UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DISEÑO ASISTIDO POR COMPUTADORA, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA DE DERIVADOS MORFOLÍNICOS DE FENOL

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en F. ANA MARÍA VELÁZQUEZ SÁNCHEZ

Posgrado Ciencias Químicas

TUTOR: Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano

2007

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A Dios, trino y uno, a Santa María Virgen, a mi familia Alfonso, Moisés, Emmanuel, Anita, Gema, Quín y Angie, a mis padres Mechita† y Salvador, a Álvaro, Alma, José y Car y hermanos con amor.

Agradecimientos

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Enrique Ángeles por la dirección y apoyo incondicional para la realización de esta tesis.

Muchas de las observaciones plasmadas en esta tesis se deben a discusiones muy enriquecedoras con los miembros del Comité Tutelar Dr. Rafael Castillo Bocanegra y Dr. Andrés Navarrete Castro, mi más sincera gratitud.

Al Dr. César Compadre, Dr. Jesús Jiménez, Dr. Javier Canales y a los miembros de sus respectivos grupos de investigación que enriquecieron enormemente mi formación. De igual manera, agradezco al Dr. José Luis Medina por su invaluable guía para adentrarme en el campo de diseño de fármacos asistido por computadora y para la realización de este trabajo.

Agradezco a la M. en C. Hilda Santillán Vargas cuyas ideas y apoyo en el trabajo computacional fueron muy importantes para desarrollar los estudios teóricos de los compuestos LQM – 300. También de manera especial a la M en C. Brígida Camacho por su ayuda en la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear.

Agradezco profundamente el apoyo constante en el trabajo experimental a Luis Alberto Torres y Adrián Pecina.

A la Dra. Adriana Ganem Rondero y al Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa miembros del Comité Tutelar Ampliado, por sus valiosas observaciones.

Al Dr. Manuel Soriano García, Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Dr. Roberto Martínez, Dr. Arturo Rojo Domínguez, Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa, Dr. Andrés Navarrete Castro y Dr. Francisco Hernández Luis, miembros del Jurado, quienes revisaron y enriquecieron este manuscrito.

Mi más profunda gratitud al MI. Alfonso Ramos Anastasio que pacientemente escuchó día a día los resultados de este trabajo y los enriqueció con sus comentarios. A toda mi familia por su amor, paciencia y apoyo incondicional siempre y a mis amigos Luis Alberto Torres, Adrián Pecina, Graciela Martínez, Memo Rodríguez, Antonio García, Victoria Hernández, Porfirio García, Hilda Santillán, Roberto

Hernández, Brígida Camacho, Miguel Ángel Balboa, Víctor Vázquez, Víctor Ábrego, y a todos aquellos que me obsequiaron con su solidaridad constante.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la DGAPA por el financiamiento y apoyo de beca honoraria para realizar los estudios de doctorado. Agradezco a la Coordinación del Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo económico para realizar estancias de investigación.

Al Sr. Draucin Jiménez Celi, responsable del taller de soplado de vidrio de la FESC, por su apoyo en la construcción del equipo de vidrio empleado para el desarrollo de parte de esta tesis y al Ing. Fernando Sotres por el apoyo técnico en el arreglo del espectrofotómetro UV-Vis, muchas gracias.

Agradezco a los proyectos PAPIIT IN213606 e IN207705 y a la Cátedra IN 1-11 de la FESC por financiar parte de esta investigación.

El trabajo realizado forma parte de una colaboración entre los investigadores Dr. Enrique Ángeles Anguiano, MC. Brígida Camacho y MC. Hilda Santillán Vargas (grupo de Química Medicinal de la FESC), Dr. José Luis Medina Franco (grupo del Dr. Rafael Castillo), Dra. María de Jesús Rosales e Ing. Marco Antonio Leyva (laboratorio de Rayos X del CINVESTAV), MC. Rosa Isela del Villar, MC. Oscar Yánez y MC. Georgina Duarte (del USAI), Dra. Luisa Martínez (del laboratorio de Farmacología del Miocardio de la FESC), Dr. César Compadre (de la Universidad de Arkansas) y Dr. Jesús Jiménez Barbero (del CIB del CSIC), reflejando la importancia del trabajo interdisciplinario para el desarrollo de fármacos.

Índice

Resumen i

Abstract iii

Abreviaturas v

Introducción 1

1. Antecedentes

1.1. Enfermedades cardiovasculares 5
1.2. Hipertensión arterial 5
1.3. Arritmias cardiacas 6
1.4. Changrolina como antiarrítmico 8
1.5. Estudios de fármacos con efectos antihipertensivos y antiarrítmicos en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán 9
1.6. Diseño de fármacos asistido por computadora 10
1.7. Diseño basado en la estructura del receptor 15
1.8. Diseño basado en la estructura del ligando 16

2. Objetivos 23

3. Metodología

3.1. Síntesis de 27 compuestos derivados morfolínicos y tiomorfolínicos de fenol empleando dos fuentes diferentes de energía para la reacción 25
3.2. Caracterización espectroscópica 26
3.3. Estudios teóricos 28
3.4. Determinación de descriptores 30
3.5. Estudios preliminares de la actividad biológica 33
3.6. Observación previa para el análisis comparativo de los campos moleculares 35

4. Resultados y discusión

Síntesis, caracterización, estudio teórico y determinación de descriptores fisicoquímicos de los compuestos de la serie LQM-300

4.1. Síntesis de los compuestos derivados metil-il-morfolín y metil-il-tiomorfolín fenoles, empleando los métodos sustitución electrofílica aromática y reacción de Mannich 41

4.2. Caracterización espectroscópica de los compuestos sintetizados 44

4.3. Estudios teóricos de los compuestos derivados metil-il-morfolín y metil-il-tiomorfolín fenoles 49

4.3.1. Análisis conformacional 49

4.3.2. Optimizaciones geométricas empleando métodos PM3, *ab initio* y DFT 57

4.3.3. Validación del método teórico 60

4.4. Determinación de algunos descriptores fisicoquímicos de los compuestos en estudio 64

Evaluación preliminar de la actividad biológica

4.5. Evaluación preliminar de la actividad biológica 72

4.5.1. Evaluación preliminar de la actividad biológica en el modelo de rata normotensa anestesiada 72

4.5.2. Evaluación preliminar de la actividad biológica en el modelo de rata consciente hipertensa espontánea 78

Estudio QSAR-3D (CoMFA) preliminar

4.6. Estudio QSAR-3D (CoMFA) preliminar 80

4.6.1. Evaluación preliminar de la relación entre la disminución de la frecuencia cardiaca y la estructura de los compuestos LQM-300 empleando la metodología CoMFA 80

5. Conclusiones 88

Referencias bibliográficas 90

Anexo

Publicaciones

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio 11 de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del

Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano.

Durante los estudios de doctorado se realizaron estancias de investigación, en orden cronológico: en la Universidad de Drew, a la 18th Residential School on Medicinal Chemistry, en la ciudad de New Jersey, Estados Unidos. En la Universidad de Arkansas bajo la dirección del Dr. César Compadre y en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Madrid, España, bajo la dirección del Dr. Jesús Jiménez Barbero.

Lista de figuras

Figura 1.4.1.	Regiones de la changrolina.	8
Figura 1.5.1.	Primeros compuestos sintetizados en la FESC.	9
Figura 1.61.	Métodos generales del DiFAC y su integración en el diseño racional de fármacos.	15
Figura 3.1.1.	Reacciones SEA y SEA_BM.	25
Figura 3.4.2.1.1.	Metodología experimental para la determinación de Log P.	31
Figura 3.4.2.2.1.	Metodología experimental para la determinación de pKa.	32
Figura 3.5.1.	Metodología empleada para determinar la actividad antihipertensiva y/antiarrítmica de los compuestos LQM-300's en el modelo de rata anestesiada.	33
Figura 3.5.2.	Metodología empleada para determinar la actividad antihipertensiva y/antiarrítmica de los compuestos LQM-300's en el modelo de rata hipertensa espontánea consciente.	34
Figura 3.6.1.	Metodología para el desarrollo de CoMFA (primera etapa).	35
Figura 3.6.2.	Metodología para el desarrollo de CoMFA (segunda etapa).	36
Figura 4.2.4.	Resultado del análisis por difracción de rayos X del compuesto LQM-309.	44
Figura 4.3.1.1.	Enlaces rotables de los LQM-300's.	45
Figura 4.3.1.2.1.	Gráfica de energía potencial respecto a la rotación del enlace rotable 4.	47
Figura 4.3.1.2.2.	Gráfica de energía potencial, del confórmero *cis*.	48
Figura 4.3.1.2.3.	Vista desde el plano del fenol de los rotámeros *cis* y *trans*.	49
Figura 4.3.1.2.4.	Diferencias entre los confórmeros *cis*.	49
Figura 4.3.1.2.5.	Energía y estructura del confórmero *trans*.	50
Figura 4.3.1.2.6.	Energía y estructura del confórmero intermediario entre el *cis* y el *trans*.	51
Figura 4.3.1.2.7.	Estructuras resultado del análisis de rayos X, LQM - 309 y LQM – 321.	52
Figura 4.3.2.1.	Optimización con DFT sin difusión.	58
Figura 4.3.2.2.	Comparación de la estructura obtenida por el método DFT (B3lyp/6-31g) con la estructura obtenida por análisis de rayos X del LQM – 318.	58

Figura 4.3.2.3.	Comparación de la estructura obtenida por el método HF (6-31g) con la estructura obtenida por análisis de rayos X del LQM – 318.	59
Figura 4.4.2.2.1.	Gráfica de movilidad efectiva en función de pH.	64
Figura 4.4.2.2.2.	Determinación de los valores de pKa del compuesto LQM-305.	65
Figura 4.6.1.1.	Análisis de los resultados.	83
Figura 4.6.1.2.	Diseño del nuevo compuesto.	84
Figura 4.6.1.3.	Predicción de la actividad antiarrítmica del compuesto LQM-319.	85
Figura 4.6.1.4.	Diseño de otro compuesto nuevo y predicción de su actividad biológica.	86

Lista de tablas

Tabla 1.2.1.	Clasificación de la presión sanguínea.	6
Tabla 1.3.1.	Clasificación de los fármacos antiarrítmicos.	7
Tabla 1.6.1.	Ejemplos de fármacos comerciales desarrollados con la ayuda de métodos computacionales.	13
Tabla 4.1.1.	Propiedades de los reactivos del producto, rendimiento y método de obtención del compuesto LQM – 304.	37
Tabla 4.1.2.	Resumen de rendimientos, tiempos de reacción y metodologías de síntesis.	38
Tabla 4.1.3.	Datos de tiempo de reacción y rendimientos de reacción.	39
Tabla 4.2.1.	Datos del cristal y de los parámetros de colección.	44
Tabla 4.3.1.1.1.	Número de confórmeros en función del ángulo de rotación de los enlaces rotables.	46
Tabla 4.3.1.2.1.	Datos energéticos de los confórmeros cis, trans e intermediario.	51
Tabla 4.3.2.1.	Descriptores de 12 moléculas optimizadas por el método PM3.	53
Tabla 4.3.2.2.	Datos geométricos de 12 moléculas optimizadas por el método PM3.	53
Tabla 4.3.2.3.	Descriptores de 12 moléculas optimizadas por el método HF-631g.	54
Tabla 4.3.2.4.	Datos geométricos resultado del método HF-631g.	54
Tabla 4.3.2.5.	Descriptores de 12 moléculas optimizadas por el método DFT.	55
Tabla 4.3.2.6.	Datos geométricos de 12 moléculas optimizadas por el método DFT.	55
Tabla 4.3.3.1.	Comparación de longitudes de enlace para la molécula del LQM-318.	56
Tabla 4.3.3.2.	Valor absoluto de la diferencia de las longitudes de enlace calculadas.	57
Tabla 4.4.1.1.	Descriptores obtenidos del cálculo teórico HF_6-31g.	60
Tabla 4.4.2.1.	Longitud de onda de absorción máxima.	61
Tabla 4.4.2.2.	Absorbancias de las soluciones en *n* – octanol del compuesto LQM – 307 tanto en la curva de calibración como en las muestras.	62

Tabla 4.4.2.3.	Resultados de Log P.	62
Tabla 4.4.2.2.1.	Tiempos de migración promedio.	63
Tabla 4.4.2.2.2.	Movilidad efectiva del LQM – 305.	64
Tabla 4.4.2.2.3.	Valores de pKa experimentales determinados por electroforesis capilar y calculados.	66
Tabla 4.5.1.1.	Resumen de los efectos de los compuestos y los controles sobre la presión arterial media, sistólica, diastólica y frecuencia cardiaca.	72
Tabla 4.5.1.2.1. a y b	Respuesta de algunos compuestos en la frecuencia cardiaca.	75
Tabla 4.5.1.2.2.	Decrementos de la frecuencia cardiaca.	76
Tabla 4.5.1.2.3	Datos empleados para el desarrollo de CoMFA.	77
Tabla 4.5.2.1.1.	Respuesta biológica de algunos compuestos LQM-300.	78
Tabla 4.6.1.1.	Resultados de los métodos desarrollados en CoMFA.	82
Tabla 4.6.1.2.	Resultados de la evaluación biológica y por ciento de error relativo de la predicción.	87

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud mundial. Dentro de ellas figura la hipertensión arterial. Este término médico se emplea para referirse al aumento de la presión arterial sistólica, de la presión arterial diastólica o ambas. La hipertensión arterial es una enfermedad silenciosa ya que la mayoría de las personas que la padecen lo ignoran. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que el 1.7% de la población mundial padece esta enfermedad.

La hipertensión es un factor de riesgo importante para otras enfermedades cardiovasculares tales como enfermedades coronarias, enfermedades en vasos y arterias, neurisma aórtico, accidentes vasculares cerebrales, etc. Las arritmias cardiacas también son un problema cardiovascular que se presenta con frecuencia y son factores de riesgo de los accidentes vasculares cerebrales, los cuales fueron causas de muerte de 5.5 millones de personas de un total de 16.7 millones en 2002 en todo el mundo. El término médico arritmia se emplea para referirse a trastornos del ritmo cardiaco. Éstos pueden deberse a una condición congénita o pueden desarrollarse si parte del tejido muscular del corazón (miocardio) se irrita o se daña.

Por todo lo expuesto anteriormente, esta investigación está dirigida a proponer nuevos compuestos que muestren efecto hipotensor y disminución de la frecuencia cardiaca y si es posible presenten menos efectos secundarios.

Para esto se sintetizaron 27 compuestos derivados il-metilmorfolínfenol e il-metiltiomorfolínfenol empleando los métodos de sustitución electrofílica aromática y sustitución electrofílica aromática vía base de Mannich. Estos compuestos se caracterizaron espectroscópicamente y se obtuvo la difracción de rayos X de cuatro de ellos. Así mismo se compararon los mismos métodos de síntesis empleando dos formas de transferencia de energía, reflujo en condiciones normales y radiación infrarroja en ausencia de disolvente. Esta última mejoró el rendimiento de las reacciones y disminuyó el tiempo de reacción en todos los casos.

Se llevó a cabo el análisis conformacional de cada una de las estructuras de los compuestos LQM-300 para obtener la gráfica de energía potencial vs número de confórmeros y encontrar el rotámero de mínima energía, de cuya estructura se partió para efectuar la optimización geométrica empleando métodos de química cuántica.

Los métodos empleados fueron semiempíricos (PM3), *ab initio* y funcionales de la densidad para caracterizar estructural y energéticamente los compuestos sintetizados. Se validó el método que mejor describe las estructuras encontradas por difracción de rayos X de algunos compuestos.

Se determinaron algunos de los descriptores teóricos que caracterizan las estructuras optimizadas de los compuestos en estudio y se obtuvieron experimentalmente algunos valores de pKa y log P, se discute la pertinencia de la determinación experimental de estos descriptores.

Los compuestos estudiados mostraron actividad hipotensora y de disminución de la frecuencia cardiaca al administrarlos vía intravenosa a ratas en un modelo farmacológico de rata anestesiada; la actividad como antihipertensivos se comparó tomando como controles positivos a captopril, losartán y omapatrilat. La actividad antiarrítmica se comparó tomando como control positivo el propranolol. Después de evaluar las actividades antihipertensiva y antiarrítmica en un modelo de todo o nada se realizaron los experimentos en el modelo de rata hipertensa espontánea (SHR, por sus siglas en inglés) administrando los compuestos vía oral a una sola dosis y observando los cambios de presión tanto sistólica como diastólica, así como el cambio de frecuencia cardiaca cada 10 minutos durante 2.0 horas, solamente se indican los resultados que fueron tomados para CoMFA y la evaluación final de los compuestos diseñados.

Se realizó una observación previa para los estudios cuantitativos de relación estructura química - actividad biológica (QSAR) en tres dimensiones (QSAR-3D) o CoMFA, se discutirán los resultados y se presentan dos moléculas que se diseñaron a partir del CoMFA con sus actividades biológicas.

Abstract

The cardiovascular diseases are serious health problem in the world. An example of cardiovascular disease is the arterial hypertensive heart disease. WHO reported that 1.7% of the world population suffer from this sickness.

Hypertension is defined as the increase of systolic pressure, diastolic pressure or a combination of these. High blood pressure is a silent disease, because it does not show evident symptoms, this is a reason why many people do not know they suffer from it. Hypertension is an important risk factor that contributes to other cardiovascular diseases such as blood vessel disorders, coronary heart disease, aortic aneurysm, stroke, etc.

Cardiac arrhythmia is also a cardiovascular problem. An arrhythmia is any disorder of the heart rate or rhythm. It may cause stroke. In 2002, 5.5 million people were killed by strokes out of a population of 16.7 million. Heart rhythm disorders may be caused by genetic factors or when the heart muscle (myocardium muscle) is damaged, by hypertension inclusively.

Because of the reasons stated above, this work was held so as to design new compounds LQM-300 series, that may decrease high blood pressure, however they also had effects in cardiac frequency. In addition to this, we hope that they show the least secondary effects. With these compounds we are compiling the training and test set for the Aid Computer Design Study

The studied compounds were 27 derivates of methyl-yl-morpholin and of methyl-yl-thiomorpholin phenol. Such compounds were synthesized by electrophilic aromatic substitution (EAS) and in “one-pot” transformation by Mannich reactions. The chemical structures of the compounds were proved by IR, ^{1}HNMR, ^{13}CNMR and MS spectroscopic data. The X-Ray diffraction data were proved only for 4 compounds.

The EAS reactions were made at reflux in the presence of solvents. The Mannich synthesis was made by using infrared light irradiation being solvent free. This last reaction increased the product yield and decreased the reaction time, in all cases.

Different computational methods were used to optimize geometry and to determine the energy of the compounds’ structures in study.

First, conformational analysis was held to develop a structure with the least energy for each compound by means of a graph of potential energy versus rotational angle. The least energy structure was used as the initial geometry by the semiempirical and quantum chemistry methods. Besides this, Hartree – Fock and Funtional Density methods were also employed.

The theoretical method that described the structures of some compounds better, was validated by X-ray diffraction.

Then, some theoretical descriptors were calculated from the optimized geometry. Experimental descriptors like Log P an pKa were determined too.

These compounds showed antihypertensive and antiarrhythmic activity in a pharmacological model of anaesthetized rats. The positive controls were Captopril, losartán, and omapatrilat by intravenously administration for the antihypertensive studies. The antiarrhythmic activity was compared with propranolol. The administration of the compounds was intramuscular in the same model of anaesthetized rats.

Thus, the effect of the compounds on the arterial pressure and cardiac frequency was studied in a pharmacological model of spontaneous hypertensive rat by oral administration, every 10 minutes during 2.0 hours. The LQM – 300 demonstrated good activity.

Preliminary Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) was developed. Antiarrhythmic activities and molar refractivity were used in the molecular spreadsheet. Therefore two molecules were designed, showing good calculated and experimental biological activities. Possible causes of the differences between the experimental and predicted activities are discussed.

Introducción

El diseño racional de fármacos es un proceso complejo, que requiere un tiempo vasto y que necesita la participación de diversas disciplinas para encontrar a un nuevo líder, optimizarlo y desarrollarlo hasta su aprobación para emplearlo como medicamento en el tratamiento de una enfermedad. Una de las muchas estrategias del diseño racional de fármacos es el diseño asistido por computadora. Esta estrategia es actualmente una herramienta muy poderosa para el descubrimiento de moléculas biológicamente activas (Boyd, 1999; Wlodawer, 2002; Waterbeemd y Gifford, 2004).

Los métodos modernos del diseño de fármacos asistido por computadora se pueden agrupar en dos categorías: métodos basados en el estudio del ligando y métodos basados en el estudio del receptor (Tropsha y Zheng, 2001). Los primeros, incluyen los estudios de relación estructura-actividad cuantitativos, métodos de asignación del farmacóforo y búsqueda sistemática en bases de datos. Se fundamentan en estudios de relación estructura-actividad experimentales de ligandos o inhibidores enzimáticos. La aplicación de estos métodos en las últimas tres o cuatro décadas ha dado origen a varios fármacos que actualmente están en el mercado como el captopril y el losartán.

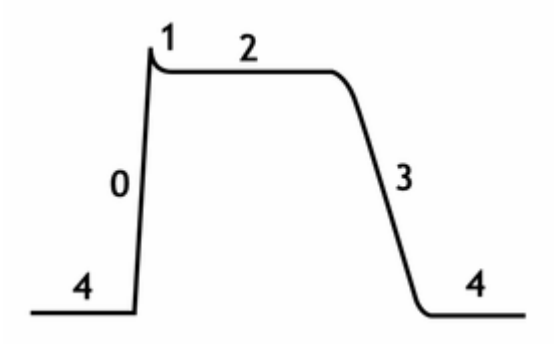
En nuestro país es necesario hacer esfuerzos conjuntos interdisciplinarios y metodológicamente sustentados para el descubrimiento de compuestos antihipertensivos y antiarrítmicos, ya que, la Secretaría de Salud registró que dentro de las principales causas de mortalidad durante 2005 están: las enfermedades isquémicas del corazón: 10.8%, las enfermedades cerebrovasculares: 5.5%, las enfermedades hipertensivas: 2.6% (SSA, 2005). Cabe mencionar que las enfermedades isquémicas del corazón y cerebrovasculares están relacionadas también con la hipertensión y las cerebrovasculares con las arritmias cardiacas. En todos los casos se trata de atender problemas de salud pública mundial de acuerdo con lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La amplia

información experimental que se ha generado en cada caso ofrece la posibilidad de aplicar diversos métodos computacionales en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

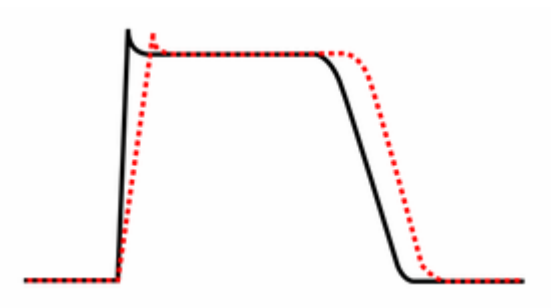
En cuanto a la investigación y desarrollo de compuestos antihipertensivos se cuenta con información de los avances que a la fecha se han tenido para diseñar fármacos que actualmente se emplean como medicamentos, en 1975 Ondetti realizó un diseño basado en el receptor para encontrar captopril, antihipertensivo inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, en 1990 Duncia mediante el modelado molecular y QSAR desarrolló losartán, antihipertensivo antagonista del receptor de angiotensina II, en 1991 y 1993 Weinstock y Keenan diseñaron mediante el modelado molecular eprosartán otro antagonista del receptor de angiotensina II; actualmente se han incrementado las investigaciones sobre el sistema renina - angiotensina de los compuestos que han denominado sartanes, así como los estudios de caracterización de los receptores AT_1 y AT_2 de angiotensina (Mavromoustakos et al., 2004).

Los fármacos antiarrítmicos corrigen alteraciones en la generación y conducción del impulso eléctrico en el miocardio. En su mayor parte, sus propiedades antiarrítmicas se descubrieron dentro de los efectos secundarios observados en su aplicación primaria como antipalúdicos, anticonvulsivos o anestésicos locales. Casi todos los fármacos antiarrítmicos tienen un nitrógeno básico que puede formar sales o bien actuar como nitrógeno cuaternario, y es necesario que exista un grupo o grupos aromáticos en su estructura, capaces de intercalarse con fosfolípidos, una cadena alquílica de conexión en la que existan grupos funcionales capaces de asociarse por enlaces de hidrógeno y un grupo amino ionizable a pH fisiológico. Unos fármacos antiarrítmicos actúan por bloqueo de los canales de sodio, otros bloqueando los receptores β-adrenérgicos y antagonizan los efectos de las catecolaminas en el tejido cardiaco, los del grupo III bloquen la salida de potasio, prolongando la duración del potencial de acción de la membrana y los del IV bloquean los canales de calcio. A pesar del gran número de fármacos antiarrítmicos que se conocen actualmente no existe un tratamiento satisfactorio y es necesario el desarrollo de agentes de larga

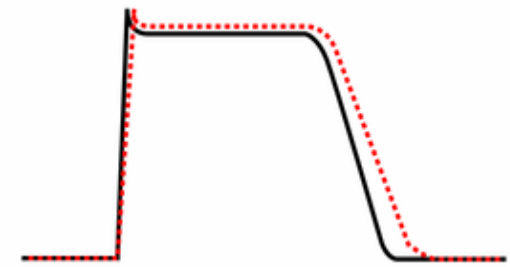
duración que sean activos por vía oral o que posean menores efectos secundarios (Lorenzo et al., 2005).



Esquema de un potencial de acción cardíaco



Antiarrítmicos de clase Ia incrementan la duración del potencial de acción cardíaco.



Efecto en el potencial de acción de un agente antiarrítmico de clase III.

Entre 1983 y 1985 Stout y colaboradores estudiaron las propiedades antiarrítmicas de la changrolina, encontrando que la estructura de un 2,6-bis (pirrolidín-1-il-metil)fenol tetrasustituido presentó la mejor actividad antiarrítmica. En 1991 Glôwka y colaboradores confirman lo establecido anteriormente y además afirman que existe un puente de hidrógeno intramolecular entre el hidrógeno del grupo hidroxilo del fenol y el nitrógeno no protonado de uno de los anillos pirrolidínicos. En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, se propuso sustituir los grupos pirrolidínicos por otros heterociclos como morfolina, tiomorfolina y piperidina, encontrando que la serie de entrenamiento iniciada con siete compuestos, por Martínez Trejo, en su tesis de maestría, (Martínez, 2003) tenían propiedades no solo antiarrítmicas sino antihipertensivas en el modelo de rata anestesiada, lo cual

confirmó lo que inició Stout en 1985 al incluir también piperidina y morfolina en la estructura de las moléculas estudiadas (Stout et al., 1985).

Por todo lo anterior en este trabajo se incrementó la serie de estudio con la síntesis y caracterización espectroscópica de 27 compuestos derivados morfolínicos y tiomorfolínicos de fenol, de ellos 25 formaron la serie de entrenamiento y dos de ellos son resultado del diseño de fármacos obtenido del estudio CoMFA, se optimizaron geométricamente las estructuras de los compuestos empleando métodos de mecánica molecular y química cuántica, así mismo se determinaron sus energías, se determinaron teóricamente algunos descriptores de las moléculas, experimentalmente se determinaron los Log P y pKa de algunos de los compuestos que forman parte de la serie de entrenamiento de los compuestos denominados LQM-300 y se estudiaron sus respuestas biológicas tanto en el modelo de rata normotensa anestesiada como en el de rata hipertensa espontánea (SHR, por sus siglas en inglés Spontaneously Hypertensive Rats).

Se aplicó un método usado actualmente en el diseño de fármacos asistido por computadora, CoMFA, como herramientas para encontrar dos compuestos que fueron viables en sus respuestas biológicas como hipotensores y reductores de la frecuencia cardiaca.

La estructura de la tesis está conformada por cinco capítulos, en el primero se incluyen los conceptos básicos para el desarrollo del proyecto, en el dos los objetivos. Posteriormente se presentan la metodología de cada parte del proyecto y los resultados y discusión de los mismos, los cuales, conforman los capítulos tres y cuatro. Finalmente se encuentran las conclusiones y las referencias bibliográficas.

1. Antecedentes

A continuación se presentan la problemática mundial y nacional de las enfermedades cardiovasculares, que muestra la importancia de seguir contribuyendo con la investigación en este campo, los conceptos básicos para el desarrollo del proyecto y como se ha llevado a cabo el estudio de estos compuestos.

1.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud mundial. La organización mundial de la salud (OMS) en 2002, reportó como principales causas de mortalidad en el mundo: enfermedades isquémicas del corazón: 12.4%**,** enfermedades de accidentes cerebro vasculares: 9.2%, hipertensión arterial: 1.7% (OMS, a, b). En 1996, en la comunidad económica Europea Murrat informó que el 5.8% de la población falleció debido al padecimiento de hipertensión (Murrat, 1996). En Estados Unidos, la FDA en abril de 2006, publicó que 65 millones de adultos (cerca de 1 de 3) padecen hipertensión arterial (FDA, 2006).

En México, la Secretaría de Salud indicó que en el año 2005 algunas de las causas de mortalidad y el porcentaje de la población fallecida fueron: enfermedades isquémicas del corazón con el 10.8%, enfermedades de accidente cerebro vasculares con el 5.5%, enfermedades de hipertensión arterial con el 2.6% (SSA, 2005).

Las prospectivas para el futuro indican que el porcentaje de muertes totales por enfermedades cardiovasculares para los años 2010, 2020 y 2030 serán 30.8%, 31.5% y 32.5% respectivamente (OMS, c), estos datos refuerzan la propuesta de seguir contribuyendo con conocimientos en la investigación en este campo

1.2. Hipertensión arterial

La hipertensión arterial se define como el aumento de la presión arterial. La presión arterial es el producto del gasto cardiaco y la resistencia vascular periférica.

La hipertensión genera cambios patológicos en la vasculatura e hipertrofia del ventrículo izquierdo del corazón, por tanto, es la principal causa de apoplejía, que produce enfermedad coronaria con infarto de miocardio, insuficiencias cardiaca y renal, aneurisma disecante de la aorta y muerte repentina de origen cardiaco (Oates y Brown, 2001).

En la Tabla 1.2.1 se muestra la clasificación de la presión sanguínea y los rangos de la presión sistólica y diastólica en los que la presión sanguínea se considera normal y los intervalos en donde se inicia la categoría de hipertensión.

Tabla 1.2.1. Clasificación de la presión sanguínea*

CATEGORÍA	PRESIÒN SISTÓLICA (mmHg)	PRESIÓN DIASTÓLICA (mmHg)
NORMAL	< 120	< 80
PREHIPERTENSIÓN	120 - 139	80 - 89
HIPERTENSIÓN		
ETAPA 1	140 -159	90 - 99
ETAPA 2	> 160	> 100

***FDA**

Los fármacos antihipertensivos que se emplean actualmente se clasifican en: diuréticos, simpaticolíticos, vasodilatadores, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA-II) (Oates y Brown, 2001; Lorenzo et al., 2004).

1.3. Arritmias cardiacas

La arritmia cardiaca se refiere a los trastornos en el ritmo cardiaco. De manera general las arritmias pueden clasificarse en taquiarritmias (aumento anormal de la frecuencia cardiaca acompañada o no de irregularidad del ritmo cardiaco) y

bradiarritmias (disminución anormal de la frecuencia cardiaca acompañada o no de irregularidad del ritmo cardiaco) (Lorenzo et al., 2004).

Los fármacos antiarrítmicos se dividen en cuatro grupos o clases siguiendo la clasificación de Vaughan Williams, mostrada en la Tabla 1.3.1.

Tabla 1.3.1. Clasificación de los fármacos antiarrítmicos

Grupo I Bloqueadores de los canales de sodio	Grupo II Antagonistas de receptores β – adrenérgicos	Grupo III Bloqueadores de los canales de potasio	Grupo IV Bloqueadores de los canales de calcio	Otros
IA Quinidina Procainamida Disopiramida	Acebutolol Bisoprolol Metoprolol propranolol	Amiodarona Sotalol	Verapamilo Diltiacem	Adenosina Digoxina
IB Lidocaína Mexiletina				
IC Propafenona Flecainida				

La adenosina es un nucleósido que actúa como agonista de los receptores A_1 cardiacos, los cuales están acoplados a proteínas G, esto activa la corriente de salida de potasio estimulada por acetilcolina y/o adenosina. La digoxina disminuye la velocidad de conducción y prolonga el período refractario del nódulo AV por un doble mecanismo: por aumento del tono vagal y por su efecto directo sobre las células del nódulo AV.

Los antiarrítmicos por lo general suprimen las arritmias al bloquear el flujo a través de canales de iones específicos o alterando la función del sistema nervioso autónomo (Roden, 2001; Lorenzo et al., 2004).

1.4. Changrolina como antiarrítmico

Stout y su grupo de investigación llevaron a cabo el estudio de la changrolina como un antiarrítmico efectivo. Esta molécula presentaba una diferencia estructural con los antiarrítmicos comúnmente conocidos hasta esa fecha. Para el análisis de la actividad biológica dividieron la estructura en tres regiones, como se muestra en la Figura 1.4.1, la I, denominada heteroaromática, consiste en la estructura de quinazolina, la II llamada aromática, posee el esqueleto de 2,6-bis(pirrolidín-1-il-metil)fenol y la III reconocida como la región de unión entre las dos anteriores. Su investigación consistió en modificar sistemáticamente cada una de ellas para determinar que parte de la molécula era necesaria para mostrar la actividad antiarrítmica (Stout et al., 1983).

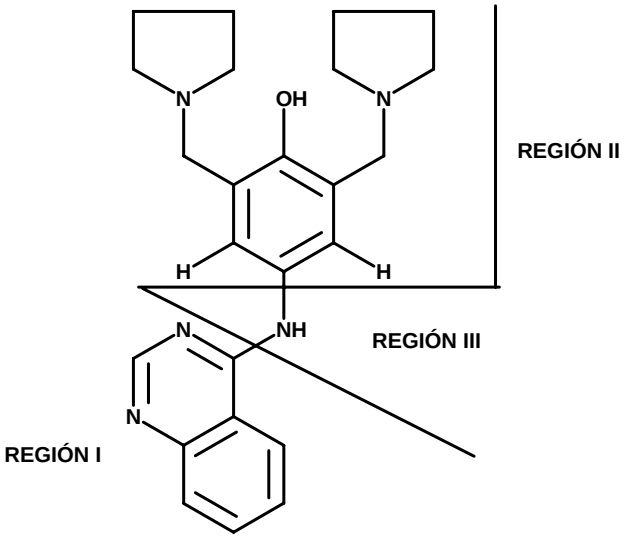


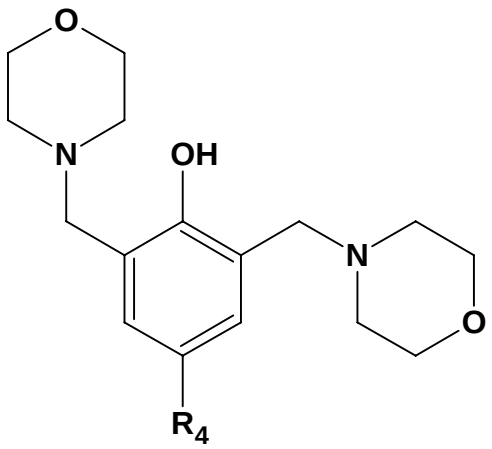
Figura 1.4.1. Regiones en la Changrolina

Las conclusiones obtenidas fueron: en la región I, la quinazolina puede remplazarse por una gran variedad de heterociclos sin perder la actividad antiarrítmica. En la II, el esqueleto de 2,6-bis(pirrolidín-1-il-metil)fenol tetrasustituido presentó la mejor actividad y sin éste la actividad es nula y en la III, si se incluyen grupos carbonilos la actividad aumenta y la toxicidad disminuye (Stout et al., 1985).

