

“Síntesis de nitratos orgánicos análogos de tocoferol diseñados como potenciales agentes antiaterogénicos”

Verónica López

Tutor: Dra. Virginia López

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Laboratorio de Química Orgánica

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

Junio 2013



"La imaginación es más importante que el conocimiento"

Albert Einstein

Agradezco a todas aquellas personas que me han acompañado en este recorrido y me han ayudado a que este proyecto salga adelante:

A Vicky por darme ésta oportunidad, colaborar en gran medida en mi formación profesional, brindarme su apoyo, y alentarme a seguir adelante.

A mi familia por estar en los buenos y malos momentos, por darme la oportunidad de estudiar y ser feliz.

A mis amigos de siempre Jhonny, Andy, Cintya y Maguie, por su eterna amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio por hacer que las horas trabajando sean muy agradables; especialmente a mis amigas Jennyfer, Estefanía, Stefani y Elena.

A mis amigas y amigos de generación que nos conocemos desde los primeros cursos; especialmente Eli, Sofí A., Sofí R.

A mi gran amigo Huguito por estar siempre que lo necesite y soportarme en los momentos de crisis.

A Horacio Pezaroglio por la realización de los espectros de RMN de los compuestos preparados.

A María Laura y Williams por la realización de los espectros de masas de los compuestos preparados.

A la ANII por la beca de Iniciación a la Investigación.

RESUMEN

La aterosclerosis es una enfermedad de distribución mundial, de proporciones epidémicas en las sociedades económicamente desarrolladas y constituye la principal causa de muerte en Estados Unidos, Europa occidental y una de las primeras en Uruguay. Afecta las principales arterias del organismo y su lesión básica, el ateroma o placa fibro-adiposa, es una placa focal elevada en la íntima arterial formada por células, detritos celulares (células musculares lisas, endoteliales, espumosas, leucocitos, etc.), un núcleo lipídico (fundamentalmente colesterol, sus ésteres y productos de oxidación) y una cubierta fibrosa. Las modificaciones oxidativas de la LDL por especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno constituyen un evento crítico en la patogenia de la aterosclerosis.

Si bien existen como componentes naturales de la LDL moléculas con capacidad antioxidante (α -tocoferol), aproximadamente el 70% de sus lípidos oxidables se encuentran en el "core" hidrofóbico, carente de antioxidantes endógenos en concentraciones significativas. El óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), componente químico del factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), puede constituir la principal molécula antioxidante a nivel del "core" hidrofóbico de la partícula de LDL, debido a su capacidad de difundir y concentrarse en dicha estructura y participar en reacciones de terminación de procesos de lipoperoxidación, con la consiguiente formación de derivados lipídicos nitrogenados. El desarrollo de medicamentos que liberen este antioxidante en el seno de la LDL puede jugar un papel de importancia en la terapia de la aterosclerosis.

En este sentido durante la presente tesina de grado se propone el desarrollo de nuevos agentes antiaterogénicos, los cuales se obtienen a partir del análogo hidrosoluble de la vitamina E, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxílico (Trolox®), incorporando en la cadena lateral el farmacóforo liberador de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), grupo nitrooxilo ($-\text{ONO}_2$), enlazado a través de un grupo sulfonamida o de una subestructura tipo piperazina.

Índice

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción y antecedentes.....	9
Patogénesis de la Aterosclerosis.....	11
Lipoproteína de baja densidad.....	14
Antioxidantes.....	15
Vitamina E y sus propiedades antioxidantes.....	18
Propiedades antioxidantes del oxido nítrico.....	19
Antecedentes.....	20
Capítulo 2. Propuesta de trabajo y objetivos.....	24
Capítulo 3. Resultados y discusión.....	27
Serie 1.....	28
Serie 2.....	38
Capítulo 4. Materiales y métodos.....	45
Síntesis de los compuestos de la serie 1.....	47
Síntesis de los compuestos de la serie 2.....	57
Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas.....	59
Capítulo 6. Bibliografía.....	62

ABREVIATURAS

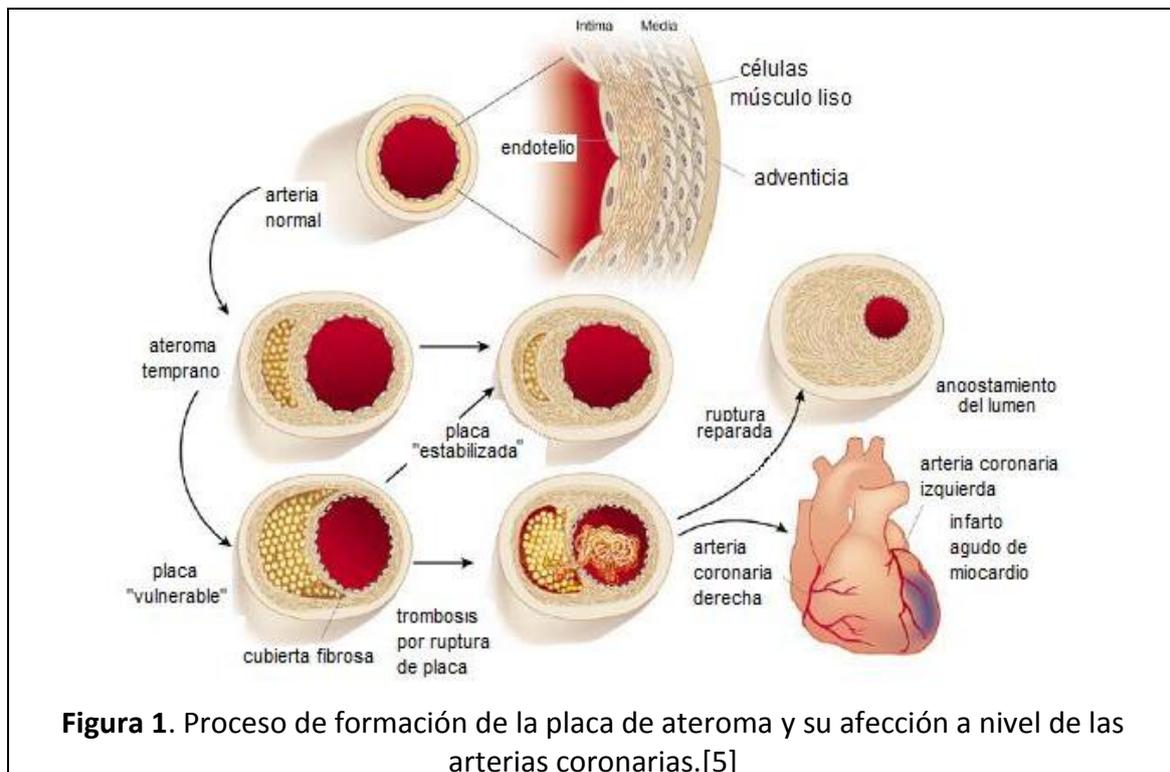
Ac – acetilo
Ac₂O – anhídrido acético
AcOEt – acetato de etilo
AcOH – ácido acético
Anh. – anhidro
Boc – *t*-butiloxicarbonilo
CC – cromatografía en columna
CCF – cromatografía en capa fina
CDI – 1,1-carbonildiimidazol
COSY – espectroscopia de correlación (Correlation Spectroscopy)
DCC – diciclohexilcarbodiimida
DMF – dimetilformamida
DMSO - dimetilsulfóxido
EP – éter de petróleo (fracción 60-70°C)
Et₂O – éter etílico
EtOH – etanol
HMBC – Correlación de enlace múltiple heteronuclear (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HMQC – Correlación cuántica múltiple heteronuclear (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)
HSQC – Correlación cuántica simple heteronuclear (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
MeOH – metanol
MS – espectrometría de masa
NBS – *N*-bromosuccinimida
NEt₃ – Trietilamina
PPh₃ – trifenilfosfina
Py – Piridina
RMN –Resonancia Magnética Nuclear
TA – Temperatura ambiente
TFA – Ácido trifluoroacético
THF – Tetrahidrofurano
Δ – calentamiento a reflujo.

Capítulo 1

Introducción y antecedentes

INTRODUCCIÓN

En el Uruguay, las enfermedades circulatorias consecuencia de la aterosclerosis constituyen la principal causa de muerte, por encima del cáncer y las enfermedades respiratorias.[1] La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias grandes e intermedias en las que surgen depósitos de grasas conocidos como placas ateromatosas en la íntima de la pared vascular.[2] El ateroma o lesión ateromatosa es una placa focal que se genera en la íntima arterial y está constituida por células, detritos celulares (células musculares lisas, endoteliales, espumosas, leucocitos, entre otras), un núcleo lipídico (fundamentalmente colesterol, sus ésteres y productos de oxidación y triglicéridos), calcio y una cubierta fibrosa (**Figura 1**).[3] La aterosclerosis es una enfermedad lenta y progresiva que puede comenzar en la primera década de la vida del hombre.[4] Aunque la causa exacta es desconocida, la aterosclerosis puede comenzar con un daño o lesión en la capa interna de una arteria. El problema principal de esta enfermedad no está directamente relacionado con la formación de la placa de ateroma sino con sus consecuencias isquémicas secundarias a la estenosis o a la ruptura con subsiguiente trombosis endovascular que alteran el normal flujo sanguíneo.[1]



Patogénesis de la Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad multifacética y multifactorial, de patogénesis desconocida, en la cual se han implicado diversas teorías que podrían explicar el complejo proceso de su génesis, estas teorías no son necesariamente excluyentes, sino que enfatizan diferentes eventos que llevarían a la formación de la placa ateromatosa.

Desde hace mucho tiempo se reconocen algunas teorías como:

- 1- Teoría de la incrustación plaquetaria
- 2- Hipótesis del daño mecánico
- 3- Teoría de la respuesta al daño endotelial
- 4- Hipótesis de respuesta a la retención
- 5- Hipótesis de respuesta a la modificación oxidativa

1- Teoría de la incrustación plaquetaria

Esta teoría propuesta por Rokitansky en 1852, sugiere que el engrosamiento de la íntima arterial se debe a la deposición de fibrina.[6, 7]

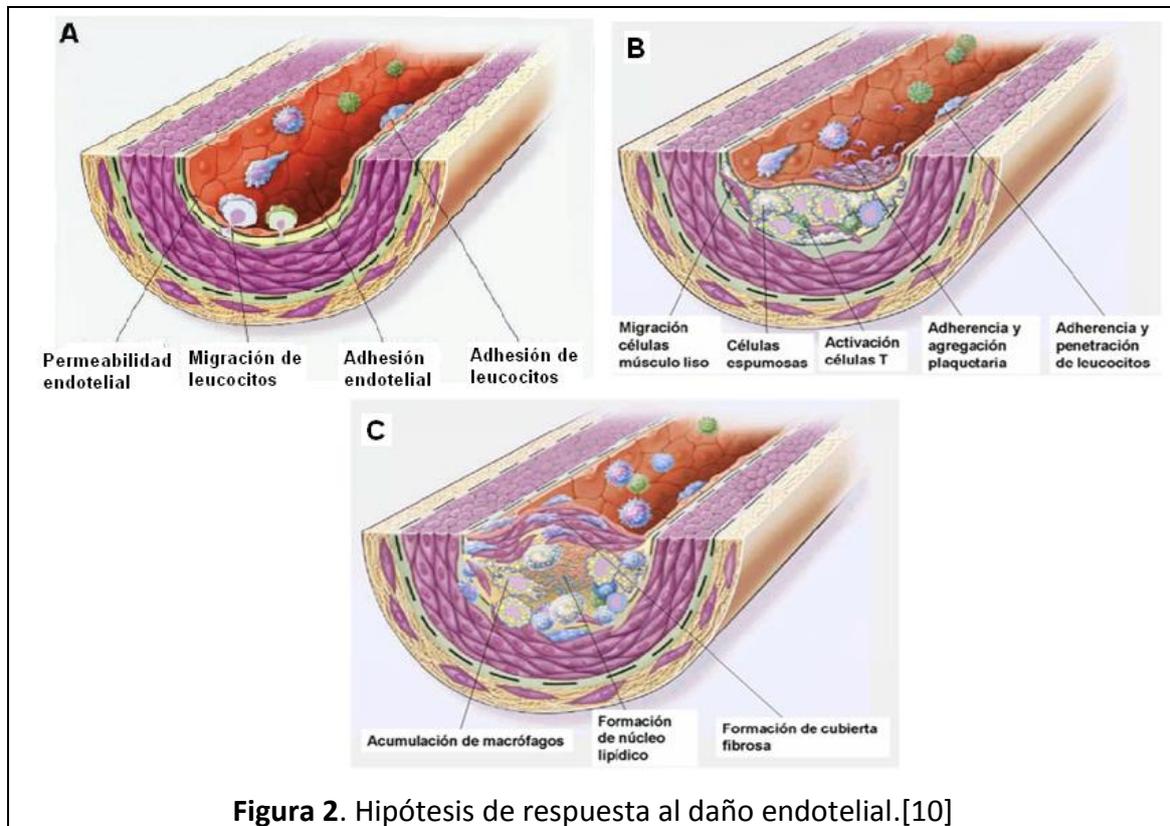
2- Hipótesis del daño mecánico

En 1856, Virchow propuso la Hipótesis de la respuesta al daño mecánico, basada en su observación de que los cambios degenerativos asociados con la arteriosclerosis podían ser reproducidos por la respuesta de cicatrización a un daño mecánico previo.[8]

3- Hipótesis de la respuesta al daño endotelial

Por otro lado Ross and Glomset, en el año 1973, propusieron la hipótesis de la respuesta al daño endotelial, esta teoría sugiere que la génesis de la aterosclerosis comienza a raíz de una lesión que se produce en el endotelio.[9] Esta lesión está caracterizada por aumento en la permeabilidad endotelial, cambio en las propiedades adhesivas de la pared por leucocitos y plaquetas, y también por el depósito de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la íntima de la pared arterial. Las células reclutadas liberan citoquinas, agentes vasoactivos y factores de crecimiento celular, los cuales promueven la respuesta inflamatoria (**Figura 2A**). En una etapa intermedia, la aterosclerosis es caracterizada por la formación de células espumosas y una respuesta inflamatoria incluyendo activación de células T, agregación plaquetaria y mayor entrada de leucocitos a la pared arterial, junto con la migración de células del músculo

liso a la intima (**Figura 2B**). Finalmente en etapas avanzadas, la enfermedad es caracterizada por una continua acumulación de macrófagos, formación de la capa fibrosa, y necrosis en el núcleo de la lesión (**Figura 2C**).[10]



4-Hipótesis de respuesta a la retención

Esta hipótesis se basa en que el evento iniciador de la aterosclerosis es la retención de la LDL. La apolipoproteína B-100 de la LDL es retenida por los proteoglicanos que se encuentran en la matriz extracelular de las arterias, una vez retenida en la pared de las arterias la LDL puede formar microagregados, que son detectados por los macrófagos llevando a la formación de células espumosas.[11-14]

5-Hipótesis de la respuesta a la modificación oxidativa

En 1986, Steinberg y col. [4] propusieron la hipótesis original de la modificación oxidativa de la aterosclerosis, basada en que en el evento iniciador del desarrollo de la lesión está involucrada una partícula de LDL modificada.[15] Esta hipótesis se centra en el concepto de que la LDL en su estado nativo no es aterogénica, sino que es la LDL modificada la que es internalizada por macrófagos a través de los receptores barrenderos.[4, 16-21] Esto se atribuye a la oxidación asociada con los cambios en la apolipoproteína B que mejoraría el reconocimiento y la captación por los receptores

barrenderos de los macrófagos [22, 23], llevando a una serie de reacciones en cadena que llevaría a la formación de la placa de ateroma. Luego de que la LDL nativa ingresa al espacio subendotelial, ésta puede sufrir una serie de modificaciones oxidativas por las células vasculares residentes, tales como las células musculares lisas, células endoteliales, y macrófagos. Además la LDL oxidada tiene actividades pro-aterogénicas: estimulando la quimiotaxis de monocitos, impidiendo la salida de monocitos y apoyando la formación de células espumosas. Los macrófagos captan a las LDL modificadas a través de endocitosis mediada por los receptores barrenderos, receptores que no están sometidos a regulación, de modo que los macrófagos se cargan de lípidos, acumulan en el citoplasma el colesterol en forma esterificada y se convierten en células espumosas. Además por otro lado una vez establecidas, las LDL oxidadas también pueden causar disfunción e injuria endotelial y necrosis de células espumosas (**Figura 3**).[2, 24]

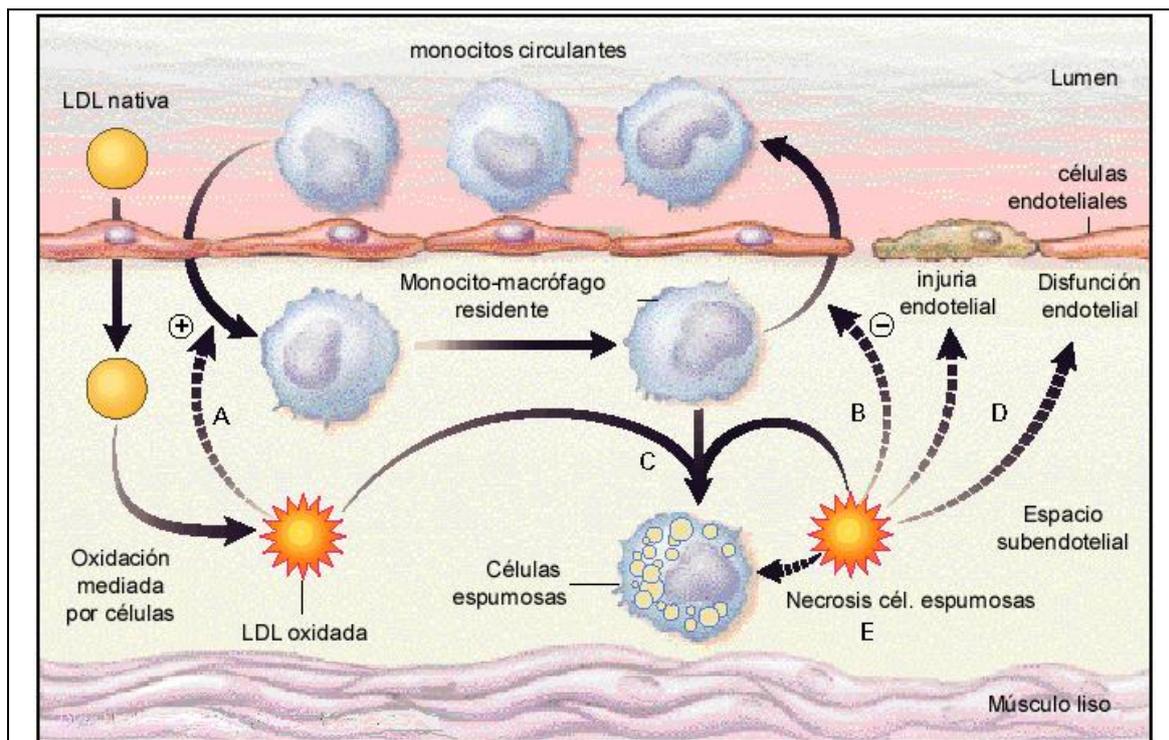


Figura 3. Hipótesis de la respuesta a la modificación oxidativa.[10]

Por lo tanto, se cree que la LDL modificada contribuiría con la aterogénesis aumentando el reclutamiento de monocitos circulantes a la intima, inhibiendo la capacidad de los macrófagos residentes de irse de la intima, potenciando la tasa de

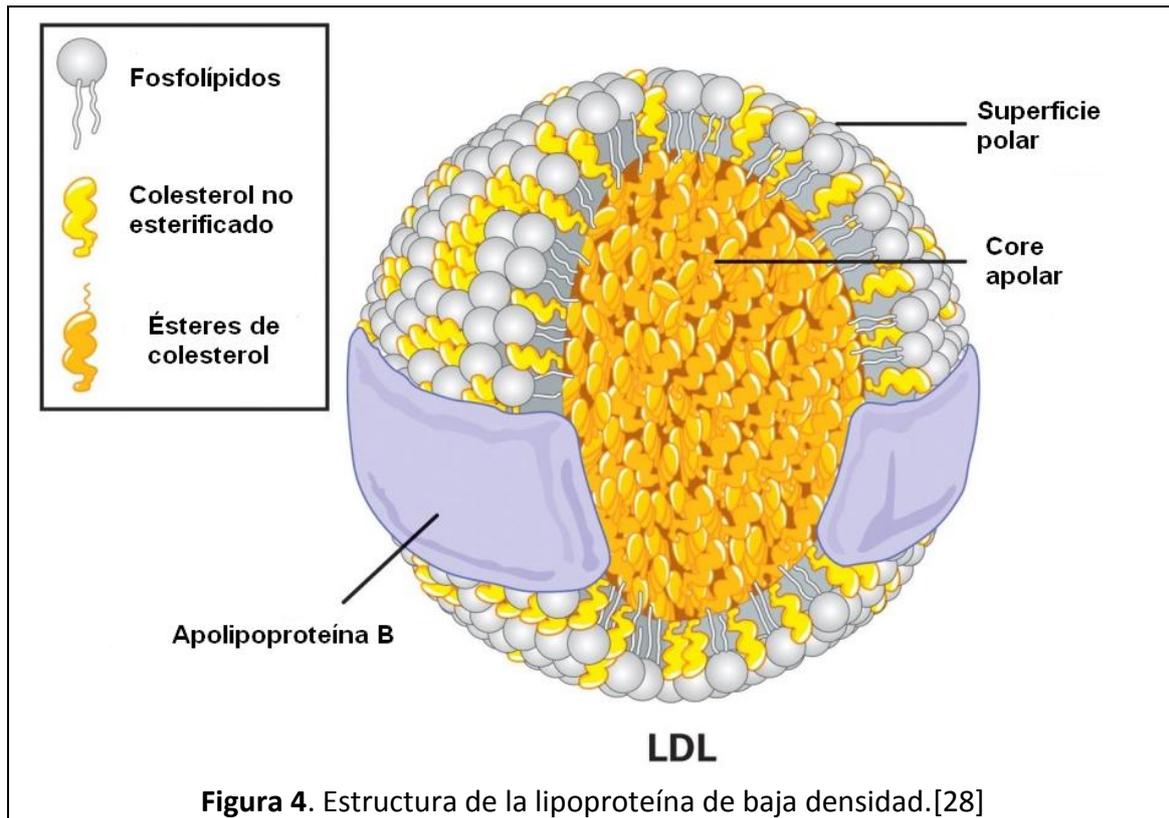
absorción de la lipoproteína, llevando a la formación de células espumosas, y éstas por ser citotóxicas llevarían a la pérdida de integridad del endotelio.

