



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DEL LEVOSIMENDÁN, EMPLEANDO
PROTOCOLOS DE LA QUÍMICA VERDE, ASÍ COMO SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Licenciado en Química Industrial ENRIQUE CÁRDENAS YONG

TUTOR: DR. BENJAMÍN VELASCO BEJARANO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, febrero del 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DEL LEVOSIMENDÁN, EMPLEANDO
PROTOCOLOS DE LA QUÍMICA VERDE, ASÍ COMO SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.I. ENRIQUE CÁRDENAS YONG

TUTOR: DR. BENJAMÍN VELASCO BEJARANO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Agradecimientos

A la primera persona, que le quiero agradecer es a mi tutor Benjamín Velasco Bejarano por su dedicación y paciencia, ya que sin su ayuda y conocimiento no hubiese sido posible realizar este proyecto y llegar a esta instancia tan anhelada.

A mis padres, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad pues me proporcionaron la mejor educación y lecciones de vida; muchos de mis logros se los debo a ustedes.

Mi padre Enrique, por haberme enseñado que, con esfuerzo, trabajo y ánimo todo se consigue.

Mi madre Leticia, por cada día hacerme ver la vida de una forma diferente y confiar en mis decisiones.

Así mismo, a mi hermana Ilse quien ha sido una fuente constante de motivación y apoyo incondicional a lo largo de mi vida académica y personal. Espero que sigamos creciendo juntos en este camino de la vida.

A mi novia Lizbeth quien siempre ha estado a mi lado apoyándome y alentándome a mejorar, y a quien considero mi cómplice a lo largo de esta vida como químico.

También a mis amigos Anuar, Alan, Osvaldo y Adriana, por todo su apoyo durante la realización de este trabajo, así como por todas las risas y buenos momentos que hemos compartido.

Por último, agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme el espacio para desarrollarme profesionalmente, así como a la Dra. Jazmín y Diana del Laboratorio de Miocardio por su valiosa asesoría a lo largo de la experimentación.

<u>Índice</u>	Página
1. Introducción	1
2. Generalidades	1
2.1. Tendencia e impacto de enfermedades cardiovasculares en México y el mundo	1
2.2. Obtención de 3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirimidin-2-onas.....	2
2.3. Levosimendán	3
2.4. Descripción de la diana biológica, sistema de troponinas cardíacas	6
2.5 Química verde	7
3. Planteamiento del problema.....	9
4. Hipótesis.....	9
5. Objetivos	10
5.1. Objetivo general	10
5.2. Objetivos particulares	10
6. Desarrollo experimental.....	11
6.1. Resumen gráfico.....	11
6.2. Equipos, materiales y reactivos	11
6.3. Obtención de 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirimidin-5-carboxilato de etilo (I)	12
6.4. Obtención de 4-(4-aminofenil)-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirimidin-5-carboxilato de etilo (II).....	13
6.5. Obtención de 4-{4-[2-(1,3-dicianopropan-2-ilideno)hidrazinil]fenil}-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro- 1 <i>H</i> -pirimidin-5-carboxilato de etilo (III).	14
6.6. Sección de química computacional.....	14
6.6.1. Estudio de acoplamiento molecular.....	14
6.7. Evaluación biológica de los compuestos sintetizados	16
6.7.1. Estudio ecocardiográfico	16

6.7.2. Medición de presión arterial y frecuencia cardiaca	17
7. Resultados y discusión.....	17
7.1. Obtención de 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirimidin-5-carboxilato de etilo	17
7.1.1. Espectrofotometría de absorción en la región del infrarrojo del compuesto I	17
7.1.2. Espectrometría de masas del compuesto I	18
7.1.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear, RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto I	23
7.2. Obtención de 4-(4-aminofenil)-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirimidin-5-carboxilato de etilo (II).....	29
7.2.1. Espectrofotometría de absorción en la región del infrarrojo del compuesto II	29
7.2.2. Espectrometría de masas del compuesto II	30
7.2.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear, RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto II ..	33
7.3. Obtención de 4-{4-[2-(1,3-dicianopropan-2-ilideno)hidrazinil]fenil}-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirimidin-5-carboxilato de etilo (III).	39
7.3.1. Espectrofotometría de absorción en la región del infrarrojo del compuesto III	39
7.3.2. Espectrometría de masas del compuesto III	40
7.3.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear, RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto III .	43
7.4. Evaluación biológica de los compuestos II y III	49
7.4.1. Estudio ecocardiográfico	49
7.4.2. Presión arterial y frecuencia cardiaca	50
7.5. Racionalización de unión por acoplamiento molecular	50
8. Conclusiones.....	54
9. Prospectivas.....	54