Glôwka y colaboradores, retoman esta investigación y concluyen entre otras cosas que: existe un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo hidroxilo del fenol y el nitrógeno no protonado de uno de los anillos pirrolidínicos lo que le proporciona una estabilidad a la molécula y le permite actuar como monoamina, característica que se encontró en otros antiarrítmicos como la disopiramida, antiarrítmico de clase I, a (Glôwka et al., 1991).

1.5. Estudios de fármacos con efectos antihipertensivos y antiarrítmicos en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

El grupo de Química Medicinal de la FESC retoma las investigaciones mencionadas anteriormente, proponiendo el estudio de compuestos, análogos a la changrolina, en los cuales los grupos pirrolidínicos se sustituyan por morfolina, tiomorfolina y piperidina. Martínez Trejo y colaboradores, realizaron la síntesis y caracterización de siete compuestos derivados 2,6–bis(morfolín–il-metil)fenol con diferentes sustituyentes en R_4, para ir construyendo una serie de entrenamiento. La Figura 1.5.1 muestra los compuestos que fueron sintetizados.



R_4 = DHP, t-butil, Cl, Br, NO_2, OCH_3, CN

Figura 1.5.1. Primeros compuestos sintetizados

Estos compuestos mostraron tener no solo actividad antiarrítmica sino también antihipertensiva en el modelo de rata anestesiada normotensa (Martínez, 2003), (12º Congreso Nacional de Hipertensión Arterial, Cd. de México, 2004; V Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química, Habana, 2004).

1.6. Diseño de fármacos asistido por computadora

El diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC) es una área del diseño racional de fármacos (Boyd, 1999) y consiste en aplicar algún procedimiento realizado por una computadora para relacionar la actividad biológica de un compuesto con su estructura (Hopfinger, 1985).

Los objetivos principales del DiFAC son tres: descubrir nuevos líderes, optimizar a los líderes existentes y seleccionar, de un grupo de moléculas, a los candidatos que tienen mayor o menor probabilidad de convertirse en fármacos exitosos. Estos objetivos se cumplen si, antes de cualquier prueba de laboratorio, se puede predecir adecuadamente la propiedad biológica o farmacológica de interés. De esta manera, un cálculo computacional puede ayudar a descubrir y diseñar estructuras químicas que tengan las propiedades que las puedan calificar para entrar en el proceso de desarrollo de un fármaco (Boyd, 1998).

Los sistemas biológicos son tan complejos que en el proceso del diseño de fármacos con la ayuda de un equipo de cómputo deben asumirse varias cosas (Balbes et al., 1994):

a) Compuestos similares, con una actividad biológica en común, se unen en el mismo sitio receptor. Si ocurre que compuestos con la misma actividad farmacológica actúan en sitios diferentes, los resultados del cómputo serán erróneos y los experimentos *in vitro*, cobran un interés relevante.

b) Para simplificar los modelos, se asume en general que tanto el ligando como el receptor interaccionan en una sola conformación. En realidad, tanto el ligando como la

macromolécula están experimentando continuamente cambios conformacionales, los cuales en general, favorecen la estabilidad del complejo fármaco - receptor.

c) Usualmente se aproxima o en algunos casos se ignora el medio: disolvente, iones, impurezas. Para que los cálculos sean más reales, se deberían considerar moléculas de agua explícitas rodeando tanto al ligando como a la macromolécula. Desgraciadamente, esto complica los cálculos. Se han desarrollado diferentes métodos para manejar el problema de la solvatación. Una forma común de manejar este problema es concentrarse en las diferencias entre sistemas similares. Asumiendo que el efecto del disolvente afectará a cada sistema por igual, se espera que los errores se cancelen.

d) Los resultados de los estudios biológicos *in vivo* e *in vitro*, con los que se evalúa a un grupo de compuestos, pueden tener un alto grado de incertidumbre. Sin embargo, se asume que la calidad de los datos biológicos es lo suficientemente adecuada para hacer los estudios computacionales.

Desde luego, las predicciones obtenidas con el DiFAC, como en muchas otras disciplinas científicas, deben someterse a pruebas experimentales. Concretamente, las moléculas diseñadas deben someterse a pruebas de actividad biológica, toxicidad, genotoxicidad, especificidad, etc., para que, pasando éstas y otras consideraciones de manufactura y costos de producción, puedan llegar a convertirse en un fármaco aprobado para su uso clínico.

Los orígenes del DiFAC se remontan a los estudios de Corwin Hansch quien, a principios de la década de los 60’s, inició el desarrollo del método de relaciones estructura-actividad cuantitativas (QSAR) (Hansch et al., 1963; Hansch y Fujita, 1964). Los primeros estudios QSAR hicieron uso de varias propiedades fisicoquímicas y descriptores moleculares, basados en la topología química, para derivar modelos que relacionaban la estructura con la actividad biológica.

En los primeros años de la década de los 70's, el DiFAC comenzó a hacer uso de las gráficas moleculares generadas por computadoras. Esto condujo al desarrollo del modelado molecular en tres dimensiones, que puede definirse como la generación, manipulación, cálculo y predicción de estructuras químicas reales y sus propiedades fisicoquímicas y biológicas asociadas (Leach, 2001). La aplicación del modelado molecular en el diseño de fármacos dio origen al primer método tridimensional de asignación del farmacóforo: la estrategia del análogo activo (Martin, 1991). Posteriormente surgió el desarrollo de métodos de búsqueda en bases de datos basados en el farmacóforo y el establecimiento de estudios QSAR en tres dimensiones (QSAR-3D). Un ejemplo de este último es el análisis comparativo de campos moleculares (*Comparative Molecular Field Analysis*, CoMFA) (Cramer et al., 1988).

En la década de los 80's comenzó a crecer el número de aplicaciones de diseño de fármacos que utilizan la información estructural de las macromoléculas biológicas blanco de los fármacos (Tropsha y Zheng, 2001, p. 351).

Actualmente hay un marcado interés en desarrollar métodos computacionales no solamente para descubrir líderes y optimizar a los fármacos ya existentes sino también para la predicción de las propiedades farmacocinéticas ADME/Tox (absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad) de moléculas bioactivas (Waterbeemd y Gifford, 2003).

Desde sus primeras aplicaciones al diseño de fármacos, las herramientas computacionales han contribuido significativamente al desarrollo de fármacos que se han aprobado para su uso clínico. Uno de los primeros casos de éxito lo constituyó el antibacteriano norfloxacina. Estudios QSAR ayudaron al desarrollo de este fármaco que se comercializó por primera vez en 1983 con el nombre de Noroxin® (Boyd, 1999).

Ejemplos de otros fármacos que se han comercializado con la asistencia de métodos computacionales se encuentran resumidos en la Tabla 1.6.1.

Tabla 1.6.1. Ejemplos de fármacos comerciales desarrollados con la ayuda de métodos computacionales

Compuesto	Nombre comercial (compañía farmacéutica)	Uso	Método computacional	Ref.
Norfloxacina	NOROXIN® (Kyorin Pharmaceutical)	Antibacteriano	QSAR	Koga, 1980
Losartan	COZAAR® (DuPont (BMS) Merck)	Tratamiento de hipertensión	Modelado molecular y QSAR	Duncia, 1990
Dorzolamida	TRUSPOT® (Merck)	Tratamiento del glaucoma	Diseño basado en la estructura y cálculos *ab initio*	Baldwin, 1989 Greer, 1994
Nelfinavir	VIRACEPT® (Pfizer)	Tratamiento del SIDA	Diseño basado en la estructura	Kaldor, 1997
Eprosartan	TEVETEN® (Smithkline Beecham)	Tratamiento de la hipertensión	Modelado molecular	Weinstock, 1991 Keenan, 1993
Zolmitriptan	ZOMING® (Wellcome, Zeneca)	Tratamiento de la migraña	Modelado molecular, desarrollo del farmacóforo	Buckingham, 1995
Indinavir	CRIXIVAN® (Merck)	Tratamiento del SIDA	Diseño basado en la estructura	Dorsey, 1994
Captopril IECA	CAPOTEN ® (Bristol-Myers Squibb)	Tratamiento de la hipertensión	Diseño basado en el receptor QSAR	Ondetti, 1975

Además de los fármacos que han llegado al mercado con la asistencia de computadoras, se reportan constantemente casos, por ejemplo en la revista *Journal of Medicinal Chemistry*, en donde el modelado molecular, estudios QSAR o algún otro método del DiFAC, han tenido impacto en el proyecto sugiriendo nuevos líderes potenciales (Charifson y Kuntz, 1997; Wlodawer, 2002).

El empleo de técnicas computacionales para el desarrollo de fármacos se ha visto favorecido por la disponibilidad de equipos de cómputo cada vez más rápidos y más baratos. Así mismo, el número de programas computacionales va creciendo en forma acelerada, en la actualidad existen muchos programas disponibles gratuitamente.

Desde los años noventas, la industria farmacéutica y muchos grupos de investigación alrededor del mundo, incorporaron herramientas computacionales al descubrimiento y desarrollo de fármacos (Balbes et al., 1994; Sippl, 2002; Shen et al., 2004).

Los métodos del DiFAC pueden agruparse en dos áreas principales: métodos basados en la estructura del ligando y métodos basados en la estructura del receptor (Tropsha y Zheng, 2001, p. 351). A los primeros también se les conoce como métodos basados en el farmacóforo (Reddy y Parrill, 1999). Los métodos más comunes que el DiFAC emplea en el descubrimiento y optimización de fármacos, se muestran en la Figura 1.6.1.

La aplicación de algún método basado en la estructura del ligando o basado en la estructura del receptor depende, en primera instancia, si se conoce o no la estructura tridimensional de la macromolécula blanco o receptor (Ooms, 2000). Ya sea que se utilice un tipo de método u otro, la finalidad es la predicción de la actividad biológica, o de alguna otra propiedad farmacológica o fisicoquímica, de una serie de moléculas. La siguiente etapa consiste en sintetizar, si es que no están disponibles, las moléculas seleccionadas como mejores candidatos y realizar las evaluaciones biológicas y/o fisicoquímicas correspondientes. Los resultados de las evaluaciones biológicas y/o fisicoquímicas pueden servir para nuevos diseños (Figura 1.6.1).

Esta serie de etapas tiene como objetivo la generación o selección de nuevos líderes o la optimización de líderes ya existentes. Si, además de conocer la estructura del receptor, se cuenta con información experimental sobre relaciones estructura-actividad para un grupo de moléculas determinadas que se unen al mismo receptor, se pueden combinar técnicas de diseño basado en el receptor y diseño basado en el ligando (Lozano et al., 2000; Sippl et al., 2001; Sippl, 2002).

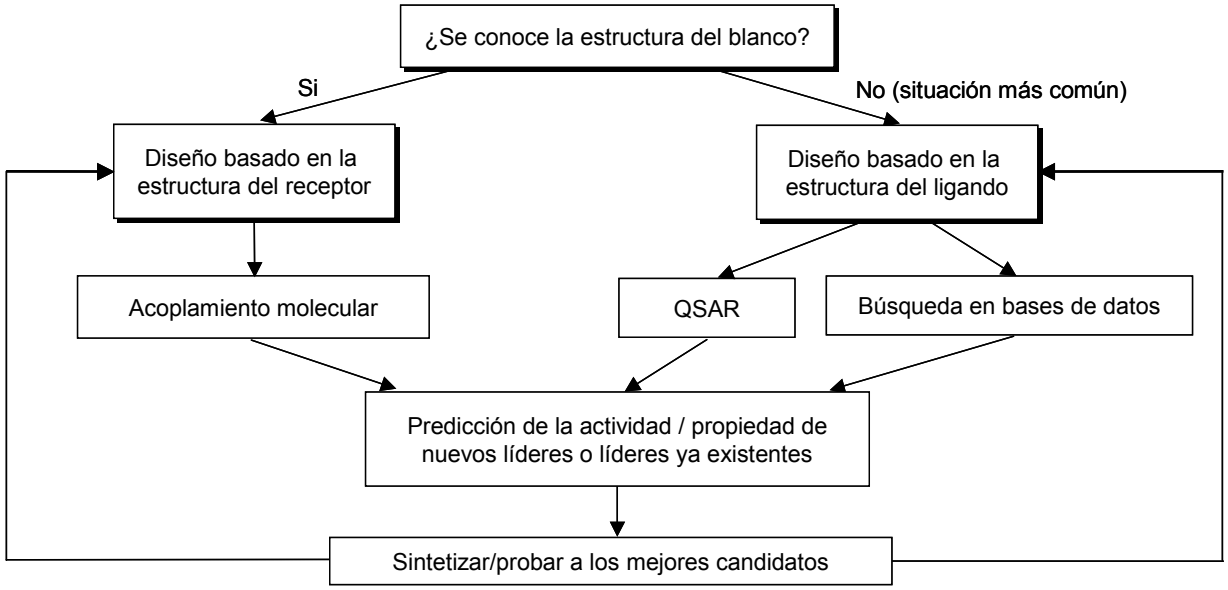


Figura 1.6.1. Métodos generales del DiFAC y su integración en el diseño racional de fármacos. Adaptado de (Reddy y Parrill, 1999)

1.7. Diseño basado en la estructura del receptor

Recientemente se han identificado macromoléculas que juegan un papel importante tanto en procesos metabólicos como en rutas biosintéticas. La estructura de muchas de estas macromoléculas se conoce experimentalmente. De esta manera, se pueden aplicar procedimientos computacionales para identificar o diseñar ligandos que tengan una buena complementariedad química y estérica en algún sitio de la biomolécula, que sea responsable de la actividad biológica. A estos procesos computacionales se les da el nombre de diseño basado en la estructura del receptor (Oshiro et al., 1998).

Actualmente se cuenta con tres fuentes para obtener las estructuras tridimensionales de biomoléculas. Dos de ellas son experimentales: la cristalografía de rayos X y los experimentos de resonancia magnética nuclear, cuyos resultados se concentran en bases de datos como el *Protein Data Bank* (RCSB), la cual, es una base de datos pública que tiene las coordenadas de miles de proteínas obtenidas por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear. La tercera fuente es el

modelado por homología, empleado si no hay datos experimentales para una biomolécula. El modelado por homología (Hillisch et al., 2004) puede proporcionar datos estructurales aproximados si se conoce la estructura de una biomolécula similar.

Una vez que se cuenta con la estructura del receptor, ya sea en forma experimental o en un modelo, hay que buscar una zona en particular de la biomolécula con la cual interaccionará el ligando. Esto reduce significativamente el tamaño de la búsqueda que habrá que hacer posteriormente. Esta zona puede ser, por ejemplo, el sitio activo de una enzima o un sitio alostérico. En algunos casos se conoce este sitio a través de datos de mutaciones u otros experimentos. En algunas ocasiones, la estructura de rayos X de una biomolécula con el ligando indica directamente el sitio de unión de la molécula. En algunos casos, los sitios de unión pueden identificarse por un análisis visual de las estructuras. Cuando no se conocen los sitios de unión, pueden emplearse métodos computacionales que sugieren lugares probables de unión (Hetényi y Van der Spoel, 2002). Grid es uno de los programas ampliamente usados para este propósito (Goodford, 1985).

Uno de los métodos de diseño basado en la estructura del receptor es el llamado diseño *de novo* que consiste en construir moléculas directamente en el receptor (Oshiro et al., 1998). Otro método, y el más empleado, es el acoplamiento molecular automatizado, comúnmente conocido en la literatura como *docking* molecular. Uno de los casos de éxito más notable del acoplamiento molecular es su participación en el desarrollo del indinavir (Tabla 1.6.1).

1.8. Diseño basado en la estructura del ligando

Cuando no se conoce la estructura del receptor se utilizan los métodos basados en el ligando. Éstos están fundamentados en la información experimental disponible para una serie de estructuras químicas con actividad biológica conocida. Algunos métodos comunes dentro de esta área son los estudios QSAR y la búsqueda en bases de datos.

1.8.1. Relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR)

Hansch introdujo la metodología involucrada en los estudios QSAR a principios de la década de los 60's. Esta estrategia se fundamenta en que la diferencia estructural de los compuestos es responsable de la diferencia de la actividad biológica de los mismos. Los factores estructurales que tienen mayor impacto en la actividad biológica son de tres tipos principalmente: electrónicos, estéricos e hidrófobos. La relación entre la actividad biológica (o la propiedad molecular) y los parámetros estructurales se obtienen a través de un análisis de regresión múltiple (Hansch et al., 1963; Hansch y Fujita, 1964).

Cualquier método QSAR se puede definir, en general, como la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos al problema de encontrar relaciones empíricas (modelos QSAR) de la forma:

$$P_i = k(D_1, D_2, .., D_n),$$

en donde P_i son las actividades biológicas evaluadas *in vivo* o *in vitro* (dosis efectiva 50, DE_{50}, dosis letal media, DL_{50} o dosis inhibitoria cincuenta DI_{50}) o alguna otra propiedad de interés (punto de ebullición normal, viscosidad, índice de refracción, pKa, Log P, constantes de velocidad, rendimiento de las reacciones químicas, corrimientos químicos en resonancia magnética nuclear de protón, entalpía de formación, capacidad calorífica, etc.) de las moléculas, $D_1, D_2, .., D_n$ son propiedades estructurales calculadas (o algunas veces medidas experimentalmente) de los compuestos y se les conoce comúnmente con el nombre de descriptores. En la expresión, *k*, representa alguna transformación matemática establecida empíricamente que habría que aplicar a los descriptores para calcular el valor de la propiedad P_i de todas las moléculas. La relación entre los descriptores *D* y la propiedad *P* puede ser lineal, donde la propiedad puede calcularse directamente a partir del valor de los descriptores, o no lineal, donde el valor de los descriptores se utilizan para caracterizar la similitud química entre las moléculas, lo cual se usa para predecir la propiedad *P* de los compuestos. La selección de los descriptores y la correlación que exista entre ellos se determina usando métodos como el factor de análisis, análisis del componente principal (PCA), mínimos cuadrados parciales (PLS)

o mínimos cuadrados parciales no lineales (NIPALS). (Tropsha, 2003; Karelson, 2000, Atkins, 1997).

Desde los primeros trabajos de Hansch se han desarrollado diferentes estrategias para hacer estudios QSAR (Debnath, 2001; Kubini, 1998, p. 2309). Los diferentes métodos que se han desarrollado pueden analizarse desde dos puntos de vista: 1) los tipos de parámetros estructurales que se utilizan para caracterizar a las moléculas, desde simple fórmulas químicas a estructuras tridimensionales y 2) los procedimientos matemáticos que se emplean para obtener las relaciones cuantitativas entre los descriptores moleculares y la actividad biológica.

De acuerdo al origen de los descriptores moleculares usados en los cálculos, los métodos QSAR pueden dividirse en tres grupos. Un grupo usa un número relativamente pequeño de propiedades fisicoquímicas y parámetros que describen, por ejemplo, efectos hidrófobos, estéricos y electrostáticos. Estos métodos son conocidos en la literatura con el nombre de análisis de Hansch. Métodos más recientes se basan en características cuantitativas de gráficas moleculares. Debido a que las gráficas moleculares o fórmulas estructurales son bidimensionales, a estos métodos se les refiere como estudios QSAR en dos dimensiones o QSAR-2D (Tropsha, 2003). Un tercer grupo de métodos se basa en los descriptores obtenidos de la representación tridimensional de las estructuras de las moléculas. A estos estudios se les conoce como QSAR en tres dimensiones o QSAR-3D (Greco, et al., 1997; Tropsha, 2003). Estos métodos se han hecho cada vez más populares con el desarrollo rápido y preciso de métodos computacionales para generar conformaciones tridimensionales y alineaciones de las estructuras químicas. Probablemente el ejemplo más conocido de QSAR-3D es CoMFA. Otro ejemplo representativo es el análisis comparativo de índices de similitud molecular Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (CoMSIA) (Klebe et al., 1994).

Los estudios QSAR pueden también clasificarse por el tipo de método de correlación usado en el desarrollo de los modelos. Estos pueden ser métodos lineales, como es el caso de la regresión lineal o la regresión lineal múltiple, y no

lineales. Ejemplo de este último es el análisis de *k*-vecinos más cercanos (*k-Nearest Neighbors*, *k*NN) (Zheng y Tropsha, 2000).

Los diferentes modelos QSAR tienen ventajas y desventajas. Por ejemplo, los métodos QSAR-3D tienen la ventaja de mostrar sus resultados en forma gráfica que pueden interpretarse fácilmente en términos de las interacciones estéricas y electrostáticas importantes para que el ligando se una al receptor. Sin embargo, estos métodos requieren de una alineación precisa de las estructuras en tres dimensiones, lo cual es subjetivo, consume tiempo y dificulta el análisis de bases de datos grandes. Por otra parte, los métodos QSAR-2D son mucho más rápidos y más fácilmente adaptables a la automatización. Esto se debe a que no requieren búsqueda conformacional y alineación de las estructuras. De esta forma, los métodos QSAR-2D son mejores para analizar a una gran cantidad de compuestos y hacer búsquedas computacionales en bases de datos. Sin embargo, la interpretación de los modelos en términos químicos comunes es, con frecuencia, difícil o prácticamente imposible (Tropsha, 2003).

Después de desarrollar un modelo que correlacione la actividad biológica con los descriptores, la siguiente etapa de un estudio QSAR es la validación de los modelos. Esta etapa es necesaria debido a la posibilidad de que las correlaciones encontradas sean producto de la casualidad (Topliss y Costello, 1972). La validación consiste en evaluar la capacidad que tiene el modelo QSAR para predecir con exactitud la propiedad de interés (por ejemplo, la actividad biológica) de los compuestos que no fueron utilizados en el desarrollo del modelo. La predicción es una de las características más importantes de los modelos QSAR (Golbraikh y Thopsha, 2002, p. 357; Oprea y Waller, 1997). Al grupo de compuestos con los que se desarrolla el modelo se le denomina grupo de entrenamiento mientras que, al grupo con que se valida, se le llama grupo de prueba. Se ha sugerido que el grupo de prueba debe contener al menos cinco compuestos (Golbraikh y Tropsha, 2002, p. 269). En el caso de que, al momento de desarrollar los modelos QSAR, no se cuente con un grupo de prueba, se puede dividir el grupo de datos original en los grupos de entrenamiento y prueba. Una alternativa a la selección de un grupo de entrenamiento y un grupo de

prueba, aunque menos eficiente, es la llamada validación cruzada. En esta estrategia se desarrollan varios modelos QSAR en donde se han eliminado uno o varios compuestos del grupo de datos que después son predichos por los correspondientes modelos. La validación cruzada más común es la llamada dejar-uno-afuera (LOO, por sus siglas en inglés) en donde cada compuesto se excluye una vez. Si se tienen *n* compuestos se derivan entonces *n* modelos y *n* predicciones se comparan con los valores experimentales. Como resultado se obtiene un coeficiente de correlación cruzada q^2 (Kubini, 1998, 2309). La capacidad de predicción de un método QSAR puede considerarse como el criterio más importante para evaluar la eficiencia de ese método (Tropsha et al., 2003).

Para evaluar que tan robusto es un modelo QSAR se puede usar la prueba llamada de la aleatorización de la respuesta Y (por ejemplo, la actividad biológica) (Golbraikh y Tropsha, 2002, 269). Esta prueba consiste en aleatorizar a la actividad biológica y repetir las predicciones. Si el modelo es robusto, las predicciones con las actividades reales deben ser estadísticamente superiores que cuando se derivaron los modelos con valores aleatorios (Tropsha et al., 2003).

Las diferentes metodologías QSAR han tenido aplicaciones exitosas al diseño de fármacos. Numerosos ejemplos de estas pueden encontrarse en revistas de química medicinal, química farmacéutica, etc. (Debnath, 2001; Fujita, 1990; Hansch y Leo, 1995). Hoy en día, una de las aplicaciones más importantes que tienen los estudios QSAR es la predicción de una gran cantidad de compuestos en forma rápida. Esto se debe al creciente desarrollo de la química combinatoria y a las pruebas de actividad biológica de alto rendimiento. De esta manera, se puede predecir en forma virtual la actividad de compuestos que podrán ser sintetizados posteriormente, de manera que los estudios QSAR sirven como guía para la creación de bases de datos. Todo esto hace que en la era moderna de la química farmacéutica, los estudios QSAR constituyan una de las herramientas más importantes del diseño de fármacos asistido por computadora (Tropsha, 2003).

1.8.2. Búsqueda en bases de datos

En el diseño de fármacos, la búsqueda en bases de datos o evaluación virtual, puede entenderse como el uso de un procedimiento computacional para evaluar una serie de compuestos químicos contenidos en una base de datos y sugerir que compuestos son lo más prometedores para su posterior síntesis y/o evaluación biológica (Tropsha, 2003; Walters et al., 1998). Esta estrategia es cada vez más popular en el diseño de fármacos y su uso se ha visto promovido por la química combinatoria y la evaluación biológica de alta eficiencia.

Para hacer una búsqueda en una base de datos es necesario contar con un patrón de búsqueda. Usualmente este patrón está relacionado con la estructura de una molécula líder. En muchos casos, los patrones de búsqueda se derivan de farmacóforos tridimensionales (Martin, 1992), que contienen información sobre los requerimientos estructurales esenciales para la actividad biológica. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que modelos QSAR-2D pueden emplearse para hacer búsquedas en bases de datos (Shen et al., 2004).

Hay dos estrategias principales para realizar una búsqueda en base de datos. Una es la búsqueda de subestructuras del compuesto líder, la cual se utiliza como patrón de la búsqueda. Ésta se cree que es importante para la actividad. El resultado serán todas las estructuras en la base de datos que contenga a esa subestructura. Un problema que se puede presentar en este tipo de búsquedas es que resulten una gran cantidad de compuestos que requieran un tiempo grande no razonable para poder analizarse.

Otra estrategia es la búsqueda por similitud. En donde, se emplean una serie de descriptores que, en forma colectiva, describen a la estructura completa del compuesto líder. Ésta se compara con el correspondiente grupo de descriptores para cada uno de los compuestos en la base de datos y posteriormente se calcula la similitud entre ellos. Se han desarrollado una variedad de descriptores aplicados a

este tipo de búsqueda así como una serie de métodos para evaluar la similitud (Tropsha, 2003).

Aunque muchas bases de datos son propiedad de compañías farmacéuticas, hay bases de datos públicas significativas. Una de las bases de datos públicas más grandes es la base de datos del Instituto Nacional de Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) (NCI Database) que contiene *ca.* 250,000 compuestos. Recientemente se han reportado varias aplicaciones exitosas de la búsqueda en la base de datos del NCI en donde han surgido nuevos líderes potenciales contra diferentes blancos, por ejemplo, la transcriptasa reversa (Keller, 2003), la proteasa de VIH (Wang et al., 1996) y agentes anticonvulsivos (Shen et al., 2004), entre otros. Otra base de datos es Zinc, la cual puede consultarse en docking.org.

2. Objetivos

General

Aplicar el diseño asistido por computadora para proponer nuevos compuestos morfolínicos y/o tiomorfolínicos del fenol que presenten actividad biológica como antihipertensivos y antiarrítmicos para sintetizar y probar a los mejores candidatos e ir conformando en lo posible las series de entrenamiento y prueba.

Particulares

1. Sintetizar 27 análogos derivados morfolínicos y tiomorfolínicos de fenol, 25 para conformar en lo posible las series de entrenamiento y prueba y dos resultados del diseño asistido por computadora empleando el método CoMFA.

2. Realizar el estudio teórico de compuestos derivados morfolínicos y tiomorfolínicos del fenol con posible actividad antihipertensiva y/o antiarrítmica empleando los métodos de mecánica molecular (análisis conformacional) para el análisis de los rotámeros obtenidos de menor energía.

3. Llevar a cabo el estudio teórico de la estructura molecular de los compuestos sintetizados empleando el método semiempírico PM3 para optimizar la geometría de dichas estructuras y encontrar las propiedades fisicoquímicas teóricas de cada compuesto (descriptores).

4. Efectuar el estudio teórico de la estructura molecular de los compuestos sintetizados empleando métodos *ab initio* para optimizar la geometría de dichas estructuras y encontrar los descriptores teóricos de cada compuesto.

5. Optimizar la geometría de la estructura molecular de los compuestos sintetizados empleando métodos funcionales de la densidad (DFT) para encontrar los descriptores teóricos de cada compuesto.

6. Validar el método teórico por comparación con las estructuras de rayos X para encontrar cual de ellos describe mejor las estructuras moleculares encontradas por rayos X de los compuestos sintetizados.

7. Determinar mediante cálculos teóricos algunos descriptores de estos análogos: ΔH de formación, Índice de Balaban, E. electrostática, E. homo, E. lumo, etc., para alimentar posteriormente los programas CoMFA.

8. Determinar experimentalmente algunas propiedades fisicoquímicas de algunos de estos análogos (pKa y log P) para ir construyendo la base de datos experimentales de la serie de entrenamiento.

9. Emplear los resultados obtenidos, en el laboratorio de farmacología del miocardio, de las actividades hipotensora y disminución de la frecuencia cardiaca preliminares de los compuestos sintetizados, empleando los modelos de rata anestesiada y de rata hipertensa espontánea para alimentar las bases de datos empleadas para el desarrollo del método CoMFA y comprobar la predicción de las actividades de los compuestos diseñados.

10. Efectuar una observación previa de los estudios cuantitativos de correlación estructura actividad en tres dimensiones (CoMFA) empleando la actividad de disminución de la frecuencia cardiaca observada de la serie de entrenamiento de compuestos tiomorfolínicos para diseñar al menos dos moléculas y predecir su actividad biológica.

11. Sintetizar y predecir la actividad de disminución de la frecuencia cardiaca de las dos moléculas diseñadas empleando los estudios QSAR-3D (CoMFA).

12. Comparar los resultados teóricos y experimentales de la actividad antiarrítmica de las dos moléculas diseñadas empleando CoMFA.

3. Metodología

La metodología de trabajo se describe por cada actividad realizada para dar cumplimiento a cada uno de los objetivos planteados en el proyecto.

3.1. Síntesis y purificación de 27 compuestos derivados morfolínicos y tiomorfolínicos de fenol empleando 2 fuentes diferentes de energía para las reacciones.

La síntesis de los diversos derivados de (metil–il–morfolín)fenol y (metil–il–tiomorfolín)fenol se llevó a cabo por los métodos de sustitución electrofílica aromática (SEA) y SEA vía base de Mannich (SEA_BM), en cada método lo que cambió es el orden de mezclado de los reactivos, además para cada método se emplearon dos fuentes diferentes de transferencia de energía a la reacción, el primero fue a reflujo y el segundo con radiación infrarroja en ausencia de disolventes (Velázquez et al., 2005).

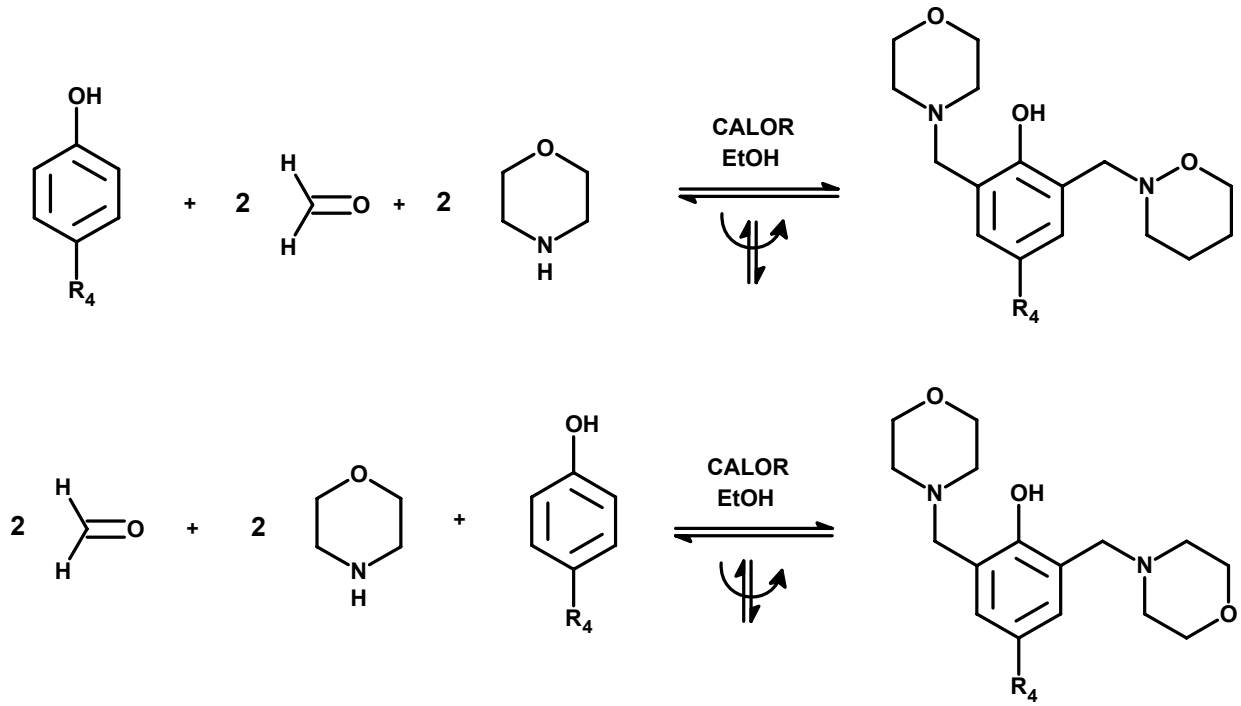


Figura 3.1.1. Reacciones SEA y SEA_BM

El punto final de la reacción se determinó por cromatografía en placa fina (TLC, por sus siglas en inglés) tomando como referencia la materia prima y empleando la mezcla de disolventes hexano – acetato de etilo en diferentes proporciones como eluyente o fase móvil. A los compuestos sintetizados se les asignó la clave LQM – 300. De 27 compuestos sintetizados, 25 fueron empleados como serie de entrenamiento, 8 de ellos mismos en la serie de prueba y 2 de ellos son resultado del diseño por QSAR-3D.

La purificación de cada LQM – 300 se llevó a cabo por cromatografía en columna (CC), empleando gel de sílice como fase estacionaria y un gradiente de hexano/acetato de etilo como fase móvil. Las fracciones se agruparon de acuerdo a los resultados obtenidos por TLC.