Algunos estudios descritos en la literatura demuestran que las LDL oxidadas intervienen prácticamente en todas las etapas del proceso de formación de lesiones. Inducen la expresión de MCP-1 y de moléculas de adhesión como la molécula 1 de adhesión vascular (VCAM-1) y la P-selectina en células endoteliales, lo que promueve la unión de monocitos circulantes al endotelio. Además provocan apoptosis de las células endoteliales y alteran la producción de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y radicales libres, con el consiguiente deterioro de la protección antiaterogénica que ejerce el endotelio.[25]

Lipoproteínas de baja densidad

Las lipoproteínas tienen la función de transportar diferentes tipos de lípidos entre las células de diversos tejidos. En particular, las LDLs son lipoproteínas que se encargan de transportar el colesterol a los diferentes tejidos del cuerpo. Cuando la célula necesita colesterol para la síntesis de membrana, produce proteínas receptoras de LDL y las inserta en su membrana plasmática. Cuando el colesterol es captado pasa a los lisosomas donde se hidrolizan los ésteres de colesterol dando lugar a colesterol libre, que de esta forma queda a disposición de la célula para la biosíntesis de las membranas. Si se acumula demasiado colesterol libre en la célula, ésta detiene tanto la síntesis de colesterol como la síntesis de proteínas receptoras de LDL, con lo que la célula produce y absorbe menos colesterol.[26]

Cada partícula de LDL (~2.5 MDa) está formada por fosfolípidos, triglicéridos, ésteres de colesterol, colesterol no esterificado y una apolipoproteína; la apo B-100 (4,536 amino ácidos, 550 kDa). La apo B-100 está dispuesta según una distribución circunferencial alrededor de la partícula de microemulsión esférica que representa el 30 % de la superficie de la LDL. Los ésteres de colesterol junto con los triglicéridos forman el core hidrofóbico separados del entorno acuoso por una monocapa de fosfolípidos, principalmente esfingomiélin (25 %), fosfatidilcolina (66 %) y moléculas de colesterol no esterificadas (**Figura 4**).[27]

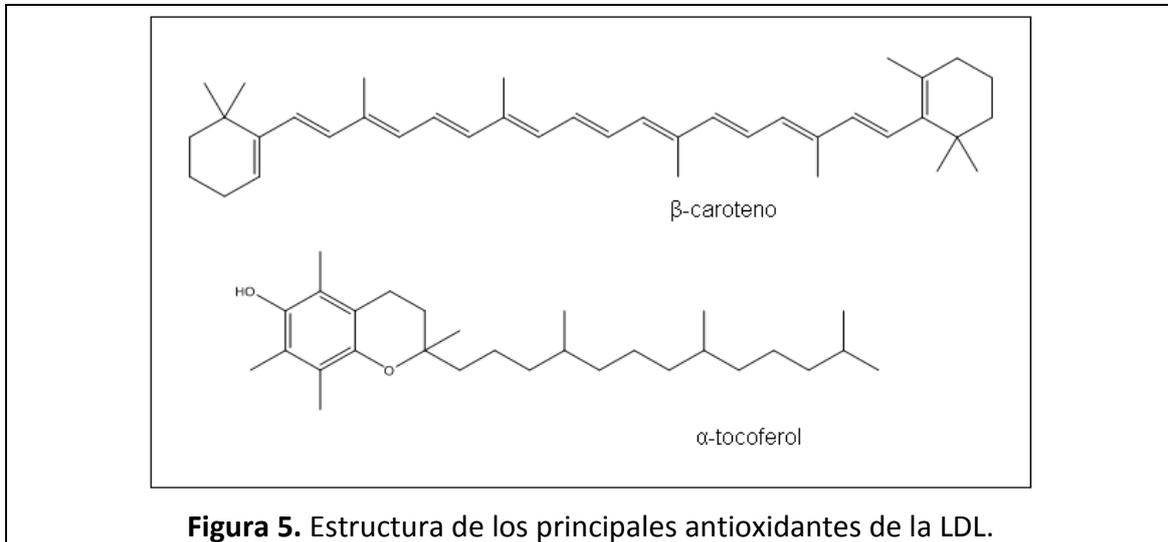


Además, la partícula de LDL humana contiene diversos antioxidantes que inhiben la oxidación lipídica, siendo el α -tocoferol (vitamina E) el más abundante (aproximadamente 6 moléculas de α -tocoferol por partícula de LDL) y otros antioxidantes como carotenoides, ubiquinol-10 y γ -tocoferol, presentes en menores cantidades (**Figura 5**). El α -tocoferol se encuentra en la superficie de la lipoproteína, brindando una mínima protección a nivel del core hidrofóbico, donde carece de antioxidantes en concentraciones significativas, donde se encuentran sus principales lípidos oxidables, los ésteres de colesterol.[29] Por esto y teniendo en cuenta la hipótesis de las modificaciones oxidativas de la LDL, la suplementación con antioxidantes actuaría en etapas tempranas de la aterogénesis, protegiendo a la LDL de la oxidación.

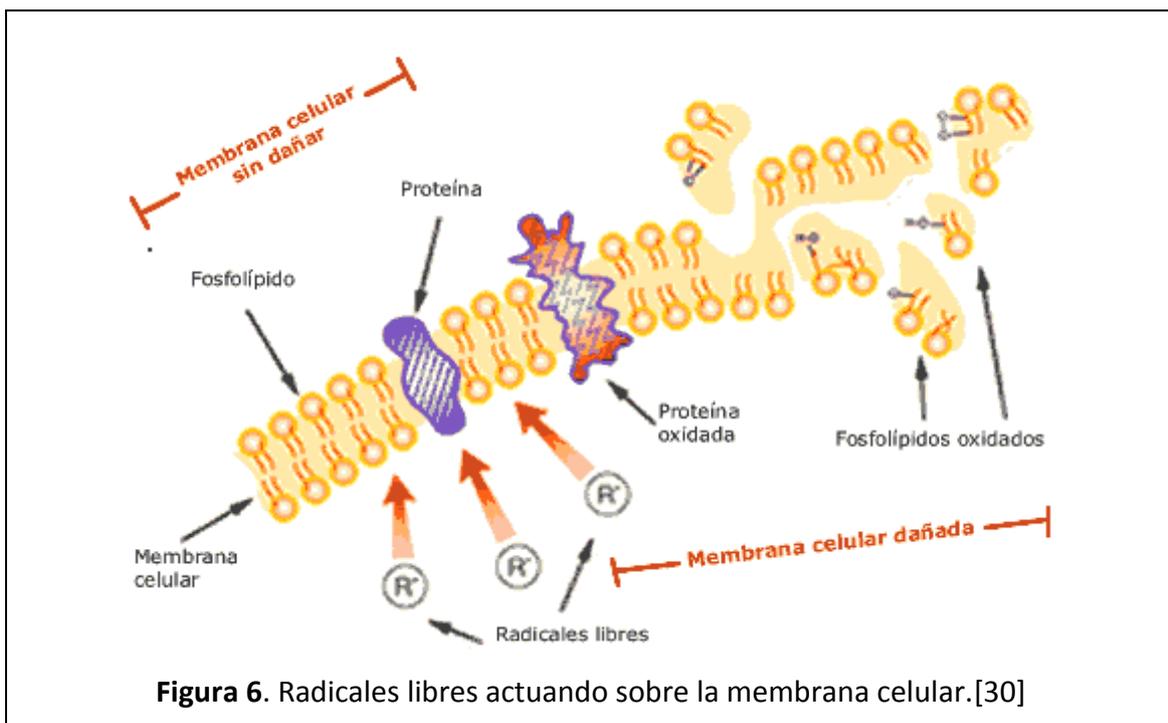
Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales

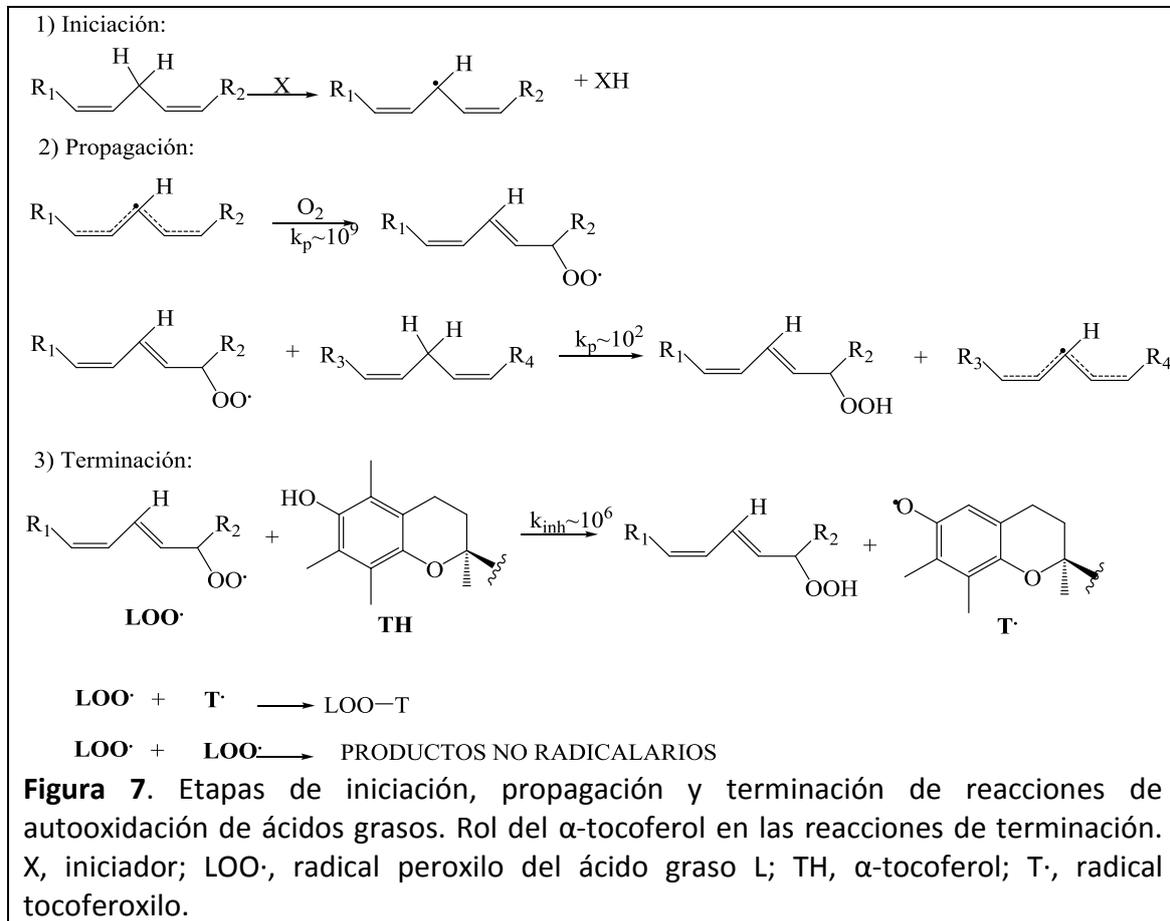
libres que comienzan una serie de reacciones en cadena que generan daño celular. Los radicales libres son moléculas altamente inestables y por lo tanto reactivas. La finalidad de estos radicales libres es encontrar su propia estabilidad y esto lo logran oxidando otras partículas. Oxidan desde las proteínas hasta el material genético.



Los efectos de estas oxidaciones son muy variados, desde anemias hemolíticas, al afectar a los ácidos grasos que componen las membranas celulares (**Figura 6**) y por lo tanto imprescindibles para su integridad, hasta pérdida de memoria o de las funciones cognitivas, al verse dañadas proteínas neuronales.



Algunos antioxidantes, como por ejemplo el α -tocoferol, interrumpen estas reacciones quitando intermediarios radicalares, reaccionando con radicales peroxilo derivados de los ácidos grasos, los productos principales de la peroxidación lipídica (**Figura 7**).[31, 32]

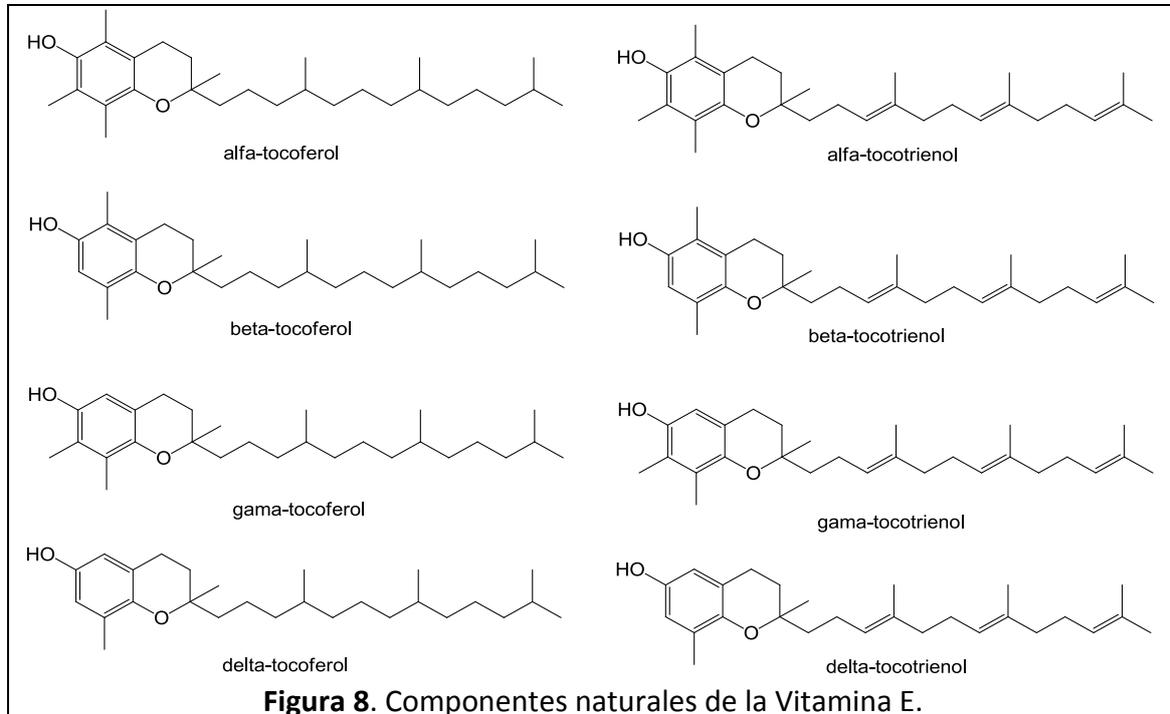


Los antioxidantes pueden inhibir la aterogénesis y mejorar la función vascular mediante dos mecanismos diferentes. En primer lugar, los antioxidantes presentes en la LDL, principalmente el α -tocoferol, y antioxidantes presentes en el fluido extracelular del espacio subendotelial, dentro de los cuales podemos encontrar al ácido ascórbico (vitamina C), inhiben la oxidación de la LDL a través de una acción antioxidante LDL-específica. En segundo lugar, los antioxidantes presentes en las células de la pared vascular (enzimas como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, peroxirredoxina, tioredoxina reductasa y varias peroxidases), disminuyen la producción celular y la liberación de especies reactivas del oxígeno (ERO), inhiben la activación endotelial (es decir, la expresión de moléculas de adhesión y quimiotácticas de monocitos), y mejoran la actividad

biológica del óxido nítrico derivado del endotelio, a través de una acción antioxidante celular o tejido-específica.[33, 34]

Vitamina E y sus propiedades antioxidantes

Se denomina vitamina E, a un grupo de antioxidantes liposolubles potentes, incluyendo 4 tocoferoles (α , β , γ , δ) y 4 tocotrienoles (α , β , γ , δ) (**Figura 8**). El α -tocoferol es la forma más abundante en la naturaleza, y posee la mayor actividad química y biológica.[35] Los estudios epidemiológicos demostraron que un consumo elevado de vitamina E se correlaciona con un bajo riesgo de patología cardiovascular. Esa correlación no se observa con la ingesta de otros antioxidantes de la dieta (vitamina C, β -caroteno), lo cual sugiere que la vitamina E cumple un papel específico más allá de su función antioxidante.[33] La vitamina E funciona como un interruptor de las reacciones oxidantes en cadena, previniendo la propagación de las reacciones en las que intervienen los radicales libres.



La vitamina E se absorbe junto con los lípidos y es transportada al hígado por los quilomicrones. Este proceso es similar para todas las formas de vitamina E, pero luego

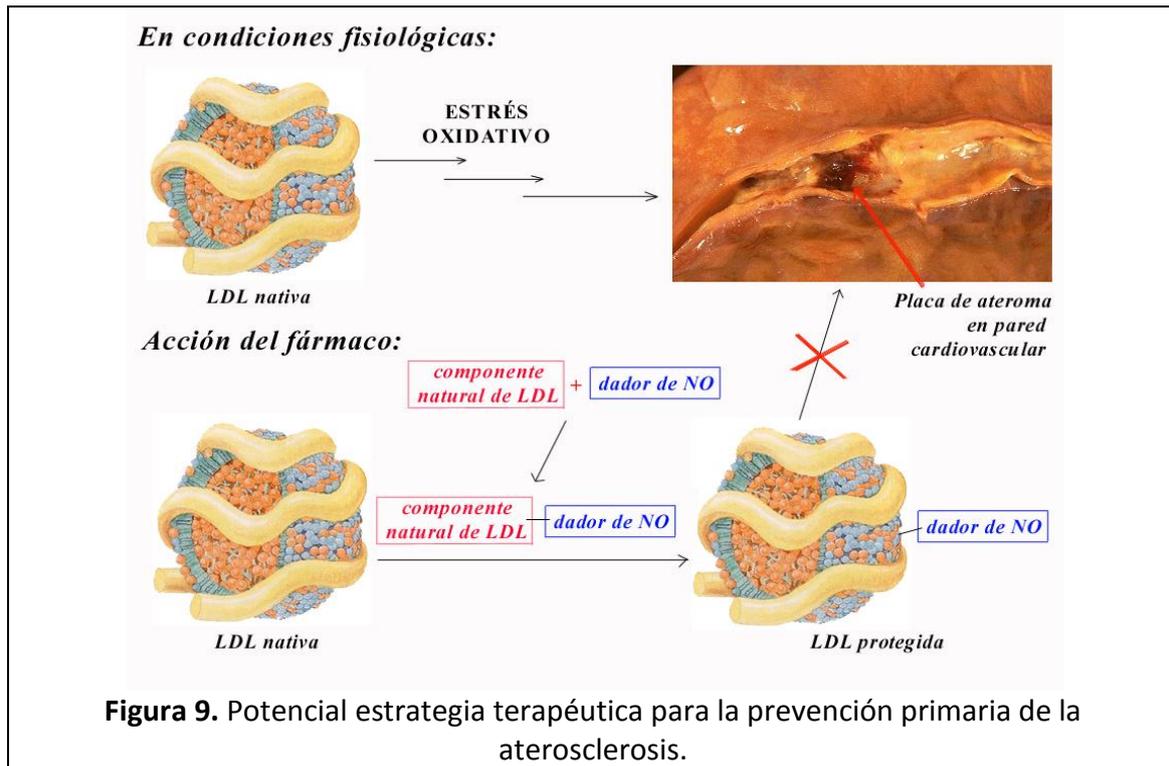
del pasaje por el hígado la forma que aparece principalmente en plasma es el α -tocoferol. Gran parte de los tocoferoles β , γ , y δ son secretados en la bilis o no son absorbidos. La preferencia por α -tocoferol se debe a la selección específica que ejerce la proteína transferidora de α -tocoferol hepática (α -TTP), para ser incorporado en la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lo cual explica que el α -tocoferol presente la mayor actividad biológica *in vivo*. [33, 36]

Propiedades antioxidantes del óxido nítrico

El óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), también conocido como el Factor de Relajación Derivado del Endotelio (EDRF), es un radical libre relativamente estable que tiene un rol central en la regulación del tono vasomotor y una amplia variedad de otros efectos biológicos. [37-39] En los últimos años se ha incrementado considerablemente el número de observaciones que indican que el $\cdot\text{NO}$ disminuye la formación de lesiones ateroscleróticas, no solo por su acción vasodilatadora sino también mediante un rol protector de la oxidación de la partícula de LDL. [40-42] La oxidación de la LDL por diferentes oxidantes es inhibida por $\cdot\text{NO}$ proveniente tanto de fuentes celulares como químicas, el cual posee propiedades fisicoquímicas que explicarían una mayor capacidad antioxidante que incluso la del α -tocoferol. [43-46] Trabajos previos de nuestro grupo, demostraron la capacidad del $\cdot\text{NO}$ de difundir en la LDL, sugiriendo que junto con la producción vascular de $\cdot\text{NO}$ podrían representar un mecanismo antioxidante clave *in vivo*. [29] El $\cdot\text{NO}$ podría ejercer sus acciones antioxidantes incluso en el seno hidrofóbico de la partícula, donde la relación lípidos oxidables vs. antioxidantes es incluso mayor que en la superficie de la LDL donde existen otros antioxidantes.