Índice de figuras

Página

Figura 1. Estructura molecular Levosimendán y sus metabolitos más importantes.	4
Figura 2. A. Esquema de ubicación de la diana biológica. B. Complejo de troponina cardiaca (PDB: 1J1E). En color rojo se muestra la subunidad cTnI, morado cTnT, amarillo cTnI (147-163) y verde cTnC (parte posterior correspondiente al C-dominio y delante N-dominio)	7
Figura 3. Los 12 Principios de la Química Verde ³⁷	8
Figura 4. Resumen gráfico del desarrollo experimental	11
Figura 5. Condiciones de reacción para la obtención de 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo	12
Figura 6. Condiciones de reacción para la obtención de 4-(4-aminofenil)-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo.....	13
Figura 7. Condiciones de reacción para la obtención de 4-{4-[2-(1,3-dicianopropan-2-ilideno)hidrazinil]fenil}-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo.....	14
Figura 8. Estructuras moleculares a pH= 7.4 de los estereoisómeros del compuesto III ocupadas en el estudio de acoplamiento molecular.	15
Figura 9. Estructura del ion dimérico [2M+H] ⁺ , obtenido a través de la técnica DART+.	20
Figura 10. Mecanismo de fragmentación, pérdida del grupo etoxilo.....	20
Figura 11. Mecanismo de fragmentación en la posición 5 del anillo de DHPM.	21
Figura 12. Mecanismo de fragmentación del anillo de DHPM.....	21
Figura 13. Resultados del experimento alta resolución del compuesto I	23
Figura 14. Estructura enumerada del compuesto I	24
Figura 15. Resultados del experimento alta resolución del compuesto II	33
Figura 16. Estructura enumerada del compuesto II	34
Figura 17. Resultados del experimento alta resolución del compuesto III	43
Figura 18. Estructura enumerada del compuesto III	44
Figura 19. Dominio regulatorio de la troponina cardiaca C, en color magenta se muestran los residuos con mayor interacción con Levosimendán, por lo tanto, definiendo el sitio de unión experimental.	51
Figura 20. A. Agrupaciones obtenidas a partir de la simulación de acoplamiento molecular Levosimendán-dominio regulatorio cTnTnC. B. Diagrama 2D de las interacciones ligando-receptor dentro del sitio 1.....	52
Figura 21. A. Agrupaciones obtenidas a partir de la simulación de acoplamiento molecular compuesto IIIa -dominio regulatorio cTnTnC. B. Compuesto IIIb -dominio regulatorio cTnTnC. C. Diagrama 2D de las	

interacciones IIIa -receptor dentro del sitio 1. D. Diagrama 2D de las interacciones IIIb -receptor dentro del sitio 2.	53
Figura 22. A. Diagrama 3D de la pose de unión más estable en el acoplamiento Levosimendán-receptor en el sitio 1. B. Compuesto IIIa -receptor en el sitio 1	54

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Resultados RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto I	23
Tabla 2. Resultados RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto II	33
Tabla 3. Resultados RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto III	43
Tabla 4. Resultados de la evaluación ecocardiográfica del compuesto II y III , empleando Levosimendán como control.....	49
Tabla 5. Resultados de presiones arteriales y frecuencia cardiaca, empleando Levosimendán como control. PAS (presión arterial sistólica), PAD (presión arterial diastólica) y FC (frecuencia cardiaca).	50
Tabla 6. Resultados del acoplamiento molecular ciego, de los ligandos Levosimendán, IIIa y IIIb con cNTnC.	51