3.2. Caracterización espectroscópica

Cada uno de los compuestos LQM – 300 se caracterizaron empleando las siguientes técnicas: espectroscopía infrarroja, de resonancia magnética nuclear de protón (RMN^{1}H), resonancia magnética nuclear de carbono trece (RMN^{13}C), espectrometría de masas y difracción de rayos X, ésta última solamente se aplicó a cuatro compuestos.

3.2.1. Espectroscopia infrarroja

Se obtuvieron los espectros con un equipo marca NICOLET, modelo Magna 560 FT-IR, las pastillas se prepararon con KBr grado espectrofotométrico FT-IR de ALDRICH.

3.2.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Los espectros tanto de RMN^{1}H como de RMN^{13}C se obtuvieron empleando equipos VARIAN de 300 MHz y VARIAN de 200 MHz, en cloroformo deuterado.

3.2.3. Espectrometría de masas

En el estudio de masas desarrollado en la USAI se empleó un espectrómetro marca VARIAN y el método FAB (+), la matriz utilizada en todas las muestras analizadas fue el alcohol 3 – nitrobencílico y en la FESC se utilizó un espectrómetro de masas de inserción directa acoplado a un cromatógrafo de gases marca Thermo Finigan, modelo Trace 2000.

3.2.4. Difracción de rayos X

El análisis estructural de los compuestos LQM – 309, LQM-318, LQM321 y LQM – 324 se llevó a cabo por el Ing. Marco Antonio Leyva Ramírez en el laboratorio de rayos X del CINVESTAV bajo la dirección de la Dra. María de Jesús Rosales.

El difractómetro usado fue un Enraf-Nonius CCD, la radiación y longitud de onda aplicada fue MoKα con λ = 0.71073 Å, tipo de barrido de hemisferio, temperatura 293.0 K, rango de 2θ para la recolección de datos de 8.24 a 54.90°, 6439 reflexiones colectadas, 3488 (R_{int}= 0.0200) reflexiones independientes, el programa empleado para la solución de la estructura es el SHELXS-97 (Sheldrick 1990), método de refinamiento: Full-matrix Least- Squares on F^2.

3.3. Estudios teóricos

3.3.1. Análisis conformacional

El análisis conformacional se llevó a cabo empleando el paquete Systematic Conformational Search del programa de modelado molecular Sybyl 6.9 (Tripos Discovery Informatic, Inc., 2002, SCS) la determinación de la energía potencial de cada molécula de los compuestos LQM – 300 se realizó mediante una búsqueda sistemática, rotando los enlaces. Se inició con incrementos de rotación de los enlaces de 30° y los factores de van der Waals (1-4) empleados fueron 0.95 y para las interacciones de hidrógeno de 0.87.

3.3.2. Optimización geométrica y cálculo de la energía empleando el método semiempírico PM3

La optimización geométrica se efectúo con el paquete MOPAC del programa en modelado molecular Sybyl 6.9 (Tripos Discovery Informatic, Inc., 2002, MOPAC). La estructura del compuesto en estudio se tomó del mínimo conformacional obtenido del análisis anterior. En el cuadro de diálogo se fueron seleccionando las siguientes opciones: el método, la carga neta de la molécula, el estado de la molécula, el tipo de convergencia, la optimización, las opciones que deseo que calcule y aparezcan en el archivo de salida, la máquina en donde va a correr los cálculos y el nombre del trabajo.

3.3.3. Métodos *ab initio*

La optimización geométrica y el cálculo de energía se realizaron empleando el paquete Northwest Computacional Chemistry (NWChem) 4.5. Se crea un archivo de entrada en donde se introduce el título del trabajo, la orden de inicio o de reinicio con el nombre de la molécula, la memoria total empleada para el cálculo, la dirección en donde se encuentra el archivo de entrada y ahí mismo pondrá el de salida cuando concluya los cálculos, indicar la geometría en formato *.cc1, indicar con end que termina la geometría, dejar un espacio y escribir el conjunto de base para cada orbital atómico de los átomos que constituyen la molécula, indicar que se terminó de escribir las funciones de base con end, indicar el nivel de teoría (por ejemplo scf para

métodos *ab initio*), indicar el estado de la molécula, indicar los vectores de entrada y los de salida en un archivo del tipo *.movecs, indicar el número de ciclos que realizará el cálculo, e indicar con end que se terminó de programar esa parte, dejar un espacio e indicar la tarea a realizar (por ejemplo: task scf optimize). (Straatsma etal., 2003, Atkins, 1997, Karelson, 2000, Andrés y Beltrán, (Eds.), 2000)

3.3.4. Método Funcionales de la Densidad

La optimización geométrica y el cálculo de energía se realizaron empleando el mismo paquete que en el inciso anterior. Se crea un archivo de entrada en donde se introduce el título del trabajo, la orden de inicio o de reinicio con el nombre de la molécula, la memoria total empleada para el cálculo, la dirección en donde se encuentra el archivo de entrada y ahí mismo pondrá el de salida cuando concluya los cálculos, indicar la geometría en formato *.cc1, indicar con end que termina la geometría, dejar un espacio y escribir el conjunto de base para cada orbital atómico de los átomos que constituyen la molécula, indicar que se terminó de escribir las funciones de base con end, escribir el conjunto de bases para los orbitales “cd”, indicar el nivel de teoría (por ejemplo dft para métodos funcionales de la densidad), indicar el estado de la molécula, indicar los vectores de entrada y los de salida en un archivo del tipo *.movecs, indicar el número de iteraciones que realizará el cálculo, e indicar con end que se terminó de programar esa parte, dejar un espacio e indicar la tarea a realizar (por ejemplo: task dft optimize). En todos los casos los métodos y los conjuntos de base empleados para el cálculo fueron: B3LYP/DZVP/A1// B3LYP/DZVP/A1 y B3LYP/6-31g// B3LYP/6-31g (Straatsma etal., 2003; Atkins, 1997; Karelson, 2000; Andrés y Beltrán, (Eds.), 2000).

3.3.5. Validación del método teórico

La validación del método teórico que describe mejor la estructura de los compuestos a estudiar consistió en comparar los resultados de la optimización geométrica obtenida por la aplicación de los diversos métodos con la estructura geométrica resultado del análisis estructural realizado por difracción de rayos X.

La comparación consistió en medir las longitudes de enlace entre átomos tanto de las estructuras obtenidas por difracción de rayos X, denominando a éstas experimentales, como de las estructuras optimizadas por cada método teórico. Se efectúo la diferencia entres ellas y se obtuvo el promedio de esas diferencias. Otro método de validación consistió en realizar la superposición de las estructuras experimentales con las estructuras resultantes de la optimización de cada método teórico empleado con el programa Sybyl y evaluar el % de desviación estándar de la sobreposición de las mismas (Tripos Discovery Informatic, Inc., 2002).

3.4. Determinación de descriptores

3.4.1. Cálculo teórico de los descriptores electrónicos, estéricos y fisicoquímicos

Una vez validado el método se eligen las estructuras resultantes y se calculan teóricamente los siguientes descriptores electrónicos: E. HOMO (eV)**,** E. LUMO (eV)**,** Fórmula molecular**,** Simetría**,** Energía total, MD (debye)**,** E. electrónica. También se calcularon los descriptores estéricos: Índice de Balaban, Área de Connolly, Índice de Wiener, Volumen, Área, Refractividad molar, Log P. Además se calcularon los descriptores fisicoquímicos: E. de vibración cero, ΔH de formación, E. vdW no debida a las interacciones de los átomos -1,4, E. vdW -1,4 y E. de solubilidad en agua, aplicando un “single point” a la estructura optimizada con el programa Chem 3D® ULTRA, versión 8.03 (Cambridge Soft Co., 2003, Straatsma etal., 2003, Atkins, 1997 Karelson, 2000, Andrés y Beltrán, (Eds.), 2000).

3.4.2. Determinación experimental de Log P y pKa

3.4.2.1. Determinación de Log P mediante el método espectrofotometría UV - VIS

Los equipos empleados para esta determinación son: espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Lamda 18, espectrofotómetro UV-VIS marca GBC, modelo CINTRA 20 y la Centrifuga Hettich Zentrifugen Rotina 35.

La Figura 3.4.2.1.1 presenta la metodología experimental desarrollada para la determinación del Log P de algunos de los compuestos LQM – 300. Ésta emplea el método espectrofotométrico UV-Visible para conocer la concentración de los compuestos en *n* octanol y por diferencia con la concentración inicial se calcula la concentración en la fracción acuosa. Una vez conocidas las dos concentraciones se procede a calcular P y luego Log P (Tomlinson, 1982).

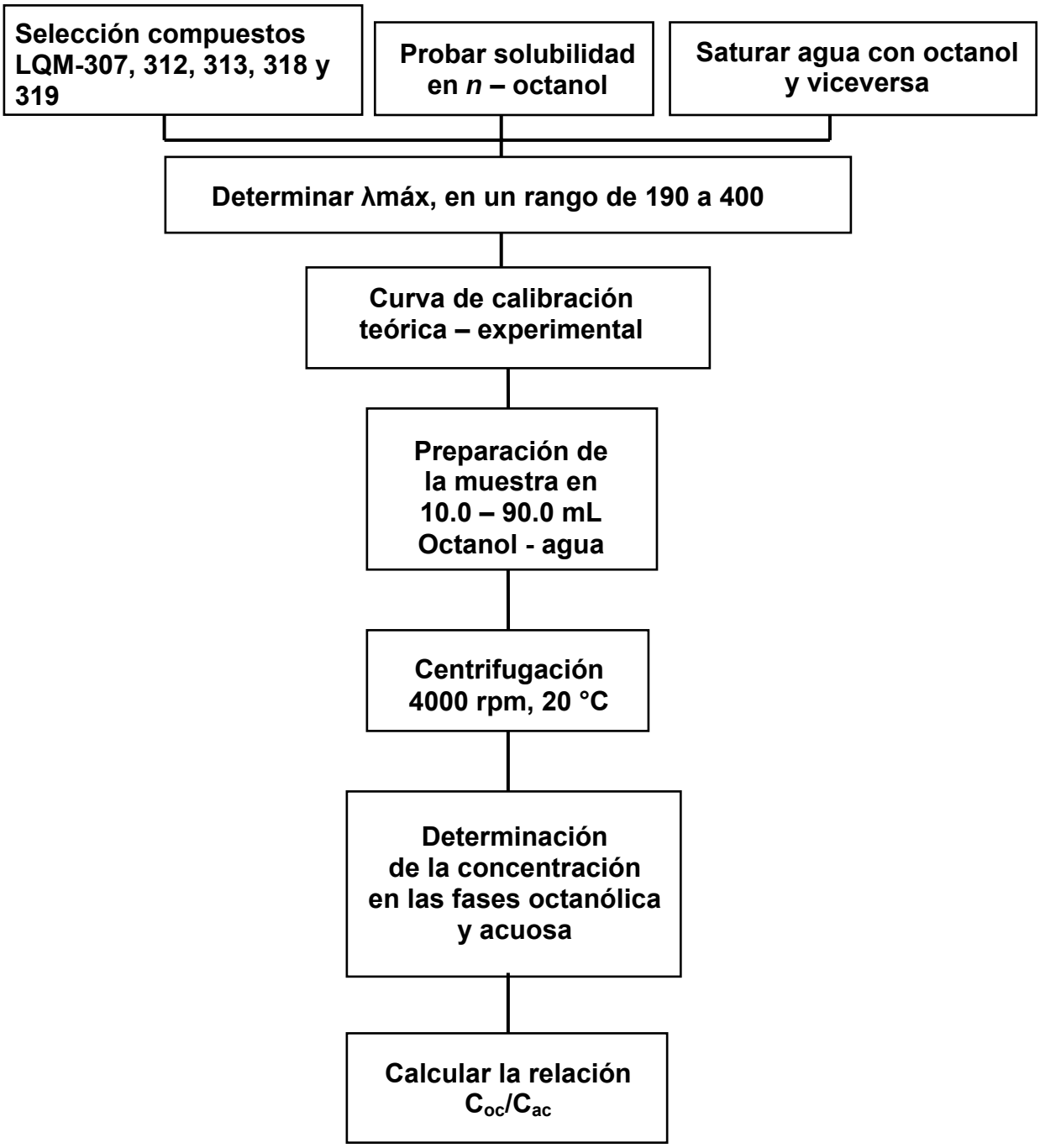


Figura 3.4.2.1.1. Metodología experimental para la determinación de Log P

3.4.2.2. Determinación de pKa por el método de electroforesis capilar

El equipo de electroforesis capilar empleado fue de la marca Beckman – Coulter, modelo P/ACE System MDQ, con límite de detección entre 10^{-3} y 10^{-6} M. La concentración de las muestras se seleccionó también en función del coeficiente de absortividad molar. La confiabilidad del equipo es del 99%. La metodología que se usó se muestra en la Figura 3.4.2.2. (Matota, et al., 2003; Poole, et al., 2004).

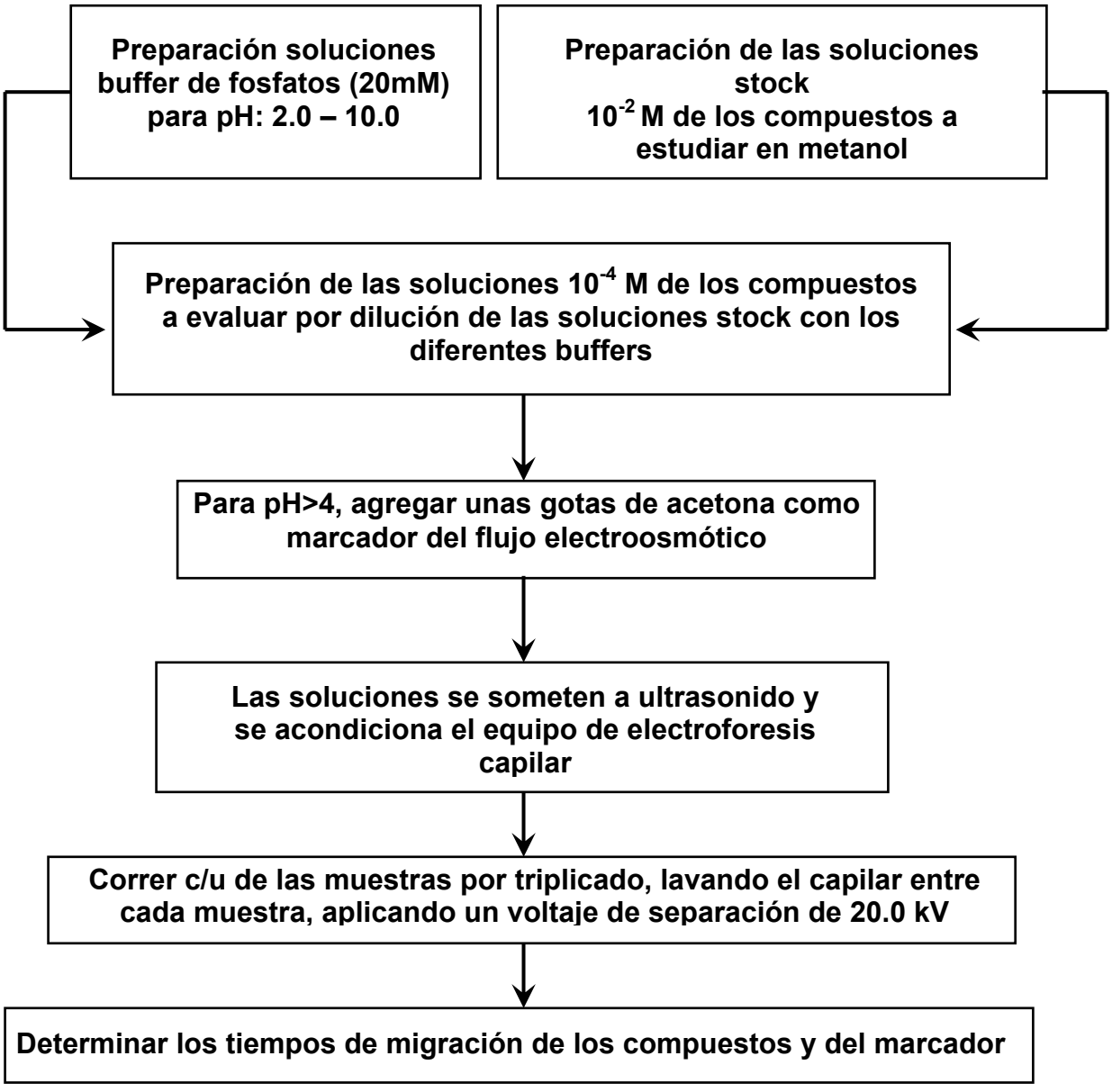


Figura 3.4.2.2.1 Metodología para determinar pKa de los compuestos LQM - 300

3.5. Estudios preliminares de la actividad biológica

3.5.1. Modelo de rata anestesiada normotensa

La metodología se desarrolló en el laboratorio de farmacología del miocardio. El material y equipo empleados para determinar de forma preliminar la actividad hipotensora de los compuestos LQM-300 son: material de cristalería, estuche de disección, mesa de disección con soporte para llave de tres vías, micropipetas de 1000 y 100 μL marca PIPETMAN®, jeringas desechables de 1.0, 3.0 y 5.0 mL, cajas Petri, espátulas, tubo de poliestireno de 2.0 y 3.0 mm de diámetro, algodón, hilo seda (3-0,4-0, 5-0), hilo cáñamo blanco, balanza analítica, BL60S, Sartorios®, balanza granataria OHAUS®, manómetro, fuente de iluminación, catéter PE50 acoplado a transductor de presión, llave de tres vías con catéter PE20, DIGI-MED®-BPA (Blood Presssure Analyzer™), PC (Compaq Presario MV525), con software DMSI-200_1.

Se realizaron pruebas de solubilidad en medio neutro empleando solución salina, en medio básico empleando solución de bicarbonato de calcio al 2.0% y medio ácido empleando una solución 0.00145 M de ácido clorhídrico. El efecto hipotensor de los compuestos morfolínicos y tiomorfolínicos derivados de fenol se determinó empleando el modelo invasivo de presión arterial en rata Wistar macho anestesiada, de 10 a 14 semanas de edad, con pesos promedio de 250 a 350 g. Se preparó una disolución en una dosis de 1.0 mg/kg para administrar un volumen de 0.1 mL. Se anestesió la rata con pentobarbital sódico en una dosis de 45.0 mg/kg por vía intraperitoneal (ip). Se realizó una traqueotomía con el tubo de polietileno, el cual se sujetó con hilo de seda (3-0). Enseguida se localizó la arteria carótida derecha, separando de ella el nervio vago con hilo seda 4-0, se canuló mediante un catéter PE50 heparinizado, el cual está conectado a un transductor de presión y éste a su vez con el amplificador de presión (DIGIMED Blood Presssure Analizar), que les permitió registrar la presión arterial sistólica (PAD), diastólica (PAD), media (PAM) y la frecuencia cardiaca (FC). Este amplificador está conectado a una PC que registró las lecturas mediante el programa DMSI-200_1. Posteriormente se disecó la vena femoral y se canuló con el catéter PE20, mediante el cual fue administrada la dosis de 1.0 mg/kg vía intravenosa (iv.), en un volumen de 0.1 mL.

Para la segunda etapa de este mismo estudio se emplearon los compuestos tanto control como LQM-300 en un intervalo de dosis de 10^{-4} a 10 mg/kg, la vía de administración también fue intravenosa y las muestras se disolvieron en 1.0 mL de vehículo, el cuál está constituido por la mezcla de 0.2 mL de HCl 10^{-2} M y 0.8 mL de solución salina.

Para la determinación de las curvas dosis efecto de los compuestos LQM_300 y de los antihipertensivos de referencia, la rata se preparó como se mencionó anteriormente, se realizó la disección y canulación de la arteria carótida y de la vena femoral. Se administraron dosis de 0.0001, 0.001, 0.1, 1.0, 3.1 y 10.0 mg/kg en 0.1 mL. Las curvas dosis-efecto se realizaron para obtener la dosis efectiva 50 (DE_{50}) y observar mejor el efecto hipotensor de los compuestos LQM-300 y de los fármacos control captopril, losartán y omapatrilat; realizando una n=5 para cada uno de ellos. El efecto presentado por cada compuesto, en cada una de las dosis, se evaluó mediante los cambios en la PAM, PAS, PAD y FC. Los datos se analizaron mediante el uso del programa Excel, los valores se reportaron como valores promedio de n=5 más menos el error estándar. La comparación de los resultados de las curvas de los compuestos control y de los LQM-300 se realizó mediante ANOVA de dos factores con una sola muestra por grupo, *P<0.05.

Para evaluar el efecto sobre la frecuencia cardiaca de los compuestos LQM-300 se emplearon 70 ratas Wistar Macho de 250 a 350 g y de 10 a 14 semanas de edad. Se tomó como control el antiarrítmico propranolol marca SIGMA, las solución salina fisiológica, ácido clorhídrico 0.00147 M, pentobarbital sódico de uso veterinario SEDALPHORTE (0.063 g/mL), micropipetas de 100 y 1000 μL, frascos viales de 5.0 mL, jeringas de 1.0 mL, Fisiógrafo Desk Model DMP-4B, Narco Biosistems INC., Balanza granataria OHAUS, balanza analítica SARTORIOS, BL60S, fuente de iluminación, 3 electrodos de plata. Se prepararon soluciones de Propranolol 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 y 3.1 mg/kg. Se administró 0.5 mL de cada dosis por vía intramuscular (im.) y con la misma concentración se prepararon las soluciones de los LQM-300, el disolvente fue 1.0 mL de un vehículo que se conformó de la mezcla de 0.2 mL de HCl 10^{-2} M y 0.8 mL de solución salina fisiológica. Se prepararon las dosis

a administrar, se anestesió a la rata con una dosis de pentobarbital sódico de 45 mg/kg y vía de administración intraperitoneal (ip.), se espera a que la rata esté anestesiada, aproximadamente 2.0 minutos, enseguida se coloca la rata en una tabla de disección se mantuvo a la rata con las extremidades bien estiradas y fijas para evitar cualquier movimiento en los electrodos, los cuales se colocaron de la siguiente manera: el verde en la pata anterior izquierda, el rojo en el tórax y el café en la pata posterior izquierda, se enciende el botón blanco del fisiógrafo: para registrar la lectura se coloca el botón en la derivación de INPUT, la velocidad del fisiógrafo empleada fue de 10 cm/s, se registra la lectura basal del electrocardiograma, posteriormente se administra la primera dosis de propranolol por vía intramuscular (im.), se dejan pasar 10.0 minutos de la administración y se registra el ECG, posteriormente se administra la segunda dosis se espera un tiempo de 10.0 minutos para registrar el ECG y se repite el procedimiento para las siguientes dosis.

Esta metodología se llevó a cabo también para evaluar los compuestos LQM-300 para cada una de las dosis administradas. Finalmente se calculó la frecuencia cardiaca. Los datos obtenidos se analizaron con el programa Excel y se expresaron en valores promedio más menos el error estándar. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos factores con una sola muestra por grupo con una F de Fisher utilizando una significancia de $P<0.05$ (Cunha, et al., 1997; Lacolley, et al., 1995; Tardy, et al., 1991; Glaser, et al., 1995; Albaladejo, et al., 1994; Guyton, et al., 1982; Flores, 2005; Villegas, 2005).

El resumen de la metodología empleada para encontrar la respuesta biológica de los compuestos LQM – 300 como hipotensores o como modificadores de la frecuencia cardiaca se muestra en la Figura 3.5.1.

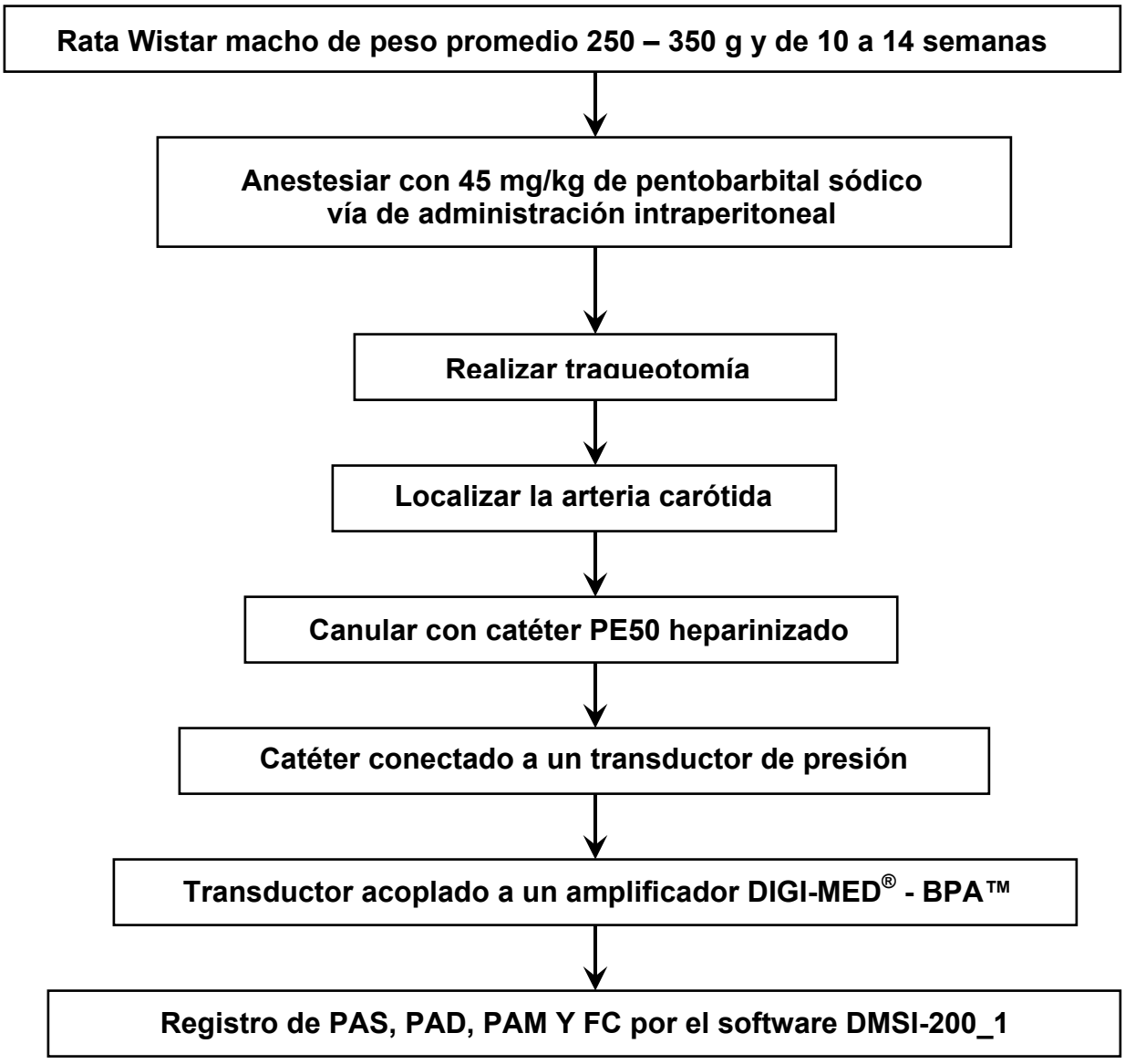


Figura 3.5.1. Metodología empleada para determinar la actividad antihipertensiva y/o antiarrítmica de los compuestos LQM – 300 en el modelo de rata anestesiada

3.5.2. Modelo de rata hipertensa espontánea (SHR)

Este estudio se llevó a cabo en ratas hipertensas espontáneas machos concientes con una edad de 6 meses, en ellas se midieron la PAS, PAD, PAM y la FC, antes de administrar tanto los fármacos control (captopril y losartán) como los LQM-300 y después de administrar vía oral la dosis única de 1.0 mg/kg los mismos. El resumen de la metodología empleada para evaluar la respuesta biológica de los compuestos LQM – 300 como antihipertensivos o como antiarrítmicos en el modelo SHR se muestra en la Figura 3.5.2 (Cunha, et al., 1997; Lacolley, et al., 1995; Tardy, et al., 1991; Glaser, et al., 1995; Albaladejo, et al., 1994; Guyton, et al., 1982).

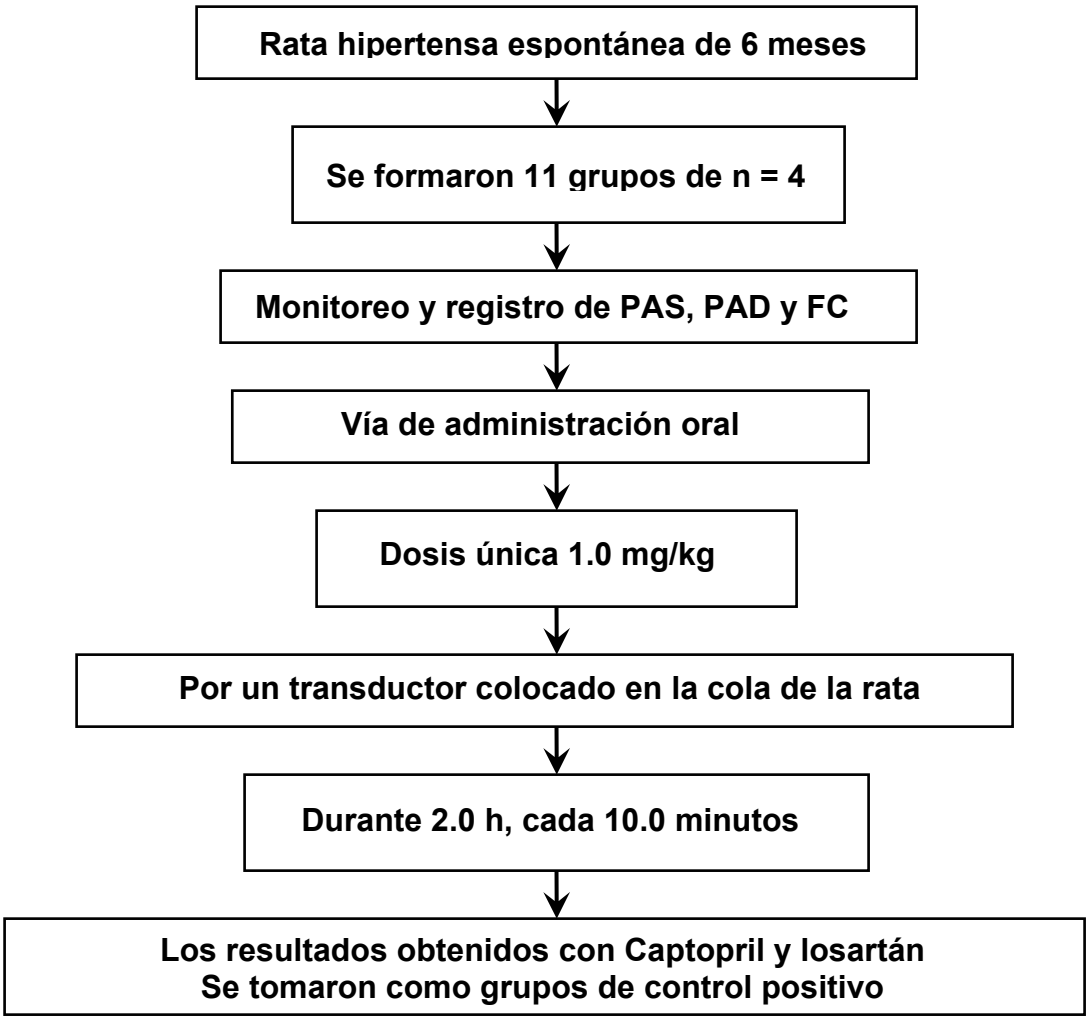


Figura 3.5.2. Metodología empleada para evaluar la actividad antihipertensiva y/o antiarrítmica de los compuestos LQM – 300 en el modelo SHR.

3.6. Observación previa para el análisis comparativo de los campos moleculares

La metodología empleada para el desarrollo de CoMFA se ilustra en las Figuras 3.6.1 y 3.6.2 para la primera y segunda etapa respectivamente. Las actividades biológicas como antiarrítmicos de la serie de entrenamiento constituida por los compuestos derivado metil – il – tiomorfolínfenol empleadas fueron las encontradas en el modelo de rata anestesiada empleando propranolol como control positivo y la vía de administración fue intramuscular (Tripos Discovery Informatic, Inc., 2002, CoMFA).