ANTECEDENTES

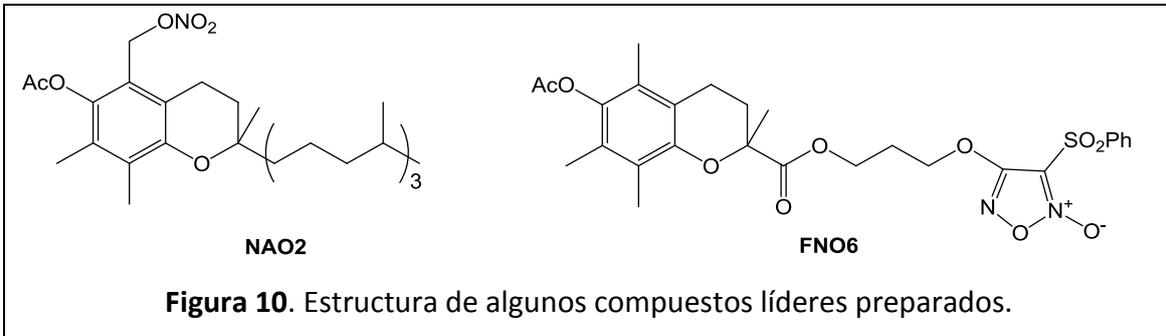
La hipótesis de la modificación oxidativa de la aterosclerosis ha sido sustentada por evidencias que muestran que la oxidación de la LDL es un proceso que ocurre *in vivo*, que se relaciona con el riesgo cardiovascular y que contribuye a las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Esto ha llevado a la evaluación, a través de estudios observacionales, epidemiológicos, de la relación entre enfermedad cardiovascular y niveles plasmáticos de diferentes antioxidantes tales como β -caroteno, polifenoles, vitamina E, vitamina C. Los primeros estudios fueron positivos, resultando consistentes con una correlación inversa entre los niveles plasmáticos de vitamina E y mortalidad cardiovascular.[47] Sin embargo, los estudios clínicos de suplementación que se han realizado con antioxidantes en pacientes con y sin historia previa de enfermedad cardiovascular, han dado resultados conflictivos.[48, 49] No obstante, la hipótesis de la modificación oxidativa no es necesariamente refutada por estos resultados, sino que enfatiza la importancia de desarrollar nuevos fármacos con mejorada capacidad antioxidante *in vivo*. De hecho, la intervención con un antioxidante apropiado, a una dosis adecuada, en pacientes correctamente seleccionados y durante un correcto período de tiempo, debería mejorar el pronóstico de la enfermedad.[50] Así, estos resultados nos impulsaron a desarrollar nuevas moléculas con mayor capacidad antioxidante para bloquear dichos procesos asociados al desarrollo de la enfermedad. Teniendo en cuenta estos datos, moléculas híbridas combinando la estructura de la vitamina E y grupos liberadores de óxido nítrico, para liberar $\cdot\text{NO}$ específicamente en la LDL *in vivo* sería una estrategia terapéutica para proteger a la LDL de modificaciones oxidativas, contribuyendo al tratamiento de la aterosclerosis (**Figura 9**). Los furoxanos (derivados de *N*-óxido de 1,2,5-oxadiazol), nitratos orgánicos, nitrosotioles, representan entre otros, importantes clases de compuestos liberadores de $\cdot\text{NO}$. [51] Al igual que para los antioxidantes, la utilización clínica de los dadores de $\cdot\text{NO}$ (nitritos/nitratos), particularmente como tratamiento de la enfermedad aterosclerótica no han tenido los resultados esperados.[52]



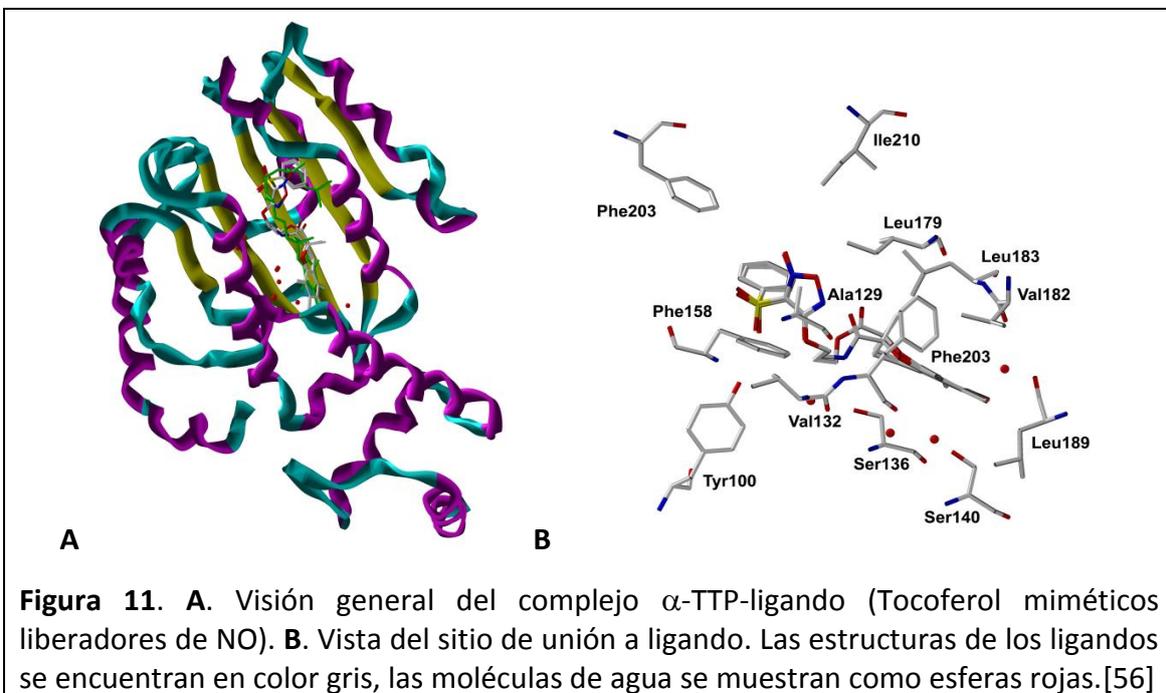
Los compuestos desarrollados en nuestro laboratorio poseen estructuras novedosas y a diferencia de los casos citados, como elemento central se concibe que los nuevos compuestos en su metabolismo sean incorporados a las lipoproteínas confiriendo liberación local y controlada de óxido nítrico en el propio seno de las partículas lipoproteicas y, por tanto, evitando o retardando la oxidación de las mismas.[35, 53-58]

Desde fines de 2002, el grupo de investigación del cual forma parte el presente tesista, trabaja en el diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de componentes naturales de la LDL capaces de liberar $\cdot\text{NO}$ (**Figura 10**). Estos compuestos presentan diferentes perfiles de liberación de $\cdot\text{NO}$ debido a la presencia de una subestructura nitrooxi-, furoxano o S-nitrosotiol, inhibiendo la agregación plaquetaria y exhibiendo propiedades vasoactivas. Es más, ellos son capaces de proteger efectivamente a la LDL de la oxidación, combinando la subestructura del α -tocoferol con afinidad por la LDL y las propiedades antioxidantes del grupo liberador de $\cdot\text{NO}$. Asimismo, los compuestos híbridos son capaces de interactuar con LDL y otras biomoléculas *in vitro* e *in vivo*. Además, se estudió la citotoxicidad *in vitro* observándose, en términos relativos, que los tionitrito- y los nitrooxi-derivados no son prácticamente citotóxicos. No obstante, los estudios en modelo animal demostraron

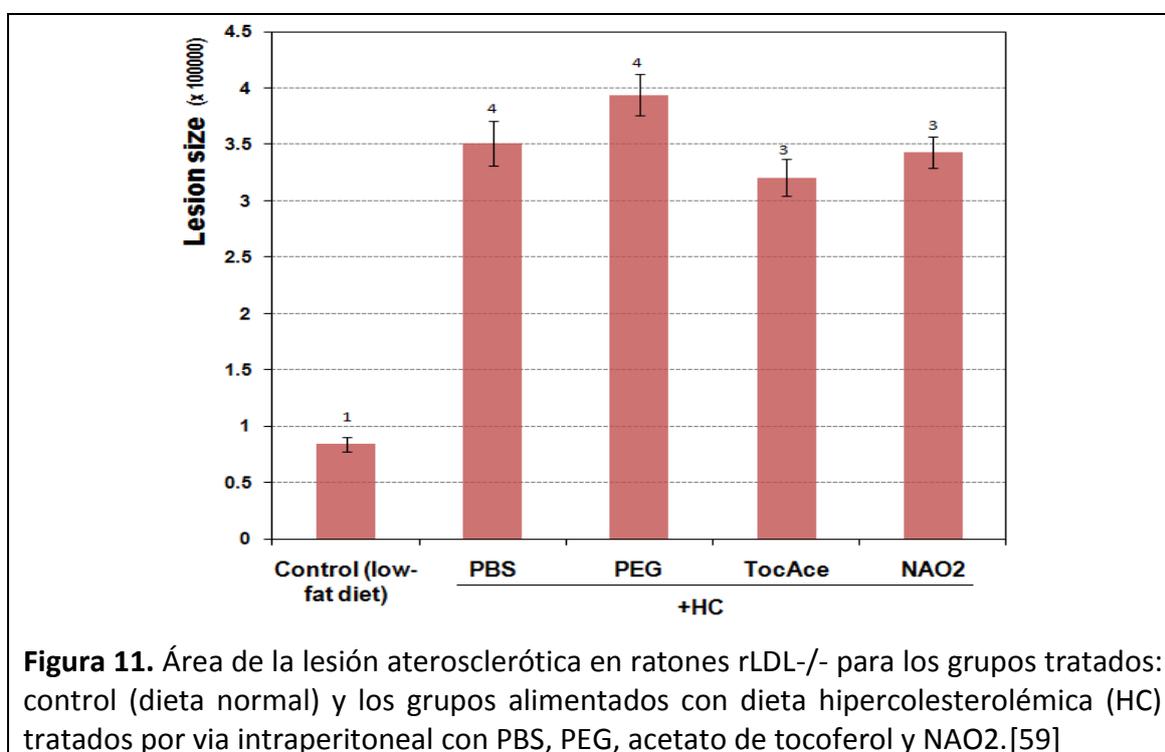
que los compuestos sintetizados (del grupo de los nitrooxi-derivados y furoxanos) no dejan secuelas macro y microscópicas luego de su administración.[57] Por otra parte, los nitrooxiderivados no evidenciaron mutagenicidad ni genotoxicidad en los ensayos correspondientes: Test de Ames y Ensayo cometa. En cambio, los derivados de furoxanos mostraron cierta toxicidad en estos estudios.[57]



Por otra parte, es sabido que el α -tocoferol es retenido selectivamente sobre otros tocoles de la dieta. Esta discriminación resulta de la alta afinidad del α -tocoferol por la proteína transferidora de α -tocoferol (α -TTP). En este sentido, se estudiaron las interacciones moleculares de los diferentes híbridos sintetizados con la α -TTP usando técnicas de docking así como también estudios de afinidad in vitro, siendo los resultados muy favorables (**Figura 11**).[56]



Por todo lo anterior se realizaron estudios *in vivo* en un modelo murino de aterosclerosis. Para ello se eligió el compuesto híbrido NAO2 pues presentó el mejor perfil químico, biológico, fisicoquímico y también presentó la mejor performance en los estudios pre-clínicos (citotoxicidad, mutagenicidad, genotoxicidad).[55-57] Sin embargo, estos estudios que consistieron en la administración semanal de NAO2 (50 $\mu\text{mol/kg/d}$) por vía intraperitoneal a un grupo de ratones “knockout” para el receptor de LDL, alimentado con una dieta hipercolesterolémica, no resultaron muy auspiciosos (Figura 11).[59] En consecuencia, son necesarios más estudios: ensayar otras vías de administración, otras dosis, otros vehículos, etc.



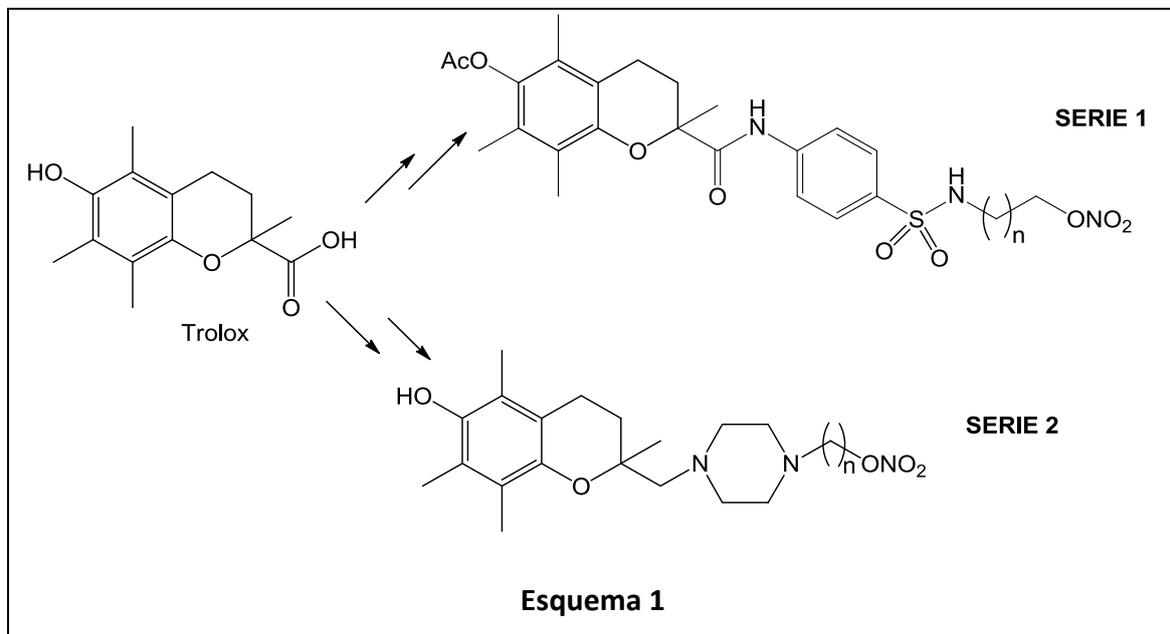
En resumen, si bien los estudios realizados han demostrado que los compuestos sintetizados son potenciales fármacos con posible aplicación en el tratamiento de la aterosclerosis, como se mencionó anteriormente, más estudios son necesarios. Por ello, en el presente trabajo se propone sintetizar nuevos derivados homólogos de los ya preparados [53, 55] que nos permitan modificar las propiedades fisicoquímicas y así modular sus propiedades biológicas.

Capítulo 2

Propuesta y objetivos

PROPUESTA

Se propone en este trabajo de tesina el desarrollo de nuevos agentes antiaterogénicos, los cuales se obtienen a partir del análogo hidrosoluble de la vitamina E, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxílico (Trolox®), incorporando en la cadena lateral el farmacóforo liberador de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), grupo nitrooxilo ($-\text{ONO}_2$), enlazado a través de un grupo sulfonamida o de una subestructura tipo piperazina (**Esquema 1**).



OBJETIVOS

Objetivo general:

Optimización de líderes diseñados como potenciales agentes antiaterogénicos, α -tocoferol (componente natural de las lipoproteínas de baja densidad, LDLs) modificado y análogos con grupos liberadores de $\cdot\text{NO}$, como fuente continua de un antioxidante fisiológico como una estrategia terapéutica que podría prevenir las reacciones oxidativas de la LDL en la pared vascular.

Objetivos específicos:

1. Síntesis de nuevos derivados de α -tocoferol portadores del grupo nitrooxilo, reconocido farmacóforo liberador de $\cdot\text{NO}$.
2. Elucidación estructural y caracterización espectroscópica de los productos de síntesis.

Capítulo 3

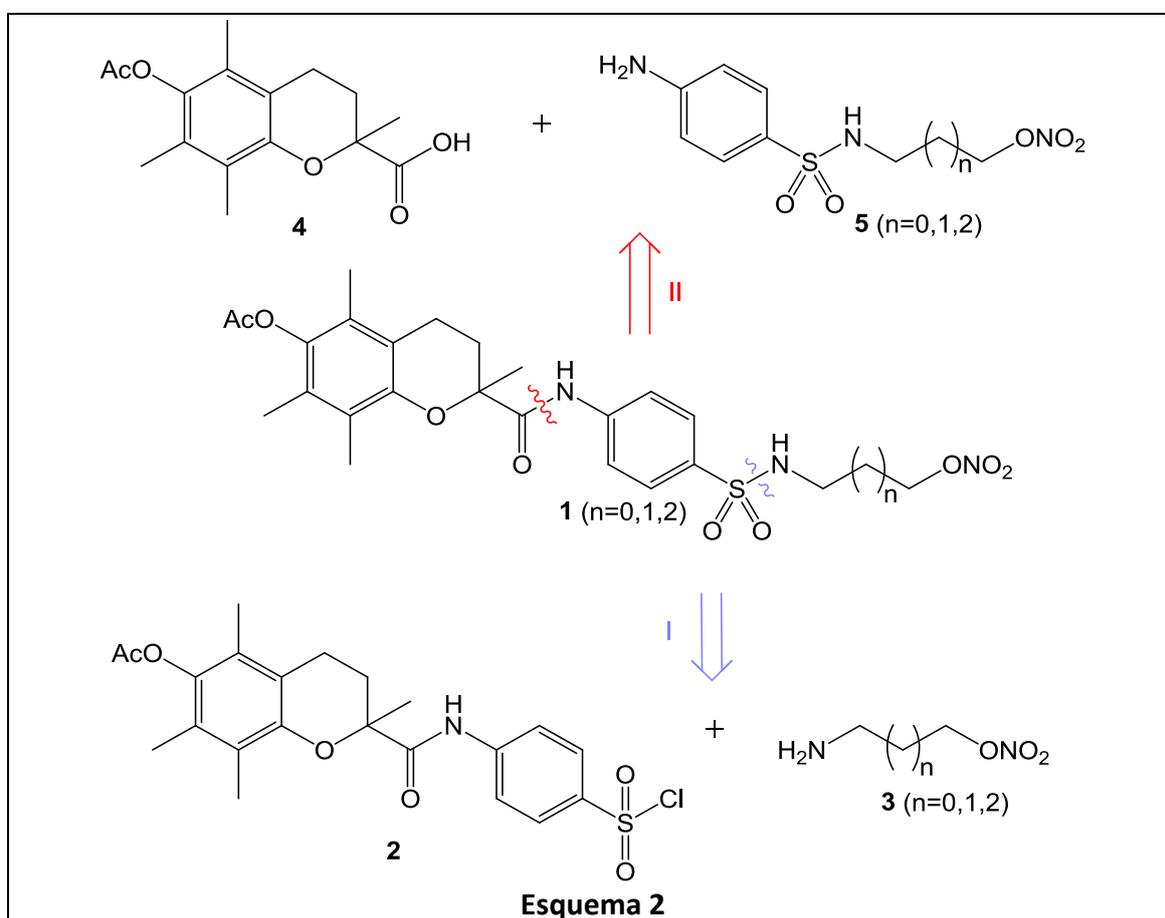
Resultados y discusión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

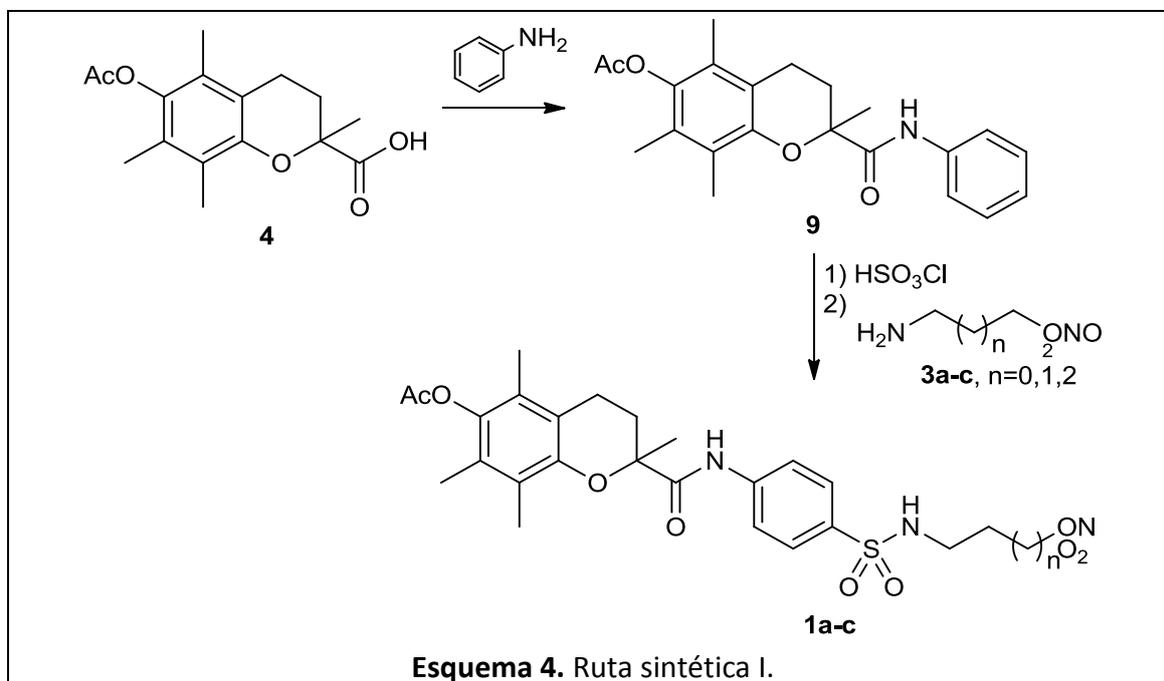
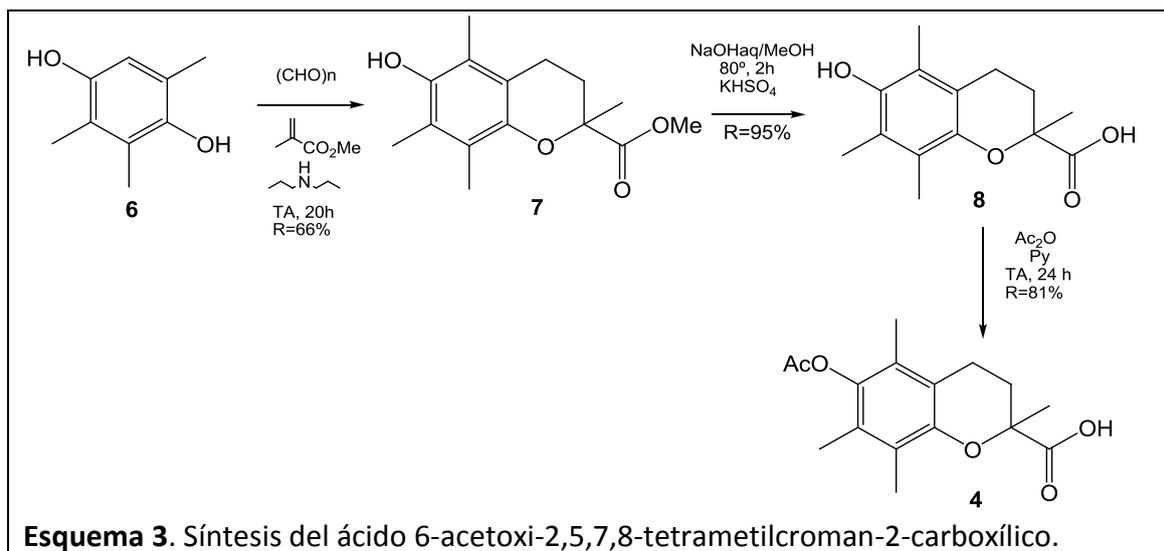
Química

SERIE 1. La Serie 1 está formada por los derivados que incorporan la subestructura nitrooxilo a nivel de la cadena lateral del ácido (\pm)-6-acetiloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, enlazado a través de un grupo sulfonamida (**Esquema 2**).

Se diseñan dos rutas sintéticas (**Esquemas 4 y 8**) que permiten cumplir con los objetivos descritos a partir del análisis retrosintético de los nuevos derivados que se desean preparar (**Esquema 2**).