Índice de espectros

	Página
Espectro 1. Espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto I	18
Espectro 2. Espectro de masas adquirido por análisis directo en tiempo real del compuesto I	19
Espectro 3. Espectro de masas adquirido por IE del compuesto I	22
Espectro 4. Espectro RMN ¹ H del compuesto I	25
Espectro 5. Espectro RMN ¹³ C del compuesto I	26
Espectro 6. HSQC del compuesto I	27
Espectro 7. DEPT 90 del compuesto I	28
Espectro 8. DEPT 135 del compuesto I	28
Espectro 9. Espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto II	29
Espectro 10. Acercamiento a la región 1900-400cm ⁻¹ del espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto II	30

Espectro 11. Espectro de masas adquirido por análisis directo en tiempo real del compuesto II.	31
Espectro 12. Espectro de masas adquirido por IE del compuesto II.	32
Espectro 13. Espectro RMN ¹ H del compuesto II.....	35
Espectro 14. Espectro RMN ¹³ C del compuesto II.....	36
Espectro 15. HSQC del compuesto II.....	37
Espectro 16. DEPT 90 del compuesto II.	38
Espectro 17. DEPT 135 del compuesto II.	38
Espectro 18. Espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto III.....	40
Espectro 19. Espectro de masas adquirido por análisis directo en tiempo real del compuesto III.....	41
Espectro 20. Espectro de masas adquirido por IE del compuesto III.	42
Espectro 21. Espectro RMN ¹ H del compuesto III.	45
Espectro 22. Espectro RMN ¹³ C del compuesto III.	46
Espectro 23. HSQC del compuesto III.	47
Espectro 24. DEPT 90 del compuesto III.	48
Espectro 25. DEPT 135 del compuesto III.....	48

Glosario

% ar	Porcentaje de abundancia relativa
Å	Ángstrom
B3C	Reacción de Biginelli donde participan 3 componentes.
ccf	Cromatografía en capa fina
cTnC	Troponina C cardiaca
cCTnC	Dominio-C de la troponina C cardiaca
cNTnC	Dominio-N de la troponina C cardiaca
DART+	Análisis directo en tiempo real modo positivo
DHPM	Dihidropirimidinonas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometría de masas
ECV	Enfermedades cardiovasculares
Et	Etilo
FC	Frecuencia cardiaca
FE	Fracción de eyección
FA	Fracción de acortamiento
h	Horas
IR	Irradiación infrarroja
min	Minutos
MHz	Megahercios
MO	Microondas
m/z	Relación masa carga
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PDE III	Fosfodiesterasa 3
RMN	Resonancia magnética nuclear
UV	Ultravioleta
VFD	Volumen al final de la diástole
VFS	Volumen al final de la sístole
VS	Volumen sistólico

1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares representan un riesgo latente que afectan a la mortalidad y calidad de vida de millones de personas alrededor del mundo, entre estas se encuentra la insuficiencia cardiaca aguda, que es provocada generalmente por una pérdida en la fuerza contráctil en los cardiomiocitos generando eventos cardiovasculares, y en muchos casos la muerte. En ese sentido en el presente trabajo se sintetizó un análogo estructural del Levosimendán a partir de una variación del anillo de piridazina por una dihidropirimidinona, obteniendo el compuesto 4-{4-[2-(1,3-dicianopropan-2-ilideno)hidrazinil]fenil}-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-5-carboxilato de etilo, el cual se evaluó farmacológicamente junto al compuesto 4-(4-aminofenil)-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-5-carboxilato de etilo en un modelo *in vivo* como agentes inotrópicos positivos a través de un estudio ecocardiográfico y medición de la presión arterial y frecuencia cardiaca administrados en una dosis de 2 mg/kg. Adicionalmente, se realizó un estudio computacional de acoplamiento molecular para la racionalización de los resultados obtenidos de la evaluación biológica a través de la identificación de las potenciales interacciones con la diana biológica correspondiente al dominio regulatorio de la troponina cardiaca C.