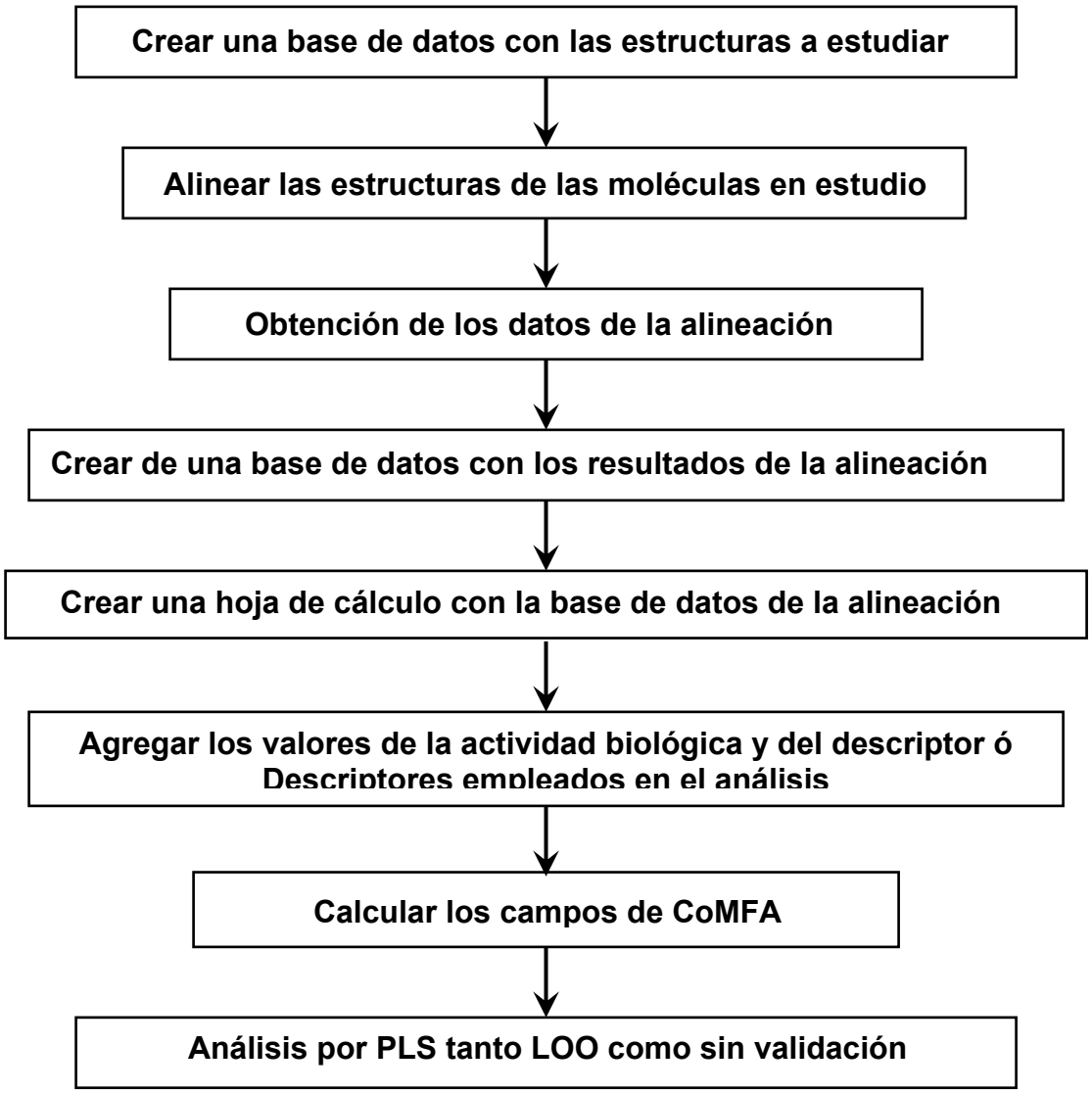


Figura 3.6.1. Metodología para el desarrollo de CoMFA (primera etapa)

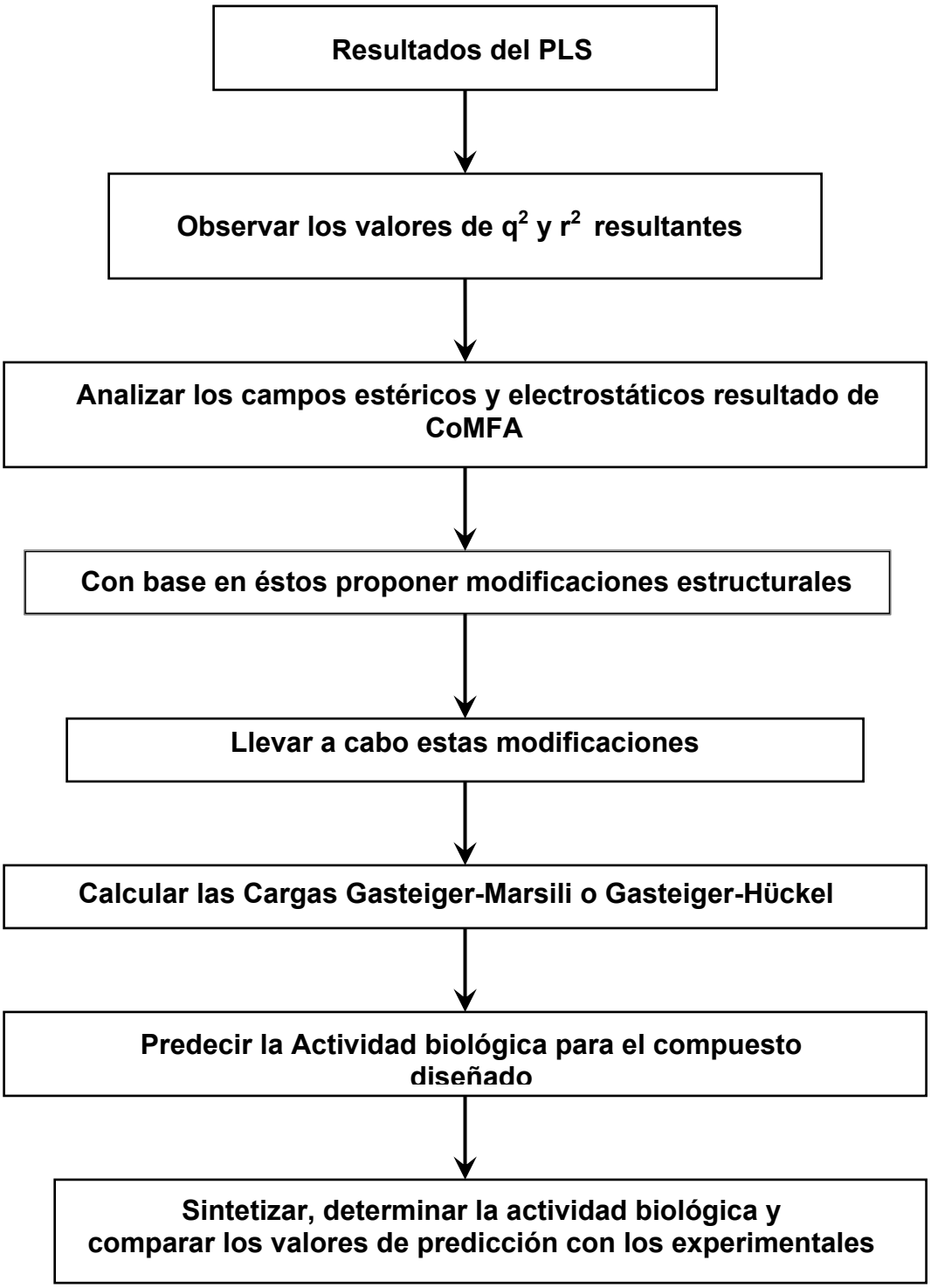


Figura 3.6.2. Metodología para el desarrollo de CoMFA (segunda etapa)

Resultados y discusión

Los resultados se presentan por cada objetivo y se discute solamente un ejemplo de cada parte, algunos otros resultados se muestran en los artículos del anexo.

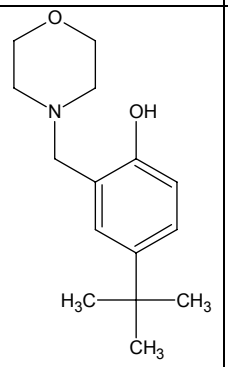
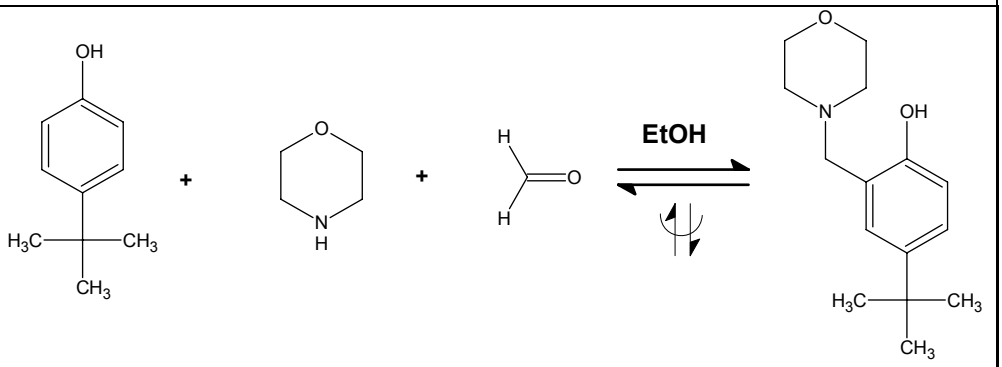
Síntesis, caracterización, estudio teórico y determinación experimental de descriptores de los compuestos de la serie LQM – 300

4. Síntesis y caracterización espectroscópica de 27 compuestos derivados metil–il–morfolín y metil–il-tiomorfolín fenol.

4.1. Síntesis empleando los métodos de Sustitución Electrofílica Aromática y SEA_vía Base de Mannich

Se sintetizaron 27 derivados (morfolín–il–metil)fenol y (tiomorfolín–il–metil)fenol. 25 compuestos fueron empleados en las series de entrenamiento y prueba y dos de ellos se propusieron a partir de la predicción realizada en el estudio CoMFA. Los resultados de cada compuesto en cuanto a las propiedades de los reactivos y de los productos, al rendimiento, a los tiempos de reacción y tipos de metodología empleada para la síntesis se resumieron en tablas, solo se muestra la Tabla 4.1.1 con los datos del compuesto LQM – 304.

Tabla 4.1.1. Propiedades de los reactivos, del producto, rendimiento y método de síntesis del compuesto LQM – 304

LQM 304		**Reacción**		
				
Propiedades *físicas de los reactivos*	***Nombre***	*p*-terbutilfenol	Morfolina	Formaldehído
	Peso molecular	150 g mol^{-1}	85.15 g mol^{-1}	30.03 g mol^{-1}
	Densidad	1.074 g/mL	0.8691 g/mL	1.083 g/mL
	Pureza	100%	99%	37%
Nombre Producto	4-terbutil-2-(1-metil-il-morfolin)fenol		**Características físicas**	Sólido cristalino traslucido
Peso molecular	249.351 g mol^{-1}		**Método de obtención**	SEA // IR
Fórmula molecular	$C_{15}H_{23}NO_2$		**Rendimiento**	5.11% // 58.0%
Punto de fusión	75-78 ° C		**Tiempo de reacción**	56 horas // 25’

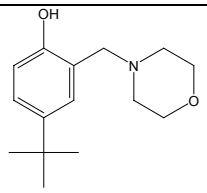
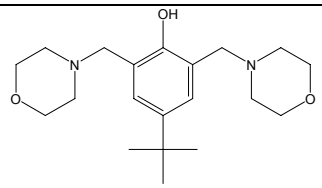
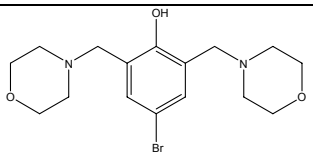
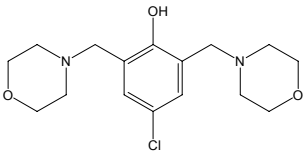
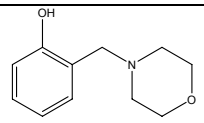
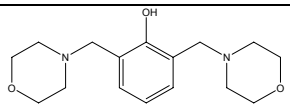
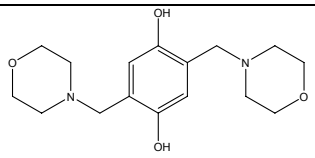
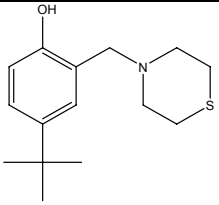
Cuando se realizó la reacción por SEA_BM en ausencia de disolvente y empleando radiación infrarroja para transferirle energía a la reacción, se observa que en todos los casos los tiempos de reacción son menores y en la mayoría de los casos los rendimientos de las reacciones aumentan. En la Tabla 4.1.2 se resumen estos datos para 24 reacciones efectuadas.

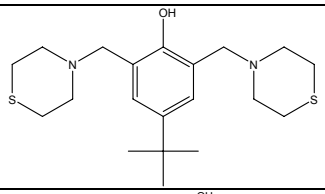
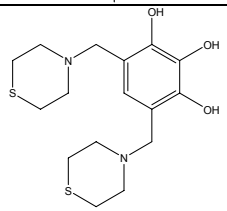
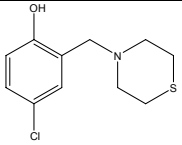
Tabla 4.1.2. Resumen de rendimientos, tiempos de reacción y metodologías de síntesis

LQM	Reacción	Rendimiento	Punto fusión/ ebullición (° C)	Tiempo de reacción
301	SEA_BM // IR	17.71 % // 83.61 %	188 -190	3 h 45' // 54'
302	SEA_BM // IR	34.78 %	156 -158	5 días // 17'
303	SEA_BM // IR	50.53%	248 – 250 (eb.)	5 días // 20'
304	SEA // IR	5.11% // 58.0%	75 - 78	56 horas // 25'
305	SEA // IR	37.55% // 57.44%	129-131	5.0 h // 25'
306	SEA // IR	82.0% // 92.0%	114 - 116	6 horas // 12'
307	SEA // IR	78.0% // 85.0%	102 - 104	4.0 h // 23'
308	SEA // IR	// 90.0%	95-97	31 h // 32'
309	SEA // IR	20.0% // 95.0%	124 - 126	15 h // 9.0'
310	SEA // IR	NA // 90.0%	202 – 204	8.0 h // 28'
311	SEA // IR	70.0%	114 – 116	15' // 8'
312	SEA // IR	85.0% // 95.0%	108 – 110	36.0 h // 32'
313	SEA // IR	83.0%	78 – 80	36.0 h // *40'*
314	SEA // IR	87.0% // 87.0%	104 -106	38.0 h // 21'
315	SEA_BM		84.0	8 días
316	SEA		113	3 días
317	SEA // IR	25.0 // 60.0%	127 – 129	24.0 h // 7.0'
318	SEA // IR	2.11% // 70.0%	85 – 87	48.0 h // 9.0'
319	SEA // IR	34.55% // 80.0%	95 – 97	48.0 h // 15.0'
320	SEA	11.92%	163 – 165	47.0 h 30'
321	SEA	0.98%	136 – 138	47.0 h 30'
322	SEA // IR	83.31% // 85.0%	181 -183	6.0 h // 6.0'
323	SEA	87.65%	193-195	36.0 h
324	SEA // IR	30.25 % // 38.0%	112 – 114	20 d 22.25 h //10'

En la Tabla 4.1.3 se muestran otros resultados de las síntesis SEA_BM, los tiempos de reacción, rendimientos y puntos de fusión se compararon esta vez con datos reportados en la literatura.

Tabla 4.1.3. Datos de tiempos de reacción y rendimientos de reacción

Fenol	Amina	Producto	**pf., peb.* Lit. (°C)**	**pf., peb. Exp. (°C)**	**T (h) Lit.**	**T (h) (IR)**	**Rend. (%) Lit.**	**Rend. (%) (IR)**	**Ref.**
p-Terbutil fenol	Morfolina		80-82	75-78	NA	0.4	NA	58	43
p-Terbutil fenol	Morfolina		128-130	129-131	5	0.4	82	80	43
p-Bromo fenol	Morfolina		115-115.5	114-116	6	0.2	82	92	56
p-Cloro phenol	Morfolina		NA	114-116	NA	0.15	NA	85	57
Fenol	Morfolina		95-96	95-97	96	0.15	NA	90	58
Fenol	Morfolina		123-124	119-121	15	0.15	20	95	56
Hidro-quinona	Morfolina		201-203	202-204 desc.	8	0.15	NA	90	59
p-Terbutil fenol	Tiomorfo-lina		85-87	85-87	48	0.15	5	70	*60*

p-Terbutil fenol	Tiomorfo-lina		95-97	95-97	48	0.25	35	80	*60*
Pirogalol	Tiomorfo-lina		181-183	181-183	0.1	0.01	83	85	*61*
p-Cloro fenol	Tiomorfo-lina		127-129	127-129	240	0.11	25	60	*62*

NA: significa que no aparece; las referencias de la literatura se encuentran en el artículo ARKIVOC 2006 (ii) 150 – 161, que se encuentra en anexos.

4.2. Caracterización espectroscópica

A cada compuesto purificado y recristalizado se le determinaron los espectros de IR, RMNH^1, RMNC^{13} y masas. A continuación como ejemplo se presenta la información y la discusión sobre el LQM – 309: rendimiento con método SEA 20.0%, con método SEA_BM 95%, punto de fusión 124 – 126 °C, RMNH^1 (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si, δ_H): 10.87 (1H, s, OH), 7.06 (2H, m), 6.756 (1H, m), 3.73 (8H, m), 3.63 (4H, m), 2.53 (8H, m). RMNC^{13} (δ_C): 155.94, 129.02, 122.03, 118.51, 66.71, 59.19, 53.10. EM-FAB: m/z (ab., rel.): (M+1) 293 (44%), 206 (100%), 292 (25%). Calculado para $C_{16}H_{24}N_2O_3$, C (65.73%), H (8.27%), N (9.58%), O (16.42%).

En el espectro de RMNH^1 el triplete que aparecen en 2.53 ppm y que integra para 8H corresponde a los H de los metilenos α al nitrógeno del grupo morfolino, la señal en 3.63 ppm y que integra para 4H corresponde a la posición bencílica de los metilenos, las señales en 3.73 ppm y que integran para 8H representan los H de los metilenos α al oxígeno del grupo morfolino; el triplete en 6.76 ppm y que integra para 1H corresponde al H en posición 4 del anillo aromático, el doblete que aparece en 7.06 y que integra para 2H representa a los H de las posiciones 3 y 5 del anillo

aromático y la señal en 10.87 ppm e integra para 1H corresponde al H del grupo hidroxilo.

En el espectro de resonancia de carbono trece se observan siete señales; la que aparece en 53.10 ppm corresponde a los C de los metilenos α a nitrógeno en el grupo morfolino, la que aparece en 59.19 ppm corresponde a los C de los metilenos de la posición bencílica, la señal en 66.71 ppm representa a los C de los metilenos α al oxígeno en el grupo morfolínico, la señal en 118.514 corresponde al C en posición 4 del anillo aromático, las señales en 122.03 y 129.02 representan los átomos de C 3,5 y 2,6 del fenilo respectivamente y la señal en 155.94 ppm corresponde al C unido al grupo hidroxilo. Del espectro de masas observamos que la masa del compuesto es de 292.

Otros datos espectroscópicos de los compuestos sintetizados son:

LQM-301: 4-(4-hidroxi-3,5-bis(morfolín-4-ilmetilfenil)-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridina -3,5-ácido dicarboxílico dietil éster.

IR (cm^{-1}; $CHCl_3$ film) 3450, 3540, 3056, 2932, 1691. $RMNH^1$, (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si, δ_H): falta (1H, s, OH), 6.93 (2H, s), 5.58 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.10 (4H,q,), 3.71 (8H, m), 3.51 (2H, s), 2.49, (8H, m), 2.35 (6H, s)1.22 (6H, t). $RMNC^{13}$ (δ_C): 167.70; 154.20; 143.30; 138.20; 128.70; 121.10; 104.40; 66.90; 59.50; 53.20; 38.70; 19.60; 14.30. EM-FAB: m/z (ab., rel.): (M+1) 544 (20%), 456 (96%), 252 (100%). Calculado para $C_{29}H_{41}N_3O_7$, C 64.07%; H 7.60%; N 7.73%; O 20.60%. Punto de fusión: 145 – 147 °C. Rendimiento: 85%. Tiempo de reacción: 10 minutos.

LQM-303: 4-[1-(4-hidroxi-3-morfolín-4-il-metilfenil)-1-metiletil]-2,6-bis(morfolín-4-il-metil)fenol.

IR (cm^{-1}; $CHCl_3$ film) 3575, 3158, 2932. $RMNH^1$ (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si, δ_H): 8.59 (2H, s, OH), 6.98 (1H, dd, 8.4Hz, 2.4Hz), 6.88 (1H, s), 6.81 (1H,d,2.4Hz), 6.69 (1H,d, 8.4Hz), 3.72 (12H, m), 3.64 (2H, s, Ar-$\underline{CH_2}$), 3.60, (4H, s, Ar-$\underline{CH_2}$), 2.51 (12H,m), 1.59 (6H,s). $RMNC^{13}$ (δ_C): 154.95; 153.67; 141.75; 141.06; 127.58; 127.18; 126.76; 120.76; 119.61; 115.21; 66.65, 62.04; 59.33; 52.91; 41.35; 31.03. EM-FAB: m/z (ab., rel.): (M+1) 526 (25%), 439 (100%), 352 (80%). Calculado para $C_{30}H_{43}N_3O_5$, C 68.54%; H

8.24%; N 7.99%; O 15.22%. Punto de fusión: 248 - 250 °C. Rendimiento: 50%. Tiempo de reacción: 17 minutos.

LQM-314: 4-hidroxi-3,5-bis(morfolín-4-il-metil) benzonitrilo.

IR (cm^{-1}; $CHCl_3$ film) 3455, 3056, 2932, 2230. ° $RMNH^1$ (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si, δ_H): 11.40 (1H, s, OH), 7.14 (2H, s), 3.72 (8H, m), 3.63 (2H, s), 2.54, (8H, m). $RMNC^{13}$ (δ_C): 162.20; 132.48; 123.48; 119.34; 101.75; 66.56; 58.34; 53.03. EM-FAB: m/z (ab., rel.): (M+1) 318 (34%), 230 (100%), 229 (45%). Calculado para $C_{17}H_{23}N_3O_3$; C 64.33%; H 7.30%; N 13.24%; O 15.12%. Punto de fusión: 104 - 106°C. Rendimiento: 87%. Tiempo de reacción: 15 minutos.

LQM-320: 4-[1-(4-hidroxi-3-tiomorfolín-4-il-metilfenil)-1-metiletil]-2-(tiomorfolín-4-il-metil)fenol.

IR (cm^{-1}; $CHCl_3$ film) 3409, 3050, 2956. ° $RMNH^1$ (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si, δ_H): 10.42 (2H, s, OH), 7.00 (2H, dd, J=1.6Hz, 5.6Hz), 6.79 (2H, d, 1.6Hz), 6.69 (2H, d, 5.6Hz), 3.64 (4H, s), 2.80 (8H, m), 2.71, (8H, m), 1.57 (6H,s). $RMNC^{13}$ (δ_C): 155.09; 141.70, 127.06, 126.85, 119.78, 11.30, 62.48, 54.35, 41.38, 31.07, 27.83. EM-FAB: m/z (ab., rel.): (M+1) 459 (100%), 354 (60%), 253 (40%), 102 (80%). Calculado para $C_{25}H_{34}N_2O_2S_2$, C 65.46%; H 7.47%; N 6.11%; O 6.98%; S 13.98%. Punto de fusión: 163 - 165 °C. Rendimiento: 50%. Tiempo de reacción: 11 minutos.

LQM-321: 4-[1-(4-hidroxi-3-tiomorfolín-4-il-metilfenil)-1-metiletil]-2,6-bis (tiomorfolin-4 -il-metil) fenol.

IR (cm^{-1}; $CHCl_3$ film) 3476, 3035, 2906. ° $RMNH^1$ (200 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si, δ_H): 10.22 (2H, s, OH), 6.97 (1H, dd, J=2.4Hz, 8.4Hz), 6.84 (1H, s), 6.80 (1H, d, J=8.4Hz), 6.69 (1H, d, J=2.4Hz), 3.62 (2H, s), 3.58 (4H, s), 2.74 (12H, m), 2.65, (12H, m), 1.58 (6H,s). $RMNC^{13}$ (δ_C): 155.19, 153.76, 141.88, 141.07, 127.28, 126.82, 121.34, 119.79, 115.40, 62.66, 59.87, 54.48, 41.44, 31.14, 27,87. EM-FAB: m/z (ab., rel.): (M+1) 574 (50%), 471 (100%), 368(50%), 116(60%), 102 (50%). Calculado para $C_{30}H_{43}N_3O_2S_3$, C 62.79%; H 7.55%; N 7.32%; O 5.58%; S 16.76%. Punto de fusión: 136 - 138 °C. Rendimiento: 45%. Tiempo de reacción: 15minutos.

LQM-323: 4,6-bis(tiomorfolín-4-il-metil)bencen-1,3-diol.

IR (cm^{-1}; $CHCl_3$ film) 3485, 3034, 2980. ° $RMNH^1$ (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si, δ_H): 10.11 (2H, s, OH), 6.54 (1H, s), 6.31 (1H, s), 3.59 (4H, s), 2.80 (8H, m), 2.71, (8H, m). $RMNC^{13}$ (δ_C): 158.30; 128.73, 11.49, 103.89, 61.59, 54.23, 27.82. EM-FAB: m/z (ab., rel.): (M+1) 341 (25%), 340 (37%), 238 (100%), 154(85%), 136 (62%). Calculado para $C_{16}H_{24}N_2O_2S_2$, C 56.44%; H 7.10%; N 8.23%; O 9.40%; S 18.83%. Punto de fusión: 193 - 195 °C. Rendimiento: 87%. Tiempo de reacción: 11 minutos.

LQM-324: 4-nitro-2-(tiomorfolín-4-il-metil)fenol.

IR (cm^{-1}; $CHCl_3$ film) 3498, 3030, 2987. ° $RMNH^1$ (300 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si, δ_H): 10.44 (1H, s, OH), 8.12 (1H, dd, J=1.8Hz, 6Hz), 7.95 (1H, d, 1.8Hz), 6.85 (1H, d, 6Hz), 3.81 (2H,s), 2.87 (4H,m), 2.76 (4H,m). $RMNC^{13}$ (δ_C): 164.12, 140.14, 125.33, 124.80, 120.72, 116.48, 61.49, 54.27, 27.65. EM-FAB: m/z (ab., rel.): (M+1) 257 (10%), 255 (100%), 254 (55%), 154 (30%). Calculado para $C_{11}H_{16}N_2O_3S$. C 51.54%; H 6.29%; N 10.93%; O 18.73%; S 12.51%. Punto de fusión: 193 - 195 °C. Rendimiento: 30%. Tiempo de reacción: 16 minutos.

LQM-337: 4-cloro-2,6-bis(tiomorfolín-4-il-metil)fenol.

IR (cm^{-1}; $CHCl_3$ film) 3554, 3034, 2932. ° $RMNH^1$ (200 MHz; $CDCl_3$; Me_4Si, δ_H): 10.93 (1H, s, OH), 7.03 (2H, s), 3.59 (4H, s), 2.79 (8H, m), 2.71 (8H, m). $RMNC^{13}$ (δ_C): 154.70, 128.31, 124.12, 123.46, 59.14, 54.60, y 27.84. EM-FAB: m/z (ab., rel.): (M+1)359 (25%**).** Calculado para $C_{16}H_{23}ClN_2OS_2$; C 53.54%, H 6.46%, Cl 9.88%, N 7.80%, O 4.46%, S 17.87%. Punto de fusión: 118 - 120 °C. Rendimiento: 78%. Tiempo de reacción: 12 minutos.

En cuanto a los estudios de difracción de rayos X, la Figura 4.2.1, muestra la estructura obtenida del compuesto LQM – 309. En la Tabla 4.2.1 se encuentran los datos del cristal y los parámetros de colección.

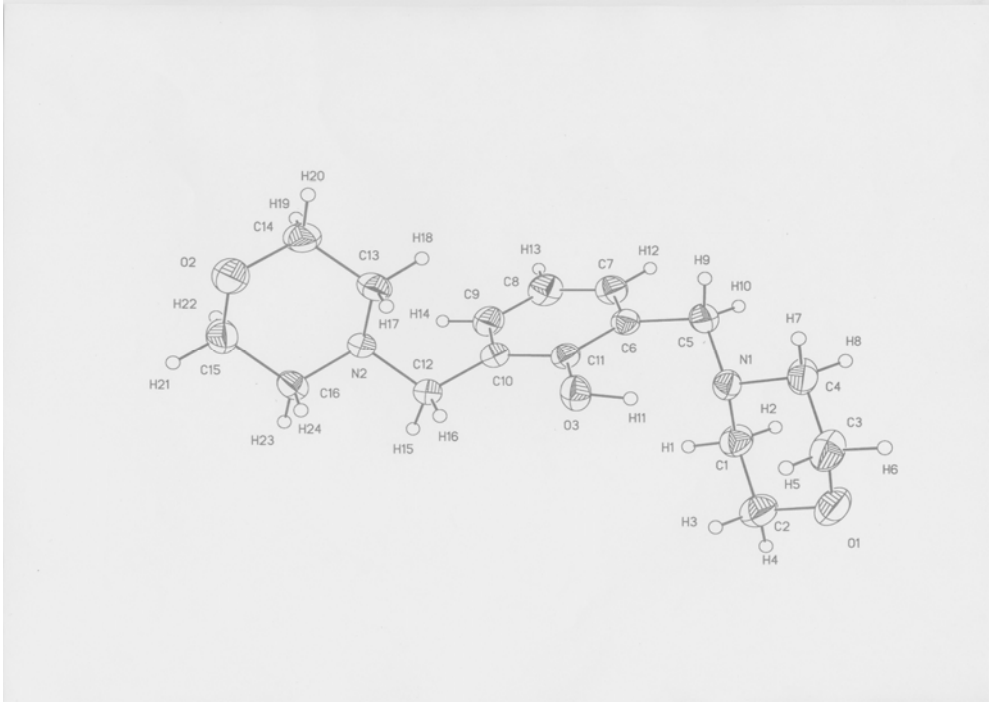


Figura 4.2.1. Resultado del análisis por difracción de rayos X del compuesto LQM – 309

Tabla 4.2.1. Datos del cristal y de los parámetros de colección

Compuesto	LQM - 309		
Fórmula química	$C_{16}H_{24}N_2O_3$	Peso fórmula	292.37
Tamaño del cristal (mm)	0.18x0.29x0.31	Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P 2 $_{1/a}$	a, (Å)	9.5129(2)
b, (Å)	11.4782(2)	c, (Å)	14.5450(3)
		V (Å^3)	1579.57(5)
Z	4	ρ (calc) (mg/m^3)	1.229
μ (mm^{-1})	0.085	F (000)	632
Intervalo de los índices	$0 \leq h \leq 11$, $0 \leq k \leq 14$, $-18 \leq / \leq 18$	2 θ (°)	54.90
T (K)	293(2)	Reflex. colectadas	3488
Reflex. únicas	3488	Reflex. Observadas (4σ)	2807
R (int.)	0.0000	Número de variables	287
GOOF	1.036	R final (4σ)	0.0457
wR2 final	0.1104	Largo del pico de respuesta (e/ Å^3)	0.195

4.3. Estudios teóricos

4.3.1. Análisis conformacional

El estudio conformacional consistió básicamente en dos experimentos para cada uno de los compuestos sintetizados: el primero consistió en encontrar el número de confórmeros en función del grado de rotación de los enlaces rotables y el segundo en obtener el rotámero de mínima energía para tomar como base su estructura para los cálculos posteriores en donde se emplearon métodos de química cuántica.

4.3.1.1. Estudio del número de confórmeros en función del grado de rotación de los enlaces rotables

Se tomó como ejemplo mostrar los resultados encontrados para el compuesto LQM – 312, la Figura 4.3.1.1 muestra en general, los enlaces rotables que tienen todas las moléculas que fueron estudiadas y la Tabla 4.3.1.1 se presenta el número de confórmeros en función de la variación del ángulo de rotación de los enlaces rotables del compuesto LQM-312 (en donde R es un grupo nitro), la diferencia máxima de energía entre cada confórmero se mantiene constante y el valor empleado es el que comúnmente se emplea en las búsquedas sistemáticas los cuales no ocupan tiempos de máquina considerables.

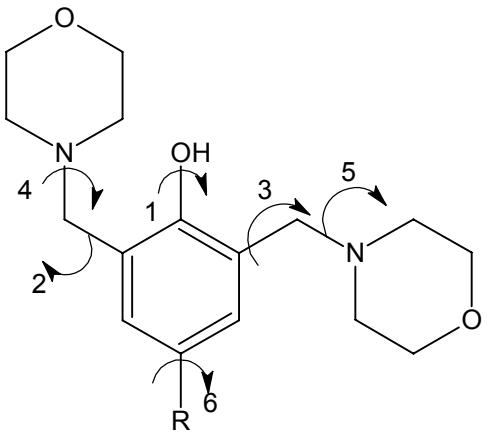


Figura 4.3.1.1. Enlaces rotables de LQM-300's

Tabla 4.3.1.1.1. Número de confórmeros en función del ángulo de rotación de los enlaces rotables

LQM	< (°)	Diferencia de Emáx., entre confórmeros (Kcal/mol)	Número de confórmeros	№ enlaces rotables	Tiempo de máquina
312	30	0.05	10	6	1.11''
312	15	0.05	14	6	40.65''
312	10	0.05	78	6	7' 22.04''
312	5	0.05	614	6	7h 49'10.67''
312	1	0.05	113017	6	5d 11h 31' 33''

4.3.1.2. Estudio de las gráficas energía potencial vs confórmeros. Selección de la estructura de mínima energía

Para ejemplificar esta parte de la investigación se presenta lo encontrado con el compuesto LQM – 306. La Figura 4.3.1.2.1 muestra la gráfica de energía potencial para el compuesto LQM – 306 respecto al ángulo de rotación del enlace rotable 4, el ángulo de rotación es de 1°. Cada punto en la gráfica representa a uno de los confórmeros.

