACION DE ARILALQUILAMINAS

La mayor parte de los compuestos preparados como posibles inhibidores de COMT, han sido obtenidos por nosotros, según describimos en el lugar correspondiente, a partir de aminas estructuralmente relacionadas con ellos. Entre las aminas requeridas, solamente unas pocas son asequibles en el mercado. Prácticamente todas las aminas portadoras de sustituyentes oxigenados en el anillo han sido sintetizadas por nosotros para su posterior transformación. A continuación haremos un tratamiento teórico de los métodos empleados en la síntesis de estos compuestos.

La fórmula general para este grupo de compuestos es:

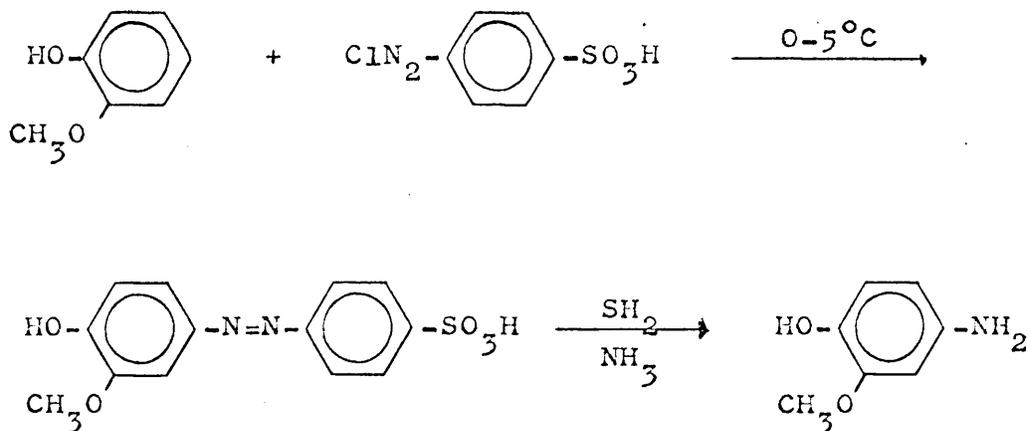


$n=0,1,2$ y 3

R_1 y R_2 (iguales o diferentes) =
 $-\text{H}, -\text{OH}, -\text{OCH}_3$

Método A: La 3-metoxi-4-hidroxianilina, la hemos sintetizado siguiendo un método dado por Jacobs y Heidelberg(31). Este producto también ha sido preparado por otros autores(32) por reducción del 5-nitroguayacol, pero según nuestra experiencia el método que condujo a mejores resultados fué el de Jacobs y Heidelberg.

Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:

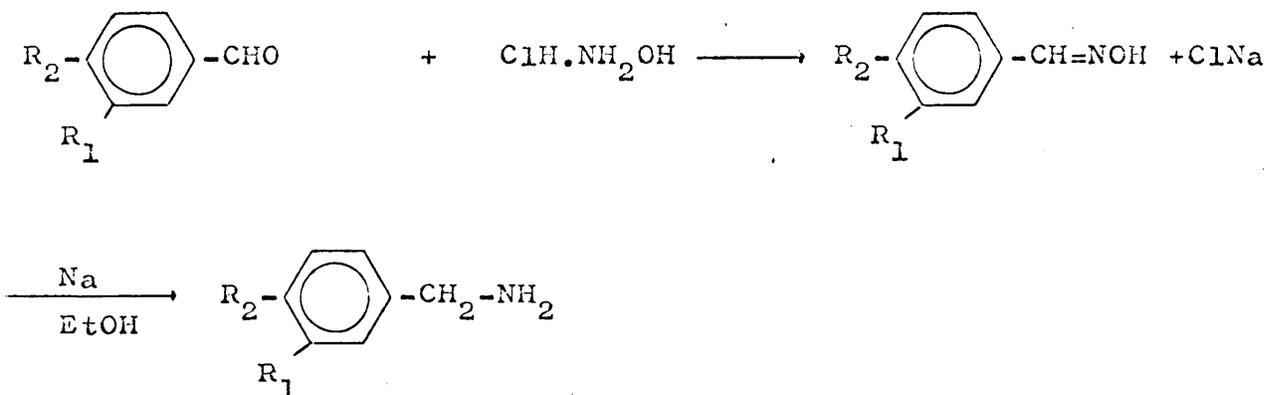


Como podemos observar en esta serie de reacciones esquematizada anteriormente, el proceso consiste esencialmente en la copulación de guayacol con la sal de diazonio del ácido sulfanílico y posterior reducción del colorante formado. Así se obtiene la 3-metoxi-4-hidroxianilina con buen rendimiento. Caracterizamos este producto por microanálisis y espectros I.R. y R.N.M. que no encontramos registrados en la literatura. Damos referencia de estos espectros en el lugar correspondiente.

Método B: Las aminas correspondientes a n=1 han sido preparadas por reducción de las oximas correspondientes. En la literatura hemos encontrado descritos distintos métodos empleados en esta reducción según los distintos autores. Unos utilizan amalgama de sodio en ácido acético y alcohol (33), hidrogenación catalítica (34), reducción electrolítica (35) y también reducción con sodio y alcohol (36).

Nosotros hemos empleado sodio y alcohol para la reducción de las oximas preparadas, si bien hemos encontrado

que los rendimientos son mejores aumentando la cantidad de alcohol con respecto a la que utilizan estos autores (vease Parte Experimental). Este método incluye las reacciones siguientes:

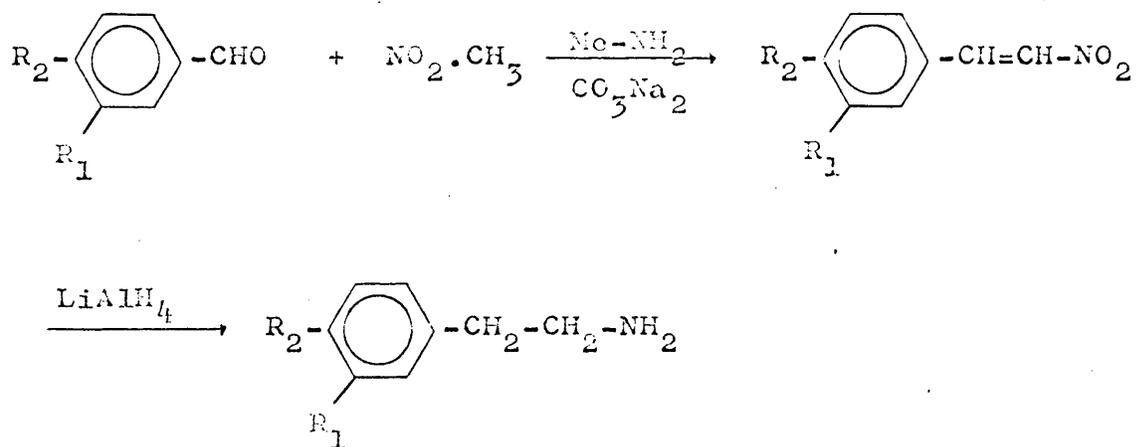


Las oximas empleadas, preparadas a partir de los correspondientes aldehidos aromáticos por tratamiento con hidroxilamina se obtienen con rendimientos del orden del 90%. Sin embargo, en la reducción con sodio y alcohol los rendimientos bajan considerablemente, no habiendose logrado obtener las aminas con rendimientos mayores del 65%. Todas las aminas se han recristalizado como sales, hidrocloruros o hidrobromuros y comprobado su pureza por cromatografía en capa fina utilizando como disolvente de desarrollo butanol saturado de amoníaco. Las aminas, una vez purificadas, han sido caracterizadas por microanálisis y espectros I.R. y R.N.M.

Método C: Para las aminas correspondientes a $n=2$, hemos seguido un método descrito por Burger y Ramirez(37) ya que los métodos descritos anteriormente no se encontraron satisfacto-

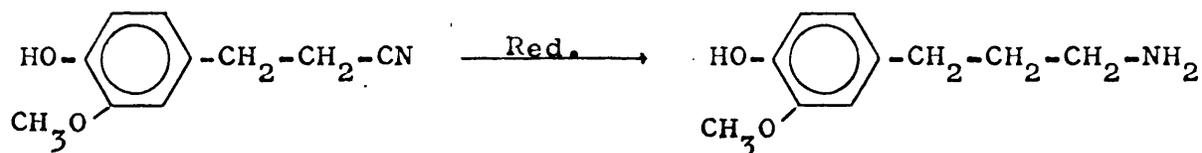
rios para preparar una cantidad apreciable de amina. Kobayasi(38) prepara estos mismos compuestos por reducción de las oximas correspondientes con el grupo hidroxilo bencilado. Los rendimientos que obtiene son bajos ya que los productos son difíciles de purificar.

El método descrito como más satisfactorio es la reducción de los β -nitroestirenos correspondientes con LiAlH_4 . Estos β -nitroestirenos se preparan fácilmente por tratamiento de los correspondientes aldehidos aromáticos con nitrometano en presencia de metilamina. Son productos generalmente amarillos cristalinos y fáciles de purificar. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



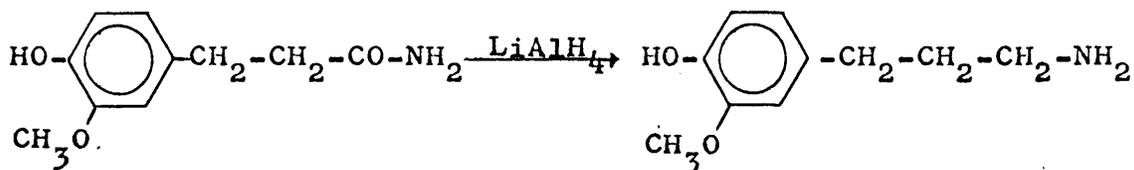
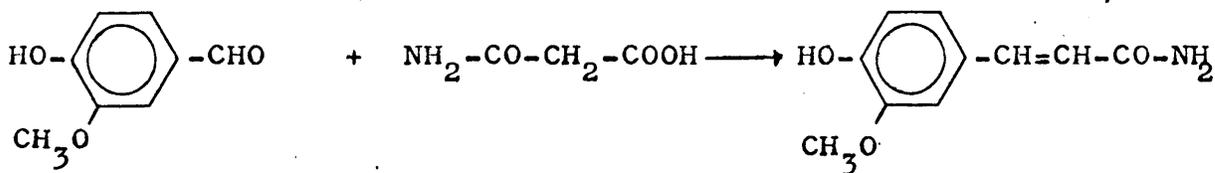
Las aminas se separan de la mezcla de reacción como picratos que posteriormente son descompuestos con ácido clorhídrico concentrado para obtener así el hidrocioruro de la correspondiente amina. Esta forma de purificación se ha encontrado muy satisfactoria para aminas fenólicas, ya que las aminas libres cristalizan con dificultad y, con ligeras impurezas, lo hacen en forma de aceite. Estos compuestos también han sido caracterizados por microanálisis y espectros I.R. y R.N.M.

Método D: Para la preparación de aminas correspondientes a $n=3$ hemos seguido la reacción de Knoevenagel, utilizando aldehidos aromáticos comerciales elegidos por nosotros y condensandolos con la monoamida del ácido malónico en piridina y en presencia de piperidina. El método utilizado ha sido descrito por Jirskorsky y M. Protiva (39) para la preparación de 3,4-dimetoxifenilpropilamina. Esta amina había sido preparada anteriormente por Kobayasi (40) por reducción del nitrilo correspondiente con amalgama de sodio según el esquema siguiente:



Los rendimientos que obtiene por este método son escasos y no es válido para preparar una cantidad estimable de producto.

El esquema general de reacción para los productos preparados por nosotros siguiendo el método de Jirskorsky y M. Protiva es el siguiente:

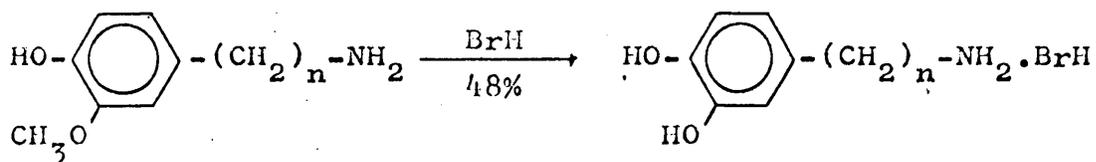


Estos autores realizan la reacción de condensación del aldehído con la monoamida del ácido malónico calentando en baño de agua durante una hora. En nuestro caso, partíamos de aldehídos con grupos OH libres y los rendimientos que obteníamos eran escasos siguiendo su mismo procedimiento, eran del orden del 20%. Sustituyendo la calefacción por larga estancia a temperatura ambiente, el rendimiento alcanzado llegó a ser de un 60%. Para evitar este tiempo de reacción de aproximadamente 10 días a temperatura ambiente, en las preparaciones posteriores utilizamos el aldehído de partida con el grupo hidroxilo bencilado. Esto no representa ningún inconveniente ya que el grupo benciloxi se elimina fácilmente por hidrogenación catalítica. La purificación de estas aminas se lleva a cabo en la misma forma descrita para las aminas con $n=2$, aislandolas de la mezcla de reducción con LiAlH_4 como picratos y descomponiendo posteriormente estos a hidroccloruros.

Por este mismo método intentamos sintetizar la 3,4-dihidroxifenilpropilamina, pero no lo pudimos lograr, ya que al intentar aislar la amina de la mezcla de hidrogenación con LiAlH_4 la disolución se oscurecía rápidamente y no conseguimos que se separase el picrato.

Todas las aminas sintetizadas por este método se caracterizaron por microanálisis y espectros I.R. y R.N.M.

Método E: Este método es general para todas las aminas preparadas que incluyen en su estructura la agrupación catecol. Esencialmente consiste en el tratamiento de las 3-metoxi-4-hidroxi-arilalquilaminas, preparadas previamente, con ácido bromhídrico al 48% recientemente destilado.



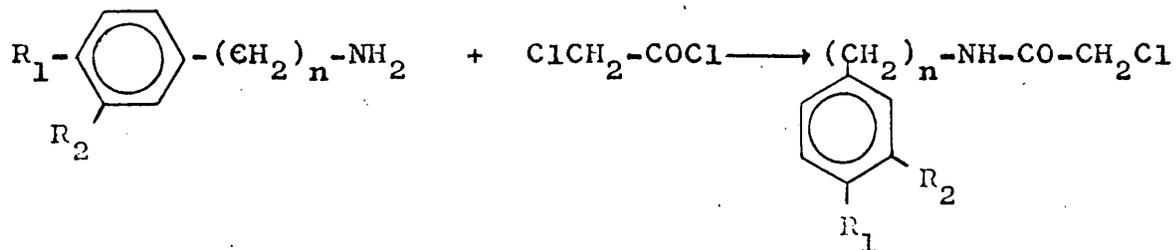
El trabajar en medio ácido es una gran ventaja por la mayor estabilidad de estas aminas como sales y también por la mayor resistencia a la oxidación del grupo catecol en estos medios ácidos. Así obtenemos hidrobromuros de estas aminas que podemos recrystalizar con relativa facilidad si la amina sometida a tratamiento con ácido bromhídrico es suficientemente pura.

Todas las aminas preparadas según este método han sido caracterizadas por microanálisis y espectros I.R. y R.N.M.

ACILACION DE AMINAS

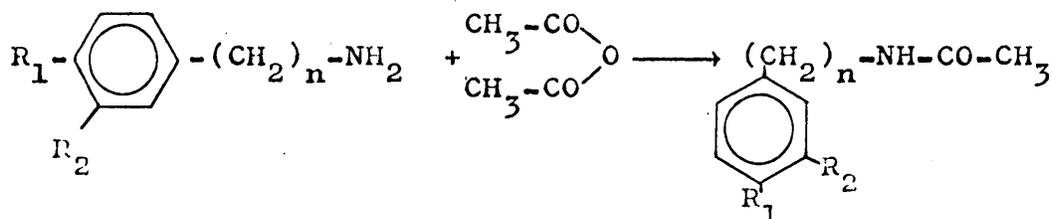
Los métodos utilizados para la síntesis de N-halogenoacetil-arilalquilaminas son fundamentalmente los siguientes:

1º) Acilación de la amina correspondiente con el cloruro de ácido(41).

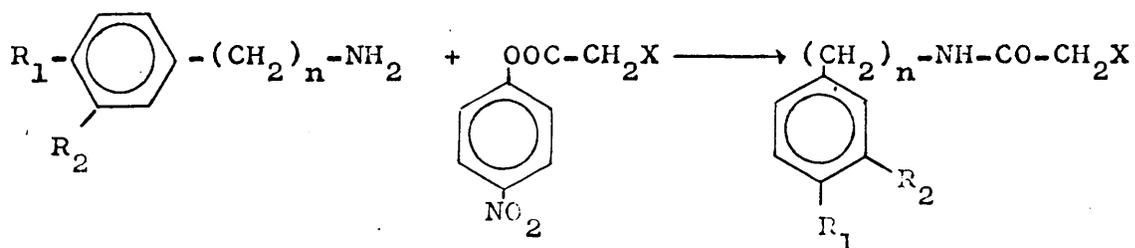


2º) Tratamiento de la amina con anhídrido acético en medio

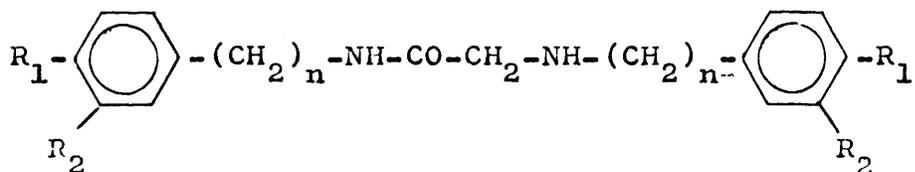
acético(42).



3º) Transacilación con esteres activos(43).



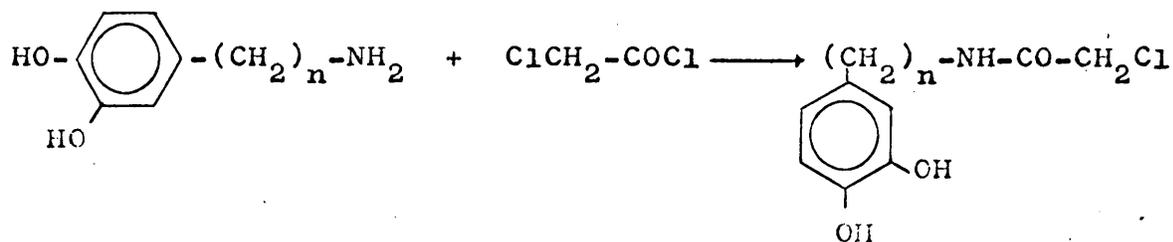
El primer método ha sido muy utilizado por diversos autores, Jones y Pyman(41) han sintetizado por este método, las N-halogenoacetil-arilalquilaminas derivadas de vainillina. El único problema que puede presentarse es la formación de dímeros, a causa de la reaccionabilidad del grupo alquilante terminal de los productos finales.



Según nuestra experiencia personal se puede evitar la formación de dímeros si se utiliza un gran exceso de disolvente, de modo que los materiales se encuentren muy diluidos en la mezcla de reacción. Operando en estas condiciones y manteniendo la temperatura a 0°C., los rendimientos conseguidos por nosotros son del orden del 90%.

Para la acilación de aminas fenólicas este método

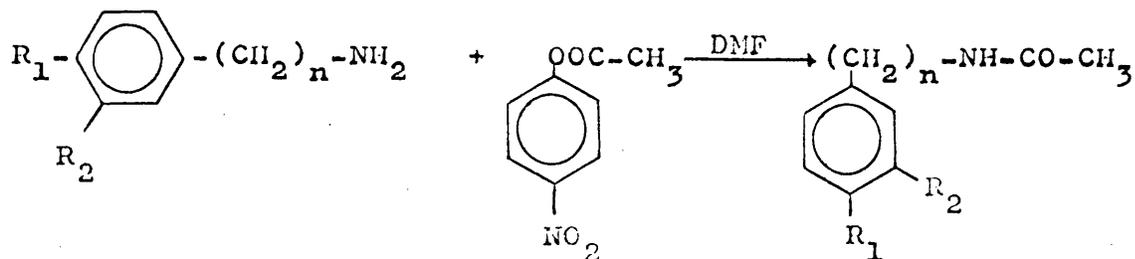
presenta algunos inconvenientes. Damos a continuación el esquema de reacción para estas aminas:



En primer lugar, para llevar a cabo esta acilación deben utilizarse las aminas libres, no protonadas, y el aislamiento de aminas fenólicas en esta forma resulta difícil o prácticamente imposible, debido a su rápida oxidación. Esta dificultad se acentúa muy especialmente en el caso de las catecolaminas.

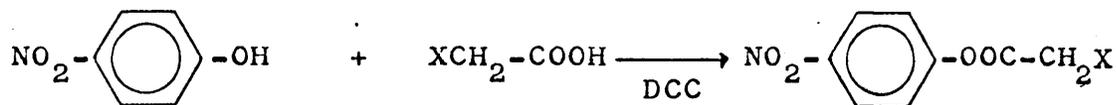
En segundo lugar, estas aminas que poseen grupos fenólicos libres presentan problemas de solubilidad en los disolventes orgánicos en los que ordinariamente tiene lugar esta reacción. Ya en el caso de las 3-metoxi-4-hidroxiarilalquilaminas la reacción se lleva a cabo manteniendo la amina en suspensión. Lógicamente en estas condiciones la reacción resulta lenta, ya que ocurre solamente en la superficie de las partículas. La poca solubilidad de la amida formada durante la reacción dificulta aún más el proceso, existiendo el peligro de precipitación sobre las mismas partículas de amina sólida.

El segundo método, válido solamente para preparar amidas sin halógeno terminal, no ha sido utilizado por nosotros. Estas amidas han sido preparadas en todos los casos, según el método (32), descrito por Bodansky y col (43) para crear uniones peptídicas.



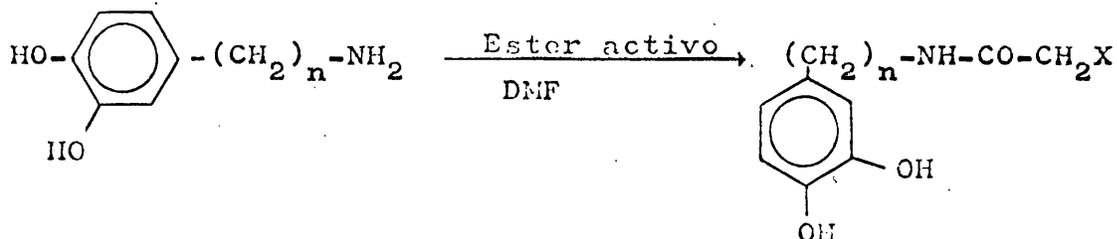
Estos autores hacen reaccionar los p-nitrofenilesteres de los aminoácidos N-protegidos con esterres de aminoácidos que tienen sus grupos NH_2 libres. Obtienen rendimientos superiores al 90% en pocas horas y a temperatura ambiente. Estos esterres tienen la ventaja de que no reaccionan con grupos $-\text{OH}$, como lo demuestra el hecho de que se cristalizan de alcohol hirviendo, pero reaccionan magníficamente y en condiciones suaves con grupos NH_2 . Existen otros tipos de esterres activos: esterres tiofenílicos (44), p-nitrotiofenílicos (45) cianometílicos (46), etc.

De entre todos estos esterres activos, hemos elegido los p-nitrofenilesteres por ser los más fácilmente asequibles los cuales hemos preparado por condensación de p-nitrofenol con el ácido correspondiente, en presencia de dicitclohexilcarbodiimida a una temperatura de 0°C , según el siguiente esquema de reacción:



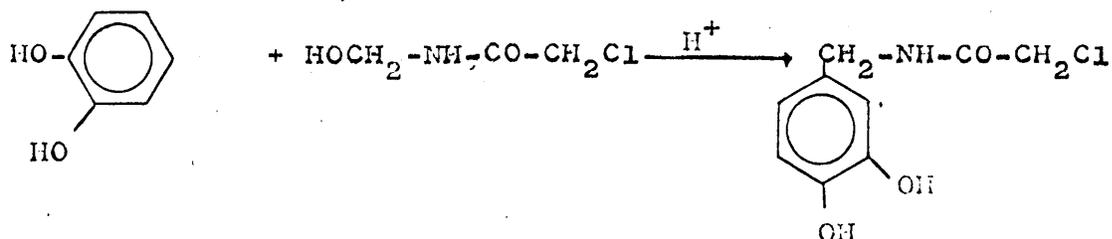
$\text{X} \neq \text{H, Cl}$

La reacción de transacilación la hemos realizado según el esquema siguiente:



El disolvente utilizado en la reacción de transacilación es dimetilformamida (DMF), liberando la amina, en el mismo medio de reacción, con una cantidad equimolecular de trietilamina. La reacción tiene lugar a temperatura ambiente y abandonamos la mezcla durante 48 horas para que se complete la reacción. Los rendimientos obtenidos por nosotros son del orden del 70% al 80%. La ventaja de este modo de operar es que utilizamos directamente el hidrocloreto en lugar de tener que liberar previamente la amina, que en el caso de las fenólicas son de difícil cristalización y no poseen la estabilidad del hidrocloreto. Para acilación de catecolaminas hemos tenido que llevar a cabo la reacción en atmósfera de nitrógeno, ya que en presencia de oxígeno y trietilamina, estas aminas se oxidan rápidamente y no conseguimos aislar ningún producto de acilación.

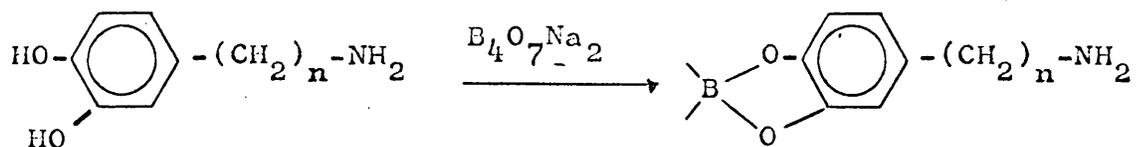
La primera 3,4-dihidroxi-N-halogenoacetil-arilalquilamina que obtuvimos en estado de pureza fué la 3,4-dihidroxi-N-cloroacetilbencilamina. Después de ensayar sin éxito una diversidad de caminos, conseguimos su preparación por un método fundamentalmente distinto de los métodos generales que hemos expuesto, debido a Einhorn y Mauermayer (47) y que ni siquiera supone acilación de la correspondiente amina. Este método tiene el gran inconveniente, para nuestros fines concretos, de no poderse aplicar más que a un solo compuesto, siendo por tanto inaplicable para la preparación de series.



