

Síntesis y caracterización biológica preliminar de nitrosotio-derivados de α -tocoferol diseñados como potenciales agentes antiaterogénicos

Lorena Téliz Fernández

Tutor: Dra. Gloria V. López

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Laboratorio de Química Orgánica – Instituto de Química Biológica

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

Diciembre 2014



RESUMEN

Palabras claves: aterosclerosis, nitrosotioles, alfa-tocoferol, antioxidantes

La aterosclerosis es una enfermedad de distribución mundial, de proporciones epidémicas en las sociedades económicamente desarrolladas¹ y constituye la principal causa de muerte en Estados Unidos, Europa occidental y en Uruguay.² 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.¹ El desarrollo y progresión de una placa de ateroma es un proceso complejo, multifactorial que suele iniciarse en edades tempranas de la vida, pero que puede ser detenido o enlentecido en su progresión e incluso retroceder.² La alteración de la función normal del endotelio vascular (disfunción endotelial), así como modificaciones post-secreción de la lipoproteína de baja densidad (LDL) son dos procesos patogénicos precoces, principales y mutuamente relacionados. Las modificaciones oxidativas de la LDL por especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno constituyen un evento crítico en la patogénia de la aterosclerosis.³

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 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.⁴ 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 Graduación, se desarrolló la síntesis y caracterización biológica preliminar de agentes derivados de α -tocoferol (componente natural de la LDL) y análogos, capaces de liberar óxido nítrico en el seno de la LDL, debido a la presencia de un grupo nitrosotiol en su estructura.

¹ Schoen, F. J. (1994). Blood vessels in Pathologic basis of disease (Robbins, S. L., Ed.), pp. 467-516, Saunders Company.

² SUDEAT (1998) 2º Consenso Uruguayo sobre Dislipemias, Sociedad Uruguaya de Aterosclerosis, Montevideo-Uruguay.

³ Heinecke, J. W. (1997). *Curr Opin Lipidol* **8**, 268-74.

⁴ i) Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. (1991). *Pharmacol Rev* **43**, 109-42; ii) Nathan, C. (1992). *Faseb J* **6**, 3051-64; iii) Ignarro, L. J. (1990). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**, 535-60; viii) Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B. A. (1994). *J Biol Chem* **269**, 26066-75; ix) Rubbo, H., Parthasarathy, S., Barnes, S., Kirk, M., Kalyanaraman, B., and Freeman, B. A. (1995). *Arch Biochem Biophys* **324**, 15-25; xi) Goss, S. P., Hogg, N., and Kalyanaraman, B. (1997). *J Biol Chem* **272**, 21647-53; xii) Denicola, A., Bathyány, C., Lissi, E., Freeman, B. A., Rubbo, H., and Radi, R. (2002). *J Biol Chem*, 277(2): 932-6.

ÍNDICE

Introducción	4
1) Aterosclerosis	4
2) Síntesis de amidas	9
3) Síntesis de Nitrosotioles	19
Antecedentes	20
Objetivos	22
Resultados y Discusión	23
1) Química	23
2) Biología y Fisicoquímica	29
Materiales y Métodos	33
Conclusiones y Perspectivas	44
Bibliografía y Referencias	47

ABREVIATURAS

ABAP	2,2'-azobis(2-amidopropano)
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
BOP	hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)- <i>tris</i> -(dimetilamino)fosfonio
Bt	Benzotriazona
CC	Cromatografía en Columna
CDI	1,1-carbonildiimidazol
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
ECV	Enfermedades cardiovasculares
HBTU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HONB	<i>N</i> -hidroxi-5-norbornen- <i>endo</i> -2,3-dicarboxiimida
HOSu	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
LDL	Lipoproteína de baja densidad
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
·NO	Óxido Nítrico
PFP	Pentafluorofenol
PNP	<i>p</i> -nitrofenol
Py	Piridina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
T.A.	Temperatura ambiente
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol
<i>t</i> -BuONO	<i>tert</i> -butilnitrito
TFA	Ácido trifluoroacético
TMHQ	2,3,5-trimetilhidroquinona
TLC	Cromatografía en capa fina
TPP	Trifenilfosfina

INTRODUCCIÓN

1) Aterosclerosis

Las enfermedades crónicas son el principal problema de salud de la población uruguaya por su elevada prevalencia y el alto número de muertes. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) ocupan el primer lugar dentro de las enfermedades crónicas obteniendo el mayor número de muertes en Uruguay (28%, Figura 1), superior a la mortalidad por cáncer (23%), por enfermedades respiratorias (10%) o por accidentes (7%) (MSP 2013) (Comisión honoraria para la salud cardiovascular 2007). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido que la aterosclerosis es la enfermedad “epidémica” más preocupante del mundo occidental, ya que sus principales manifestaciones, relacionadas con la cardiopatía isquémica y con las enfermedades cerebrovasculares, tienen una altísima tasa de morbimortalidad. (Segundo Consenso Uruguayo sobre Dislipemias 2005).

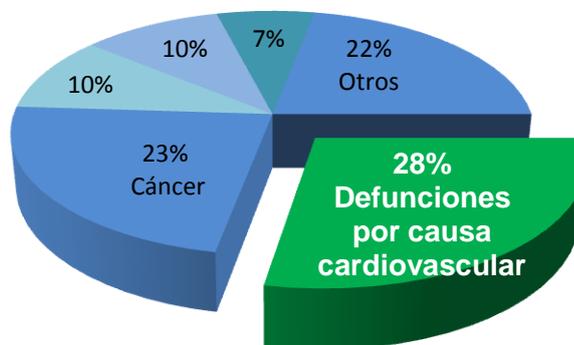


Figura 1. Incidencia de las ECV en las defunciones totales de Uruguay (MSP 2013)

La aterosclerosis es una enfermedad lenta y progresiva que puede comenzar en la primera década de la vida del ser humano (Steinberg 1989), caracterizada por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias de mediano y gran calibre, esto provoca una reacción inflamatoria, la multiplicación y migración de las células musculares lisas de la pared vascular, y en consecuencia el endurecimiento y una disminución de la luz arterial (Figura 2). Este engrosamiento se llama placa de ateroma. El endurecimiento de las arterias es un proceso que a menudo ocurre con el

envejecimiento, el acumulo de la placa de ateroma disminuye la luz arterial y eso produce rigidez arterial, ya sea por fenómenos medio ambientales o por consumo de sustancias que aumentan la oxidación del colesterol y la producción de radicales libres. Debido a la oxidación del colesterol y la consiguiente liberación de radicales, se generan transformaciones en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que transporta el colesterol, lo que facilita la formación de la placa de ateroma, siendo ésta y el envejecimiento celular, alteraciones clave asociadas a la aterogénesis. Los factores de riesgo pro-aterogénicos son: las dislipemias, hipertensión arterial, diabetes y tabaquismo, entre otros. (Segundo Consenso Uruguayo sobre Dislipemias 2005)

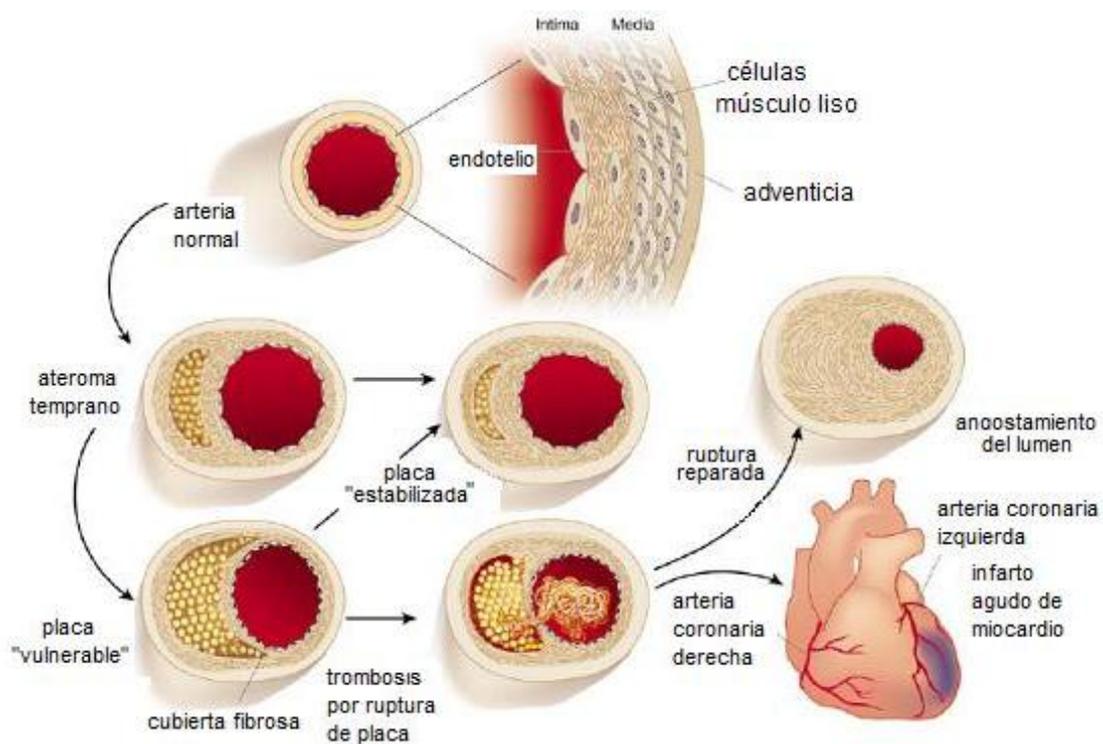


Figura 2. Proceso de la enfermedad aterosclerótica (modificado de (Libby 2002))

En la Figura 2 se puede apreciar que en principio la luz de la arteria es normal y luego ésta va disminuyendo como consecuencia de la formación de la placa de ateroma, aumentando la presión arterial. La placa puede estabilizarse o bien estar vulnerable a una ruptura, y generar así trombosis. Si la trombosis se da a nivel de la arteria coronaria se produce infarto agudo de miocardio.

Como ya mencionamos, un evento clave en la aterogénesis son las modificaciones oxidativas de la LDL dotándola de características pro-aterogénicas: Hipótesis de la

modificación oxidativa de la aterogénesis. La LDL nativa ingresa al espacio subendotelial, donde puede ser oxidada por las células residentes tales como células endoteliales, células del músculo liso y macrófagos (Figura 3). La LDL modificada promueve:

- El reclutamiento de monocitos por medio de factores quimiotácticos (ausentes en la LDL nativa)(A),
- Inhibe la movilidad de los macrófagos residentes y por tanto su habilidad de dejar la intima (B),
- Incrementa el ingreso de la LDL oxidada en los macrófagos residentes llevando a la formación de las células espumosas (C),
- La citotoxicidad de la LDL modificada lleva a la pérdida de la integridad endotelial (D),
- La disfunción endotelial precede y promueve la aterogénesis , implica un desbalance entre los factores relajantes derivados del endotelio del cual el NO forma parte y los factores de contracción,
- La LDL oxidada promueve la necrosis de las células espumosas (E).

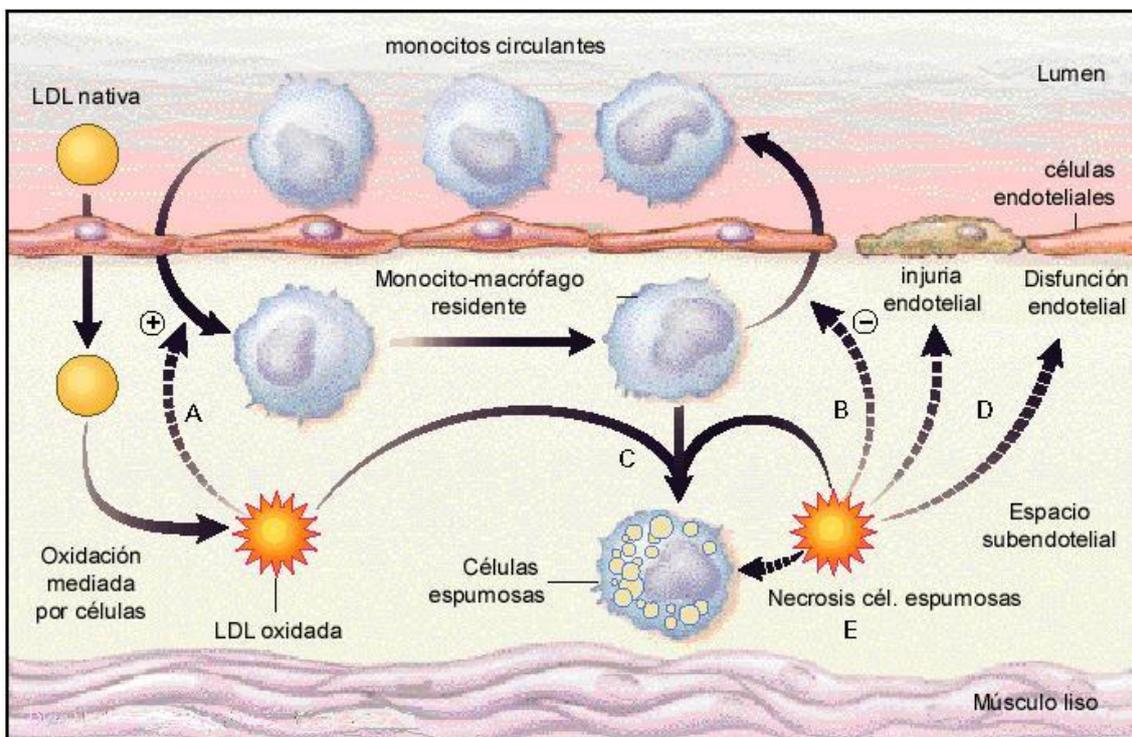


Figura 3. Primeros eventos en la aterogénesis (Modificado de (Diaz, y otros 1997))

Esta hipótesis de la modificación oxidativa 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.

La LDL consta de componentes con capacidad antioxidante en su estructura, siendo su principal componente de estas características el α -tocoferol. Esto ha llevado a la realización de estudios de suplementación con vitamina E como forma de prevenir/retardar el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. Sin embargo, a pesar de que las propiedades biológicas de la vitamina E permitirían una efectiva protección antioxidante, los resultados de diversos estudios clínicos son controversiales. Estos resultados enfatizan la importancia de desarrollar nuevos fármacos con mejorada capacidad antioxidante *in vivo* para la terapia de la aterosclerosis. (López y Rubbo 2010) Así, teniendo en cuenta que el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) difunde a través de la LDL inhibiendo más efectivamente la oxidación lipídica que sus antioxidantes naturales (α -tocoferol y ubiquinol-10) (G. V. López 2006). Un antioxidante es una molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de un sustrato oxidable, actuando como donador de electrones (agente reductor), de esta manera corta la cascada de especies reactivas del oxígeno que son nocivas para las propias células. Los seres vivos que obtienen su energía a partir del oxígeno, generan radicales libres lo cual es incompatible con la vida, por tanto tiene antioxidantes naturales para contrarrestar el efecto dañino que genera al unirse a moléculas esenciales como el material genético y proteínas.

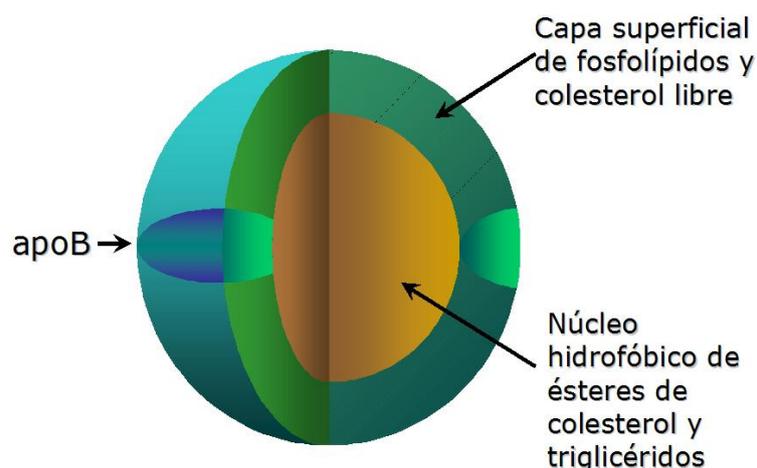


Figura 4. Estructura de la LDL (Modificado de (Murphy, y otros 2000)).

Óxido Nítrico. El óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) es un gas simple, incoloro y poco soluble en agua, que se libera por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) ampliamente distribuida en el organismo. El $\cdot\text{NO}$ es producido por una amplia variedad de tipos celulares que incluyen células epiteliales, nerviosas, endoteliales e inflamatorias.

El óxido nítrico sintetizado por las neuronas puede funcionar como neurotransmisor, atravesando fácilmente las membranas celulares por su carácter lipofílico. Cuando es producido por las células endoteliales de los vasos sanguíneos funciona como regulador parácrino, donde difunde al interior de las células musculares lisas, en el cual genera modificaciones, causando un efecto de relajación en la musculatura mediante vasodilatación y broncodilatación. Los macrófagos sintetizan $\cdot\text{NO}$ como mecanismo de defensa para destruir los microorganismos que han sido fagocitados.