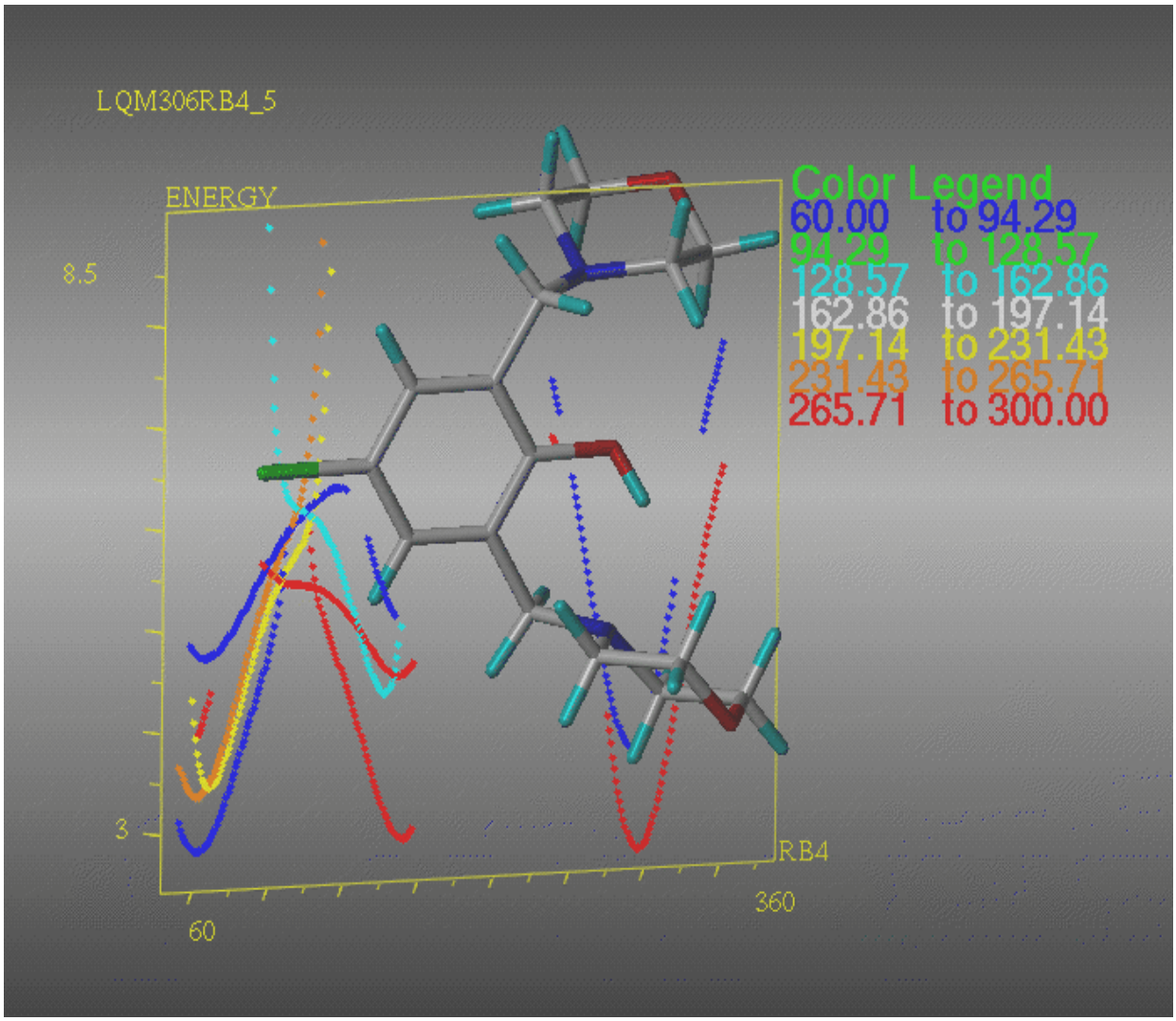


Figura 4.3.1.2.1. Gráfica de energía potencial respecto a la rotación del enlace rotable 4 del compuesto LQM-306

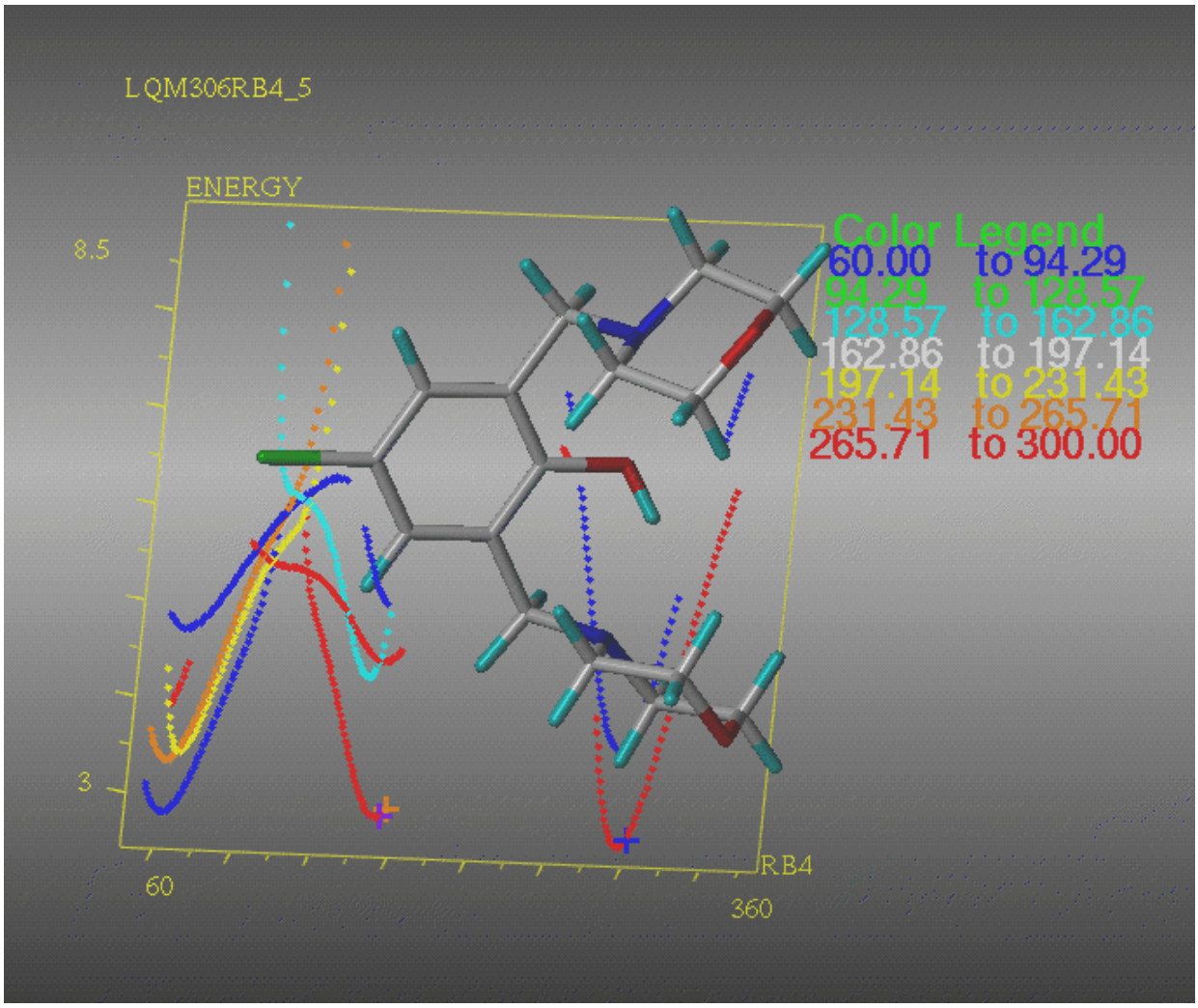


Figura 4.3.1.2.2. Gráfica de Energía potencial, conformeros cis del compuesto LQM -306

La Figura 4.3.1.2.2 muestra los tres mínimos conformacionales encontrados, los dos marcados en la gráfica corresponden a los confórmeros cuyos anillos morfolínicos se encuentran *cis* al plano del fenol, el otro mínimo no marcado representa al confórmero con los sustituyentes morfolínicos *trans* al plano del anillo del fenol. La Figura 4.3.1.2.3 muestra lo expresado anteriormente pero desde el plano perpendicular al plano del fenol.

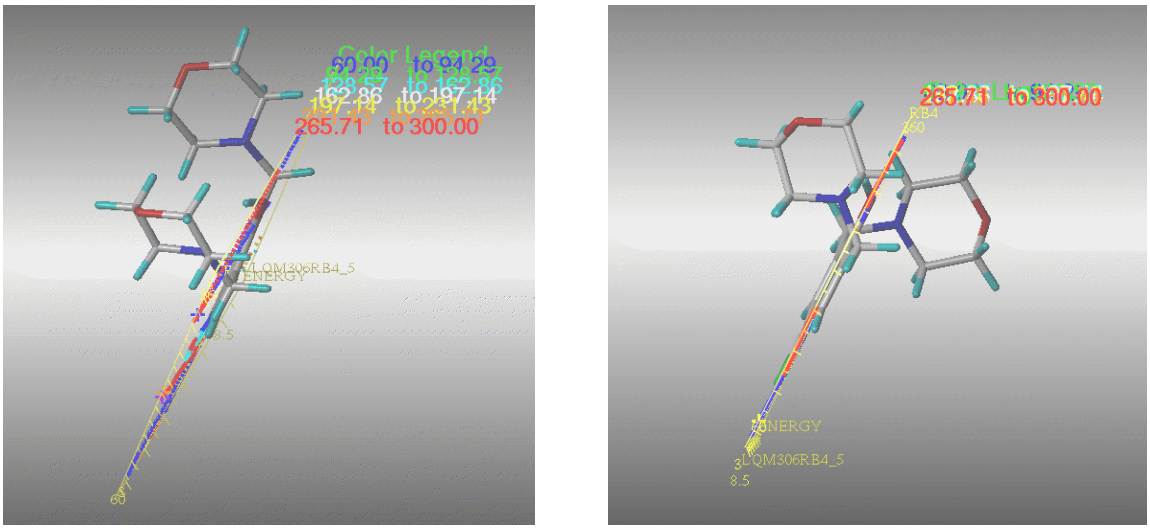


Figura 4.3.1.2.3. Vista desde el plano de fenol de los rotámeros *cis* y *trans* del compuesto LQM - 306

Como se mencionó en la figura 4.3.1.2.2 se observan dos confórmeros *cis*, sin embargo, uno de ellos es de menor energía 2.62664 kcal/mol (CNF_101) y el otro confórmero *cis* tiene una energía de 2.84384 kcal/mol (CNF_6) esta diferencia no es significativa.

La Figura 4.3.1.2.4 ilustra la diferencia tanto energética como estructural, entre estos dos confórmeros.

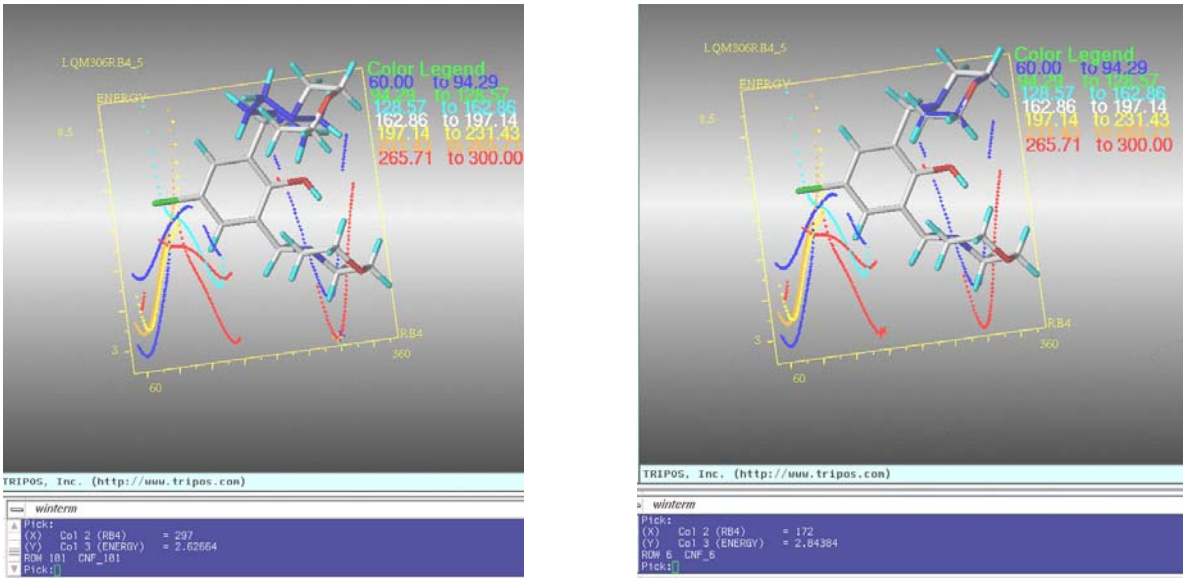


Figura 4.3.1.2.4. Diferencias entre los confórmeros *cis* del compuesto LQM - 306

Los resultados tanto en energía como en estructura del confórmero *trans* se muestran en la Figura 4.3.1.2.5.

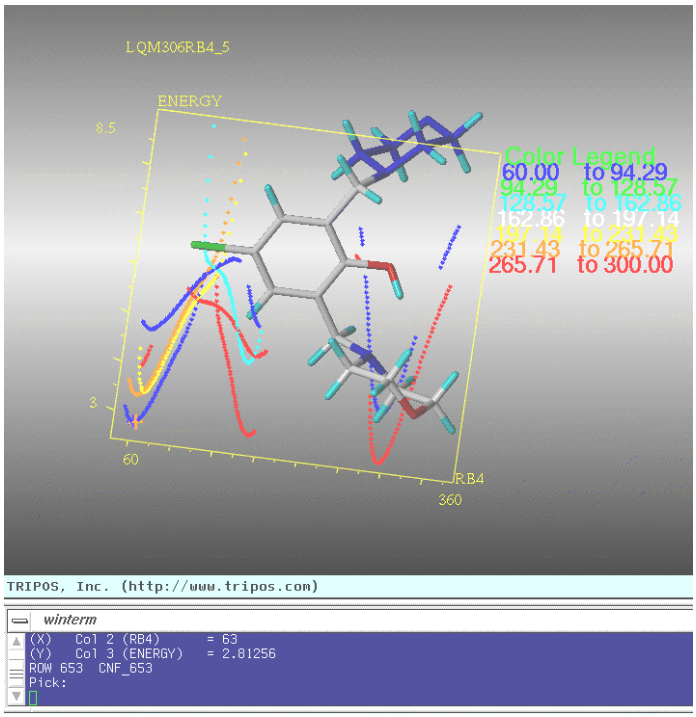


Figura 4.3.1.2.5. Energía y estructura del confórmero *trans* del compuesto LQM - 306

El confórmero intermedio (uno de los sustituyente morfolínicos se encuentra en el mismo plano que el fenol), así como su energía, entre las posiciones *cis* y *trans* se muestra en la Figura 4.3.1.2.6.

Si se analiza las diferencias de energía, datos mostrados en la Tabla 4.3.1.1, observamos que éstas son mínimas entre los isómeros *cis*_101 y *cis*_6 por lo tanto los dos isómeros pueden coexistir. Respecto al isómero *trans*_653, aunque su energía es menor que el isómero *cis*_6, la barrera energética que tiene que remontar es elevada respecto a los valores de los mínimos conformacionales, sin embargo, las estructuras encontradas en el análisis de difracción de rayos X corresponden a la conformación *trans*. Posiblemente se debe a que esta conformación posibilita un mejor empaquetamiento en la red cristalina.

Tabla 4.3.1.2.1. Datos energéticos de los confórmeros *cis*, *trans* e intermediario del compuesto LQM - 306

Confórmeros	Energía (kcal/mol)
CNF101 (*cis*)	2.62664
CNF6 (*cis*)	2.84384
CNF653 (*trans*)	2.81256
CNF433 (intermedio o en el plano)	8.31729

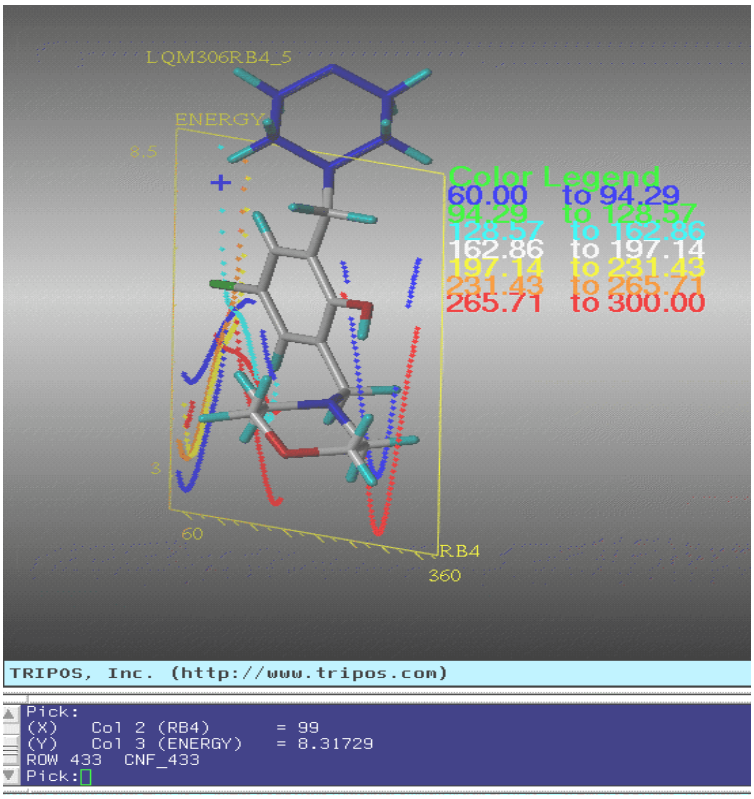


Figura 4.3.1.2.6. Energía y estructura del confórmero intermediario entre el cis y el trans del compuesto LQM – 306

En la Figura 4.3.1.2.7 se muestran las estructuras resultado del análisis de rayos X, de los compuesto LQM-309 y LQM-321, se ocultaron los átomos de hidrógeno para visualizar mejor las posiciones *trans* de los heterociclos respecto al plano de fenol.

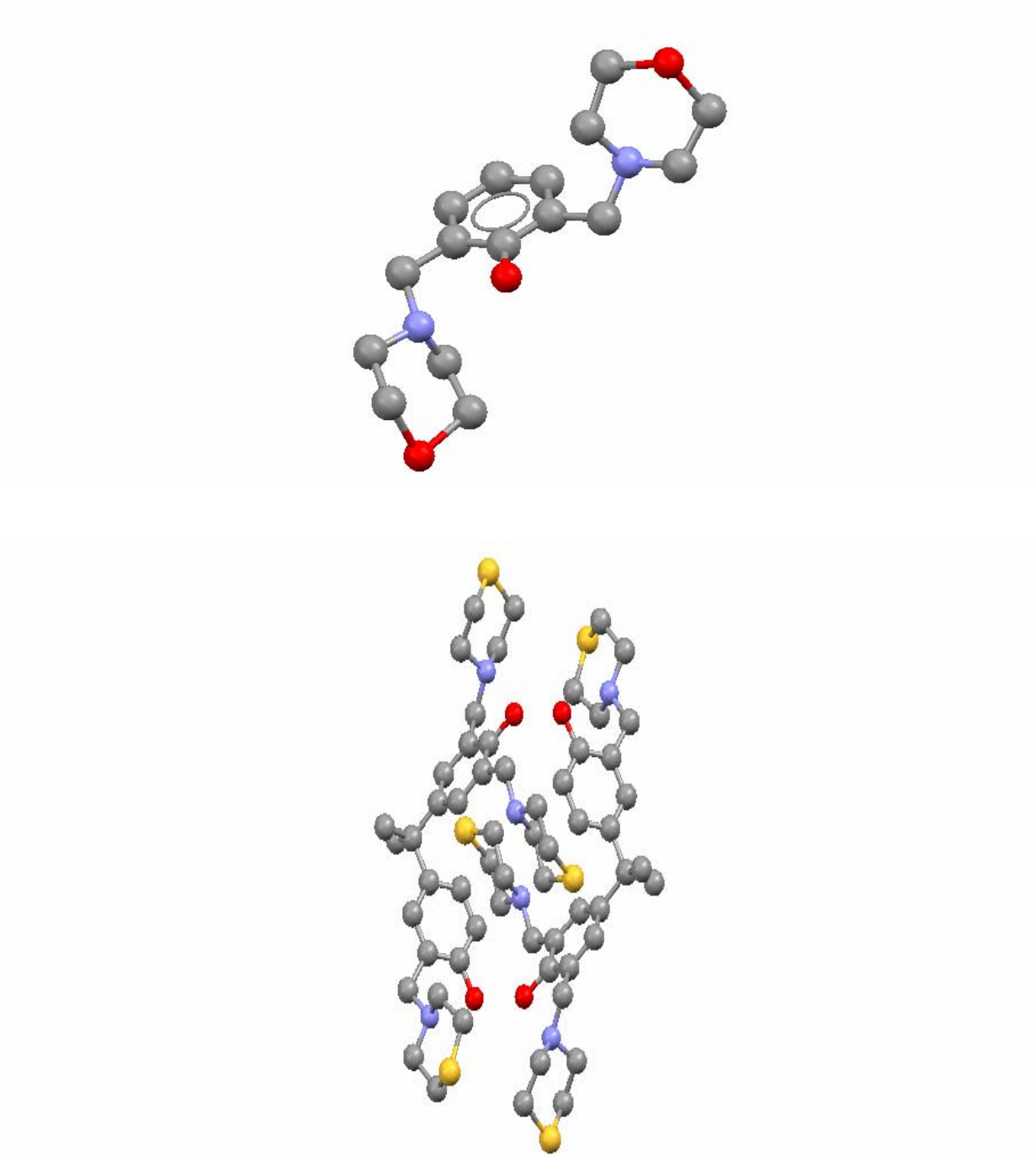


Figura 4.3.1.2.7. Estructuras resultado del análisis de rayos X, LQM-309 y LQM-321

4.3.2. Resultados de las optimizaciones geométricas empleando los métodos semiempíricos, *ab initio y* funcionales de la densidad

En las Tablas 4.3.2.1 y 4.3.2.2 se muestran los resultados de algunos de los descriptores y los datos geométricos de 12 de las moléculas en estudio, obtenidos en la optimización estructural empleando el método semiempírico PM3, los espacios con ND de la Tabla 4.3.2.2 se debe a que esos compuestos son monosustituidos y el dato no fue determinado:

Tabla 4.3.2.1. Descriptores de 12 moléculas optimizadas por el método PM3

LQM	ΔH_f (kcal/mol)	PI(eV)	MD(debye)	HOMO(eV)	LUMO(109)(eV)
301	-234.209336	8.8646	3.411	-8.8646	0.1243
302	-86.589086	8.9605	1.765	-8.9605	0.1517
303	-175.266996	8.6772	3.592	-8.6772	0.3413
304	-83.507479	8.9509	2.001	-8.9508	0.3736
305	-124.321189	8.8982	2.518	-8.8981	0.371
306	-93.85972	9.1314	1.587	-9.1313	-0.0696
307	-107.941806	8.9225	1.508	-8.9225	0.0858
308	-62.594857	9.0959	1.448	-9.0958	0.4141
309	-102.063878	8.8477	2.663	-8.8477	0.5174
310	-147.720102	8.6707	1.263	-8.6706	0.4280
311	-188.209017	8.7828	2.849	-8.7827	0.2170
312	-111.652706	9.415	5.26	-9.4149	-0.5368

Tabla 4.3.2.2. Datos geométricos de 12 moléculas optimizadas por el método PM3

Distancia N-H (OH) (Å)	ángulo CCN (°)	ángulo CCN2 (°)	ángulo de torsión CCNC (°)	ángulo de torsión CCNC2 (°)
1.836	111.06	112.40	153.80	280.30
2.484	111.92	ND	341.00	107.70
1.839	111.56	112.33	76.80	203.00
4.302	110.89	ND	159.60	286.50
2.426	111.88	110.62	64.50	191.00
2.432	111.74	110.46	167.70	294.30
2.442	111.81	110.60	169.40	295.80
2.475	112.21	ND	60.00	186.30
1.838	111.52	110.79	79.10	205.90
2.470	112.01	111.85	62.40	188.60

Es importante destacar que con la optimización geométrica empleando el método semiempírico PM3 la distancia entre el N de la morfolina y el hidrógeno del oxígeno del fenol es de 1.836, 1.839 y 1.838 para los compuestos LQM-301, LQM-303 y LQM309 respectivamente, estos valores coinciden con las longitudes de enlace intramolecular que encontró Glôwka en 1991 en los compuestos estudiado que presentaban actividad antiarrítmica con valores de 1.83 y 1.84.

En las Tablas 4.3.2.3 y 4.3.2.4 se muestran los resultados de algunos de los descriptores y los datos geométricos de 12 de las moléculas en estudio, obtenidos en la optimización estructural empleando el método *ab initio*, empleando el conjunto de base 6-31g:

Tabla 4.3.2.3. Descriptores de 12 moléculas optimizadas por el método HF-631g

LQM	ΔH_f (kcal/mol, 25 °C)	MD (debye)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Log P	Area	Volumen
301	-1336.81	2.541	-8.9751	0.1018	0.4949	451.46	465.25
302	-812.56	0.537	-8.8258	0.2972	1.8283	498.11	495.39
303	-919.75	3.184	-8.7619	0.3758	1.1956	604.85	607.78
304	-483.92	1.594	-9.1139	0.9287	2.1894	232.5	227.38
305	-591.11	1.746	-9.0098	0.7703	1.5567	308.89	310.72
306	-473.47	3.544	-8.1647	-0.0566	0.1256	238.77	231.75
307	-515.54	2.013	-9.0520	0.5237	0.0064	272.17	269.74
308	-372.27	1.238	-9.7270	0.9042	0.6419	178.99	170.27
309	-479.46	1.834	-9.0195	0.7275	0.0092	257.67	254.82
310	-470.43	0.073	-8.6095	0.4875	-1.2200	254.76	253.71
311	-824.6	1.183	-8.3276	1.2891	-1.9000	256.61	255.33
312	-736.73	4.911	-9.3716	0.0371	-2.587	276.42	274.7

Tabla 4.3.2.4. Datos geométricos resultado del método HF-631g

Distancia N-H(OH) (Å)	ángulo CCN (°)	ángulo CCN2 (°)	ángulo de torsión CCNC (°)	ángulo de torsión CCNC2 (°)
1.596	112.76	112.09	165.20	-65.17
1.974	113.28	ND	-164.25	66.28
1.958	113.36	112.22	-164.78	65.83
3.195	110.25	ND	150.19	-75.47
1.573	112.03	110.87	-164.81	65.00
1.492	144.52	150.35	-107.02	107.02
1.553	111.77	110.46	163.87	-65.99
1.570	110.94	ND	-164.81	65.07
1.570	112.14	111.07	-164.80	65.07
1.614	111.52	111.5	163.37	-69.25

En este caso los valores de la longitud del enlace intramolecular es menor, sin embargo, posteriormente se puede evaluar la relación que existe entre este valor y la actividad biológica hipotensora y/o de disminución de la FC.

En las Tablas 4.3.2.5 y 4.3.2.6 se muestran los resultados de algunos de los descriptores y los datos geométricos de 12 moléculas, obtenidos en la optimización estructural empleando el método DFT y el conjunto de base B3LYP/6-31g, los valores de los enlaces intramoleculares son más cercanos a los reportados por Glôwka.

Tabla 4.3.2.5. Descriptores de 12 moléculas optimizadas por el método DFT

LQM	ΔH_f (kcal/mol, 25 °C)	MD (debye)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Log P	Area	Volumen
301	-1045.66				0.1551		
302	-439.88	0.495	-8.7049	0.2354	3.2329	506.31	502.12
303	-538.20	3.692	-8.7394	0.2573	2.7755	623.98	619.87
304	-297.58	2.108	-8.9167	0.3451	2.8917	327.09	311.24
305	-395.90	2.852	-8.6597	0.2756	2.4343	439.93	427.16
306	-278.26	2.475	-8.9785	-0.0862	1.5586	384.06	371.00
307	-320.33	2.993	-9.0469	-0.1648	1.2879	374.45	364.62
308	-194.80	1.956	-8.9021	0.2487	0.5630	243.47	229.42
309	-293.12	2.632	-8.8344	0.1848	0.7297	358.26	345.43
310	-470.43	0.591	-8.4289	0.0656	0.3402	367.04	355.04
311	-647.74	4.433	-8.5812	0.2173	-0.0493	375.82	365.25
312	-541.52	5.807	-9.5204	-1.1924	0.0225	390.21	377.08

Tabla 4.3.2.6. Datos geométricos de 12 moléculas optimizadas con el método DFT

Distancia N-H(OH)Å	ángulo CCN (°)	ángulo CCN2 (°)	ángulo de torsión CCNC (°)	ángulo de torsión CCNC2 (°)
1.633	111.150	111.48	-68.07	167.31
1.852	113.000	112.88	-165.59	71.04
1.832	113.130	113.50	-166.03	70.56
5.113	113.190	ND	148.98	65.34
1.836	113.010	113.36	-165.86	70.64
1.819	112.870	113.04	-164.81	71.65
1.808	113.200	117.94	-164.41	72.19
1.850	112.960	ND	-165.98	70.58
1.830	112.980	113.36	-165.81	70.72
1.869	112.860	ND	-166.38	70.31
1.855	113.000	ND	-166.66	69.75
1.766	112.760	112.67	-163.34	73.18

4.3.3. Validación del método teórico

Para validar el método de cálculo se determinaron los valores absolutos de las diferencias entre las distancias de enlace obtenidas de los métodos de cálculo y las obtenidas del análisis de difracción de rayos X para las estructuras de los compuestos LQM-309, LQM-318, LQM321 y LQM-324. En la Tabla 4.3.3.1 se muestran los resultados de las distancias de enlace resultado de los métodos de cálculo para optimizar la geometría del compuesto LQM-318.

Posteriormente se calculó el promedio de las diferencias, se realizó una regresión lineal de los valores calculados y los experimentales y se observó cual de los métodos tenía un valor promedio de las diferencias menor, esto se muestra en la Tabla 4.3.3.2.

Tabla 4.3.3.1. Comparación de longitudes de enlace para la molécula del LQM-318

Comparación de las longitudes de enlace						
	Experimental	**PM3**	**HF 6-31g**	**HF 3-61g++**	**DFT B3LYP 6-31g**	**DFT B3LYP 6-31g ++**
C1 S40	1.80228	1.82058	1.87605	1.87396	1.8998	1.89736
C1 C7	1.51088	1.52029	1.51897	1.51847	1.52449	1.52452
C4 S40	1.79157	1.82021	1.87477	1.87261	1.89792	1.89536
C4 C10	1.50969	1.52084	1.52003	1.51939	1.52589	1.52562
C10 N38	1.46534	1.49713	1.46902	1.46903	1.4848	1.48545
C7 N38	1.46472	1.49771	1.4705	1.47038	1.48817	1.4882
C13 N38	1.47425	1.49846	1.47532	1.47538	1.49611	1.49641
C13 C16	1.51244	1.49889	1.51306	1.51323	1.51597	1.51587
C16 C17	1.39679	1.40791	1.38989	1.38947	1.4104	1.40932
C17 O39	1.36919	1.36271	1.37231	1.37546	1.38276	1.38961
C17 C18	1.37295	1.40444	1.38553	1.38587	1.40013	1.39939
C18 C20	1.37572	1.39497	1.38097	1.38296	1.39307	1.39537
C20 C22	1.39773	1.39888	1.39824	1.39903	1.41095	1.41186
C22 C37	1.53513	1.51604	1.539	1.53911	1.54348	1.54433
C29 C37	1.54273	1.53113	1.54536	1.54559	1.55366	1.55463
C33 C37	1.52486	1.52971	1.5401	1.53996	1.54616	1.54643
C25 C37	1.51922	1.52975	1.54535	1.54557	1.55376	1.5546
C22 C23	1.3774	1.39318	1.39011	1.3914	1.40333	1.40499
C16 C23	1.38865	1.39497	1.39406	1.39539	1.40381	1.4053

Tabla 4.3.3.2. Valor absoluto de la diferencia de las longitudes de enlace calculadas

Diferencia (valor absoluto) de las longitudes de enlace calculadas con respecto a la experimental					
	PM3	**HF 6-31g**	**HF 3-61g++**	**DFT B3LYP 6-31g**	**DFT B3LYP 6-31g ++**
C1 S40	0.0183	0.07377	0.07168	0.09752	0.09508
C1 C7	0.00941	0.00809	0.00759	0.01361	0.01364
C4 S40	0.02864	0.0832	0.08104	0.10635	0.10379
C4 C10	0.01115	0.01034	0.0097	0.0162	0.01593
C10 N38	0.03179	0.00368	0.00369	0.01946	0.02011
C7 N38	0.03299	0.00578	0.00566	0.02345	0.02348
C13 N38	0.02421	0.00107	0.00113	0.02186	0.02216
C13 C16	0.01355	0.00062	0.00079	0.00353	0.00343
C16 C17	0.01112	0.0069	0.00732	0.01361	0.01253
C17 O39	0.00648	0.00312	0.00627	0.01357	0.02042
C17 C18	0.03149	0.01258	0.01292	0.02718	0.02644
C18 C20	0.01925	0.00525	0.00724	0.01735	0.01965
C20 C22	0.00115	0.00051	0.0013	0.01322	0.01413
C22 C37	0.01909	0.00387	0.00398	0.00835	0.0092
C29 C37	0.0116	0.00263	0.00286	0.01093	0.0119
C33 C37	0.00485	0.01524	0.0151	0.0213	0.02157
C25 C37	0.01053	0.02613	0.02635	0.03454	0.03538
C22 C23	0.01578	0.01271	0.014	0.02593	0.02759
C16 C23	0.00632	0.00541	0.00674	0.01516	0.01665
Promedio de la diferencia	0.01619474	0.0147842	0.015018947	0.02648	0.027004211
R^2		0.9928601	0.987755403	0.99831463	0.998384389
m		1.1635325	1.133342372	1.015239065	1.013726637

En las tablas se observa que hay un error promedio menor al evaluar las longitudes de enlace con el método *ab initio* sin difusión, se muestra un valor de la propiedad más cercano al valor experimental (obtenido en el análisis de difracción de rayos X). Otro aspecto importante a destacar es que todas las optimizaciones sobreestiman el enlace carbono - azufre, ya que el valor experimental es de 1.80228 Å, y los obtenidos sobre todo en las optimizaciones con DFT son de 1.8998 y 1.89736 Å, la diferencia es mayor con el método DFT sin difusión como se ejemplifica en la Figura 4.3.3.1.

Si bien es cierto que en el método semiempírico PM3 se tiene un error promedio mayor, el valor del enlace C4 – S4 se encuentra más cercano al valor experimental.

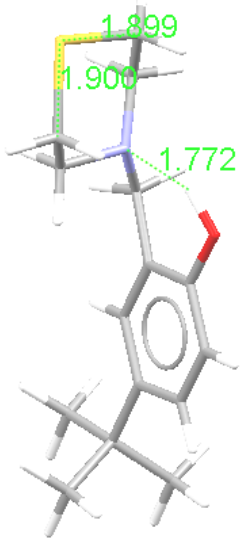


Figura 4.3.3.1. Optimización con DFT sin difusión de la estructura del LQM-318

El resultado de la otra forma de validar el método, es decir, de la sobreposición de las estructuras obtenidas de la difracción de rayos X y de las obtenidas por diversos métodos de cálculo teórico de la molécula del compuesto LQM-318 se muestra en las Figuras 4.3.3.2 y 4.3.3.3.