En este método se hace reaccionar pirocatecol con N-hidroximetil-cloroacetamida en medio acuoso fuertemente ácido y a temperatura ambiente. Al cabo de una semana se separan cristales de amida. Existen contradicciones en la bibliografía sobre la estructura de este producto, apareciendo descrito indistintamente como 2,3-dihidroxibencilamina (48) o como 3,4-dihidroxibencilamina (47).

Posteriormente cuando fuimos capaces de encontrar caminos de aplicación más general, preparamos el compuesto anterior por acilación de la 3,4-dihidroxibencilamina y la 3,4-dihidroxi-N-cloroacetilbencilamina así obtenida resultó ser idéntica a la preparada por el método de Einhorn y Mauermayer, quedando así excluida la otra posibilidad para la estructura de este compuesto.

La acilación de catecolaminas la hemos llevado a cabo con cloruro de cloroaceto en medio acuoso fuertemente alcalino manteniendo el grupo catecol protegido por formación de su complejo con borato.



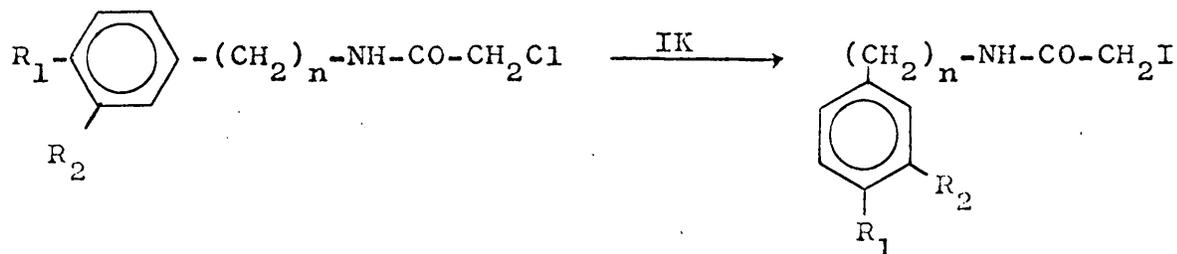
Este complejo formado es muy estable en medio alcalino pero se escinde fácilmente en medio ácido. Teniendo en cuenta

este hecho, una vez terminada la reacción de acilación añadimos a la mezcla obtenida ácido clorhídrico hasta viraje del rojo congo con lo cual liberamos el catecol. Este método lo hemos usado repetidas veces en la preparación de amidas 3,4-dihidroxisustituidas (ver páginas 65 y 69).

INTRODUCCION DE DIFERENTES HALOGENOS

Para la preparación de las N-bromo y N-iodoacetil-arilalquilaminas, no hemos utilizado los métodos de acilación ya expuestos. Pudiera pensarse que la acilación de aminas transcurriese de forma análoga utilizando los correspondientes bromo o iodo-acetil derivados en lugar del cloruro de cloroacetilo o los halogenoacetatos de p-nitrofenol. Pero hemos preferido preparar las N-bromo y N-iodoacetil-arilalquilaminas a partir de las correspondientes N-cloroacetilarilalquilaminas, mediante una simple sustitución de halógeno.

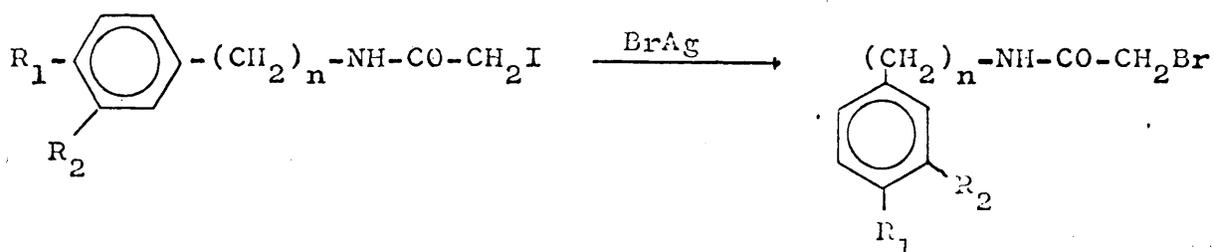
La sustitución de Cl por I se ha logrado, con rendimiento satisfactorio, mediante tratamiento del compuesto clorado con IK en acetona seca, según la siguiente reacción general:



El método va bien con todas las N-iodoacetil-arilalquilaminas

preparadas, si bien en el caso de las 3,4-dihidroxi-N-acetil-arilalquilaminas se pierde algo de rendimiento, debido a que se resinifican por calefacción.

La sustitución de I por Br se logra de forma análoga, tratando el correspondiente compuesto iodado con BrAg en acetona seca.

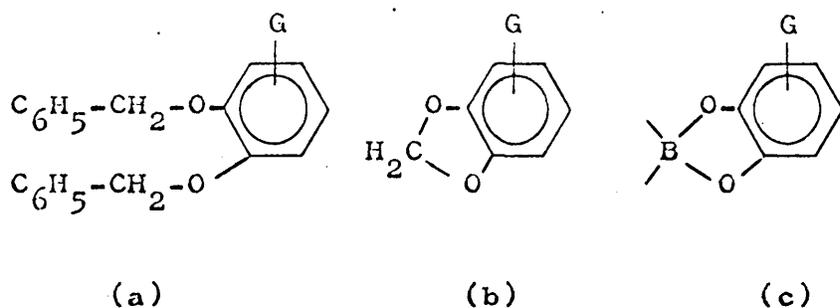


Este método va bien en todos los casos, excepto en el de las 3,4-dihidroxi-N-bromoacetil-arilalquilaminas, ennegreciéndose mucho la disolución y no pudiendo aislarse productos cristalinos. Solamente hemos conseguido en estado de pureza la 3,4-dihidroxi-N-bromoacetilbencilamina.

PROTECCION DEL GRUPO CATECOL

Fué siempre uno de nuestros principales problemas el mantener el grupo catecol protegido a lo largo de todos los pasos de síntesis con un grupo que se pueda eliminar fácilmente. Han sido ensayados los métodos siguientes:

a) Tratamiento del compuesto catecólico de partida con cloruro de bencilo formando así el grupo dibenciloxi fácilmente eliminable por hidrogenación catalítica posterior:

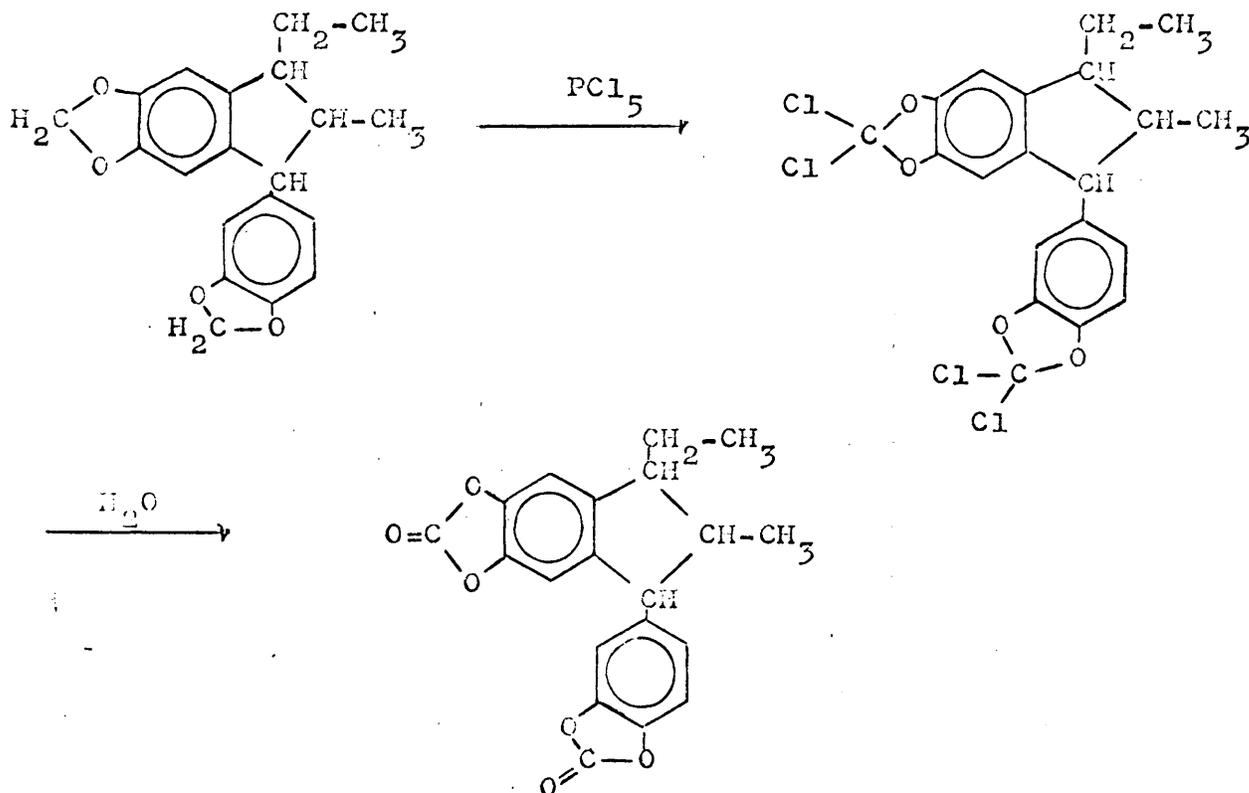


b) Partir de compuestos que incluyan en su estructura el grupo metilendioxi(b).

c) Tratamiento del compuesto catecólico de partida con boro para formar el complejo (c).

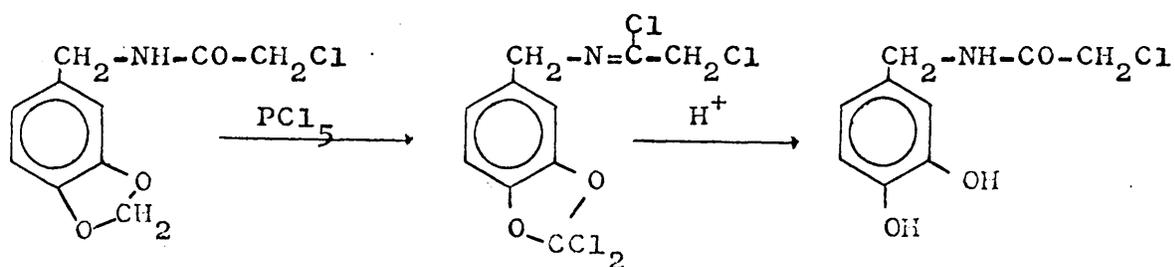
El método (a) resulta adecuado para protección de grupos OH, sin embargo, en nuestro caso, no podía ser utilizado ya que al tratar de eliminarlo por hidrogenación catalítica eliminaríamos también el grupo alquilante terminal.

Intentamos el segundo camino(b); utilizando un método dado por Baker y col.(49) para productos terpénicos.



Estos autores tratan el diisosafrol con PCl_5 , re-
fluyendolo en benceno. El producto bruto de reacción se vierte
sobre agua y se separa la fase bencénica en la que queda di-
suelto el carbonato. Este carbonato en medio debilmente áci-
do debe pasar a catecol, si bien estos autores no aislan el
compuesto terpénico con el grupo catecol libre sino que con-
forme van liberando los grupo OH los metilan en el mismo
medio de reacción.

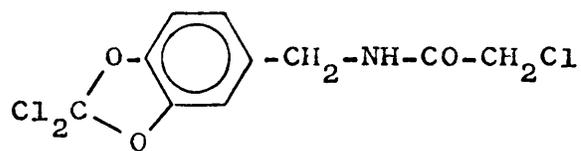
El esquema de reacción seguido por nosotros es el si-
guiente:



Hemos partido de piperonal y obtenido la oxima y la
amina correspondiente. La piperonilamina así preparada ha si-
do acilada con cloruro de cloroacetilo en medio acuoso fuer-
temente alcalino. Posteriormente la piperonilcloroacetamida
la hemos sometido a tratamiento con PCl_5 en benceno anhidro.
La disolución bencénica se virtió sobre agua como indican
los autores, si bien nosotros no conseguimos aislar produc-
tos cristalinos. Solo aislamos residuos aceitosos que no con-
seguimos cristalizar.

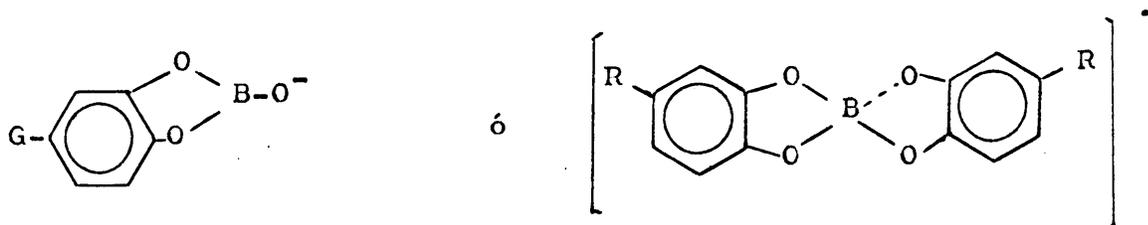
A la vista de estos resultados intentamos purificar
el producto de reacción por cromatografía preparativa en
placas de gel de sílice. Aparecen en las placas tres manchas

claras además de otras más débiles. Las dos primeras manchas aparecen en pequeña cantidad y no han podido ser caracterizados estos productos; de la tercera, más abundante, se aisló un producto cristalino de p.f. 74°C que recristalizado de cloroformo-éter de petróleo se eleva a $83-84^{\circ}\text{C}$. De este producto se obtuvo su análisis elemental y espectros I.R. y R.N.M. asignándole la estructura:



Los restantes productos aislados no son cristalinos y registrando los espectros I.R. de estos aceites, se observan en el infrarrojo bandas anchas a la altura de 3300 cm^{-1} indicando presencia de grupos fenólicos libres, pero a pesar de nuestros esfuerzos estos productos no han podido ser purificados.

El mejor método que hemos encontrado para protección de grupos OH en el caso concreto de los catecoles es la formación de su complejo con borato:



La estabilidad del complejo es grande en medio alcalino, cosa muy favorable para nuestros fines concretos ya que, en este medio, es donde llevamos a cabo la reacción de

acilación. Por otra parte, el complejo se escinde fácilmente, en medio ácido, de forma que una vez terminada la reacción de acilación podemos conseguir dos cosas al adicionar ClH al medio de reacción:

- 1º) Escindir el complejo catecol-borato.
- 2º) Estabilizar el compuesto resultante ya que, la estabilidad del grupo catecol es considerablemente mayor en medio ácido.

Como se ha expuesto anteriormente todos los productos preparados fueron caracterizados por sus análisis elementales y por el examen de sus espectros I.R. y R.N.M.. Los primeros serán detallados para cada caso en la parte experimental, junto con la descripción de sus respectivas preparaciones. Los datos espectroscópicos se resumen en la parte IV, tablas I a IX.

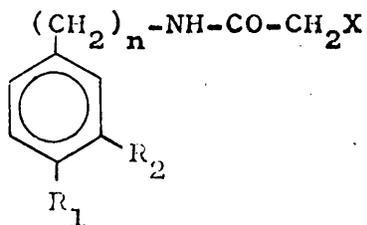
Seguidamente incluimos una discusión general de las características comunes de los espectros IR y RNM.

DISCUSION GENERAL DE ESTRUCTURAS: ESPECTROS IR Y RNM

I.- Discusión de espectros infrarrojos.

Se ha hecho un amplio estudio de los espectros infrarrojos junto con los de resonancia magnética nuclear de todos los compuestos sintetizados, como el mejor medio para caracterizarlos.

A continuación comentamos los resultados obtenidos para este grupo de compuestos de fórmula general:



R_1 y R_2 (iguales o diferentes) =
-H, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OH}$
 $n = 0, 1, 2$ y 3
 $X = \text{Cl, Br, I, H}$

En la región NH todos los compuestos de este grupo presentan una banda a 3300 cm^{-1} siendo muy aguda y fuerte en los compuestos sin sustituyentes en el anillo aromático. En los compuestos con sustituyentes OH en el anillo aromático esta banda aparece junto con la de tensión OH como una banda más ensanchada, iniciando su aparición hacia 3400 cm^{-1} . En los compuestos catecólicos ($R_1=R_2=-\text{OH}$) esta banda aparece todavía más ensanchada. Entre $1625\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ se registran en todos los espectros de estos compuestos las bandas de combinación de tensión C-N y flexión NH.

En la región carbonílica todas las N-halogenoacetil-arilalquilaminas presentan bandas de tensión C=O entre 1640 y 1660 cm^{-1} . En los compuestos con $X=\text{H}$ las bandas carbonílicas aparecen a frecuencias más altas, hacia 1660 cm^{-1} , disminuyendo un poco al introducir los diferentes halógenos, así los compuestos en los que la banda de tensión C=O aparece más baja (1640 cm^{-1}) son aquellos en los que $X=\text{I}$.

Las bandas correspondientes a la vibración de tensión C=C del anillo se observan en todos los espectros de los compuestos a una frecuencia comprendida entre 1500 y 1600 cm^{-1} .

En los compuestos con sustituyentes oxigenados en el anillo aromático la banda de tensión C-O aparece entre 1210 y 1250 cm^{-1} estando combinada con la de flexión OH en los

compuestos que tienen sustituyentes fenólicos en el anillo aromático.

Las bandas de monosustitución aromática aparecen entre 690 y 760 cm^{-1} para los diferentes compuestos, la banda de 1,4 disustitución aromática entre 810 y 860 cm^{-1} y las bandas de 1,3,4 trisustitución aromática entre 815 y 830 cm^{-1} una de ellas y la otra entre 855 y 865 cm^{-1} .

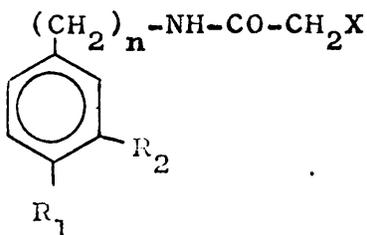
Las bandas C-halógeno aparecen a frecuencias menores que las que registra el aparato utilizado por nosotros, por lo que no han podido ser registradas.

Todos los espectros IR se registraron en Nujol como disolvente y pueden consultarse en las Tablas I a V de las páginas 119-140.

II.- Discusión de los espectros de resonancia magnética nuclear.

Hemos registrado los espectros de RNM de todas las N-acetil-arilalquilaminas y de las N-cloroacetil-arilalquilaminas. Los correspondientes a las N-iodoacetil-arilalquilaminas y N-bromoacetil-arilalquilaminas no han sido registrados por no considerarlo necesario, ya que estos productos han sido preparados a partir de las N-cloroacetil-arilalquilaminas mediante un cambio de halógeno y los espectros, en cuanto al número de protones, serían idénticos.

La fórmula general para este grupo de productos es la siguiente:

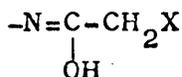
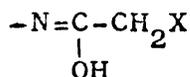


R_1 y R_2 (iguales o diferentes) =
H, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OH}$
 $n = 0, 1, 2$ y 3
 $X = \text{Cl}, \text{I}$

Para los compuestos con X=H los protones CH₃-CO aparecen a valores de τ comprendidos entre 7,87 y 8,25 y los protones CH₂X-CO entre 5,80 y 5,96, para los diferentes compuestos. La presencia del halógeno rebaja considerablemente el campo a que aparecen estos protones contiguos al grupo CO.

La señal del protón NH es siempre una señal ancha y el intervalo en que aparece en el espectro es muy extenso variando mucho de unos compuestos a otros. Así, por ejemplo, para el compuesto correspondiente a n=2 y R₁=R₂=H el protón NH aparece entre 3,4 y 4,5 (τ) y para el compuesto correspondiente a n=0; R₁=OH y R₂=H el protón NH aparece a 0,098 unidades τ .

Los protones metilénicos contiguos al NH y al anillo aromático (n=1) dan una señal entre 5,43 y 5,90 unidades τ según el compuesto de que se trate, correspondiendo los valores más altos a los compuestos en los que X=H y los más bajos a aquellos en los que X=Cl. Estos protones aparecen como un doblete con una constante de acoplamiento J=7c.p.s. Según esto cabe pensar o en la existencia de dos formas posibles para estas aminas:



o lo que parece que realmente ocurre, en un desdoblamiento por el protón NH.

Para los compuestos con n=2 los protones metilénicos contiguos al grupo NH dan una señal, generalmente muy desdoblada, entre 6,45 y 7 unidades τ . Los protones metilénicos contiguos al anillo aromático aparecen entre 7,11 y 7,60 unidades τ . La influencia del halógeno en la resonancia de estos

protones es muy escasa.

Por último para los compuestos con $n=3$ los protones metilénicos contiguos a dos grupos CH_2 aparecen entre 8,11 y 6,28 unidades τ , generalmente muy desdoblados.

Los espectros de RNM de estos productos se registraron en dimetilsulfoxido como disolvente excepto en los productos en que $X=H$ que se utilizó Cl_3D . Como patrón interno se utilizó tetrametilsilano. Pueden consultarse en las Tablas VI a IX de las páginas 144-155.

B) PARTE EXPERIMENTAL

ORIGEN COMERCIAL DE LOS PRODUCTOS Y METODOS GENERALES

Todos los productos comerciales utilizados en la realización de esta parte del trabajo, que corresponde a la síntesis de N-halogenoacetil-arilalquilaminas, son de la casa Fluka AG. Buchs SG.

Para cromatografía en capa fina, se ha utilizado sílicagel GF₂₅₄ de la casa B. Merck. Las placas se prepararon con una papilla formada con 25 gramos de sílicagel GF₂₅₄ y 55 ml de agua, extendiéndose a través de un preparador de placas Shaga y dejándolas secar primero a temperatura ambiente y activándolas después en estufa a 80°C. Para la cromatografía preparativa en placas y en columna utilizamos sílicagel PF₂₅₄ y sílicagel 0,05-0,2 mm, respectivamente, ambas también de la casa Merck. El tiempo de activación para todas las placas fue de 30 minutos. El revelado de las placas se llevó a cabo con una lámpara de luz ultravioleta de longitudes de onda 254 y 350 mμ y en el caso de las aminas además con ninhidrina.

Los espectros IR se registraron disolviendo muestras totalmente secas en nujol, utilizando un aparato 137-E de la casa Perkin-Elmer. Las frecuencias se dan en cm⁻¹.

Los espectros de RNM se registraron en un aparato R-10, a 60 Mc, de la casa Perkin-Elmer, con tetrametilsilano como patrón interno. Las muestras de 50-60 mg en 0,5 ml. de disolvente se utilizaron bien secas.

Para la determinación de los puntos de fusión de los productos preparados se utilizó un aparato Gallenkamp. Previamente las muestra se secaron en vacío sobre pentóxido de fósforo a temperaturas convenientes para no alcanzar la fusión.

PREPARACION DE ARILALQUILAMINAS

1) 3-metoxi-4-hidroxianilina

Ha sido preparada según el método dado por Jacobs y Heidelbergger(31) de la manera siguiente:

a) p-Sulfofenilazoguaiacol:

10 gramos de ácido sulfanílico seco, se disuelven en 60 cc. de NaOH N y se diluye la disolución con hielo y agua hasta 250 cc. Se añaden 4,32 gramos de nitrito sódico; la disolución se colorea y a continuación se añaden lentamente 34,6 cc de ClH 1:1. La mezcla de reacción debe mantenerse en todo momento a una temperatura de 0°C a 5°C. La sal de diazonio formada, de color amarillo claro, se añade lentamente sobre una disolución de 7,4 gramos de guaiacol en 240 cc de sosa N conteniendo trozos de hielo.

Después de 1 hora de agitación, se añaden lentamente y sin dejar de agitar 131 cc de ClH concentrado. Por estancia en nevera precipita el p-sulfofenilazoguaiacol. Se filtra el producto y se lava con ClH 1:1 y acetona, quedando suficientemente puro para la siguiente reacción.

b) 3-metoxi-4-hidroxianilina:

24 gramos de p-sulfofenilazoguaiacol seco, se disuelven en 240 cc de amoníaco al 10% y se pasa a través de la disolución una corriente fuerte de SH₂ hasta saturación. La disolución se calienta y el color de ésta cambia de rojo a amarillo separándose cristales de 5-aminoguaiacol. Se recogen los cristales por filtración, se lavan con agua y se secan

al aire. Cristaliza de agua, como placas de color pardo de p.f. 178-179°C. Rendimiento 79%. Descrito p.f. 177-80°C. Rendimiento 75%.

Análisis para $C_7H_9O_2N$	Hallado;	C:60,63%	H:6,59%	N:10,34%
	Teórico;	C:60,43%	H:6,47%	N:10,07%

Espectro IR: Ver compuesto nº 1 Tabla II Pág 124

Espectro RNM: Ver " nº 1 " VII " 141

2) 3-Metoxi-4-hidroxi-bencilaminahidrocloruro

Ha sido preparada por reducción de la 3-metoxi-4-hidroxi-benzaldoxima con sodio y alcohol.

a) 3-metoxi-4-hidroxi-benzaldoxima

Según método dado por Nelson (50) para preparar veratraldoximas.

En un matraz de fondo redondo, se disuelven 0,5 moles de vainillina en 200 cc de alcohol moderadamente caliente y se añaden 0,6 moles de clorhidrato de hidroxilamina en 50 cc de agua. Se mezclan a fondo las dos disoluciones. A esta mezcla se añaden 0,75 moles de NaOH en 40 cc de agua, dejándolo estar a temperatura ambiente durante dos horas y media. Después de este tiempo se añaden 250 gramos de hielo picado y se satura la disolución con CO_2 .

La aldoxima se separa en forma de aceite, el cual solidifica tratándolo con hielo picado e induciendo la cristalización rascando las paredes del matraz. La oxima cristalina se filtra a la trompa, se lava bien con agua y se seca al aire. Cristales blancos de p.f. 122°C. Recristaliza de alcohol-agua. Rendimiento 90%. Descrito p.f. 122°C. Rendimiento 90%.