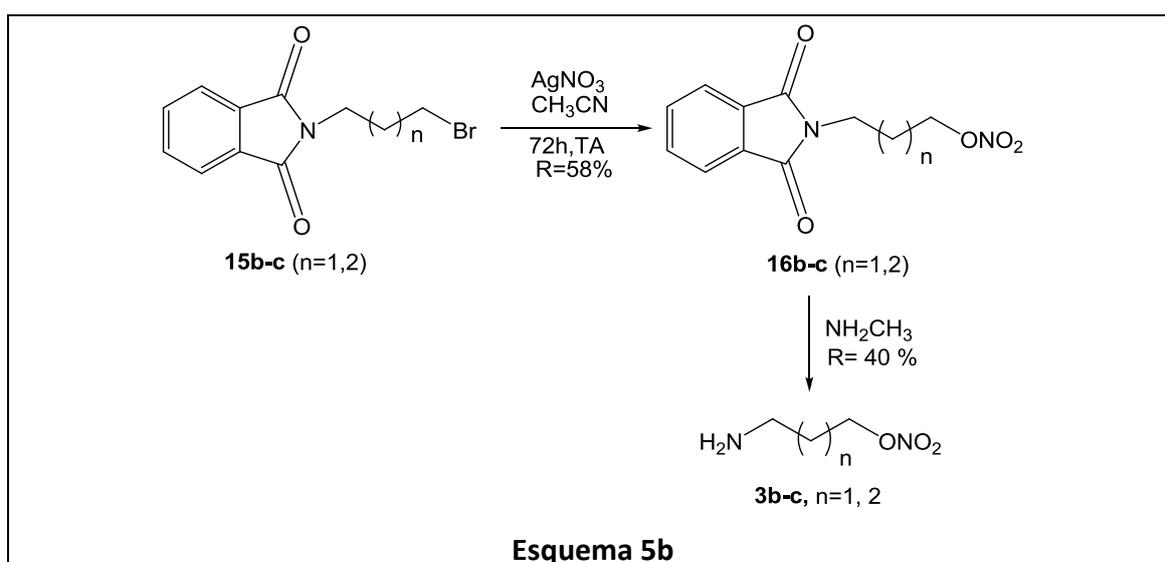
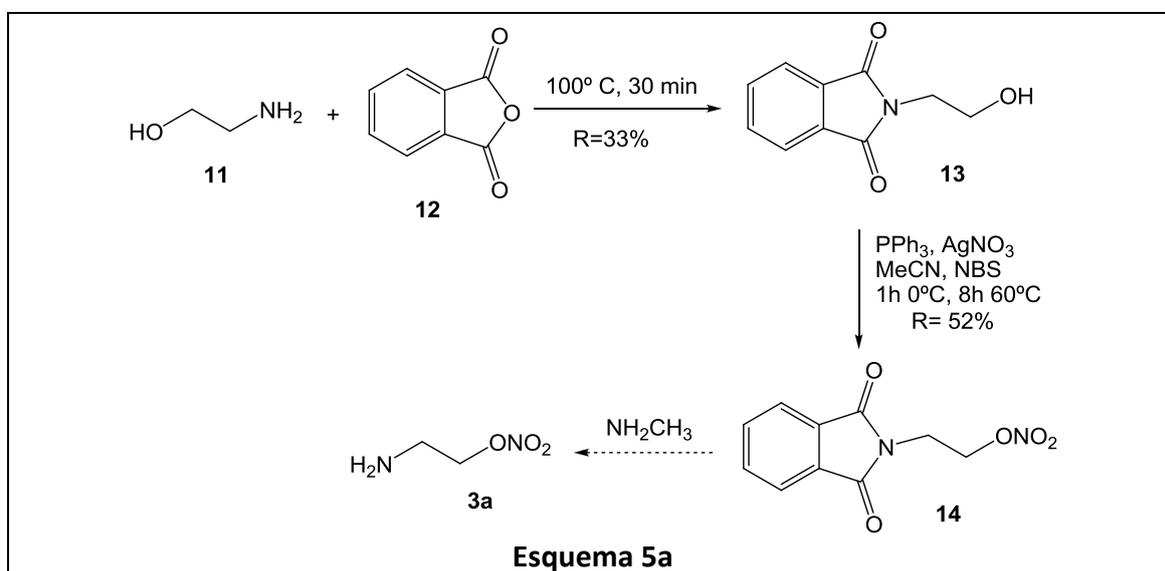
Inicialmente se procede a sintetizar el ácido 6-acetiloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (**4**, **Esquema 3**), intermedio importante para ambas vías, mediante tres etapas partiendo de la trimetilhidroquinona (**6**).[60-62] Así se obtiene el intermedio **4** con muy buenos a excelentes rendimientos (**Esquema 3**).



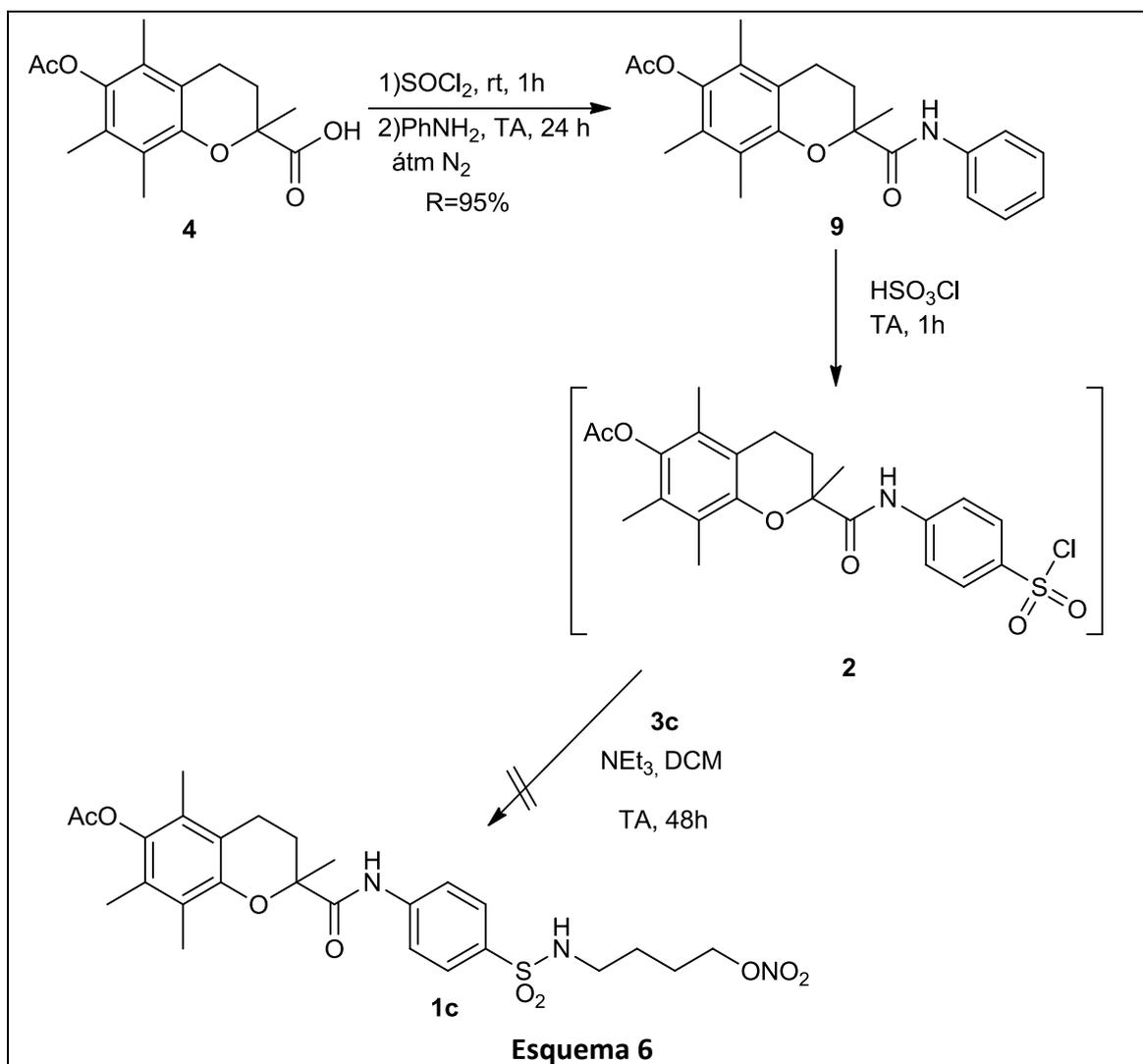
Luego, siguiendo la ruta sintética I (**Esquema 4**), a partir del compuesto **4** se genera la amida **9** (**Esquema 6**). Para ello, se ensaya la reacción utilizando 1,1-carbonildiimidazol como agente activante del grupo carboxilo obteniéndose la amida deseada con un 26% de rendimiento. Con objeto de mejorar este resultado se ensaya la síntesis vía cloruro de ácido lo que permite obtener la amida **9** con excelentes rendimientos (**Esquema 6**).[63]

Paralelamente, se preparan la nitrooxiaminas (**3a-c**) como se muestra en los esquemas 5a y 5b. Por una parte, la nitrooxiamina **3a** se prepara a partir de etanolamina (**11**) recién destilada, la cual se hace reaccionar con anhídrido ftálico en baño de vapor por 30 minutos para dar 2-hidroxi-etil-*N*-ftalimida (**13**) con modesto rendimiento.[64] Luego

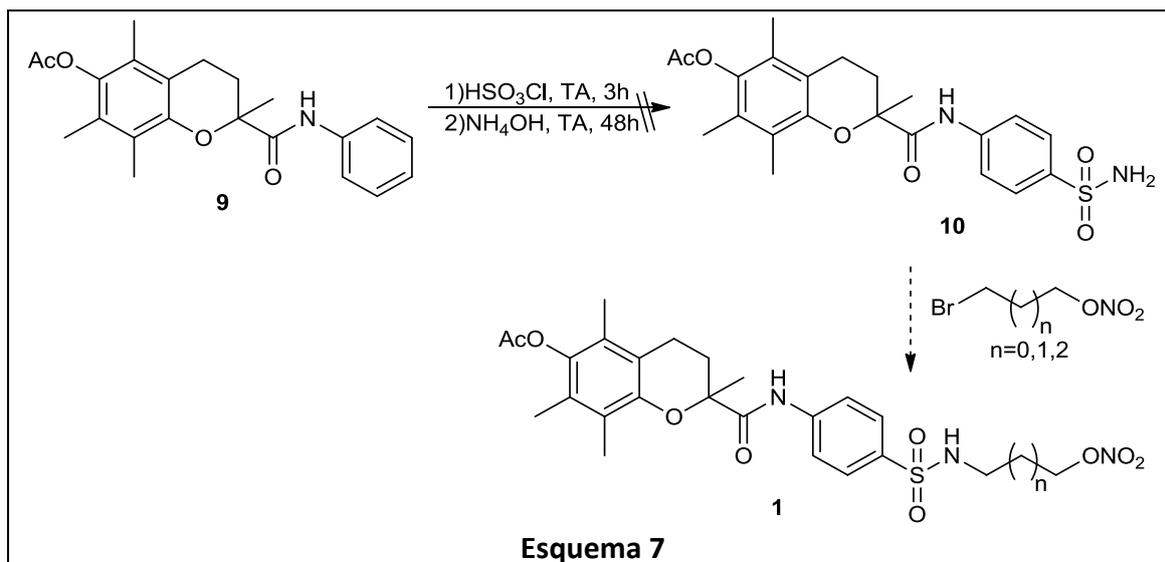
se intenta la transformación de **13** en el nitrooxiderivado **14** por tratamiento con ácido nítrico fumante y ácido acético con resultados negativos.[65] Afortunadamente es posible obtener el compuesto deseado al hacer reaccionar el alcohol **13** con nitrato de plata en presencia de trifenilfosfina y *N*-Bromosuccinimida (**Esquema 5a**).[66] El paso final de la ruta sintética para llegar al intermedio **3a** no se realizó, ya que primero se decidió optimizar este paso para los compuestos con la cadena carbonada más larga. Por otra parte, las nitrooxiaminas **3b** y **3c** se obtienen a partir de 3-bromopropil-*N*-ftalimida y 4-bromobutil-*N*-ftalimida, respectivamente, por tratamiento con nitrato de plata en acetonitrilo a temperatura ambiente y posterior desprotección con metilamina para rendir el producto deseado (**Esquema 5b**).[67-69]



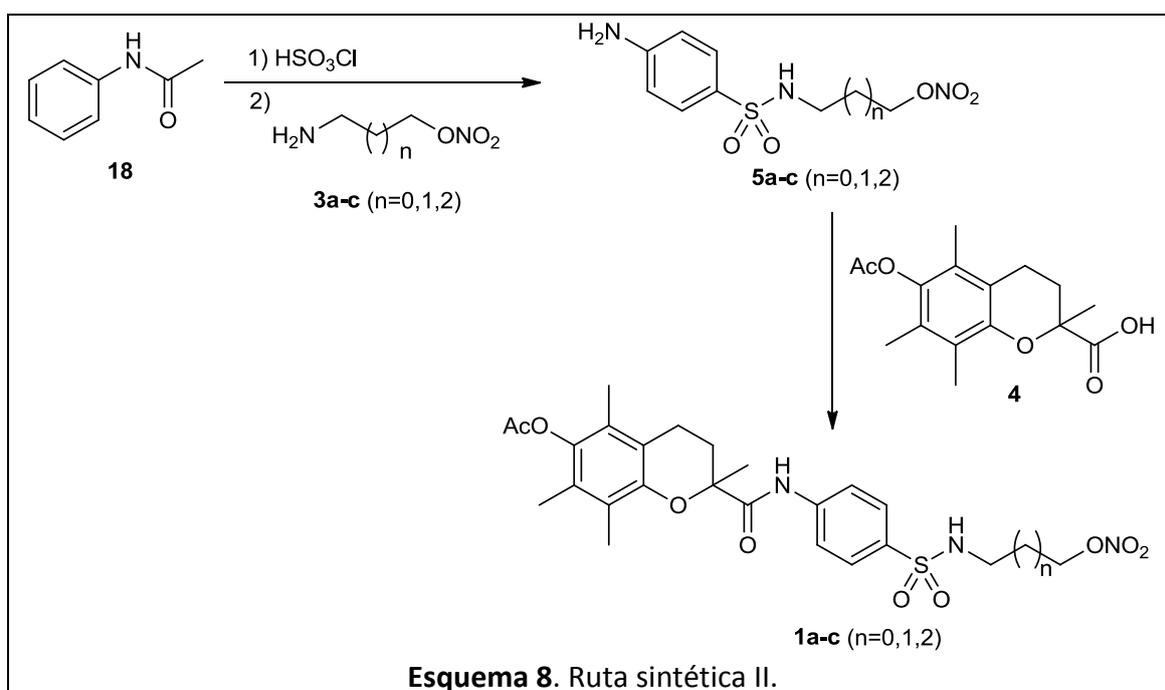
Luego se trató a la amida **9** con ácido clorosulfónico por 1 h a temperatura ambiente, transformándose en el intermedio **2** mediante una S_EAr , el cual se utiliza en la etapa siguiente sin purificar.[70] Finalmente se trata al intermedio **2** con 4-nitrooxibutilamina (**3c**) en diclorometano y en presencia de trietilamina a temperatura ambiente por 48 h, no llegando al producto esperado **1**. [64]



En vista de los resultados obtenidos se ensaya la síntesis de la sulfonamida **10** (**Esquema 7**), la cual por reacción de sustitución nucleofílica sobre el bromonitrooxialcano adecuado nos permitiría obtener los compuestos deseados (**1**). Entonces, para obtener la sulfonamida **10**, teniendo en cuenta la bibliografía, primero se realizó la reacción a 100 °C por 1 h, pero al no obtener resultados positivos se redujo la masa a la mitad y se realizó la reacción a temperatura ambiente, tampoco llegando al resultado deseado en esas condiciones.[70]



Teniendo en cuenta los resultados hasta el momento, paralelamente se estudia la ruta sintética II (**Esquema 8**).



Para preparar el producto deseado **1** mediante la vía alternativa II, en primer lugar, se sintetiza acetanilida a partir de anilina y anhídrido acético.[71] Para la siguiente etapa, en la literatura, se describen varios procedimientos convenientes para preparar **21a-c** como se muestra en los esquemas 9 y 10 a continuación. Primero se trata a la acetanilida con ácido clorosulfónico por 30 minutos a $60\text{ }^\circ\text{C}$, transformándose en el intermedio **20** mediante una $\text{S}_\text{E}\text{Ar}$.[72] Luego para obtener el intermedio **21a-c** a partir de **20** se prueban tres técnicas distintas que se detallan en la tabla a continuación

(**Tabla 1**) no obteniéndose los resultados deseados en ninguna de las condiciones ensayadas.[72, 73]

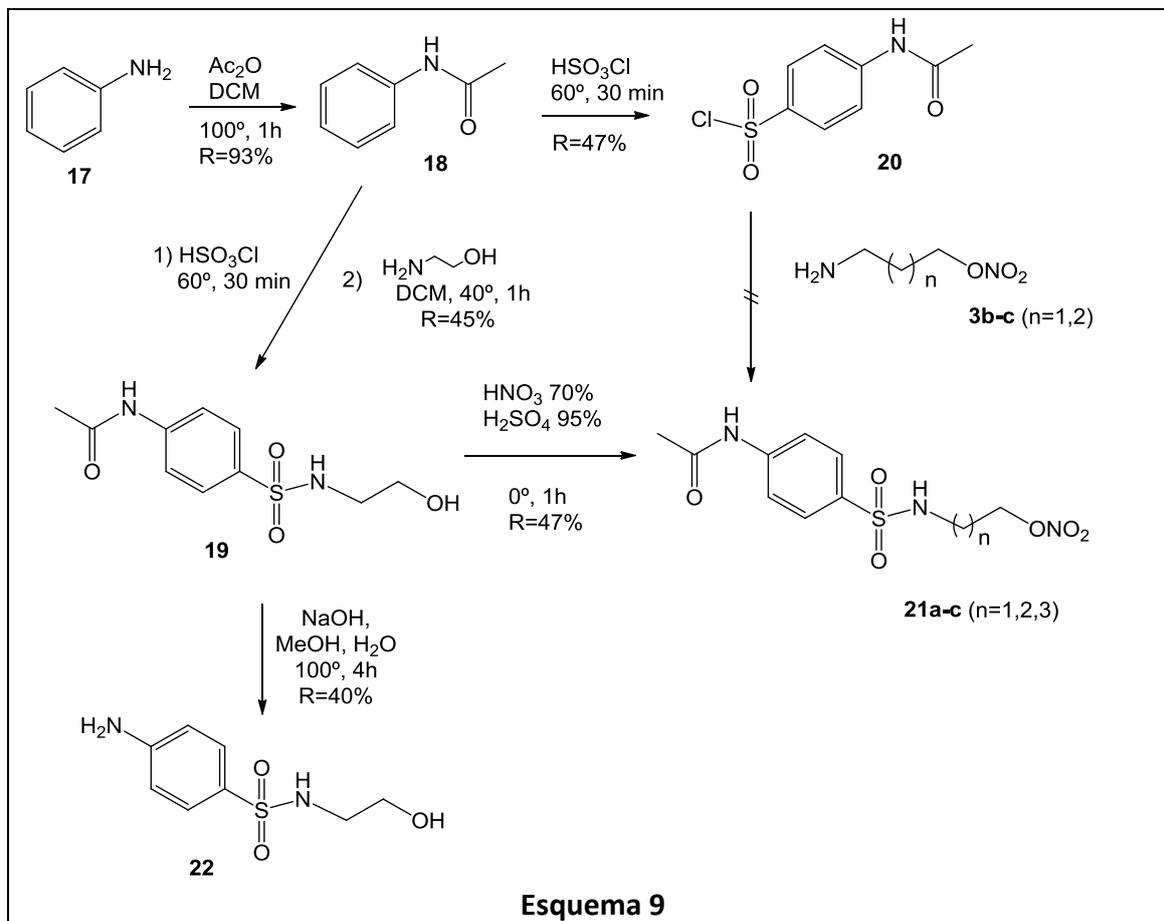
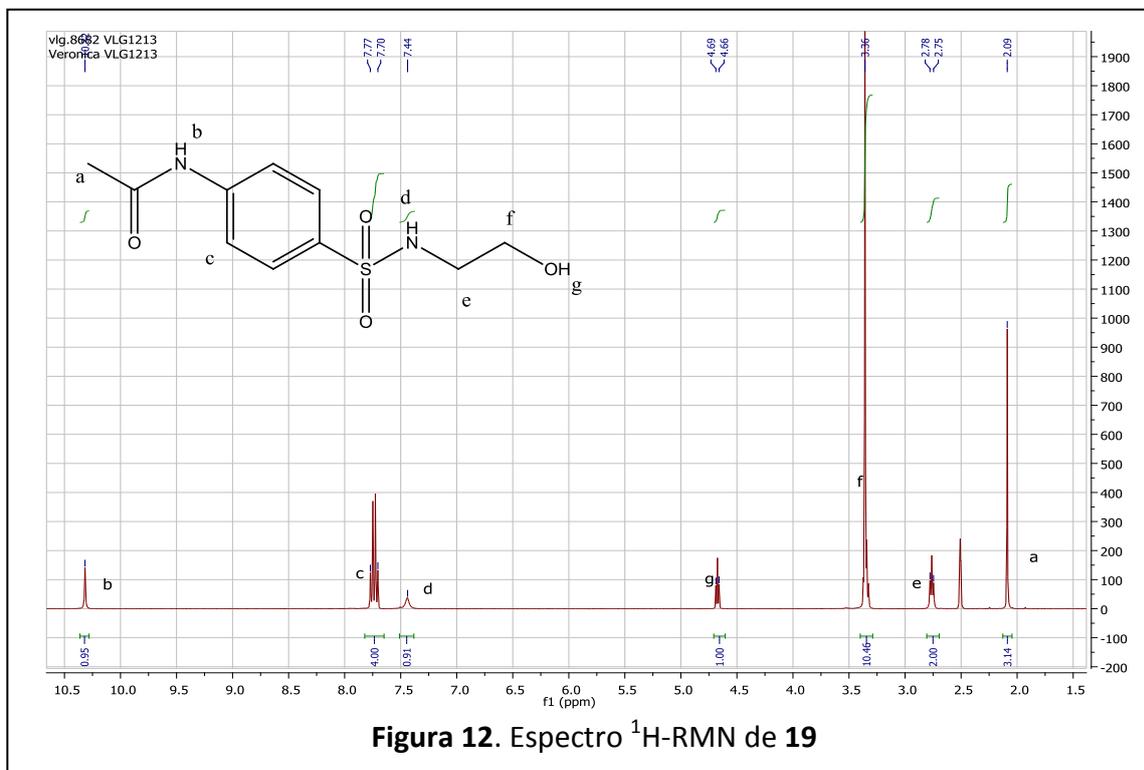


Tabla 1. Condiciones de reacción ensayadas para la obtención de **21b-c** a partir de **20**

Entrada	Condiciones ensayadas	Resultados
1	4-bromo-1-nitrooxibutilamina, diclorometano, TA, 30 min	No se obtiene 21c
2	4-bromo-1-nitrooxibutilamina, dioxano, 80°C , 1 h	No se obtiene 21c
3	3-bromo-1-nitrooxipirilamina, diclorometano, etanol, 40°C , 2,5 h	No se obtiene 21b

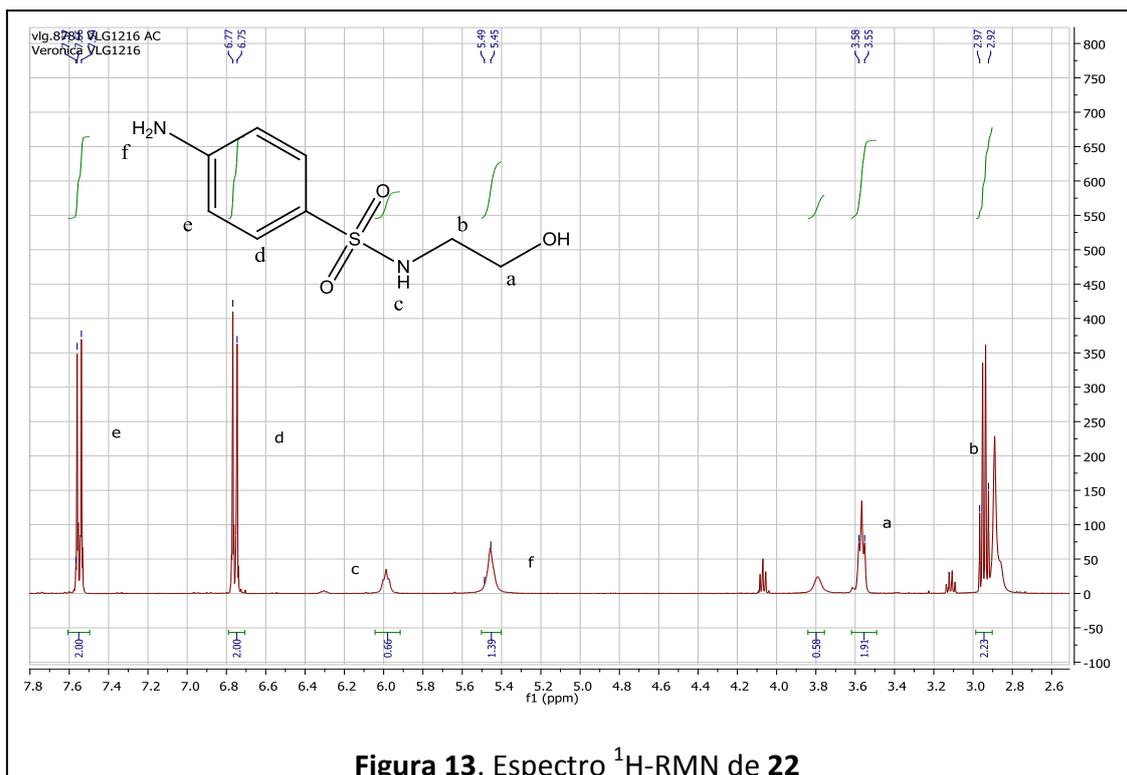
Por otro lado, siguiendo una ruta sintética alternativa (**Esquema 9**) se hace reaccionar la acetanilida en primera instancia con ácido clorosulfónico a 60°C por 30 minutos. Luego de pasados los 30 minutos la mezcla de reacción se disuelve en diclorometano y adiciona trietilamina, por último se agrega etanolamina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente por 48 h.[72] Desafortunadamente en estas condiciones no se llegó a obtener el intermedio **19**, por lo que haciendo pequeñas modificaciones en la técnica (no utilizar trietilamina y calentar la reacción a 40°C por 1 h) se llega finalmente al intermedio **19**. Mediante experimentos de ^1H -RMN (**Figura 12**) se

confirmó la estructura del compuesto **19**. En la figura 12 se muestra el espectro de RMN donde se observan claramente las señales correspondientes a los distintos tipos de protones presentes en la molécula. La correcta asignación de las señales de los mencionados espectros fue realizada mediante la ayuda de los experimentos COSY.