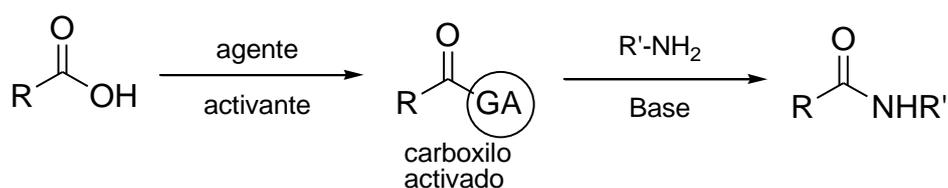
En los últimos años han incrementado considerablemente las observaciones que indican que el $\cdot\text{NO}$ disminuye la formación de lesiones ateroscleróticas, por su acción vasodilatadora y además por su rol protector de la LDL (Cooke 1994) (Hogg 1993). La oxidación de la LDL por diferentes oxidantes es inhibido por el $\cdot\text{NO}$ proveniente tanto de fuentes celulares como químicas, el cual posee propiedades fisicoquímicas que explicarían una mayor capacidad antioxidante incluso que la del α -tocoferol (Rubbo 1994) (O'Donnell 1997). 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* (Denicola 2002). El $\cdot\text{NO}$ podría ejercer sus propiedades antioxidantes incluso en el seno hidrofóbico de la LDL, donde la relación lípidos oxidables Vs antioxidantes es incluso mayor que en la superficie de la partícula donde existen otros antioxidantes.

2) Síntesis de amidas

El grupo funcional amida es común en pequeñas y complejas moléculas de origen natural y sintético, las podemos encontrar en muchísimos procesos biológicos, por ejemplo en las proteínas cumpliendo un rol crucial como: catalizadores, transporte y almacenamiento, protección inmune (anticuerpos) y como soporte mecánico (colágeno). En la química medicinal más del 25% de los fármacos tienen el grupo carboxiamida, dado que son moléculas neutras, estables y son capaces tanto de aceptar como de donar enlaces de hidrógeno.

Las amidas son derivados de ácidos carboxílicos que se forman a partir de la combinación de un ácido con amoníaco o con una amina. Las amidas son los derivados de ácidos menos reactivos, por tanto se pueden obtener a partir de los otros derivados de ácido. (Wade, 2004). En la naturaleza, por ejemplo en la síntesis de proteínas involucra reacciones de acoplamiento en la secuencia peptídica, que es la formación del enlace amida, éste es un proceso complejo, seguramente es así para realizar la secuencia precisa y definida que requiere una proteína, *in vivo* es catalizado por enzimas y asistido por miles de moléculas, dónde se da la activación selectiva del aminoácido requerido (Montalbetti, 2005).

En el laboratorio, se recurre a otros métodos para que se dé el acople (Esquema 1). Las amidas se pueden sintetizar directamente a partir de ácidos carboxílicos con una amina, la reacción inicial es la generación de una sal de amonio. El ión carboxilato es un electrófilo pobre y el ión amonio no es nucleofílico, por tanto la formación del enlace amida tiene que pelear en contra de la termodinámica ya que el equilibrio está desplazado hacia los reactivos, para que prospere la reacción se debe calentar la sal por encima de 100C°, se libera vapor de agua y se forma la amida. De ahí que se necesite una activación, y una de las maneras más clásicas de activación es la de formar como intermedio un acilo.

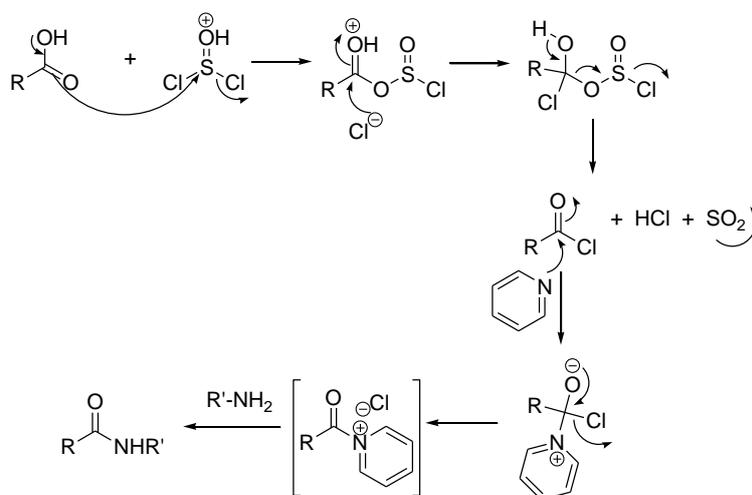


Esquema 1. Síntesis de amidas

Existen varias formas de activar el componente carboxilo de la mezcla como: haluro de ácido, azida de acilo, acilimidazol, anhídridos, ésteres, etcétera. (Montalbetti, 2005) (Valeur y Bradley 2009) (Joullie y Lassen 2010).

Cloruro de ácido: Es uno de los métodos más sencillos para activar un ácido, usualmente es un proceso de dos pasos, el primero convierte el ácido en haluro de ácido y el segundo es el acople propiamente dicho. Se dispone comercialmente de numerosos agentes para formar el cloruro de ácido a partir del ácido correspondiente, como ser: cloruro de tionilo (Esquema 2), cloruro de oxalilo, tricloruro de fósforo, pentacloruro de fósforo, entre otros. El pentacloruro de fósforo se utiliza generalmente para ácidos aromáticos que tienen como grupo sustituyente grupos electrón aceptor y que no reaccionan fácilmente con cloruro de tionilo.

Estas reacciones son catalizadas mediante el uso de una gota de dimetilformamida (DMF) o piridina (Py) (Esquema 2).

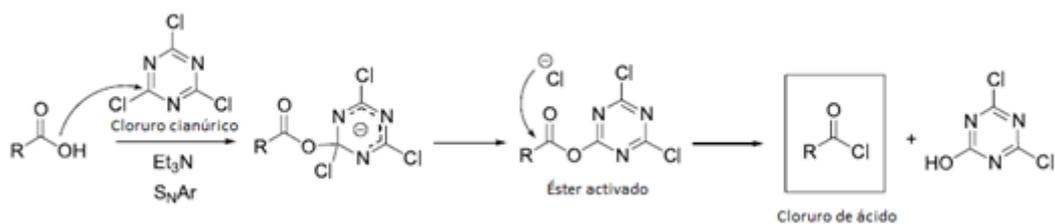


Esquema 2. Síntesis de amidas vía cloruro de ácido catalizada por Piridina.

Cabe destacar que en las reacciones con cloruro de oxalilo se produce monóxido de carbono gas, por lo cual, cuando se utiliza tiene que tenerse muy en cuenta el peligro químico que esto conlleva.

Además, los agentes químicos usados para la preparación de cloruros de ácido o acilo liberan HCl al medio de reacción, esto es una desventaja para los sustratos que son sensibles a condiciones ácidas, como lo son las aminas protegidas con *t*-

butoxicarbonilo por ejemplo. Para solucionar este problema surge como agente para formar el cloruro de ácido, el cloruro cianúrico (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina), en presencia de trietilamina. De esta manera se genera el haluro de acilo, en medio básico. La presencia de la base orgánica mantiene el pH en condiciones básicas durante el transcurso de la reacción. El mecanismo propuesto implica una sustitución nucleofílica aromática inicial, que genera el éster aromático activado y el anión cloruro. En el paso siguiente ocurre el ataque nucleofílico por el anión cloruro al éster activado, para formar el cloruro de acilo deseado (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis de cloruro de ácido usando cloruro cianúrico.

El cloruro cianúrico es recomendado para el preparado a gran escala de amidas, ya que requiere 0.33 equivalentes del promotor 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina, lo que minimiza el uso de reactivo y la formación de producto secundario. En esta reacción se puede utilizar una base orgánica como la trietilamina, bases inorgánicas y además la reacción puede ocurrir en presencia de agua o en medio acuoso. El producto secundario es ácido cianúrico que se remueve por filtración y con un lavado básico.

Alternativamente, para transformar el ácido carboxílico en el correspondiente cloruro de ácido, en medio libre de ácido, se utiliza trifenilfosfina (TPP) y una fuente de cloruro como el tetracloruro de carbono. El uso de éste último acarrea riesgo ambiental y es tóxico. En este sentido, la hexacloroacetona es un buen sustituto. Villeneuve ha demostrado que los ácidos carboxílicos pueden ser convertidos por la hexacloroacetona y la TPP a baja temperatura en el correspondiente cloruro de acilo (Villeneuve & Chan, 1997,38.). La principal desventaja de ésta técnica es la de separar el óxido de trifenilfosfina resultante de los productos. La solución a este problema, es el uso de un soporte polimérico de fosfina-tetracloruro de carbono.

Otra condición neutra fue descrita por Ghosez y colaboradores, utilizando 1-cloro-N,N,2-trimetilpropenilamina. Durante el proceso se evita la formación de haluros de

hidrógeno. Por lo tanto, éste es otro método muy útil cuando se tienen grupos lábiles en medio ácido.

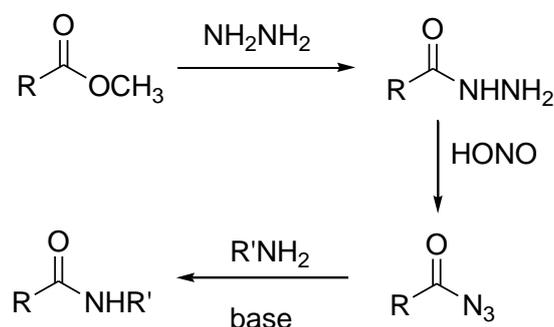
Una vez que tenemos el cloruro de ácido, para formar el enlace amida, en general se hace reaccionar el cloruro de ácido con la amina correspondiente, estos acoplamiento se llevan a cabo en disolventes secos e inertes, en presencia de una amina no nucleofílica como la trietilamina (NEt_3), capaz de captar el ácido clorhídrico del medio. Éstas reacciones también pueden ser aceleradas utilizando cantidades catalíticas de Piridina (Py) o N,N dimetilaminopiridina(DMAP) (Ragnarsson y Grehn 1998). El uso de zinc, puede acelerar la reacción de acoplamiento a temperatura ambiente, aplicable a: alquilos, arilos, heterociclos, carbohidratos y amino ácidos y lleva a altos rendimientos (Meshram, y otros 1998).

Fluoruros de acilo: Los fluoruros de acilo son menos sensibles a la humedad que los cloruros de ácido y por lo tanto son más reactivos con las aminas. Otra ventaja es que estos intermedios activos son compatibles con grupos protectores como Fmoc y Cbz, e incluso con ésteres de *t*-Butilo y otros grupos de ésteres que son lábiles en medio ácido, por lo que es muy útil en la síntesis de péptidos. La preparación de fluoruros de acilo, generalmente, se lleva a cabo usando fluoruro cianúrico en presencia de Py de manera análoga a lo descrito para el cloruro cianúrico. En lo que respecta a la preparación de amidas, los fluoruros reaccionan de la misma manera que los cloruros de ácido.

Bromuros de acilo. Los bromuros de acilo son usados en raras ocasiones para generar enlaces amida. Los bromuros de ácido son habitualmente preparados con el pentabromuro de fósforo. Otra forma de preparar un acilo *in situ*, es usando trifenilfosfina y N-bromosuccinimida (NBS) (Froeyen 1995), entre otros (Montalbetti y Falque 2005).

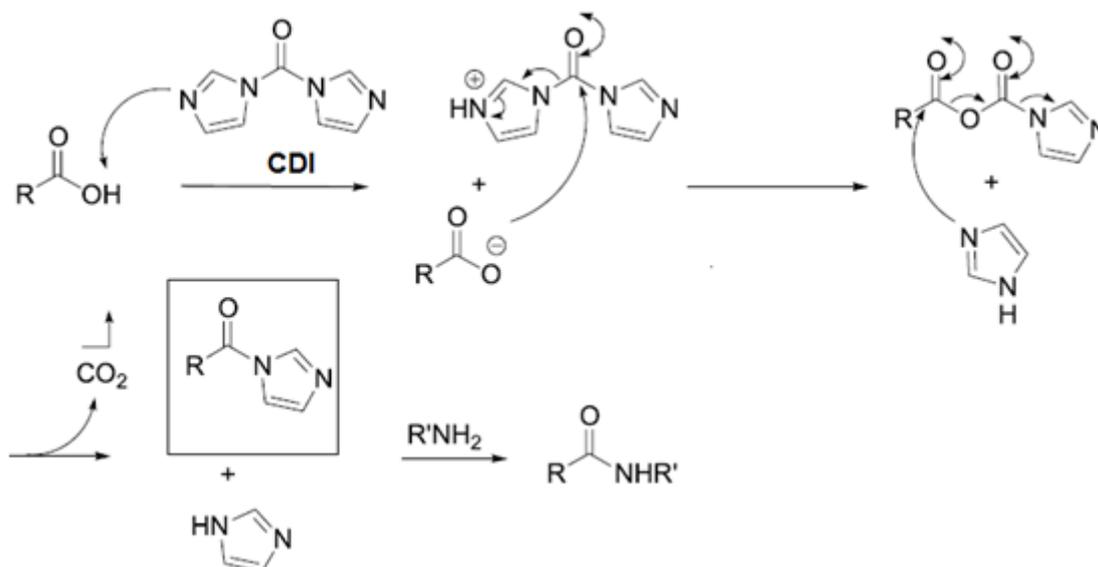
Azidas de acilo. La ruta que involucra la azida de acilo para la formación de amidas es la más antigua, fue desarrollada por Curtius a principios del siglo XX (Klausner y Bodansky 1974). Las azidas de acilo pueden ser preparadas a partir del éster metílico o etílico correspondiente en dos etapas, en la primera la hidrazina desplaza al grupo

alcoxilo, generando así la acilhidrazina y luego por nitrosación se obtiene la azida de acilo..



Esquema 4. Síntesis de amidas vía azida de acilo.

Acilimidazoles. El 1,1-carbonildiimidazol (CDI) es un agente acoplante muy útil para formar amidas en una etapa (Esquema 5). El acilcarboxiimidazol e imidazol que son inicialmente formados, rápidamente reaccionan para rendir especies activadas, como el acilimidazol. Prácticamente el acilimidazol es preformado en una hora y luego se le adiciona la amina deseada. Ésta reacción que genera imidazol *in situ*, no necesita de una base adicional y es compatible con sales de ácido clorhídrico de la amina. Este reactivo es usado a gran escala en la síntesis peptídica y puede ser extendido a la formación de ésteres y tioésteres.



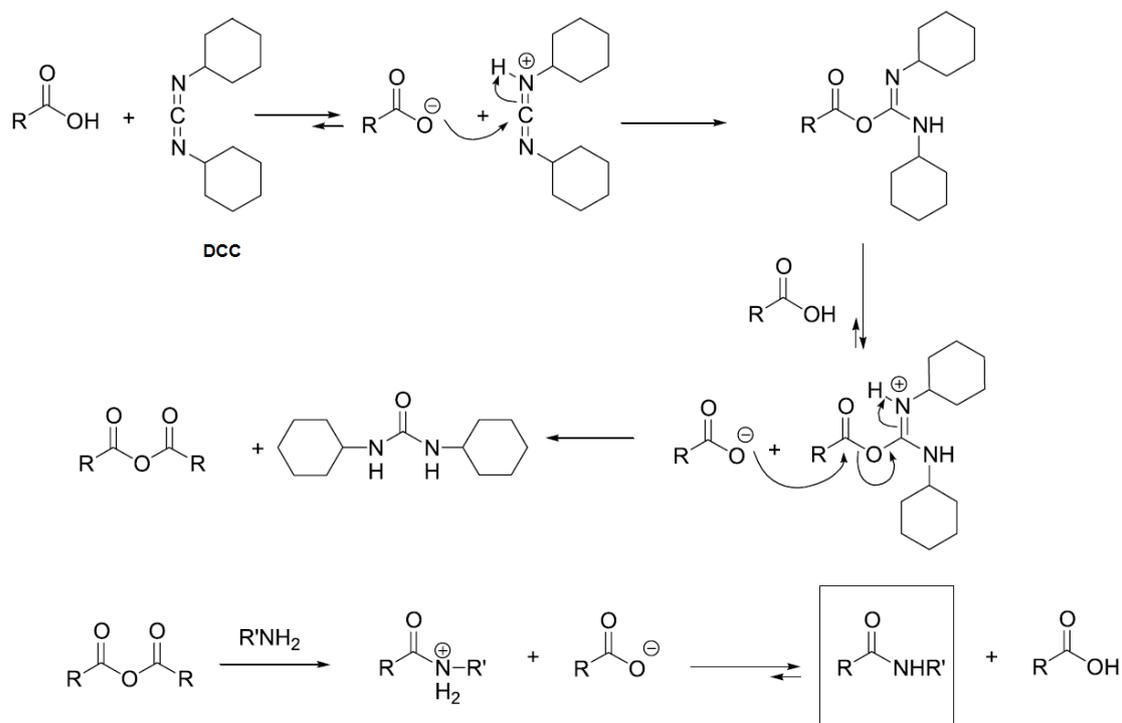
Esquema 5. Síntesis de amidas usando CDI como agente activante.

Actualmente, otros agentes acoplantes análogos al CDI han sido descritos en la literatura (Valeur y Bradley 2009).