2. Generalidades

2.1. Tendencia e impacto de enfermedades cardiovasculares en México y el mundo

Las enfermedades no contagiosas afectan a personas de todos los sectores socioeconómicos y culturales alrededor de todo el mundo, éstas son el resultado de una serie de factores de riesgo que, en la actualidad, se ven ante una globalización de comportamientos que dificultan la prevención de estas enfermedades. Son la principal causa de muerte a nivel mundial, mostrando un incremento del 13% en el periodo 2000-2019, en el año 2019 representó el 74% (equivalente a 41 millones de personas) del número total de muertes a nivel global¹. Sin embargo, no solamente representan un riesgo para la salud humana sino es una amenaza para los sectores económico y de producción de todos los países, ya que en el 2019 causó el 63% (equivalente a 1.6 mil millones) de años de vida ajustados por discapacidad¹.

Entre las enfermedades no contagiosas las cardiovasculares, ECV, son las que presentan una mayor mortalidad ocasionando 17.9 millones de muertes mundialmente, además es la principal causa de muerte en México desde

1990 hasta la actualidad^{1,2}. Esta tendencia a nivel nacional se debe al aumento de la incidencia en por lo menos un factor de riesgo de ECV. Entre los factores de riesgo se encuentran el consumo de tabaco, consumo de alcohol, obesidad, hipertensión, dislipidemia y diabetes; por ejemplo, la obesidad infantil aumentó el 9.6% en niñas y niños entre 5 a 11 años, y aumentó más del 10% en adultos entre 1999 y 2021³.

Ante un panorama donde las enfermedades cardiovasculares seguirán representando un riesgo latente para la salud humana, se siguen desarrollando programas para la prevención, detección y atención oportuna de estas enfermedades en los que se prioriza, a partir de evidencia, seleccionar la mejor estrategia posible de tratamiento para un paciente en particular que sufra ECV, por lo tanto, es imperante continuar con el desarrollo de nuevas moléculas y su evaluación para la práctica clínica, y así disminuir el aporte negativo al cambio de esperanza de vida con respecto a la situación actual.

2.2. Obtención de 3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-2-onas

La obtención de dihidropirimidinonas (DHPMs) es a través de la reacción multicomponente B3C, descrita originalmente en el protocolo de Biginelli⁴, mediante el uso de un aldehído aromático y un β -cetoéster como sustratos, urea como reactivo y un ácido mineral como catalizador.

Desde el descubrimiento por Pietro Biginelli se han sintetizado una gran cantidad de dihidropirimidinonas, cuya actividad biológica se ha estudiado desde hace más de dos décadas encontrando potenciales beneficios para la salud humana como agentes antitumorales ante líneas celulares HeLa, MCF-7⁵ y SK-BR-3⁶, antimicrobianos en

¹ Organization, W. H. (2023). *World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals*. World Health Organization.

² Gómez, H., Fullman, N., Lamadrid, H., Cahuana, L., Darney, B. G., Ávila, L., Correa-Rotter, R., Rivera, J. A., Barquera, S., González, E., Aburto, T., De Castro, E. F., Barrientos, T., Basto, A. C., Batis, C., Borges, G., Campos, I., Campuzano, J. C., De Jesús Cantoral, A., Contreras, A. G., Cuevas, L., De la Cruz, V. V., Díaz, J. L., García, M. L., García, A., González de Cossío, T., González, L. D., Heredia, I., Hajar, M. C., Jáuregui, A., Jimenez, A., Lopez, N., Magis, C., Medina, C., Medina, M. E., Mejia, F., Montañez, J. C., Montero, P., Montoya, A., Moreno, G. L., Pedroza, A., Pérez, R., Quezada, A. D., Richardson-López, V., Riojas, H., Ríos, M. J., Razo, C., Romero, M. P., Sánchez, T. G., Sánchez, L. M., Schilman, A., Servan, E., Shamah, T., Téllez, M. M., Texcalac, J. L., Wang, H., Vos, T., Forouzanfar, M. H., Naghavi, M., López, A. D., Murray, C. J., Lozano, R. (2016). Dissonant health transition in the states of Mexico, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 388(10058), 2386-2402. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)31773-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)31773-1)

³ Aburto, Z. R. (2023). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2022. *Salud Pública de México*, 65, s1-s4. <https://doi.org/10.21149/15087>

⁴ Biginelli, P. (1893) Aldehyde-Urea Derivatives of Aceto- and Oxaloacetic Acids. *Gazzetta Chimica Italiana*, 23, 360-413.