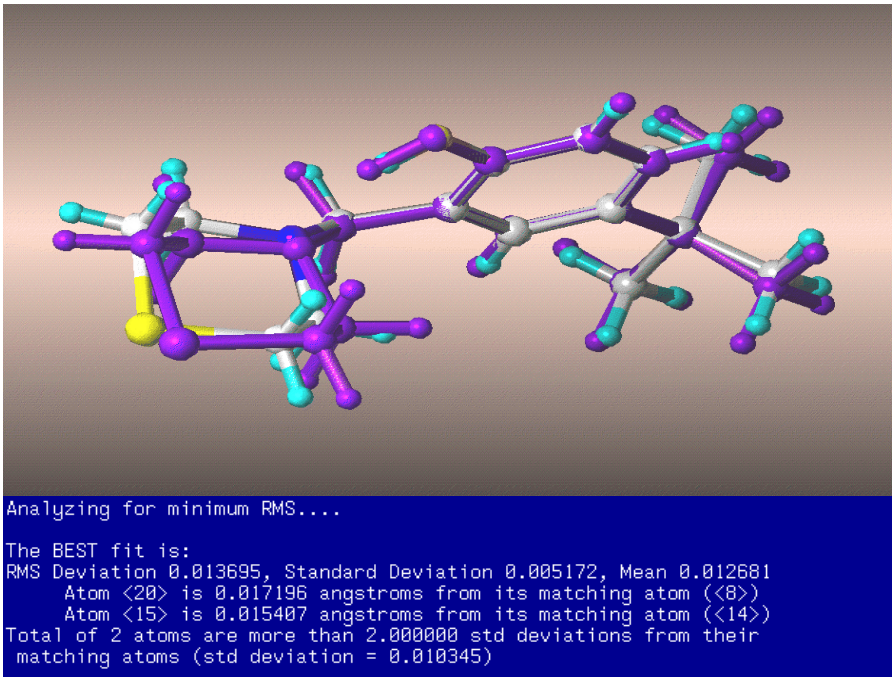


Figura 4.3.3.2. Comparación de la estructura obtenida por el método DFT (B3lyp/6-31g) con la estructura obtenida por análisis de rayos X del LQM-318

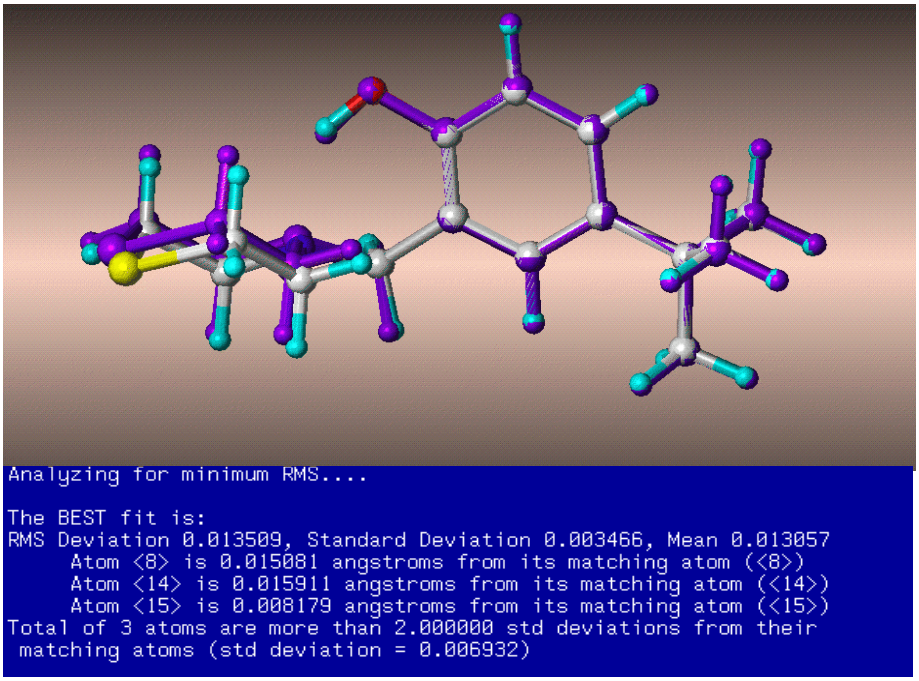


Figura 4.3.3.3. Comparación de la estructura obtenida por el método HF (6-31g) con la estructura obtenida por análisis rayos X del LQM-318

En la Figura 4.3.3.2 se muestra que la desviación estándar para la sobreposición de la estructura obtenida en la difracción de rayos X y la geometría optimizada por el método DFT en donde se emplearon las funciones de base B3lyp/6-31g es de 0.010345, la cual evaluada en porcentaje es de 1.035%. En la Figura 4.3.3.3 aparece el empalmaje de la estructura resultante del análisis de la difracción de rayos X con la estructura optimizada obtenida por el método HF empleando la función de base 6-31g, la desviación estándar evaluada en porcentaje es del 0.6932%.

Se puede afirmar entonces que el método teórico que mejor describe la estructura, de los compuestos en estudio, encontrada por difracción de rayos X es el *ab initio* que empleó la función de base 6-31g sin difusión.

4.4. Determinación de propiedades fisicoquímicas o descriptores

4.4.1. Cálculo teórico de los descriptores

En la Tabla 4.4.1.1 se muestran solamente tres de los descriptores que se mencionaron en la metodología, los demás descriptores se calcularon y se tienen las tablas correspondientes que pueden ser solicitadas. De los resultados mostrados en la tabla es importante destacar que las entalpías de formación para todos los compuestos sintetizados son negativas, pudiendo expresar que las reacciones de formación de los compuestos son exotérmicas.

Tabla 4.4.1.1. Descriptores obtenidos del cálculo teórico HF_6-31g

LQM	ΔH_f (kcal/mol // 25 °C)	E. de solvatación	MD(debye)	LUMO (eV)
301	-1336.81	-16.877	2.541	0.101754081
302	-812.56	-23.717	0.537	0.297233877
303	-919.75	-23.018	3.184	0.375835948
304	-483.92	-3.231	1.594	0.928715394
305	-591.11	-5.345	1.746	0.7703034
306	-473.47	-45.095	3.544	-0.056641125
307	-515.54	-6.447	2.013	0.52366521
308	-372.27	-9.618	1.238	0.904160818
309	-479.46	-7.801	1.834	0.727446615
310	-470.43	-11.668	0.073	0.487461708
311	-824.6	-16.315	1.183	1.28910722
312	-736.73	-16.93	4.911	0.037129542
313	-652.66	-3.986	1.359	0.607367199
314	-486.64	-9.087	4.043	0.33289231
315	-738.68	-1.227	4.058	0.479308504
316	-454.23	-15.257	1.137	0.919717863
317	-231.09	-16.795	1.47	0.208856559
318	-306.66	-10.195	1.127	-0.033706605
319	-236.59	-11.486	2.083	-0.072277488
320	-458.04	-14.416	1.529	-0.049739499
321	-387.97	-23.313	1.421	-0.099724541
322	-470.08	-9.49	2.521	0.077933358
323	-297.51	-13.894	1.858	0.058179306
324	-452.28	-13.565	4.277	-0.798598807

4.4.2. Determinación experimental de descriptores

4.4.2.1. Determinación de Log P mediante el método de espectrofotometría UV-Vis

Los resultados de la determinación de las longitudes de onda en las cuales la absorción de la luz ultravioleta visible es máxima, se muestran en la Tabla 4.4.2.1

Cabe mencionar que las diferencias entre las longitud de onda a las que absorben los compuestos estudiados en algunos casos es pequeña pero suficiente para distinguir un compuesto de otro. La determinación de este parámetro es importante para determinar la curva de calibración y posteriormente encontrar la absorbancia en la fase orgánica de cada compuesto para interpolar en la curva de calibración y encontrar la concentración.

Tabla 4.4.2.1. Longitud de onda de absorbancia máxima

COMPUESTO	λ de absorción máxima de luz UV (nm)
LQM - 307	288.80
LQM - 312	318.20
LQM - 313	299.30
LQM - 318	280.00
LQM - 319	284.90

Un ejemplo de los datos empleados en la curva de calibración midiendo la absorbancia en función de la concentración y de la determinación de la absorbancia de la muestra en *n* - octanol después de centrifugar se muestra en la Tabla 4.4.2.2, en ella se presenta el comportamiento del compuesto LQM-307 en el estudio realizado por triplicado.

Tabla 4.4.2.2. Absorbancias de las soluciones en *n* - octanol del compuesto LQM-307 tanto en la curva de calibración como en las muestras

LQM - 307		
MUESTRA	**ABSORBANCIA**	**CONCENTRACIÓN (ppm)**
Std. 1	0.3768	10.56
Std. 2	0.6463	26.39
Std. 3	1.3959	65.98
Std. 4	2.2700	109.96
	$r^2 = 0.9842$	
Muestra 1	0.5485	26.09
Muestra 2	0.5698	27.10
Muestra 3	0.5554	26.42

Después de encontrar la concentración del compuesto en *n* - octanol, por diferencia con la cantidad inicial se obtuvo la concentración del compuesto en la fase acuosa y se calcularon los Log P correspondientes, los resultados experimentales comparados con los valores de Log P calculados por diversos paquetes de cálculo se muestran en la Tabla 4.4.2.3.

Tabla 4.4.2.3. Resultados de Log P

LQM	Log P experimental	Log P Calculado con SYBYL	Log P Calculado con TSAR	Log P Calculado con ChemPro	Log P Calculado con ACD/Labs
307	1.00	2.45	1.3668	1.2870	1.10 ± 0.47
312	0.52	1.25	0.8044	0.025	0.24 ± 0.47
313	1.10	1.57	0.5981	0.6033	-0.02 ± 0.47
318	1.95	3.68	3.3762	3.6135	3.38 ± 0.53
319	2.03	4.06	3.363	3.8779	2.69 ± 0.37

Como se observa en la Tabla 4.4.2.3 los valores experimentales difieren de los valores calculados por los programas computacionales, de estos programas Sybyl marca que en el cálculo ocurrió el error 54, el cual se refiere a que el programa no

cuenta con suficientes datos para calcular los heterociclos y que los valores finales son resultado de varias aproximaciones que efectúa durante el cálculo correspondiente, también ACD/Labs mencionó en el protocolo de cálculo que carece de datos experimentales de los heterociclos y para el enlace del heterociclo con el metileno unidos al fenol asigna un valor aproximado correspondiente para estas partes de la molécula, por lo tanto es importante la determinación experimental de este descriptor, no solamente con el método espectrofotométrico sino también con otros métodos como los cromatográficos y por electroforesis capilar.

4.4.2.2. Determinación de pKa mediante el método de electroforesis capilar

Para determinar los valores de pKa del compuesto LQM-305, como primer paso, se determinó el tiempo de migración promedio tanto para el compuesto como para el marcador electroosmótico (acetona) a diferentes valores de pH. Los resultados de estos tiempos de migración promedio se muestran en la Tabla 4.4.2.2.1

Tabla 4.4.2.2.1. Tiempos de migración promedio en minutos

pH	LQM-305	Acetona
2.26	3.23	0
3.13	4.09	0
4.08	4.17	0
5.04	2.40	3.25
5.94	3.08	4.34
7.03	3.11	3.73
8.09	3.28	3.42
9.04	2.75	2.75
10.05	2.71	2.71

Posteriormente, se realizó el cálculo de la movilidad efectiva del compuesto para cada valor de pH empleando la siguiente ecuación:

$$m_{ef} = \frac{Ll}{V}\left[\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}}\right]$$

En donde l es la distancia desde el final de la inyección de el capilar al detector y para detección on-column será considerada igual que la longitud de la columna (L); V

es el voltaje aplicado; t_m es el tiempo de migración para la muestra y t_{eo} es el tiempo de migración del marcador neutral que es arrastrado a través de la columna por el flujo electroosmótico. En esta experimentación los valores de L, l y V fueron los siguientes: 30.0 cm, 40.0 cm y 20000.0 V respectivamente. La Tabla 4.4.2.2.2 muetra los resultados de la movilidad efectiva del LQM-305.

Tabla 4.4.2.2.2. Movilidad efectiva del LQM – 305

pH	Movilidad efectiva ($cm^2V^{-1}min^{-1}$)
2.26	**0.01860**
3.13	**0.01466**
4.08	**0.01439**
5.04	**0.00656**
5.94	**0.00563**
7.03	**0.00322**
8.09	**0.00073**
9.04	**0**
10.05	**0**

Se procede entonces a graficar los valores de movilidad efectiva del compuesto como una función del pH, Figura 4.4.2.2.1:

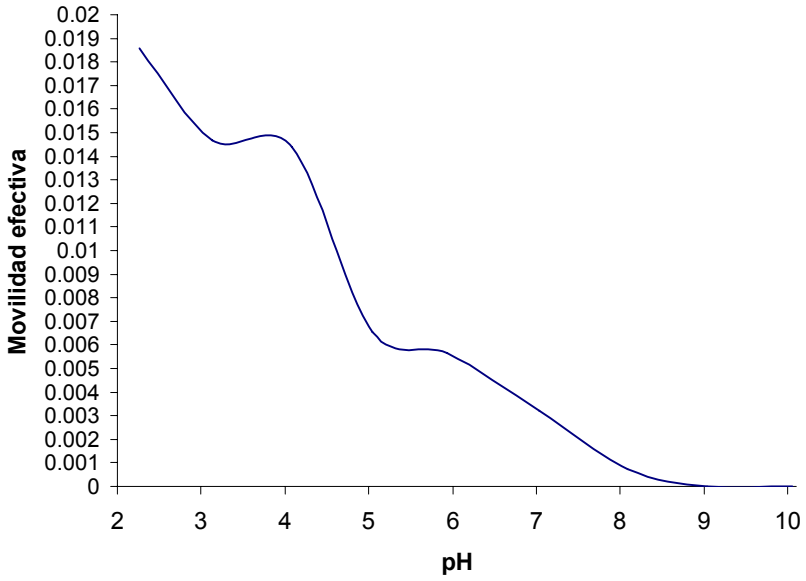


Figura 4.4.2.2.1. Gráfica de movilidad efectiva en función del pH del compuesto LQM - 305

Una vez que se ha realizado el gráfico, se procede a analizarlo y realizar la determinación de los valores de pKa_1 y pKa_2 del compuesto por el método tradicional, es decir, trazando las tangentes paralelas en las inflecciones del gráfico, en este caso 2 inflecciones, y se realizan las interpolaciones pertinente en el eje de las abscisas, los valores de pH resultado de esta interpolación corresponden a los valores de pKa.

Los valores de pKa determinados para el compuesto LQM-305 por electroforesis capilar se muestran en la Figura 4.4.2.2.2 y en la Tabla 4.4.2.2.3.

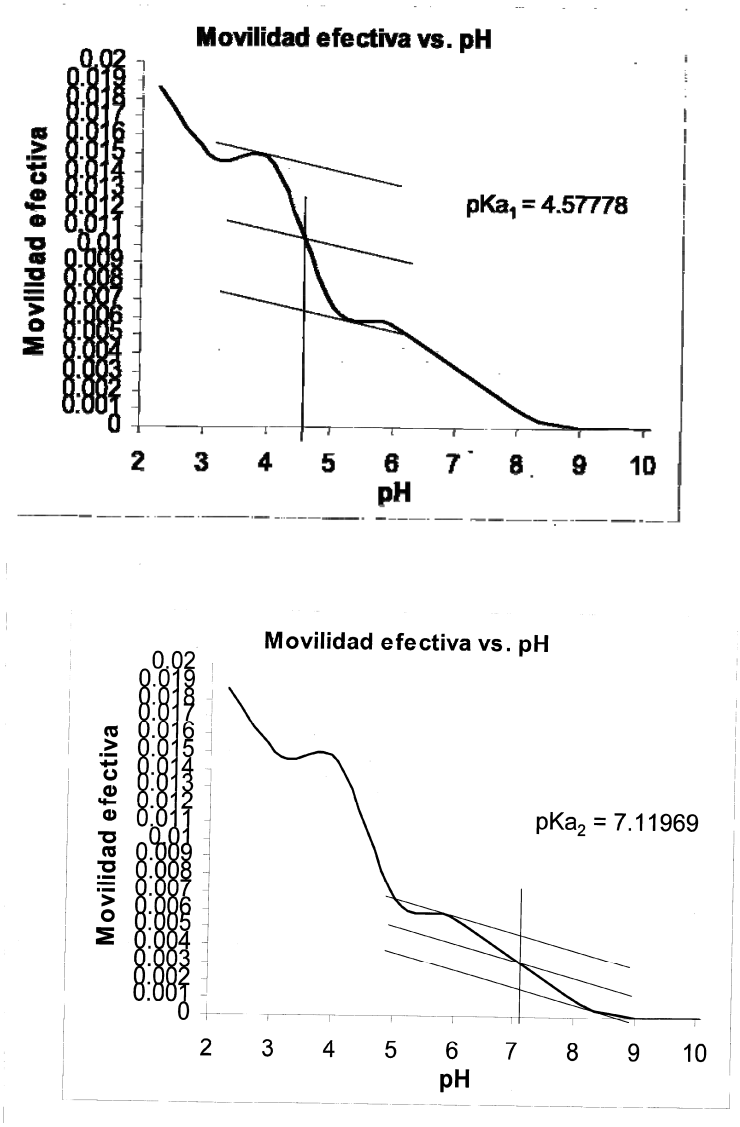


Figura 4.4.2.2.2. Determinación de los valores de pKa del compuesto LQM - 305

Tabla 4.4.2.2.3. Valores de pKa determinados por electroforesis capilar y calculados

LQM	pKa_1 (exp)	pKa_2 (exp)	pKa_1 (calc) con ACD/Labs	pKa_2 (calc) con ACD/Labs
305	4,58	7.12	6.55 ± 0.50	8.28 ± 0.5
308	4.69	6.98	6.63 ± 0.12	10.18 ± 0.30
331	4.67	7.13	6.65 ± 0.2	10.18 ± 0.30
335	4.64	6.50	7.04 ± 0.5	10.52 ± 0.50

La determinación de los valores de pKa por electroforesis capilar está basada en la observación de la movilidad efectiva de un compuesto ionizable en una serie de soluciones electrolíticas de fuerza iónica constante y de diferente pH. Los valores de pKa se obtienen relacionando a la movilidad efectiva como una función del pH en un modelo conveniente para el número de grupos ionizables.

Las ventajas de realizar determinaciones de los valores de pKa por electroforesis capilar son:

- Es posible manejar muestras impuras debido a que la electroforesis capilar es una técnica de separación.
- No es necesario conocer la concentración exacta de la muestra. Únicamente se emplean los tiempos de migración en los cálculos, sin embargo los límites de detección en electroforesis capilar son del orden entre 10^{-6} y 10^{-9}M y la elección de la concentración depende también del coeficiente de extinción molar (manual del equipo de electroforesis capilar marca Beckman Coulter P/ACE™MDQ, Temperatura Controlled, UV/Vis and Diode Array Detectors).
- El consumo de muestra es insignificante.
- Es posible estudiar compuestos parcialmente solubles cuyos espectros puedan observarse de manera clara.
- No se requieren soluciones electrolíticas puras.
- La confiabilidad en las lecturas del equipo está entre 95-99%, de acuerdo al método que se desarrolle (manual del equipo de electroforesis capilar marca Beckman Coulter P/ACE™MDQ, Temperatura Controlled, UV/Vis and Diode Array Detectors).

Por todo lo anteriormente expresado sabemos que el método de determinación por electroforesis capilar es recomendable, confiable y reproducible.

Como puede observarse en la tabla los valores de pKa calculados con el ACD/Labs y experimentales son diferentes; en los valores experimentales se observa que para los compuestos LQM – 308 y LQM – 331, con diferencia entre los heteroátomos, ya que el 308 es un derivado de morfolina monosustituido y el 331 es un derivado de tiomorfolina también monosustituido, los valores correspondientes al equilibrio ácido base que involucra al nitrógeno del heteroátomo son muy semejantes no así los valores de pKa correspondientes al equilibrio del hidroxilo, el programa de cálculo muestra valores muy cercanos para el primer equilibrio e iguales para el segundo, es decir no diferencía el efecto de oxígeno del de azufre en los heteroátomos, por lo que es necesario determinar experimentalmente este descriptor.

Además, para verificar y validar los valores experimentales obtenidos es recomendable emplear otros métodos analíticos para determinar los valores de pKa de los compuestos en estudio.

Evaluación preliminar

de la

actividad biológica

4.5. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.5.1. EVALUACIÓN EN EL MODELO BIOLÓGICO DE RATA NORMOTENSA ANESTESIADA

4.5.1.1. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA DE LOS COMPUESTOS LQM300'S RESPECTO A CAPTOPRIL, LOSARTÁN Y OMAPATRILAT

De acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.5.1, se proporcionaron los resultados del efecto sobre la PAM, PAS, PAD y la FC de captopril y de los compuestos LQM-300 en estudio. Los datos de la evaluación biológica preliminar solo se tomaron en cuenta para alimentar el programa computacional para desarrollar el método CoMFA.

El modelo biológico empleado les permitió evaluar de manera preliminar el comportamiento de los compuestos sobre la presión y la frecuencia cardiaca el resumen de los resultados se muestra en la Tabla 4.5.1.1. Cabe mencionar que el compuestos LQM-318 es uno de los compuestos empleados en la serie de entrenamiento que mostró un mejor efecto sobre la frecuencia cardiaca y el compuesto LQM-319 es resultado del diseño molecular empleando el método CoMFA.

Tabla 4.5.1.1. Resumen de los efectos en las presiones y en la frecuencia cardiaca

DOSIS (mg/kg)	0.0001	0.001	0.01	0.1	1.0	3.1	10.0
PRESIÓN MEDIA (∆P, mmHg)							
CAPTOPRIL	15.20	15.00	28.00	17.20	23.00		
LQM-318	2.40	1.80	1.80	5.80	22.20	20.40	46.20
LQM-319	16.40	12.40	11.20	17.20	44.80	57.20	45.00
PRESIÓN SISTÓLICA (∆P, mmHg)							
CAPTOPRIL	17.20	25.00	25.00	14.00	19.60		
LQM-318	-0.20	4.00	9.40	5.40	20.70	14.60	37.20
LQ M-319	12.00	10.20	7.00	11.20	37.30	49.60	35.00
PRESIÓN DIASTÓLICA (∆P, mmHg)							
CAPTOPRIL	14.80	15.60	29.20	18.20	24.00		
LQM-318	3.00	4.40	-0.40	4.40	21.80	21.80	44.60
LQ M-319	17.80	13.20	12.60	17.20	47.10	58.60	43.80
FRECUENCIA CARDIACA (∆F, lat/min)							
CAPTOPRIL	24.00	14.80	17.60	6.60	16.80		
LQM-318	5.40	26.60	75.00	33.40	15.30	20.40	43.20
LQ M-319	23.60	3.40	5.80	5.80	91.10	114.20	68.40

Como desde el punto de vista biológico se desea administrar dosis más pequeñas para tener menores probabilidades de que los compuestos muestren efectos tóxicos y disminuir los efectos secundarios, al analizar los datos de los efectos producidos cuando se administran los compuestos a la dosis de 0.0001 mg/kg para la PAM se observa que el captopril muestra una disminución de la presión basal de 15.20 mmHg y el compuesto LQM-319 de 16.40 mmHg, la diferencia es pequeña; también es importante señalar que la dosis en la cual captopril muestra un efecto máximo de ΔP de 28.0 mmHg es a 0.01 mg/kg mientras que a esa misma dosis el LQM-319 presenta un valor de 11.20. También es importante conocer el tiempo que dura este efecto lo cual será objeto de otro estudio.

En el caso de la PAS a dosis de 0.0001 mg/kg el captopril presenta una disminución de 17.20 mmHg mientras el LQM-319 la muestra de 12.0 mmHg. Para la PAS las disminuciones son de 14.80 y 17.80 mmHg respectivamente. El efecto sobre la disminución de la FC a esta dosis es de 24 latidos/minuto para captopril, este valor es a su vez la actividad de disminución máxima que presenta, y de 23.6 latidos/minuto para LQM-319.

Captopril presenta un efecto máximo de disminución de la PAM de 28.00 mmHg en las dosis de 0.01 mg/kg, a esa dosis el LQM-319 muestra una disminución de la presión de 11.20 mmHg; para la PAS los valores de disminución máxima para captopril es de 25.0 mmHg a una dosis de 0.001 mg/kg a esa misma dosis la disminución que presenta el LQM-319 es de 10.20 mmHg; analizando lo que sucede con la PAD, los valores de disminución máxima para captopril es de de 29.20 mmHg a una dosis de 0.001 mg/kg a esa misma dosis la disminución que presenta el LQM-319 es de 12.60 mmHg.

A dosis de 3.1 y 10.0 mg/kg los compuestos LQM-319 y LQM-318 presentan los valores de disminución máxima de la presión media de 57.20 y 46.20 mmHg respectivamente, sin embargo hay que tomar en cuenta que estas dosis son 310 y 1000 veces mayores que la dosis en donde captopril presenta su efecto de

disminución máxima. El comportamiento de los tres compuestos para la PAS en donde el efecto máximo se presenta en las dosis 0.001, 10.0 y 3.1 mg/kg con valores de ΔP de 25.00, 37.20 y 49.60 mmHg para captopril, LQM-318 y LQM-319, respectivamente. Tendencia similar presenta el comportamiento para la PAD en donde el efecto máximo se presenta en las dosis 0.01, 3.1 y 10.0 mg/kg con valores de ΔP de 29.20, 58.60 y 44.60 mmHg para captopril, LQM-319 y LQM-318, respectivamente. Otro factor que hay que considerar es si los descensos altos en la presión provocan otros problemas en las ratas, lo cual se propone ser evaluado en otros experimentos.

Respecto a la FC se observa que el captopril tiene la disminución máxima de 17.60 latidos/minuto a una dosis de 0.01 mg/kg, a esa misma dosis el LQM-318 muestra también su efecto máximo con una disminución de 75 latidos/minuto, para el LQM-319 a la misma dosis el valor es de 5.80, sin embargo, presenta su máximo efecto a una dosis de 3.1 mg/kg con un valor de 114.20 latidos/minuto, para este caso también hay que efectuar las consideraciones anteriormente mencionadas.

Por lo anterior se puede decir que tanto el compuesto sintetizado y empleado en la serie de entrenamiento (LQM-318) como el diseñado en un estudio preliminar de CoMFA (LQM-319) muestran un efecto sobre la presión arterial media, sistólica, diastólica y sobre la frecuencia cardiaca. Y a dosis de 0.0001 mg/kg captopril y el LQM-319 muestran efectos con valores numéricos parecidos.

Como los compuestos LQM-318 y LQM-319 muestran efecto sobre la PAM, PAS, PAD y FC, se infiere que deben continuarse los estudios para evaluar su efecto reductor sobre el ritmo cardiaco y sobre la presión arterial.

4.5.1.2. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LOS COMPUESTOS LQM300'S RESPECTO A PROPRANOLOL

Dentro de la evaluación del efecto sobre la frecuencia cardiaca se desarrolló la metodología ahora comparando el comportamiento de los compuestos con propranolol como control positivo. En las Tablas 4.5.1.2.1 a y b se muestran los resultados del propranolol y de algunos de los compuestos LQM-300 en donde se observan los cambios de FC desde la frecuencia basal hasta el valor alcanzado para los ejemplos mostrados, en todos los casos existe una disminución de ésta lo que indica un comportamiento como antiarrítmicos de los compuestos en estudio en el modelo de rata normotensa.

Tabla 4.5.1.2.1. a. Respuesta de algunos compuestos en la frecuencia cardiaca

Frecuencia Cardiaca (lat/min)						
Dosis (mg/kg)	**FC. Basal**	**Propranolol**	**LQM 305**	**LQM 309**	**LQM 321**	**LQM 322**
0.001	337.5 ± 23	290 ± 13	288	300 ± 19	324	288
0.01	337.5 ± 23	282 ± 10	312	264 ± 31	312	276
0.1	337.5 ± 23	228 ± 17	300	252 ± 23	312	276
1.0	337.5 ±23	220 ± 23	264	228 ± 48	300	276
3.1	337.5 ± 23	233 ± 23	276	192 ± 52	300	288

Tabla 4.5.1.2.1. b. Respuesta de algunos compuestos en la frecuencia cardiaca

Frecuencia Cardiaca (lat/min)						
Dosis (mg/kg)	**FC. Basal**	**Propranolol**	**LQM 324**	**LQM 328**	**LQM 329**	**LQM 337**
0.001	337.5 ± 23	290 ± 13	300	300 ± 27	300	240 ± 19
0.01	337.5 ± 23	282 ± 10	300	288 ± 23	282	240 ± 19
0.1	337.5 ± 23	228 ± 17	288	252 ± 40	282	228 ± 23
1.0	337.5 ±23	220 ± 23	264	228 ± 52	300	228 ± 23
3.1	337.5 ± 23	233 ± 23	264	216 ± 62	294	240 ± 19

En la siguiente Tabla 4.5.1.2.2 se muestran los ΔF (decrementos de la frecuencia cardiaca) respecto a la frecuencia cardiaca basal.

Tabla 4.5.1.2.2 Decrementos de la frecuencia cardiaca, se destacan los cambios máximos para cada compuesto y a la mínima dosis los que tuvieron un efecto mayor que el propranolol

Efectos en la frecuencia cardiaca (ΔF, latidos/min) del propranolol y algunos compuestos LQM-300's					
Dosis (mg/kg)	0.001	0.01	0.1	1.0	3.1
Propranolol	47.5	55.5	109.5	117.5 ± 23	104.5
LQM-305	49.5	25.5	37.5	73.5	61.5
LQM-309	37.5	73.5	85.5	109.5 ± 48	145.5
LQM-321	13.5	25.5	25.5	37.5	37.5
LQM-322	49.5	61.5	61.5	61.5	49.5
LQM-324	37.5	37.5	49.5	73.5	73.5
LQM328	37.5	49.5	85.5	9.5	21.5
LQM-329	37.5	55.5	55.5	37.5	43.5
LQM-337	97.5	97.5	109.5	109.5 ± 23	97.5

Como se observa el efecto máximo de propranolol se presenta en la dosis de 1.0 mg/kg con un valor de decremento de la FC de 117.5 ± 23 latidos/minuto, a esa misma dosis los compuestos LQM-309 y el LQM-337 muestran un decremento de 109.5 ± 48 y de 109.5 ± 23 latidos/minuto, cabe mencionar que el compuesto LQM-337 muestra este valor desde la dosis de 0.1 mg/kg, a esta misma dosis LQM-309 y LQM-328 presentan una disminución de la frecuencia cardiaca de 85.5 lat/min. Es importante mostrar que para la dosis de 0.001 mg/kg, la menor dosis administrada, se observa el siguiente comportamiento de efecto sobre la FC 337> 322 = 305 > propranolol.

Aunque todavía no se conoce el sitio receptor de los compuestos LQM-300, por lo observado experimentalmente podemos decir que estos compuestos muestran efecto de disminución sobre la frecuencia cardiaca, sin embargo, es necesario realizar los estudios *in vitro* para conocer el o los posibles sitios receptores y tener una mayor precisión en las observaciones para saber si los decrementos mayores en la frecuencia cardiaca son debidas a los fármacos aplicados y determinar de manera más objetiva si causan otros problemas en los animales de estudio esto se llevará a cabo en otro proyecto en donde el diseño de experimentos y la validación de los datos sean estadísticamente soportados.

Otra propuesta es realizar los estudios tomando como control otros antiarrítmicos de los grupos I, III, IV, adenosina y digoxina.

El modelo de rata normotensa anestesiada empleado es una evaluación preliminar del efecto que tienen los compuestos tanto sobre la presión arterial como sobre la frecuencia cardiaca y los datos obtenidos solo se emplearon para alimentar el programa de CoMFA, en el desarrollo de diversos experimentos. Estos datos y sus transformaciones se muestran en la siguiente Tabla .4.5.1.2.3.

Tabla 4.5.1.2.3 Datos empleados para el desarrollo de CoMFA

COMPUESTO	% EFECTO	% EFECTO RELATIVO	DOSIS mg/kg	EFEC-TIVIDAD	EFECTIVIDAD RELATIVA	1/ER	log 1/ER
LQM318	41	48.8	0.0038	0.1545	0.1839	5.4388	0.7355
LQM319	58	69	0.0026	0.1524	0.1813	5.5160	0.7416
LQM320	50	59.5	0.0022	0.1090	0.1297	7.7088	0.8870
LQM321	50	59.5	0.0017	0.0871	0.1037	9.6448	0.9843
LQM322	50	59.5	0.0028	0.1403	0.1669	5.9915	0.7775
LQM323	41	48.8	0.0029	0.1204	0.1433	6.9774	0.8437
LQM324	50	59.5	0.0029	0.1468	0.1747	5.7226	0.7576
LQM328	30	35.7	0.0042	0.1254	0.1492	6.7039	0.8263
LQM329	40	47.6	0.0029	0.1175	0.1398	7.1533	0.8545
LQM337	50	59.5	0.0028	0.1393	0.1658	6.0327	0.7805

Las filas marcadas incluyen los resultados obtenidos del efecto sobre la frecuencia cardiaca de los compuestos resultantes del diseño en CoMFA.

4.5.2. MODELO DE RATA CONSCIENTE HIPERTENSA ESPONTÁNEA

4.5.2.1. EVALUACIÓN ETAPA I DE LOS COMPUESTOS LQM-300'S RESPECTO A CAPTOPRIL Y LOSARTÁN

Después de diseñar 2 compuestos en CoMFA (LQM-319 y LQM-337), se procedió a sintetizarlos y a probar el efecto que presentaban sobre PAM, PAS, PAD y FC en el modelo de rata hipertensa espontánea (SHR). Los datos observados del comportamiento tanto de los compuestos control positivo como LQM-300 en estudio, a una sola dosis (1.0 mg/kg) y vía de administración oral, respecto al tiempo se muestran en la Tabla 4.5.2.1.1. Los valores reportados permiten visualizar los cambios máximos de presión (ΔP), tanto sistólica como diastólica y de frecuencia cardiaca.

Tabla 4.5.2.1.1. Respuesta biológica de algunos compuestos

Compuestos	$\Delta P_{MÁX}$ sistólica/tiempo (mmHg/min)	$\Delta P_{MÁX}$ diastólica/tiempo (mmHg/min)	$\Delta_{MÁX}$ Frecuencia cardiaca /tiempo (latidos/min/min)
LQM 301	73.9 / 100	46.7 / 100	72.2 / 110
LQM 318	71.47 / 100	31.8 / 60	147.88 / 100
LQM319	95.755 / 90	48.225 / 90	160.448 / 100
LQM322	45.6 / 60	29.2 / 60	92.5 / 120
LQM320	28.086 / 60	12.5875 / 60	106.566 / 120
CAPTOPRIL	42.0 / 50	36.45 / 100	52.04 / 70
LOSARTAN	82.3 / 80	66.35 / 80	38.37 / 80

De los compuestos empleados como control para estos experimentos en el modelo de rata conciente hipertensa espontánea se observa que el losartán presenta un mejor efecto sobre las presiones sistólica y diastólica, el tiempo necesario para desarrollar éste es de 80 minutos. Para los compuestos LQM-300 estudiados en esta etapa el LQM-319 muestra mejor efecto que losartán en la presión sistólica y en la frecuencia cardiaca, el tiempo necesario para desarrollar estos efectos es 90 y 100 minutos respectivamente; aunque hay que recordar que losartán no posee actividad

antiarrítmica. Otros de los compuestos que tienen una actividad hipotensora considerable respecto a losartán son el LQM-301 para ambas presiones y LQM-318 para presión sistólica. Tanto el compuesto LQM – 318 como el 320 muestran efecto de disminución sobre la frecuencia cardiaca.

Los resultados biológicos observados son alentadores, ya que, en general los compuestos de la serie LQM-300 estudiados muestran un efecto sobre la disminución de la frecuencia cardiaca. Sin embargo, es necesario realizar los estudios biológicos para determinar las DE_{50} tanto para las actividades de disminución de frecuencia cardiaca como hipotensora empleando el modelo de rata hipertensa espontánea y en un modelo animal que presente arritmia cardiaca. Al emplear estos valores en los estudios tanto de QSAR-2D como de CoMFA, se espera mejorar los resultados obtenidos en este estudio preliminar, lo cual permitirá seguir nutriendo tanto la serie de entrenamiento como la serie de prueba y así obtener mejores resultados en el diseño de los fármacos en estudio y e la optimización de nuevos líderes.

Otra posibilidad para continuar los estudios del efecto sobre la disminución de la frecuencia cardiaca es emplear un modelo biológico diferente por ejemplo un modelo de perro al cual se le ha administrado uobaina para producir arritmia (Stout et al, 1985).

Otras actividades, que se sugiere se realicen posteriormente son la evaluación del efecto neto de cada compuesto LQM-300 y de los controles descontando el efecto del vehículo en cada medida y el estudio de la estabilidad de las mezclas del vehículo con los compuestos LQM-300 y los controles.