Anhídridos. Los anhídridos son especies que también reaccionan rápidamente con una amplia gama de nucleófilos tales como: alcoholes, tioles y por supuesto aminas. Esta estrategia va desde el uso de anhídridos simples simétricos hasta anhídridos mixtos que involucra, por ejemplo, isoureas o especies derivadas del ácido fosfórico.

Anhídridos simétricos. La diversidad de compuestos comercialmente disponibles es limitada y por lo general se procede a preparar el anhídrido deseado. Los anhídridos sintéticos se forman ya sea por calentamiento a partir del correspondiente ácido o en condiciones suaves por reacción de dos moléculas de ácido en presencia de un equivalente de dicitlohexilcarbodiimida (DCC), la fuerza impulsora de esta reacción es la formación de urea como producto secundario. El anhídrido se hace reaccionar a continuación, en un segundo paso con la amina deseada. En teoría no es necesario adicionar base ya que se genera el carboxilato *in situ* que va a actuar como anión (Esquema 6).

La mayor limitación es el rendimiento efectivo, dado que solo la mitad del ácido es efectivamente acoplado, la otra parte se pierde. Esto representa un problema cuando el ácido carboxílico a utilizar es costoso.



Esquema 6. Síntesis de amidas vía anhídrido de ácido.

Anhídridos mixtos. Los anhídridos carboxílicos mixtos, surgen como forma de superar el problema de desecho. El método del anhídrido mixto puede ser desarrollado cuando la segunda molécula de ácido carboxílico es más barata y fácil de acoplar. La dificultad es para alcanzar la regioselectividad en la adición del nucleófilo.

O-acilisoureas. La DCC, la diisopropilcarbodiimida(DIC) y el clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilamino)carbodiimida, son frecuentemente utilizadas como agentes activantes de ácidos carboxílicos para la formación del enlace amida (Figura 5). También puede ser utilizado para sintetizar tanto ésteres como anhídridos. La carbodiimida reacciona con el ácido carboxílico para dar un anhídrido mixto O-acilisourea. Este intermedio puede reaccionar directamente con la amina para rendir la amida deseada y urea como producto secundario, que resulta ser la fuerza impulsora de esta reacción.

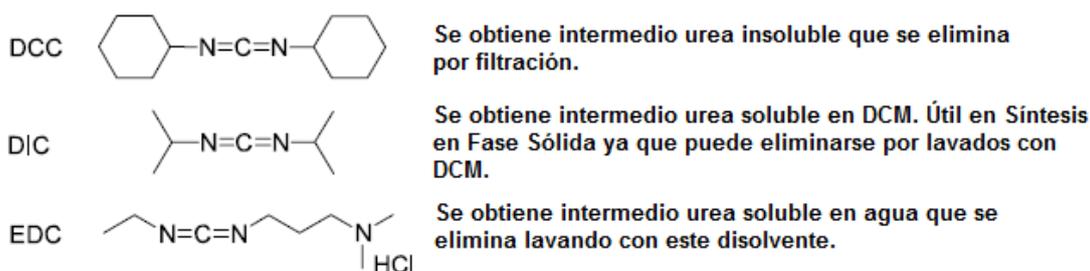


Figura 5. Agentes activantes de ácidos carboxílicos DCC, DIC y el clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilamino)carbodiimida.

Diferentes carbodiimidias están disponibles comercialmente (Figura 5). La diferencia de solubilidad de la urea y sus subproductos da ventaja en la purificación. Por ejemplo, dicitohexilurea (DHU) es bastante más insoluble, puede ser removida por filtración. Por el contrario la dimetilaminopropil-3-etilurea es extremadamente soluble en agua y puede ser eliminada con la capa acuosa.

Ésteres activados. Los ésteres activados tales como ésteres aromáticos son usualmente más fáciles de hidrolizar que los ésteres de alquilo y reaccionan con una amplia gama de nucleófilos. En la Figura 6 se ven los alcoholes utilizados comúnmente. El aumento de la electrofilia del centro carbonílico, comparado con los ésteres alquílicos, resulta del carácter electrón-atrayente de los alcoholes descritos (Figura 6).

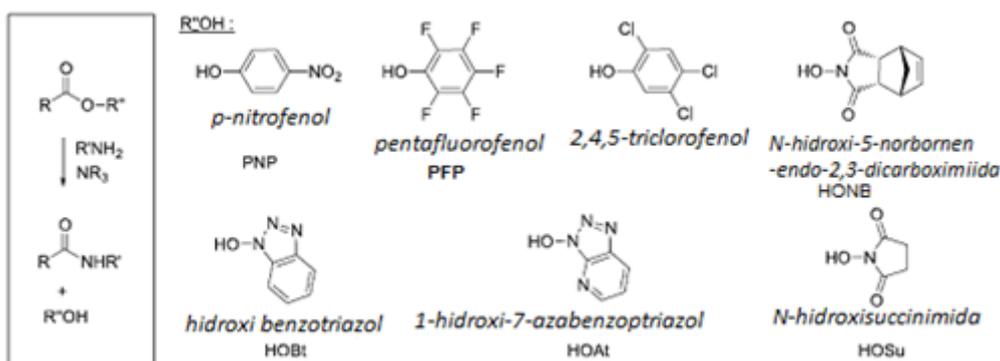


Figura 6. Alcoholes comúnmente usados como agentes activantes en la síntesis de amidas.

La elección del alcohol depende del tipo de aplicación. En la síntesis de péptidos, son comúnmente utilizados HOBt, PNP y PFP (Figura 6). Los ésteres derivados del 2,4,5-triclorofenol (Figura 6) son más reactivos que los ésteres derivados de PNP y los ésteres derivados de HONB (Fujino, y otros, 1974) (Kitada, y otros, 1978). Los ésteres de 2,4,5-triclorofenilo también son superiores a los de *N*-hidroxisuccinimida (HOSu). Los ésteres de HOSu, sin embargo, todavía se utilizan como una alternativa ya que ellos son solubles en agua y por tanto es fácil de eliminar en las etapas de purificación.

El HOAt ha sido reportado como más eficiente que el HOBt. El incremento en la eficiencia puede ser explicada por la formación de un enlace de hidrógeno entre el nitrógeno de la piridina vecina y los protones del grupo amina en la etapa de aminólisis (Figura 7).

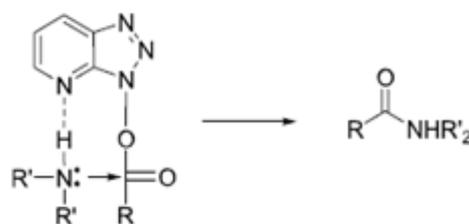


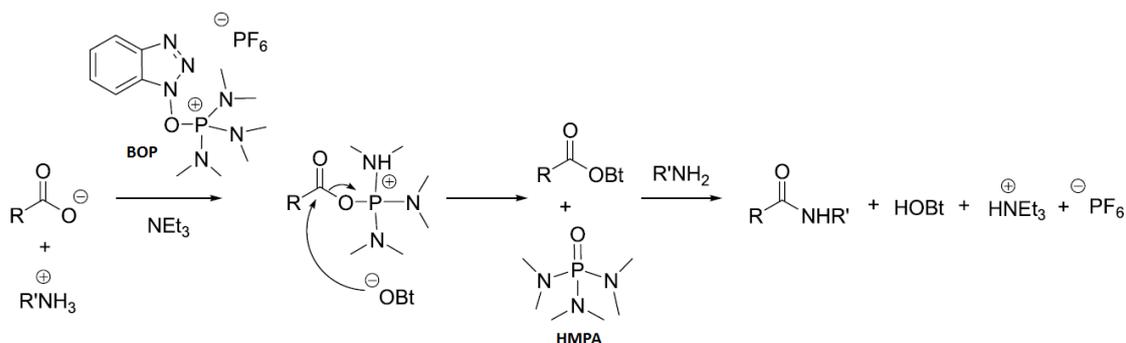
Figura 7

Los ésteres activados pueden ser preparados previo a su uso, purificado y almacenado por cierto tiempo. El éster activado es usualmente sintetizado en un procedimiento estándar de formación de ésteres con DCC (Esquema 6) y luego utilizado para su acople con la amina adecuada.

Alternativamente, el éster activado puede ser preparado *in situ* como intermedio y subsiguientemente reacciona con la amina deseada. Esto puede ser llevado a cabo por adición catalítica o en cantidades estequiométricas de HOBt a condiciones estándar de acoplamiento con DCC.

Más recientemente catalizadores eficientes, que ya incorporan el fenol, se encuentran disponibles comercialmente. Éstos se pueden clasificar de acuerdo a su naturaleza, esto es, sales de fosfonio, sales de uronio y sales de amonio.

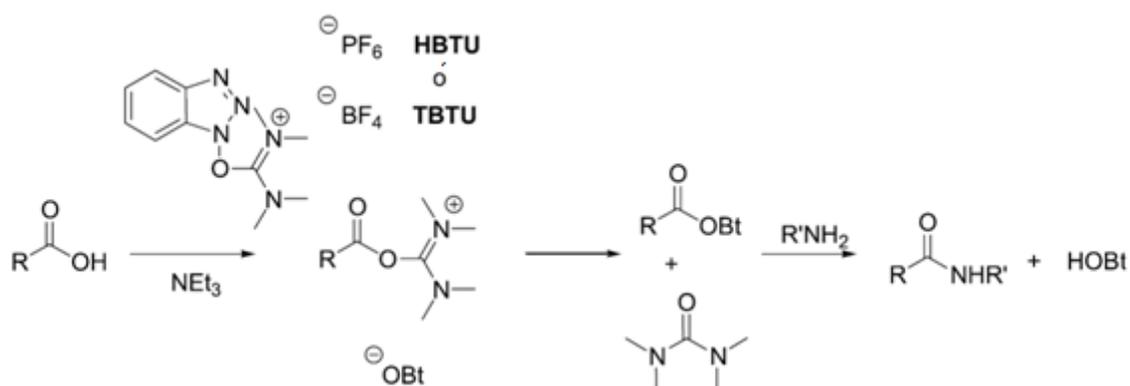
Sales de fosfonio. El primer ejemplo descrito de sales derivadas de HOBT es el hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris-(dimetilamino)fosfonio (BOP), también llamada reactivo de castro (Castro, y otros 1975). El acoplamiento en un solo paso, se lleva a cabo mezclando el ácido y la amina deseado, en presencia de BOP y trietilamina, o la base de Hünig. El ácido desprotonado, primero reacciona con BOP para generar una especie acil-fosfonio activada y HOBT. EL HOBT reacciona rápidamente con el ácido activado para producir el éster activado de benzotriazol, el cual por aminólisis rinde la amida deseada (Esquema 7).



Esquema 7. Síntesis de amidas usando BOP como agente acoplante.

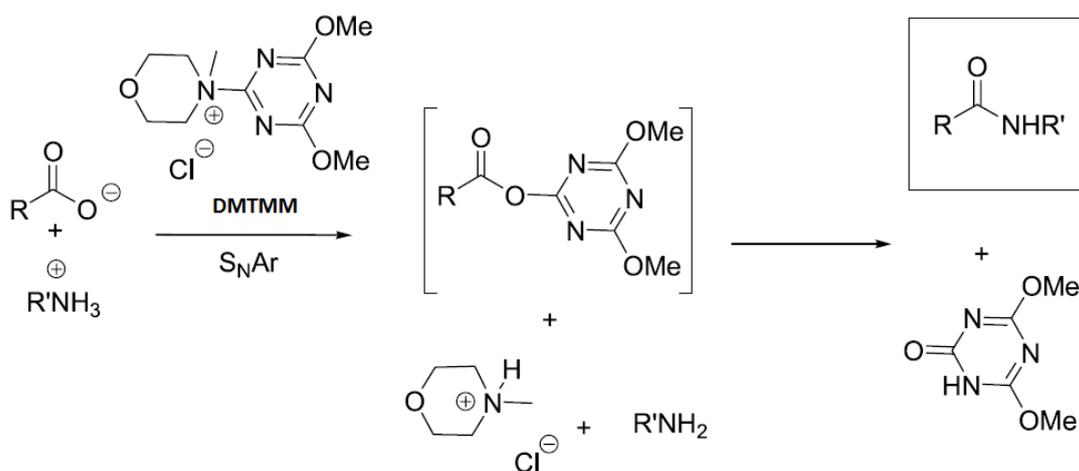
Si bien el reactivo de Castro es muy eficiente, genera Hexametilfosforamida (HMPA) que es extremadamente tóxica. Por tanto se han desarrollado otras sales de fosfonio que son igualmente eficientes, pero que generan productos secundarios menos tóxicos, por ejemplo hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino fosfonio (PyBop).

Sales de uronio. Una familia de reactivos que ha sido desarrollada, son las sales de uronio, siendo las más usadas hexafluorofosfato de *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU) o su equivalente tetrafluoroborato (TBTU) (Knorr, y otros 1989) (Pettit y Taylor 1996) (Esquema 8).



Esquema 8. Síntesis de amidas usando HBTU o TBTU como agentes acoplantes.

Ésteres triazínicos. Kunishima y colaboradores (Kunishima, y otros 1999) describen el uso de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-(1,3,5)triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM), como un efectivo agente activante, para la síntesis de ésteres y amidas. Este reactivo, inicialmente participa de una sustitución electrofílica aromática, similar al caso del cloruro cianúrico (ver página 12). Luego el intermedio éster activado es desplazado por la amina. La principal ventaja del uso de esta sal de amonio, es que no se necesita agregar una base, ya que se libera en el primer paso *N*-metilmorfolina. Los productos secundarios se pueden eliminar fácilmente por lavados con agua (Esquema 9).



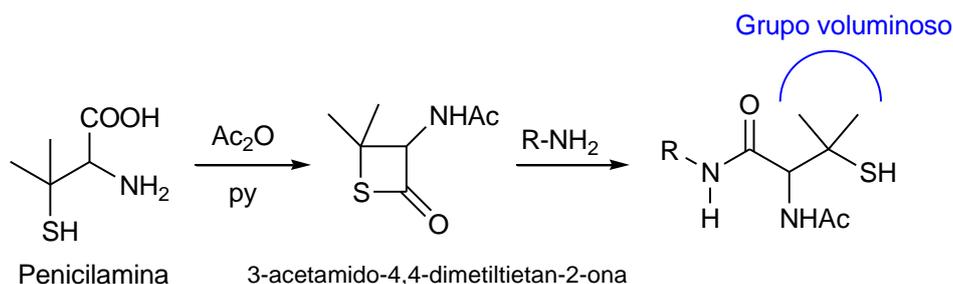
Esquema 9. Síntesis de amidas usando DMTMM como agente acoplante.

Considerando que la síntesis de péptidos es de gran interés en el desarrollo de fármacos, día a día se siguen desarrollando nuevos catalizadores como se describe en la revisión de (Al-Warhi, Al-Hazimi y El-Faham 2012).

3) Síntesis de nitrosotioles

Los nitrosotioles fueron descritos *in vivo*, por primera vez en la década de los 80, juegan un rol principal en el almacenamiento, transporte y liberación de óxido nítrico (NO) en el organismo (Williams 1985). Continuamente se describen nuevas funciones para los nitrosotioles. Por ejemplo, algunos autores indican que el flujo sanguíneo es regulado por S-nitrosohemoglobina, vía liberación de NO (Stamler, y otros 1997). Por otra parte también pueden servir como fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades tales como, hipertensión y aterosclerosis (Luscher, Raji y Vanhoutte s.f.) (Lefar y Sedar 1991).

Los nitrosotioles se degradan por calor, luz ultra violeta o trazas de metales, para dar óxido nítrico y el correspondiente disulfuro. La descomposición también se puede dar por acción enzimática, además los S-nitrosotioles pueden participar en reacciones de transnitrosación donde el grupo NO es transferido a otro tiol. Esto puede resultar en la liberación de NO si el compuesto resultante es más susceptible de descomponerse que el nitrosotiol de partida (Al-Sa`doni y Ferro 2000). Los nitrosotioles más estables son aquellos que contienen en el carbono adyacente al grupo nitrosotiol sustituyentes voluminosos. Por ello para incorporar el grupo tiol utilizamos la 3-acetamido-4,4-dimetiltietan-2-ona, preparada a partir de penicilamina (Esquema 10)(Monihan y Roberts 1994)



Esquema 10

Diversos métodos están disponibles para transformar un tiol en un S-nitrosotiol (Williams 1985). En el presente trabajo de tesis para realizar esta transformación se utilizó *t*-BuONO en DCM a temperatura ambiente. Alternativamente, se podría utilizar nitrito de sodio en condiciones ácidas (Roy, Du Moulinet d`Hardemare y Fontecave 1994).

ANTECEDENTES

El grupo en el cual se desarrollo la presente tesis viene trabajando en la síntesis de análogos de α -tocoferol conteniendo el grupo nitrosotiol como farmacóforo liberador de óxido nítrico.

Los compuestos sintetizados previamente como **SNO1**, **SNO2** y **SNO3** (Figura 8) demostraron tener capacidad de liberar espontáneamente $\cdot\text{NO}$ y capacidad vasoactiva dependiente de $\cdot\text{NO}$ (Figura 9, A y B). También protegieron de la oxidación mediada por 2,2'-azobis(2-amidopropano) (ABAP) del ácido linoleico, que es uno de los principales componentes del núcleo de la LDL (Figura 9C). Sin embargo, estudios experimentales y teóricos de lipofilia relativa muestran que estos compuestos son menos lipofílicos que el α -tocoferol (Figura 9D) (G. V. López 2006).