Análisis para $C_8H_9O_3N$	Hallado;	C:57,79%	H:5,62%	N:8,22%
	Teórico;	C:57,49%	H:5,38%	N:8,30%

Espectro IR: Ver compuesto nº 1 Tabla I Pág 119

b) 3-Metoxi-4-hidroxibencilamina

Una disolución de 2 moles de 3-metoxi-4-hidroxibenzaldoxima en 4 litros de alcohol absoluto se calienta en un matraz de fondo redondo sobre baño de vapor. El matraz lleva un condensador de reflujo de tipo Liebig. Tan pronto como el alcohol empieza a hervir se corta el vapor y se mantiene la temperatura del alcohol introduciendo tiras de sodio a través del condensador. La cantidad total de sodio usada es de 500 gramos y debe añadirse lo más rápidamente posible, evitando pérdidas de alcohol. Tan pronto como el sodio se disuelve, se enfria el contenido del matraz y se diluye con 5 litros de agua. Se evapora el alcohol y la disolución acuosa se extrae con éter para recuperar la oxima inalterada. A esta disolución, libre de oxima, se añade ClH concentrado, gota a gota, hasta pH ácido. Hemos observado que por ser este proceso fuertemente exotérmico, debe mantenerse el matraz en baño de hielo y regular la velocidad de goteo para evitar una elevación de temperatura. Esta elevación de temperatura disminuye considerablemente el rendimiento.

La disolución acuosa del clorhidrato de la amina se evapora a sequedad bajo presión reducida y el residuo se extrae con alcohol absoluto a ebullición. Se separa el cloruro sódico por filtración y al concentrar la disolución alcohólica cristaliza el clorhidrato como polvo amarillento de p.f. 220°C. Recristaliza de alcohol. Rendimiento 61%. Descrito p.f. 222°C. Rendimiento 58%.

Análisis para $C_8H_{12}O_2NC1$ Hallado; C: 50,63% H: 6,49% N: 7,13%
Teórico; C: 50,66% H: 6,37% N: 7,30%

Espectro IR: Ver compuesto nº 2 Tabla II Pág 124

Espectro RNM: " " nº 2 " VII " 141

3) 3-Metoxi-4-hidroxi- β -feniletilamina-hidrocloruro

Ha sido preparada según el método dado por Burger y Ramirez(37) por reducción del β -nitroestireno correspondiente.

a) 3-Metoxi-4-hidroxi- β -nitroestireno

Una mezcla de 1,5 gramos de hidrocloruro de metilamina, 2,2 gramos de carbonato sódico y 8 ml de metanol se agita bien, se filtra y se añade el filtrado sobre una disolución de 50 gramos de vainillina y 19,5 cc de nitrometano en 137 cc de metanol.

La disolución se deja a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 72 horas y el β -nitroestireno, que cristaliza, se filtra y lava con metanol frío. Agujas amarillas de p.f. 165-166°C. Rendimiento 80%. Descrito p.f. 165-166°C. Rendimiento 75%.

<u>Análisis</u> para $C_9H_9O_4N$	Hallado; C:55,13%	H:4,67%	N:6,96%
	Teórico; C:55,38%	H:4,61%	N:7,17%

b) 3-Metoxi-4-hidroxi- β -feniletilamina-hidrocloruro

12 gramos del β -nitroestireno preparado anteriormente se reducen con 12 gramos de $LiAlH_4$ por la técnica de extracción con Soxhlet. La reducción dura 72 horas. A continuación se enfria el matraz en baño de hielo y se añaden gota a gota y con fuerte agitación 650 cc de SO_4H_2 1,5 N. Aparecen dos capas claras; la fase acuosa se separa y se ajusta a pH 6 con carbonato de litio sólido. El hidróxido de aluminio que precipita se separa por centrifugación.

Al sobrenadante claro y caliente (70°C) se le añaden 15 gramos de ácido pícrico, disuelto en la menor cantidad

posible de etanol caliente. Se deja estar toda la noche a temperatura ambiente y cristaliza el picrato en forma de agujas anaranjadas de p.f. 195-196°C. Recristaliza de alcohol. Rendimiento 70%. Descrito p.f. 194-195°C. Rendimiento 75%.

Análisis para $C_{15}H_{16}O_9N_4$ Hallado; C: 45,50% H: 4,27% N: 13,80%
Teórico; C: 45,45% H: 4,04% N: 14,04%

A 16 gramos del picrato en 10 cc de agua hirviendo, se añaden 72 cc de ClH concentrado. El ácido pícrico que precipita al enfriar se separa por filtración y el filtrado se lava primero con nitrobenzono y después con éter. La disolución acuosa se evapora a sequedad bajo presión reducida y aparecen cristales blancos de hidrocloreto de 3-metoxi-4-hidroxi- β -feniletilamina. Recristalizado de alcohol-éter, se forman cristales blancos de p.f. 212-213°C. Rendimiento 60%. Descrito p.f. 213-214°C. Rendimiento 65%.

Análisis para $C_9H_{14}O_2NC1$ Hallado; C: 52,83% H: 6,98% N: 6,60%
Teórico; C: 53,08% H: 6,87% N: 6,87%

Espectro IR: Ver compuesto nº 3 Tabla II Pág 125

Espectro RNM: " " nº 3 " VII " 141

4) 3-Metoxi-4-hidroxi- γ -fenilpropilamina-hidrocloreto

Ha sido preparada según método descrito para 3,4-dimetoxi- γ -fenilpropilamina por Jirskorsky y M. Protiva (39).

a) Monoamida del ácido malónico

A una disolución de un mol de dietilmalonato (160 gr.) en 450 cc de metanol, se añadió con agitación 28 cc de hidróxido potásico al 20% en metanol (1 mol).

lo que intentamos mejorarlo variando las condiciones de reacción. Se logra un resultado satisfactorio sustituyendo la calefacción por la larga permanencia a temperatura ambiente. Con esto conseguimos elevar el rendimiento al 60%.

Análisis para $C_{10}H_{11}O_3N$ Hallado; C:62,08% H:5,78% N:7,01%
Teórico; C:62,17% H:5,69% N:7,25%

Espectro IR: Ver compuesto nº 9 Tabla I Pág 121

14 gramos del producto preparado anteriormente se disuelven en dioxano y se hidrogenan utilizando C/Pd como catalizador. Rendimiento cuantitativo. Se aislan cristales blancos de p.f. 102-103°C. El producto es lo suficientemente puro para seguir la síntesis.

12 gramos de este producto se sometieron a reducción con 12 gramos de $LiAlH_4$ por el método de extracción con Soxhlet. Después de 90 horas, se enfria el matraz en baño de hielo y se añade gota a gota y con fuerte agitación SO_4H_2 1,5 N hasta que aparecen dos fases claras. Separamos la fase acuosa, la cual se ajusta a pH 6 con carbonato de litio sólido. El hidróxido de aluminio que precipita se separa por filtración. Al filtrado claro y caliente se añaden 14 gramos de ácido pícrico disueltos en la menor cantidad posible de etanol caliente. Dejando la disolución a temperatura ambiente durante toda la noche, cristaliza el picrato en forma de preciosas agujas rojas.

10 gramos del picrato se suspenden en 10 cc de agua hirviendo y se añaden 45 cc de ClH concentrado. Al enfriar precipita el ácido pícrico, el cual se separa por filtración. El filtrado se extrae primero con nitrobenzono y después con éter. La disolución acuosa se evapora a sequedad en vacío, quedando como residuo cristales blancos de 3-metoxi-4-

hidroxi- γ -fenilpropilamina. Cristalizado de alcohol-éter alcanza un p.f. de 139-140°C. Rendimiento 75%. Descrito (40) p.f. 144-145°C. Rendimiento 30%.

Análisis para $C_{10}H_{16}O_2NCl$ Hallado; C:55,27% H:7,34% N:6,18%
Teórico; C:55,17% H:7,35% N:6,43%

Espectro IR: Ver compuesto nº 4 Tabla II Pág 125

Espectro RNM: " " nº 4 " VII " 142

5) 4-Hidroxi-bencilamina-hidrocloruro

Ha sido preparada por reducción de la 4-hidroxi-benzaldoxima con sodio y alcohol, siguiendo el mismo método descrito por nosotros para preparar 3-metoxi-4-hidroxibencilamina (ver pág 46).

a) 4-Hidroxi-benzaldoxima

Se disuelven 4,4 gramos (0,12 moles) de p-hidroxi-benzaldehído en 11,5 cc de alcohol moderadamente caliente y se añaden 4,1 gramos (0,18 moles) de hidrocloruro de hidroxilamina en 5,2 cc de agua. Se mezclan a fondo las dos disoluciones. A continuación se añaden 2,2 gramos de NaOH en 2,7 cc de agua, dejándolo a temperatura ambiente durante dos horas y media. Después de este tiempo, se añaden 19 gramos de hielo picado y se satura la disolución con CO_2 . El líquido color amarillo rojizo se vuelve claro y precipita directamente la oxima. Cristalizada de agua alcanza un p.f. de 72-73°C. Rendimiento 87%.

Análisis para $C_7H_7O_2N$ Hallado; C:61,28% H:4,93% N:10,51%
Teórico; C:61,31% H:5,10% N:10,21%

Espectro IR: Ver compuesto nº 3 Tabla I Pág 119

b) 4-Hidroxi-bencilamina hidrocioruro

Una disolución de 9,5 gramos de 4-hidroxibenzaldoxi-
ma en 100 cc de alcohol absoluto, se calientan a ebullición
en un matraz de fondo redondo sobre baño de vapor. El matraz
lleva adaptado un condensador de reflujo tipo Liebig. Tan
pronto como el alcohol empieza a hervir se corta el vapor
y se mantiene la temperatura introduciendo tiras de sodio
a través del condensador. La cantidad total de sodio usada
es de 10 gramos y debe añadirse lo más rápidamente posible
evitando pérdidas de alcohol. Tan pronto como el sodio se
disuelve, se enfria el contenido del matraz y se diluye con
medio litro de agua. La disolución acuosa se extrae con éter
para recuperar la oxima inalterada. A esta disolución libre
de oxima se añade ClH concentrado hasta pH ácido, manteniendo
el matraz en baño de hielo para evitar el calentamiento de
la mezcla, lo cual conduce a rendimientos bajos.

La disolución acuosa del clorhidrato de la amina se
evapora a sequedad bajo presión reducida y el residuo se
extrae con alcohol absoluto a ebullición. Se separa el clo-
ruro sódico por filtración y al evaporar el alcohol apare-
cen cristales blancos de hidrocioruro de amina. Cristaliza
de alcohol-éter en forma de polvo blanco de p.f. 180-181°C
Rendimiento 63%. Descrito (51) p.f. 180°C. Rendimiento 60%.

Análisis para $C_7H_{10}ONCl$ Hallado; C: 52,60% H: 6,13% N: 8,65%
Teórico; C: 52,66% H: 6,26% N: 8,77%

Espectro IR: Ver compuesto nº 5 Tabla II Pág 124

Espectro RNM; " " nº 5 " VII " 142

6) 4-Hidroxi- χ -fenilpropilamina

Ha sido preparada según método descrito en pág 49

para 3-metoxi-4-hidroxi- γ -fenilpropilamina.

a) p-Benciloxicinamamida

16,8 gramos de p-benciloxibenzaldehido y 22,6 gramos de monoamida del ácido malónico (descrita en pág 49), disueltos en 48 cc de piridina y en presencia de 1,6 cc de piperidina se calientan a reflujo durante dos horas. Al enfriar precipita la amida. Cristalizada de alcohol se forman cristales blancos de p.f. 125°C . Rendimiento 70%.

Análisis para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}$ Hallado; C:75,28% H:6,51% N:5,25%
Teórico; C:75,29% H:6,66% N:5,49%

b) p-Hidroxicinamamida

7 gramos de la amida preparada anteriormente se disuelven en dioxano y se reducen por hidrogenación catalítica utilizando C/Pd como catalizador. Cristalizado de alcohol aparecen cristales blancos de p.f. 190°C . Rendimiento cuantitativo. El producto es lo suficientemente puro para pasar a la siguiente reacción.

Espectro IR: Ver compuesto nº 8 Tabla I Pág 121

●) p-Hidroxi- γ -fenilpropilamina

7,1 gramos del producto hidrogenado catalíticamente se someten a una nueva reducción con 7,1 gramos de LiAlH_4 por el método de extracción con Soxhlet. Después de 100 horas se enfria el matraz en baño de hielo y con agitación fuerte se añade SO_4H_2 1,5 N hasta que se separan dos capas claras. Se separa la fase acuosa y se ajusta a pH 6 con carbonato de litio sólido, la cual se calienta a ebullición, sepa-

rando por filtración el hidróxido de aluminio formado. Al filtrado claro y caliente se añaden 9,7 gramos de ácido picrico disueltos en la menor cantidad posible de etanol caliente. Después de permanecer una noche a temperatura ambiente cristaliza el picrato en forma de agujas anaranjadas.

7 gramos del picrato se suspenden en 7 cc de agua hirviendo y se añaden 31,5 cc de ClH concentrado. El ácido picrico que precipita al enfriar se separa por filtración y el filtrado se extrae primero con nitrobenzono y después con éter. Evaporando la disolución acuosa a sequedad aparecen cristales blancos de hidrocloruro de p-hidroxi- γ -fenilpropilamina. Recristalizado de alcohol-éter alcanza un p.f. de 79-80°C. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_9H_{14}ONCl$ Hallado; C:57,71% H:7,43% N:7,65%
Teórico; C:57,63% H:7,47% N:7,47%

Espectro IR: Ver compuesto nº 6 Tabla II Pág 124

Espectro RNM: " " nº 6 " VII " 142

7) 3,4-Dihidroxianilina

8,5 gramos de 3-metoxi-4-hidroxianilina (0,01 moles) (ver pág 45) se disuelven en 42 cc de BrH al 48%, recientemente destilado, y se calienta a reflujo durante 8 horas. Al concentrar la disolución acuosa bajo presión reducida, cristaliza el hidrobromuro de 3,4-dihidroxianilina. Cristalizado de alcohol-éter se forman unas escamas grises de p.f. 250°C. Rendimiento 61%. Descrito (31) p.f. 250°C. Rendimiento 60%.

Análisis para $C_6H_8O_2NBr$ Hallado; C:35,01% H:3,86% N:7,05%
Teórico; C:34,95% H:3,88% N:6,79%

Espectro IR: Ver compuesto nº 7 Tabla II Pág 125

Espectro RNM: Ver compuesto nº 7 Tabla VII Pág 143

8) 3,4-Dihidroxibencilamina

A partir de 8 gramos de 3-metoxi-4-hidroxibencilamina (ver pág 46) y 60 cc de BrH siguiendo el método anterior descrito para 3,4-dihidroxianilina. Cristalizado de metanol-éter se forma un polvo pardo de p.f. 180°C (descomposición). Rendimiento 59%. Descrito (50) p.f. 182°C. Rendimiento 50%.

Análisis para $C_7H_{10}O_2NBr$ Hallado; C: 38,04% H: 4,33% N: 6,48%
Teórico; C: 38,24% H: 4,54% N: 6,79%

Espectro IR: Ver compuesto nº 8 Tabla II Pág 126

Espectro RNM: " " nº 8 " VII " 143

9) 3,4-Dihidroxi-γ-fenilpropilamina

A partir de 7 gramos de 3-metoxi-4-hidroxi-γ-fenilpropilamina (ver pág 49) y 40 cc de BrH siguiendo el método descrito para 3,4-dihidroxianilina. Cristales blancos que se colorean con el tiempo. Cristalizado de alcohol-éter alcanza un p.f. de 153°C. Rendimiento 62%.

Análisis para $C_9H_{14}O_2NBr$ Hallado; C: 43,32% H: 5,54% N: 5,79%
Teórico; C: 43,54% H: 5,64% N: 5,64%

Espectro IR: Ver compuesto nº 9 Tabla II Pág 126

Espectro RNM: " " nº 9 " VII " 143

PREPARACION DE N-ACETILARILALQUILAMINAS

Métodos generales de preparación

Método I.-Se disuelven dos moles de la correspondiente amina en un volumen tres veces superior de benceno seco, se enfria la disolución en baño de hielo, y se añade, con agitación, un mol de cloruro de acetilo. Una vez terminada la adición del cloruro de ácido, se retira el baño de hielo continuando la agitación una hora más para completar la reacción. Transcurrido este tiempo se vierte sobre agua y se separa la fase bencénica mediante un embudo de decantación. Se lava el extracto varias veces con agua y a continuación se evapora a sequedad, quedando como residuo un aceite que cuaja al enfriar. Los rendimientos oscilan entre el 85% y el 90%.

Método II.-Describimos previamente la preparación del acetato de p-nitrofenilo ya que es utilizado en la síntesis de estos compuestos.

a) Acetato de p-nitrofenilo

A una disolución de 1,4 gramos de ácido acético en acetato de etilo, se añade p-nitrofenol en 20% en exceso (4 gramos). A continuación se añade la cantidad calculada de dicitclohexilcarbodiimida (3,4 gramos) a 0°C. Se mantiene a esta temperatura la mezcla durante media hora y a continuación se abandona a temperatura ambiente y se deja estar una hora más. La dicitclohexilurea que precipita se separa por filtración, evaporando a continuación el filtrado a sequedad. El residuo que se separa cristalizado de alcohol alcanza un p.f. de 96°C. Rendimiento 95%. Descrito (52) p.f. 96°C Rendimiento 90%.

Análisis para $C_8H_7O_4N$ Hallado; C:53,09% H:4,16% N:7,72%
Teórico; C:53,03% H:3,86% N:7,70%

Espectro IR: Ver compuesto nº 4 Tabla I Pág 119

b) N-Acetil-arilalquilaminas

1 mol del hidrocioruro de la amina correspondiente, se disuelve en dimetilformamida (DMF), añadiendo a continuación 1 mol de trietilamina y 1 mol de acetato de p-nitrofenilo. Se abandona la mezcla a temperatura ambiente durante 48 horas, filtrando al cabo de este tiempo el hidrocioruro de hidroxilamina formado. El filtrado se evapora a sequedad en vacío y el residuo, disuelto en alcohol, se purifica por cromatografía preparativa en placas de gel de sílice, utilizando como disolvente de desarrollo éter sulfúrico. Todos los productos aislados por cromatografía preparativa han sido cristalizados posteriormente. Los rendimientos son del orden del 70%.

Utilizando alguno de estos métodos (I y II) hemos obtenido las siguientes N-acetil-arilalquilaminas.

1) N-Acetil-anilina. Acetanilida:

Preparada según método (I) a partir de 1 gramo de anilina y 0,4 gramos de cloruro de acetilo. Cristales blancos de p.f. $114^{\circ}C$. Cristaliza de agua. Rendimiento 95%. Descrito (53) p.f. $114^{\circ}C$; rendimiento 95%.

Análisis para C_8H_9ON Hallado; C:70,83% H:6,83% N:10,12%
Teórico; C:71,11% H:6,66% N:10,37%

Espectro IR: Ver compuesto nº 1 Tabla III Pág 127

Espectro RNM: " " nº 1 " VIII " 144

2) N-Acetil-bencilamina

Preparada según método (I) por acilación de 1 gramo de bencilamina con 0,35 gramos de cloruro de acetilo. Cristales blancos de p.f. 60-61°C. Cristaliza de agua. Rendimiento 80%. Descrito (54) p.f. 60-61°C. Rendimiento 75%.

Análisis para $C_9H_{11}ON$ Hallado; C:72,75% H:7,42% N:9,21%
Teórico; C:72,48% H:7,38% N:9,46%

Espectro IR: Ver compuesto nº 2 Tabla III Pág 127

Espectro RNM: " " nº 2 " VIII " 144

3) N-Acetil-β-feniletilamina

Preparada según método (I) a partir de 1 gramo de β-feniletilamina y 0,32 gramos de cloruro de acetilo. Cristales blancos de p.f. 54-55°C. Cristaliza de agua. Rendimiento 85%. Descrito (55) p.f. 42-44°C. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_{10}H_{13}ON$ Hallado; C:73,76% H:7,61% N:8,76%

Espectro IR: Ver compuesto nº 3 Tabla III Pág 127

Espectro RNM: " " nº 3 " VIII " 144

4) N-Acetil-γ-fenilpropilamina

Preparada según método (I) por acilación de 1 gramo de γ-fenilpropilamina con 0,29 gramos de cloruro de acetilo. Se aísla un líquido siruposo que no cristaliza. Se purifica por cromatografía preparativa en placas de gel de sílice, utilizando éter como disolvente de desarrollo. El aceite que aislamos por cromatografía no cristaliza pero en capa fina presenta una sola mancha. Rendimiento 84%.

Análisis para $C_{11}H_{15}ON$ Hallado; C:74,47% H:8,39% N:7,73%
Teórico; C:74,57% H:8,47% N:7,90%

Espectro IR: Ver compuesto nº 4 Tabla III Pág 127

Espectro RNM: " " nº 4 " VIII " 144

5) N-Acetil-4-hidroxianilina

Preparada según método (II) a partir de 1 gramo de p-aminofenol y 1,5 gramos de acetato de p-nitofenilo. Cristales pardos de p.f. 168°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 75%.

Análisis para C_8H_9ON Hallado; C:63,81% H:6,07% N:9,00%
Teórico; C:63,57% H:5,96% N:9,27%

Espectro IR: Ver compuesto nº 5 Tabla III Pág 128

Espectro RNM: " " nº 5 " VIII " 145

6) N-Acetil-4-hidroxibencilamina

Preparada según método (II) a partir de 0,35 gramos de hidrocloreuro de 4-hidroxibencilamina, 0,4 gramos de acetato de p-nitrofenol y 0,22 gramos de trietilamina. Cristaliza de agua. Cristales blancos de p.f. 114-115°C. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_9H_{11}O_2N$ Hallado; C:65,70% H:6,88% N:8,20%
Teórico; C:65,44% H:6,66% N:8,48%

Espectro IR: Ver compuesto nº 6 Tabla III Pág 128

Espectro RNM: " " nº 6 " VIII " 145

7) N-Acetil-4-hidroxi- β -feniletilamina

Preparada según el método (II) a partir de 1 gramo

de hidrocloreuro de tiramina, 1,4 gramos de acetato de p-nitrofenilo y 0,5 gramos de trietilamina. Cristales blancos de p.f. 125-126°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 64%.

Análisis para $C_{11}H_{13}O_2N$ Hallado; C:66,90% H:7,55% N:8,04%
Teórico; C:67,03% H:7,26% N:7,82%

Espectro IR: Ver compuesto nº 7 Tabla III Pág 128

Espectro RNM: " " nº 7 " VIII " 145

8) N-Acetil-3-metoxi-4-hidroxianilina

Preparada según método (II) a partir de 0,7 gramos de 3-metoxi-4-hidroxianilina (ver pág 45) y 0,9 gramos de acetato de p-nitrofenol. Cristales blancos de p.f. 54-55°C. Cristaliza de benceno. Rendimiento 70%. Descrito (31) p.f. 111-113°C. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_9H_{11}O_3N$ Hallado; C:59,39% H:6,37% N:8,02%
Teórico; C:59,66% H:6,07% N:7,73%

Espectro IR: Ver compuesto nº 8 Tabla III Pág 129

Espectro RNM: " " nº 8 " VIII " 146

9) N-Acetil-3-metoxi-4-hidroxibencilamina

Preparada según método (II) a partir de 1,04 gramos de hidrocloreuro de 3-metoxi-4-hidroxibencilamina, 1 gramo de acetato de p-nitrofenilo y 0,5 gramos de trietilamina. Cristales blancos de p.f. 91-92°C. Cristaliza de benceno. Rendimiento 70%. Descrito (36) p.f. 84-85°C. Rendimiento 70%

Análisis para $C_{10}H_{13}O_3N$ Hallado; C:61,29% H:6,80% N:7,10%
Teórico; C:63,15% H:7,17% N:6,69%

Espectro IR: Ver compuesto nº 9 Tabla III Pág 129

Espectro RNM: " " nº 9 " VIII " 146

10) N-Acetil-3-metoxi-4-hidroxi-β-feniletilamina

Preparada según método (II) a partir de 0,5 gramos de hidrocloreuro de 3-metoxi-4-hidroxi-β-feniletilamina (ver pág 48). 0,5 gramos de acetato de p-nitrofenilo y 0,25 gramos de trietilamina. Se aísla líquido siruposo que no cristaliza. Rendimiento 65%.

Análisis para $C_{11}H_{15}O_3N$ Hallado; C:62,82% H:7,22% N:7,00%
Teórico; C:63,15% H:7,17% N:6,69%

Espectro IR: Ver compuesto nº 10 Tabla III Pág 129

PREPARACION DE N-CLOROACETIL-ARILALQUILAMINAS

Describimos a continuación los métodos generales de preparación utilizados en la síntesis de estos compuestos.

Método I.-

a) Preparación de cloruro de cloroacetilo(56)

A un matraz de fondo redondo añadimos 0,25 moles de ácido cloroacético(100 gramos) y 0,375 moles de cloruro de benzoilo. Adaptamos al matraz un sistema de destilación y calentamos la mezcla en baño de silicona. La fracción que destila a 95°C se recoge para destilarla de nuevo. Este cloruro de cloroacetilo más puro destila a 98°C.

b) N-Cloroacetil-arilalquilaminas

En un erlemmeyer se pesan dos moles de amina y se disuelven en un volumen tres veces superior de éter seco, enfriando la disolución en baño de hielo. Una vez que la disolución de la amina ha alcanzado la temperatura de 0°C, se añade go-

ta a gota y con agitación 1 mol de cloruro de cloroacetilo. Terminada la adición del cloruro de ácido, se retira el baño de hielo, continuando la agitación una hora más para que se complete la reacción. Se forma un precipitado blanco de hidrocioruro de amina. Después de este tiempo, se vierte el contenido del matraz en agua fría y se separa la fase etérea en un embudo de decantación, lavándola tres veces con agua para eliminar el hidrocioruro de amina formado. Una vez bien lavada con agua la fase etérea se evapora a presión reducida, quedando como residuo un aceite que cuaja al enfriar. Los rendimientos oscilan entre el 80% y el 95%.

Método II.-

a) Cloroacetato de p-nitrofenilo

A una disolución de 1 gramo de ácido cloroacético en acetato de etilo, se añade p-nitrofenol en 20% en exceso (2 gramos). A continuación se añade la cantidad calculada de dicitclohexilcarbodiimida (2,2 gramos) a 0°C. Se mantiene a esta temperatura la mezcla durante media hora y a continuación se abandona a temperatura ambiente y se deja estar una hora más. La dicitclohexilurea que precipita se separa por filtración, evaporando a continuación el filtrado a sequedad. El residuo que se separa cristalizado de alcohol alcanza un p.f. de 93-94°C. Rendimiento 95%. Descrito (52) p.f. 93-94°C. Rendimiento 90%.

Análisis para $C_8H_6O_4NCl$ Hallado; C:44,43% H:2,75% N:6,41%
Teórico; C:44,55% H:2,78% N:6,49%

Espectro IR: Ver compuesto nº 5 Tabla I Pág 120

b) N-Cloroacetil-arilalquilaminas

Siguiendo el mismo método descrito en pág 58 para N-acetil-arilalquilaminas utilizando cloroacetato de p-nitrofenilo en lugar de acetato de p-nitrofenilo.