Estudio CoMFA

preliminar

4.6. ESTUDIOS QSAR-3D (CoMFA) PRELIMINARES

4.6.1. Evaluación preliminar de la relación entre la disminución de la frecuencia cardiaca y la estructura de los compuestos LQM-300 empleando la metodología de CoMFA

Cuando se refiere a CoMFA, la idea subyacente es identificar las diferencias en una propiedad del receptor que están siempre relacionadas a diferencias en las formas de los campos no covalentes que rodean a las moléculas de prueba. Para poner la forma de un campo molecular dentro de una tabla de QSAR, se prueban las magnitudes de sus campos estéricos (Lennard-Jones) y electrostáticos (Coulómbicos) en intervalos regulares a lo largo de una región definida (Tripos Discovery Informatic, Inc., 2002, CoMFA).

En CoMFA existen muchos parámetros que pueden ajustarse, pero ciertamente el más importante es la alineación relativa de las moléculas individuales, debido a la importancia que tiene el cálculo de los campos estéricos y electrostáticos de todas las moléculas ya alineadas. Ya que cuando las moléculas están alineadas correctamente presentan una conformación comparable y una orientación similar en el espacio cartesiano. Cuando esto se logra entonces la relación estructura química – actividad biológica se genera por un análisis PLS (Partial Least Squares) (Wold, 1995) de los datos que se han generado en la hoja de cálculo. La evaluación del QSAR resultante se determina por el valor de la validación cruzada (q^2) reportada para el PLS; algunos autores consideran q^2 altas (valores de $q^2 > 0.5$) como valores aceptables y como criterio de robustez y habilidad predictiva del modelo (Golbraikh, 2002); CoMFA rederiva o reenvía los resultados ahora en la forma sin validación cruzada, que es una manera en la que puede manejar más fácilmente los datos empleando varias técnicas gráficas, en ellas puede cambiar la alineación de una o más moléculas o bien alterar otros parámetros y entonces repite el análisis (Tripos Discovery Informatic, Inc., 2002, CoMFA).

Cuando se ha logrado tener un modelo QSAR-3D aceptable se pueden predecir los valores de las actividades biológicas o de las propiedades estudiadas para compuestos nuevos con una gran precisión (Tripos Discovery Informatic, Inc., 2002, CoMFA).

Si bien valores bajos de q^2 para una serie de entrenamiento pueden indicar una habilidad predictiva baja de un modelo, lo contrario no es necesariamente cierto, es decir, valores altos de q^2 no implican automáticamente una habilidad predictiva elevada del modelo y viceversa. Para desarrollar el modelo y validarlo, se necesita dividir todo el conjunto de datos disponibles en serie de entrenamiento y serie de prueba (Golbraikh, 2002; Novellino, 1995; Norinder, 1996; Kubiny, 1998).

Pueden usarse varios métodos para este propósito, como la selección aleatoria, selección por grupos de compuestos en donde todo el grupo esté incluido dentro de la serie de entrenamiento o dentro de la serie de prueba, selección de la serie de entrenamiento con compuestos que presenten características variables, etc., (Austel, 1995).

Aparentemente, el único camino para evaluar el poder predictivo verdadero de un modelo es probarlo sobre una serie suficientemente grande de compuestos de un conjunto de prueba distinto a los de la serie de entrenamiento (Golbraikh, 2002).

Las 4 fases importantes del desarrollo de CoMFA son:

- Preparación para CoMFA
- Construcción de la hoja de cálculo para CoMFA
- Cálculo PLS
- Evaluación y uso de los resultados CoMFA

Después de llevar a cabo estas cuatro fases para el desarrollo preliminar de CoMFA, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.6.1.1.

Tabla 4.6.1.1. Métodos desarrollados y resultados de CoMFA

Variables evaluadas	q^2	# OC*	# OC*	r^2	SEE**	F	Prob_r^2=0
Campos estérico y electrostático, CMR, CMR², LOG P, E. LUMO	0.182	6	1	1.000	0.0020	2125.202	0.017
Campos estérico, electrostático, CMR, CMR², LOG P	0.312	6	1	1.000	0.0010	3628.279	0.013
Campos estérico, electrostático, CMR, CMR²	0.388	6	1	1.000	0.0020	1383.065	0.021
Campos estérico, electrostático, CMR	0.228	6	1	1.000	0.0020	1985.916	0.017
Campos estérico, electrostático, CMR, LOG P	0.150	6	1	1.000	0.0010	3442.702	0.013
Campos estérico, electrostático, CMR, LOG P, E. LUMO	-0.022	6	1	1.000	0.0000	218122.31	0.002
Campos estérico, electrostático, CMR, E. LUMO	0.028	6	1	0.999	0.0050	246.239	0.049
Campos estérico y electrostático, CMR, CMR², LOG P, LOG P²	0.256	6	1	1.000	0.0020	2119.792	0.017

* Número òptimo de componentes
** Error estándar de estimación

La tabla muestra sólo algunos de un gran número de métodos desarrollados, empleando diversos descriptores tanto estéricos, electrónicos y fisicoquímicos. El análisis que presenta un mejor valor de q^2 (q^2 = 0.388) es en el que se relacionan los campos estéricos, electrostáticos, la refractividad molar y la refractividad molar al cuadrado con logaritmo del inverso de la efectividad relativa a propranolol.

Los resultados del análisis PLS de la serie de entrenamiento de los compuestos LQM-318, LQM-320, LQM-321, LQM-322, LQM-323, LQM-324, LQM328 Y LQM329, todos ellos derivados tiomorfolínicos de fenol, describen que el número óptimo de

componentes con los que realizó el análisis fue de 6 y después del análisis el número de componentes óptimos es 1 y el valor de q^2 fue de 0.388.

Aunque el valor de q^2 es menor de 0.5 se reenvió el análisis con validación no cruzada obteniéndose un valor de r^2 de 1.000, una estimación del error estándar de 0.002, el valor de F de 1383.065 y la probabilidad de que r^2 sea cero es de 0.021.

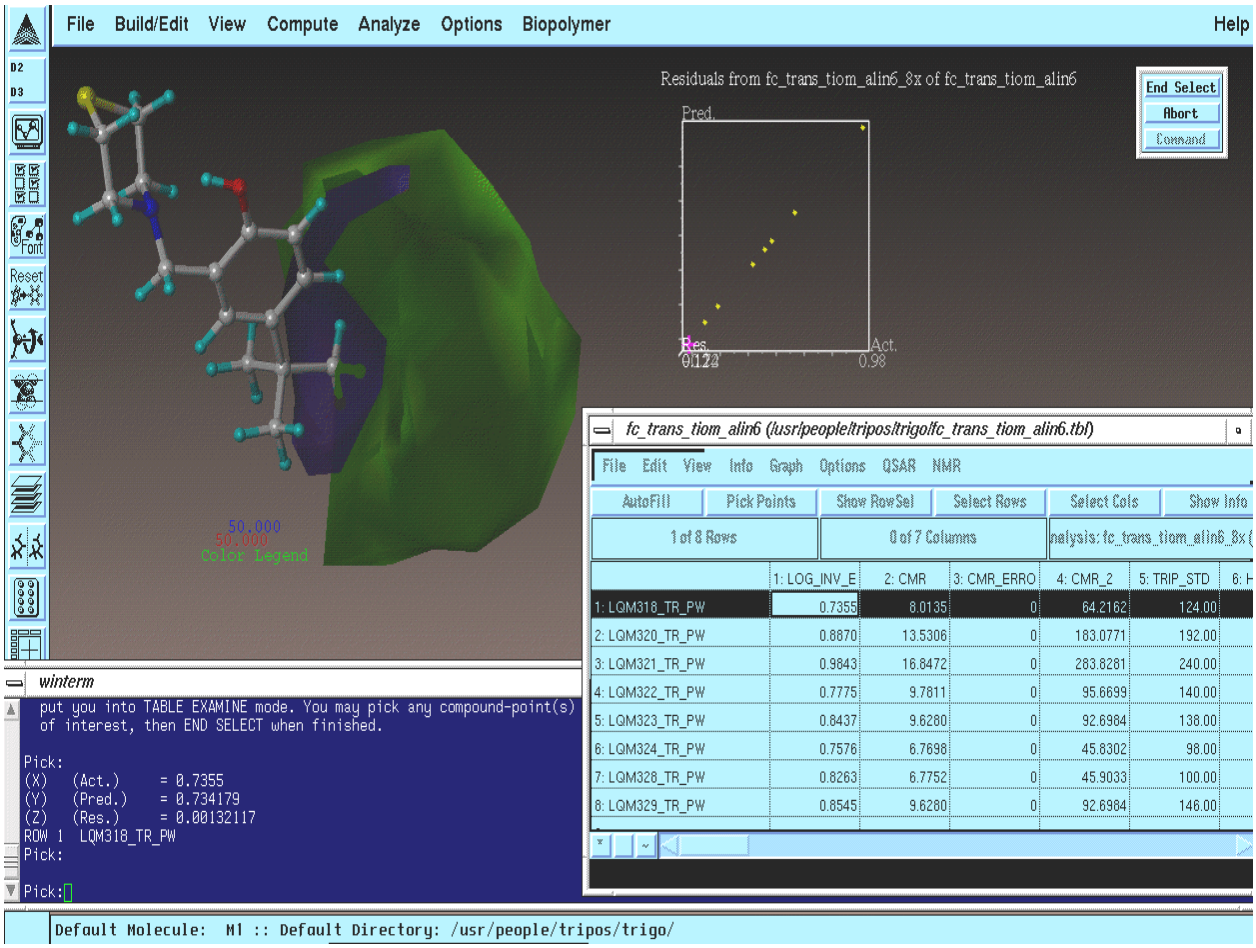


Figura 4.6.1.1. Análisis de los resultados

La Figura 4.6.1.1 muestra el análisis de resultados en donde el compuesto de la serie de entrenamiento que presenta el mejor valor de la actividad antiarrítmica, es el LQM-318. El modelo predice una actividad para este compuesto de 0.7342 y la actividad biológica experimental es de 0.7355, el valor residual de la predicción es de 0.0013.

Se observa también que existen una zona verde relativa al campo estérico y una azul relativa al campo electrostático, la zona verde indica que al diseñar un compuesto nuevo en esa región favorece la actividad un grupo voluminoso, la zona azul nos dice que la actividad biológica se ve favorecida con un sustituyente que contenga hidrógenos para crear la posibilidad de interacciones mediante puentes de hidrógeno con el receptor.

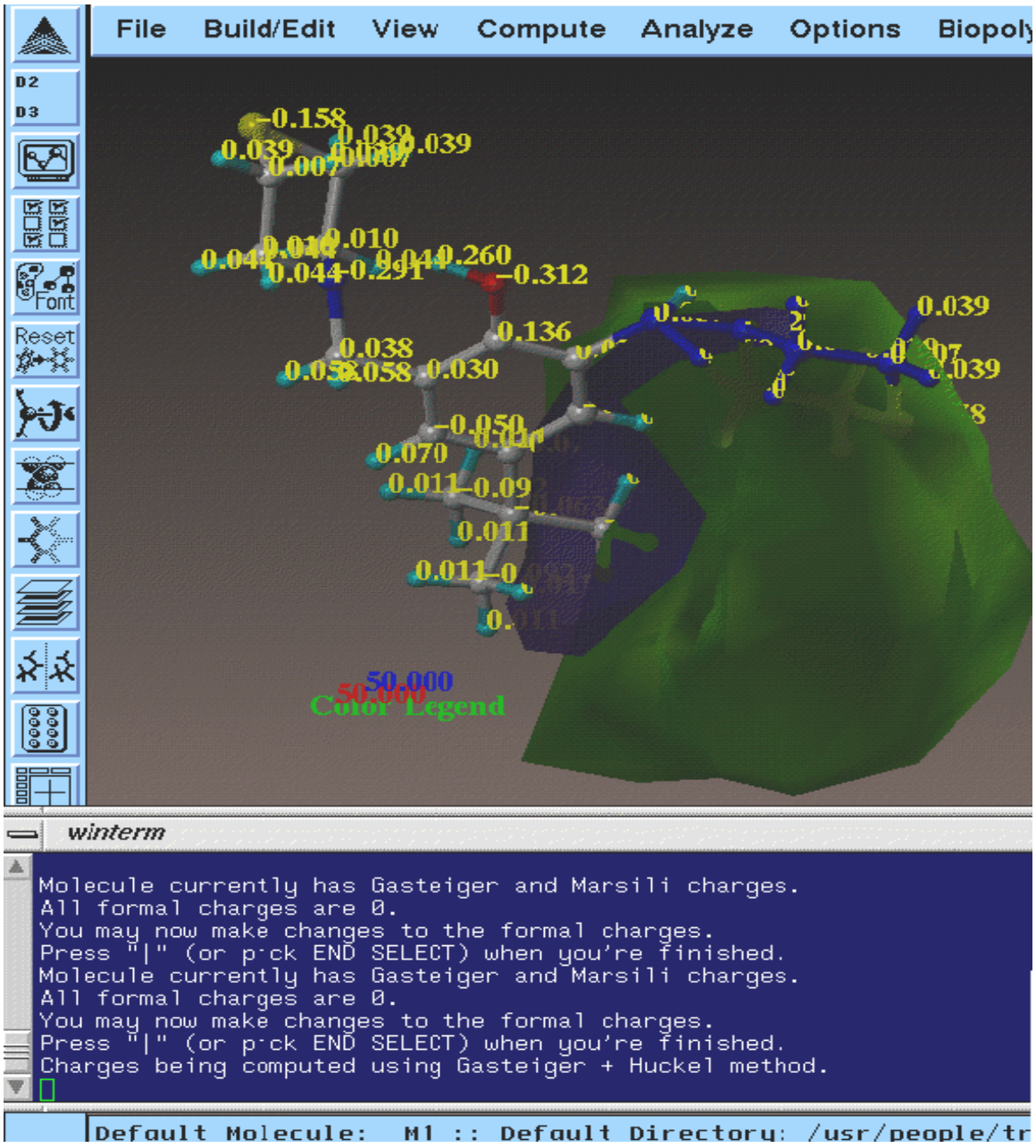


Figura 4.6.1.2. Diseño del nuevo compuesto

Con base en los resultados anteriores en la posición cinco del fenol se sustituyó el hidrógeno por un heterociclo, tiomorfolina, que es un grupo voluminoso y que tiene hidrógenos que pueden interaccionar con el receptor para formar puentes de hidrógeno. Una vez que se construyó la nueva molécula se calcularon las cargas Gasteiger-Marsili, se asignó nombre a la molécula y se procedió a predecir el valor de la actividad antiarrítmica. Lo anteriormente expresado se muestra en la Figura 4.6.1.2.

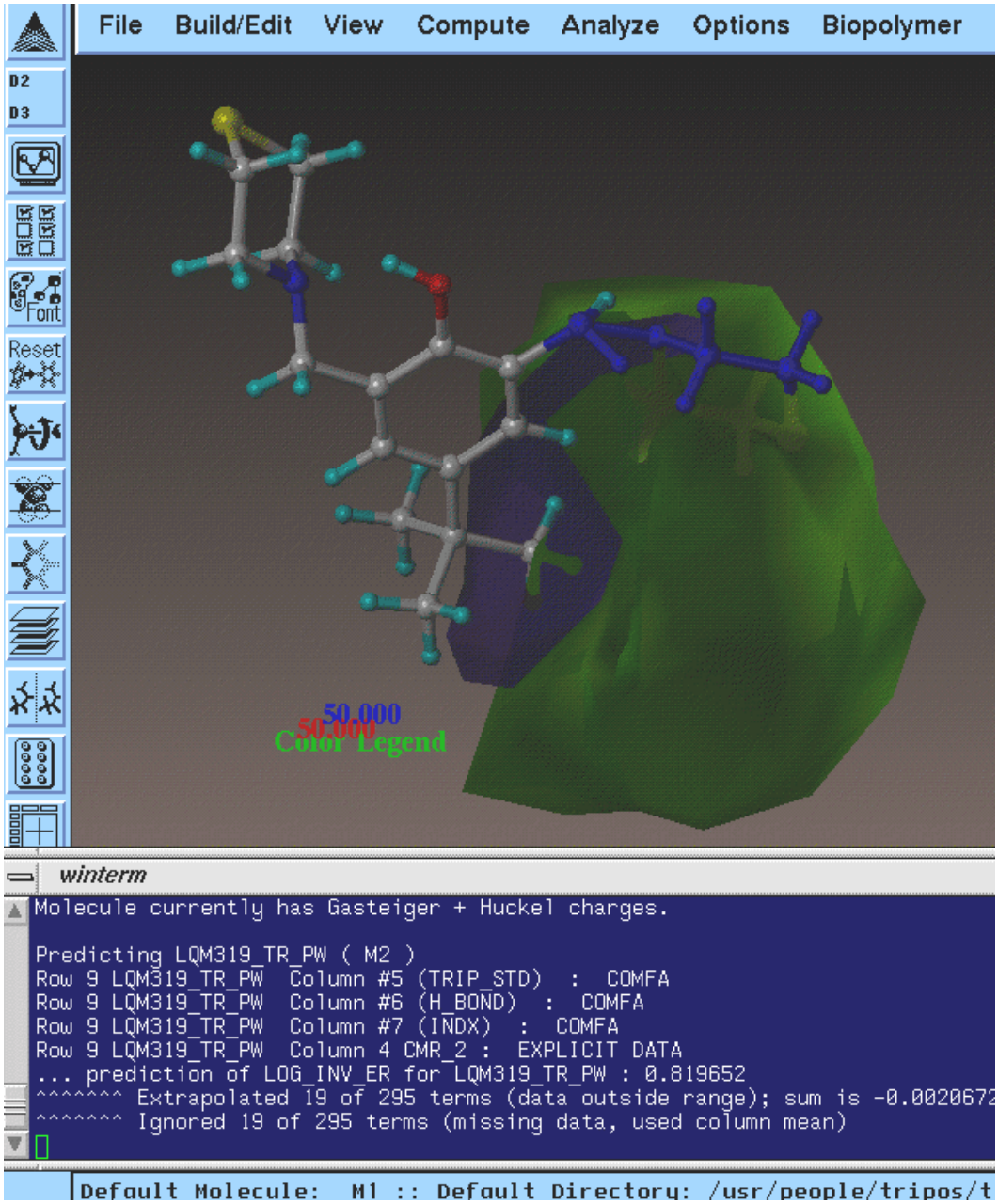


Figura 4.6.1.3. Predicción de la actividad antiarrítmica del compuesto LQM - 319

Los resultados de la predicción de la actividad se muestran en la Figura 4.6.1.3, el dato explicito fue de 0.819652 y lo obtuvo extrapolando 19 de 295 términos. Posteriormente se presentará la comparación de este valor con el valor experimental.

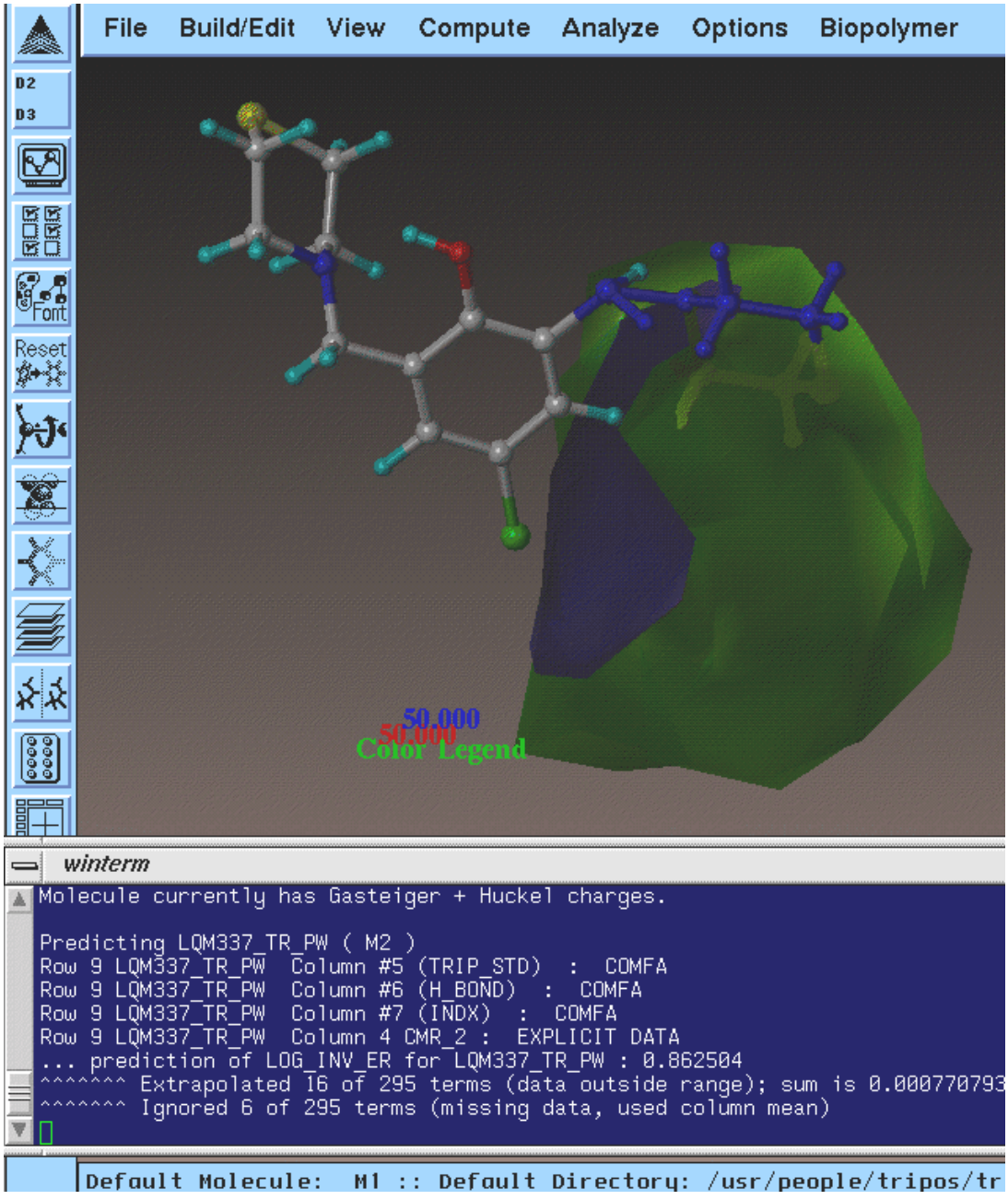


Figura 4.6.1.4. Diseño y predicción de su actividad de otro compuesto nuevo LQM - 337

Con la misma metodología antes mencionada se diseñó otro compuesto nuevo, aunque el modelo no indica nada en la zona del sustituyen R_4 del fenol, se propuso sustituir el grupo terbutilo por cloro, la predicción de la actividad encontrada fue de 0.862504. Todo esto se muestra en la Figura 4.6.1.4.

Después de predecir las actividades biológicas se sintetizaron los compuestos LQM-319 y LQM-337, se caracterizaron y se les determinó la actividad biológica de la misma manera que a los compuestos de la serie de entrenamiento, los resultados y la evaluación del % de error relativo se muestran en la Tabla 4.6.1.2.

Tabla 4.6.1.2. Resultados de la evaluación biológica y % de error relativo de la predicción

LQM	Actividad biológica predicha por CoMFA	Actividad biológica experimental	% de error relativo en la predicción
319	0.819652	0.741625	10.52
337	0.862504	0.780509	10.51

Se empleó el análisis comparativo de los campos moleculares para desarrollar un modelo que predijo con un 10.5% de error relativo las actividades de dos nuevos compuestos diseñados LQM-319 y LQM-337 y que mostraron tener efecto de disminución de la frecuencia cardiaca.

Este trabajo constituye el primer estudio preliminar de los compuestos LQM-300's que mostraron tener actividad como hipotensores y disminución de la frecuencia cardiaca en modelos de rata anestesiada normotensa y de rata hipertensa espontánea conciente.

Se habla de un estudio preliminar porque los resultados no son contundentes para ser reportados, esto se debe a que el análisis se efectuó con datos de actividad biológica realizados en animales normotensos, que tienen una fisiología, morfología, bioquímica y funciones farmacológicas diferentes a las de los animales hipertensos.

5. Conclusiones

- Aplicando el diseño asistido por computadora basado en la estructura del ligando en tres dimensiones, se proponen dos nuevos compuestos LQM-319 y LQM-337 derivados tiomorfolínicos de fenol de los cuales se predijo su actividad biológica de disminución de la frecuencia cardiaca con un 10.5% de error una serie de entrenamiento de 25 compuestos derivados morfolínicos y tiomorfolínicos de fenol y una serie de prueba de ocho compuestos de entre los 25 para el estudio CoMFA, dichas series deben formarse respetando el esqueleto básico del compuesto líder.
- La radiación de luz infrarroja empleada como fuente de energía en las reacción vía base de Mannich redujo notablemente los tiempos de síntesis e incrementó los rendimientos de las reacciones.
- En general los mínimos conformacionales, encontrados en los estudios de mecánica molecular, corresponden a los rotámeros cuyos anillos con los heteroátomos se encuentran en las posiciones *cis* y *trans* al plano del fenol. El rotámero *cis* es el de menor energía, aunque la estructura del rotámero *trans* se encontró en el análisis por difracción de rayos X de algunos de los compuestos, lo cual puede deberse en gran medida a las interacciones intermoleculares e intramoleculares involucradas en la formación de los cristales.
- En los estudios de química cuántica, el método *ab initio* empleando el conjunto de base 6-31g sin difusión es el que mejor describe las estructuras encontradas en el análisis por difracción de rayos X de los compuestos en estudio.
- Debido a que se observaron diferencias grandes entre los valores experimentales tanto de Log P como de pKa y los valores teóricos calculados, se propone que deben realizarse las determinaciones experimentales de los mismos y comparar los resultados que se obtengan al aplicar diversos métodos analíticos.
- Los compuestos LQM de la serie 300 mostraron tanto efecto de disminución sobre la frecuencia cardiaca como actividad hipotensora en los modelos de rata anestesiada y de rata hipertensa espontánea.

- El modelo obtenido en los estudios CoMFA, predijo una actividad aceptable para los compuestos diseñados LQM-319 y LQM-337, de manera que al observar los datos reportados para los estudios de etapa I en el modelo de rata hipertensa el efecto del compuesto LQM-319 fue mayor que el de losartán en la PAS, menor en la PAD y mayor en el efecto presentado sobre la FC, así mismo dicho efecto fue mayor que el de los demás compuestos de la serie LQM-300 estudiados en ese modelo. Esto es notable, ya que se demuestra que se puede llevar a cabo el estudio CoMFA de la serie de prueba de estos compuestos aunque el valor de q^2 obtenido sea menor a 0.5 porque el % de error relativo encontrado en la predicción es aceptable.
- Se propone que los estudios preliminares tanto de evaluación del efecto hipotensor como del efecto de disminución de la frecuencia cardiaca se diseñen y se validen estadísticamente para confirmar o modificar los resultados en la primera etapa del estudio.

Referencias bibliográficas

Accelrys, Inc., ViewerPro, version 5.0. San Diego, CA, USA.

Alvadalejo, P., Bouaziz, H., Duriez, M., Gohlke, P., Levy, B. I., Safar, M. E., Benetos, A. **1994.** Angiotensin converting enzime inhibition prevents the increase in aortic collagen in rats. *Hypertension.* 23, 74-82.

Andrés, J., Beltrán, J. (Eds.). **2000**. *Química Téorica y Computacional*. (3ra ed.). Publicacions de la Universitat Jaume I. D. L. Castellón, p. 417 – 532.

Atkins, P. W. and Friedman, R. S. **1997.** *Molecular Quantum Mechanics*. (3ra ed.). New York, Oxford University Press, p. 240 – 318.

Avendaño, L. C., *et al*. **2001.** *Introducción a la Química Farmacéutica.* (2a ed.). Madrid, McGraw-Hill/Interamericana, p. 1 – 39 y 63 – 139.

Balbes, L. M., Mascarella, S. W. Boyd, D. B. **1994.** A perspective of modern methods in computer-aided drug design. En *Reviews in Computational Chemistry.* Lipkowitz, K.; Boyd, D., Eds., (vol. 5, pp. 337-379). New York, VCH Publishers.

Baldwin, J. J., Ponticello, G. S., Anderson, P. S., Christy, M. E., Murcko, M. A., Randall, W. C., Schwam, H., Sugrue, M. F., Gautheron, P., Grove, J., Mallorga, P., Viader, M-P., McKeever, B. M., Navia, M. A. **1989.** Thienothiopyran-2-sulfonamides: novel topically active carbonic anhidrase inhibitors for the treatment of glaucoma. *J. Med. Chem.*, *32*, 2510 - 2513.

Boyd, D. B. **1998.** Drug design. En *Encyclopedia of Computational Chemistry*. Schleyer, P. V. R., Ed., (vol. 1, pp. 795-804). West Sussex, John Wiley and Sons.

Boyd, D. B. **1999.** Is rational design good for anything? En *Rational Drug Design: Novel Methodology and Practical Applications.* Parril, A. L., Reddy, M. R., Eds., (ACS Symposium Series 719, pp. 347-356). Washington, DC, American Chemical Society.

Buckingham, J., Glen, R. C., Hill, A. P., Hyde, R. M., Martin, G. R., Robertson, A. D., Salmon, J. A., Woollard, P. M. **1995.** Computer-aided design and synthesis of 5-substituted tryptamines and their pharmacology at the 5-HT1D receptor: discovery of compounds with potential anti-migraine properties. *J. Med. Chem*. *38*, 3566-3580.

Campillo Martín, N. **2003.** *Apuntes del curso Diseño de Fármacos. Relación Esctructura Actividad.* Instituto de Química Médica (CSIC) Madrid.

Charifson, P. S., Kuntz, I. **1997.** Recent successes and continuing limitations in computer-aided drug design. En *Application of Computer-Aided Drug Design*. Charifson, P. S. Ed., (pp.1-37). New York, Marcel Dekker.

Cambridge Soft Corporation. **2003**. *Chem 3D® ULTRA. Molecular Modeling and Analysis*. Versión 8.03.

Cramer, R. D. III., Patterson, D. E., Bunce, J. D. **1988**. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc. 110*, 5959 - 5967.

Cuevas, G y Cortés F. **2003.** *Introducción a la Química Computacional.* México, Fondo de Cultura Económica, pp. 28 – 91 y 103 – 126.

Cunha, R. S., Dabiré, H., Bezie, I., Weiss, A. M., Chaouche-Teyara, K., Laurent, S., Safar, M. E., Lacolley, P. **1997.** Mechanical stress of the carotid artery at the early plase of spontaneous hypertension in rats. *Hypertension.* 29, 992-998.

Datar, P. A. Coutinho, E. C and Srivastava, S. **2004.** Comparative study of 3D – QSAR techniques on angiotensina II receptor (AT_1) antagonists. Lett. Drug Des. & Discov. 1, 115 – 120.

Debnath, A. K. **2001.** Quantitative structure-activity relationship (QSAR): a versatile tool in drug design. En *Combinatorial Library Design and Evaluation for Drug Discovery: Principles, Methods, Software Tools and Applications.* Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., Eds., New York, Marcel Dekker, pp. 73-129.

Dorsey, B. D., Levin, R. B., McDaniel, S. L., Vacca, J. P., Guare, J. P., Darke, P. L., Zugay, J. A., Emini, E. A., Schleif, W. A., Quintero, J. C., Lin, J. H., Chen, I.W., Holloway, M. K., Fitzgerald, P. M. D., Axel, m. G., Ostovic, D., Anderson, P. S., Huff, J. R. **1994.** L-735,524: The design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J. Med. Chem*. *37*, 3443-3451.

Duncia, J. V., Chiu, A. T., Carini, D. J., Gregory, G. B., Jonson, A. L., Price, W. A., Wells, G. J., Wong, P. C., Calabrese, J. C., Timmermans, P. B. M. W. M. **1990.** The discovery of potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: a new class of potent antihypertensives. *J. Med. Chem. 33*, 1312-1329.

FDA. Food and Drug Administration. En http://nhlbi.nih.gov/health/dci/Diseases/Hbp/HBP_Links.html. The seventh Report on the joint National Committee on Prevention, Detction, Evaluation and Trearment of High Blood Pressure (JNC 7), NIH Publication No. 03-5233, consultado en mayo 2006.

Flores, J. **2005.** Efecto del LQM-301, LQM-304, LQM-308, LQM-310, LQM318, LQM-319, LQM-320 y LQM-323 sobre la frecuencia cardiaca y el intervalo P-R en rata anestesiada. *Tesis de licenciatura.* FESC-UNAM.

Fujita, T., Iwasa, J., Hansch, C. **1964.** A new substituent constant, π, derived from partition coefficients. *J. Am. Chem. Soc. 86*, 5175-5180.

Fujita, T. **1990.** The extrathermodynamic approach to drug design. En *Comprenhensive Medicinal Chemistry*. Hansch, C., Sammes, P. G., Taylor, J. B., Ramsden, C. A., Eds. Oxford, Pergamon Press, (vol. 4, pp. 497-560).

Glazer, E., Lacolley, P., Boutouyrie, P., Sacunha, R., Lucet, B., Sfar, M. E., Laurent, S. **1995.** Dynamic versus static compliance of the carotid artery in living Wistar-Kyoto rats. *J. Vasc. Res.* 32 (4), 254-256.

Glõwka, M. L., Dargie, R. L and Cooding, P. W. **1991.** Spatial Requirements of the Na Channel Binding Site for Class I Antiarrhythmics As Derived from the Crystal Structures of 4-Substituted 2,6-Bis(1-pyrrolidinylmethyl)phenols. J. Med. Chem. 34, 2678 – 2684.

Golbraikh, A and Tropsha, A. **2002.** Beware of q^2! *J. Mol. Graphics Model. 20*, 269-276.

Golbraikh, A and Tropsha, **2002.** A. Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection. *J. Comput.-Aided. Mol. Des. 16*, 357-369.

Goodford, P. J. **1985.** A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem. 28*, 849-857.

Greco, G., Novellino, E., Martin, I. C. **1997**. Approaches to three-dimensional quantitative structure-activity relationships. En *Reviews in Computational Chemistry.* Lipkowitz, K., Boyd, D., Eds. New York, VCH Publishers, (vol. 11, pp.183-240).

Greer, J., Erickson, J. W., Baldwin, J. L., Varney, M. D. **1994.** Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design. *J. Med. Chem. 37*, 1035-1054.

Guyton, J. R., Harley, C. J. **1985.** Flow restriction of one carotid artery in juvenile rats exhibits growth of arterial diameter. *Am. J. Physiol.* 248, H540-H546.

Hansch, C., Muir, R. M., Fujita, T., Maloney, P. P., Geiger, E., Streich, M. **1963.** The correlation of biological activity of plant growth regulators and chloromycetin derivatives with Hammett constants and partition coefficients. *J. Am. Chem. Soc. 85*, 2817-2824.

Hansch, C and Fujita, T. **1964.** ρ-σ-π Analysis; method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc. 85*, 1616-26.

Hansch, C and Leo, A. **1995.** Exploring QSAR-fundamentals and applications in chemistry and biology. Washington, DC, American Chemical Society.

Harkness, J. E and Wagner, J. E. **1989.**The Giology an Medicine of Rabbits and Rodents. 3ª ed. Lea & Febiger.