Así, en base a estos resultados, se plantea el diseño y síntesis de nuevos derivados que contengan fragmentos variables (F.V) con mayor carácter hidrofóbico.

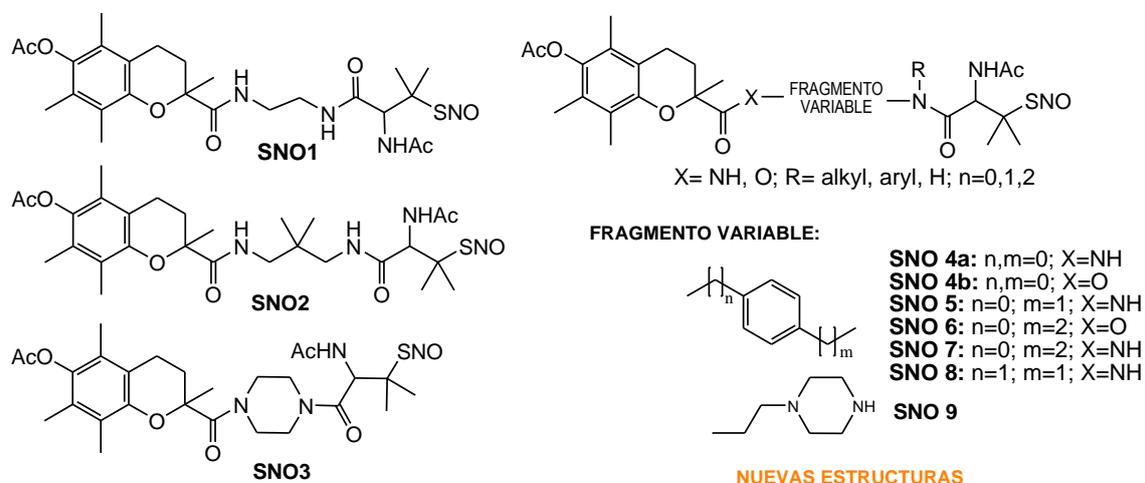


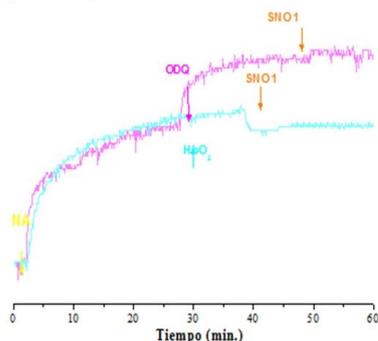
Figura 8. Estructura de los nitrosotioles ya estudiados **SNO1**, **SNO2**, **SNO3**, **SNO4a**, **SNO4b** (G. V. López 2006) (Silveira 2009) y las nuevas estructuras desarrolladas en el presente trabajo **SNO5-SNO9**.

A) Liberación de ·NO *in vitro*

Compuesto	[NO] liberado (μM)
SNO1	0.86 ± 0.04
SNO2	2.2 ± 0.2
SNO3	1.7 ± 0.1

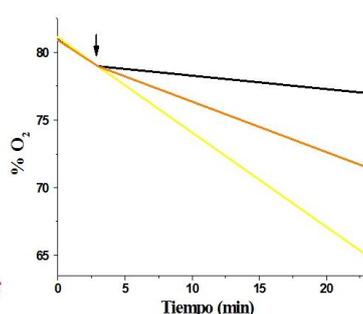
La liberación de ·NO se mide para una concentración 100 μM de compuesto, por oxidación de HbO₂ a MetHb, a λ=401nm, a 37°C, por método espectrofotométrico.

B) Propiedades vasoactivas



Los compuestos (30μM) son ensayados sobre anillos de aorta aislados de rata Wistar, en buffer Krebs-Henseleit, previamente contraídos con noradrenalina NA. Se adquieren los registros de tensión en función del tiempo, en presencia y ausencia de ODQ o HbO₂.

C) Capacidad antioxidante



La incubación de LH con SNO3 inhibe el consumo de oxígeno durante la oxidación mediada por ABAP. **a**, La oxidación de LH (3.3mM) en buffer fosfato 50 mM por ABAP 5mM fue evaluada usando un electrodo de oxígeno tipo Clark a 37°C. **b**, curva control, en ausencia de LH y SNO3. **c**, oxidación de LH previamente incubada con SNO3 en buffer fosfato 50 mM.

D) Estudio de lipofilia relativa

Compuesto	R _M	clogP	TPSA(Å ²)
α-Tocoferol	1.7	8.1	29.46
SNO1	0.1	1.1	152.26
SNO2	0.4	3.3	152.26
SNO3	0.3	2.3	134.68

R_M se define como $\log[(1/R_f) - 1]$ y permitiendo determinar la lipofilia relativa de los compuestos. R_f es la relación de frente de los compuestos ensayados por RP-TLC utilizando como fase móvil agua-acetona (50:50) y como fase estacionaria SIL RP-18 W/UV254nm. clogP es el coeficiente de partición octanol:agua determinado teóricamente utilizando el método Villar del paquete SPARTAN 04. TPSA es el índice de polaridad molecular determinado teóricamente

Figura 9. Caracterización biológica de los nitrosioles ya estudiados SNO1, SNO2, SNO3: A) Liberación de ·NO *in vitro*; B) Propiedades vasoactivas; C) Capacidad antioxidante; D) Estudio de lipofilia relativa.

OBJETIVOS

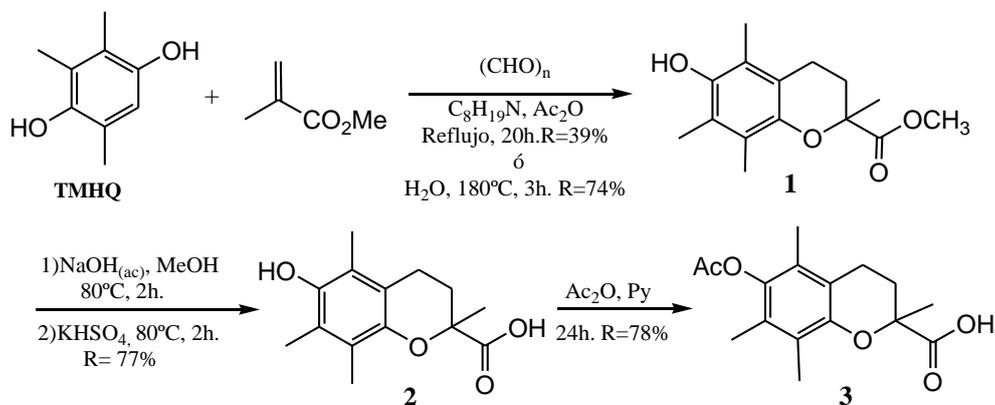
Objetivo general:

Optimización de lípidos 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 nitrosotiol, reconocido farmacóforo liberador de $\cdot\text{NO}$.
2. Elucidación estructural y caracterización espectroscópica de los productos de síntesis.
3. Caracterización fisicoquímica preliminar. Estudio de lipofilia relativa.
4. Caracterización biológica preliminar. Estudio de liberación de óxido nítrico.

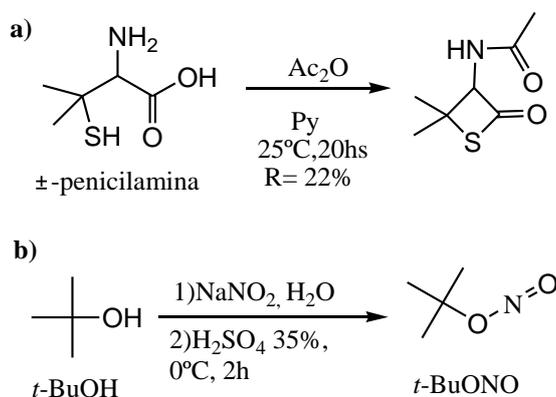
Así, inicialmente se preparan los reactivos necesarios, esto es el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxílico (Trolox®) y sus derivados (Esquema 12), 3-acetamido-4,4-dimetiltietan-2-ona y *t*-BuONO (Esquema 13).



Esquema 12. Síntesis de Trolox y sus derivados.

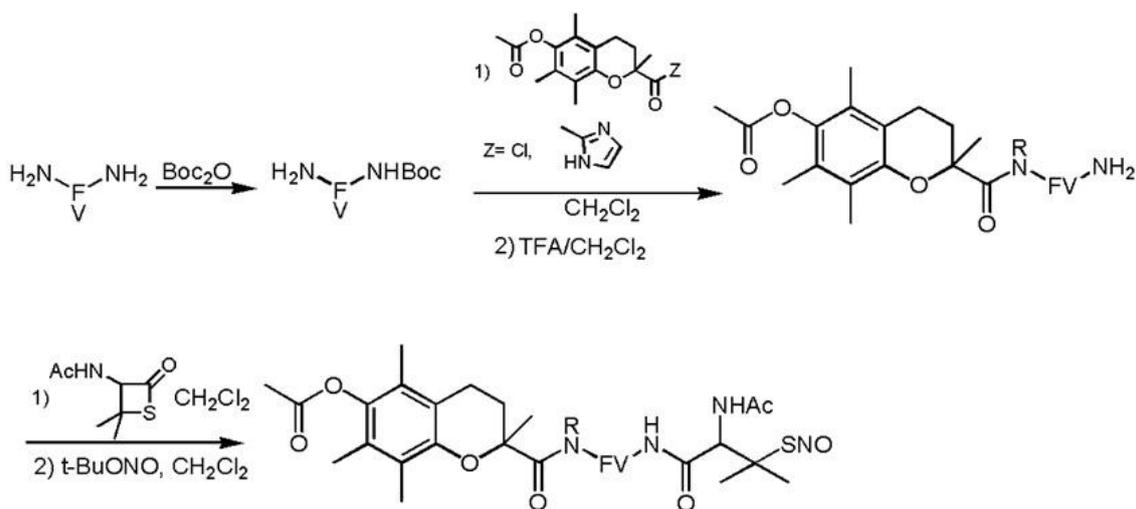
La síntesis utilizada para la preparación de Trolox (**2**, Esquema 12) involucra una ruta sintética de dos pasos. En primer lugar se obtiene el éster metílico de Trolox (Hidaka 2006) (Hyatt 2007), y luego en un segundo paso de hidrólisis se obtiene el ácido carboxílico. En un paso siguiente se protege el grupo fenólico como éster por tratamiento con anhídrido acético en presencia de piridina.

La 3-acetamido-4,4-dimetiltietan-2-ona fue preparada a partir de \pm -penicilamina (Soulère L. 2001) y paralelamente, el *t*-BuONO fue preparado a partir de *t*-BuOH (Coe y Doumani 1948) como se muestra en el esquema 13.



Esquema 13. a) Síntesis de 3-acetamido-4,4-dimetiltietan-2-ona; b) Síntesis de *tert*-butilnitrito.

Entonces, para la preparación de los nuevos derivados nos planteamos seguir una secuencia sintética análoga a la ensayada para los primeros derivados preparados (G. V. López 2006) (G. V. López 2006), como se muestra a continuación (Esquema 14). Esto es, partiendo de un derivado acetilado de Trolox[®] (6-acetoxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, **3**), y el compuesto conteniendo el fragmento variable con *N*-terminal protegido con Boc.



Esquema 14. Síntesis propuesta para los nitrosotioles derivados de análogos de alfa-tocoferol.

Sin embargo, en la etapa de acople, se observa no solo la formación del compuesto de interés sino también el producto de aminólisis a nivel del acetilo del anillo cromano. Entonces, se decide utilizar en esta etapa el ácido con el fenol libre e inmediatamente realizar la acetilación. Así, con objeto de obtener los productos finales **SNO5**, **SNO6** y **SNO7**, el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxílico es activado con CDI y acoplado con aminas monoprotectidas (Silveira 2009) 4-(*N*-tert-butoxicarbonilaminometil)anilina **4a**, 4-(*N*-tert-butoxicarbonilaminoetil)fenol **4b** ó 4-(*N*-tert-butoxicarbonilaminoetil)anilina **4c**, para dar los derivados de ácido correspondiente, los cuales fueron inmediatamente tratados con anhídrido acético en presencia de piridina, rindiendo **5a-c**. Estos últimos se hicieron reaccionar con TFA en DCM a temperatura ambiente para dar **6a-c**.

La caracterización estructural de los compuestos finales e intermedios se realizó mediante experimentos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, experimentos bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC) y espectrometría de masas.

Por ejemplo para el intermedio **6a** en la Figura 11 se muestran A) ^1H -RMN, B) ^{13}C -RMN y C) Espectrometría de masas. En el ^1H -RMN se observan las señales características del compuesto: en 8.34 ppm (**h**) se observa una señal ancha correspondiente al H amídico, en la región de 7.5-7.0 ppm (**i,j**) se observan las señales de los H aromáticos, en 3.89 ppm (**k**) una señal ancha correspondiente a los protones metilénicos vecinos al grupo amino y en la región de 2.5-1.6 ppm (**a,b,d,e,f,g**) se observan las señales correspondientes al anillo cromano sustituido. En el espectro de ^{13}C -RMN se ven las señales esperadas correspondientes al producto **6a**. En el espectro MS se destaca el ión molecular (396) que nos confirma la obtención del producto deseado.

Finalmente, los compuestos **6a-c** fueron tratados con la 3-acetamido-4,4-

dimetiltietan-2-ona y enseguida con *t*-BuONO con objeto de obtener los nitrosotioles correspondientes.

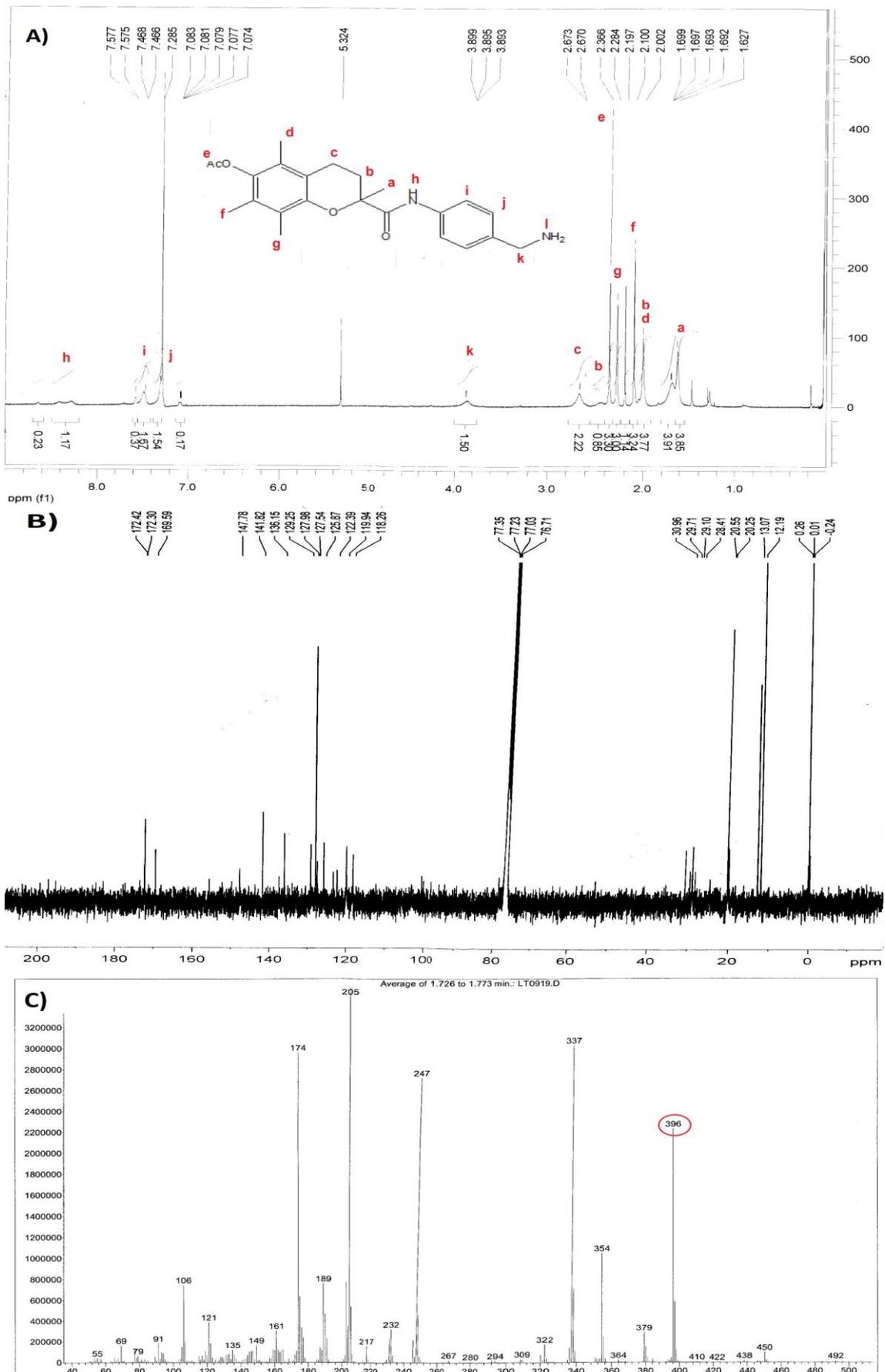
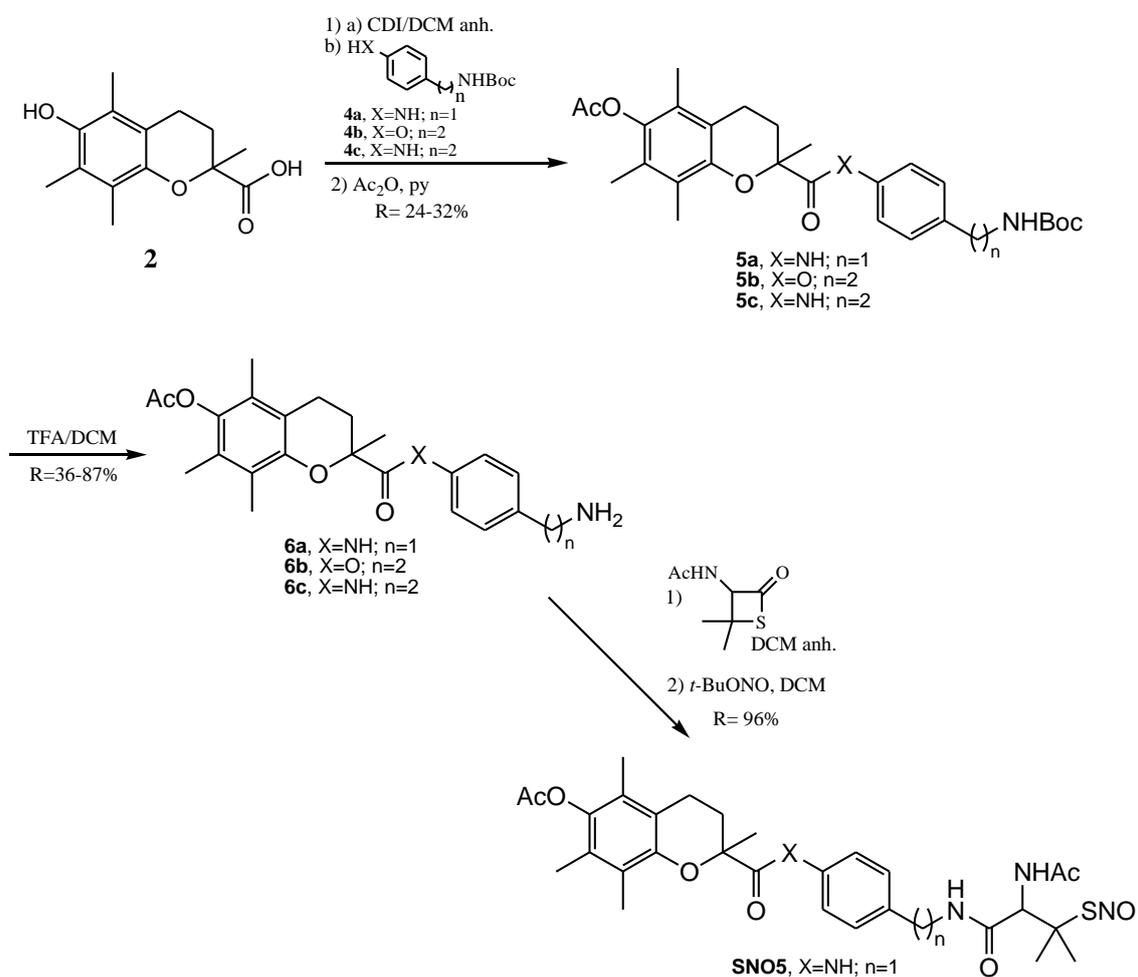