⁵ Bidram, Z., Sirous, H., Khodarahmi, G., Hassanzadeh, F., Dana, N., Hariri, A. H., Rostami, M. (2020). Monastrol derivatives: in silico and in vitro cytotoxicity assessments. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 15(3), 249. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.288427>

⁶ Wright, C. E., Chovatiya, R. J., Jameson, N. E., Turner, D. A., Zhu, G., Werner, S., Huryn, D. M., Pipas, J. M., Day, B. W., Wipf, P., Brodsky, J. L. (2008). Pyrimidinone-peptoid hybrid molecules with distinct effects on molecular chaperone function and cell proliferation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(6), 3291–3301. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.12.014>

contra de *Mycobacterium tuberculosis*^{7,8}, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*⁹, antivirales^{10,11}, antifúngicos en contra de *Aspergillus niger*, *Chrysosporium tropicum*, *Rhizopusoryzae*, *Fusarium moniliformae*, *Curvularia lunata*¹², *Candida albicans* y *Aspergillus parasiticus*^{13,14} y como bloqueadores de canales de calcio para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión, arritmias cardíacas y angina de pecho^{15,16,17}.

2.3. Levosimendán

El Levosimendán es el levo isómero de la molécula 2-[[4-((4*R*)-4-metil-6-oxo-4,5-dihidro-1*H*-piridazin-3-il)fenil]hidrazinilideno]propanodinitrilo¹⁸, es el fármaco sensibilizante al calcio más potente disponible en el mercado (Simdax[®]), introducido en el año 2000 en Suecia y es comercializado únicamente en algunos países de Sudamérica y Europa para su uso en paciente con insuficiencia cardíaca aguda. Actualmente, es el agente

⁷ Yadlapalli, R. T., Chourasia, O. P., Vemuri, K., Sritharan, M., Sridhar, P. R. (2012). Synthesis and in vitro anticancer and antitubercular activity of diarylpyrazole ligated dihydropyrimidines possessing lipophilic carbamoyl group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(8), 2708–2711. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.02.101>

⁸ Trivedi, A. R., Bhuva, V. R., Dholariya, B. H., Dodiya, D. K., Kataria, V. B., Shah, V. H. (2010). Novel dihydropyrimidines as a potential new class of antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(20), 6100–6102. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.046>

⁹ Chitra, S., Devanathan, D., Pandiarajan, K. (2010). Synthesis and in vitro microbiological evaluation of novel 4-aryl-5-isopropoxycarbonyl-6-methyl-3,4-dihydropyrimidinones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(1), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.09.018>

¹⁰ Kim, J., Park, C., Ok, T., So, W., Jo, M., Seo, M., Kim, Y., Sohn, J., Park, Y. S., Ju, M. H., Kim, J., Han, S., Kim, T. Y., Cechetto, J., Nam, J., Sommer, P., No, Z. (2012). Discovery of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones with inhibitory activity against HIV-1 replication. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(5), 2119–2124. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.12.090>

¹¹ Kim, J., Ok, T., Park, C., So, W., Jo, M., Kim, Y., Seo, M., Lee, D., Jo, S., Ko, Y., Choi, I., Park, Y., Yoon, J., Ju, M. K., Ahn, J., Kim, J., Han, S., Kim, T., Cechetto, J., Nam, J., Liuzzi, M., Sommer, P., No, Z. (2012). A novel 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one: HIV-1 replication inhibitors with improved metabolic stability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(7), 2522–2526. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.01.133>

¹² Rajanarendar, E., Reddy, M. V., Murthy, K. P. N., Reddy, K. R., Raju, S., Srinivas, M., Prasanna, B. M., Rao, M. S. R. (2010). Synthesis, antimicrobial, and mosquito larvicidal activity of 1-aryl-4-methyl-3,6-bis-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-thioxo-2,3,6,10b-tetrahydro-1*H*-pyrimido[5,4-*c*]quinolin-5-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(20), 6052–6055. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.060>

¹³ Beena, K. P., Akelesh, T. (2012). Synthesis and screening of some dihydropyrimidine derivatives as antimicrobial agents. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(9), 303–304.