Método III.-Este método solo es válido para preparar la 3,4-dihidroxi-N-cloroacetilbencilamina. En esencia consiste en hacer reaccionar N-hidroximetil-cloroacetamida y pirocatecol en medio ácido(47)

a) N-Hidroximetil-cloroacetamida

A 2 gramos de monocloroacetamida se añaden 2 gramos de formaldehído al 40% y 0,5 gramos de ClH concentrado. Se digiere en baño de agua hasta disolución total y se deja enfriar. Después de 4 horas, se añade acetato sódico hasta neutralización del ácido mineral, se evaporará en vacío a sequedad y queda un residuo siruposo que se extrae con acetona. Concentrando el extracto se obtiene la N-hidroximetil-cloroacetamida en forma de aceite espeso el cual solidifica poco a poco. Cristaliza de acetona como prismas incoloros de p.f. 87-88°C. Rendimiento 83%

<u>Análisis</u> para $C_3H_6O_2NCl$	Hallado;	C:29,05%	H:4,80%	N:11,27%
	Teórico;	C:29,14%	H:4,85%	N:11,33%

Espectro IR: Ver compuesto nº 10 Tabla I Pág 122

b) N-Cloroacetil-3,4-dihidroxibencilamina

Sobre una disolución de 26 gramos de pirocatecol y 30 gramos de N-hidroximetil-cloroacetamida en 100 cc de agua se añaden, enfriando, 10 cc de ClH concentrado y se abandona la disolución. Al primero o segundo día empiezan a separarse los productos de reacción, los cuales se separan por filtración a los cuatro o cinco días. Por evaporación del filtrado a vacío se obtiene una cantidad adicional de producto. Cristales blancos de p.f. 144-145°C. Cristaliza de agua. Rendimiento 60%.

El producto así obtenido resulta ser idéntico al pre-

parado por el método (IV) que describimos a continuación.

Método.IV.- 0,02 moles de hidrocioruro o-hidrobromuro de la amina correspondiente, se disuelven en disolución acuosa saturada de borato sódico en agua, añadiendo un exceso de disolución de borato para que el medio tenga un pH fuertemente alcalino. Una vez disuelto el hidrocioruro, enfriamos en baño de hielo y añadimos gota a gota con agitación cloruro de cloroacetilo (0,01 mol). Una vez que se ha añadido el cloruro de cloroacetilo, se continúa agitando una hora más para que se complete la reacción y a continuación se añade ClH concentrado hasta viraje del rojo congo. Seguidamente evaporamos la disolución a sequedad y extraemos el residuo con alcohol. Para aislar la amida de esta disolución alcohólica, se utilizó la cromatografía preparativa en placas de gel de sílice, con éter como disolvente de desarrollo. Los productos una vez puros se pueden cristalizar, aunque algunos de ellos lo hacen con bastante dificultad.

Utilizando alguno de estos métodos (I a IV) se han obtenido las siguientes N-cloroacetil-arilalquilaminas:

11) N-Cloroacetil-anilina

Preparada según método (I) a partir de 1 gramo de anilina y 0,4 gramos de cloruro de cloroacetilo. Cristales blancos de aspecto escamoso de p.f. 134-135°C. Cristaliza de agua. Rendimiento 95%. Descrito (53) p.f. 134-135°C. Rendimiento 90%.

<u>Análisis</u> para C_8H_8ONCl	Hallado;	C:56,43%	H:4,67%	N:7,97%
	Teórico;	C:56,63%	H:4,73%	N:8,26%

Espectró IR: Ver compuesto nº 11 Tabla IV Pág 130

Espectro RNM: " " nº 11 " IX " 147

12) N-Cloroacetil-bencilamina

Preparada según método (I) por acilación de 5 gramos de bencilamina con 1,5 gramos de cloruro de cloroacetilo. Cristaliza de agua en forma de cristales blancos de p.f.94-95°C. Rendimiento 95%. Descrito(54) p.f 93,5-94,5. Rendimiento 90%.

Análisis para $C_9H_{10}ONCl$ Hallado; C:59,08% H:5,68% N:7,84%
Teórico; C:58,89% H:5,44% N:7,62%

Espectro IR: Ver compuesto nº 12 Tabla IV Pág 130
Espectro RNM: " " nº 12 " IX " 147

13) N-Cloroacetil-β-feniletilamina

Preparada según método (I) a partir de 4 gramos de β-feniletilamina y 1,86 gramos de cloruro de cloroacetilo. Cristales blancos de p.f.66-67°C. Cristaliza de agua. Rendimiento 80%. Descrito(55) p.f.67°C. Rendimiento 85%.

Análisis para $C_{10}H_{12}ONCl$ Hallado; C:61,20% H:6,12% N:7,08%
Teórico; C:61,18% H:6,35% N:7,35%

Espectro IR: Ver compuesto nº 13 Tabla IV Pág 130
Espectro RNM: " " nº 13 " IX " 147

14) N-Cloroacetil-γ-fenilpropilamina

Preparada según método (I) a partir de 5 gramos de γ-fenilpropilamina y 2,09 gramos de cloruro de cloroacetilo. Cristaliza de alcohol-agua. Agujas blancas de p.f.58-59°C. Rendimiento 95%.

Análisis para $C_{11}H_{14}ONCl$ Hallado; C:62,41% H:6,76% N:6,91%
Teórico; C:62,71% H:6,63% N:6,63%

Espectro IR: Ver compuesto nº 14 Tabla IV Pág 130

Espectro RNM: Ver compuesto nº 14 Tabla IX Pág 148

15) N-Cloroacetil-4-hidroxianilina

Preparada según método (II) a partir de 1 gramo de p-aminofenol y 2 gramos de cloroacetato de p-nitrofenilo. Cristales blancos de p.f.139-140°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 80%. Descrito p.f.139°C. Rendimiento 75%(56)

Análisis para $C_8H_8O_2NC1$ Hallado; C:52,02% H:4,44% N:7,47%
Teórico; C:51,75% H:4,31% N:7,54%

Espectro IR: Ver compuesto nº 15 Tabla IV Pág 131

Espectro RNM: " " nº 15 " IX " 148

16) N-Cloroacetil-4-hidroxibencilamina

Preparada según método (II) a partir de 1 gramo de hidrocloreuro de 4-hidroxibencilamina, 1,3 gramos de cloroacetato de p-nitrofenilo y 0,5 gramos de trietilamina. Agujas blancas de p.f.123-124°C. Cristaliza de agua. Rendimiento 75%. Descrito(57)p.f.123-124°C. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_9H_{10}O_2NC1$ Hallado; C:54,84% H:5,32% N:7,28%
Teórico; C:54,63% H:5,06% N:7,01%

Espectro IR: Ver compuesto nº 16 Tabla IV Pág 131

Espectro RNM: " " nº 16 " IX " 149

17) N-Cloroacetil-4 hidroxibencilamina

Preparada según método (II) a partir de 1 gramo de hidrocloreuro de tiramina, 1,2 gramos de cloroacetato de p-nitrofenilo y 0,5 gramos de trietilamina. Cristales blancos de p.f.108-109°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 70%. Descrito(58)p.f.108-109°C. Rendimiento 70%.

Espectro IR: Ver compuesto nº 17 Tabla IV Pág 131
Espectro RNM: " " nº 17 " IX " 149

18) N-Cloroacetil-3-metoxi-4-hidroxianilina

Preparada según método (II) a partir de 0,5 gramos de 3-metoxi-4-hidroxianilina y 0,75 gramos de cloroacetato de p-nitrofenilo. Cristales ligeramente pardos de p.f. 115-116°C. Cristaliza de benceno. Rendimiento 70%. Descrito (59) p.f. 113-114°C. Rendimiento 60%.

Análisis para $C_9H_{10}O_3NCl$ Hallado; C: 50,38% H: 4,90% N: 6,19%
Teórico; C: 50,11% H: 4,66% N: 6,49%

Espectro IR: Ver compuesto nº 18 Tabla IV Pág 132
Espectro RNM: " " nº 18 " IX " 150

19) N-Cloroacetil-3-metoxi-4-hidroxibencilamina

Preparada según método (II) a partir de 1 gramo de hidrocloreuro de vainillinamina, 1,13 gramos de acetato de p-nitrofenilo y 0,53 gramos de trietilamina. Rendimiento 75%. Descrito (50) p.f. 119-122°C. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_{10}H_{12}O_3NCl$ Hallado; C: 52,37% H: 5,19% N: 6,27%
Teórico; C: 52,28% H: 5,22% N: 6,10%

Espectro IR: Ver compuesto nº 19 Tabla IV Pág 132
Espectro RNM: " " nº 19 " IX " 150

20) N-Cloroacetil-3-metoxi-4-hidroxibencilamina

Preparada según método (II) a partir de 1,6 gramos de hidrocloreuro de 3-metoxi-4-hidroxibencilamina, 1,7 gramos de cloroacetato de p-nitrofenilo y 0,5 gramos de trietilamina. Cristales blancos de p.f. 100-101°C. Cristaliza

de alcohol-éter. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_{11}H_{14}O_3NCl$ Hallado; C:54,28% H:5,82% N:5,40%
Teórico; C:54,08% H:5,74% N:5,74%

Espectro IR: Ver compuesto nº 20 Tabla IV Pág 132

Espectro RNM: " " nº 20 " IX " 151

21) N-Cloroacetil-3-metoxi-4-hidroxi-γ-fenilpropilamina

Preparada según el método (II) a partir de 1 gramo de hidrocloreuro de 3-metoxi-4-hidroxi-γ-fenilpropilamina, 1 gramo de cloroacetato de p-nitrofenilo y 0,49 gramos de trietilamina. Cristales blancos de p.f. 54-55°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_{12}H_{16}O_3NCl$ Hallado; C:55,93% H:6,20% N:5,47%
Teórico; C:55,92% H:6,46% N:5,65%

Espectro IR: Ver compuesto nº 21 Tabla IV Pág 133

Espectro RNM: " " nº 21 " IX " 151

22) N-Cloroacetil-3,4-dihidroxianilina

Preparada según el método (IV) a partir de 3 gramos de hidrobromuro de 3,4-dihidroxianilina y 1,6 gramos de cloruro de cloroacetilo. Aislamos cristales blancos de p.f. 155-156°C. Cristaliza de agua. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_8H_8O_3NCl$ Hallado; C:47,90% H:3,99% N:7,11%
Teórico; C:47,64% H:3,97% N:6,94%

Espectro IR: Ver compuesto nº 22 Tabla IV Pág 133

Espectro RNM: " " nº 22 " IX " 152

23) N-Cloroacetil-3,4-dihidroxibencilamina

Preparada según el método (IV) a partir de 3 gramos

de hidrocioruro de 3,4-dihidroxibencilamina y 0,77 gramos de cloruro de cloroacetilo. Cristales blancos de p.f. 139-140°C. Cristaliza de agua. Rendimiento 60%.

Análisis para $C_9H_{10}O_3NCl$ Hallado; C: 50,35% H: 4,47% N: 6,74%
Teórico; C: 50,11% H: 4,64% N: 6,49%

Espectro IR: Ver compuesto nº 23 Tabla IV Pág 133

Espectro RNM: " " nº 23 " IX " 153

24) N-Cloroacetil-3,4-dihidroxi-β-feniletilamina

Preparada según el método (IV) a partir de 2 gramos de hidrocioruro de 3,4-dihidroxi-β-feniletilamina y 1,6 gramos de cloruro de cloroacetilo. Aislamos un aceite que tratado varias veces con éter seco, cristaliza. Cristales blancos de p.f. 85-86°C. Rendimiento 58%.

Análisis para $C_{10}H_{12}O_3NCl$ Hallado; C: 52,29% H: 6,36% N: 5,28%
Teórico; C: 52,28% H: 6,10% N: 5,22%

Espectro IR: Ver compuesto nº 24 Tabla IV Pág 135

Espectro RNM: " " nº 24 " IX " 153

PREPARACION DE N-IODOACETIL-ARILALQUILAMINAS

Método general.

En un matraz de fondo redondo, se disuelve 1 mol de la correspondiente N-cloroacetil-arilalquilamina en acetona seca y se añaden 5 moles de IK finamente pulverizado. Con agitación se calienta en baño de agua, a reflujo, durante 8 horas. Al cabo de este tiempo se separa por filtración la fase sólida compuesta por IK y ClK y se evapora la acetona a presión reducida. Al eliminar la acetona quedan como resi-

duos aceites amarillentos. Estos aceites pueden cristalizarse algunas veces de alcohol-agua, sin embargo otras veces es necesario purificarlos previamente por cromatografía.

25) N-Iodoacetil-anilina

A partir de 0,5 gramos de N-cloroacetil-anilina y 2,4 gramos de IK. Cristales blancos de p.f. 141-142°C. Rendimiento 90%. Descrito (53) p.f. 143-144°C. Rendimiento 80%.

Análisis para C_8H_8ONI Hallado; C: 36,51% H: 3,09% N: 5,09%
Teórico; C: 36,78% H: 3,07% N: 5,36%

Espectro IR: Ver compuesto nº 25 Tabla V Pág 134

26) N-Iodoacetil-bencilamina

A partir de 2,2 gramos de N-cloroacetil-bencilamina y 8 gramos de IK. Cristaliza de alcohol-agua. Cristales blancos de p.f. 131-132°C. Descrito (54) p.f. 131-132°C. Rendimiento 90%.

Análisis para $C_9H_{10}ONI$ Hallado; C: 39,28% H: 3,65% N: 5,10%
Teórico; C: 39,27% H: 3,63% N: 5,09%

Espectro IR: Ver compuesto nº 26 Tabla V Pág 134

27) N-Iodoacetil-β-feniletilamina

Por tratamiento de 0,8 gramos de N-cloroacetil-β-feniletilamina con 3,3 gramos de IK. Cristaliza de agua. Cristales blancos de p.f. 84-85°C. Rendimiento 90%.

Análisis para $C_{10}H_{12}ONI$ Hallado; C: 41,9% H: 4,04% N: 5,01%
Teórico; C: 41,69% H: 4,16% N: 4,80%

Espectro IR: Ver compuesto nº 27 Tabla V Pág 134

28) N-Iodoacetil- γ -fenilpropilamina

A partir de 1 gramo de N-cloroacetil- γ -fenilpropilamina y 3,9 gramos de IK. Cristaliza de alcohol-agua. Agujas blancas de p.f. 55-56°C. Rendimiento 95%.

Análisis para $C_{11}H_{14}ONI$ Hallado; C:43,89% H:4,82% N:4,88%
Teórico; C:43,89% H:4,62% N:4,62%

Espectro IR: Ver compuesto nº 28 Tabla V Pág 134

29) N-Iodoacetil-4-hidroxianilina

A partir de 0,9 gramos de N-cloroacetil-4-hidroxianilina y 3 gramos de IK. Cristales blancos que con el tiempo toman color amarillo de p.f. 153°C. Rendimiento 75%.

Análisis para $C_8H_8O_2NI$ Hallado; C:34,79% H:3,07% N:5,13%
Teórico; C:34,66% H:2,88% N:5,05%

Espectro IR: Ver compuesto nº 29 Tabla V Pág 135

30) N-Iodoacetil-4-hidroxibencilamina

Por tratamiento de 0,5 gramos de N-cloroacetil-4-hidroxibencilamina con 3,3 gramos de IK. Cristales blancos de p.f. 99-100°C. Cristaliza de agua. Rendimiento 89%.

Análisis para $C_9H_{10}O_2NI$ Hallado; C:37,38% H:3,48% N:5,04%
Teórico; C:37,11% H:3,78% N:4,81%

Espectro IR: Ver compuesto nº 30 Tabla V Pág 135

31) N-Iodoacetil-4-hidroxi- β -feniletilamina

A partir de 0,5 gramos de N-cloroacetil-4-hidroxi- β -feniletilamina y 3,5 gramos de IK. Cristales blancos de p.f.

114-115°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 88%

Análisis para $C_{10}H_{12}O_2NI$ Hallado; C:39,62% H:4,11% N:4,80%
Teórico; C:39,34% H:3,93% N:4,59%

Espectro IR: Ver compuesto nº 31 Tabla V Pág 135

32) N-Iodoacetil-3-metoxi-4-hidroxianilina

A partir de 0,4 gramos de N-cloroacetil-3-metoxi-4-hidroxianilina y 1,5 gramos de IK. Cristales ligeramente amarillos de p.f. 134°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 79%.

Análisis para $C_9H_{10}O_3NI$ Hallado; C:35,36% H:3,52% N:4,29%
Teórico; C:35,17% H:3,25% N:4,56%

Espectro IR: Ver compuesto nº 32 Tabla V Pág 136

33) N-Iodoacetil-3-metoxi-4-hidroxibencilamina

A partir de 1,9 gramos de N-cloroacetil-3-metoxi-4-hidroxibencilamina y 6,9 gramos de IK. Cristales blancos de p.f. 99-100°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 82%. Descrito (50) p.f. 104°C. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_{10}H_{12}O_3NI$ Hallado; C:37,38% H:3,78% N:4,23%
Teórico; C:37,38% H:3,73% N:4,36%

Espectro IR: Ver compuesto nº 33 Tabla V Pág 136

34) N-Iodoacetil-3-metoxi-4-hidroxi-β-feniletilamina

A partir de 0,5 gramos de N-cloroacetil-3-metoxi-4-hidroxi-β-feniletilamina y 2 gramos de IK. Cristales blancos que con el tiempo toman color ligeramente amarillo de p.f. 109-110°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 90%

Análisis para $C_{11}H_{14}O_3NI$ Hallado; C:62,82% H:7,22% N:7,00%
Teórico; C:63,15% H:7,17% N:6,69%

Espectro IR: Ver compuesto nº 34 Tabla V Pág 136

35) N-Iodoacetil-3-metoxi-4-hidroxi- χ -fenilpropilamina

A partir de 0,5 gramos de N-cloroacetil-3-metoxi-4-hidroxi- χ -fenilpropilamina y 1,9 gramos de IK. Cristales blancos de p.f. 84-85°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_{12}H_{16}O_3NI$ Hallado; C:41,53% H:4,74% N:4,21%
Teórico; C:41,26% H:4,58% N:4,01%

Espectro IR: Ver compuesto nº 35 Tabla V Pág 136

36) N-Iodoacetil-3,4-dihidroxianilina

A partir de 0,5 gramos de N-cloroacetil-3,4-dihidroxianilina y 2 gramos de IK. Por cromatografía preparativa en placas de gel de sílice y utilizando éter como disolvente de desarrollo, se aísla un polvo amarillo de p.f. 177-178°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 60%.

Análisis para $C_8H_8O_3NI$ Hallado; C:32,78% H:2,91% N:4,43%
Teórico; C:32,66% H:2,73% N:4,77%

Espectro IR: Ver compuesto nº 36 Tabla V Pág 137

37) N-Iodoacetil-3,4-dihidroxibencilamina

A partir de 0,5 gramos de N-cloroacetil-3,4-dihidroxibencilamina y 1,9 gramos de IK. Por cromatografía preparativa en placas de gel de sílice y utilizando éter como disolvente de desarrollo se aísla un aceite que cristaliza de éter con dificultad. Cristales ligeramente amarillos de p.f. 119-120°C. Rendimiento 58%.

Análisis para $C_9H_{10}O_3NI$ Hallado; C:35,17% H:3,25% N:4,56%
Teórico; C:35,06% H:3,43% N:4,77%

Espectro IR: Ver compuesto nº 37 Tabla V Pág 137

38) N-Iodoacetil-3,4-dihidroxi- β -feniletilamina

A partir de 0,2 gramos de N-cloroacetil-3,4-dihidroxi- β -feniletilamina y 1,5 gramos de IK. Por cromatografía preparativa en placas de gel de sílice y utilizando éter como disolvente de desarrollo se aísla un aceite, que cristaliza con dificultad de alcohol-éter. Cristales blancos de p.f. 93-94°C. Rendimiento 55%.

Análisis para $C_{10}H_{12}O_3NI$ Hallado; C:39,59% H:3,91% N:4,64%
Teórico; C:39,86% H:3,98% N:4,65%

Espectro IR: Ver compuesto nº 38 Tabla V Pág 137

PREPARACION DE N-BROMOACETIL-ARILALQUILAMINAS

Método general.

En un matraz de fondo redondo se disuelve en acetona seca 1 mol de la correspondiente N-iodoacetil-arilalquilamina y se añaden 5 moles de BrAg finamente pulverizado. Con agitación se calienta la mezcla a reflujo durante 8 horas, procurando mantener el matraz fuera de la acción directa de la luz. Al cabo de este tiempo se filtra el sólido y la acetona se evapora a presión reducida. Al eliminar la acetona quedan residuos aceitosos que, a veces, para conseguir cristalizarlos hay que purificarlos previamente por cromatografía preparativa.

39) N-Bromoacetil-anilina

A partir de 0,5 gramos de N-iodoacetil-anilina y 1,7 gramos de BrAg. Cristaliza de agua. Cristales blancos de p.f. 137-138°C. Rendimiento 91%. Descrito (53) p.f. 136°C. Rendimiento 90%.

Análisis para C_8H_8ONBr Hallado; C:44,55% H:3,64% N:6,46%
Teórico; C:44,85% H:3,73% N:6,54%

Espectro IR: Ver compuesto nº 39 Tabla VI Pág 158

40) N-Bromoacetil-bencilamina

A partir de 0,5 gramos de N-iodoacetil-bencilamina y 1,7 gramos de BrAg. Cristaliza de agua. Cristales blancos de p.f. 102-103°C. Rendimiento 93%. Descrito (54) p.f. 102-103°C. Rendimiento 90%.

Análisis para $C_9H_{10}ONBr$ Hallado; C:47,58% H:4,45% N:6,17%
Teórico; C:47,36% H:4,39% N:6,14%

Espectro IR: Ver compuesto nº 40 Tabla VI Pág 138

41) N-Bromoacetil- β -feniletilamina

A partir de 0,5 gramos de N-iodoacetil- β -feniletilamina y 1,6 gramos de BrAg. Cristaliza de agua. Cristales blancos de p.f. 74-75°C. Rendimiento 90%.

Análisis para $C_{10}H_{12}ONBr$ Hallado; C:49,69% H:5,16% N:5,98%
Teórico; C:49,58% H:4,95% N:5,78%

Espectro IR: Ver compuesto nº 41 Tabla VI Pág 138

42) N-Bromoacetil- γ -fenilpropilamina

A partir de 1 gramo de N-iodoacetil- γ -fenilpropil-
amina y 3,08 gramos de BrAg. Cristaliza de alcohol-agua.
Cristales blancos de p.f. 40-41°C. Rendimiento 95%.

Análisis para $C_{11}H_{14}ONBr$ Hallado; C: 51,78% H: 5,63% N: 5,52%
Teórico; C: 51,56% H: 5,46% N: 5,46%

Espectro IR: Ver compuesto nº 42 Tabla VI Pág 138

43) N-Bromoacetil-4-hidroxianilina

A partir de 0,7 gramos de N-iodoacetil-4-hidroxiani-
lina y 2 gramos de BrAg. Cristales ligeramente pardos de
p.f. 144°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 85%.

Análisis para $C_8H_8O_2NBr$ Hallado; C: 41,92% H: 3,73% N: 6,34%
Teórico; C: 41,73% H: 3,47% N: 6,08%

Espectro IR: Ver compuesto nº 43 Tabla VI Pág 139

44) N-Bromoacetil-4-hidroxibencilamina

A partir de 0,5 gramos de N-iodoacetil-4-hidroxiben-
cilamina y 1,6 gramos de BrAg. Cristales blancos de p.f. 93°C.
Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 78%

Análisis para $C_9H_{10}O_2NBr$ Hallado; C: 44,53% H: 4,18% N: 5,56%
Teórico; C: 44,26% H: 4,09% N: 5,73%

Espectro IR: Ver compuesto nº 44 Tabla VI Pág 139

45) N-Bromoacetil-4-hidroxi- β -feniletilamina

A partir de 0,7 gramos de N-iodoacetil-4-hidroxi- β -
feniletilamina y 2 gramos de BrAg. Cristales blancos de p.f.
90-91°C. Cristaliza de éter. Rendimiento 70%.

Análisis para $C_{10}H_{12}O_2NBr$ Hallado; C:46,80% H:4,80% N:5,34%
Teórico; C:46,51% H:4,65% N:5,42%

Espectro IR: Ver compuesto nº 45 Tabla VI Pág 139

46) N-Bromoacetil-3-metoxi-4-hidroxianilina

Por tratamiento de 0,3 gramos de N-iodoacetil-3-metoxi-4-hidroxianilina con 1 gramo de BrAg. Cristales ligeramente pardos de p.f. 106-107°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 80%.

Análisis para $C_9H_{10}O_3NBr$ Hallado; C:41,83% H:4,04% N:5,16%
Teórico; C:41,56% H:3,84% N:5,38%

Espectro IR: Ver compuesto nº 46 Tabla VI Pág 139

47) N-Bromoacetil-3-metoxi-4-hidroxibencilamina

A partir de 1,5 gramos de N-iodoacetil-3-metoxi-4-hidroxibencilamina y 3 gramos de BrAg. Cristales blancos de p.f. 104-105°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 70%. Descrito(50) p.f. 94-95°C. Rendimiento 65%.

Análisis para $C_{10}H_{12}ONBr$ Hallado; C:44,07% H:4,39% N:4,81%
Teórico; C:43,79% H:4,37% N:5,10%

Espectro IR: Ver compuesto nº 47 Tabla VI Pág 140

48) N-Bromoacetil-3-metoxi-4-hidroxi-β-feniletilamina

A partir de 0,4 gramos de N-iodoacetil-3-metoxi-4-hidroxi-β-feniletilamina y 1,1 gramos de BrAg. Cristales blancos de p.f. 64-65°C. Cristaliza de alcohol-éter. Rendimiento 91%.

Análisis para $C_{11}H_{14}O_3NBr$ Hallado; C:45,80% H:4,80% N:4,73%
Teórico; C:45,83% H:4,86% N:4,86%

Espectro IR: Ver compuesto nº 48 Tabla VI Pág 140

49) N-Bromoacetil-3,4-dihidroxibencilamina

A partir de 0,5 gramos de N-iodoacetil-3,4-dihidroxibencilamina y 1,5 gramos de BrAg. Se aislan cristales blancos de p.f. 104-105°C. Rendimiento 60%.

Análisis para $C_9H_{10}O_3NBr$ Hallado; C:41,43% H:3,95% N:5,29%
Teórico; C:41,53% H:3,84% N:5,38%

Espectro IR: Ver compuesto nº 49 Tabla VI Pág 140

PARTE III

ESTUDIOS SOBRE INHIBICION DE CATECOL-O-METILTRANSFERASA
POR N-HALOGENOACETIL-ARILALQUILAMINAS Y COMPUESTOS RELA-
CIONADOS.