Figura 11. Caracterización espectroscópica de **6a**: A) ^1H -RMN, B) ^{13}C -RMN, C) MS

El nitrosotiol **SNO5** se obtiene con excelente rendimiento (R= 96%), sin embargo, la baja estabilidad de los nitrosotioles dificulta la caracterización completa del producto.

Para el éster **6b** se observa por $^1\text{H-RMN}$ la formación del producto deseado **SNO6** con muy bajo rendimiento, lo que no permite una caracterización adecuada. Se ensaya la reacción varias veces con idéntico resultado.

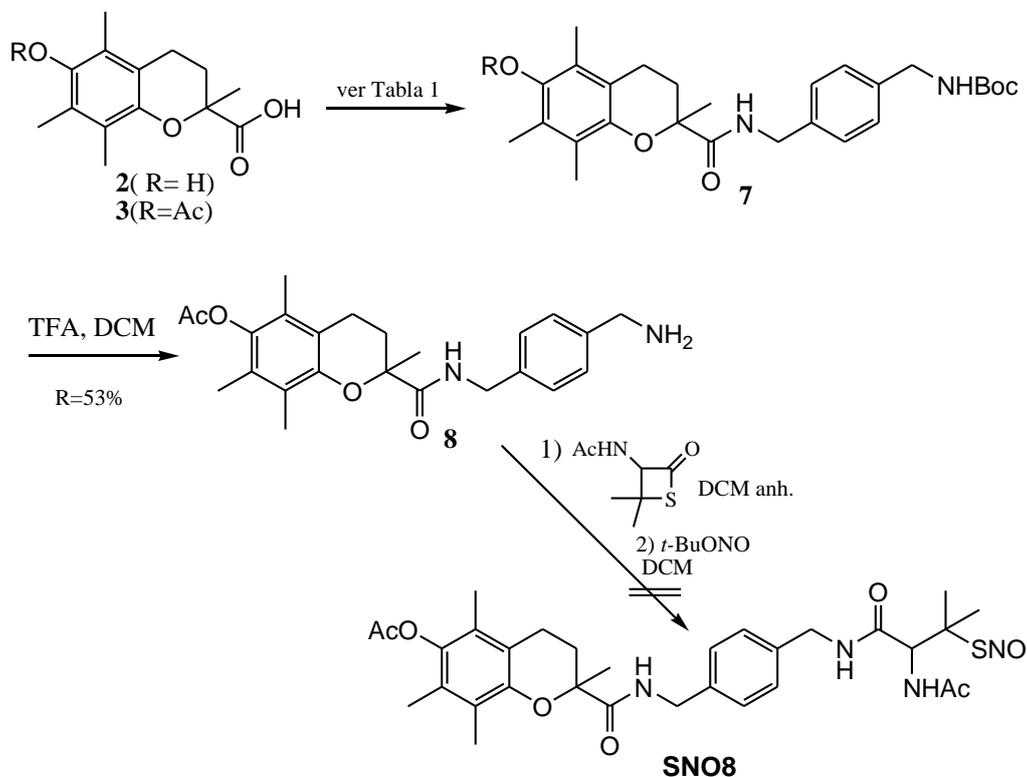
En el caso de la amida **6c** fue imposible obtener el nitrosotiol deseado en las condiciones ensayadas (Esquema 15), recuperándose los reactivos sin reaccionar.



Esquema 15

Luego, a través de la misma estrategia se ensaya la obtención del nitrosotiol **SNO8** a partir del Trolox (**2**) o su derivado acetilado (**3**) (Esquema 16). En una primera etapa se ensayan distintas condiciones de acoplamiento de **2** ó **3** con 1-(*N*-Boc-Aminometil)-4-(aminometil)benceno como se describe en la Tabla 1, resultando las mejores condiciones las indicadas en la entrada 4 para la obtención de la amida. En la etapa

siguiente, se desprotege el grupo amino terminal con ácido trifluoroacético y posteriormente **8** se trata con 3-acetamido-4,4-dimetiltietan-2-ona seguida de *t*-BuONO.



Esquema 16. Síntesis de **SNO8**

Tabla 1. Condiciones ensayadas para la obtención de la amida **7** (Esquema 16).

Entrada	Condiciones	Resultados
1	1) i) 2 , CDI, DCM anh, T.A., 24h.; ii) 1-(<i>N</i> -Boc-Aminometil)-4-(aminometil)benceno; 2) Ac ₂ O, Py, T.A., 24h.	7 (R<5%)
2	1) 3 , NHS, DCC, DCM anh., 0°C, 1h; 2) 1-(<i>N</i> -Boc-Aminometil)-4-(aminometil)benceno, T.A., 24h.	7 (R<5%)
3	1) 3 , SOCl ₂ , Tolueno, reflujo, 90mín.; 2) 1-(<i>N</i> -Boc-Aminometil)-4-(aminometil)benceno, T.A., 4 días.	7 (R=19%)
4	1) 2 , 1-(<i>N</i> -Boc-Aminometil)-4-(aminometil)benceno, BOP, DIPEA, DMF/CH ₃ CN, 5 días. 2) Ac ₂ O, Py, T.A., 72h..	7 (R: 32%)
5	1) 2 , 1-(<i>N</i> -Boc-Aminometil)-4-(aminometil)benceno, HBTU, 1-HOBt, DIPEA, DMF, 7 días. 2) Ac ₂ O, Py, 72h..	7 (R: 15%)

Sin embargo, en las condiciones ensayadas, no fue posible obtener el derivado **SNO8** en cantidades que permitieran una adecuada caracterización espectroscópica. En la figura 12 se muestra el ^1H -RMN donde se puede visualizar una pequeña señal a 5.0 ppm correspondiente al H vecino al grupo funcional acetamida del **SNO8**.

Las últimas etapas se ensayaron varias veces, extremando cuidado de las condiciones, como por ejemplo: secar el disolvente y utilizarlo inmediatamente, trabajar en atmósfera de nitrógeno, corroborar la pureza de los reactivos, protegerlo de la luz con especial énfasis, etcétera.

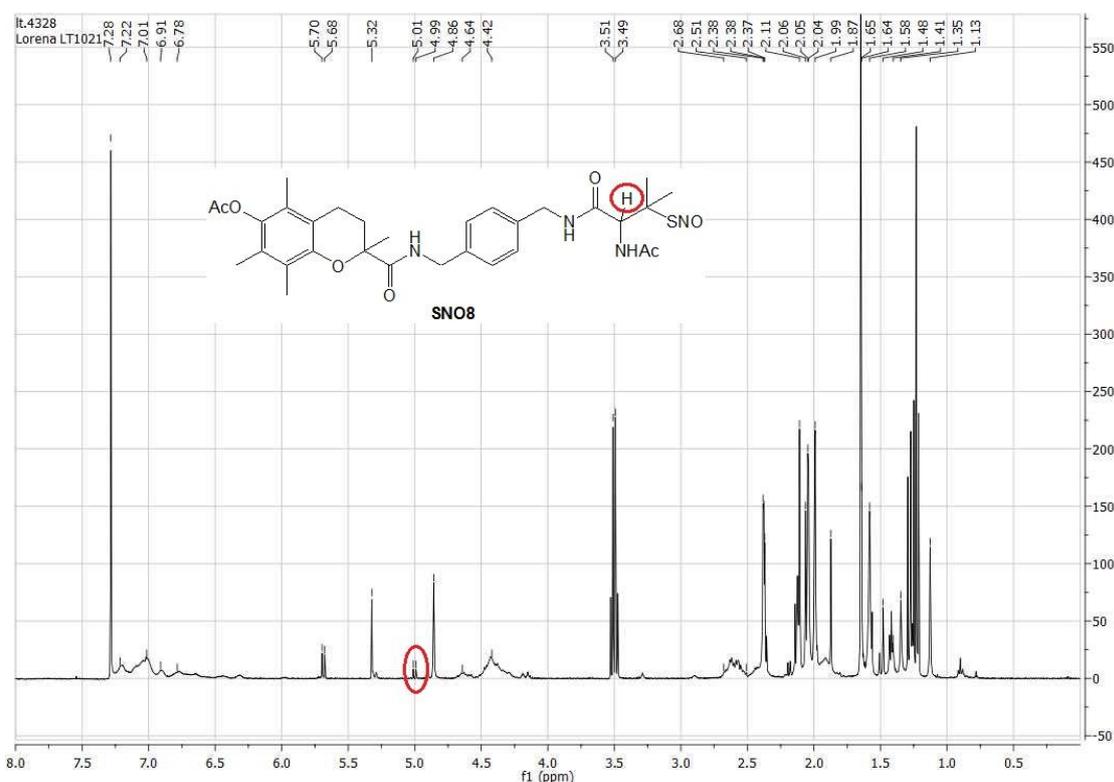
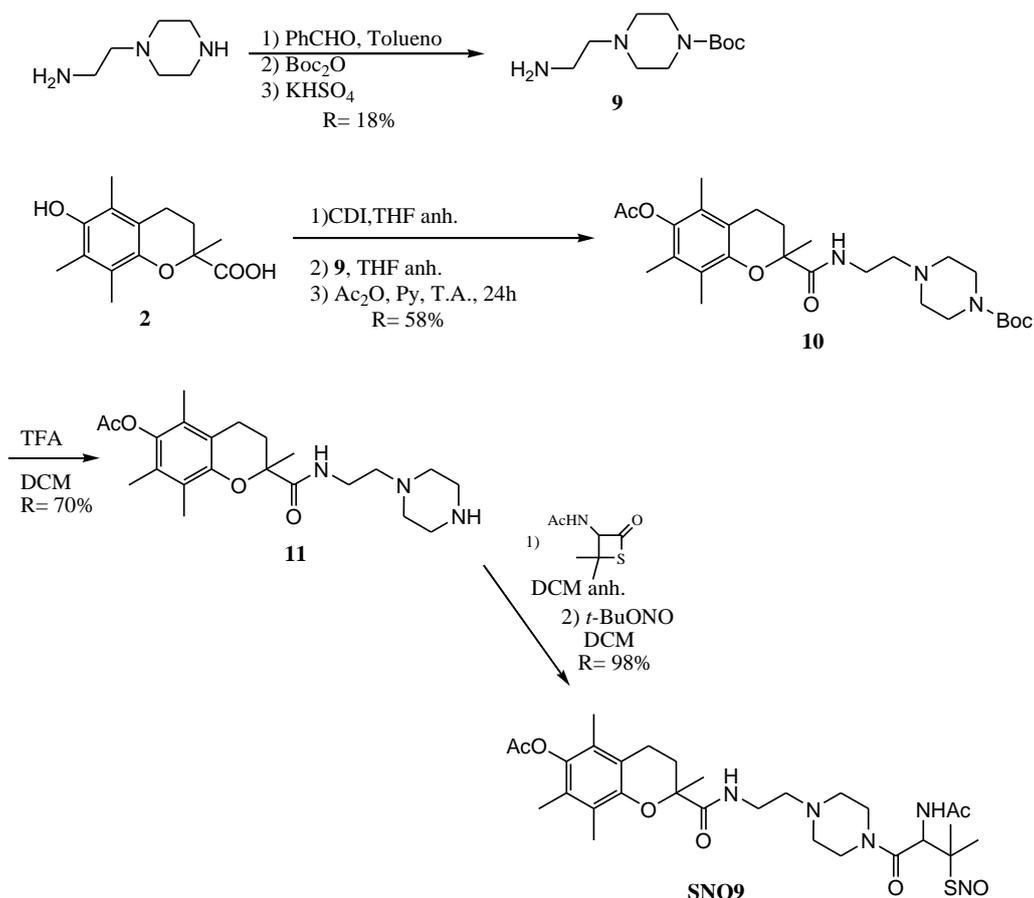


Figura 12. Espectro de ^1H -RMN del crudo de la reacción para la obtención de **SNO8**.

Paralelamente, una estrategia análoga fue utilizada para sintetizar **SNO9** a partir de **2** activado con CDI y 4-(2-aminoetil)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo **9** (Prugh, Birchenough y Egbertson 1992) como material de partida (Esquema 17), obteniendo el producto deseado con un rendimiento global de 7% en 6 pasos.



Esquema 17. Síntesis de SNO9

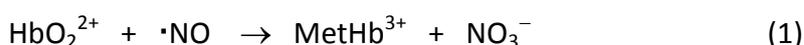
El avance de todas las reacciones se analiza por cromatografía en capa fina y las mismas se detienen cuando no se detecta más producto de partida o cuando luego de largos periodos de reacción no se observa avance.

La caracterización estructural de los compuestos finales e intermedios se realizó mediante experimentos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, experimentos bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC) y espectrometría de masas (ver Materiales y Métodos).