¹⁴ Para más ejemplos de actividades biológicas.

a) De Fátima, Â., Braga, T. C., Neto, L. S., Terra, B. S., Oliveira, B. G., Da Silva, D. L., Modolo, L. V. (2015). A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. *Journal of Advanced Research*, 6(3), 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.10.006>

b) Matos, L. H., Masson, F. T., Simeoni, L. A., Homem-de-Mello, M. (2018). Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1779–1789. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.073>

¹⁵ Janis, R., Silver, P. J., Triggler, D. J. (1987). Drug action and cellular calcium regulation. *Advances in Drug Research*, 16, 309–591.

¹⁶ Atwal, K. S., Rovnyak, G. C., Schwartz, J. E., Moreland, S., Hedberg, A., Gougoutas, J. Z., Malley, M. F., Floyd, D. (1990). Dihydropyrimidine calcium channel blockers: 2-heterosubstituted 4-aryl-1,4-dihydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as potent mimics of dihydropyridines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 33(5), 1510–1515. <https://doi.org/10.1021/jm00167a035>

¹⁷ Zorkun, I. S., Saraç, S., Çelebi, S., Erol, K. (2006). Synthesis of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-thione derivatives as potential calcium channel blockers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(24), 8582–8589. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.031>

¹⁸ Raasmaja, A., Talo, A., Haikala, H., Nissinen, E., Linden, I., Pohto, P. (1992). Biochemical properties of OR-1259 - a positive inotropic and vasodilatory compound with an antiarrhythmic effect. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 311, 423. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3362-7_63

sensibilizante al calcio más ampliamente estudiado tanto en su evaluación clínica¹⁹, mecanismos de acción²⁰ e incluso beneficios socioeconómicos en los sistemas de salud²¹.

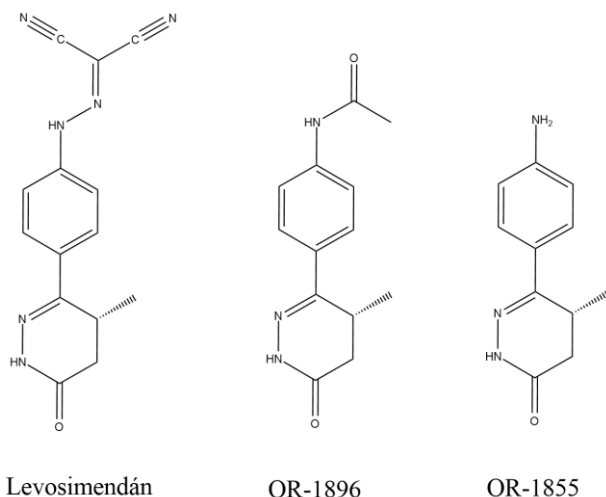


Figura 1. Estructura molecular Levosimendán y sus metabolitos más importantes.

Levosimendán es un agente inotrópico positivo que incrementa la contractilidad del miocardio a través del incremento de la afinidad del dominio regulatorio del complejo de troponina C hacia el ion Ca^{2+} . La sensibilización al Ca^{2+} es la respuesta a la interacción molecular de Levosimendán con la región hidrofóbica del dominio regulatorio de la troponina C cuando esta se encuentra saturada de Ca^{2+} dentro de su región II. El efecto de esta interacción es el desplazamiento del equilibrio dinámico hacia la conformación abierta del dominio regulatorio de troponina C, aumentando su estabilidad y afinidad por el ion Ca^{2+} ^{22,23}. A partir de esta interacción se aumenta