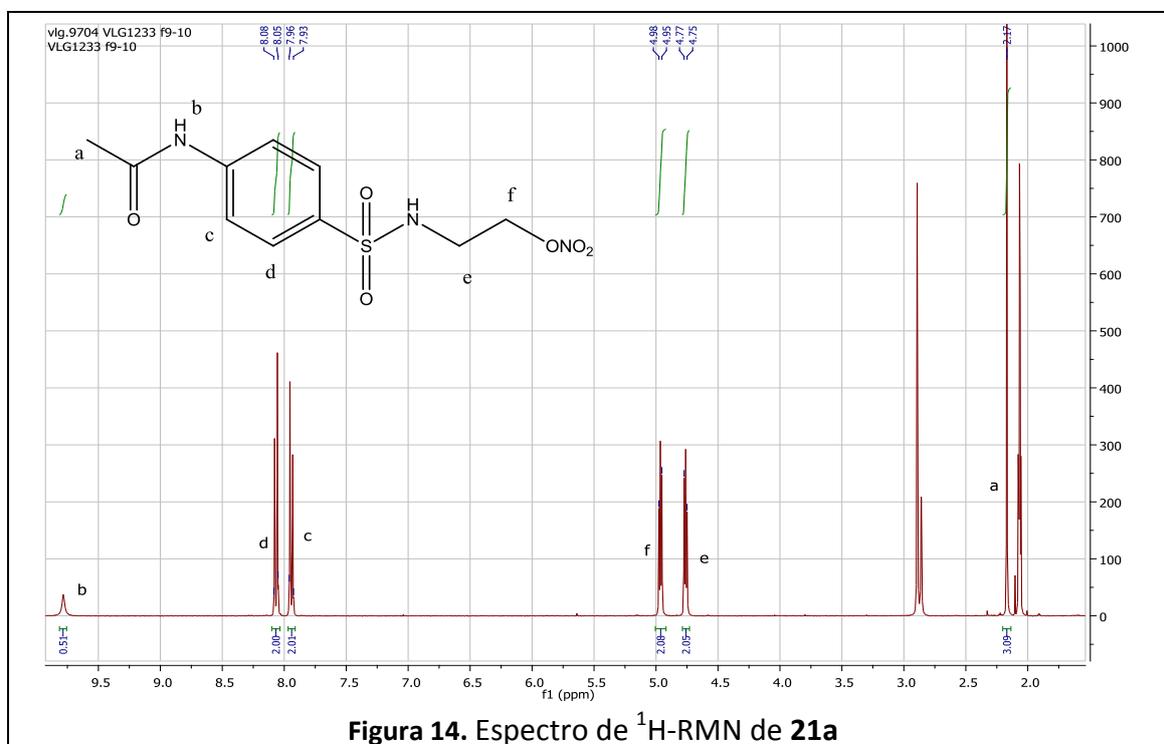


Una vez obtenido el intermedio **19**, por una parte se ensaya la hidrólisis de la amida (desprotección del grupo amina) obteniéndose **22** con buenos resultados.[74]

Mediante experimentos de $^1\text{H-RMN}$ (Figura 13) se confirmó la estructura del compuesto **22**. En la figura 13 se muestra el espectro de RMN donde se observan claramente las señales correspondientes a los distintos tipos de protones presentes en la molécula. La correcta asignación de las señales de los mencionados espectros fue realizada mediante la ayuda de los experimentos COSY.



Por otra parte, el intermedio **19** se transforma en el nitrato **21a** por tratamiento con HNO_3 70% y H_2SO_4 95% (Esquema 9).[73]



El intermedio **21a** se caracteriza mediante experimentos de ^1H -RMN (**Figura 14**). En la figura 14 se muestra el espectro de ^1H -RMN donde es fácil notar la diferencia en el desplazamiento químico correspondiente a la señal de los protones metilénicos unidos al grupo $-\text{ONO}_2$ cuando se compara con la señal de dichos protones metilénicos unidos al grupo $-\text{OH}$ en el intermedio **19** (**Figura 12**).

Por otro lado se intenta llegar al intermedio **21** mediante otra ruta sintética nuevamente a partir de acetanilida. Esta vez, en una primera etapa con objeto de obtener la sulfonamida **23**, se trata acetanilida diferentes condiciones siendo la más efectiva la descrita en el esquema 10.[74, 75] De los resultados obtenidos se desprende que el compuesto **21b** se obtiene con buen rendimiento a partir del intermedio **23**. Las condiciones ensayadas se detallan en la tabla a continuación (**Tabla 2**), siendo la mejor la mencionada en la entrada 3.

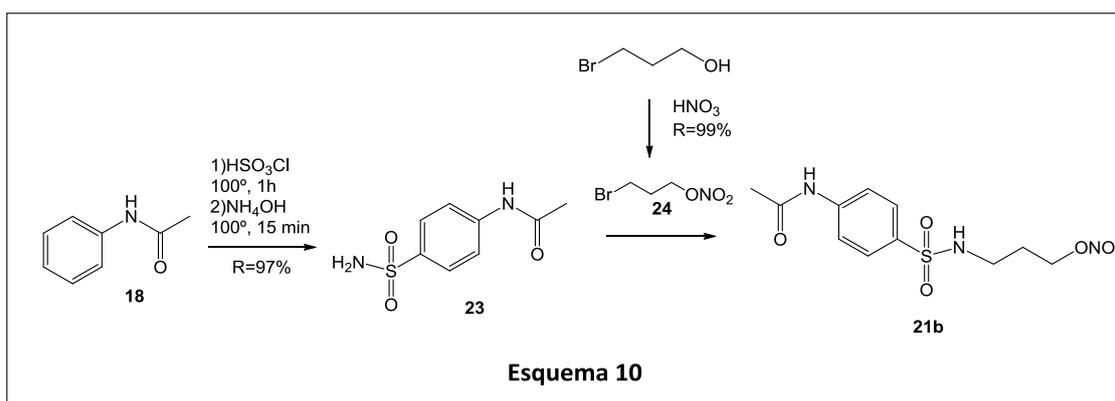
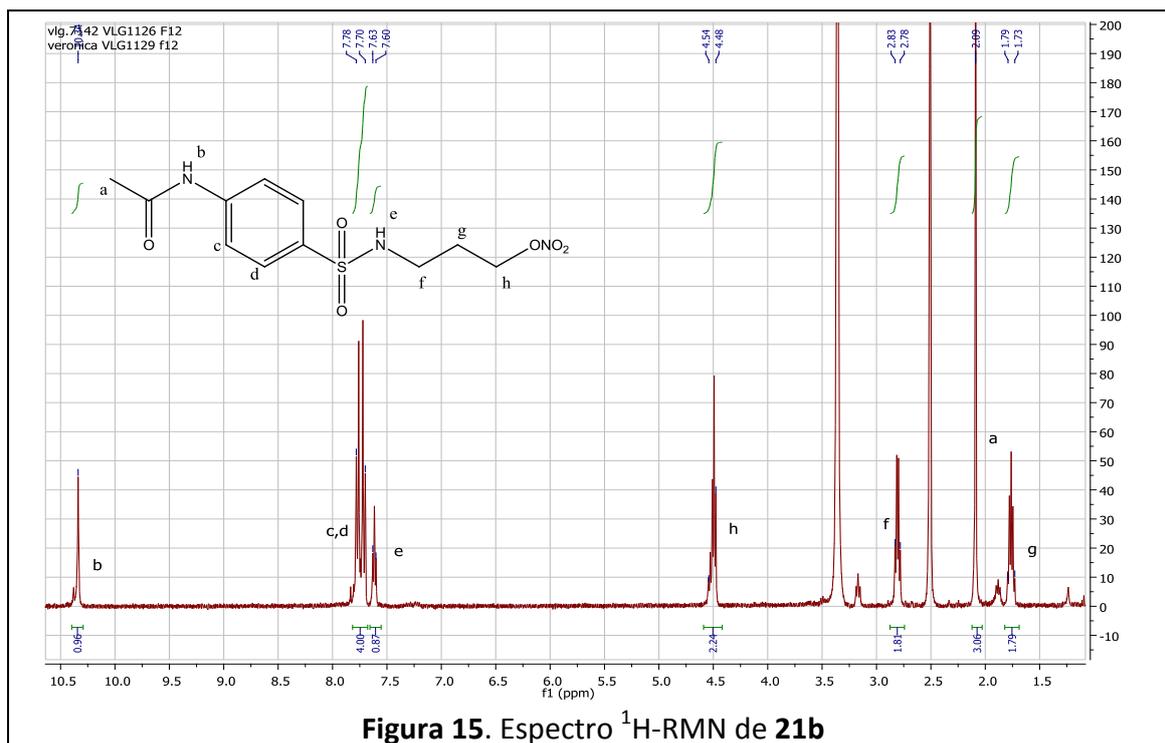


Tabla 2. Condiciones de reacción ensayadas para la obtención de **21b** a partir de **23**

Entrada	Condiciones ensayadas	Resultados
1	23: 3-bromo-1-nitrooxipropano, acetona, Δ , 48 h	Se obtiene 21b con un rendimiento de 18%
2	23: 3-bromo-1-nitrooxipropano, etanol, Δ , 6 h	Se obtiene 21b con un rendimiento de 7%
3	23: 3-bromo-1-nitrooxipropano, DMF, Δ , 3,5 h	Se obtiene 21b con un rendimiento de 51%

Mediante experimentos de ^1H -RMN (**Figura 15**) se confirmó la estructura del compuesto **21b**. En la figura 15 se muestra el espectro de RMN donde observan claramente las señales correspondientes a los distintos tipos de protones presentes en la molécula. La correcta asignación de las señales de los mencionados espectros fue realizada mediante la ayuda de los experimentos COSY.



Finalmente, a partir del intermedio **21a-b** se procede a realizar la hidrólisis por catálisis tanto básica como ácida el intermedio **5a-b** (**Esquema 11**), no lográndose obtener el resultado deseado en ninguna de las condiciones ensayadas (**Tabla 3**).

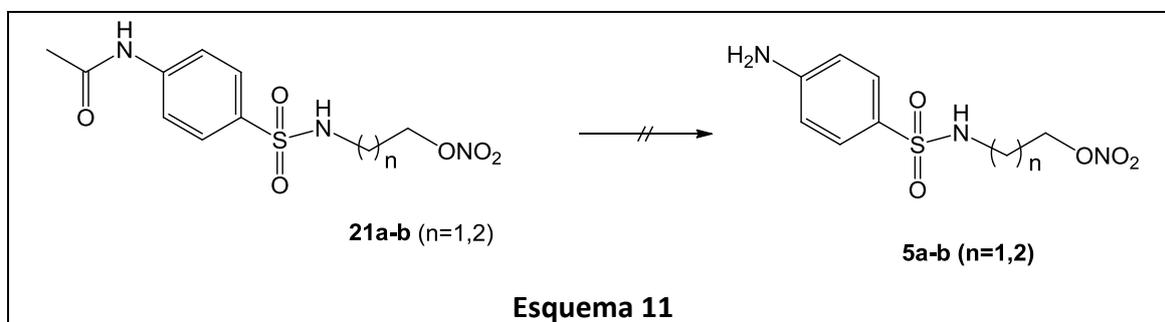
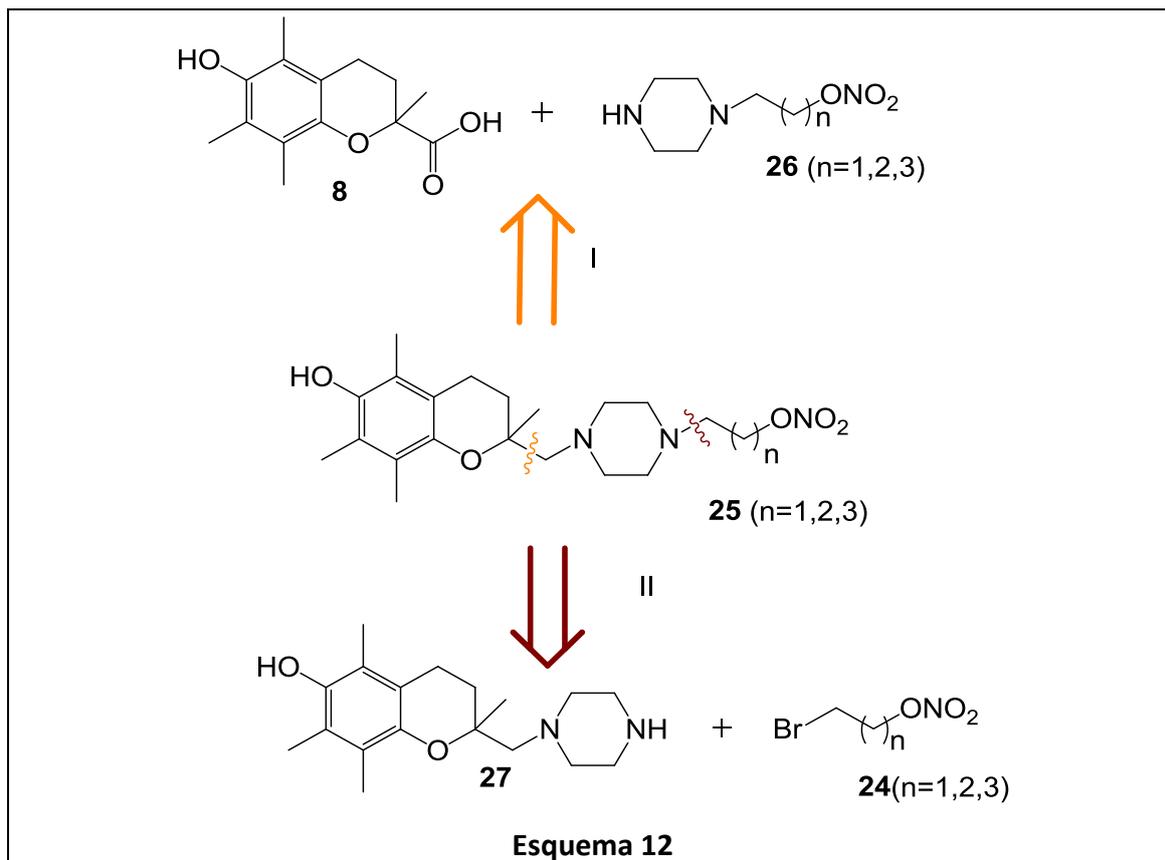


Tabla 3. Condiciones de reacción ensayadas para la hidrólisis de **21a-b**

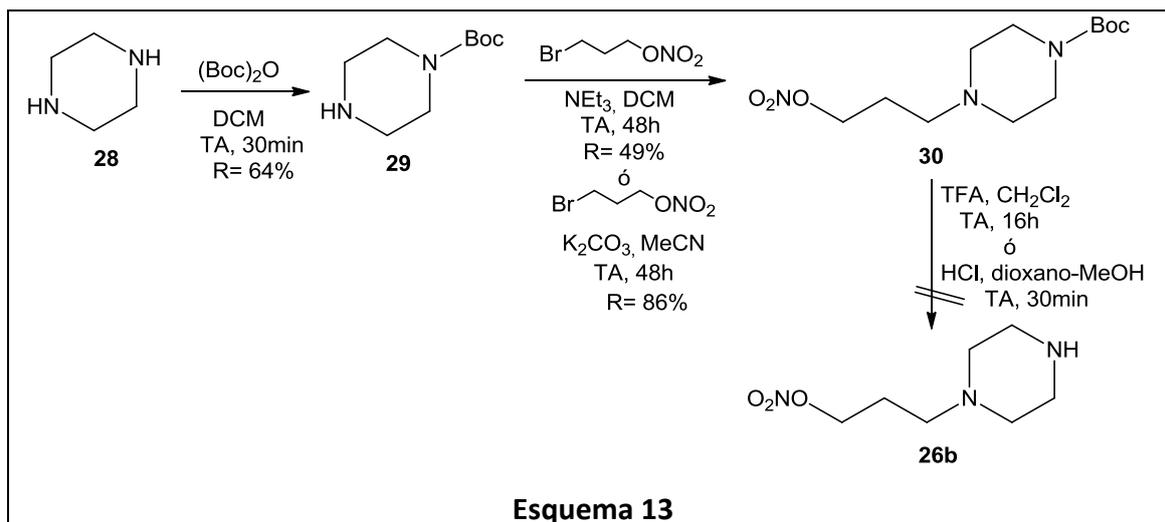
Entrada	Condiciones ensayadas	Resultado
1	21a ó 21b: KOH, H ₂ O, MeOH, 100°C 3 h	No se obtiene 5a ó 5b
2	21a: HCl, EtOH, TA, 24 h	No se obtiene 5a
3	21a: NaOH, MeOH, TA, 24 h	No se obtiene 5a
4	21a: SOCl ₂ , MeOH, Δ, 2 h	No se obtiene 5a

SERIE 2. La Serie 2 está formada por los derivados que incorporan la subestructura nitrooxilo a nivel de la cadena lateral del ácido (\pm)-6-acetiloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, enlazado a través de una subgrupo tipo piperazina (**Esquema 12**).

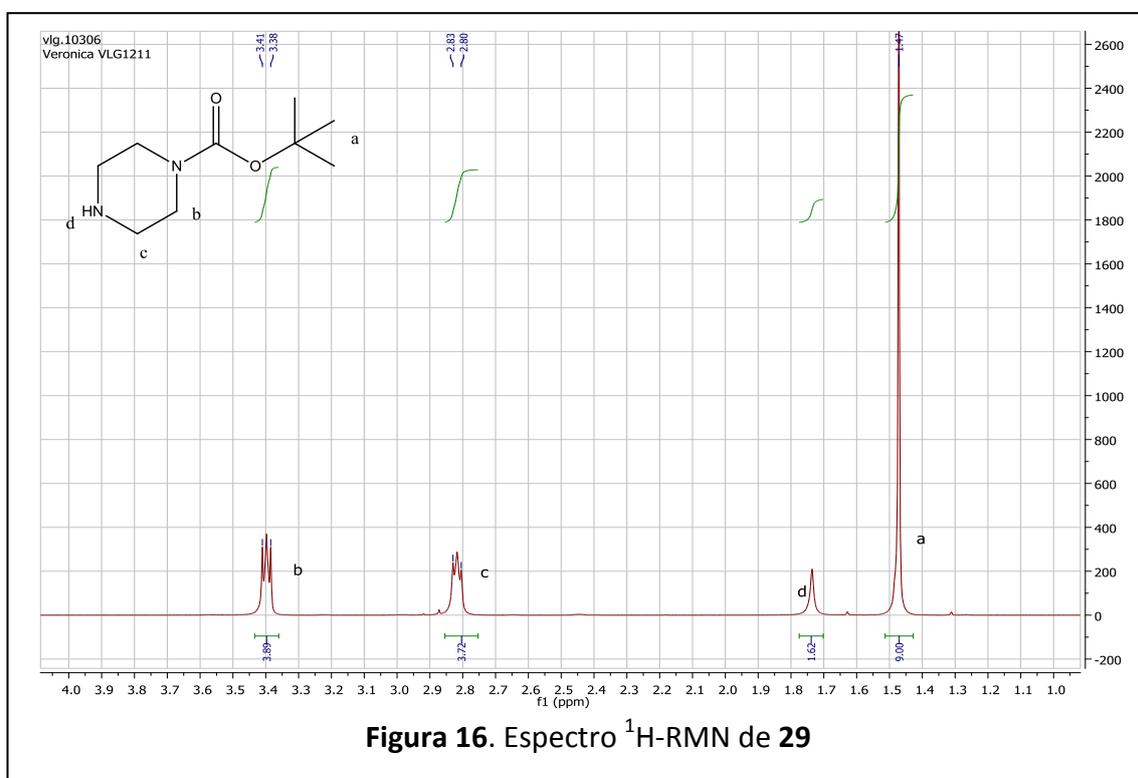
Se diseñan dos rutas sintéticas que permiten cumplir con los objetivos descritos a partir del análisis retrosintético de los nuevos derivados que se desean preparar:

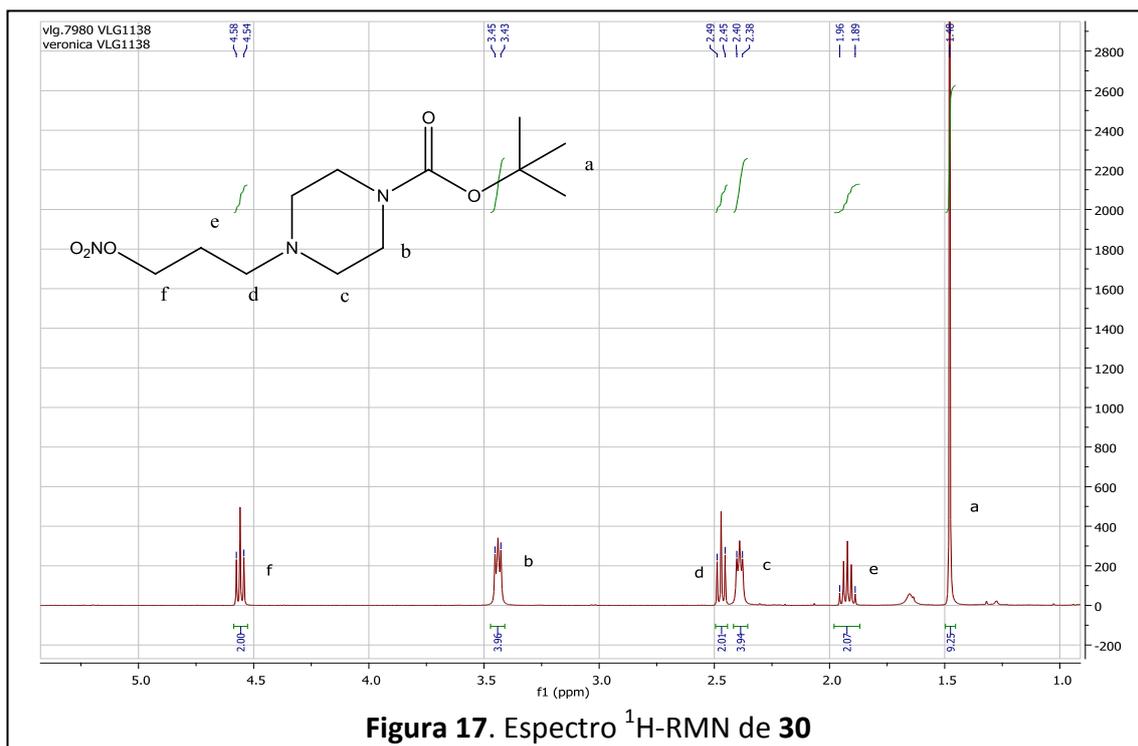


Para ello, se comienza con la protección de uno de los grupos amino de la piperazina (**28**, **Esquema 13**) con dicarbonato de di-tert-butilo.[76] El producto monoprotegido así obtenido se hace reaccionar con 3-bromo-1-nitrooxipropano en presencia de base. Se ensayan dos condiciones, detalladas en el esquema 13.[77] La etapa siguiente involucra la desprotección del grupo amino. En las condiciones ensayadas (**Esquema 13**) siguiendo la reacción por CCF, se observa la desaparición del reactivo **29** y se observa la aparición de una nueva mancha, que más tarde por RMN se comprueba que no es el producto esperado.[77-79]

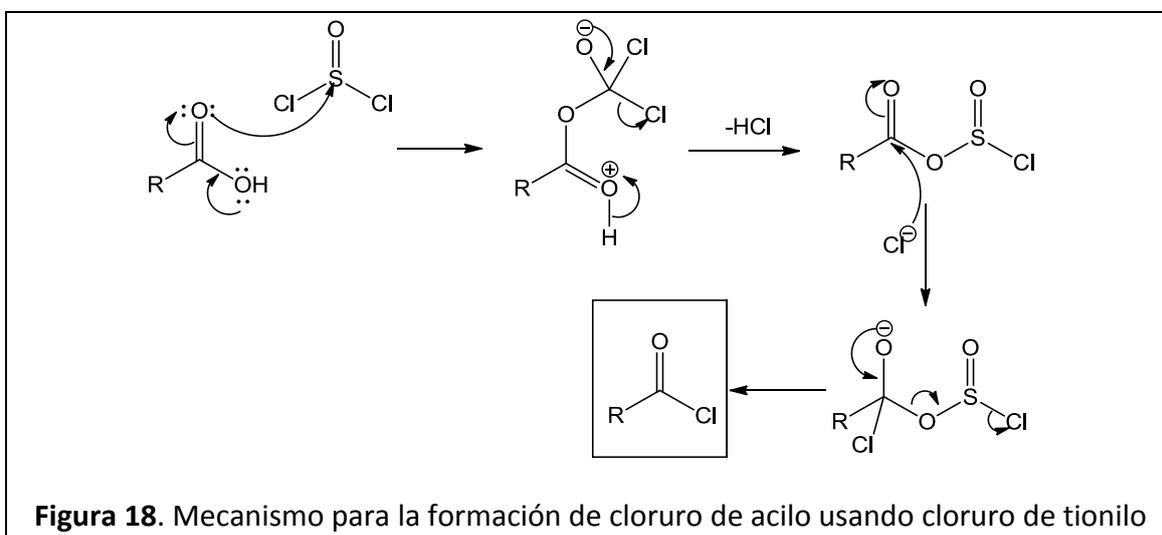


A través de experimentos de ^1H -RMN se confirmó la estructura de los intermedios **29** y **30** (Figuras 16 y 17, respectivamente). La correcta asignación de las señales de los mencionados espectros fue realizada mediante la ayuda de los experimentos COSY. En el espectro de ^1H -RMN del intermedio **30** (Figura 17), se observa la aparición de las señales correspondientes a los protones de la cadena hidrocarbonada unida al nitrógeno de la piperazina.

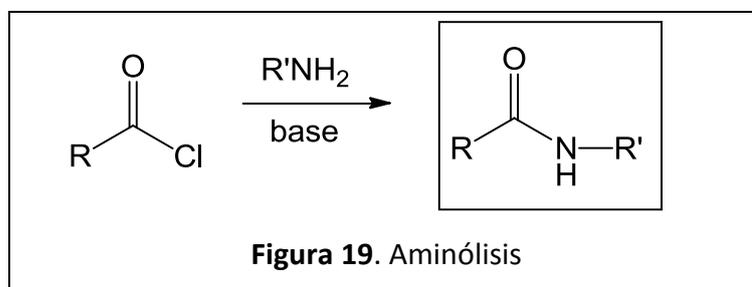




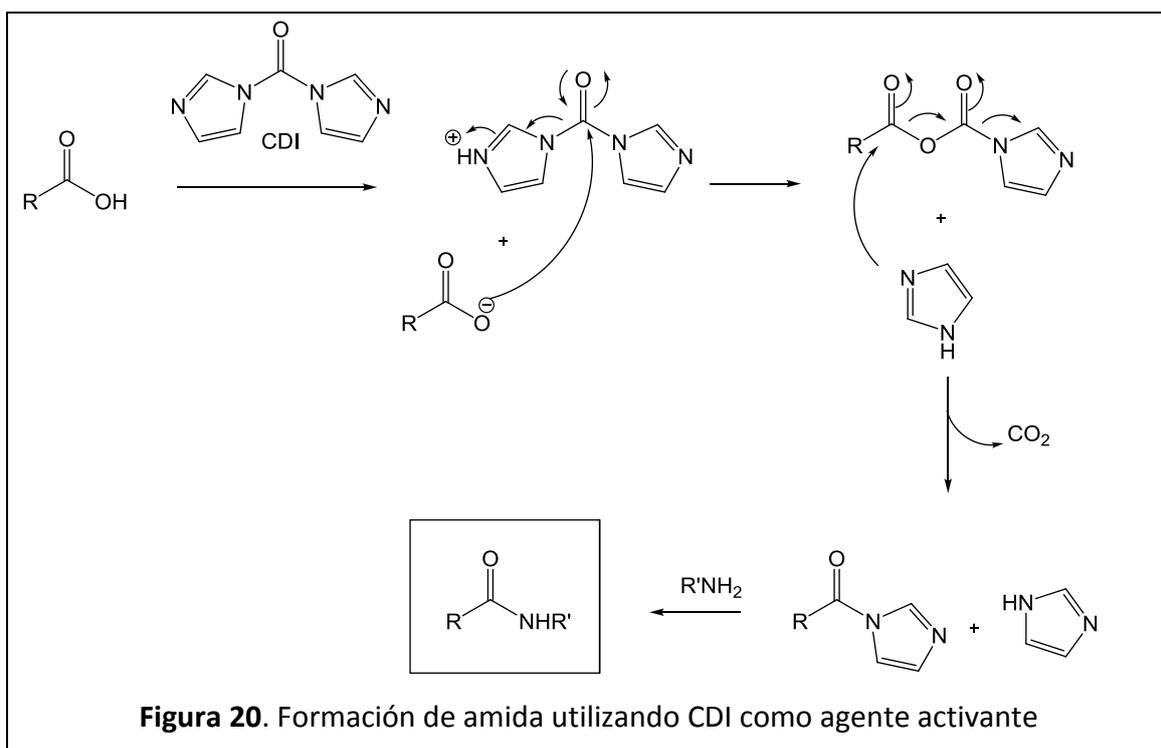
Paralelamente se trabajó en la ruta alternativa (II, **Esquema 12**) a partir del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxílico **8** o su derivado acetilado **4** (**Esquema 14**). En la literatura se pueden encontrar distintos agentes activantes para la formación de amidas a partir de ácidos carboxílicos.[80, 81] Una forma simple de transformar el ácido carboxílico en un intermedio más reactivo es preparar su cloruro de acilo o cloruro de ácido. En este caso, la preparación de la amida es por lo general un proceso de dos pasos, que implica primero la conversión del ácido en el haluro de acilo (**Figura 18**) seguido por el acoplamiento en sí. Estas reacciones a menudo se promueven mediante la adición de una gota de dimetilformamida (DMF).



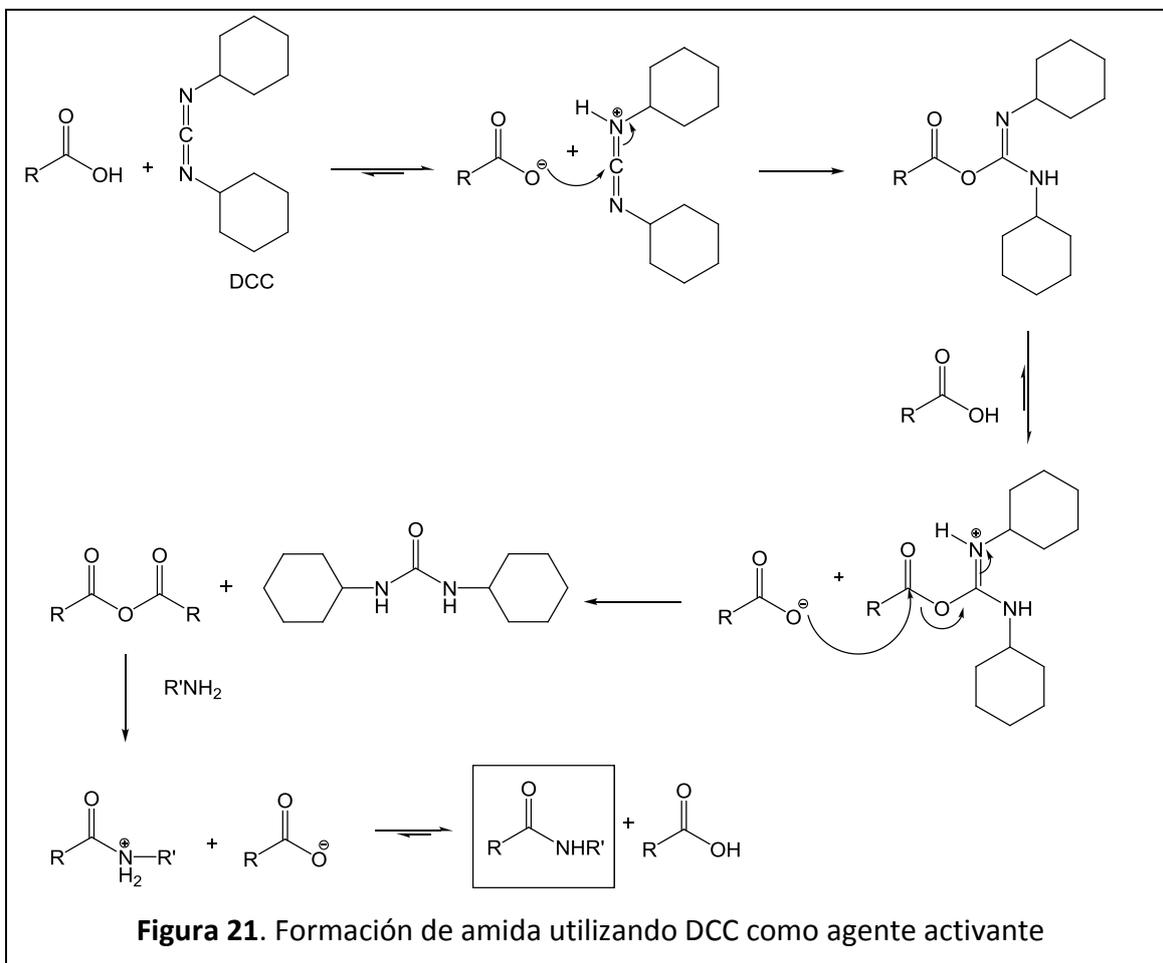
El enlace amida se forma haciendo reaccionar el cloruro de acilo con la amina deseada (**Figura 19**). Los acoplamiento se realizan generalmente en disolventes inertes secos, en presencia de una amina terciaria no nucleofílica (por ejemplo, NEt_3 ó piridina) para atrapar el HCl formado y evitar la conversión de la amina en su sal.



Otros métodos para la síntesis de amidas requieren el uso de agentes activantes, uno de los más usados es el 1,1-carbonildiimidazol. El CDI es un agente acoplante útil que permite la formación de la amida deseada. Inicialmente se forman el correspondiente Acilcarboxiimidazol e imidazol, para luego reaccionar entre si y producir la especie activada acilimidazol (**Figura 20**). Prácticamente, el acilimidazol se forma luego de 1 h de colocar juntos el ácido carboxílico y CDI, y a continuación se añade la amina. Esta reacción, que genera imidazol in situ, no necesita una base adicional. Este reactivo se emplea comúnmente en la síntesis de péptidos a gran escala y su uso se puede extender a la formación de ésteres y tioésteres.



Por otra parte también las carbodiimidas, por ejemplo dicitclohexilcarbodiimida (DCC) se usa muy frecuentemente en química orgánica sintética como agente activante de ácidos carboxílicos para la formación de amidas o ésteres. En este caso además es habitual el agregado de aditivos como el *N*-hidroxibenzotriazol o *N*-hidroxisuccinimida para aumentar los rendimientos y disminuir las reacciones laterales.



Por otro lado los anhídridos son especies que reaccionan fácilmente con una amplia gama de nucleófilos tales como alcoholes, tioles y, por supuesto, aminas. Esta estrategia consta del uso de anhídridos simétricos o anhídridos mixtos. La diversidad de los anhídridos comercialmente disponibles es bastante limitada y, muy a menudo, el anhídrido deseado tiene que ser preparado de antemano. Anhídridos simétricos se forman ya sea por calentamiento a altas temperaturas del ácido correspondiente o, en condiciones más suaves, haciendo reaccionar dos moléculas de ácido en la presencia de un equivalente de DCC (**Figura 21**). El anhídrido se hace reaccionar a continuación, en un segundo paso con la amina adecuada. En teoría, no se requiere ninguna base adicional ya que la adición genera un anión carboxilato in situ. La principal limitación

es que sólo la mitad del ácido es efectivamente acoplada y la otra mitad se desperdicia, esto podría ser un problema si el ácido es valioso.

Entonces, se ensayaron distintos agentes activantes en la preparación de la amida **27** o **31** (Esquema 14) como se describe en la tabla 4.[63, 82-84]

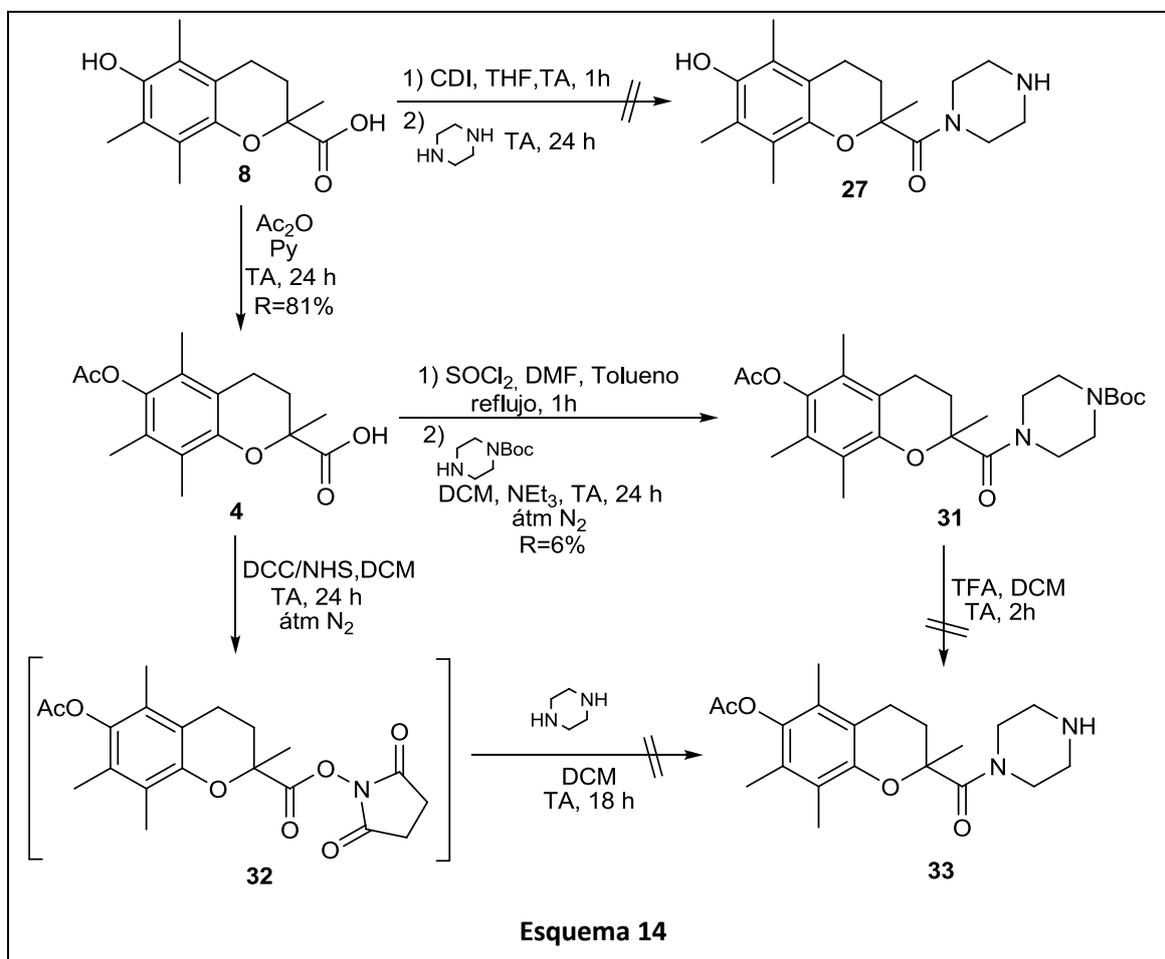


Tabla 4. Condiciones de reacción ensayadas para la formación de las amidas: **27**, **31**, **33**

Entrada	Condiciones ensayadas	Agente activante	Resultado
1	1- 8 , CDI, THF, 1 h, TA 2- 28 , TA, 24 h	CDI	No se obtiene 27
2	1- 4 , DCC, DCM 0 °C, 30' 2- 29 , TA, 48 h	DCC	No se obtiene 31
3	1- 4 , DCC, NHS, DCM, TA, 24 h 2- 28 , DCM, TA, 18 h	DCC	No se obtiene 33
4	1- 4 , SOCl ₂ , DMF, tolueno, 1 h, Δ 2- 29 , DCM, NEt ₃ , TA, 24 h	SOCl ₂	Se obtiene 31 con un rendimiento de 6%

Más tarde se ensayó la desprotección de la amina **31** con TFA a temperatura ambiente. En estas condiciones no se observó reacción.[78]

El avance de todas las reacciones se analiza por CCF y las mismas se detienen cuando no se detecta más producto de partida o cuando luego de largos periodos de reacción no se observa avance.

Capítulo 4

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

Generalidades

En este capítulo se detallan los datos experimentales y el análisis espectroscópico de los compuestos (intermedios y productos finales) obtenidos.

Los disolventes se purifican y secan, previo a su utilización, por métodos convencionales.[85, 86]

Otros reactivos fueron adquiridos en empresas comerciales y usados sin purificación.

El grado de avance de las reacciones y la pureza de los productos se examina por cromatografía en capa fina. Se usa sílica gel con indicador fluorescente sobre placas de poliéster y/u óxido de aluminio (alúmina) con indicador fluorescente sobre placas de poliéster.

Las fases móviles más usadas fueron mezclas de acetato de etilo y éter de petróleo (en distintas proporciones); éter etílico y éter de petróleo (en diversas proporciones) y diclorometano y metanol (en distintas proporciones).

Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:

- Exposición a la luz ultravioleta (254 nm).
- Exposición a vapores de yodo
- Asperjado con una mezcla de: etanol: ácido sulfúrico: anisaldehído (95:4:1) (V/V/V) y posterior quemado.

Para las cromatografías en columna (CC), se utiliza sílica gel (Kieselgel, tamaño 0.063-0.2 mm, J. T. Baker) o alúmina (Merck, 70-230 mesh).

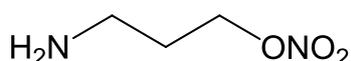
Todas las reacciones que involucran reactivos sensibles a la humedad o aire se realizan bajo atmósfera de nitrógeno.

Los espectros ^1H -RMN de los compuestos se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), empleando los disolventes indicados con cada producto y tetrametilsilano como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las multiplicidades según: singulete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), doble doblete (dd), doble triplete (dt) y señal ancha (sa). Para obtener los espectros de correlación homonuclear y heteronuclear, COSY, HSQC y HMBC, se utilizan las secuencias de pulso disponibles en el software del equipo.

Los puntos de fusión de los compuestos se determinan utilizando un equipo ELECTROTHERMAL IA-9100.

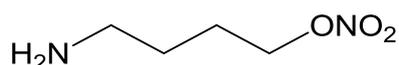
Los espectros de masa por impacto electrónico se realizan en un equipo Shimadzu GCMS QP 1100 EX a un potencial de ionización de 70 eV por inyección directa.

Síntesis de los compuestos de la Serie 1



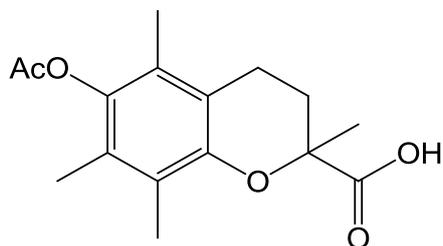
3-nitrooxipropilamina (3b). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[67] *N*-(3-nitropropil)ftalimida **16b** (0,20 g, 0,80 mmol) se disuelve en etanol (5,0 mL). Luego se agrega monohidrato de hidrazina (0,04 g, 0,80 mmol). Se refluxa por 1,5 h. La mezcla de reacción se enfría y el precipitado se remueve por filtración. El disolvente del filtrado se evapora a presión reducida. Líquido amarillo. R= 100 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 4,61-4,58 (m, 2H), 2,86-2,78 (m, 2H), 1,93-1,87 (m, 2H).



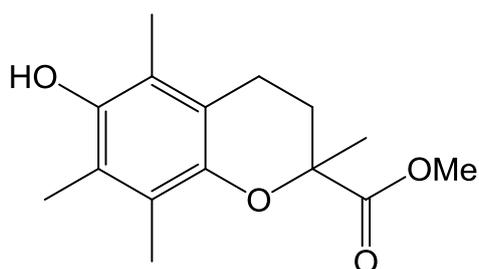
4-nitrooxibutilamina (3c). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[69] En un balón de dos bocas se coloca NaOH sólido (100 mg). A dicho balón se conecta un ecualizador con clorhidrato de metilamina (0,56 g, 8,25 mmol) en H_2O y se conecta a otro balón de dos bocas, donde se coloca *N*-(4-nitrooxibutil)ftalimida **16c** (0,20 g, 0,75 mmol) en etanol absoluto y en la otra boca una salida de gases. El balón con NaOH se calienta a 60 °C durante el agregado de la metilamina generando la liberación de la amina, para que ésta reaccione con el reactivo en etanol. La reacción continúa hasta que se corrobora por TLC la desaparición de *N*-(4-nitrooxibutil)ftalimida. Al terminar la reacción el disolvente se evapora a presión reducida. Líquido amarillo. R= 40 %.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 4,53-4,49$ (m, 2H), $3,45-3,40$ (m, 2H), $1,86-1,79$ (m, 2H), $1,74-1,67$ (m, 2H).