2. Biología y Físicoquímica

2.1- Liberación de óxido nítrico

Las velocidades iniciales de liberación de $\cdot\text{NO}$ en presencia de cisteína (5 a 20 veces en exceso) son determinadas a diferentes concentraciones por oxidación de oxihemoglobina (HbO_2) a metahemoglobina (MetHb) (Murphy y Noack 1994). Este método se basa en la habilidad del $\cdot\text{NO}$ de oxidar cuantitativamente la HbO_2 a MetHb en solución acuosa de acuerdo a la reacción:



La transformación en la forma trivalente del átomo central de hierro viene acompañada de un cambio en sus características de absorción en el espectro visible. La relación lineal existente entre la diferencia de absorbancia (ΔA) y la concentración de MetHb formada es usada para calcular el cambio en la concentración de MetHb. En este sentido, para la conversión de HbO_2 en MetHb la mayor diferencia de absorbancia se observa a 401 nm. Para la diferencia de absorbancia a esta longitud de onda ($\Delta A_{401(\text{HbO}_2/\text{MetHb})}$) se puede determinar un coeficiente de extinción molar, el cual se define matemáticamente como la diferencia entre los coeficientes de extinción molar individual de los compuestos a dicha longitud de onda (ecuación 2). Entonces, a partir de la medida de la ΔA_{401} y del $\Delta \epsilon_{401(\text{MetHb}-\text{HbO}_2)}$ se puede calcular la concentración de MetHb (ΔC_{MetHb}) de acuerdo a la ecuación 3.

$$\Delta \epsilon_{401(\text{MetHb}-\text{HbO}_2)} = \epsilon_{401(\text{MetHb})} - \epsilon_{401(\text{HbO}_2)} \quad (2)$$

$$\Delta C_{\text{MetHb}} = \Delta(\Delta A_{401}) / \Delta \epsilon_{401(\text{MetHb}-\text{HbO}_2)} \quad (3)$$

Así, la concentración de MetHb (ΔC_{MetHb}) la cual es idéntica a la concentración de $\cdot\text{NO}$ generado, se determina siguiendo la reacción mediante la determinación del incremento de absorbancia a $\lambda = 401$ nm ($\Delta(\Delta A_{401})$) y dividiendo el valor obtenido por el coeficiente de extinción molar ($\Delta \epsilon_{401(\text{MetHb}-\text{HbO}_2)}$) para esta reacción.

El coeficiente de extinción molar $\Delta \epsilon = \epsilon_{401\text{MetHb}} - \epsilon_{401\text{HbO}_2}$ se determina por oxidación cuantitativa de 5 concentraciones diferentes de HbO_2 (1- 10 μM) en buffer

fosfato 50 mM pH 7.4 con una solución 20 μM de NOC-7 (1-hidroxi-2-oxo-3-(*N*-3-metilaminopropil)-3-metil-1-triazeno). La pendiente ($\Delta\epsilon$) de la línea de ajuste ($r = 0.999$) obtenida de graficar el incremento de absorbancia ΔA a $\lambda=401\text{nm}$ versus la concentración de HbO₂ fue $57 \pm 2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (G. V. López 2006).

Así, se determina la liberación de óxido nítrico a 100 μM de compuesto por oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina, en los primeros 10 minutos a 37°C (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de liberación de óxido nítrico, en presencia de Cys (100 μM)y ausencia de Cys.

Compuesto	[NO]_{lib.}(μM)
	<u><i>Con Cys</i></u>
SNO5	4.2
SNO9	6.0
SNO1	3.8
SNO2	22.6
SNO3	22.9
	<u><i>Sin Cys</i></u>
SNO5	1.5
SNO9	0.17
SNO1	0.86
SNO2	2.2
SNO3	1.7

Los nuevos compuestos fueron capaces de liberar espontáneamente óxido nítrico en las condiciones estudiadas. Comparando con los nitrosioles sintetizados anteriormente **SNO1**, **SNO2** y **SNO3**, el **SNO5** se mantiene en el mismo orden de liberación de $\cdot\text{NO}$ con un valor de 1.5 μM , el **SNO9** fue el que liberó menos $\cdot\text{NO}$ en ausencia de Cys con un valor de 0.17 μM . Sin embargo, en presencia de Cys si bien todos los productos liberaron mayor concentración de óxido nítrico, los nitrosioles **SNO5** y **SNO9** del presente trabajo, tienen menos capacidad de liberar óxido nítrico que los sintetizados anteriormente **SNO2** y **SNO3**, pero tienen una liberación de $\cdot\text{NO}$ semejante a **SNO1**.

2.2- Lipofilia relativa

El comportamiento lipofílico de un fármaco es uno de los parámetros más importantes de la acción farmacológica y más aún para los fármacos que estamos tratando en la presente tesis. Como consecuencia, un aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de potenciales fármacos es la modificación del balance hidrofóbico-hidrofilico tratando de optimizar su transporte hasta el sitio de acción y/o su interacción con el receptor. El coeficiente de partición octanol-agua es el índice de lipofilia más difundido, sin embargo, está asociado a una serie de dificultades concernientes a su medida, resultando un método tedioso y con frecuencia sujeto a errores. Debido a lo cual, las técnicas cromatográficas en fase reversa (HPLC y CCF) están siendo más utilizadas. (Krass J.D. 1997;69, Wang Q.S. 1999,22)

Así, en el presente trabajo de tesis se realizó el estudio de lipofilia relativa usando CCF en fase reversa, empleando placas SIL RP-18W/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel), utilizando como disolvente de elución una mezcla agua-acetona (50:50). Se utilizan α -tocoferol y acetato de α -tocoferol como referencia. Los valores de R_f se convierten en R_M usando la relación (Tsantili-Kakoulidou A. 1988; 445.)

$$R_M = \log\left[\frac{1}{R_f} - 1\right]$$

El valor de R_M se puede usar para estimar la lipofilia relativa de los compuestos sintetizados.

En la tabla 3 se resumen los valores de R_M determinados y como referencia se incluyen, además de α -tocoferol y acetato de α -tocoferol, los nitrosotioles previamente preparados SNO1 y SNO2 (G. V. López 2006) (G. V. López 2006).

Tabla 3. Valores de RM determinados para los compuestos sintetizados SNO5 y SNO9 y de referencia (SNO1, SNO2, α -Tocoferol, Acetato de α -Tocoferol)

Entrada	Compuesto	R_M
1	SNO1	-0.1
2	SNO2	0.3
3	SNO5	0.5
4	SNO9	0.3
5	α -Tocoferol	2.2
6	Acetato de α -Tocoferol	2.2

Los nuevos nitrosotioles, obtenidos en el presente trabajo, presentan una lipofilia relativa similar a los nitrosotioles anteriormente obtenidos por el grupo de trabajo (Tabla 3) pero sigue siendo mucho menor a la del α -tocoferol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generalidades

En este apartado 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. (Perrin D.D. 1996).

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/ 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:

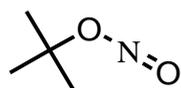
- Exposición a la luz ultravioleta (254 nm).
- Exposición a vapores de yodo
- Asperjado con una mezcla de: etanol: ácido sulfúrico: anisaldehído (95:4:1) (V/V/V) y posterior quemado.

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).

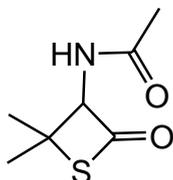
Todas las reacciones que involucran reactivos sensibles a la humedad o aire se realizan bajo atmósfera de nitrógeno.

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.

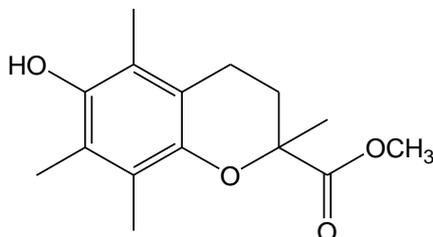
Los espectros de masa por impacto electrónico se realizan en un equipo Shimadzu GCMS QP 1100 EX a un potencial de ionización de 70 eV por inyección directa.



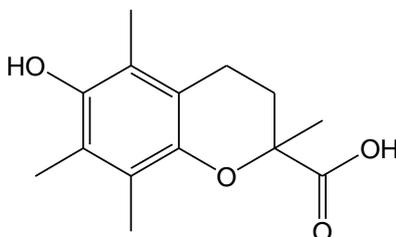
t-Butilnitrito. Se prepara siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (Coe y Doumani 1948).



3-acetamida-4,4-dimetiltietan-2-ona. Se prepara siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (Soulère L. 2001).



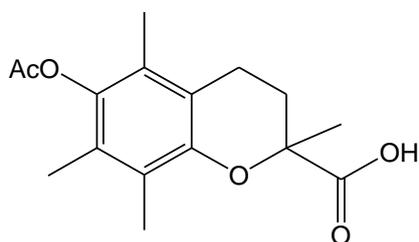
6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcarboxilato de metilo (1). (Hidaka 2006) En un reactor de acero inoxidable, de 30 mL se colocan: TMHQ (10.00 g, 66.00 mmol), paraformaldehído (4.00 g, 132.00 mmol), metacrilato de metilo (35.0 mL) y agua (3.0 mL). La mezcla se deja reaccionar a 180°C por 3 horas. Luego de transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se deja llegar a temperatura ambiente y se adiciona MeOH, precipitando el producto como polvo blanco. Se filtra el sólido obtenido y se recrystaliza de MeOH para dar el éster correspondiente como cristales blancos (11.28 g) R= 69%



Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico(Trolox™) (2). (Hidaka 2006) A una solución de **1** (1.37 g, 5.20 mmol) en MeOH (3.0 mL) se adiciona gota a gota en 2

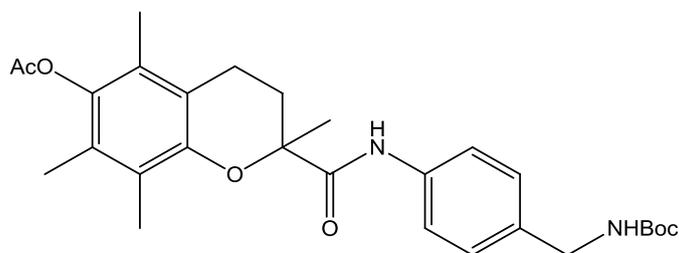
horas una solución de NaOH (0.27 g, 6.75 mmol) en H₂O (4.0 mL). Luego se calienta la mezcla de reacción 2 horas a 80°C. Una vez cumplido ese tiempo, la mezcla de reacción se neutraliza con una solución de KHSO₄ (0.92 g) en H₂O (4.0 mL), a 80°C por 2 horas. La mezcla de reacción se deja llegar a temperatura ambiente y se filtran los cristales obtenidos. El crudo obtenido se purifica por CC (SiO₂, Eter etílico) para dar cristales blancos (1.68 g) R= 65%.

¹H-RMN (CDCl₃): δ= 11.18 (s, 1H), 2.73 – 2.59 (m, 2H), 2.42 – 2.36 (m, 1H), 2.19 (s, 6H), 2.11 (s, 3H), 2.00 – 1.93 (m, 1H), 1.63 (s, 3H).



Ácido 6-acetoxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (3). Una solución de **2** (1.16 g, 4.64 mmol) en 5.1 mL de piridina y 4.3 mL de anhídrido acético se agita por 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluye en agua (10.0 mL) y se extrae con éter etílico (4 x 5.0 mL). La capa etérea se lava con solución saturada de sulfato de cobre y posteriormente con solución saturada de cloruro de sodio. Se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra el agente desecante y evapora el disolvente a vacío. El sólido blanco obtenido se utiliza sin purificar en las etapas siguientes. R= 78%. El proceso de acetilación se confirma por ¹H-RMN.

¹H-RMN: δ= 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).



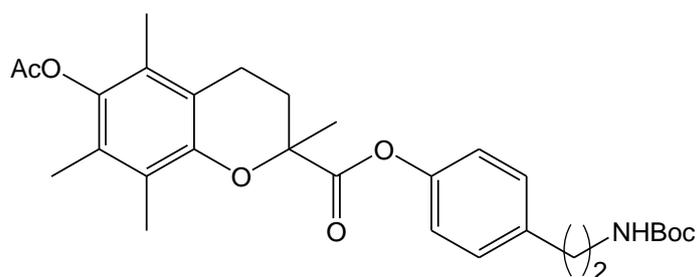
6-acetoxi-2-((4-*tert*-butoxicarbonil)metil)fenil)carbamoil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (5a). A una solución de **2** (0.25 g, 1.00 mmol) en DCM anhidro (10.0 mL), se agrega CDI

(0.20 g, 1.20 mmol) y se agita durante 1 hora a TA. Luego se adiciona amina **4a** (0.22 g, 1.00 mmol) (Silveira 2009) y continúa la agitación durante 24 horas. A la mezcla de reacción se le agrega DCM (20 mL), se hacen tres lavados con HCl 10%, luego con NaHCO₃ 10%, agua y por último con solución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y evapora el disolvente a presión reducida.

El producto crudo sin purificar se coloca en un balón y se agregan Ac₂O (2.0 mL) y Py (2.6 mL), y se agita a T.A. por 24 h. Luego, la mezcla de reacción se enfría en baño de hielo y se agrega agua (10.0 mL) y éter etílico (20.0 mL). La capa orgánica se extrae con NaOH 10%, se lava con agua y seca con Na₂SO₄. El agente desecante se filtra y evapora el disolvente a presión reducida. El producto se utiliza en la etapa siguiente sin purificar (0.13 g, R= 26%). La transformación se verifica por ¹H-RMN y MS.

¹H-RMN: δ= 8.31(sa, 1H, NH), 7.43(d, J=8.4Hz, 2H), 7.28-7.21(m, 2H), 4.39(sa, 1H, NH), 4.25(sa, 2H), 2.70-2.58(m, 2H), 2.44-2.38(m, 1H), 2.34(s, 3H), 2.27(s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.09(s, 3H), 1.98(m,1H), 1.60(s, 3H), 1.45(s, 9H).

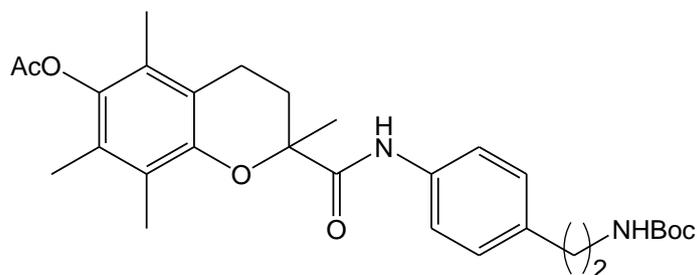
MS(IE, 70eV): m/z(%)= 496(M⁺, 4), 440(15), 422(5), 395(16), 380(81), 354(6), 337(11), 247(45), 232(7), 217(7), 205(100), 189(16), 174(9), 149(3), 121(5), 106(4), 91(2).



6-acetoxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de 4-((tert-butoxicarbonil)etil)fenilo (5b). Se sintetiza en iguales condiciones que el compuesto **5a**, a partir de **2** (0.50 g, 2.00 mmol) y **4b** (0.47 g, 2.00 mmol). R: 35 %.

¹H-RMN: δ= 7.17 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.89(d, J=8.0Hz, 2H), 4.54(sa, 1H, NH), 3.35(sa, 2H), 2.83-2.56(m, 5H), 2.35(s, 3H), 2.21(s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.99(s, 4H), 1.80(s, 3H), 1.45(s, 9H).

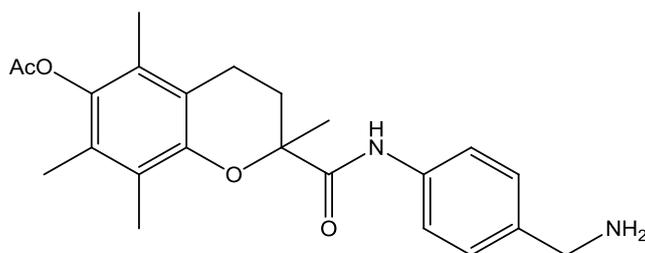
MS(IE, 70eV): m/z(%)= 511(M⁺, 3), 469(1), 455(3), 413(24), 395(47), 369(16), 247(68), 205(100).



6-acetoxy-2-((4-((tert-butoxycarbonyl)etil)fenil)carbamoil)-2,5,7,8-tetrametilcromano

(5c). Se sintetiza en iguales condiciones que el compuesto **5a**, a partir de **2** (0.25 g, 1.00 mmol) y **4c** (0.24 g, 1.00 mmol). R: 32%.

$^1\text{H-RMN}$: δ = 8.31(sa, 1H, NH), 7.43(d, J =8.0Hz, 2H), 7.154(d, J =8.0Hz, 2H), 4.53(sa, 1H, NH), 3.34(sa, 2H), 2.80-2.73(m, 2H), 2.70-2.60(m, 2H), 2.47-2.41(m, 1H), 2.37(s, 3H), 2.29(s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.11(s, 3H), 2.01-1.96(m, 1H), 1.62(s, 3H), 1.44(s, 9H).

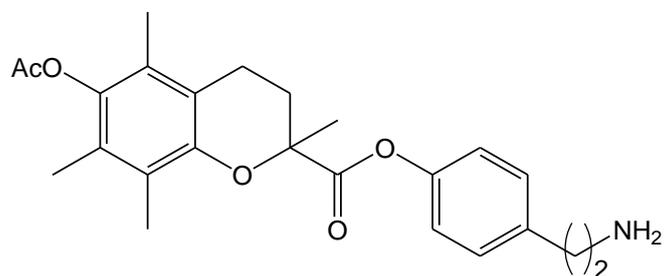


6-acetoxy-2-((4-(aminometil)fenil)carbamoil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (6a). En un balón se disuelve **5a** (0.13 g, 0.26 mmol) en DCM (10.0 mL), se enfría a 0°C en baño de hielo y se agrega TFA (0.45 mL). Se agita a TA durante 5 horas. La solución resultante se lava con NaHCO_3 hasta pH básico, luego con agua, solución saturada de NaCl. La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y evapora el disolvente a presión reducida. El producto crudo se purifica por CC (Alúmina, DCM:MeOH (95:5)) (0.08 g). R= 79%.