El objeto de esta Parte III es detallar nuestras experiencias sobre ensayos de todos los productos preparados y descritos en la Parte II, como inhibidores de Catecol-O-metiltransferasa y obtener la información oportuna acerca de si su mecanismo de acción responde a las hipótesis formuladas en la introducción de esta Tesis.

El capítulo incluye una revisión crítica de los métodos disponibles para la determinación de la actividad enzimática y la justificación de la elección del método colorimétrico con pirocatecolftaleina como sustrato. Se detallan las experiencias de inhibición y los resultados y se someten éstos a discusión.

METODOS DE DETERMINACION DE COMT

a).-Métodos fluorométricos

Representan los primeros métodos que se emplearon para determinación enzimática de actividad de COMT y, básicamente, constituyen variaciones del método descrito por Axelrod, (19) descubridor de la enzima, quien realiza las primeras medidas de actividad. Se basan en una determinación fluorométrica del sustrato metilado por la acción catalítica de la enzima. Para esta se realiza una extracción previa del producto mediante disolventes orgánicos, la cual puede ir seguida, o no, de una reextracción de la fase orgánica con un disolvente acuoso ácido.

El principal inconveniente que presentan estos métodos es el tener que extraer de la disolución el producto metilado para poder realizar después las medidas fluorométricas. En primer lugar, las extracciones no son cuantitativas y el

introducir blancos para corregir este error supone un gran número de manipulaciones. En segundo lugar, hay que tener en cuenta la selectividad que se logre en las extracciones ya que hemos de extraer el producto metilado de un catecol en presencia de un gran exceso de este catecol. Esta serie de inconvenientes, según nuestra opinión, hacen a los métodos fluorométricos tediosos, lentos y no de mucha garantía.

La diferencia entre los métodos utilizados por los distintos autores consiste en la utilización de diversos sustratos, o de distintos disolventes para la extracción del producto transformado. Pueden diferir también en que lleven a cabo una extracción con disolventes orgánicos seguida de una reextracción de la fase orgánica con medios acuosos ácidos o bien supriman esta reextracción acuosa.

Axelrod, (60) utiliza epinefrina como sustrato y para extraer la metanefrina formada, realiza una extracción, en presencia de borato con dicloroetileno que lleva un 2% de alcohol isoamílico, seguida de una reextracción de la fase orgánica con $\text{ClH } 0,1\text{N}$. Realiza experiencias de recuperación de metanefrina pura con objeto de poder introducir la oportuna corrección.

Belleau y Burba (61) siguen el mismo procedimiento de Axelrod, pero utilizan norepinefrina como sustrato. También siguen el mismo procedimiento de Axelrod, e incluso utilizan el mismo sustrato, Abbs y col. (62), pero introducen la variación de realizar tres extracciones sucesivas de cada muestra con el disolvente orgánico y dos extracciones de la fase orgánica con $\text{ClH } 0,1\text{N}$. Sin embargo necesitan también introducir correcciones para el porcentaje de recuperación.

Hattori y col (63), utilizan un procedimiento análogo al de Axelrod, pero empleando como disolvente orgánico alcohol

isoamílico. Estos autores introducen también la modificación de que no determinan la metanefrina por una fluorimetría directa, sino que utilizan el método del trihidroxiindol de Betler y col. (64) que supone una oxidación de la metanefrina con iodo y tautomerización por una mezcla de ácido ascórbico al 2% y NaOH 5N (1:9), realizando inmediatamente después la determinación fluorométrica.

b). -Empleo de isótopos radiactivos

La introducción de los isótopos radiactivos por Axelrod (65) para determinación de actividad enzimática de COMT supuso el desplazamiento casi total de los métodos fluorométricos. Precisamente su introducción fué una consecuencia de la palpable necesidad de encontrar otros métodos que eliminasen las deficiencias de los métodos fluorométricos. Podemos dividir estos en dos grupos: Los que emplean sustratos marcados y los que emplean S-Adenosilmetionina marcada en su grupo metilo transferible.

Estos métodos poseen la ventaja de tener una sensibilidad mayor que los métodos fluorométricos, con lo cual se pueden reducir considerablemente las cantidades de enzima y S-Adenosilmetionina empleadas. Tienen la ventaja de eliminar las interferencias producidas por los componentes de los extractos de tejidos cuando se realizan determinaciones fluorométricas pero no eliminan el inconveniente de tener que extraer de la mezcla de reacción el producto metilado.

Axelrod, (66) utiliza adrenalina-7-³H y extrae la metanefrina utilizando el mismo método de extracción ya empleado en el método fluorométrico con la diferencia de que la determinación de metanefrina en el extracto no se realiza fluorométricamente sino por medida de actividad en un conta-

dor de centelleo líquido. El mismo procedimiento es utilizado por Maitre(67) que utiliza adrenalina como sustrato. Ross y col.(68) también siguen el mismo procedimiento de Axelrod.

El empleo de SAM marcada en su grupo metilo transferible, es el método preferido en los últimos tiempos. En estas condiciones solo muestra actividad el sustrato transformado enzimáticamente. Estos métodos tampoco eliminan el inconveniente que representa en estas determinaciones las extracciones con disolventes.

El marcaje del grupo metilo de SAM con ^3H ha sido utilizado por Assicot y col.(69). Sin embargo la mayoría de los investigadores parecen preferir el marcaje de la SAM con ^{14}C . Así Mann y col.(70) lo utilizan para estudiar la metilación enzimática de la norbelladina; Gugler y col.(71) utilizan el mismo método usando L-epinefrina como sustrato y Nikodijevic y col.(72) emplean también esta modificación, pero extraen el producto con una mezcla de tolueno y alcohol isoamílico, también en medio ácido y sin utilizar borato.

c). Métodos colorimétricos

Solamente hemos encontrado tres métodos de este tipo los cuales son, por otra parte, básicamente distintos entre sí.

Uno de ellos debido a Belleau y col.(73) utiliza nor-epinefrina como sustrato y no ofrece ninguna ventaja respecto a los métodos fluorométricos al menos en lo que respecta al número y tipo de manipulaciones. El producto metilado no se determina fluorométricamente sino colorimétricamente según el método de Udenfriend y col.(74).

Los otros dos métodos tienen la ventaja de eliminar las extracciones con disolventes, pero uno de ellos original de Abdel-Latif(75) tiene el gran inconveniente de no medir

sustrato transformado sino sustrato residual no transformado.

El tercero de estos métodos desarrollado por Anderson y col.(76)reune la ventaja de eliminar las extracciones con disolventes con la de medir en la misma mezcla de reacción el sustrato enzimáticamente metilado.Se basa en el empleo de pirocatecolftaleina como sustrato cromógeno que,una vez metilado,presenta un máximo de absorción óptica en la zona visible del espectro.Esta absorción se mide directamente en la mezcla de reacción en presencia de borato.El inconveniente de este método es que se limita a un solo sustrato y,no es utilizable,por tanto,para el estudio comparativo de diversos sustratos.

Elección de un método de medida de actividad

Al revisar los métodos existentes para la medida de actividad de COMT,hemos comentado ya sus posibilidades,limitaciones e inconvenientes.En nuestro caso particular y por las características de nuestro trabajo nos enfrentamos con el problema de tener que realizar un gran número de medidas.

En primer lugar,pretendemos medir el poder inhibitor de muchos compuestos frente a la enzima y,obligadamente,deben medirse simultaneamente las actividades de la enzima no inhibida pero sometida a idénticas condiciones experimentales.Si a esto se añade la conveniencia de realizar medidas por duplicado o de repetir experiencias en caso necesario,surge la necesidad de disponer de un método de medida que se ajuste a las necesidades prácticas.Por esta razón pretendemos elegir un método que se aproxime lo más posible a las características ideales exigidas por nosotros.

Desechamos, en primer lugar,todos los métodos basados

en la determinación de sustrato residual no transformado, en los que el sustrato enzimáticamente transformado se mide por diferencia.

Entre los métodos basados en la determinación directa de sustrato enzimáticamente transformado, eludimos los métodos que implican un previo aislamiento del producto a partir de la mezcla de reacción. Este aislamiento se realiza en todos los casos mediante extracciones con disolventes y a nuestro juicio esto es un gran inconveniente.

La valoración del sustrato enzimáticamente transformado realizada directamente en la mezcla de reacción y con un equipo fácilmente asequible, resulta especialmente atractiva. Esta posibilidad se ofrece en el método propuesto por Anderson y D'Iorio(76) que emplea un sustrato cromógeno y reduce la valoración a una lectura espectrofotométrica. En consecuencia y por las razones expuestas, adoptaremos este método, que responde mejor que ningún otro a las características que necesitamos.

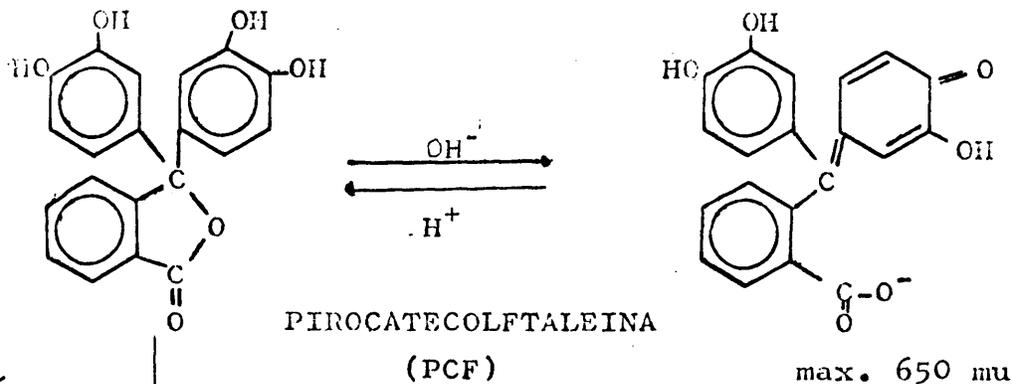
Las determinaciones son razonablemente rápidas y el equipo necesario es corriente en los laboratorios. El material de vidrio se reduce a tubos de centrífuga y pipetas. El único inconveniente de este método es que se limita al uso de un solo sustrato.

DETERMINACION DE CATECOL-O-METILTRANSFERASA CON PIROCATECOL-FTALEINA COMO SUSTRATO CROMOGENICO.

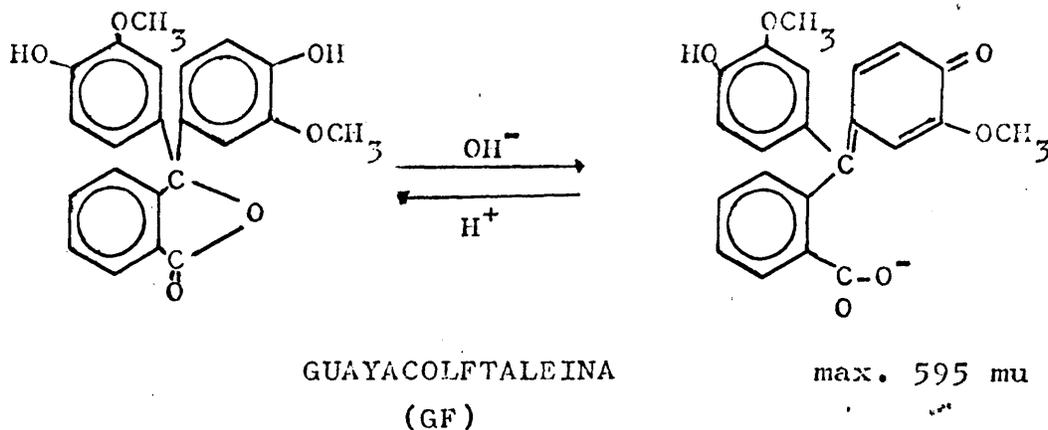
Este método, descrito inicialmente por Anderson y col. (76) ha sido recientemente revisado y estudiado detalladamente por Elorriaga, Montuenga y Fernández Alvarez(77) y es actualmente el método de rutina de nuestro laboratorio.

Como sustrato cromogénico se utiliza la pirocatecolftaleina. Esta conserva su carácter de indicador ácido-base presentando un color amarillo en su forma no disociada y un color azul al disociarse en medio alcalino, con aparición de una forma quinoidea resonante.

Complejan con borato



No complejan con borato

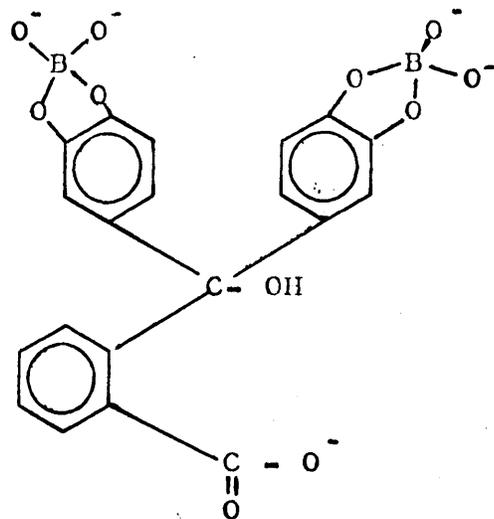


Este color azul es extraordinariamente intenso aún en disoluciones diluidas y presenta un máximo de absorción óptica

a 650 mμ.

Por ser sustrato de la CONT es metilado por la enzima en posición 3. La guayacolftaleina resultante conserva la capacidad de producir una forma quinoidea en medio alcalino y desarrollar un color violeta que presenta un máximo de absorción a 595 mμ. Esta posibilidad existe mientras el OH fenólico en posición 4 exista como tal. Un bloqueo de este grupo fenólico en posición 4 tendría como consecuencia la imposibilidad de formación de la forma quinoidea responsable del color. El sustrato enzimáticamente metilado puede determinarse espectrofotométricamente por medida de su absorción a 595 mμ.

Aunque los colores producidos por el sustrato metilado y por el sustrato no metilado poseen distintos máximos de absorción óptica, resulta más conveniente eliminar el color azul del sustrato no metilado. Esto puede conseguirse complejando el catecol con borato.



En estas condiciones no existe posibilidad de aparición de la forma quinoidea azul de la pirocatecolftaleina y se evita por tanto su interferencia en las determinaciones colorimétricas.

Sin embargo, la guayacolftaleina formada en la reacción enzimática, no es capaz de complejarse con borato por no poseer la agrupación catecol y en consecuencia, adquiere su forma quinoidea aún en presencia de borato, con la consiguiente aparición del color violeta.

Si después de finalizada la reacción enzimática, se alcaliniza el medio de reacción con borato sódico, solamente el sustrato enzimáticamente transformado desarrolla un color característico. El sustrato residual queda complejado con borato y no desarrolla color.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL UTILIZADO

Preparación de tampones

1º.-Tampón de fosfato 0,5 M pH 7,9(78)

Se pesan 68,07 gramos de KH_2PO_4 y se disuelven en 1 litro de agua destilada (solución A) y 87,09 gramos de K_2HPO_4 y se disuelven también en 1 litro de agua (solución B). Para preparar el tampón de fosfato del pH deseado se mezclan 7 ml. de la solución A con 93 ml. de la solución B.

2º.-Tampón de fosfato 0,001 M pH 7

La solución A se prepara disolviendo 0,136 gramos de KH_2PO_4 en 1 litro de agua y la solución B se prepara disolviendo 0,174 gramos de K_2HPO_4 en 1 litro de agua. Para alcanzar el pH deseado se mezclan 39 ml. de la solución A con 63 ml. de la solución B.

3º.-Tampón Borax-NaOH 0,5 M pH 10

47,7 gramos de $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en la menor cantidad posible de agua y se añade gota a gota NaOH 2M hasta alcanzar el pH deseado. Finalmente se enrasa con agua hasta 1 litro comprobando de nuevo el pH.

Métodos generales

La homogeneización de tejidos se realizó en un aparato Sorvall Omni Mixer a una velocidad correspondiente a 9 en la escala del aparato, durante 15 minutos, en períodos de medio minuto, para evitar el calentamiento de la mezcla.

La separación de los precipitados se llevó a cabo por centrifugación, utilizando centrifugas MSE de alta velocidad y supercentrifugas.

El ajuste de pH de las disoluciones se llevó a cabo con un medidor de pH Metrohm Herisau E353B. Por último, las medidas de absorción se realizaron en un aparato Hitachi 139 de la casa Perkin Elmer.

PREPARACION DE PIROCATECOLFTALEINA

Ha sido preparada según un método descrito por Bayer y Kochendoerfer(79) introduciendo algunas modificaciones en cuanto a la purificación del producto con respecto al método que utilizan estos autores

Tres partes de anhídrido ftálico se calientan durante 3-4 horas en baño de aceite a 140-150°C con dos partes de pirocatecol y tres partes de cloruro de zinc. Al enfriarse el líquido se transforma en una masa dura de color pardo rojizo. Esta masa se disuelve en agua caliente y se filtra. Al filtrado se añade sosa muy diluida hasta que el líquido se colorea débilmente de azul, con lo cual se neutraliza el ácido ftálico en exceso.

El líquido se extrae varias veces con éter y al evaporar el éter se obtiene la ftaleina en forma de una masa parda aceitosa. Para purificar esta pirocatecolftaleina, se disuelve en agua caliente, se hierve durante media hora aproximadamente con un poco de carbón animal, se filtra y, después de enfriada la disolución se extrae con éter. Al eliminar el éter, queda la pirocatecolftaleina en forma de una masa amarilla, la cual no se logra cristalizar a pesar de diversos ensayos.

Esta masa amarilla, como pudimos comprobar, estaba im-

purificada por diversas sustancias ya que originaba hasta seis manchas distintas en capa fina. Dos de ellas se identificaron como debidas a pirocatecol y a la propia pirocatecolftaleina, aunque no llegamos a esclarecer la naturaleza de las restantes manchas. El producto se purificó por cromatografía en capa fina preparativa, empleando placas de Silicagel GF₂₅₄ como absorbente, y como eluyente la mezcla que damos a continuación:

Eter..... 40 partes en volumen
Ciclohexano.... 20 partes en volumen
Acido acético.. 6 partes en volumen

Una vez desarrolladas las placas, se revelaron mediante una lámpara de luz ultravioleta a 260 mμ y la mancha correspondiente a la pirocatecolftaleina se recogió y eluyó con la misma mezcla que desarrollamos las placas.

Al eliminar los disolventes queda un polvo amarillento que no pudimos cristalizar pero que sin embargo ya es puro.

<u>Análisis</u> para C ₂₀ H ₁₄ O ₆	Hallado;	C:68,35%	H:4,22%
	Teórico;	C:68,57%	H:4,00%

El espectro IR del producto presenta las bandas características de grupos OH a 3300 cm⁻¹ y de lactona α-β no saturada a 1740 cm⁻¹.

PREPARACION DE CATECOL-O-METILTRANSFERASA

Material necesario:

CLK isotónico, preparado disolviendo 21,02 gramos de CLK en 1 litro de agua destilada.

Tampón de fosfato 0,001 M; pH=7 (ver preparación en página 89)

Método:

La COMT se extrajo y purificó parcialmente siguiendo el método descrito por Axelrod y Tomchick(20).

Se sacrificaron cuatro ratas adultas, las cuales a continuación se desangraron e inmediatamente se separaron los hígados(24,2 gramos) y se enfriaron a 0°C. A partir de este momento se mantuvo una temperatura entre 0-5°C a través de todos los procesos de extracción y purificación. El tejido hepático se homogeneizó con 96,8 ml. de ClK isotónico y el homogeneizado se centrifugó durante 30 minutos a 78000 g, desechándose el sedimento.

El sobrenadante se liberó de una parte de las proteínas inactivas mediante precipitación por cambio de pH, el cual se ajustó a un valor 5,0 con ácido acético 1M. El precipitado se eliminó por centrifugación y el sobrenadante obtenido se sometió a fraccionamiento con sulfato amónico. Se precipitan 94 ml. de sobrenadante con 16,2 gramos de $SO_4(NH_4)_2$ (30% de saturación), se deja estar el conjunto durante 20 minutos a 0°C para que la precipitación sea completa y el precipitado se aglomere y se elimina el precipitado por centrifugación. Se desechó el precipitado inactivo y el sobrenadante se precipitó con 10,6 gramos de $SO_4(NH_4)_2$ para alcanzar un 50% de saturación final. Después de dejar el conjunto a 0°C durante 20 minutos, se recoje el precipitado por centrifugación y se desecha el sobrenadante.

El precipitado, que representa la fracción que precipita entre 30% y 50% de saturación con $SO_4(NH_4)_2$, se disolvió en 8 ml. de agua y la disolución obtenida se dializó durante seis horas contra tampón de fosfato 0,001 M. Durante la diálisis precipitan cierta cantidad de proteínas inactivas, las cuales se eliminan por centrifugación. La preparación

dializada y centrifugada tiene un volumen de 11,5 ml. La disolución es limpia, transparente y tiene un ligero color amarillo.

Esta preparación concentrada puede almacenarse en nevera durante tres meses con poca pérdida de actividad. Para realizar medidas de inhibición la preparación concentrada se diluyó diez veces, lo que permite tener lecturas espectrofotométricas de alrededor de 0,5 siguiendo el método estandard de ensayo que detallamos posteriormente.

PREPARACION DEL IODURO DE S-ADENOSILMETIONINA

Material necesario:

$Cl_2Mg.6H_2O$	0,429	gramos
Cl_2Ca	0,143	gramos
$SO_4Mn.2H_2O$	0,087	gramos
SO_4Zn	0,080	gramos
Citrato sódico	1,428	gramos
$(NH_4)_2SO_4$	2,857	gramos
KH_2PO_4	1,428	gramos
Glucosa anhidra	35,71	gramos
L-Metionina	1,008	gramos
Levadura fresca de panadero	...	65	gramos
ClO_4H	1,5 N		
Acido fosfowolfrámico al 50%	(50 gramos de ácido en 100 cc de agua)		
Ioduro de trietilamonio	1M		

Método:

La preparación se llevó a cabo cultivando levadura en presencia de metionina y activando el metabolismo de las

células mediante aireación y suministro de glucosa(80).

Se empleó un matraz de tres bocas provisto de un tapón con dos orificios, uno de los cuales se conectó a la trompa de vacío, utilizándose el otro para introducir en el matraz un aireador provisto de filtro y a su vez se conectó el sistema a tres frascos lavadores, el de entrada conteniendo SO_4H_2 y los otros dos agua. El primer par de productos ($\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Cl_2Ca) se disolvió en 400 cc de agua y los otros tres pares restantes en 200 cc de agua cada par. Las cuatro soluciones se añadieron al matraz de tres litros, enjuagando los recipientes, sin que se observara turbidez alguna. Seguidamente se añadió una solución conteniendo 21,42 gramos de glucosa anhidra y 6,7 milimoles (1,008 gramos) de L-metionina para dar un volumen final de 1430 cc y por último 65 gramos de levadura fresca de panadero, adquirida en el comercio. El matraz de cultivo se agitó hasta que la levadura presentase un aspecto pulverulento y se conectó el sistema de vacío, descrito anteriormente, con lo que se consiguió una intensa aireación, que se interrumpió a las siete horas para añadir una cantidad de 14,29 gramos de glucosa. La aireación se prosiguió entonces hasta el día siguiente con una duración global de 24-25 horas. Durante este tiempo el matraz se mantuvo en termostato a 26°C .

La levadura se separó del medio de cultivo por centrifugación, lavándose el sedimento dos veces con un volumen de agua helada tres veces superior al del propio sedimento. La levadura volvió a aislarse por centrifugación y seguidamente se extrajo con 4 volúmenes de ClO_4H 1,5N dejando el extracto una hora a temperatura ambiente con agitación frecuente. El residuo de levadura se separó por centrifugación y el sobrenadante perclórico se dejó en nevera durante toda la noche. Este sobrenadante mantenido toda la noche en ne-

vera es amarillo turbio y en el se observa un ligero precipitado blanco. Se filtró dos veces en placa de poro fino para eliminar el precipitado.

El filtrado se precipitó con 95 cc de una disolución de ácido fosfowolfrámico al 50%. Con esta cantidad se observó que el producto precipitaba totalmente. Se mantuvo durante dos horas en nevera y a continuación se centrifugó para separar el precipitado.

Lavados del precipitado:

- 1) Se lavó dos veces con agua destilada helada, hasta conseguir un pH 5 en el agua de lavado. El precipitado se decantó por centrifugación.
- 2) Se llevan a cabo seis lavados con alcohol frío del 96% separando el precipitado de la misma forma que en el apartado anterior.
- 3) A continuación se lava dos veces con alcohol absoluto frío en las mismas condiciones que en los apartados anteriores.
- 4) Por último se lleva a cabo un solo lavado con éter seco en las mismas condiciones.

Después de los lavados el precipitado se secó en un desecador y, una vez seco, lo extraemos con 144 cc de acetona en seis veces sucesivas. El fosfowolframato de SAM, en disolución acetónica, se descompone con $(C_2H_5)_4NI$ 1M (14 cc) añadiendo después 160 cc de agua helada. Centrifugamos para aislar el precipitado, el cual se desecha y, ajustamos el sobrenadante a pH 5,8 con NH_4OH 1M. Lo dejamos reposar una hora y centrifugamos de nuevo para separar el precipitado. El sobrenadante lo evaporamos a sequedad a una temperatura de 24-29°C quedando un residuo blanco amarillento.

Este residuo se lava tres veces con alcohol para secarlo bien, operando siempre a la temperatura de 0°C. El pro-

ducto se lava también diez veces con alcohol absoluto y una vez con éter seco sobre sodio. Después de estos lavados obtuvimos 165 miligramos de producto que resultó ser activo como donador biológico de grupo metilo.

DETERMINACION DE CATECOL-O-METILTRANSFERASA Y ENSAYO DE INHIBIDORES.

Preparación de soluciones y reactivos.

Tampón de fosfato 0,75M (ver preparación en página 89)

Cl_2Mg 0,1M preparado disolviendo 10,1 gramos del producto en 500 cc de agua.

Ioduro de S-Adenosilmetionina $5 \cdot 10^{-3}$ M preparado disolviendo 2,32 miligramos del producto en 1 cc de agua

Preparación enzimática parcialmente purificada según se describe en la página(91)

Inhibidor $1,8 \cdot 10^{-2}$ M. Para preparar las disoluciones de inhibidor utilizamos como disolvente acetonitrilo, pesando la cantidad necesaria de cada producto para preparar disoluciones de la concentración deseada.

Sustrato 1,333 M preparado pesando 4,66mggramos de pirocatecolftaleina y disolviendolos en 10 ml. de tampón de fosfato 0,15M.