Ácido 6-acetoxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (4). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[61] Una solución de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxílico **8** (0,76 g, 3,05 mmol), en piridina (7,8 mL, 97,00 mmol), y ácido acético (6,53 mL, 69,28 mmol) se agitan por 24 h a temperatura ambiente. Luego a la mezcla de reacción se agrega H_2O (10 mL) en baño de hielo y se agita por 15 minutos. Luego se realizan extracciones con éter etílico (3x10 mL), H_2O (3x10 mL), solución saturada de CuSO_4 (3x10 mL) y finalmente solución saturada de cloruro de sodio. La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra el agente desecante y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (SiO_2 , EP:Et₂O (1:1)). Sólido blanco. R= 81 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2,68-2,61$ (m, 2H), $2,42-2,38$ (m, 1H), $2,34$ (s, 3H), $2,18$ (s, 3H), $2,05$ (s, 3H), $1,98$ (s, 4H), $1,65$ (s, 3H).

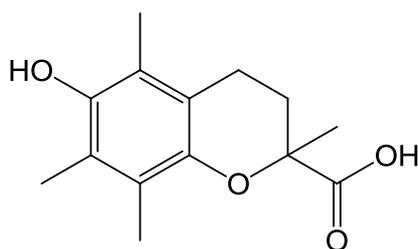


6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxilato de metilo (7). Método A. Se prepara según se describe en la literatura con pequeñas modificaciones.[60] A una mezcla de metacrilato de metilo (14,63 g, 146,00 mmol), paraformaldehído (0,88 g, 29,20 mmol), dibutilamina (0,45 g, 3,50 mmol) y ácido acético (5,50 mL, 96,20 mmol) bajo agitación a temperatura ambiente se adiciona trimetilhidroquinona (4,44 g, 29,2 mmol). Se

calienta a reflujo por 23 h y luego de llegar a temperatura ambiente la mezcla resultante se enfría a 0-5 °C. El sólido presente se filtra y lava con metanol frío. El producto se purifica por recristalización de metanol. Sólido blanco. R= 66 %. P. F. 162.0-164.0 °C.

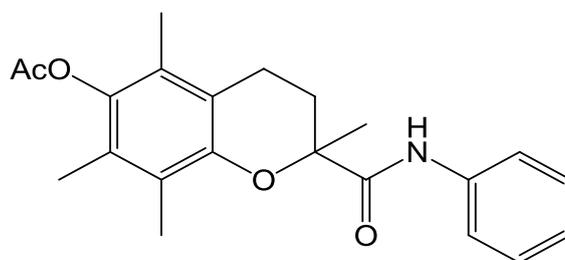
Método B. Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[62] En un reactor de presión de acero inoxidable, se coloca trimetilhidroquinona (10,00 g, 65,70 mmol), paraformaldehído (4,00 g, 133,20 mmol), metacrilato de metilo (32,76 g, 327,00 mmol) y H₂O (3,00 mL). La mezcla se deja reaccionar a 180 °C por 3 h. Luego de completada la reacción la mezcla se enfría a temperatura ambiente y se adiciona metanol para que se forme un precipitado. El producto se purifica por recristalización de metanol. Sólido blanco. R= 50 %. P. F. 162.0-164.0 °C.

¹H-NMR (CDCl₃): δ= 5,65 (s, 1H), 3,67 (s, 3H), 2,65-2,72 (m, 1H), 2,41-2,55 (m, 2H), 2,18 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 1,82-1,90 (m, 1H), 1,59 (s, 3H).



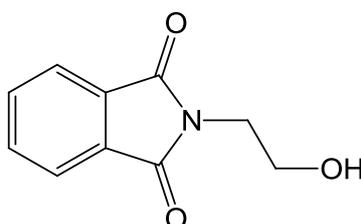
Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxílico (8). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[62] A una solución de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxilato de metilo **7** (1,15 g, 4,35 mmol) en metanol (7,50 mL) se adiciona gota a gota por 2h a una solución de NaOH (0,23 g, 5,65 mmol) en H₂O (3,33 mL). Luego, la mezcla de reacción se calienta a 80 °C por 2 horas. Una vez cumplido este tiempo la mezcla se neutraliza con una solución de NaHSO₄ (0,678 g, 5,65 mmol) en H₂O (1,67 mL). La mezcla de reacción se filtra y los cristales obtenidos se secan en desecador. Sólido blanco. R= 95 % P.F. 187.0-189.0 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ=2,70-2,64 (m, 2H), 2,19 (s, 6H), 2,11 (s, 3H), 2,0-1,93 (m, 2H), 1,63 (s, 3H).



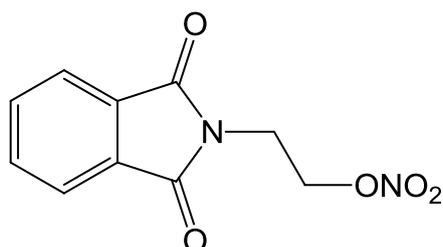
6-acetoxy-2-(fenilcarbamoil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (9). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[63] Cloruro de tionilo (0,10 mL, 0,77 mmol) y 1 gota de DMF se agregan a una solución de ácido 6-acetoxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico **4** (0,15 g, 0,51 mmol) en tolueno seco (2,0 mL). La mezcla se calienta a reflujo por 1 h y se enfría a temperatura ambiente. El disolvente en exceso y el cloruro de tionilo se evaporan a presión reducida. El cloruro de ácido se disuelve en diclorometano (1,4 mL) y se adiciona gota a gota a una solución de anilina (0,046 mL, 0,51 mmol) y trietilamina (0,16 g, 1,54 mmol) en diclorometano (1,0 mL). Luego se agita a temperatura ambiente por 24 h. La mezcla de reacción se lava con HCl 10%, solución saturada de bicarbonato de sodio, agua, solución saturada de cloruro de sodio. La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra el agente desecante y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (SiO₂, EP:AE (8:2)). Sólido marrón. R= 95 %

¹H-NMR (CDCl₃): δ= 8,35 (d, 1H), 7,52 (s, 2H), 7,33 (d, 2H), 7,15 (m, 2H), 2,68 (s, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 2,19 (s, 2H), 2,10 (s, 3H), 2,0 (s, 3H), 1,63 (s, 3H).



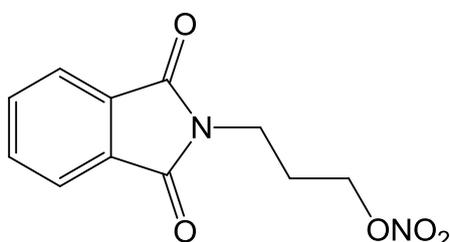
N-(2-hidroxietil)ftalimida (13). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[87] En un balón se mezclan anhídrido ftálico (1,00 g, 6,74 mmol) y etanolamina (0,42 g, 6,74 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 100 °C por 30 minutos. El producto se aísla y purifica por recristalización de agua. Cristales blancos. R= 24 % P.F. 130.0-134.0 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7,91-7,87$ (m, 2H), $7,76-7,74$ (m, 2H) $3,94-3,88$ (m, 4H).



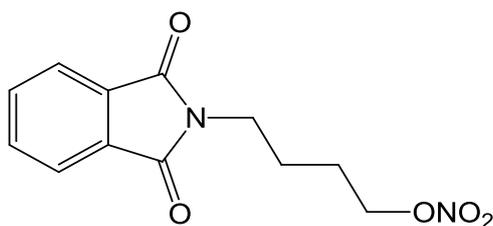
***N*-(2-nitrooxietil)ftalimida (14)**. Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[66] A una suspensión de *N*-(2-hidroxiethyl)ftalimida **13** (0,32 g, 1,67 mmol) en acetonitrilo (21,40 mL), protegida de la luz, se agrega nitrato de plata (0,57 g, 3,34 mmol) y trifenilfosfina (0,64 g, 2,45 mmol). La mezcla de reacción se enfría a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se agrega NBS (0,42 g, 2,39 mmol). La agitación a $0\text{ }^\circ\text{C}$ se continúa por 1 h y luego se calienta a $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 3 h. La mezcla de reacción se filtra y el filtrado se evapora a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (SiO_2 , Et_2O :EP (1:1)). Sólido amarillo. R= 52 % P.F. $88.0-89.0\text{ }^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7,93-7,88$ (m, 2H), $7,80-7,53$ (m, 2H), $4,72-4,69$ (m, 2H), $4,11-4,08$ (m, 2H).



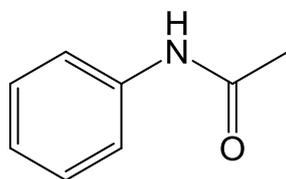
***N*-(3-nitrooxipropil)ftalimida (16b)**. Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[68] En un balón, protegido de la luz, se coloca *N*-(3-bromopropil)ftalimida (2,00 g, 7,46 mmol) en acetonitrilo (20 mL) y se agrega nitrato de plata (1,90 g, 11,17 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente por 9 días. Luego la mezcla de reacción se vuelca en agua, se filtra el sólido verde, y las aguas madres se extraen con acetato de etilo. La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra el agente desecante y el disolvente se evapora a presión reducida. Sólido blanco. R= 58 % P.F. $72.0-73.0\text{ }^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7,88$ (dd, 2H), $7,76$ (dd, 2H), $4,54$ (t, 2H), $3,86$ (t, 2H), $2,15$ (q, 2H).

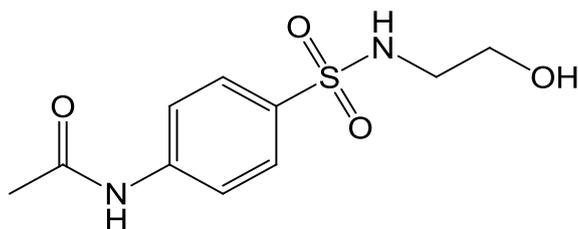


N-(4-nitrooxibutil)ftalimida (16c). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[68] En un balón, protegido de la luz, se coloca *N*-(4-bromobutil)ftalimida (2,00 g, 7,09 mmol) en acetonitrilo (20 mL) y se agrega nitrato de plata (1,80 g, 10,59 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente por 9 días. Luego la mezcla de reacción se vuelca en agua, se filtra el sólido verde, y las aguas madres se extraen con acetato de etilo. La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra el agente desecante y el disolvente se evapora a presión reducida. Sólido blanco. R= 58 % P.F. 68.0-70.0 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ= 7,87 (dd, 2H), 7,75 (dd, 2H), 4,52 (t, 2H), 3,76 (t, 2H), 1,83 (m, 4H).



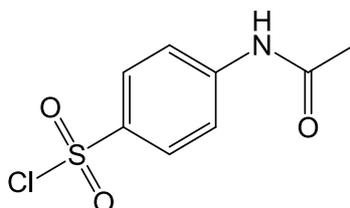
Acetanilida (17). Se prepara como se describe en la literatura.[71]



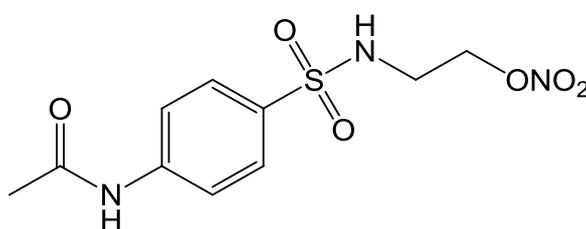
4-acetamido-N-(2-hidroxietil)bencensulfonamida (19). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[72] En un balón de dos bocas

se coloca acetanilida **17** (2,00 g, 14,8 mmol) y se agrega lentamente ácido clorosulfónico (5,20 mL, 78,44 mmol). El equipo se protege de la humedad ambiente con una campana de cloruro de calcio. La mezcla de reacción resultante se agita a 60 °C por 30 minutos. Luego se enfría en baño de hielo y se observa la aparición de un precipitado. El producto se filtra a vacío. Al sólido filtrado se le agrega una solución de etanolamina (2,08 g, 34,04 mmol) en diclorometano (15 mL). La mezcla de reacción se agita por 1 h a 40 °C, 1 h a temperatura ambiente y vuelca sobre agua. Se observa la aparición de un precipitado el cual se filtra a vacío. Se obtiene el producto puro como un sólido blanco. R= 45 % P.F. 155.0-157.0 °C

¹H-NMR (DMSO): δ=10,32 (s, 1H), 7,77-7,70 (m, 4H), 7,44 (s, 1H), 4,69-4,66 (t, 1H), 3,37-3,33 (m, 2H), 2,7 (m, 2H), 2,09 (s, 3H).



Cloruro de 4-acetamidobencensulfonilo (20). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[72] Ácido clorosulfónico (0,46 g, 3,93 mmol) se agrega lentamente a acetanilida **17** (0,10 g, 0,74 mmol,). La mezcla resultante se agita a 60 °C por 30 minutos. Luego de enfriar, el producto se filtra a vacío y se lava dos veces con 50 mL de H₂O. Aceite amarillo. R= 47 %

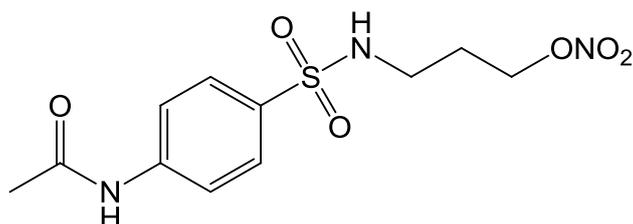


4-acetamido-N-(2-nitrooxietil)bencensulfonamida (21a). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[73] 4-acetamido-N-(2-hidroxietyl) bencensulfonamida **19** (0,30 g, 1,16 mmol) se agrega a una solución de HNO₃ 70% (0,13 mL), y H₂SO₄ 95% (0,28 mL), a 0 °C y la reacción continúa a la misma temperatura por 1 h. Se realizan extracciones con éter etílico y H₂O. Luego la capa

orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra el agente desecante, y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (SiO_2 , CH_2Cl_2 :MeOH (99:1)). Sólido amarillo. R= 47 % P.F. 127.0-129.0 °C

$^1\text{H-NMR}$ (Acetona): δ =8,08-8,05 (d, 2H), 7,96-7,92 (d, 2H), 4,98-4,95 (t, 2H), 4,77-4,75 (t, 2H), 2,17 (s, 3H).

MS (EI) m/z (%): 303 ($\text{M}^{+\bullet}$, 1), 257 (1), 227 (2), 198 (100), 150 (8), 134 (44).

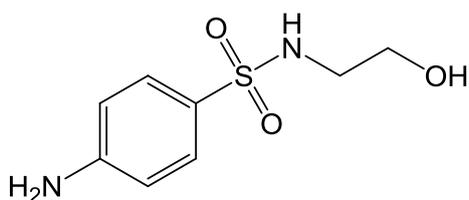


4-acetamido-*N*-(3-nitrooxipropil)bencensulfonamida (21b). Método A. A una suspensión de 4-acetamidobencensulfonamida **23** (0,40 g, 1,87 mmol) y K_2CO_3 (0,33 g, 2,14 mmol) en dimetilformamida (5,0 mL) se agrega 3-Bromo-1-nitrooxipropano (0,34 g, 1,87 mmol) y se agita a temperatura ambiente por 2 h. Se realizan extracciones con acetato de etilo. La capa orgánica se lava con solución de HCl 1 M, luego con solución saturada de NaCl. Se seca con Na_2SO_4 , se filtra el agente desecante, y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (SiO_2 , AE:EP (8:2)). Aceite amarillo. R= 51 %

Método B. Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[74] Se mezclan cloruro de 4-acetamidobencensulfonilo **19** (0,79 g, 3,71 mmol) y carbonato de potasio (0,75 g, 5,38 mmol) en acetona (4,6 mL) con agitación vigorosa. Se agrega 3-Bromo-1-nitrooxipropano **24** (1,19 g, 10,76 mmol) a temperatura ambiente. Luego de 1 h se agrega yoduro de tetrabutilamonio (2,33 mg) y la mezcla resultante se agita a 47 °C por 48 h. Se adiciona agua y se extrae con diclorometano. Luego la capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra el agente desecante, y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (SiO_2 , AE:EP (8:2)). Aceite amarillo. R= 18 %

Método C. Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[75] Se coloca cloruro de 4-acetamidobencensulfonilo **19** (0,40 g, 1,87 mmol) y 3-Bromo-1-nitrooxipropano **24** (0,34 g, 1,87 mmol) en etanol absoluto (37,5 mL) conteniendo NaOH (75 mg, 1,87 mmol) a reflujo por 6 h. La mezcla de reacción se concentra, se adiciona agua y se realizan extracciones con diclorometano. Luego la capa orgánica se lava con solución saturada de NaCl, se seca con Na₂SO₄, se filtra el agente desecante, y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (SiO₂, AE:EP (8:2)). Aceite amarillo. R= 7 %

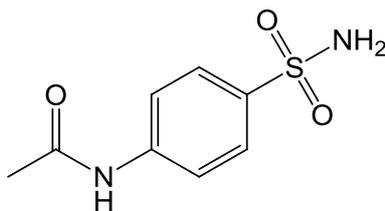
¹H-NMR (DMSO): δ 10,34 (s, 1H), 7,78-7,69 (m, 4H), 7,63-7,59 (m,1H), 4,53-4,47 (m, 2H), 2,83-2,78 (m, 2H), 2,09 (s, 3H), 1,79-1,73 (m, 2H).



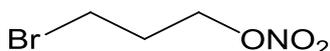
4-amino-N-(2-hidroxiethyl)bencensulfonamida (22). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[74] Una solución de 4-acetamido-N-(2-hidroxiethyl)bencensulfonamida **19** (0,10 g, 0,39 mmol) y NaOH (77 mg, 1,94 mol) en H₂O (0,31 mL) y MeOH (0,31 mL) es calentada a 100 °C por 4 h. La mezcla de reacción se deja llegar a temperatura ambiente y se extrae con acetato de etilo. La capa orgánica se lava con H₂O. Luego a se seca con Na₂SO₄, se filtra el agente desecante, y el disolvente se evapora a presión reducida. Aceite amarillo. R= 40 %

¹H-NMR (Acetona): δ=7,56-7,54 (m, 2H), 6,77-6,74 (m, 2H), 5,99 (s, 1H), 5,46 (s, 1H), 3,59-3,55 (t, 2H), 2,97-2,92 (m, 2H).

MS (EI) *m/z* (%): 216 (M⁺, 18), 199 (1), 185 (32), 171 (1), 156 (100), 108 (39), 92 (55).



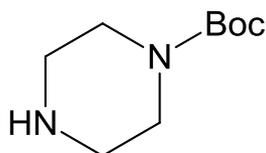
4-acetamidobencensulfonamida (23). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[70] En un balón de dos bocas se agrega acetanilida **17** (1,80g, 13,30 mmol) y ácido clorosulfónico (8,06g, 69,2 mmol) desde un ecualizador, en pequeñas porciones. Luego de finalizar el agregado, se calienta la mezcla de reacción a 100 °C por 1 h. Se deja llegar a temperatura ambiente y vuelca la mezcla oleosa en hielo picado. Se filtra y lava con agua fría. Más tarde se transfiere el producto crudo a un balón y se mezcla con una solución concentrada de hidróxido de amonio (1,55g, 44,3 mmol) en H₂O. La mezcla se calienta a 95 °C 15 minutos. Se enfría la suspensión en baño de hielo y se agrega ácido sulfúrico hasta llegar a un pH ácido. El producto se filtra y lava con agua. Sólido blanco. R= 97 % P.F. 218.0-220.0 °C [88]



3-Bromo-1-nitrooxipropano (24). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[73] 3-bromopropanol (1,40g, 10 mmol) se agrega gota a gota a una solución de HNO₃ 70 % (1,1 mL) y H₂SO₄ 95 % (2,4 mL) a 0°C y la reacción continua a la misma temperatura por 1 h. La suspensión resultante se vuelca en H₂O y se extrae con diclorometano. La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra el agente desecante y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto se obtiene como un líquido marrón transparente. R= 99 %

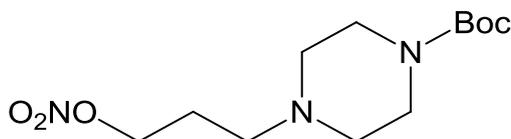
¹H-NMR (CDCl₃): δ=4,65-4,62 (m, 2H), 3,52-3,48 (m, 2H), 2,33-2,26 (m, 2H).

Síntesis de los compuestos de la Serie 2



N-Boc-piperazina (29). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[76] A una solución de piperazina (3,95g, 45,82 mmol) en diclorometano (45,8 mL), se le agrega bicarbonato de di-terbutilo (1,00g, 4,58 mmol) disuelto en diclorometano (22,9 mL) durante 4 h, agitando a 0°C. Luego se agita por 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizado este tiempo la mezcla de reacción se lava con H₂O (8 x 15 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra el agente desecante y el disolvente se evapora a presión reducida. Sólido blanco R= 80 %. P.F. 43.0-47.0 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ=3,41-3,85 (t, 4H), 2,83-2,80 (t, 4H), 1,47 (s, 9H).

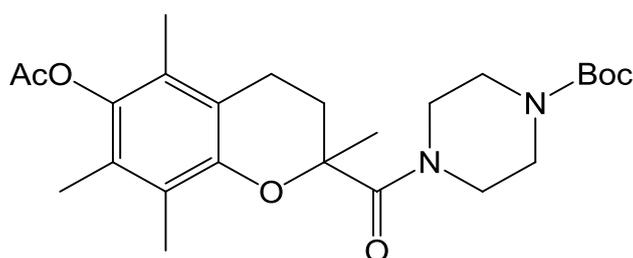


1-Boc-4-(3-Nitrooxipropil)piperazina (30). Método A. A una solución de N-Boc-piperazina **29** (0,15g, 0,81 mmol) y K₂CO₃ (0,12 g, 0,89 mmol) en acetonitrilo (2,4 mL) a 0°C, se agrega 3-Bromopropanol (0,18 g, 0,89 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente por 36 h. Se reduce el volumen del disolvente y se diluye el producto en diclorometano. Se lava con una solución saturada de bicarbonato de sodio (5 mL), H₂O (5 mL), solución saturada de cloruro de sodio (5 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra el agente desecante y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (SiO₂, EP:AE (1:1)). Sólido blanco. R= 86 %

Método B. Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[77] A una solución de N-Boc-piperazina (0,15g, 0,81 mmol) y trietilamina (0,09g, 0,89 mmol) en diclorometano (2,4 mL) a 0°C, se agrega 3-Bromopropanol (0,18g, 0,89 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura

ambiente por 48 h y diluye con diclorometano (5 mL). Se lava con una solución saturada de bicarbonato de sodio (5 mL), H₂O (5 mL), solución saturada de cloruro de sodio (5 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra el agente desecante y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (SiO₂, EP:AE (6:4)). Sólido blanco. R= 49 %

¹H-NMR (CDCl₃): δ= 4,56 (t, 2H), 3,44 (m, 4H), 2,47 (t, 2H), 2,39 (m, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,48 (s, 9H).