$^1\text{H-RMN}$: δ = 8.34(m, 1H, NH), 7.47(d, J =8 Hz, 2H), 7.28(m, 2H), 3.89(sa, 2H), 2.73-2.64(m, 2H), 2.51-2.40(m, 1H), 2.37(s, 3H), 2.28(s, 3H), 2.10(s, 3H), 2.00(sa, 4H), 1.63(s, 3H).

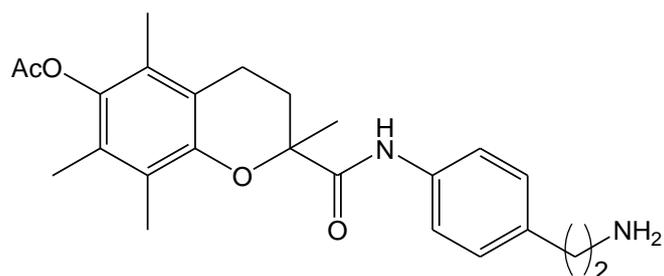
$^{13}\text{C-RMN}$: δ = 172.30, 169.39, 147.78, 141.82, 138.84, 136.15, 127.98(2C), 127.54, 125.87, 122.39, 119.94(2C), 118.26, 78.46, 45.72, 29.10, 24.53, 20.55, 20.32, 13.07, 12.19(2C).

MS(IE, 70eV): $m/z(\%) = 396(M^+, 62)$, 379(8), 354(29), 337(85), 247(76), 232(9), 205(100), 189(21), 174(83), 149(5), 121(11), 106(21), 91(5).



6-acetoxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de 4-(aminoetil)fenilo (6b). Se sintetiza en iguales condiciones que el compuesto **6a**, a partir de **5b** (0.34 g, 0.68 mmol). R: 41%.

$^1\text{H-RMN}$: $\delta = 7.04(\text{d}, J=8.0\text{Hz}, 2\text{H})$, $6.80(\text{d}, J=8.0\text{Hz}, 2\text{H})$, $5.58(\text{sa}, 2\text{H}, \text{NH})$, $3.49(\text{M}, 2\text{H})$, $2.94\text{-}2.56(\text{m}, 5\text{H})$, $2.35(\text{s}, 3\text{H})$, $2.20(\text{s}, 3\text{H})$, $2.05(\text{s}, 3\text{H})$, $1.99(\text{s}, 4\text{H})$, $1.79(\text{s}, 3\text{H})$.

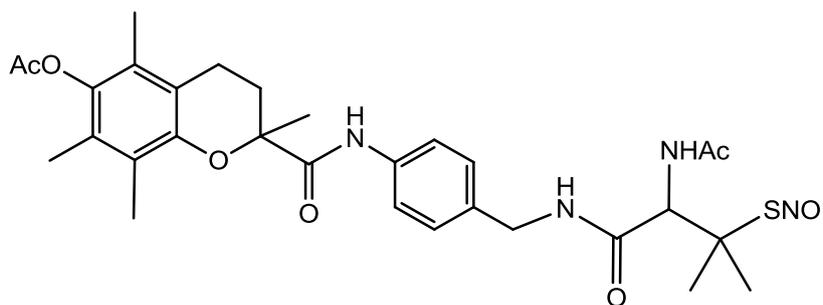


6-acetoxy-2-((4-(aminoetil)fenil)carbamoil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (6c). Se sintetiza en iguales condiciones que el compuesto **6a**, a partir de **5c** (0.16 g, 0.31 mmol). R: 69 %.

$^1\text{H-RMN}$: $\delta = 8.30(\text{m}, 1\text{H})$, $7.34(\text{sa}, 2\text{H})$, $7.17(\text{d}, J=7.6\text{ Hz}, 2\text{H})$, $3.06(\text{sa}, 2\text{H})$, $2.84(\text{m}, 2\text{H})$, $2.67(\text{sa}, 2\text{H})$, $2.41(\text{sa}, 1\text{H})$, $2.36(\text{s}, 3\text{H})$, $2.26(\text{s}, 3\text{H})$, $2.09(\text{s}, 3\text{H})$, $2.00(\text{s}, 4\text{H})$, $1.61(\text{s}, 3\text{H})$.

$^{13}\text{C-RMN}$: $\delta = 172.88$, 196.60 , 147.70 , 141.84 , 135.47 , 134.42 , $129.67(2\text{C})$, 127.57 , 125.88 , 122.40 , $120.93(2\text{C})$, 118.19 , 77.24 , 41.79 , 35.75 , 29.16 , 23.38 , 20.55 , 20.22 , 13.05 , $12.17(2\text{C})$.

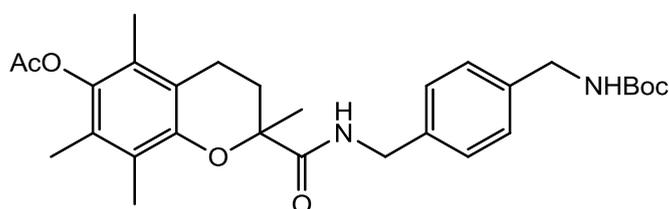
MS(IE, 70eV): $m/z(\%) = 410(M^+, 30)$, 381(77), 368(13), 339(73), 247(66), 232(4), 217(4), 205(100), 189(17), 174(17), 149(3), 121(4), 106(25), 91(4).



6-acetoxi-2-((4-((2-acetamido-3-tionitroso-3-metilbutanamido)metil)fenil)carbamoil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (SNO5). En un balón provisto de atmósfera de N_2 y en ausencia de luz, se disuelve **6a** (0.08 g, 0.20 mmol) en DCM anhidro (5.0 mL), se adiciona 3-acetamido-4,4-dimetiltietan-2-ona (0.03 g, 0.16 mmol) y agita a T.A. durante 27 horas. Luego la mezcla de reacción se extrae con HCl 4%, luego con H_2O . La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , filtra y evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en DCM seco, en atmósfera de N_2 y ausencia de luz y se le adiciona *t*-BuONO, 30 minutos después se evapora el disolvente, en oscuridad, y el residuo se lava con Et_2O seco. El producto se almacena protegido de la luz bajo atmósfera de N_2 a $-20^\circ C$. Sólido verde (0,08 g). R= 96%.

1H -RMN: δ = 8.82(s,1H,NH), 7.52(d, J =8.4 Hz,2H), 7.37(m, 1H,NH), 7.16(d, J =8.4 Hz, 2H), 6.74(m, 1H, NH), 5.30(d, J =8.0 Hz,1H), 4.40-4.25(m,2H), 2.65-2.61(m,2H), 2.52(m,1H), 2.36(s, 3H), 2.28(s, 3H), 2.25-2.19(m,1H), 2.09(s,3H), 2.04(s, 3H), 1.99(s, 3H), 1.97(s,6H), 1.62(s,3H).

MS(IE, 70eV): m/z (%)= 568.5(M^+ -NO, 10), 510.5(100), 536.5(77), 494.5(7), 397.3(19), 354.3(47), 247.0(28), 232.0(1), 205.0(24), 106.0(20).



6-Acetoxi-2-((4-((tert-butoxicarbonil)metil)encil)carbamoil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (7).

Método a) A una solución de **3** (0.12 g, 0.42 mmol) en tolueno anhidro (2.00 mL, 0.42 mmol) se le agrega $SOCl_2$ (0.05 mL, 0.74 mmol) y una gota de DMF. La mezcla se refluja

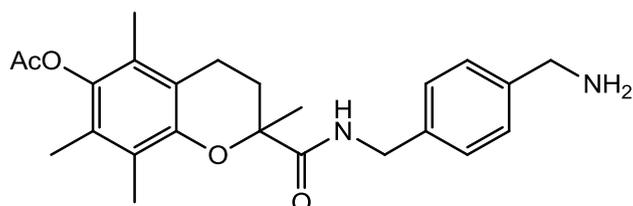
por 90 minutos y se enfría a T.A. El disolvente y el SOCl_2 en exceso se evaporan a presión reducida. El cloruro de ácido se disuelve en DCM anhidro (2.00 mL) y se adiciona gota a gota a una solución de amina **9** (0.10 g, 0.42 mmol) y NEt_3 (0.20 mL, 1.68 mmol) en DCM seco (2.00 mL). Luego de agitar durante 4 días a T.A..La mezcla de reacción se lava con solución de NaHCO_3 10% y luego con H_2O . La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra el agente desecante, y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se purifica por CC (Sílica gel, EP:AE (7:3)). R= 19%.

Método b) En un balón se coloca **2** (0.14 g, 0.56mmol), BOP (0.49 g,1.10 mmol), **9**(0.26 g, 1.10 mmol), DIPEA (0.22 g, 1.10 mmol) y se disuelven en DMF (2.0 mL) y CH_3CN (3.0 mL). Se agita a T.A. bajo atmósfera de N_2 , hasta completar la reacción (5 días). Luego, a la mezcla de reacción se agrega HCl 10% y AcOEt. La capa orgánica se lava con HCl 10% (X2), luego con solución saturada de bicarbonato de sodio(X2). Finalmente, se lava con solución saturada de NaCl. La capa orgánica se seca Na_2SO_4 , se filtra y evapora a presión reducida. Se purifica el producto crudo mediante CC (Sílica flash, EP:AE (7:3, 1:1). Se obtienen 0.13 g de producto. R: 28%. Luego, se trata con Ac_2O (1.0 mL, 10.00 mmol) y Py (1.2 mL, 15.00 mmol) en baño de hielo. Se agita a T.A. durante 72 horas. Luego, a la mezcla de reacción se agrega H_2O y éter etílico. La capa orgánica se lava con solución saturada de Na_2CO_3 , seguida de solución saturada de NaCl. Se seca con Na_2SO_4 , se filtra y evapora el disolvente a presión reducida. La pureza del producto se verifica por ^1H -RMN. R= 32%.

Método c). Una solución de **2** (0.10 g, 0.40 mmol), **9** (0.10 g, 0.44 mmol), HBTU (0.22 g, 0.52 mmol), HOBt (0.08 g, 0.61 mmol) en DMF (9.37 mL, 121.2 mmol), se agita a T.A., durante 20 minutos, bajo atmosfera de N_2 . Se adiciona DIPEA (0.21 g, 1.60 mmol) y la mezcla de reacción se agita a T.A. por 6 días . Luego, a la mezcla de reacción se agrega HCl 10% y AcOEt. La capa orgánica se lava con HCl 10% (X2), luego con solución saturada de bicarbonato de sodio (X2). Finalmente, se lava con solución saturada de NaCl. La capa orgánica se seca Na_2SO_4 , se filtra y evapora a presión reducida. Se purifica el producto crudo mediante CC (Sílica flash, EP:AE (7:3, 1:1). Se obtienen 0.04 g de producto. R: 22%. Luego, se trata con Ac_2O (0.3 mL, 3.07 mmol) y Py (0.4 mL, 4.60 mmol) en baño de hielo. Se agita a T.A. durante 72 horas. Luego, a la mezcla de reacción se agrega H_2O y éter etílico. La capa orgánica se lava con solución saturada de

Na₂CO₃, seguida de solución saturada de NaCl. Se seca con Na₂SO₄, filtra y evapora el disolvente a presión reducida. La pureza del producto se verifica por ¹H-RMN. R= 15%.

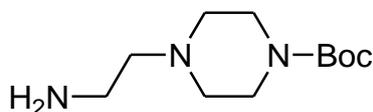
¹H-RMN: δ= 7.28 (m, 2H), 7.21 (m, 2H), 6.99(sa, 1H, NH), 6.66(sa, 1H, NH), 4.48(dd, J= 15.1, 6.2Hz, 1H), 4.35-4.29(m,3H), 2.67-2.52(m,2H), 2.49-2.39(m,1H), 2.37(s, 3H), 2.12(s, 3H), 2.04(s,3H), 1.99(s, 3H), 1.92(m,1H), 1.59(s,3H), 1.48(s,9H).



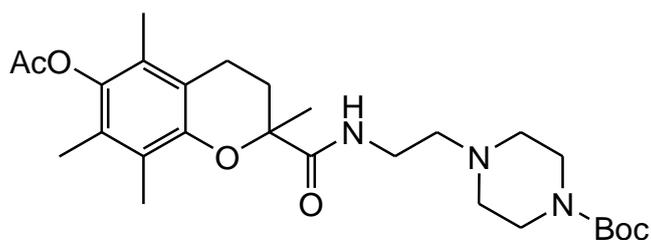
6-Acetoxy-2-((4-(aminometil)encil)carbamoil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (8) En un balón se disuelve **7** (0.21 g, 0.42 mmol) en DCM seco (10.0 mL). Se enfría a 0°C y se agrega TFA (0.7 mL, 9.15 mmol). Se agita a T.A. por 1 hora. La mezcla de reacción se lava con solución saturada de NaHCO₃, seguida de solución saturada de NaCl. La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y evapora el disolvente a presión reducida. El producto crudo se purifica mediante CC (Alúmina, DCM:MeOH (95:05)). R= 53%.

¹H-RMN: δ= 7.19 (m, 2H), 7.03 (m, 2H), 6.86-6.59(m, 1H, NH), 4.52-4.27(m, 4H), 2.71-2.51(m,2H), 2.42(sa,1H), 2.36(s, 3H), 2.11(s, 3H), 2.05(s,3H), 1.98(s, 3H), 1.92(m,1H), 1.67(s,3H).

¹³C-RMN: δ= 174.04, 169.54, 148.15, 141.68(2C), 136.72, 127.43(4C), 127.21, 125.76, 122.40, 118.40, 78.89, 46.11, 42.73, 29.31, 24.08, 20.56, 20.48, 13.00, 12.15, 12.04.



4-(2-aminoetil)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (9). Se prepara a partir de 4-(2-aminoetil)piperazina siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (Astrazeneca 1999).

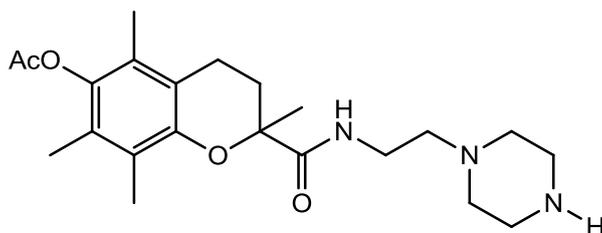


4-(2-(6-acetoxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamido)etil)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (10). A una solución de **2** (0.25 g, 1.00 mmol) en THF anhidro (4.0 mL), se agrega CDI (0.20 g, 1.25 mmol) y agita a T.A. por 1 hora. Luego se adiciona **9** (0.23 g, 1.00 mmol) y se continúa agitando a T.A. por 48 horas. La mezcla de reacción se lava con solución saturada de NaHCO₃, seguida de H₂O. La capa orgánica se seca con Na₂SO₄, filtra y evapora el disolvente a presión reducida para dar el producto como aceite naranja (0.33 g). Luego, se trata con Ac₂O (2.0 mL, 20.00 mmol) y Py (2.6 mL, 32.50 mmol) en baño de hielo. Se agita a T.A. durante 48 horas. Luego, a la mezcla de reacción se agrega H₂O y éter etílico. La capa orgánica se lava con solución saturada de Na₂CO₃, seguida de solución saturada de NaCl. Se seca con Na₂SO₄, filtra y evapora el disolvente a presión reducida. La pureza del producto se verifica por ¹H-RMN y ¹³C-RMN. R= 58%.

¹H-RMN: δ= 7.15-7.02(m, NH), 3.33(sa, 6H), 2.67- 2.43 (m, 3H), 2.35(s+m, 9H), 2.22 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.90(sa, 1H), 1.55(s, 3H), 1.48(s, 9H).

¹³C-RMN: δ= 173.96, 169.57, 147.72, 141.49, 126.78(2C), 125.65, 122.28, 117.47, 56.49(2C), 52.56, 43.02(2C), 35.48, 28.42(3C), 20.54, 20.37, 13.01, 12.32, 12.16.

MS(IE, 70eV): *m/z*(%)= 503(M⁺, 7), 447(1), 430(2), 403(10), 360(1), 347(1), 318(2), 291(2), 275(1), 247(5), 205(10).

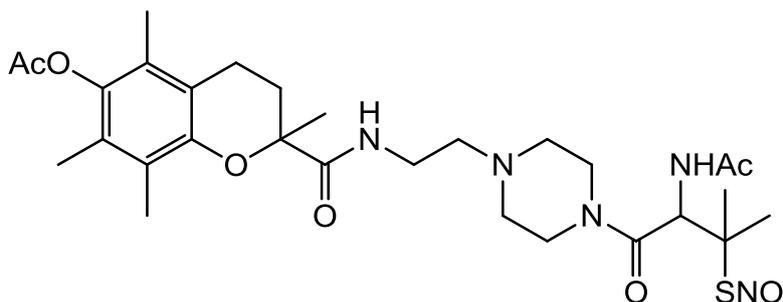


6-Acetoxy-2,5,7,8-tetrametil-N-(2-(piperazin-1-il)etil)croman-2-carboxamida (11). A una solución de **10** (0.28 g, 0.52 mmol) en DCM (10.0 mL) a 0°C, se agrega TFA (0.9 mL,

12.00 mmol). Se agita a T.A. por 1 hora. Se evapora el disolvente a presión reducida y el producto crudo se purifica mediante CC (Alúmina DCM:MeOH (95: 5)). R= 70%.