Tampón de borato pH 10 (ver preparación en página 89)

Método operatorio.

En un tubo de centrifuga se colocan las siguientes disoluciones:

	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
Tampón de fosfato 0,75 M0,06 ml.....	0,15M(en 0,5 ml.)
Cl ₂ Mg 0,1 M.....0,05 "0,01M(" ")
Ioduro de SAM $5 \cdot 10^{-3}$ M.....0,05 " $5 \cdot 10^{-4}$ M(en 0,5 ml.)
Preparación enzimática.....0,12 "
Inhibidor $1,8 \cdot 10^{-2}$ M.....0,02 " $7,25 \cdot 10^{-4}$ M(en 0,5 ml.)
Sustrato 1,333 M.....0,2 " $5,3 \cdot 10^{-4}$ M(" ")
Tampón de borato pH 10.....0,25 "	

La mezcla en ausencia de tampón de borato se incubaba a 37° C durante un tiempo prefijado. La reacción puede iniciarse por adición de la enzima, por adición del sustrato o por adición de la SAM. Para las medidas de inhibición hemos iniciado las reacciones por adición del sustrato, precalentando los reactivos a la temperatura de reacción. El momento de la adición se toma como tiempo cero para la medida del tiempo de reacción.

El final de la reacción se logra por adición de 0,25 ml. de tampón de borato 0,5 M; pH 10. El medio alcalino logrado por adición del tampón de borato, produce una inmediata desnaturalización de la enzima y por otra parte elimina del sistema el sustrato al complejar su grupo catecol. Inmediatamente y por efecto de la alcalinidad del medio aparece el color violeta característico de la forma quinoidea del sustrato enzimáticamente transformado. El sustrato residual no desarrolla color en estas condiciones por las razones expuestas.

Una vez finalizada la reacción enzimática, se deja la mezcla de reacción en reposo durante 20 minutos para que se aglomere el precipitado de proteína desnaturalizada y se elimina el precipitado por centrifugación en el mismo tubo. El sobrenadante limpio se pasa a una cubeta óptica y se determina su absorción a 595 mμ.

La lectura obtenida debe corregirse restando la absorción de un blanco desarrollado en las mismas condiciones, pero en el que la SAM (donador de grupos metilo) se ha sustituido por un volumen igual de agua destilada. La absorción de este blanco representa cualquier pequeña absorción que puedan presentar los reactivos. La sustracción del blanco se realiza automáticamente si el sistema completo se lee contra su correspondiente blanco, cuya transmisión se toma como 100%.

Incorporación del inhibidor a la mezcla de reacción

El estudio de los inhibidores preparados presenta el inconveniente de su insolubilidad en medios acuosos. Su solubilización puede lograrse mediante disolventes orgánicos mixcibles con el agua. Si el inhibidor, disuelto en un disolvente orgánico, se añade sobre un medio acuoso, se logra su solubilización con una pequeña concentración final de disolvente orgánico.

El problema de este modo de operar es que estos disolventes pueden tener una acción sobre la enzima. Por esta razón realizamos un estudio previo de la acción de diversos disolventes sobre la actividad enzimática. A este fin estudiamos el efecto de dioxano, dimetilformamida, tetrahidrofurano y acetonitrilo. En cada caso se ensayan una serie de concentraciones de disolventes en la mezcla de reacción enzimática.

Disolvente	Concentración en la mezcla de reacción %	Actividad residual %
Dioxano	2,75	100
	5,4	79
Acetonitrilo	2,7	103
	5,4	100
THF	2,7	100
	5,4	54
DMF	2,7	95
	5,4	90

La tabla anterior muestra los resultados obtenidos con los disolventes ensayados. Estos resultados muestran que el acetonitrilo no afecta apreciablemente a la actividad enzimática a concentraciones inferiores al 5%.

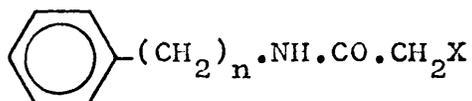
Después de esta observación, preparamos disoluciones $1,8 \cdot 10^{-2}$ M de cada inhibidor en acetonitrilo y añadimos 0,02 ml. a la mezcla de reacción. De esta manera la concentración de disolvente en la mezcla de reacción es del 4%.

Cuando se mide actividad en ausencia de inhibidor, se añade a la mezcla de reacción el mismo volumen de acetonitrilo puro, en vez de añadir la disolución de inhibidor. Si se desean otras concentraciones de inhibidor, se preparan disoluciones del inhibidor en acetonitrilo con la concentración adecuada, pero se añade siempre el mismo volumen de disolución sobre la mezcla de reacción.

Las Tablas I a V, que se dan a continuación, resumen los resultados obtenidos. En cada Tabla se han resumido los productos más afines y, junto a la estructura para cada caso, se da la actividad enzimática residual, expresada en % de la actividad total, bajo las condiciones de ensayo standard dadas anteriormente, sin y con preincubación de la solución enzimática con el inhibidor 20 minutos, en ausencia de sustrato.

TABLA I

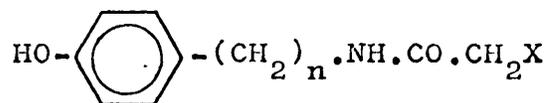
Resultados de las medidas de inhibición expresados en % de actividad residual, obtenidos para los productos de la siguiente fórmula general:



Producto nº	n	X	Actividad sin preincubación	Actividad con 20 minutos de preincubación
1	0	H	98	99
11	0	Cl	100,8	79,6
39	0	Br	73	18,2
25	0	I	48	14,6
2	1	H	100	98
12	1	Cl	100	89
40	1	Br	100	57
26	1	I	100	53
3	2	H	100	100
13	2	Cl	100	89
41	2	Br	100	57
27	2	I	100	53
4	3	H	100	98
14	3	Cl	100	90,9
42	3	Br	100	59
28	3	I	100	54

TABLA II

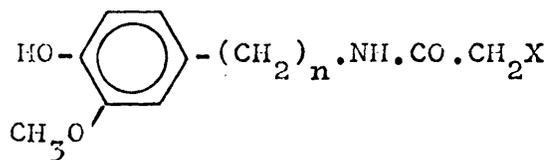
Resultados de las medidas de inhibición expresadas en % de actividad residual obtenidos para los productos de la siguiente fórmula general:



Producto nº	n	X	Actividad sin preincubación	Actividad con 20 minutos de preincubación
5	0	H	97	95
15	0	Cl	86	80
43	0	Br	79	31
29	0	I	61	15
6	1	H	100	97
16	1	Cl	95	93,1
44	1	Br	100	47,2
30	1	I	95	36
7	2	H	96	98,3
17	2	Cl	101	80
45	2	Br	96	52
31	2	I	100	41,1

TABLA III

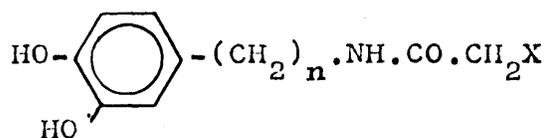
Resultados de las medidas de inhibición expresados en % de actividad residual obtenidos para los productos de la siguiente fórmula general:



Producto nº	n	X	Actividad sin preincubación	Actividad con 20 minutos de preincubación
8	0	H	62	64
18	0	Cl	52	0
46	0	Br	26	0
32	0	I	15	0
9	1	H	100	99,5
19	1	Cl	100	69,3
47	1	Br	100	45
33	1	I	100	34,4
10	2	H	100	99
20	2	Cl	98,1	78
48	2	Br	96,6	50
34	2	I	95,9	59
21	3	Cl	88,7	86
35	3	I	97	50,4

TABLA IV

Resultados de las medidas de inhibición expresados en % de actividad residual obtenidos para los productos de la siguiente fórmula general:



Producto nº	n	X	Actividad sin preincubación	Actividad con 20 minutos de preincubación
22	0	Cl	24	0
36	0	I	5	0
23	1	Cl	48	3
49	1	Br	45	6
37	1	I	25	4
24	2	Cl	49,7	17,6
38	2	I	29,5	10

TABLA V

Resultados de las medidas de inhibición expresados en % de actividad residual obtenidos para algunos de los productos preparados como intermediarios en síntesis.

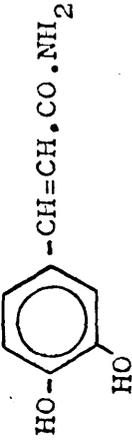
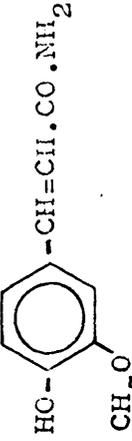
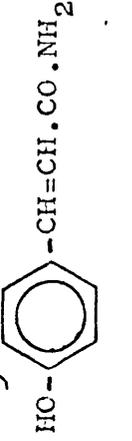
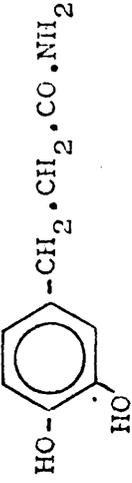
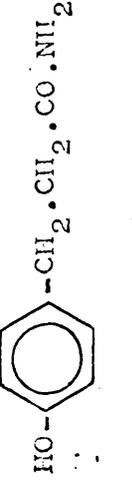
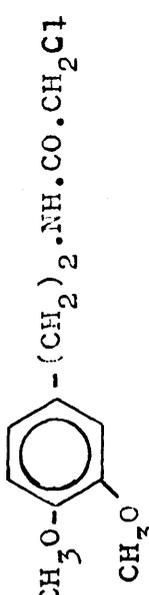
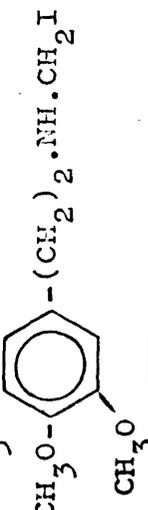
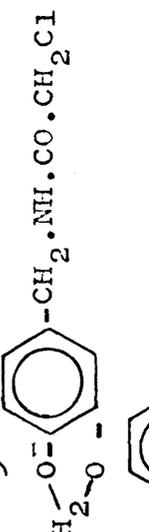
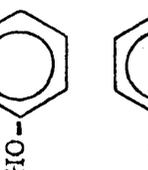
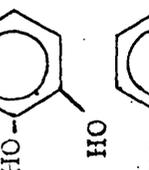
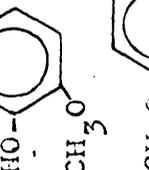
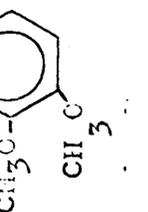
Producto nº	Fórmula	Actividad sin preincubación	Actividad con 20 minutos de preincubación.
50		24	23
51		100	100
52		100	99
53		55,4	55
54		100	100

TABLA V (continuación)

Producto n°	Fórmula	Actividad sin preincubación	Actividad con 20 minutos de preincubación
55	 $-\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{Cl}$	100	96,6
56	 $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{I}$	100	78
57	 $-\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{Cl}$	100	95,6
58	 $-\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{Cl}$	100	94,2
59		98	97
60		55	53
61		92	91,5
62		100	99

RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSION

Este apartado tiene por objeto comentar los resultados de inhibición, realizados como se ha expuesto en páginas anteriores, y discutir los mecanismos a través de los cuales creemos que tiene lugar la acción inhibidora en cada caso.

Los resultados de los ensayos, bajo condiciones standard, para todos los productos estudiados, a concentración $5 \cdot 10^{-4} M$, sin preincubación previa del inhibidor con la enzima, o con preincubación previa del inhibidor con la enzima, en ausencia del sustrato, vienen resumidos en las Tablas I a V, junto con la estructura de cada producto. Los resultados están expresados en % de la actividad que conserva la enzima después del tratamiento con el inhibidor y tomando como 100% la actividad de la enzima libre, es decir en ausencia de cualquier inhibidor. La agrupación de los productos en distintas tablas, según sus características estructurales nos facilitará la discusión.

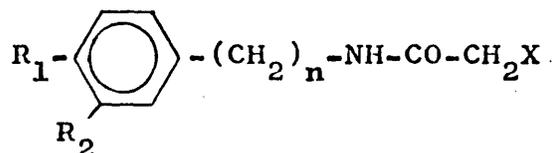
Puesto que la enzima (catecol-O-metiltransferasa) es específica para la O-metilación de catecoles con S-Adenosilmetionina como donador de grupo metilo, admitimos el esquema mecanístico propuesto por Axelrod (22), y que implica un centro receptor del sustrato (catecol), un centro receptor de la coenzima (S-Adenosilmetionina) y un centro catalítico en el que, a través de quelación del sustrato con la coenzima con la intervención de un metal (Mg^{2+}) como puente, tiene lugar la transferencia del grupo metilo al sustrato. Este esquema se mostró en la página 10.

En principio, presumimos que los productos con estructura catecólica o estructura afín a esta pueden establecer interacción con el centro receptor del sustrato y servir co-

mo inhibidores competitivos respecto al sustrato y reversibles.

En efecto, la Tabla V (compuestos 59 a 62), muestra los resultados con fenol, catecol, monometiléter de catecol y dimetiléter de catecol. El fenol y el dimetiléter del catecol no inhiben, ni con ni sin preincubación, porque no complejan o lo hacen muy débilmente con el centro receptor del catecol. El monometiléter inhibe muy débilmente y el catecol más fuertemente. En ambos casos la inhibición es la misma con que sin preincubación. La inhibición seguramente es competitiva con el sustrato y reversible.

Con este preámbulo, clasificamos todos los demás productos en los tres grupos siguientes:



R₁ y R₂ (iguales o diferentes) = -H, -OCH₃, -OH

n = 0, 1, 2 y 3

X = Cl, Br, I, H

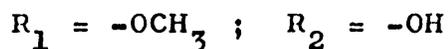
GRUPO I.-Compuestos sin afinidad para el centro receptor del catecol:

Subgrupo A: R₁=R₂ = H ó R₁ = OH ; R₂ = H

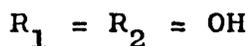
Subgrupo B: R₁=R₂ = OCH₃; R₁ = R₂ = CH₂

GRUPO II.-Compuestos cuya afinidad por el centro receptor

del catecol prevemos débil o no existente.



GRUPO III.-Compuestos con afinidad para el centro receptor del catecol.

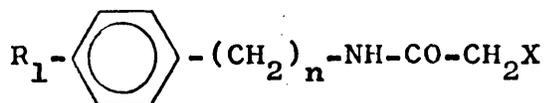


GRUPO IV.-Compuestos diversos.

Discutimos ahora para cada grupo el efecto de variar el parámetro n que define la longitud de la cadena lateral, de los sustituyentes X(H,Cl,Br,I) y de la preincubación o no de la enzima.

COMPUESTOS DEL GRUPO I

Nos referimos en primer término al Subgrupo A. La Tabla I resume los resultados para compuestos de fórmula:



$$n = 0, 1, 2, 3$$

$$X = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{H}$$

$$R_1 = \text{H}, -\text{OH}$$

Los compuestos de este tipo, al carecer de estructura catecol, no deben mostrar afinidad para la enzima y, en principio, no deberían inhibir, de acuerdo con la hipótesis de trabajo. Así ocurre con todos los productos en los que $X = \text{H}$, independientemente del valor de n (ver compuestos 1, 2, 3 y 4 de la Tabla I). Estos compuestos no inhiben ni con ni sin preincubación.

La situación cambia cuando X=halógeno(Cl,Br,I).El compuesto ahora,aunque no tiene afinidad para la enzima,puede servir como agente alquilante al azar,sobre algún grupo alquilable de la proteina enzimática(o de su cofactor).Que esto es así lo confirma el hecho de que todos los compuestos de la Tabla I en que X=halógeno,independientemente del valor de \underline{n} por ahora,inhiben más al preincubar la enzima con el inhibidor que al no preincubar.Además,para un valor de \underline{n} dado(0,1,2,3)el poder inhibidor y el poder alquilante también varían en el orden:



Así,p.e.,cuando $\underline{n} = 0$ se tiene para la inhibición: %

	I	Br	Cl	H
Inhibición sin preincubación	52	27	0	0
Inhibición con preincubación	85,4	81,2	20,4	1

Por último es muy interesante observar lo que ocurre al mantener fijo el resto de la estructura y variar \underline{n} , como se muestra en la tabla que damos a continuación, referida a datos de inhibición % con preincubación y cuyos datos son deducidos de la Tabla I.

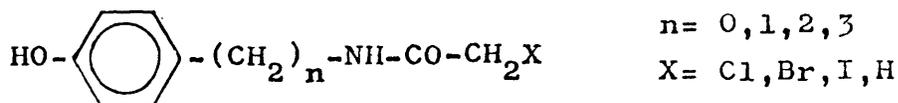
Compuesto	n	Cl	Br	I	H
1	0	20,4	81,2	85,4	1
39	1	11	43	47	2
3	2	11	43	47	0
4	3	9,1	41	46	2

Es decir, el poder inhibitor es independiente de n para aquellos compuestos con $n=1, 2$ o 3 , pero para aquellos compuestos con $n=0$ varía siendo, en cada caso, respectivamente, más activos. Puesto que todos estos productos deben inhibir por alquilación al azar de uno o más grupos de la enzima y no hay razones para suponer que el número, tipo y naturaleza del grupo alquilado varíe de un caso a otro, la única interpretación que se nos ocurre por ahora es un mayor poder electrófilo de los compuestos en que $n=0$, que aumentaría la velocidad de la reacción:



Este efecto podría ser consecuencia de una acción donadora de carga eléctrica por el anillo bencénico, la cual se vería muy disminuida o anulada al intercalar una cadena $(CH_2)_n$ con $n > 0$.

Que esto podría ser así, al menos en parte, lo sugiere el observar los datos de la Tabla II, que hacen referencia a compuestos idénticos a los comentados hasta aquí, en los que se ha introducido un grupo OH (donador de electrones) en posición para.



Todo lo dicho anteriormente para la serie de compuestos sin OH es igualmente aplicable aquí. En efecto y resumiendo:

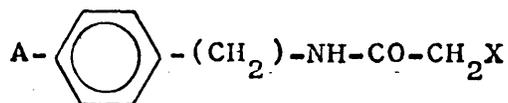
a) Estos compuestos no tienen afinidad para el centro activo de la enzima. El fenol no era inhibitor ni con ni sin prein-

cubación y los compuestos con X=H(Tabla II, compuestos 5,6,7) tampoco.

b) Cuando hay inhibición(X=Cl,Br,I) esta es mayor con preincubación que sin ella.Los compuestos deben actuar por alquilación al azar de algún grupo funcional nucleófilo de la enzima(o de su cofactor).De acuerdo con ello,el poder inhibidor crece en el sentido del poder alquilante,I > Br > Cl > H.

c) La máxima inhibición para un sustituyente X dado(Cl,Br,I) se obtiene con n=0 y es prácticamente constante con n=1,2. Es decir el poder inhibidor es tanto mayor cuanto menor es n.

Si ahora comparamos compuestos de las Tablas I y II se observa que la introducción del OH en para no ha tenido otro efecto que aumentar muy ligeramente,en cualquier caso, el poder alquilante,y como consecuencia la inhibición.Esto no se observa bien cuando n=0 pero si en los compuestos en que n=1 o 2.Por ejemplo,cuando n=1 resulta(ver Tablas I y II):



A	H	Cl	Br	I	
H	0	0	0	0	} Sin preincubación
HO	0	5	0	5	
H	2	11	43	47	} Con preincubación
HO	3	7	53	64	

Parece existir un pequeño efecto favorable a la inhibición por introducción del grupo OH en posición para,aunque

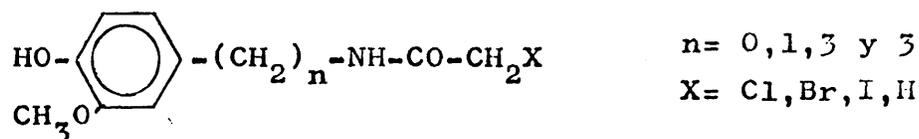
no está claro se deba a su acción donadora de electrones.

Consideremos ahora los compuestos del Subgrupo B. Solamente se han estudiado cuatro compuestos de este tipo y se muestran con sus resultados en la Tabla V (55, 56, 57 y 58). A causa de que el grupo catecol está bloqueado como éteres metilénicos o dimetilénicos, estos compuestos no tienen afinidad para la enzima. Aún siendo alquilantes ($X=Cl, I$), sin preincubación no inhiben, como tampoco inhibía ni con ni sin preincubación el dimetiléter del catecol (Tabla V, compuesto 62). Por su acción alquilante, que debe tener lugar al azar, inhiben apreciablemente con preincubación y el poder inhibitor es comparable a sus análogos estructurales del Subgrupo A ya comentado.

El efecto donador de electrones del grupo metoxi- o del grupo metilendioxi- sobre el anillo bencénico, que podrá aumentar el poder inhibitor de los compuestos de este tipo, no se aprecia claramente y, si tal efecto influye, debe ser muy débilmente, como ocurría, aunque en mayor grado, con el OH en posición para.

COMPUESTOS DEL GRUPO II

Nos referimos a compuestos cuyos datos sobre inhibición se muestran en la Tabla III y referibles a la estructura general:



Consideramos primero productos en los que $X=H$ y que por tanto, no deben actuar como alquilantes (números 8, 9 y 10)

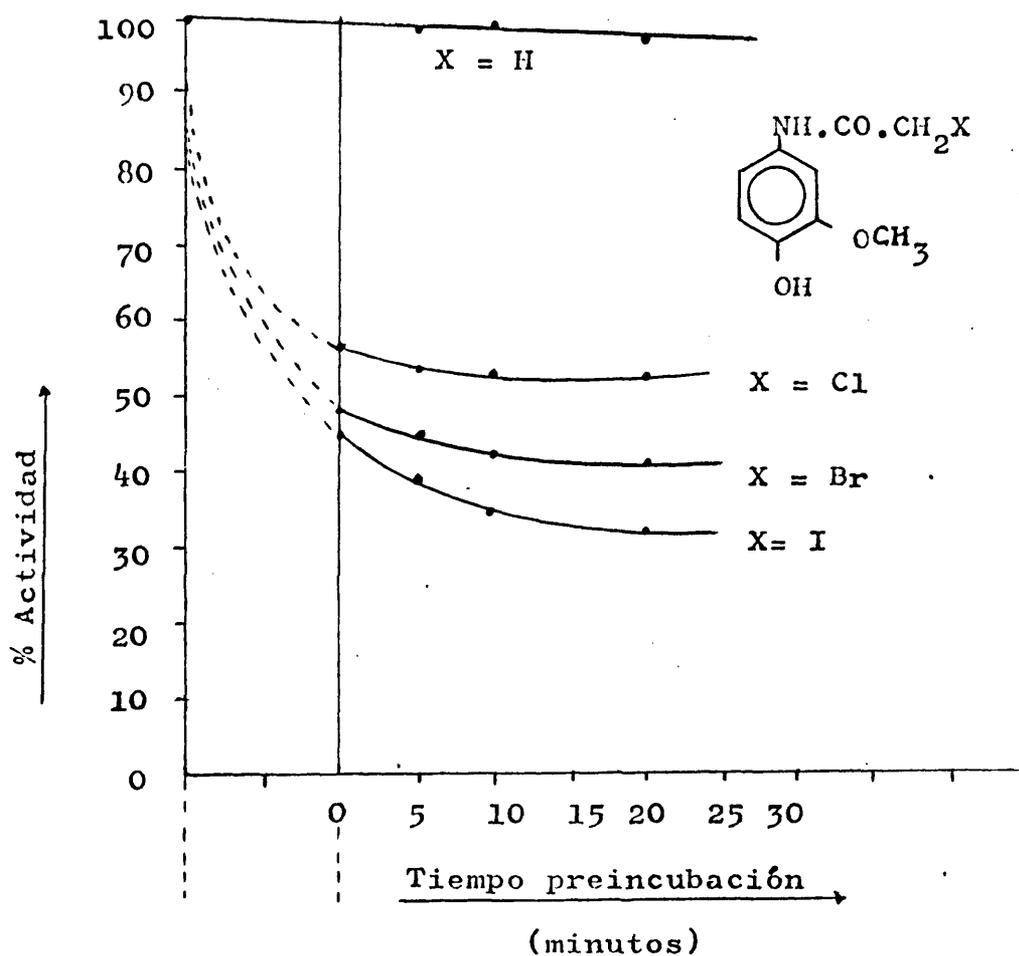
Que esto es así, lo prueba el hecho de que inhiben igualmente con que sin preincubación, como ocurría con el monometiléter del catecol (Tabla V, compuesto 61). Sin embargo, una vez más observamos que la inhibición disminuye al aumentar n . Las máximas inhibiciones se obtienen con $n=0$. Estos compuestos deben poseer una afinidad ligera o media por el centro receptor del catecol en la enzima y, en ausencia de poder alquilante ($X=H$), comportarse de modo análogo al compuesto con su estructura base, el monometiléter del catecol. Así ocurre en efecto.

No encontramos explicación al hecho de que el compuesto nº 8, con $n=0$, sea el más activo entre los que tienen $X=H$, pues un supuesto impedimento estérico por la cadena supondría que el monometiléter del catecol debía ser más activo que el compuesto nº 8 y las cosas ocurren al revés. Pero es claro en ésta como en series precedentes que una cadena con $n=0$ es la más favorable.

Por lo demás, la introducción de X =halógeno (Cl, Br, I), al introducir un grupo alquilante, hace que la inhibición con preincubación sea mayor que sin ella siempre. El efecto de la naturaleza del halógeno es el esperado y observado en series anteriores, y el poder inhibitor por alquilación, para un valor fijo de n , aumenta en el orden:



La figura (3) que damos en la página siguiente ilustra esto muy claramente para los tres compuestos con $n=0$ y $X=Cl, Br, I$. La inhibición con los tres compuestos es progresiva con el tiempo de preincubación y la velocidad de la reacción mayor con el ioduro que con el bromuro y mayor que este con el cloruro.



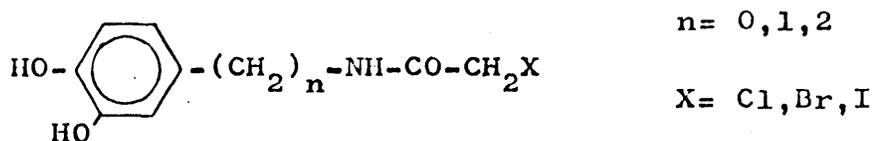
Figura(3)

El efecto inhibitor más potente de estos compuestos, comparados con los del Grupo I, es consecuencia de su mayor afinidad para el centro activo introducida por el agrupamiento monometiléter de catecol y este efecto aumenta aún más (ver Tabla VI, página 116) en los compuestos con grupo catecol que comentamos seguidamente

COMPUESTOS DEL GRUPO III.