Harris, D. **1992.** *Análisis Químico Cuantitativo.* 3ª ed. México, Grupo Editorial Iberoamérica, S. A. de C. V, pp. 246 – 247; 301 – 331.

Harrison, T. R., Resnick, W. R., Wintrob, E. M. M., Thorn, G. W., Adams, R. D. **2001.** *Principios de Medicina Interna.* 15ª ed. México, McGraw-Hill Interamericana, pp. 1286 – 1303.

Heténtyi, C., Van der Spoel, D. **2002.** Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein Science*. *11*, 1729-1737.

Hillisch, A., Pineda, L. F., Hilgenfeld, R. **2004.** *Drug Discov.* Utility of homology models in the drug discovery process. *Today*. *9*, 659-669.

Holmes, D. D. **1987.** Clinical Laboratory Animal Medicine. An Introduction. Iowa State. University Press.

Hopfinger, A. J. **1985.** Computer-assited drug design. *J. Med. Chem. 28*, 1133-1139.

Kaldor, S.W., Kalish, V. J., Davies, J. F., Shetty, B. V., Fritz, J. E., Appelt, K., Burgess, J. A., Campanale, K. M., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Dressman, B. A., Hatch, S. D., Khalil, D. A., Kosa, M. B., Lubbehusen, P. P., Muesing, M. A., Patick, A. K., Reich, S. H., Su, K. S., Tatlock, J. H. **1997.** Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343): A potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease. *J. Med. Chem*. *40*, 3979-3985.

Karelson M. **2000**. Molecular Descriptors in QSAR/QSPR. New York. Wiley – Interscience, pp. 1 – 415.

Keenan, R. M., Weinstock, J., Finkelstein, J. A., Franz, R. G., Gaitanopoulos, D. E., Girard, G. R., Hill, D. T., Morgan, T. M., Samanen, J. M., Peishoff, C. E., Tucker, L. M., Aiyar, N., Griffin, E., Ohlstein, E. H., Stack, E. J., Weidley, E. F., Edwards, R. M. **1993.** Potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. 2. 1-(Carboxybenzyl)imidazole-5-acrylic acids. *J. Med. Chem*. *36*, 1880-1892.

Keller, P. A., Birch, C., Leach, S. P., Tyseen, D., Griffith, R. **2003.** Novel pharmacophore-based methods reveal gossypol as a reverse transcriptase inhibitor. *J. Mol. Graphics Model. 21*, 365-373.

Klebe, G., Abraham, U., Mietzner, T. **1994.** Molecular similarity indeces in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J. Med. Chem. 37*, 4130-4146.

Koga, H., Itoh, A., Murayama, S., Suzue, S., Irikura, T. **1980.** Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem. 23*, 1358-1363.

Kong, J., White, C. A., Krylov, A. I., Sherrill, C. D., Adamson, R. D., Furlani, T. R., Lee, M. S., Lee, A. M., Gwaltney, S. R., Adams, T. R., Ochsenfeld, C., Gilbert, A. T. B., Kedziora, G. S., Rassolov, V. A., Maurice, D. R., Nair, N., Shao, Y., Besley, N. A., Maslen, P. E., Dombroski, J. P., Daschel, H., Zhang, W., Korambath, P. P., Baker, J., Byrd, E. F. C., Van Vooris, T., Oumi, M., Hirata, S., Hsu, C.-P., Ishikawa, N., Florian, J., Warshel, A., Johnson, B. G., Gill, P. M. W., Head-Gordon, M., Pople, J. A. A. **2000.** Q-Chem 2.0: a high-performance ab initio electronic structure program package. *J. Comput. Chem. 21*, 1532-1548.

Korolkovas, A. **1970.** *Essentials of Molecular Pharmacology Background for Drug Design.* New York. Wiley-Interscience, pp. 5 – 36.

Kubini, H. **1998.** Comparative molecular field analysis (CoMFA). En *Encyclopedia of Computational Chemistry.* Schleyer, P. V. R., Ed. West Sussex, John Wiley and Sons, (vol. 1, pp. 448-460).

Kubini, H. **1998.** Quantitative structure-activity relationships in drug design. En *Encyclopedia of Computational Chemistry.* Schleyer, P. V. R., Ed. West Sussex, John Wiley and Sons, (vol. 4, pp. 2309-2320).

Lacolley, P., Ghodsi, N., Glazer, E., Callande, P. Brissac, A. M., Safar, M. E., Laurent, S. **1995.** Influence of graded changes in vasomotor tone on the carotid arterial mechanics inlive spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol.* 115 (7), 1235-1244.

Leach, A. R and Hann, M. M. **2000.** The *in silico* world of virtual libraries. *Drug Discov. Today*. *5*, 326-336.

Leach, A. R. **2001.** *Molecular modeling. Principles and Applications*. Essex, Oxford, Pearson Education Limited, 2.

Leach, A. R.. Gillet, V. **2003**. *An Introduction to Chemoinformatics.* Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, (vol. 2, p. 57).

Levine, I. N. **2001.** *Química Cuántica*. 5ª ed., Madrid, Prentice Hall, pp. 467 – 679.

Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J. C., Lizasoaín. I y Moro, M. A. **2004.** *Farmacología Básica y Clínica/Velázquez.* 17ª ed. Madrid. Editorial Médica Panamericana, pp. 161 – 176; 377 – 437.

Lozano, J. J., Pastor, M., Cruciani, G., Gaedt, K., Centeno, N. B., Gago, F., Sanz, F. **2000.** 3D-QSAR methods on the basis of ligand-receptor complexes. Application of COMBINE and GRID/GOLPE methodologies to a series of CYP1A2 ligands. *J. Comput.-Aided. Mol. Des.* 14, 341-353.

Manual de operación del equipo de electroforesis capilar. **1999**. Capillary Performance Test. Beckman Coultier. USA.

Martin, Y. C. **1991.** Overview of concepts and methods in computer-assisted drug design. *Methods Enzymol. 203*, 587-613.

Martin, Y. C. **1992.** 3D Database searching in drug design. *J. Med. Chem. 35*, 2145-2154.

Martínez, I. **2003**. Análisis Conformacional Teórico y Síntesis de derivados 4-sutituidos-2,6-bis(4-morfolínmetil)fenoles con potencial actividad antiarrítmica. Tesis Maestría. FESC.

Matoga, M., Laborde-Kummer, E., Langlois, M. H., Ballet, P., Bosc, J. J., Jarry, C., Dubost, J. P. **2003**. Determination of pKa values of 2-amino-2-oxazolines by capillary electrophoresis. *J. of Chromatography A*, 984, 253 – 260.

Mavromoustakos, T., Zervou, M., Zoumpoulakis, P., Kyrikou, I., Benetis, N. P., Polevaya, L., Roumelioti, P., Giatas, N., Zoga, A., Moutevelis Minakakis, P., Kolocouris, A., Vlahakos, D., Golic Gradadolnik, S and Matsoukas, J. **2004.** Conformation an Bioactivity. Design and Discovery of Novel Antihypertensive Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 4, 385 – 401.

Murrat, C. J. L., López, A. D. **1996.** *The global burden of disease.* Cambridge, Mass. Harvard University Press.

Oates, J. A and Brown, N. I. **2001.** Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. En Hardman, J. G and Limbird, L. E. Editors. Goodman Gilman A. Consulting Editor. *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 10th edition. New York. McGraw-Hill. (pp. 871 – 900).

OMS. Organización Mundial de la Salud **2005**: En (a) http://3.who.int, (b) http://nhlbi.nih.gov/health/dci/Diseases/Hbp/HBP_Links.html, (c) http://3.who.int.cvd_atas_25_future.pdf.

Ondetti, M., Rubin, B and Cushman, D. U.S. Patent 4,046,889. Developed **1975**. Patent protection **1976**, the patent was granted in **1977**.

Ooms, F. **2000.** Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem. 7*, 141-158.

Oprea, T and Waller, C. L. **1997.** Theoretical and practical aspects of three-dimensional quantitative structure-activity relationships. En *Reviews in Computational Chemistry.* Lipkowitz, K., Boyd, D., Eds., New York, VCH Publishers, (vol. 11, pp. 127-182).

Poole, S. D., Patel, S., Dehring, K., Workman, H., Poole, C. F. **2004.** Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis. *J. of Chromatogr. A.* 1037, 445-454.

RCSB. Brookhaven Protein Data Bank. En: http://www.rcsb.org.

Reddy, M. R and Parrill, A. L. **1999.** Overview of rational drug design. En *Rational Drug Design: Novel Methodology and Practical Applications,* Parril, A. L., Reddy, M. R., Eds. Washington, DC, ACS Symposium Series 719; American Chemical Society, pp. 1-11.

Roden, D. M. **2001.** Antiarrhythmic drugs. En Hardman, J. G and Limbird, L. E. Editors. Goodman Gilman A. Consulting Editor. *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 10^{th} edition. New York. McGraw-Hill. (pp. 933 – 970).

Rozenski, J., De Ranter, C. J., Verpanken, H. **1995.** *Quant. Struct. Act. Relat.* 14, 134 – 141.

Semler, E. D., Cox, G. S and Chengelis, P. Ch. **1992.** The rat, in Animal Models in Toxicology.

Shen, M., Béguin, C., Golbraikh, A., Stables, J. P., Kohn, H., Tropsha, A. **2004.** Application of predictive QSAR models to database mining: identification and experimental validation of novel anticonvulsant compounds. *J. Med. Chem. 47*, 2356-2364.

Sippl, W., Contreras, J-M., Parrot, I., Rival, Y. M., Wermuth, C. G. **2001.** Structure-based 3D QSAR and design of novel acetylcholinesterase inhibitors. *J. Comput.-Aid. Mol. Des. 15*, 395-410.

Sippl, W. **2002.** Development of biologically active compounds by combining 3D QSAR and structure-based design methods. *J. Comput.-Aid. Mol. Des. 16*, 825-830.

SSA. Secretaría de Salud. México, 2005. En: www.salud.gob.mx.

Stout, D. M., Matier, W. L., Barcelon-Y, C., Reynolds, R. D and Brown, B. S. **1983.** Synthesis and Antiarrhythmic and Parasympatholytic Properties of Substituted Phenols. 1. Heteroarylamine Derivates. *J. Med. Chem*. 26, 808 – 813.

Stout, D. M., Matier, W. L., Barcelon-Y, C., Reynolds, R. D and Brown, B. S. **1984.** Synthesis and Antiarrhythmic and Parasympatholytic Properties of Substituted Phenols. 2^1. Amides. *J. Med. Chem.* 27, 1347 – 1350.

Stout, D. M., Matier, W. L., Barcelon-Y, C., Reynolds, R. D and Brown, B. S. **1985.** Synthesis and Antiarrhythmic and Parasympatholytic Properties of Substituted Phenols. 3. Modifications to the Linkage Region (Region 3). *J. Med. Chem.* 28, 295 – 298.

Straatsma, T. P., Apra, E., Windus, T. L., Dupuis, M., Bylaska, E. J., Jong, S. W. De., Hirata, D. M., Smith, A., Hackler, M. T., Pollack, L., Harrison, R. J., Nieplocha, J., Tipparaju, V., Krishnan, M., Brown, E., Cisneros, G., Fann, G. I., Fruchtl, H., Garza, J., Hirao, K., Kendall, R., Nichols, J. A., Tsemekhman, K., Valiev, M., Wolinski, K., Ancheli, J., Bernholdt, D., Borowski, P., Clark, T. A., Clerc, D., Darchsel, H., Deegan, M., Dyall, K.,

Elwood, D., Glendening, E., Gutowski, M., Hess, A., Jaffe, J., Johnson, B., Ju, J., Kobayashi, R., Kutteh, R., Lin, Z., Littlefield, R., Long, X., Meng, B., Nakajim a, T., Niu, S., Rosing, M., Sandrone, G., Stave, M., Taylor, H., Thomas, G., van Lenthe, J., Wong, A and Zhang, Z. **2003**. "NWChem. A Computational Chemistry Package for Parallel Computers. Version 4.5". Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington 99352-0999, USA.

Tardy, Y., Meister, J. J., Perret, F., Brunner, H. R., Arditi, M. **1991.** Non-invasive estimate of the mechanical properties of peripheral arteries from ultrasonic and photoplethysmographic measurements. *Clin. Phys. Physiol. Meas.*12 (1), 39-54.

Tomlinson, E. **1982.** Filter probe extractor: a tool for the rapid determination of oil-water partition coefficients. *J. Pharm. Sci.* 71, 602-604.

Topliss, J. G., Costello, R. J. **1972.** Chance correlations in structure-activity studies using multiple regression analysis. *J. Med. Chem. 15*, 1066-1068.

Tripos Discovery Informatics, Inc. **2002**. SYBYL 6.9. *CoMFA.* St. Louis, Missouri.

Tripos Discovery Informatics, Inc. **2002**. SYBYL 6.9. *Conformational Analysis.* St. Louis, Missouri.

Tripos Discovery Informatics, Inc. **2002**. *SYBYL 6.9.* MOPAC. St. Louis, Missouri.

Tripos Discovery Informatics, Inc. **2002**. *SYBYL 6.9.* SCS. St. Louis, Missouri.

Tripos Discovery Informatics, Inc. **2002**. SYBYL 6.9. *QSAR.* St. Louis, Missouri.

Tripos Discovery Informatics, Inc. **2002**. *SYBYL 6.9.* St. Louis, Missouri.

Tropsha, A., Cho, S. J. and Zheng, W. **1999.** “New Tricks For an Old Dog”: Development and application of novel QSAR methods for rational design of combinatorial chemical libraries and database mining. En Parrill, A. L. and Reddy, M. R. (Eds.), Washington, DC, ACS Symposium Series 719, American Chemical Society, pp. 198-211.

Tropsha, A and Zheng, W. **2001.** Computer aided drug design. En *Computational Biochemistry and Biophysics.* Becker, O. M., Mackerell, Jr. A. D., Roux, B.; Watanabe, M., Eds., New York, Marcel Dekker, pp. 351-369.

Tropsha, A and Zheng, W. **2001.** Identification of the descriptor pharmacophores using variable selection QSAR: Applications to database mining. *Curr. Pharm. Design 7*, 599-612.

Tropsha, A. **2003.** Recent trends in quantitative structure-activity relationships. En *Burger’s Medicinal Chemistry and Drug Discovery.* Abraham, D. J., Ed. Hoboken, New Jersey, John Wiley and Sons, (vol. 1, pp. 49-76).

Tropsha, A.; Gramatica, P.; Gombar, V. K. The importance of being earnest: Validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. *Quant. Struct.-Act. Relat. Comb. Sci.* **2003***, 22*, 69-77.

Velázquez, A. Ma., Torres, L. A., Díaz, G., Ramírez, A., Hernández, R., Santillán, H., Martínez, L., Martínez, I., Díaz-Barriga, S., Ábrego, V., Balboa, M. A., Camacho, B., López Castañares, R., Dueñas-González, A., Cabrera, G and Ángeles, E. **2006.** A novel one pot,

solvent free Mannich Synthesis of methylpiperidinyl phenols, methylphenylmorpholinyl phenols and methylthiophenylmorpholinyl phenols using infrared light irradiation. ARKIVOC. (ii), 150 – 161.

Villegas, M. A. **2005.** Determinación de la actividad hipotensora de los compuestos dimorfolínicos en rata anestesiada. *Tesis licenciatura.* FESC-UNAM.

Walters, W. P., Stahl, M. T., Murcko, M. A. **1998.** Virtual screening - an overview. *Drug Discov. Today*. *3*, 160-178.

Wang, S., Milne, G. W. A., Yan, X., Posey, I. J., Nicklaus, M. C., Graham, L., Rice, W. G. **1996.** Discovery of novel, non-peptide HIV-1 protease inhibitors by pharmacophore searching. *J. Med. Chem. 39*, 2047-2054.

Waterbeemd, van de H., Gifford, E. **2003.** ADME *in silico* modelling: towards prediction paradise? *Nat. Rev. Drug Discov. 2*, 192-204.

Weinstock, J., Keenan, R. M., Samanen, J., Hempel, J., Finkelstein, J. A., Franz, R. G., Gaitanopoulos, D. E., Girard, G. R., Gleason, J. G., Hill, D. T., Morgan, T. M., Peishoff, C. E., Aiyar, N., Brooks, D. P., Fredrickson, T. A., Ohlstein, E. H., Ruffolo, Jr. R. R., Stack, E. J., Sulpizio, A. C., Wiedley, E. F., Edwards, R. M. **1991.** 1-(Carboxybenzyl)imidazole-5-acrylic acids: potent and selective angiotensin II receptor antagonists. *J. Med. Chem*. *34*, 1514-1517.

Wlodawer, A. **2002.** Rational approach to AIDS drug design through structural biology. *Annu. Rev. Med. 53*, 595-614.

Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L. **1998.** Partial least squares projections to latent structures (PLS) in chemistry. En: Encyclopedia of Computational Chemistry. Schleyer, P. V. R., Ed. West Sussex, John Wiley and Sons, (vol. 3, pp. 2006-2021).

Zeng, W and Tropsha, A. **2000.** Novel variable selection quantitative structure-property relationship approach based on the k-Nearest-Nieghbor principle. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 40, 185-194.

A novel one pot, solvent-free Mannich synthesis of methylpiperidinyl phenols, methylphenylmorpholinyl phenols and methylthiophenylmorpholinyl phenols using infrared light irradiation

A. Ma. Velázquez[a], L.A.Torres[a], G. Díaz[a], A.Ramírez[a], R.Hernández[a], H.Santillán[a], L.Martínez[a], I.Martínez[a], S.Díaz-Barriga[a], V.Abrego[a], M.A.Balboa[a], B.Camacho[a], R.López-Castañares[b], A.Dueñas-González[c], G.Cabrera[c], and E.Angeles*[a]

[a]*Laboratorio de Química Medicinal FESC-UNAM,* [b]*Facultad de Química UAEM,* [c]*Instituto Nacional de Cancerologia SSA-México*
E-mail: angeles@servidor.unam.mx

Abstract
A series of methylpiperidinyl phenols, methylphenylmorpholinyl phenols and methylthiophenylmorpholinyl phenols were synthesized in one-pot transformation by Mannich reactions using infrared irradiation under solvent-free conditions. The chemical structures of the compounds were proved by IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR and MS spectroscopic data.

Keywords: Methylpiperidinyl phenols, methylphenylmorpholinyl phenols and methylthiophenyl morpholinyl phenols, one-pot reaction, Mannich, infrared irradiation

Introduction

The Mannich reaction provides an excellent method for carbon-carbon bond formation and its importance is reflected in the ever-increasing number of suitable substrates and reaction conditions that have been developed[1-4]. Some important experimental modifications involve the use of preformed iminium salts[5-9], which can be prepared by a number of methods including the reactions of acetyl chloride with aminals[10], of trifluoroacetic anhydride with N-oxides[11], and of trichloromethylsilane with aminol ethers[12].

This reaction is also one of the most important and fundamental reactions in organic chemistry. It is a powerful tool in routes for the synthesis of various β-amino ketones or esters, which are versatile synthetic building blocks for the preparation of many nitrogen-containing, biologically important compounds[13-17]. In the bimolecular version of the classical Mannich reaction the use of preformed or in situ generated iminium[18] or *N*-acyliminium ions[19-20] and carbon nucleophiles has greatly expanded the versatility of this methodology, allowing the use of

Molbank **2005**, M399 http://www.mdpi.net/molbank/

Synthesis of 4,6-bis(thiomorpholin-4-ylmethyl)-1,2,3-benzenetriol

A. Ma. Velázquez[1], L.Torres[1], R.González[1], A.Valencia[1], I.Martínez[1], A.Pecina[1], I. Menconi[1], L.Martínez[1], A.Ramírez[1], R.Hernández[1], R.López-Castañares[2] , O.Olvera-Neria[3], E.Angeles*[1],

1) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México,
2) Facultad de Química de la UAEM,
3) Instituto de Ciencias Básicas e Ingenieria, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

e-mail: angeles@servidor.unam.mx

Received: 2 April 2004 / Accepted: 31 May 2004 / Published: 1 July 2005

Keywords: phenol, thiomorpholine

4,6-bis(thiomorpholin-4-ylmethyl)-1,2,3-benzenetriol (**2**) was prepared from pyrogalol (**1**) and thiomorpholine and formaldehyde (37%) in methanol as solvent . A solution of methanol (50 mL) and pyrogalol (1.24g, 9.83mmol) **1** was prepared, after that a solution of thiomorpholine (2.0g, 20.70 mmol) and formaldehyde (2.0 mL, 24.6 mmol) in methanol were added at rt. When the addition was completed, the reaction mixture was stirred at room temperature for 10 minutes and one red solid was formed and it was isolated for filtration and recristalizaded from ethanol (2.90g, 83% yield).

Melting Point: 181-183 C° (ethanol, uncorrected)

IR ($CHCl_3$ film, cm^{-1}): 3429 (O-H); 3065 (C_{sp2}-H Ar); 2872 (C_{sp3}-H).

^{1}H-NMR (300 MHz; $CDCl_3$): δ= 8.40 (3H, s, OH); 6.20 (1H, s); 3.61 (4H, s, Ar-$\underline{CH_2}$); 2.81 (8H, m, -S-CH_2-); 2.72 (8H, m, -N-CH_2-); 1.27.

^{13}C-NMR (75 MHz; $CDCl_3$): δ= 144.8 (C); 132.51 (C); 118.42 (CH); 111.74(C); 61.63 (Ar-$\underline{CH_2}$); 54.22 (-N-CH_2-); 27.81 (-S-CH_2-).

MS (FAB; m/z, %): 357 (10%); 254(100%); 102(91).

Elemental Analysis: Calculated for $C_{16}H_{24}N_2O_3S_2$: C, 53.91%; H, 6.79%; N, 7.86%; O, 13.46%; S,17.99%. Found: C, 53.90%; H, 6.74%; N, 57.91%; O, 13.37%; S, 18.02%.

Acknowledgements
The authors wish to acknowledge to PAPIIT/UNAM Projects No IN205902 and IN207705 and ALPHARMA SA de CV, by partially support this work. We would like to thank C.Barajas, F. Sotres, P.García, D.Jiménez from FESC-UNAM and Rosa I.del Villar M., Oscar Yañez and Georgina Duarte from USAI-UNAM for their skillful technical assistance and DGSCA-UNAM for their support. As a part of Project Cátedra Química Medicinal of FESC-UNAM.

References

1. Artico, M.; Mai, A.; Sbardella, G.; Massa, S.; Lampis, G.; Deidda, D.; Pompei, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 1493-1498.

2. Biava, M.; Fioravanti, R.; Porretta, G.C.; Deidda, D.; Maullu, C.; Pompei, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9*, 2983-2988.
3. Mai, A.; Sbardella, G.; Artico, M.; Massa, S.; Lampis, G.; Deidda, D.; Pompei, R. *Medicinal Chemistry Research* **1999**, *9*, 149-161.

© 2005 MDPI. All rights reserved.

Molbank **2005**, M400 http://www.mdpi.net/molbank/

Synthesis of 4-chloro-2-(thiomorpholin-4-ylmethyl)phenol

A. Ma. Velázquez[1], L.Torres[1], R.González[1], A.Valencia[1], A.Pecina[1], I.Menconi[1], I. Martínez[1], L.Martínez[1], A.Ramírez[1], R.Hernández[1], R.López-Castañares[2] , O.Olvera-Neria[3], E.Angeles*[1],

1) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México,
2) Facultad de Química de la UAEM,
3) Instituto de Ciencias Básicas e Ingenieria, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

e-mail: angeles@servidor.unam.mx

Received: 2 April 2004 / Accepted: 31 May 2004 / Published: 1 July 2005

Keywords: phenol, thiomorpholine

4-chloro-2-(thiomorpholin-4-ylmethyl)phenol (**2**) was prepared from 4-chlorophenol (**1**) and thiomorpholine and formaldehyde (37%) in methanol as solvent . A solution of methanol (50 mL) and 4-chlorophenol **1** (1.26g, 9.80 mmol) was prepared and heated at 40 °C for 15 minutes, after that a solution of thiomorfoline (2.0g, 20.7 mmol) and formaldehyde (1.5 mL, 20.15 mmol) in methanol was added . When the addition was completed, the reaction mixture was stirred at reflux for 24 hrs. The solvent was eliminated using rotavapor and reaction mixture was poured into water and extracted with ehtyl acetate. The product was crystallized after eliminated solvent and recrystallized from ethanol as white powder (**2**) (25% yield).

Melting Point: 127-129 °C (methanol, uncorrected).

IR ($CHCl_3$ film, cm^{-1}): 3502 (O-H); 3010 (C_{sp2}-H Ar); 2985 (C_{sp3}-H).

^{1}H-NMR (300 MHz; $CDCl_3$): δ= 10.56 (1H, s, OH); 7.11 (1H, dd, *J*= 8.7Hz, 2.7Hz); 6.94 (1H, d, *J*= 2.7Hz); 6.74 (1H, d, 8.7Hz); 3.65 (2H, s, Ar-CH_2); 2.81 (4H, m, -S-CH_2-); 2.71 (4H, m, -N-CH_2-).

^{13}C-NMR (75 MHz; $CDCl_3$): δ= 156 (C); 128.56 (CH); 128.31 (CH); 123.61 (C); 122.11(C);

117.37 (CH); 61.63 (Ar-CH_2); 54.27 (-S-CH_2-); 27.73 (-N-CH_2-).

MS (FAB; m/z, %): 244(100%); 215; 180; 154.

Elemental Analysis: Calculated for $C_{11}H_{14}NOSCl$: C, 54.20%; H, 5.79%; N, 5.75%; O, 6.56%; S, 13.15%; Cl, 14.54%. Found: C, 54.40%; H, 5.77%; N, 5.80%; O, 6.45%; S, 13.22%; Cl, 14.49%.

Acknowledgements
The authors wish to acknowledge to PAPIIT/UNAM Projects No IN205902 and IN207705 and ALPHARMA SA de CV, by partially support this work. We would like to thank C.Barajas, F. Sotres, P.García, D.Jiménez from FESC-UNAM and Rosa I.del Villar M., Oscar Yañez and Georgina Duarte from USAI-UNAM for their skillful technical assistance and DGSCA-UNAM for their support. As a part of Project Cátedra Química Medicinal of FESC-UNAM.

References

1. Biava, M., Fioravanti, R., Porretta, G.C., Deidda, D., Maullu, C., Pompei M. *Biorg.& Med. Chem.Lett.* **1999**, *9*, 2083-2985.

2. Teipel, S.; Griesar, K.; Haase, W.; Krebs, B. *Inorganic Chemistry* **1994**, *33*, 456-64.

3. Hodgkin, J.H., *Aust .J. Chem.*, **1984**, *37*, 2371-2378.

© 2005 MDPI. All rights reserved.

Molbank **2005**, M401 http://www.mdpi.net/molbank/

Synthesis of 4-*tert*-butyl-2-(thiomorpholin-4-ylmethyl)phenol, and 4-*tert*-butyl-2,6-bis(thiomorpholin-4-ylmethyl)phenol

A. Ma. Velázquez[1], L.Torres[1], R.González[1], I.Martínez[1], A.Valencia[1], A.Pecina[1], L.Torres, I.Menconi[1], L.Martínez[1], A.Ramírez[1], R.Hernández[1], R.López-Castañares[2] , O.Olvera-Neria[3], E.Angeles*[1],

1) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México,
2) Facultad de Química de la UAEM,
3) Instituto de Ciencias Básicas e Ingenieria, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

e-mail: angeles@servidor.unam.mx

Received: 2 April 2004 / Accepted: 31 May 2004 / Published: 1 July 2005

Keywords: phenol, thiomorpholine

4-*tert*-butyl-2-(thiomorpholin-4-ylmethyl)phenol (**2**) and 4-*tert*-butyl-2,6-bis(thiomorpholin-4-ylmethyl)phenol (**3**) were prepared from 4- *tert*-butylphenol (**1**) and thiomorpholine and formaldehyde (37%) in methanol as solvent . A solution of methanol (50 mL) and 4-*tert*-butylphenol (1.49 g, 9.92 mmol) 1 was prepared and and heated at 40 °C for 15 minutes, after that a solution of thiomorpholine (2.0 g, 20.7mmol) and formaldehyde (1.50 mL, 20.15 mmol) in methanol were added. When the addition was completed, the reaction mixture was stirred at reflux for 24 hrs. The solvent was eliminated using rotavapor and reaction mixture was poured into water and extracted with ethyl acetate. Chromatography on silica gel (30/70 EtOAc/*n*-hexane) afforded two crystalline products **2** and **3** (5% and 35 % yield).

4-*tert*-butyl-2-(thiomorpholin-4-ylmethyl)phenol (**2**)

Melting Point: 85-87 C° (methanol, uncorrected).

IR ($CHCl_3$ film; cm^{-1}): 3456 (O-H); 3197 (C_{sp2}-H Ar); 2886 (C_{sp3}-H).

^{1}H-NMR (300 MHz; $CDCl_3$): δ= 10.33 (1H, s, OH); 7.18 (1H, dd, *J*= 8.4Hz, 2.7Hz); 6.94 (1H, d, *J*= 2.7Hz); 6.74 (1H, d, 8.4Hz); 3.70 (2H, s, Ar-CH_2); 2.82 (4H, m, -S-CH_2-); 2.71 (4H, m, -N-

CH_2-); 1.27 (9H, CH_3).

^{13}C-NMR (75 MHz; $CDCl_3$): δ= 155 (C); 141.8 (C); 125.60 (CH); 125.49 (CH); 119.77(C); 115.47 (CH); 62.51 (Ar-$\underline{CH_2}$); 54.36 (-N-CH_2-); 33.84 (C); 31.48 (CH3); 27.79 (-S-CH_2-).

MS (FAB; m/z, %): 266(80%); 265 (100%); 163(45%).

Elemental Analysis: Calculated for $C_{15}H_{23}NOS$: C, 67.88%; H, 8.73%; N, 5.28%; O, 6.03%; S, 12.08%. Found: C, 67.58%; H, 8.75%; N, 5.41%; O, 6.09%; S, 12.01%.

4-*tert*-butyl-2,6-bis(thiomorpholin-4-ylmethyl)phenol (**3**)

Melting Point: 95-97 C° (methanol, uncorrected).

IR ($CHCl_3$ film; cm^{-1}): 3403 (O-H); 3089 (C_{sp2}-H Ar); 2986 (C_{sp3}-H).

^{1}H-NMR (300 MHz; $CDCl_3$): δ=10.69 (1H, s, OH); 7.09 (2H, s); 3.71 (4H, s, Ar-CH_2); 2.86 (8H, m, -S-CH_2-); 2.76 (8H, m, -N-CH_2-); 1.27 (9H, CH_3).

^{13}C-NMR (75 MHz; $CDCl_3$): δ=153.6 (C); 141.14 (C); 125.79 (CH); 121.22 (C); 58.81 (Ar-$\underline{CH_2}$); 54.42 (-N-CH_2-); 33.78 (C); 31.47 (CH_3); 27.74 (-S-CH_2-).

MS (FAB; m/z, %): 381 (35%); 278 (100%); 175 (50%).

Elemental Analysis: Calculated for $C_{20}H_{32}N_2OS_2$: C, 63.11%; H, 8.47%; N, 7.36%; O, 4.20%; S, 16.85%. Found: C, 63.42%; H, 8.51%; N, 7.29%; O, 4.25%; S, 16.91%.

Acknowledgements
The authors wish to acknowledge to PAPIIT/UNAM Projects No IN205902 and IN207705 and ALPHARMA SA de CV, by partially support this work. We would like to thank C.Barajas, F. Sotres, P.García, D.Jiménez from FESC-UNAM and Rosa I.del Villar M., Oscar Yañez and Georgina Duarte from USAI-UNAM for their skillful technical assistance and DGSCA-UNAM for their support. As a part of Project Cátedra Química Medicinal of FESC-UNAM.

References

1. Biava, M., Fioravanti, R., Porretta, G.C., Deidda, D., Maullu, C., Pompei M. *Biorg.& Med. Chem.Lett.* **1999**, *9*, 2983-2988.

2. Teipel, S.; Griesar, K.; Haase, W.; Krebs, B. *Inorganic Chemistry* **1994**, *33*, 456-64.

3. Hodgkin, J.H., *Aust .J. Chem*., **1984**, *37*, 2371-2378.

© 2005 MDPI. All rights reserved.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
European Journal of Medicinal Chemistry xx (2007) 1–15
EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY
http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Original article

Synthesis and antihypertensive effects of new methylthiomorpholinphenol derivatives

A. Ma. Velázquez [a], L. Martínez [a], V. Abrego [a], M.A. Balboa [b], L.A. Torre [a], B. Camacho [a], S. Díaz-Barriga [a], A. Romero [a], R. López-Castañares [c], E. Angeles [a,*]

[a] *División de Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 54740 Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Mexico*
[b] *Facultad de C. Químicas, UNACH, Mexico*
[c] *Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, Mexico*

Received 17 March 2006; received in revised form 25 March 2007; accepted 4 April 2007

Abstract

We present in this work the synthesis and cardiovascular effects of new methylthiomorpholine compounds and they were compared with cardiovascular drugs such as captopril, losartan and omapatrilat.
© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Cardiovascular effects; Thiomorpholin; Methylthiomorpholinphenols

UNCORRECTED PROOF

1. Introduction

In the last twenty years, cardiovascular diseases have become the world's leading cause of death [1]. In this setting, well-formulated health promotion programs may play an important role, as they are thought to reduce chronic disease-related morbidity and mortality, as well as health care costs [2]. It is known that such health programs may be effectively delivered at the workplace, in addition to improve absenteeism and work safety [3–6]. Under most real-world conditions, it is difficult and costly for worksite health promotion programs to follow strictly controlled research designs over an extended period of time, impeding the evaluation and determination of the most effective programmatic structure to achieve health improvements. On the other hand, it is estimated that about one million patients are hospitalized for acute coronary events each year in the United States, and it is well known that low socioeconomic status is associated with increased risk of cardiovascular disease in both men and women, and in different ethnic groups [7–9]. Risk factors for cardiovascular disease are prevalent in men and women [10]. In young adults, education level is inversely associated with 5-year weight gain [11] and 10-year incidence of high blood pressure [12], while financial hardship is associated with 10-year incidence of hypertension [13].

The dihydropyridine calcium channel blocker compounds such as nifedipine and isradipine were originally developed for the treatment of hypertension [14,15], and today there are many compounds used as antihypertensives [16]. In 1979, a research group in the People's Republic of China noted, while examining the antimalarial properties of derivatives of febrifugine, that one compound in clinical trials, changrolin, Fig. 1, was effective as an arrhythmic agent. In 1983, Stout and his research group of the American Hospital Supply Corporation, McGaw Park, Illinois, studied the structure of changrolin for its dissimilarity with currently marketed antiarrhythmics [17–20]; there are also other recent studies about the biological structure–activity relationships [21,22]. And so, we take the phenol and methylpyrrolidine rings as a structural

* Corresponding author. Tel./fax: +52 55 56232066.
E-mail address: angeles@servidor.unam.mx (E. Angeles).

0223-5234/$ - see front matter © 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ejmech.2007.04.003