$^1\text{H-RMN}$: δ = 7.20-7.00(m, 1H, NH), 3.31(sa,2H), 2.79(sa,4H), 2.63-2.20(m,4H), 2.35(s, 3H), 2.24(s, 3H), 2.07(s, 9H), 1.98(s, 3H), 1.90(sa, 1H), 1.54(s, 3H).

$^{13}\text{C-RMN}$: δ = 173.95, 169.60, 148.25, 141.48, 127.16, 125.55, 122.39, 118.09, 78.60, 56.98, 54.04, 45.94(2C), 35.42(2C), 29.16, 24.42, 20.57(2C), 13.04, 12.32, 12.16.



6-Acetoxy-2-((2-(4-(2-acetamido-3-tionitroso-3-metilbutanoil)piperazin-1-il)etil)carbamoyl)-2,5,7,8-tetrametilcromano (SNO9). Se sintetiza en iguales condiciones que el compuesto **SNO5**, a partir de **11** (0.13 g, 032 mmol), disuelto en DCM (10.0 mL) y 3-acetamido-4,4-dimetiltietan-2-ona (0.04 g, 0.26 mmol). Sólido verde (0,15 g) R: 98 %.

$^1\text{H-RMN}$: δ = 5.80 (m, 1H, NH), 5.00 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.44 (m, 6H), 2.73 (m, 6H), 2.59 (m, 1H), 2.45 (m, 2H), 2.34 (s,3H), 2.30 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.07(s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.87 (s, 6H), 1.82 (m, 1H), 1.58 (s, 3H).

Liberación de óxido nítrico. La velocidad inicial de liberación de $\cdot\text{NO}$ se determina usando una técnica espectrofotométrica basada en la oxidación de oxihemoglobina (HbO_2) a metahemoglobina (MetHb) a $\lambda=401\text{nm}$, a 37°C usando un espectrofotómetro Shimadzu. La reacción se comienza por agregado de una solución del producto a estudiar (concentración final $100\ \mu\text{M}$ en buffer fosfato $50\ \text{mM}$), a una solución de $10\ \mu\text{M}$ HbO_2 en buffer fosfato $50\ \text{mM}$ (pH 7.4), en presencia de un exceso de 5 veces de cisteína. El incremento en absorbancia (ΔA) fue registrado en los primeros 10 minutos. Cada velocidad inicial se promedia de por lo menos 5 determinaciones. El coeficiente de extinción molar $\Delta\epsilon = \epsilon_{401\text{MetHb}} - \epsilon_{401\text{HbO}_2}$ se determina por oxidación cuantitativa de 5 concentraciones diferentes de HbO_2 ($1\text{-}10\ \mu\text{M}$) en buffer fosfato $50\ \text{mM}$ pH 7.4 con

una solución 20 μM de NOC-7 (1-hidroxi-2-oxo-3-(*N*-3-metil-aminopropil)-3-metil-1-traizeno). La pendiente ($\Delta\varepsilon$) de la línea de ajuste ($r = 0.999$) obtenida de graficar el incremento de absorbancia ΔA a $\lambda=401\text{nm}$ versus la concentración de HbO_2 fue $57 \pm 2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Se informa la concentración de $\cdot\text{NO}$ liberada en los primeros 10 min.

Lipofilia relativa. Se siembran los compuestos sintetizados (**SNO5** y **SNO9**), también **SNO1**, **SNO2**, α -Tocoferol y acetato de α -Tocoferol en placas SIL RP-18W/UV254 (Macherey-Nagel), utilizando como disolvente de elución una mezcla agua-acetona (50:50). Los valores de R_f se convierten en R_M usando la relación: $R_M = \log\left[\frac{1}{R_f} - 1\right]$.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el transcurso de la presente tesis de graduación se desarrollaron compuestos que en su metabolismo fueran factibles de ser incorporados a las lipoproteínas confiriendo liberación local y controlada de óxido nítrico en el seno de las partículas lipoproteicas y, por tanto, pudieran evitar o retardar la oxidación de las mismas. En este sentido, se sintetizaron y caracterizaron biológicamente 2 nuevos derivados miméticos de α -tocoferol capaces de liberar $\bullet\text{NO}$ y más de 15 intermedios.

Los estudios biológicos han demostrado que los nitrosotioles sintetizados **SNO5** y **SNO9** (Figura 13), son capaces de liberar óxido nítrico y presentan una lipofilia relativa similar a los compuestos previamente desarrollados pero menor a la del α -Tocoferol.

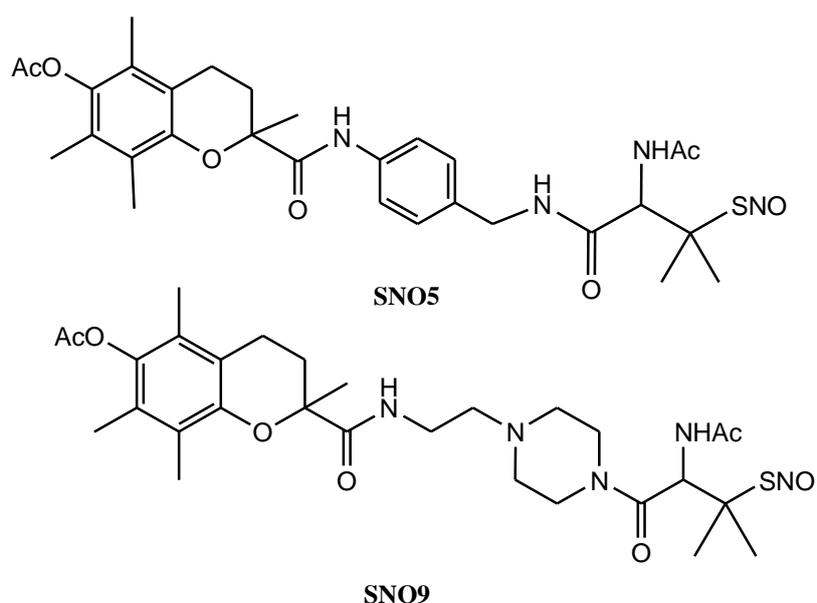


Figura 13. Nitrosotioles sintetizados **SNO5** y **SNO9**.

En el desarrollo del presente trabajo hemos visto que los nitrosotioles derivados de α -tocoferol son difíciles de preparar a través de las rutas sintéticas ensayadas, visto que se logró la síntesis de dos de los cinco compuestos planteados **SNO5** y **SNO9**. Por otra parte, éstos nuevos compuestos son inestables a temperatura ambiente y lábiles a la exposición lumínica, teniendo que mantenerlos protegidos de la luz y a -20°C , lo cual los hace poco prácticos para: la síntesis a gran escala, la

distribución y mantenimiento de la cadena de frío, hasta su administración, pensándolos como potenciales fármacos.

Con respecto a los nitrosotioles, que no se pudieron obtener (**SNO6**, **SNO7** y **SNO8**, Figura 14), las dificultades sintéticas se presentaron en la etapa que involucra la reacción de las aminas **6b**, **6c** u **8** con 3-acetamido-4,4-dimetiltietan-2-ona para dar la amida correspondiente y dejando libre el grupo tiol para la posterior nitrosación. Por tanto, teniendo en cuenta que estas aminas son estructuralmente similares a la precursora de **SNO5**, pensamos que se podrían hacer estudios teóricos computacionales con el fin de buscar alguna explicación para los resultados obtenidos.

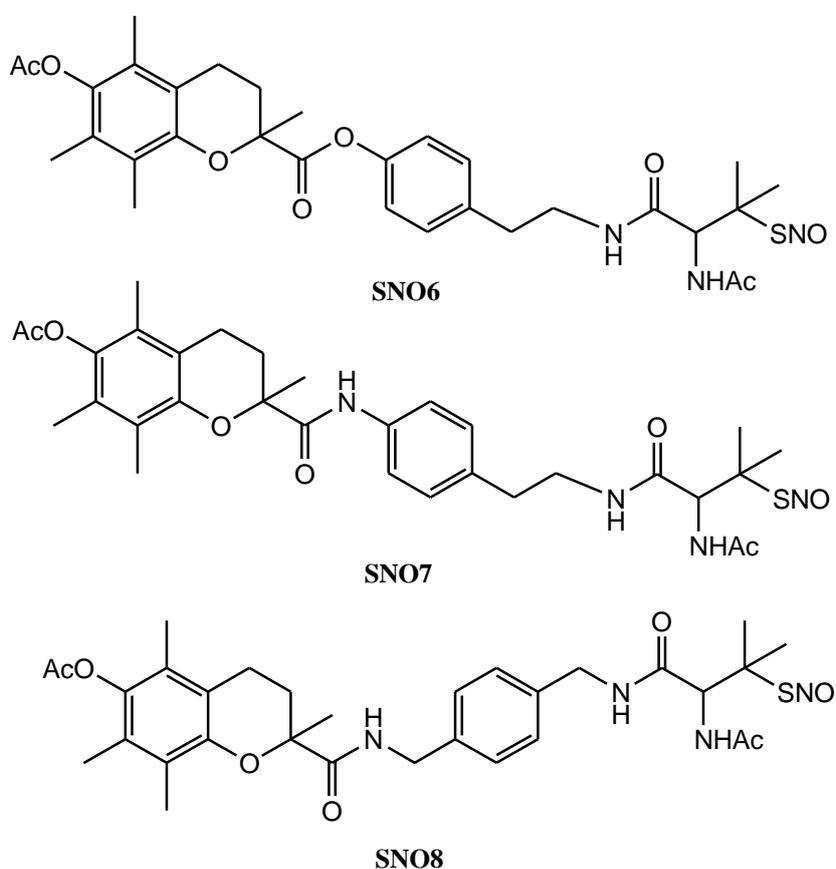


Figura 14. Los nitrosotioles que no se lograron obtener SNO6, SNO7, SNO8

Como perspectiva nos planteamos la síntesis de nuevos nitrosotioles con un grupo adamantilo vecino (Figura 13), que conferiría no solo mayor lipofilia, sino también mayor estabilidad según se describe en la literatura (Lin, y otros 2004).

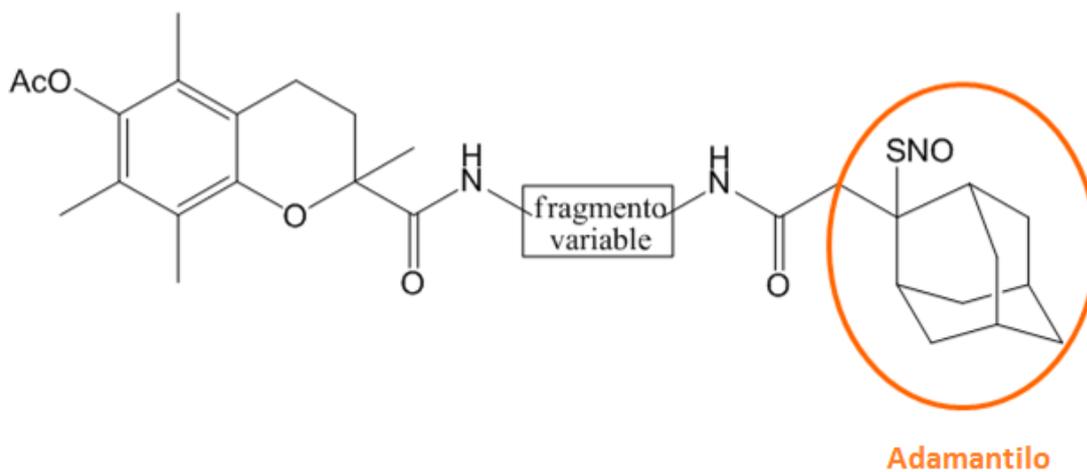


Figura 13. Esquema de las nuevas estructuras diseñadas de nitrosotioles con el grupo adamantilo.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Comisión honoraria para la salud cardiovascular. «Mortalidad por enfermedades cardiovasculares en el Uruguay.» 2007. http://archivo.presidencia.gub.uy/_Web/noticias/2009/09/Mortalidad_CV_2007.pdf (último acceso: 7 de Agosto de 2014).
- Al-Warhi, T.I., H.M.A. Al-Hazimi, y A. El-Faham. *J. Saudi. Chem. Soc.* 2012, 16: 97-116.
- Astrazeneca. Novel compounds. Londres, Inglaterra Patente WO00/58305. 10 de junio de 1999.
- Castro, B., J. R. Dormoy, G. Evin, y C. Selve. *Tetrahedron* 1975, 14: 1219-1222.
- Coe, C.S., y T.F. Doumani. *J. Am. Chem. Soc.* 1948, 70: 1516-1519.
- Cooke, J.P. and P.S. Tsao. *Arterioscler Thromb*, 1994: 653-655.
- Denicola, A., Batthyány, C., Lissi, E., Freeman, B.A., Rubbo, H., and Radi, R. *J Biol Chem* . 2002,277: 932-936.
- Diaz, N.M., B. Frei, J.A. Vita, y J.F. Keaney. *N. Eng. J. Med.* 1997, 337: 408-416.
- Froeyen, P. *Synthetic Commun.* 1995, 25: 959-968.
- Hidaka, T. (Mitsubishi Gas Chemical CompanyInc.). "Process for producing chroman compound". Europa Patente EP1710239 A1. 11 de Octubre de 2006.
- Hogg, N., Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. *FEBS Lett.*1993,334: 170-174.
- Hyatt, J.A. *Synthetic Communications* 2007, 38: 8-14.
- Joullie, M.M., y K.M. Lassen. *Arkivoc*, 2010, 8: 189-250.
- Klausner, Y.S., y M. Bodansky. *Synthesis*, 1974, 549-559.
- Knorr, R., A. Trzeciak, W. Bannwarth, y D. Gillessen. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30: 1927-1930.
- Krass J.D., Jastorff B., Genieser H.-G. *Anal. Chem.* 1997, 69: 2575-2581.
- Kunishima, M., C. Kawachi, F. Iwasaki, K. Terao, y S. Tani. *Tetrahedron Lett.* 1999, 40: 5327-5330.
- Libby, P. «Inflammation in atherosclerosis.» *Nature* 2002, 420: 868-74.
- Lin, C.-E., Garvey DS, Janero DR, Letts LG, Marek P, Richardson SK, Serebryanik D, Shumway MJ, Tam SW, Trocha AM, Young DV. *J. Med. Chem.* 2004, 47: 2276.
- López, G.V., y H. Rubbo. «Novel Synthetic Antioxidants and Nitrated Lipids: From Physiology to Therapeutics Implications.» En *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice – Studies on Cardiovascular Disorders*, de Ajay Shah (from King's College, London) and

Francisco Laurindo (from Heinrich Sauer (from Justus-Liebig Universität), 473-498. New York: Human Press, 2010.

López, Gloria V. «Diseño, síntesis y evaluación biológica de tocoferol-miméticos liberadores de óxido nítrico.» Tesis Doctoral, 2006. Fac. de Química, Udelar, Montevideo, Uruguay.

Meshram, H.M., G.S. Reddy, M.M. Reddy, y J.S. Yadav. *Tetrahedron Lett.* 1998, 39: 4103-4106.

Montalbetti, C.A.G.N., y V. Falque. *Tetrahedron* 2005, 61: 10827-10852.

Ministerio de Salud Pública. «Indicadores básicos de salud, Uruguay 2013.» http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/OPS%20INDICADORES%202013.pdf (último acceso: 11 de Diciembre de 2014).

Murphy, H.C., S.P. Burns, J.J. White, J.D. Bell, y R.A. Iles. *Biochemistry* 2000, 39: 9763-9700.

Murphy, M.E., y E. Noack. *Methods Enzymol.* 1994, 233: 240-250.

O'Donnell, V.B., Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, Darley-Usmar VM, Freeman BA. *Biochemistry* 1997, 36: 15216-15223.

Perrin D.D., A.W.L.F. *Purification of Laboratory Chemicals.* Oxford : Butterworth-Heinemann., 1996.

Pettit, G. R., y S. R. Taylor. *J. Org. Chem.* 1996, 61: 2322-2325.

Prugh, J.D., L.A. Birchenough, y M.S. Egbertson. *Synthetic Communications*, 1992: 2357-2360.

Ragnarsson, U., y L. Grehn. *Acc. Chem. Res.* 1998, 31: 494-501.

Rubbo, H., Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. *J Biol Chem.* 1994, 269: 26066-26075.

Segundo Consenso Uruguayo sobre Dislipemias . «Sociedad Uruguaya de Cardiología.» 21 de Enero de 2005. <http://www.suc.org.uy/pdf/Consenso%20Disli.pdf> (último acceso: 7 de Agosto de 2014).

Silveira, Rodolfo G. «Síntesis de tionitritos derivados de tocoferol.» Tesina de graduación , 2009. Fac. de Ciencias, Udelar, Montevideo, Uruguay.

Soulère L., Sturm J.-C., Núñez-vergara L.J., Hoffmann P., Périé J. *Tetrahedron* 2001, 57: 7173-7180.

Steinberg, D., Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. *N. Engl. J. Med.* 1989, 320: 915-24.

Tsantili-Kakoulidou A., Antoniadou-Vyza A. *J.Chromatogy.* 1988, 445: 317-326.

Valeur, E., y M. Bradley. *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38: 606-631.

Wang Q.S., Zhang L. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 1999,22: 1-14.

Williams, D.L.H. *Chem. Soc. Rev.*, 1985,14: 171-196.