Los datos experimentales de inhibición para este tipo

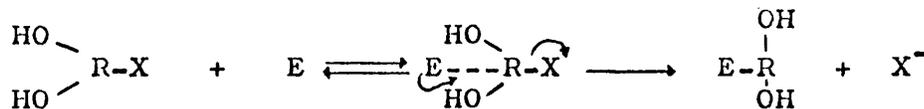
de compuestos aparecen en la Tabla IV. Son todos ellos referibles a la fórmula general:



Toda la discusión y conclusiones obtenidas hasta aquí, son válidas para esta serie de productos, que son los inhibidores más potentes preparados por nosotros.

En ellos, la estructura de catecol aumenta su afinidad para el centro receptor del sustrato catecol en la enzima, y este anclaje del compuesto sobre el centro activo orienta al grupo alquilante (X/H) para llevar a cabo una reacción de alquilación sobre un grupo no identificado de la enzima con la consiguiente inhibición, seguramente irreversible de la misma.

Su mecanismo de acción seguramente puede ser representado como sigue:



Esto es, cada compuesto compleja con el centro activo, probablemente de modo reversible, como ocurre con el catecol mismo, cuya inhibición no depende de si hay o no preincubación. Este complejo evoluciona seguidamente y de modo irreversible a otro en que la estructura base del inhibidor ha quedado asociada a la enzima de modo muy sólido. Es posible, y difícil de probar, que el grupo catecol asociado del modo indicado a la

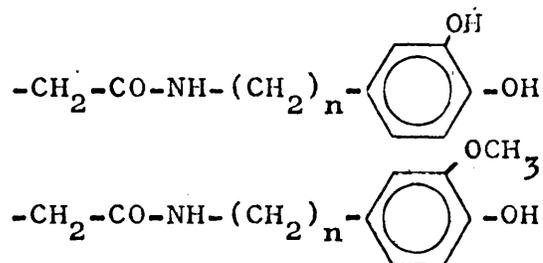
enzima pueda ser metilado por la coenzima según la reacción:



SAM= S-Adenosilmetionina

AHC= Adenosilhomocisteina

pero en cualquier caso la enzima ha quedado irreversiblemente bloqueada a través de un enlace covalente con uno de los grupos:



que a su vez se mantienen unidos al centro activo y de modo reversible por los agrupamientos de catecol o de monometiléter.

La observación de los datos de la Tabla I indican que la interpretación dada es compatible y seguramente no equivocada en relación con los resultados

Como era de esperar después de cuanto se ha discutido y comentado hasta aquí, el compuesto más activo debiera ser y es el siguiente:

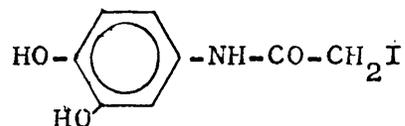
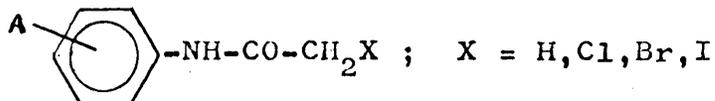


Tabla IV, nº 36

Poco inferior en su poder inhibitor es su análogo clorado (Tabla IV, nº 22).

TABLA VI

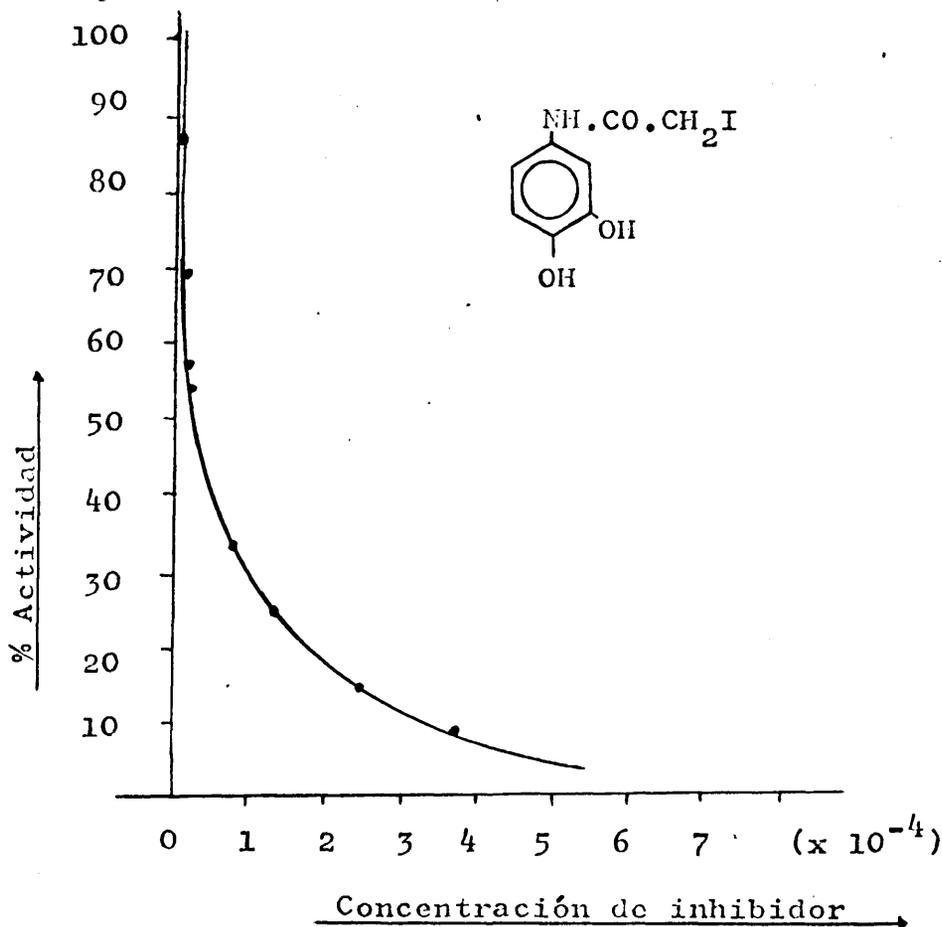
Inhibición de COMT, con y sin preincubación por compuestos de fórmula general:



(Datos de las Tablas I, II, III y IV)

A	H	Cl	Br	I	
H	2	0	27	52	
p-OH	3	14	21	39	Sin preincubación
3-MeO-4-OH	28	68	74	85	
3,4-di-OH	-	76	-	95	
H	1	20	80	85	
p-OH	5	20	69	85	Con preincubación
3-MeO-4-OH	34	100	100	100	
3,4-di-OH	-	100	-	100	

La figura(4) es ilustrativa de la inhibición de la enzima por el derivado iodado. Para una concentración dada, la inhibición es progresiva con el tiempo, como se ilustró en la figura(3) para sus análogos estructurales. Para un tiempo fijo la inhibición aumenta con la concentración.

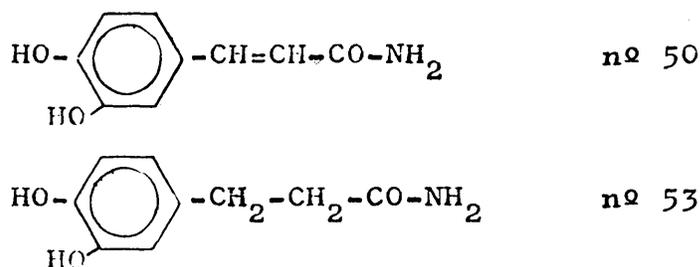


Figura(4)

La Tabla VI, a título de resumen y para las series de compuestos con $n=0$, ilustra la variación gradual en poder inhibidor, expresado en % a medida que aumenta la reactividad del grupo alquilante ($I > Br > Cl > H$) y a medida que se aumenta la afinidad para el centro activo de la enzima. Tablas similares, que reflejan lo mismo, pueden confeccionarse con los datos de las Tablas I a IV, para compuestos con $n=1, 2$ o 3 .

COMPUESTOS DEL GRUPO IV

Aparte de los resultados comentados hasta aquí, la Tabla V (ver página 104) incluye datos sobre inhibición de COMT para algunos otros productos preparados como intermedarios de síntesis y que fueron también objeto de ensayo. Entre ellos los compuestos 50 a 54 no han sido comentados hasta ahora. De ellos solamente muestran inhibición a concentración $5 \cdot 10^{-4} M$ los dos productos siguientes:



La inhibición por ambos es la misma con que sin preincubación y resulta explicable en función de su estructura de derivados de catecol, que los hace afines para la enzima. Lo que no resulta claro es porqué el compuesto 50 es mejor inhibidor que el 53, cuando solo difieren en el doble enlace de la cadena, mientras que el compuesto 51, que también presenta la insaturación en la cadena como el número 50, no es inhibidor. Esta cuestión requiere posterior investigación con series más amplias de productos.

Independientemente, la confirmación definitiva del mecanismo de inhibición de la enzima por los agentes alquilantes que hemos estudiado exige un estudio cinético de inhibición como continuación lógica al trabajo descrito por nosotros en esta memoria. Este estudio cinético y mecanístico se encuentra ahora en curso de realización.

APENDICE

TABLAS CARACTERISTICAS DE LOS ESPECTROS IR Y RMN DE N-HA-
LOGENOACETIL-ARILALQUILAMINAS E INTERMEDIARIOS EN SU SIN-
TESIS.

TABLA I

Absorción IR de intermediarios para la síntesis de N-halogenoacilarilalquilaminas

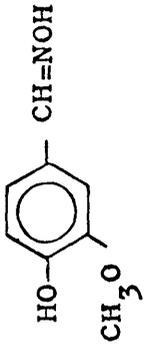
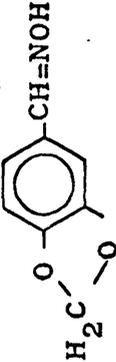
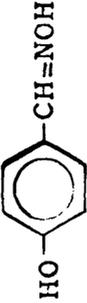
compuesto nº	Fórmula	Absorción cm^{-1}	Asignaciones
1		3300 1510 1250-1300 830-845	tensión OH " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática
2		3100 1520 1175-1200 815-850	tensión OH " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática
3		3380 1525 1270 830	tensión OH " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,4 disustitución aromática

TABLA I (continuación)

Compuesto n ^o	Fórmula	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
4	$\text{N}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OOC}\cdot\text{CH}_3$	1510 1325 1750 1200 870	tensión N-O antisimétrica " N-O simétrica " C=O ester " C-O 1,4 disustitución aromática
5	$\text{N}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OOC}\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$	1780 1515 1325 1160 875	tensión C=O ester " N-O antisimétrica " N-O simétrica " C-O 1,4 disustitución aromática
6	$\text{CH}_2\text{Cl}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}_2$	3300 1650 1580	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH

TABLA I (continuación)

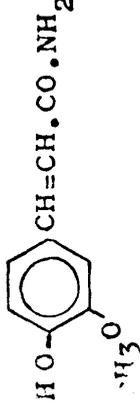
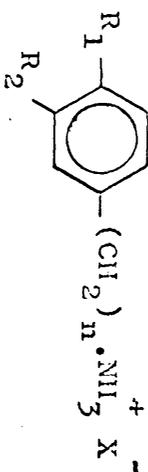
Compuesto nº	Fórmula	Absorción cm^{-1}	Asignaciones
7		<p>3310 1675 1515 1210-1245 825-870</p>	<p>tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O 1,2,4 trisustitución aromática</p>
8		<p>3310-3400 1660 1590 1235 830</p>	<p>tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,4 disustitución aromática</p>
9		<p>3110-3500 1655 1595 1270 815-845</p>	<p>tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática</p>

TABLA I (continuación)

Compuesto nº	Fórmula	Absorción cm^{-1}	Asignaciones
10	$\text{CH}_2\text{Cl} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH}$	3380-3320 1655 1540 1095	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH
11	$\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$	3050-3400 1750 1650 1200	tensión OH " C=O acido " C=O amida " C-O y flexión OH
12		3210 1640 1545 1130 820-860	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O 1,2,4 trisustitución

TABLA II

Absorción IR de Arilalquilaminas



Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	X	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
1	-OH	H	1	Cl	2600-3200	tensión NH ₃ ⁺ y OH
					1580	flexión NH ₃ ⁺ antisimétrica
					1250	tensión C-O y flexión OH
2	-OH	-OCH ₃	0	Cl	840	1,4 disustitución aromática
					765	rocking NH ₃ ⁺
					2700-3350	tensión NH ₃ ⁺ y OH
					1545	" C-N y flexión NH
3	-OH	-OCH ₃	1	Cl	1210	" C-O y flexión OH
					780	rocking NH ₃ ⁺
					800-850	1,2,4 trisustitución aromática
3	-OH	-OCH ₃	1	Cl	1000-3100	tensión NH ₃ ⁺ y OH
					1390	flexión NH ₃ ⁺ antisimétrica

TABLA II (continuación)

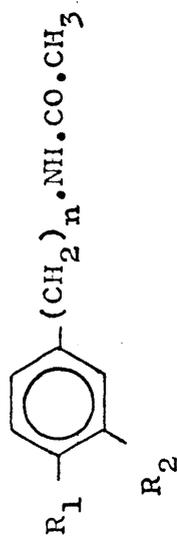
Compuesto n ^o	R ₁	R ₂	n	X	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
4	-OH	-OCH ₃	2	Cl	2700-3125 1595 1250-1275 820-870 790	tensión NH ₃ ⁺ y OH flexión NH ₃ ⁺ antisimétrica tensión C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática rocking NH ₃ ⁺
5	-OH	-OCH ₃	3	Cl	2600-3110 1590 11200 815-850 800	tensión NH ₃ ⁺ y OH flexión NH ₃ ⁺ antisimétrica tensión C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática rocking NH ₃ ⁺
6	-OH	-OH	0	Br	2610-3300 1600 1175 815-875 785	tensión NH ₃ ⁺ flexión NH ₃ ⁺ antisimétrica tensión C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática rocking NH ₃ ⁺

TABLA II (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	X	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
7	-OH	-OH	1	Br	2610-3310	tensión NH ₂ ⁺ y OH
					1580	flexión NH ₂ ⁺ antisimétrica
					1200	tensión C-O y flexión OH
					830-880	1,2,4 trisustitución aromática
8	-OH	-OH	3	Br	2750-3350	tensión NH ₂ ⁺ y OH
					1585	flexión NH ₂ ⁺ antisimétrica
					1175	tensión C-O y flexión OH
					800-865	1,2,4 trisustitución aromática
					792	rocking NH ₂ ⁺

TABLA III

Absorción IR de N-acetilalquilaminas



Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
1	H	H	0	3300 1652 1550 695-760	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
2	H	H	1	3300 1660 1555 695-760	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
3	H	H	2	3390 1655 1545 700-740	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
4	H	H	3	3300 1650 1550 695-745	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática

TABLA III (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
5	-OH	H	0	3100-3350	tensión NH y OH
				1650	C=O amida
				1560	C-N y flexión NH
				1220-1250	C-O y flexión OH
				840	1,4 disustitución aromática
6	-OH	H	1	3090-3250	tensión NH y OH
				1655	C=O amida
				1550	C-N y flexión NH
				1200-1250	C-O y flexión OH
				830	1,4 disustitución aromática
7	-OH	H	2	3090-3300	tensión NH y OH
				1625	C=O amida
				1560	C-N y flexión NH
				1245	C-O y flexión OH
				810	1,4 disustitución aromática

1281

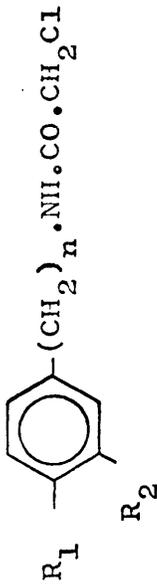
TABLA III (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
8	-OH	-OCH ₃	0	3500 1650 1560 1220-1270 815-855	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática
9	-OH	-OCH ₃	1	3340-3250 1640 1560 1215-1275 815-850	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática
10	-OH	-OCH ₃	2	3450-3500 1650 1555 1250 820-860	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática

1129

TABLA I V

Absorción IR de N-cloroacetilarilalquilaminas



Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
11	H	H	0	3300 3100 1662 1560 760-695	tensión NH trans tensión NH cis " C=O amida " C-N y flexión N-H monosustitución aromática
12	H	H	1	3305 1645 1550 700-745	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
13	H	H	2	3325 1637 1540 700-755	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
14	H	H	3	3300 1645 1580 700-750	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática

TABLA IV (continuación)

compuesto n ^o	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
15	-OH	H	0	3450-3110	tensión NH y OH
				1655	" C=O amida
				1545	" C-N y flexión NH
				1175-1255	" C-O y flexión OH
				835	1,4 disustitución aromática
16	-OH	H	1	3325-3100	tensión NH y OH
				1610	" C=O amida
				1540	" C-N y flexión NH
				1200-1180	" C-O y flexión OH
				825	1,4 disustitución aromática
17	-OH	H	2	3330-3100	tensión NH y OH
				1655	" C=O amida
				1540	" C-N y flexión NH
				1250-1210	" C-O y flexión OH
				820	1,4 disustitución aromática

TABLA IV (continuación)

compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
18	-OH	-OCH ₃	0	3300 1650 1555 1240 820-850	tensión NH y OH tensión C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,3,4 trisustitución aromática
19	-OH	-OCH ₃	1	3350 3250 1660 1556 1250-1190 825-850	tensión OH " NH " C=O " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,3,4 trisustitución aromática
20	-OH	-OCH ₃	2	3500-3340 1645 1550 1245-1255 825-865	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,3,4 trisustitución aromática

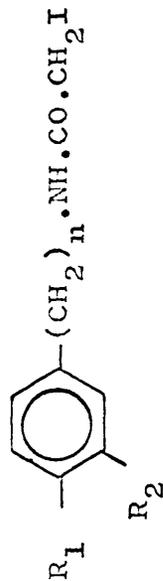
TABLA IV (continuación)

compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
21	-OH	-OCH ₃	3	3450-3340	tensión NH y OH
				1640	C=O amida
				1545	C-N y flexión NH
				1250	C-O y flexión OH
				820-855	1,3,4 trisustitución aromática
22	-OH	-OH	0	3000-3500	tensión NH y OH
				1640	C=O amida
				1550	C-N y flexión NH
				1250-1200	C-O y flexión OH
				810-870	1,2,4 trisustitución aromática
23	-OH	-OH	1	5250-3460	tensión NH y OH
				1650	C=O
				1535	C-N y flexión NH
				1260-1280	C-O y flexión OH
				820-880	1,2,4 trisustitución aromática
24	-OH	-OH	2	3235-3530	tensión NH y OH
				1655	C=O
				1545	C-N y flexión NH
				1260-1280	C-O y flexión OH
				830-870	1,2,4 trisustitución aromática

- 133 -

TABLA V

Absorción IR de N-iodoacetilarilalquilaminas



Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
25	H	H	0	3300 1650 1550 695-715	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
26	H	H	1	3290 1650 1545 690-760	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
27	H	H	2	3225 1650 1550 700-750	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
28	H	H	3	3230 1645 1550 700-745	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática

TABLA V (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
29	-OH	H	0	3400-3000	tensión NH y OH
				1650	" C=O amida
				1550	" C-N y flexión NH
				1250	tensión C-O y flexión OH
				840	1,4 disustitución aromática
30	-OH	H	1	3310-3210	tensión NH y OH
				1610	" C=O amida
				1550	" C-N y flexión NH
				1240	" C-O y flexión OH
				815	1,4 disustitución aromática
31	-OH	H	2	3300	tensión NH y OH
				1648	" C=O amida
				1540	" C-N y flexión NH
				1250	" C-O y flexión OH
				830	1,4 disustitución aromática

TABLA V (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
32	-OH	-OCH ₃	0	3450-3300	tensión NH y OH
				1640	C=O amida
				1560	C-N y flexión NH
				1260	C-O y flexión OH
				815-850	1,2,4 trisustitución aromática
33	-OH	-OCH ₃	1	3300-3050	tensión NH y OH
				1650	C=O amida
				1555	C-N y flexión NH
				1215-1275	C-O y flexión OH
				820-845	1,2,4 trisustitución aromática
34	-OH	-OCH ₃	2	3300-3250	tensión NH y OH
				1645	C=O amida
				1560	C-N y flexión NH
				1250	C-O y flexión OH
				810-860	1,3,4 trisustitución aromática
35	-OH	-OCH ₃	3	3400-3300	tensión NH y OH
				1640	C=O amida
				1550	C-N y flexión NH
				1260	C-O y flexión OH
				820-855	1,2,4 trisustitución aromática

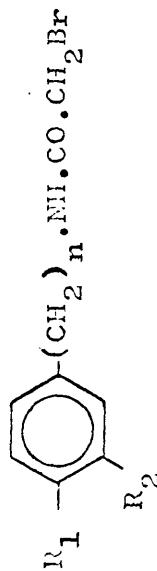
11361

TABLA V (continuación)

compuesto n ^o	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
36	-OH	-OH	0	5100-3450	tensión NH y OH
				1620	" C=O amida
				1555	" C-N y flexión NH
				1260-1 275	" C-O y flexión OH
				810-875	1,2,4 trisustitución aromática
37	-OH	-OH	1	3100-3400	tensión NH y OH
				1615	" C=O amida
				1540	" C-N y flexión NH
				1250-1300	" C-O y flexión OH
				825-870	1,2,4 trisustitución aromática
38	-OH	-OH	2	3400-3465	tensión NH y OH
				1630	" C=O amida
				1250-1270	" C-O y flexión OH
				1545	" C-N y flexión NH
				820-870	1,2,4 trisustitución aromática

TABLA VI

Absorción IR de N-bromoacetilalquilalquilaminas



Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
39	H	H	0	3300 1650 1550 765-697	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
40	H	H	1	3300 1645 1555 685-745	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
41	H	H	2	3290 1650 1560 700-750	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática
42	H	H	3	3300 1640 1550 700-765	tensión NH " C=O amida " C-N y flexión NH monosustitución aromática

TABLA VI (continuación)

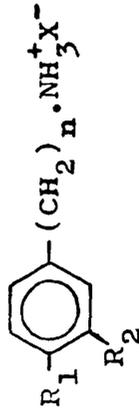
Compuesto no	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
43	-OH	-OCH ₃	0	3400-3250 1652 1560 1220-1270 810-850	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática
44	-OH	-OCH ₃	1	3315-3100 1650 1545 1200 820-850	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática
45	-OH	-OCH ₃	2	3100-3400 1640 1550 1175-1275 800-860	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática
46	-OH	-OH	1	3455-3220 1645 1255-1280 810-845	tensión NH y OH " C=O amida " C-O y flexión OH 1,2,4 trisustitución aromática

TABLA VI (continuación)

compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Absorción cm ⁻¹	Asignaciones
47	-OH	H	0	3350-3100 1652 1550 1220-1275 830	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,4 disustitución aromática
48	-OH	H	1	3360-3300 1610 1555 1200-1175 835	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,4 disustitución aromática
49	-OH	H	2	3090-3300 1650 1550 1200-1250 835	tensión NH y OH " C=O amida " C-N y flexión NH " C-O y flexión OH 1,4 disustitución aromática

TABLA VII

Espectros de RNM de Arilalquilaminas



compuesto nº	R ₁	R ₂	n	X	Valores τ	Multiplicidad-Valores J (cps)	Asignaciones
1	-OH	-OCH ₃	0	-	6,32 3,4-4,0 5,6	Singlete Multiplere Señal ancha	3H: -OCH ₃ 3H: C ₆ H ₅ 2H: NH ₂
2	-OH	-OCH ₃	1	Cl	6,23 6,10 3,12 2,75 1,30	Singlete Singlete Singlete Singlete Señal ancha	3H: -OCH ₃ 2H: -CH ₂ 2H 3H: -C ₆ H ₅ 1H 4H: -OH, -NH ₃ ⁺
3	-OH	-OCH ₃	2	Cl	7,70-7,30 7,20-6,95 6,23	Multiplere Señal ancha Singlete	2H: -CH ₂ -C ₆ H ₅ 2H: -CH ₂ -N 3H: -OCH ₃

TABLA VII (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	X	Valores Z	Multiplicidad-Valores J(cps)	Asignaciones	
4					3,50-3,05	Multiplete	3H: -C ₆ H ₅	
					2,10-1,20	Señal ancha	3H: -NH ₃	
					Cl	8,50-7,80	Multiplete	2H: -C-CH ₂ -C
						7,60-7,00	Multiplete	4H: -CH ₂ -Ar, CH ₂
						6,26	Singlete	3H: -OCH ₃
						3,60-3,10	Multiplete	3H: -C ₆ H ₅
						1,80	Señal ancha	3H: -NH ₃
1,25	Singlete	1H: -OH						
5	-OH	-H _D	1	Cl	6,13	Singlete	2H: -CH ₂ -C ₆ H ₅	
					3,18	Doblete	2H: -H _A H _C	
					2,65	Doblete	2H: -H _B H _D	

TABLA VII (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	X	Valores τ	Multiplicidad-Valores J(cps)	Asignaciones
6	-OH	-OH	0	Br	3,60-2,95	Multiplete	3H: -C ₆ H ₅
					0,20	Señal muy ancha	5H: -NH ₃ ⁺ , 2-OH
7	-OH	-OH	1	Br	6,17	Singlete	2H: -CH ₂ -C ₆ H ₅
					3,22	Singlete	2H: 3H aromático
					3,13	Singlete	1H:
					2,20-0,90	Señal muy ancha	5H: 2-OH, NH ₃ ⁺
8	-OH	-OH	3	Br	8,60-7,85	Multiplete	2H: -C-CH ₂ -C-
					7,80-7,00	Multiplete	4H: -CH ₂ Ar, -CH ₂ N
					3,75-3,10	Multiplete	3H: -C ₆ H ₅
					1,80	Señal muy ancha	5H: -NH ₃ ⁺ , 2-OH

TABLA VIII

Espectros de RNM de N-acetilalquilaminas



Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Valores τ	Multiplicidad-Valores J(cps)	Asignaciones
1	H	H	0	7,87	Singlete	3H -CO.CH ₃
				2,6-3,2	Señal ancha	1H -NH
				3,3	Singlete	5H -C ₆ H ₅
2	H	H	1	8,02	Singlete	3H -CO.CH ₃
				5,6	Dobleto J=7cps	2H -CH ₂ .N
				2,7	Singlete	5H -C ₆ H ₅
				2,2-2,6	Señal ancha	1H -NH
3	H	H	2	8,09	Singlete	3H -CO.CH ₃
				7,2	Triplete J=7cps	2H -CH ₂ .C ₆ H ₅
				6,48	Cuartete J=7cps	2H -CH ₂ .N
				3,7-4,5	Señal ancha	1H -NH
				2,71	Singlete	5H aromáticos