6-acetiloxi-2-(4-Boc-piperazincarbamoil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (31). Se ensayan condiciones descritas en la literatura con pequeñas modificaciones.[63] Cloruro de tionilo (0,11mL, 1,5 mmol) y una gota de dimetilformamida se agregan a una solución de **4** (0,29g, 1,0 mmol) en tolueno seco (2,0 mL). La mezcla de reacción se calienta a reflujo por 1 h y se enfría a temperatura ambiente. El disolvente y el exceso de cloruro de tionilo se evaporan a presión reducida. El cloruro de ácido así obtenido se disuelve en diclorometano (2,0 mL) y se adiciona gota a gota a una solución de *N*-Boc-piperazina (0,19g, 1,0 mmol) y trietilamina (0,34mL, 3,0 mmol) en diclorometano (2 mL). La mezcla de reacción se lava con solución saturada de bicarbonato de sodio (5 mL), y luego con solución saturada de cloruro de sodio (5 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra el agente desecante y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (SiO₂, EP:Et₂O (2:8)). Aceite amarillo. R=6 %

¹H-NMR (CDCl₃): δ= 3,95 (sa, 2H), 3,49 (sa, 6H), 2,79-2,72 (m, 1H), 2,60-2,51 (m, 2H), 2,35 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 1,75 (sa, 1H), 1,62 (s, 3H), 1,48 (s, 9H).

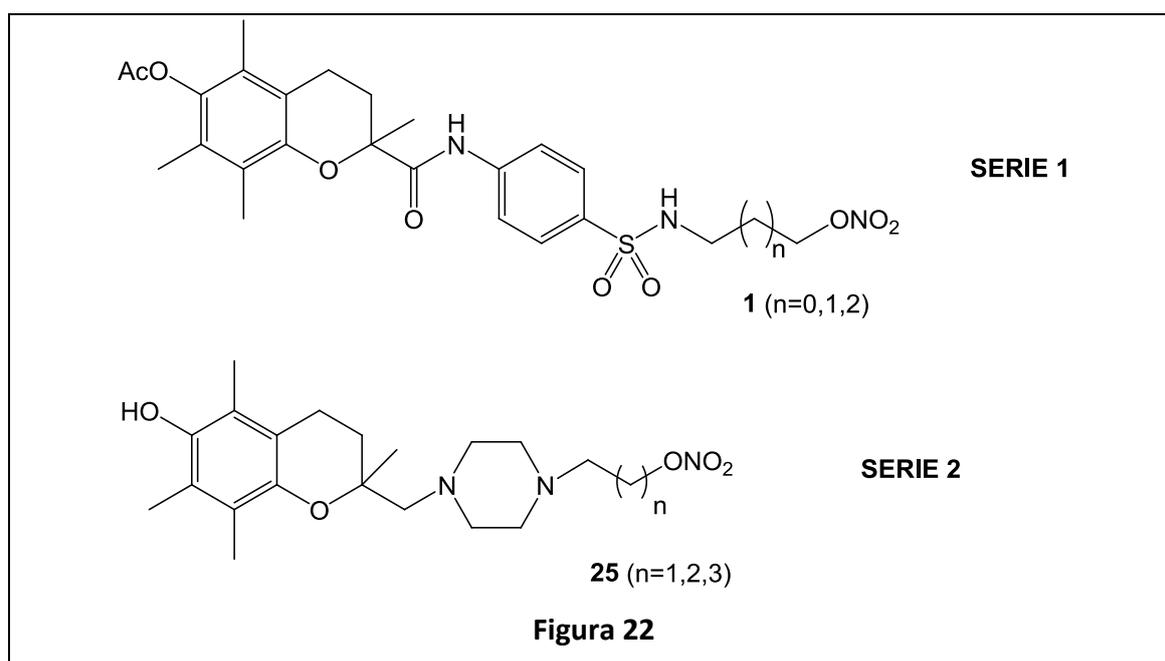
Capítulo 5

Conclusiones y perspectivas

CONCLUSIONES

En el transcurso de la presente tesina de graduación se intentó sintetizar compuestos que en su metabolismo sean factibles de ser incorporados a las lipoproteínas confiriendo liberación local y controlada de óxido nítrico en el propio seno de las partículas lipoproteicas y, por tanto, evitar o retardar la oxidación de las mismas. En este sentido, se buscó la optimización de líderes diseñados como potenciales agentes antiaterogénicos, α -tocoferol (componente natural de las lipoproteínas de baja densidad, LDLs) modificado y análogos con grupos liberadores de $\cdot\text{NO}$, como fuente continua de un antioxidante fisiológico como una estrategia terapéutica que podría prevenir las reacciones oxidativas de la LDL en la pared vascular (**Figura 22**).

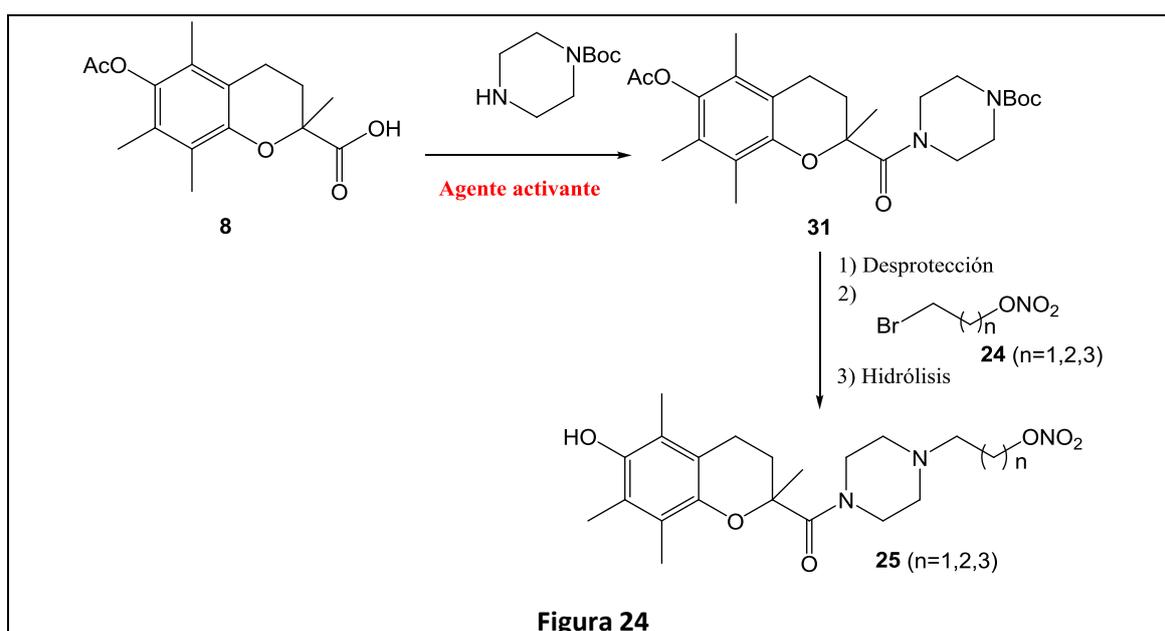
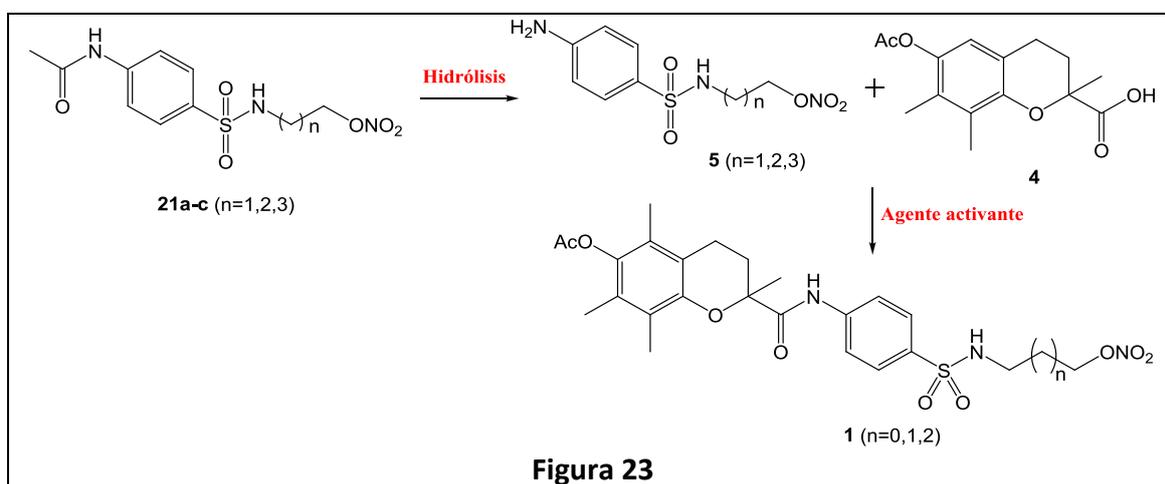
El trabajo realizado en el marco de la presente tesina de grado permitió explorar diferentes rutas sintéticas para la obtención de los productos finales de interés y la preparación de intermedios sintéticos clave como los compuestos **21a**, **21b** y **31**.



PERSPECTIVAS

Como perspectivas principales que derivan del presente trabajo de tesina se plantean los siguientes puntos:

- Respecto a la síntesis química. Para la serie 1, explorar condiciones de reacción que permitan la obtención del intermedio **5** y a partir de él ensayar reacciones para obtener el producto final **1** (**Figura 23**). Para la serie 2, explorar otros agentes activantes de ácido carboxílico para obtener mejores resultados en la preparación del intermedio amida **31** y a partir de él obtener el producto **25** (**Figura 24**).
- Una vez obtenidos los productos finales de interés, se realizará la evaluación biológica preliminar: i. Ensayos de vasorelajación *in Vitro*; ii. Capacidad antioxidante frente a la lipoperoxidación.



Capítulo 6

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. SUDEAT-SUC 1º Consenso Nacional de Aterosclerosis, in *Sociedad Uruguaya de Aterosclerosis-Sociedad Uruguaya de Cardiología*. 2004: Montevideo-Uruguay.
2. J., B., *Fisipatología*, ed. FEFMUR. 2007, Montevideo, Uruguay.
3. Ross R, G.J.I., Goldstein I.M., Snyderman R., *Atherogenesis in Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Raven Press, Ltd: New York, 1992: p. pp.1051-59
4. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
5. <http://enciclopedia.us.es/index.php/Aterosclerosis>. 1/05/2013.
6. C., R., *A Manual of Pathological Anatomy*. 1852 London:Sydenham Society.
7. M., C., *ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ATEROSCLERÓTICA CORONARIA SOMETIDOS A CIRUGÍA DE REVASCULARIZACIÓN MIOCÁRDICA.*, in *Universidad de Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía*. 2011.
8. Virchow, R., *Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries*. 1858. Nutr Rev, 1989. **47**(1): p. 23-5.
9. Ross, R. and J.A. Glomset, *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. Science, 1973. **180**(4093): p. 1332-9.
10. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
11. Nievelstein, P.F., et al., *Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(6): p. 1795-805.
12. Tamminen, M., et al., *Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(4): p. 847-53.
13. Ismail, N.A., M.Z. Alavi, and S. Moore, *Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 1994. **105**(1): p. 79-87.
14. Vijayagopal, P., et al., *Lipoprotein-proteoglycan complexes from atherosclerotic lesions promote cholesteryl ester accumulation in human monocytes/macrophages*. Arterioscler Thromb, 1992. **12**(2): p. 237-49.
15. Steinberg, D., *The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S376-81.
16. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 333-7.
17. Steinbrecher, U.P., et al., *Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation*. J Biol Chem, 1989. **264**(26): p. 15216-23.
18. Yla-Herttuala, S., et al., *Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man*. J Clin Invest, 1989. **84**(4): p. 1086-95.
19. Frostegard, J., et al., *Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells*. Atherosclerosis, 1991. **90**(2-3): p. 119-26.
20. Berliner, J.A. and J.W. Heinecke, *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(5): p. 707-27.
21. Steinberg, D., *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 20963-6.

22. Chen, K., S.R. Thomas, and J.F. Keaney, Jr., *Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(2): p. 117-32.
23. Tribble, D.L., et al., *Increased low density lipoprotein degradation in aorta of irradiated mice is inhibited by preenrichment of low density lipoprotein with alpha-tocopherol*. J Lipid Res, 2000. **41**(10): p. 1666-72.
24. De Diaz M, F.B., Vita JA, Keaney JF Jr, *Los antioxidantes y enfermedad cardíaca aterosclerótica*. N Engl J Med 1997. **337**: p. 408-416.
25. Martínez-González, J., V. Llorente-Cortés, and L. Badimon, *Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas*. Revista Española de Cardiología, 2001. **54**(2): p. 218-231.
26. Ross R, T.J., Fuster V, *Aterosclerosis y Enfermedad Arterial Coronaria*. 1997: Springer-Verlag Ibérica S.A. Barcelona.
27. Murphy, H.C., et al., *Investigation of Human Low-Density Lipoprotein by 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Mobility of Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Headgroups Characterizes the Surface Layer†*. Biochemistry, 2000. **39**(32): p. 9763-9770.
28. <http://www.colesterolldl.es/ldl/>. 1/05/2013.
29. Denicola, A., et al., *Diffusion of nitric oxide into low density lipoprotein*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 932-6.
30. <http://www.hifasdaterra.com/index.php/2010/01/16/oxidacion-y-antioxidantes/>. 1/05/2013.
31. Sies, H., *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Vol. 82. 1997: Experimental Physiology.
32. Burton, G.W. and K.U. Ingold, *Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro*. Journal of the American Chemical Society, 1981. **103**(21): p. 6472-6477.
33. Brigelius-Flohe, R. and M.G. Traber, *Vitamin E: function and metabolism*. FASEB J, 1999. **13**(10): p. 1145-55.
34. Esterbauer, H., et al., *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. Free Radic Biol Med, 1992. **13**(4): p. 341-90.
35. Traber M., S.E., Packer L., *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, ed. A. Press. 1999.
36. Brigelius-Flohe, R., et al., *The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research*. Am J Clin Nutr, 2002. **76**(4): p. 703-16.
37. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
38. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
39. Wolf, A., et al., *Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans*. J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(3): p. 479-85.
40. Cooke, J.P. and P.S. Tsao, *Is NO an endogenous antiatherogenic molecule?* Arterioscler Thromb, 1994. **14**(5): p. 653-5.
41. Jessup, W., et al., *The participation of nitric oxide in cell free- and its restriction of macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1180**(1): p. 73-82.
42. Hogg, N., et al., *Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis*. FEBS Lett, 1993. **334**(2): p. 170-4.
43. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26066-75.

44. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. Arch Biochem Biophys, 1995. **324**(1): p. 15-25.
45. Hogg, N. and B. Kalyanaraman, *Nitric oxide and lipid peroxidation*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 378-84.
46. O'Donnell, V.B., et al., *Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with alpha-tocopherol*. Biochemistry, 1997. **36**(49): p. 15216-23.
47. Gey, K.F., *Optimum plasma levels of antioxidant micronutrients. Ten years of antioxidant hypothesis on arteriosclerosis*. Bibl Nutr Dieta, 1994(51): p. 84-99.
48. Vivekananthan, D.P., et al., *Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2003. **361**(9374): p. 2017-23.
49. Bleys, J., et al., *Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(4): p. 880-7; quiz 954-5.
50. Steinberg, D. and J.L. Witztum, *Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?* Circulation, 2002. **105**(17): p. 2107-11.
51. Wang, P.G., et al., *Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications*. Chem Rev, 2002. **102**(4): p. 1091-134.
52. Ignarro, L.J. and C. Napoli, *Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2004. **6**(4): p. 281-7.
53. Lopez, G.V., et al., *Design, synthesis, and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs*. Bioorg Med Chem, 2005. **13**(20): p. 5787-96.
54. Chegaev, K., et al., *Amphiphilic NO-donor antioxidants*. ChemMedChem, 2007. **2**(2): p. 234-40.
55. Lopez, G.V., et al., *Second generation of alpha-tocopherol analogs-nitric oxide donors: Synthesis, physicochemical, and biological characterization*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(18): p. 6262-72.
56. Lopez, G.V., et al., *Interaction studies between human alpha-tocopherol transfer protein and nitric oxide donor tocopherol analogues with LDL-protective activity*. Bioorg Med Chem, 2009. **17**(24): p. 8143-8.
57. Cabrera, M., et al., *Genetic toxicology and preliminary in vivo studies of nitric oxide donor tocopherol analogs as potential new class of antiatherogenic agents*. Drug Chem Toxicol, 2011. **34**(3): p. 285-93.
58. González, M., López, G.V., Cerecetto, H., Batthyány, C., Radi, R, Rubbo, H. , *Análogos de Tocoferol Dadores de Óxido Nítrico*. 2004.UY28445
59. Gómez L., L.M., Rodríguez J.,González L., Trostchansky A., Fernández Graña G.,Crispo M.,Rubbo H., Ferreira A., López G., *Alpha-Tocopherol Analogs-Nitric Oxide Donors designed as antiatherogenic agents: in vivo studies*. VII Meeting of the SFRBM, South American Group, San Pedro-SP, Brasil, 2011
60. Hyatt, J.A., *Convenient Preparation of 2,7,8-Trimethyl-6-hydroxychroman-2-carboxylic Acid (γ -Trolox)*. Synthetic Communications, 2007. **38**(1): p. 8-14.
61. Cohen, N., et al., *Total Synthesis of All Eight Stereoisomers of α -Tocopheryl Acetate. Determination of their diastereoisomeric and enantiomeric purity by gas chromatography*. Helvetica Chimica Acta, 1981. **64**(4): p. 1158-1173.
62. Toshio Mitsubishi Gas Chemical CompanyInc HIDAKA, M.G.C.C.I.Y.K., Kazuo Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. TANAKA, *Process for producing chroman compound*. 2006, EP1710239 A1.

63. Moulin, C., et al., *Synthesis and anti-inflammatory activity of N-(aza)arylcarboxamides derived from Trolox®*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1998. **33**(4): p. 321-329.
64. Varala, R.K., Vijay; Alam, M Mujahid; Kumar, N Ramesh; Ganapaty, S; Adapa, Srinivas R, *Synthesis of mandelic acid derived phthalimides as a new class of anti-inflammatory and antimicrobial agents*. *Indian Journal of Chemistry*, 2008. **47B**: p. 1243.
65. dos Santos, J.L., et al., *Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel Hybrid Compounds To Treat Sickle Cell Disease Symptoms*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011. **54**(16): p. 5811-5819.
66. Chegaev, K., et al., *NO-Donor COX-2 Inhibitors. New Nitrooxy-Substituted 1,5-Diarylimidazoles Endowed with COX-2 Inhibitory and Vasodilator Properties*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007. **50**(7): p. 1449-1457.
67. Anderson, M.A., et al., *Hydrolysis of Phosphotriesters: Determination of Transition States in Parallel Reactions by Heavy-Atom Isotope Effects*. *Journal of the American Chemical Society*, 2001. **123**(38): p. 9246-9253.
68. López, G.V., et al., *Second generation of α -tocopherol analogs-nitric oxide donors: Synthesis, physicochemical, and biological characterization*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007. **15**(18): p. 6262-6272.
69. Yufeng S., Y.L., Yun L., *Design, synthesis and biological activity of E- β -farnesene analogues containing pyrazole-carboxamide*. *Youji Huaxue*, 2011. **31**(9): p. 1425-1432.
70. Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry*. 3^o ed. 1966, New York.
71. Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G. S. and Ángel, R.G. . , *INTRODUCTION TO ORGANIC LABORATORY TECHNIQUES. A SMALL SCALE APPROACH*. . Brooks/Cole Laboratory Series, 2005.
72. de Castro Barbosa, M.L., et al., *Synthesis and pharmacological evaluation of N-phenylacetamide sulfonamides designed as novel non-hepatotoxic analgesic candidates*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009. **44**(9): p. 3612-3620.
73. Shan, R., C. Velazquez, and E.E. Knaus, *Syntheses, Calcium Channel Agonist–Antagonist Modulation Activities, and Nitric Oxide Release Studies of Nitrooxyalkyl 1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-3-nitro-4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)pyridine-5-carboxylate Racemates, Enantiomers, and Diastereomers*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003. **47**(1): p. 254-261.
74. Wang, X.-L., K. Wan, and C.-H. Zhou, *Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010. **45**(10): p. 4631-4639.
75. Amin, K.M., et al., *Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel series of spiro [(2H,3H) quinazoline-2,1'- cyclohexan]-4(1H)- one derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010. **45**(6): p. 2117-2131.
76. Muller, D., et al., *Building Units for N-Backbone Cyclic Peptides. 3. Synthesis of Protected N α -(ω -Aminoalkyl)amino Acids and N α -(ω -Carboxyalkyl)amino Acids*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1997. **62**(2): p. 411-416.
77. Baraldi, P.G., et al., *Synthesis of Nitro Esters of Prednisolone, New Compounds Combining Pharmacological Properties of Both Glucocorticoids and Nitric Oxide*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003. **47**(3): p. 711-719.
78. Zheng, H., et al., *Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005. **13**(3): p. 773-783.
79. Andrzej B., B.J., Roe M., Handy R., Heeney C., Hudson P., Stockley L., *Vasopressin v1a antagonists*. 2006.

80. Montalbetti, C.A.G.N. and V. Falque, *Amide bond formation and peptide coupling*. Tetrahedron, 2005. **61**(46): p. 10827-10852.
81. Han, S.-Y. and Y.-A. Kim, *Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis*. Tetrahedron, 2004. **60**(11): p. 2447-2467.
82. Jacobsen, E.J., et al., *2-(Aminomethyl)chromans that inhibit iron-dependent lipid peroxidation and protect against central nervous system trauma and ischemia*. Journal of Medicinal Chemistry, 1992. **35**(23): p. 4464-4472.
83. Koufaki, M., et al., *Synthesis of chroman analogues of lipoic acid and evaluation of their activity against reperfusion arrhythmias*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004. **12**(18): p. 4835-4841.
84. Koufaki, M., et al., *Novel Potent Inhibitors of Lipid Peroxidation with Protective Effects against Reperfusion Arrhythmias*. Journal of Medicinal Chemistry, 2001. **44**(24): p. 4300-4303.
85. Perrin D.D., A.W.L.F., *Purification of Laboratory Chemicals*, ed. **Butterworth-Heinemann**. 1996, **Oxford**
86. Perry, R.H.G., D.W. Perry's, *Chemical Engineers Handbook*. 7th ed, ed. McGraw-Hill. 1997, New York, USA
87. Varala, R.V.A., M Mujahid; Kumar, N Ramesh; Ganapaty, S; Adapa, Srinivas *Synthesis of mandelic acid derived phthalimides as a new class of anti-inflammatory and antimicrobial agents*. Indian Journal of Chemistry, 2008. **47B**(Aug): p. 1243-1248.
88. Tongfu D., Z.C., Hua G., *Method for combining synthesis of p-acetaminobenzenesulfonamide with wastewater treatment*, F.Z. Shenqing, Editor. 2012: China.