TABLA VIII (continuación)

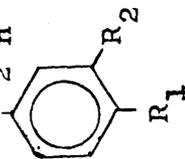
Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Valores τ	Multipl. - Valores J (cps)	Asignaciones				
4	OH	H _D	2	8,25	Singlete	3H -CO.CH ₃				
				7,22-7,60	Multiplete	2H -CH ₂ .C ₆ H ₅				
				6,60-7,01	Multiplete	2H -CH ₂ -N				
				3,3	Doblete J=8cps	2H H _A H _C				
				2,97	Doblete J=8cps	2H H _B H _D				
				2-2,3	Señal ancha	1H -NH				
				0,85	Singlete	1H -OH				
				5	OH	OCH ₃	0	8,03	Singlete	3H -CO.CH ₃
								6,29	Singlete	3H -OCH ₃
3,45-2,65	Multiplete	3H -C ₆ H ₅								
1,0-2	Señal ancha	1H -NH								
0,40	Singlete	1H -OH								
6	OH	OCH ₃	1					8,17	Singlete	3H -CO.CH ₃
								6,24	Singlete	3H -OCH ₃
								5,85	Doblete	2H -CH ₂ -N
								3,00-3,40	Multiplete	3H -C ₆ H ₅
				1,83	Señal ancha	1H -NH				
				1,20	Singlete	1H -OH				

TABLA VIII (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Valores	Multiplicidad-Valores J(cps)	Asignaciones
7	H	H	3	8,00	Cuartete J=7cps	2H -CH ₂ -
				7,85	Singlete	3H -CO.CH ₃
				7,33	Triplete J=7cps	2H -CH ₂ .C ₆ H ₅
				6,70	Multiplete	2H -CH ₂ .N
				2,80	Singlete	5H -C ₆ H ₅
				2-1,1	Señal ancha	1H -NH
8	OH	H _D	0	8,1	Singlete	3H -CO.CH ₃
				3,32	Doblete J=8cps	2H H _A C
				2,66	Doblete J=8cps	2H H _B D
				0,098	Singlete	1H -NH
				0,035	Singlete	1H -OH
				8,2	Singlete	3H -CO.CH ₃
9	OH	H _D	0	8,2	Singlete	3H -CO.CH ₃
				5,9	Doblete J=6,5cps	2H -CH ₂ .C ₆ H ₅
				3,33	Doblete J=8cps	2H H _A C
				2,92	Doblete J=8cps	2H H _B D
				2,1-1,1	Señal ancha	1H -NH
				0,75	Singlete	1H -OH

TABLA IX

Espectros de RNM de N-cloroacetilarilalquilaminas



Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Valores δ	Multiplicidad	Valores J (cps)	Asignaciones
11	H	H	0	5,85	Singlete		-CH ₂ Cl
				2,74	Singlete		-C ₆ H ₅
				2,50	Señal ancha		-NH
12	H	H	1	5,80	Singlete		-CH ₂ Cl
				5,53-5,43	Dobleto	J=6,5 cps	-CH ₂ N
				2,63	Singlete		-C ₆ H ₅
13	H	H	2	7,11	Triplete	J=7 cps	-CH ₂ ·C ₆ H ₅

TABLA IX (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Valores τ	Multiplicidad-Valores J(cps)	Asignaciones
14	H	H	2	6,20-6,65	J=7 cps	2H -CH ₂ N
				5,95		2H -CH ₂ Cl
				2,68		5H -C ₆ H ₅
14	H	H	3	8,10	J=7cps	2H -C-CH ₂ -C
				7,33		2H -CH ₂ ·C ₆ H ₅
				6,68		2H -CH ₂ ·NH
				6,05		2H -CH ₂ Cl
				2,27		5H -C ₆ H ₅
15	-OH	H _B	0	5,88		2H -CH ₂ Cl
				3,32	J _{AB} =8cps	2H H _B
				2,64	J _{AB} =8cps	2H -H _A
				0,93		1H -NH
				0,11		1H -OH

TABLA IX (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Valores τ	Multiplicidad-Valores J(cps)	Asignaciones	
16	-OH	H _B	1	5,93	Singlete	2H	-CH ₂ Cl
				5,86-5,78	Doblete	2H	-CH ₂ N
				3,30	Doblete	2H	-H _A
				2,90	Doblete	2H	-H _B
				1,45	Señal ancha	1H	-NH
				0,73	Singlete	1H	-OH
				17	-OH	H _B	2
6,50-6,90	Multiplete	2H	-CH ₂ -N				
5,96	Singlete	2H	-CH ₂ Cl				
3,33	Doblete	2H	-H _A				
2,98	Doblete	2H	-H _B				
1,80	Señal ancha	1H	-NH				
0,87	Señal ancha	1H	-OH				

TABLA IX (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Valores τ	Multiplicidad-Valores J(cps)	Asignaciones	
18	-OH	-OCH ₃	0	6,25	Singlete	3H	-OCH ₃
				5,87	Singlete	2H	-CH ₂ Cl
				3,27	Doblete	1H	-HC
							J _{CD} =8cps
							J _{CA} =0cps
				2,97	Cuartete	1H	J _{DC} =8cps
							J _{DA} =0cps
							-H _D
19	-OH	-OCH ₃	1	6,23	Singlete	3H	-OCH ₃
				5,89	Singlete	2H	-CH ₂ Cl
				5,77	Doblete	2H	-CH ₂ -N
				3,55-3,00	Multiplete	3H	aromaticos
				1,42	Señal ancha	1H	-NH
				1,18	Singlete	1H	-OH
							-H _A
							-NH

TABLA IX (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Valores τ	Multiplicidad-Valores J(cps)	Asignaciones
19	-OD	-OCH ₃	1	6,23	Singlete	3H -OCH ₃
				5,89	Singlete	2H -CH ₂ Cl
				5,78	Singlete	2H -CH ₂ -N
				3,35-3,00	Multiplete	3H aromaticos
20	-OH	OCH ₃	2	7,15-7,55	Multiplete	2H -CH ₂ -C ¹ H ₆ ⁵
				6,45-6,90	Multiplete	2H -CH ₂ -N ⁵
				6,21	Singlete	3H -OCH ₃
				5,95	Singlete	2H -CH ₂ Cl
				3,15-3,35	Multiplete	3H aromaticos
				1,80	Señal ancha	1H -NH
				1,32	Singlete	1H -OH
21	-OH	-OCH ₃	3	6,25	Multiplete	2H C-CH ₂ -C
				7,30-7,70	Multiplete	2H -CH ₂ -C ⁶ H ₅
				6,90	Multiplete	2H -CH ₂ -N

TABLA IX (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Valores τ	Multiplidad-Valores J(cps)	Asignaciones
22	-OH	-OCH ₃	3	6,21	Singlete	3H -OCH ₃
				5,94	Singlete	2H -CH ₂ Cl
				3,15-3,40	Multiplete	3H aromáticos
				1,80	Singlete ancho	1H -NH
				1,38	Singlete	1H -OH
		-OH	-OH	5,82	Singlete	2H -CH ₂ Cl
				3,35	Doblete	1H -H _e
					J _{CD} =8cps J _{CA} =0cps	
				3,15	Cuartete	1H -H _D
					J _{DC} =8cps J _{DA} =2,5cps	
			2,85	Doblete	1H -H _A	
				J _{AD} =2,5cps J _{AC} =0cps		
			0,80-1,70	Señal muy ancha	1H -NH	
			0,10	Señal ancha	1H -OH	

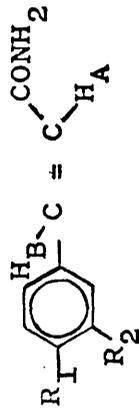
-1152-

TABLA IX (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	n	Valores τ	Multipl. J(cps)	Asignaciones
23	-OH	-OH	1	5,83	Singlete	2H -CH ₂ Cl
				5,78	Doblete J=6cps	2H -CH ₂ -N
				3,00-3,50	Multiplete	3H aromaticos
				1,30	Señal ancha	1H -NH
				1,05	Señal ancha	2H -2 OH
23'	-OD	-OD	1	5,80	Singlete	2H -CH ₂ Cl
				5,70	Singlete	2H -CH ₂ -N
				3,00-3,40	Multiplete	3H aromaticos
24	-OH	-OH	2	7,21-7,60	Multiplete	2H -CH ₂ -C ₆ H ₅
				6,50-7,00	Multiplete	2H -CH ₂ -N
				5,96	Singlete	2H -CH ₂ Cl
				3,20-3,70	Multiplete	3H aromaticos
				1,60-2,00	Señal ancha	1H -NH
			1,55-1,10	Señal ancha	2H -2 -OH	

TABLA X

Espectros de RNM de cinamamidas



Compuesto nº	R ₁	R ₂	Valores τ	Multiplicidad-Valores J(cps)	Asignaciones
50	-OCH ₃	-OCH ₃	6,22	Singlete	6H: 2 -OCH ₃
			3,52	Doblete J _{AB} =17cps	1H: H _A
			3,15-2,75	Multiplete	3H: aromáticos
			2,65	Doblete J _{AB} =17cps	1H: H _B
			3,20-2,40	Señal muy ancha	2H: -NH ₂
51	-OH	-OCH ₃	6,20	Singlete	3H: -OCH ₃
			3,60	Doblete J _{AB} =16cps	1H: -H _A
			3,30-2,80	Multiplete	3H: aromáticos
			2,63	Doblete J _{AB} =16cps	1H: -H _B
			3,30-2,40	Señal muy ancha	2H: -NH ₂
			0,60	Señal muy ancha	1H: -OH

TABLA X (continuación)

Compuesto nº	R ₁	R ₂	Valores τ	Multiplicidad-Valores J(cps)	Asignaciones
52	-OH	-OH	3,65	Doblete J _{AB} =15cps	1H: -H _A
			3,40-2,90	Multiplete	3H: aromáticos
			2,69	Doblete J _{BA} =15cps	1H: -H _B
			2,40	Señal ancha	2H: -NH ₂
			1,0	Señal muy ancha	2H: -OH

1
15
5
1

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El trabajo experimental que se describe en esta memoria como Tesis Doctoral es una contribución al trabajo global que desde hace algunos años se viene realizando en la Sección de Enzimoquímica, Departamento de Productos Naturales, del Instituto de Química Orgánica General, sobre síntesis y estudio de nuevos inhibidores de las enzimas que catalizan la inactivación de las aminas biógenas y que pudieran tener alguna aplicación en clínica. Los resultados que aquí se exponen son los primeros en relación con la Catecol-O-metiltransferasa (CONT).

El objeto de esta memoria es exponer los resultados obtenidos por el Doctorando acerca de la síntesis, caracterización y estudios in vitro como inhibidores de CONT de una serie de N-halogenoacetil-arilalquilaminas y compuestos relacionados. La elección de estas estructuras como objeto de nuestro trabajo se justifica por los dos puntos siguientes:

- a) El interés potencial de los inhibidores de CONT como agentes de bloqueo metabólico de catecolaminas.
 - b) La no existencia de inhibidores de CONT de tipo irreversible y como consecuencia la falta de interés terapéutico de los inhibidores conocidos.
- 1º. Hemos preparado una serie de aril-alquilaminas como productos de partida en la síntesis de N-halogenoacetil-arilalquilaminas con distintas longitudes de la cadena lateral ($n=0, 1, 2$ y 3). La síntesis de estos productos, que ha seguido cursos diferentes según las características de las cadenas laterales, se detalla en las conclusiones siguientes.

- 2º Para las aminas con $n=0$ hemos seguido un método descrito en la bibliografía que consiste en hacer reaccionar guayacol con ácido sulfanílico diazotado previamente y posterior ruptura del azoderivado formado con SH_2 en medio amoniacal. Los rendimientos obtenidos son del orden del 70%.
- 3º Las aminas con $n=1$ han sido preparadas por reducción de las oximas correspondientes con Na y alcohol. Los rendimientos obtenidos en estas reducciones nunca han sido mayores del 65%.
- 4º Las aminas con $n=2$ se han sintetizado por reducción de los β -nitroestirenos, previamente preparados por nosotros, con LiAlH_4 y aislándolas de la mezcla de reacción como picratos, que posteriormente hemos transformado en hidroccloruros mediante tratamiento con ácido clórhídrico. Los hidroccloruros se obtienen así en estado de alta pureza y con rendimientos del orden del 70%.
- 5º Las aminas con $n=3$ se han preparado por reducción de las correspondientes cinamamidas preparadas previamente por nosotros, con LiAlH_4 . El procedimiento seguido para su purificación es el mismo que se describe en la conclusión precedente para las aminas con $n=2$.
- 6º Las catecolaminas se han sintetizado por desmetilación de

los compuestos 4-hidroxi-3-metoxi sustituidos con BrH al 48%. Se han aislado como hidrobromuros y los rendimientos varían mucho de unos compuestos a otros. Se han estudiado diferentes métodos de protección del grupo catecol, encontrándose como más satisfactorio la formación de su complejo con borato.

7º La acilación de las aminas sin sustituyentes OH en el anillo aromático se ha llevado a cabo con cloruro de cloroacetilo en benceno, a una temperatura de 0°C, en soluciones muy diluidas para evitar la formación de dímeros. Los rendimientos son del orden del 90%.

8º La acilación de las aminas con sustituyentes OH en el anillo aromático se ha llevado a cabo mediante el empleo de esteres activos, concretamente esteres p-nitrofenílicos. Estos esteres han dado muy buenos resultados como agentes de acilación, ya que reaccionan muy bien con grupos NH_2 y no lo hacen con grupos OH. Los rendimientos obtenidos han sido del orden del 70%.

9º Las N-iodoacetil-arilalquilaminas han sido preparadas a partir de las N-cloroacetil-arilalquilaminas correspondientes, calentadas a reflujo con IK, en acetona seca. Esta reacción ha resultado satisfactoria para todos los productos prepara-

dos, aunque los que poseen la estructura catecol se obtienen con rendimientos más bajos, ya que se resinifican algo por calefacción.

- 10º Las N-bromoacetil-arilalquilaminas han sido preparadas a partir de las N-iodoacetil-arilalquilaminas correspondientes, calentadas con BrAg en acetona seca. Esta reacción ha resultado satisfactoria para todos los productos preparados, si bien los que incluyen en su estructura la agrupación catecol se obtienen con rendimientos bajos.
- 11º Todas las N-halogenoacetil-arilalquilaminas han sido obtenidas en forma pura, con análisis elemental correcto y caracterizadas por el estudio de sus espectros de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear que se reúnen en Tablas I a IX y se discuten en el texto.
- 12º Todas las N-halogenoacetil-arilalquilaminas y algunos productos intermediarios en su síntesis han sido sometidas a estudio in vitro como inhibidores de COMT extraída de hígado de rata. Como método de ensayo para la medida de actividad enzimática hemos utilizado uno descrito por Anderson y D'Iorio que utiliza pirocatecolftaleina como sustrato cromógeno y S-Adenosilmetionina como donador de grupo metilo. Cada pro-

ducto se ensayó sistemáticamente a concentración $5 \cdot 10^{-4} M$ sin preincubación previa de la enzima con el inhibidor o con 20 minutos de preincubación. Esto ha supuesto la puesta a punto previa de la técnica de ensayo.

13º Los productos ensayados como inhibidores de esta enzima los hemos clasificado en cuatro grupos:

I.-Compuestos sin afinidad para el centro receptor del catecol, con y sin poder alquilante.

II.-Compuestos cuya afinidad por el centro receptor del catecol prevemos débil o no existente, con y sin poder alquilante.

III.-Compuestos con afinidad para el centro receptor del catecol, con y sin poder alquilante.

IV.-Compuestos diversos.

14º Los compuestos del Grupo I, que no poseen poder alquilante, no inhiben la actividad de la enzima ni con ni sin preincubación. Los compuestos pertenecientes a este grupo que tienen poder alquilante inhiben más al preincubar la enzima con el inhibidor que al no preincubar, variando el poder inhibidor en el orden: $I > Br > Cl > H$

Las mejores inhibiciones son para longitud de cadena $n=0$.

15º Los compuestos no alquilantes del Grupo II presentan algo

de inhibición pero esta no aumenta al preincubar previamente la enzima con el inhibidor. La introducción del grupo alquilante aumenta el poder inhibidor de estos compuestos y hace que la inhibición sea siempre mayor con preincubación que sin ella. También varía en el orden: $I > Br > Cl \gg H$.

El efecto inhibidor más potente de estos compuestos, comparados con los del Grupo I, es consecuencia de su mayor afinidad por el centro activo introducida por el agrupamiento monometiléter de catecol y este efecto aumenta aún más en los compuestos que incluyen en su estructura la agrupación catecol que comentamos seguidamente.

- 16º Los compuestos que presentan en su estructura la agrupación catecol, (Grupo III) de acuerdo con lo esperado, han resultado ser los mejores inhibidores de COMT. De igual forma que en los productos comentados anteriormente, la inhibición no aumenta con la preincubación en los compuestos no alquilantes y para los compuestos alquilantes la inhibición aumenta con el tiempo de preincubación variando en el orden: $I > Br > Cl$. La máxima inhibición se obtiene con N-iodoacetil-3,4-dihidroxibencilamina.
- 17º En el Grupo IV, hemos incluido productos diversos, ensayados como inhibidores de COMT y que no pertenecen a ninguno de los grupos expuestos anteriormente. De este grupo los únicos que han resultado interesantes son la 3,4-dihidroxicinamamida y la 3,4-dihidroxi- γ -fenilpropionamida. Los dos inhiben lo mismo con que sin preincubación, pero no resulta explicable porqué es mejor inhibidor el primero cuando solo difieren en un doble enlace
- 18º Los resultados descritos en esta memoria y la interpreta-

ción de los mismos sugiere la presencia en el centro activo de CONT o contiguo al mismo de un grupo nucleófilo alquilable de modo irreversible por halogenoacetil-arilalquilaminas con afinidad para el centro activo. Los resultados obtenidos establecen la línea a seguir para la síntesis de inhibidores específicos e irreversibles de la enzima, dirigidos al centro activo y de posible interés terapéutico. Asimismo, este tipo de compuestos son de interés para estudios sobre características del centro activo de la enzima.

BIBLIOGRAFIA

- 1) F.FRANZEN y K.BISSELL."Biologically Active Amines Found in Man: Their Biochemistry, Pharmacology and Patophysiological importance".Pergamon Press 1969
- 2) B.MOLINOFF y J.AXELROD."Biosynthesis and Metabolism of Catecholamines".Ann.Rev.Biochemistry,41,465-500 (1971)
- 3) S.GURIN y A.M.DELLUVA.J.Biol.Chem.,170,545 (1947)
- 4) S.UDENFRIEND, J.R.COOPER, C.T.CLARK y J.E.BAER.Science,117, 663 (1953)
- 5) P.HOLTZ.Pharmacol.Rev. 11,317 (1959)
- 6) N.KIRSNER, L.TERRY y D.POLLARD. Arch.Intern.Pharmacodyn.,132, 433,(1961)
- 7) L.WHITBY, J.AXELROD y H.WEIL-MALHERBE.J.Pharmacol.Exptl.Therap. 132,269 (1961)
- 8) R.W.SCHAYER. J.Biol.Chem.,189,301 (1951)
- 9) E.C.GREISEMEYER, J.BARSKY, D.A.DRAGSTED, T.A.WELLS y E.A.ZELLER. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.,84,699 (1953)
- 10) Z.KREBS. Phisiol.Chem.Hoppe-Seyler's,210,33 (1932)
- 11) M.BECQ. Arch.Intern.Phisiol.,42,340 (1936)
- 12) E.M.TRAUTNER y M.MESSER. Nature,169,31 (1952)
- 13) A.W.BOOTH, C.W.MURRAY, F.DE EDS y F.T.JONES. Fed.Proc.,14,521, (1955)
- 14) A.W.BOOTH, C.W.MURRAY, F.T.JONES y F.DE EDS.J.Biol.Chem.,223, 252 (1956)
- 15) F.DE EDS, A.W.BOOTH y F.T.JONES.J.Biol.Chem.,225,615(1957)
- 16) A.W.BOOTH, D.H.EMERSON, F.T.JONES y F.DE EDS.J.Biol.Chem.,226, 255 (1957)

- 17) K.N.F.SHAN, A.MC.MILLAN y M.D.ANSTRONG. *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 422 (1957)
- 18) M.D.ANSTRONG, A.MC.MILLAN y K.N.F.SHAN. *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 432 (1957)
- 19) J.AXELROD. *Science*, 126, 400 (1957)
- 20) J.AXELROD y R.TOMCHICK. *J. Biol. Chem.*, 233, 705 (1958)
- 21) J.AXELROD y R.TOMCHICK. *J. Biol. Chem.*, 233, 702 (1958)
- 22) S.SENOH, J.DALY, J.AXELROD y B.WITKOP. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 6240 (1959)
- 23) P.T.ANDERSON y A.D IÓRIO. *Biochem. Pharmacol.* 17, 1943 (1968)
- 24) M.ASSICOT y C.BOHUON. *Eur. J. Biochem.*, 12, 490 (1970)
- 25) S.B.ROSS y O.HALIASMAA. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 21, 205 (1964)
- 26) A.CARLSSON, H.CORRODI y B.WALDECK. *Helvetica Chim. Acta.* 46, 141 (1963)
- 27) A.CARLSSON, M.LINDQUIST, S.FILA-HROMADKO y H.CORRODI. *Helvetica Chim. Acta*, 45, 270 (1962)
- 28) K.HATTORI, N.MATSUURA, N.FUJIMARA y K.SHIMANOTO. *Japan. J. Pharmacol* 19, 282-286 (1969)
- 29) J.AXELROD y M.LAROCHE. *Science*, 130, 800 (1959)
- 30) S.B.ROSS. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 20, 253 (1963)
- 31) A.JACOBS, M.HEIDELBERGER y P.ROLF. *Am. Soc.*, 41, 467 (1919)
- 32) O.ZIMMERMAN. *Angewante Chemie* 425, 328 (1920)
- 33) *Belstein*, II, 363
- 34) E.K.NELSON. *Am. Soc.*, 41, 1118 (1919)
- 35) O.ZIMMERMAN. *Angewante Chemie*, 425, 314 (1920)

- 36) S.JONES y L.PYMAN. J.Chem.Soc., 127, 2588 (1925)
- 37) A.BURGER y L.RAMIREZ. J.Am.Chem.Soc., 72, 2781 (1950)
- 38) Belstein, 13, II, 493
- 39) F.JIRSKORSKY y M.PROTIVA. Collect.Czech.Chem.Comm. 32, 1197, (1967)
- 40) Belstein, 13, II, 486
- 41) S.JONES y L.PYMAN. J.Chem.Soc., 127, 2590 (1925)
- 42) A.JACOBS y M.HEIDELBERGER. J.Biol.Chem. 20, 686 (1919)
- 43) M.BODANSKY. J.Am.Chem.Soc., 81, 5688 (1959)
- 44) T.WIELAND, W.SCHAFFER y E.BOKELMAN. Ann., 99, 573 (1951)
- 45) J.A.FARRINGTON, P.J.HEXTALL, G.W.KENNER y J.M.TURNER. J.Chem. Soc., 48, 1407 (1957)
- 46) R.SCHWIZER, B.ISELIN, M.FEURER. Helv.Chim.Acta, 38, 83 (1955)
- 47) L.EINHORN y J.MAUERMAYER. Lieb. Ann., 343, 282 (1905)
- 48) Belstein, 13, 796; 13, I, 321; 13, II, 481
- 49) M.BAKER. J.Chem.Soc., 60, 4058 (1953)
- 50) E.K.NELSON. Am.Soc., 41, 115 (1919)
- 51) S.JONES y L.PYMAN. J.Chem.Soc., 127, 2592 (1925)
- 52) Belstein, 6, 1043; 6, II, 223
- 53) Belstein, 12, 237
- 54) Belstein, 12, 1043; 12, I, 457
- 55) Belstein, 12, 1098; 12, II, 594
- 56) M.MASTER. Am.Soc., 50, 146 (1928)
- 57) Belstein, 13, 606; 13, II, 346
- 58) Belstein, 13, 625; 13, II, 354

- 59) A. A. JACOBS y M. HEIDELBERGER. *Am. Soc.*, 41, 1457 (1919)
- 60) J. AXELROD. *Science*, 126, 400 (1957)
- 61) B. BELLEAU y J. BURBA. *J. Med. Chem.*, 6, 755 (1963)
- 62) E. T. ABBS, K. J. BROADLEY y D. J. ROBERTS. *Biochem. Pharmac.*, 19, 279, (1967)
- 63) K. HATTORI, M. MATSUURA, M. FUIWARA y S. SHIAMOTO. *Jap. J. Pharmac.*, 19, 282 (1969)
- 64) A. BETTLER, A. CARLSSON y E. ROSENGREEN. *Clin. Chim. Acta*, 4, 456 (1959)
- 65) J. AXELROD, W. ALBERT, C. D. CLEMENTE. *J. Neurochem.*, 5, 68 (1959)
- 66) J. DALY, J. J. INSCOE y J. AXELROD. *J. Med. Chem.*, 8, 153 (1965)
- 67) L. MAITRE. *Biochem. Pharmac.*, 15, 1935 (1966)
- 68) S. B. ROSS y O. HALIASMAA. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 21, 205, (1964)
- 69) M. ASSICOT y C. BOHUON. *Nature*, 212, 861 (1966)
- 70) J. D. MANN, H. M. FALES y S. H. MUDD. *J. Biol. Chem.*, 338, 3820 (1963)
- 71) R. GUGLER, R. KNUPPEN y H. BREUER. *Biochim. Biophys. Acta*, 220, 10, (1970)
- 72) B. NIKODIJEVIC, J. DALY y C. R. CREVELING. *Biochem. Pharmac.*, 18, 1377 (1969)
- 73) B. BELLEAU y J. BURBA. *J. Med. Chem.*, 6, 760 (1963)
- 74) S. UDENFRIEND y J. COOPER. *J. Biol. Chem.*, 196, 227 (1952)
- 75) A. A. ABDEL-LATIF. *Analytical Biochem.*, 29, 468 (1969)
- 76) P. J. ANDERSON y A. DIORIO. *Can. J. Biochem.*, 44, 347 (1966)
- 77) C. ELORRIAGA, C. MONTUENGA y E. FERNANDEZ ALVAREZ. *Tesina. Universidad de Madrid* (1971)
- 78) G. GOMORI. *Methods in Enzymology*, I, 143
- 79) A. BAEYER y E. KOCHENDOERFER. *Berichte*, XXII, 2196 (1889)