¹⁹ Papp, Z., Agostoni, P., Alvarez, J., Bettex, D., Bouchez, S., Brito, D., Cerný, V., Comín-Colet, J., Crespo-Leiro, M. G., Delgado, J. L., Édes, I., Eremenko, A. S., Farmakis, D., Fedele, F., Fonseca, C., Fruhwald, S., Girardis, M., Guarracino, F., Harjola, V., Heringlake, M., Herpain, A., Heunks, L., Husebye, T., Ivanca, V., Karason, K., Kaul, S., Kivikko, M., Kubica, J., Masip, J., Matskeplishvili, S., Mebazaa, A., Nieminen, M. S., Olivia, F., Papp, J. G., Parisis, J., Parkhomenko, A., Poder, P., Polzl, G., Reinecke, A., Ricksten, S., Riha, H., Rudiger, A., Sarapohja, T., Schwinger, R. H., Toller, W., Tritapepe, L., Tschöpe, C., Wikstrom, G., Lewinski, D., Vrtovec, B., Pollesello, P. (2020). Levosimendan efficacy and safety. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 76(1), 4-22 <https://doi.org/10.1097/fjc.0000000000000859>

²⁰ John, B., Babu, M., Shaji, S., Abraham, S., Abdullakutty, J. (2021). Clinical outcomes of Levosimendan versus dobutamine in patients with acute decompensated heart failure with reduced ejection fraction and impaired renal function. *Indian heart journal*, 73(3), 372-375. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2021.02.010>

²¹ Lorite, N., Rubio-Rodríguez, D., Costello, J. G., López, C., Grau, C., Segovia, J., Jimenez, J. F., Sien, C. C., Rubio-Terrés, C., Comín-Colet, J. (2020). Economic analysis of intermittent intravenous outpatient treatment with Levosimendan in advanced heart failure in Spain. *Revista española de cardiología*, 75(5), 361-367 <https://doi.org/10.1016/j.rec.2019.06.020>

²² Sorsa, T., Heikkinen, S., Abbott, M. B., Abusamhadneh, E., Laakso, T., Tilgmann, C., Serimaa, R., Annala, A., Rosevear, P. R., Drakenberg, T., Pollesello, P., Kilpeläinen, I. (2001). Binding of levosimendan, a calcium sensitizer, to cardiac troponin C. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9337-9343. <https://doi.org/10.1074/jbc.m007484200>

²³ Robertson, I. H., Sun, Y., Li, M. X., Sykes, B. D. (2010). A structural and functional perspective into the mechanism of Ca^{2+} -sensitizers that target the cardiac troponin complex. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(6), 1031-1041. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.08.019>

la fuerza de contracción del cardiomiocito sin necesidad de un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , por lo que no se altera la etapa de relajación ventricular (diástole).

Levosimendán tiene la capacidad de abrir los canales de K^+ sensibles a ATP^{24} , y en menor medida se encuentran involucrados la apertura de otros canales como los de K^+ activados por el ion Ca^{2+} y los canales de K^+ dependientes de voltaje^{25,26,27} produciendo una hiperpolarización de la membrana celular del músculo liso disminuyendo la concentración de Ca^{2+} disponible para el aparato miocontráctil y disminuyendo el tono muscular de los vasos sanguíneos para aumentar el flujo sanguíneo, es decir, genera un efecto vasodilatador.

Durante el proceso de metabolismo del Levosimendán se producen dos metabolitos responsables de los efectos cardioprotectores debido a su elevado tiempo de vida media posterior a su administración (70-80 horas), el primero de estos es generado en el intestino delgado en donde el 5% aproximado de la cantidad de fármaco total administrado se transforma en (4R)-3-(4-aminofenil)-4-metil-4,5-dihidro-1H-piridazin-6-ona eliminando de su estructura el grupo malonitrilo, a este metabolito se le denominó OR-1855, mientras que la segunda transformación metabólica sucede en el hígado llevando a cabo la acetilación de OR-1855 formado previamente para producir el metabolito biológicamente activo OR-1896, N-{4-[(4R)-4-metil-6-oxo-4,5-dihidro-1H-piridazin-3-il]fenil}etanamida.

Levosimendán y la presencia de su metabolito OR-1896 han mostrado ser potentes inhibidores selectivos a la isoforma III de la fosfodiesterasa (PDE III, por sus siglas en inglés), responsable junto con sus otras isoformas de la modulación de los niveles de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc)^{28,29,30}.

²⁴ Yokoshiki, H., Katsube, Y., Sunagawa, M., Sperelakis, N. (1997). The novel calcium sensitizer levosimendan activates the ATP-sensitive K^+ channel in rat ventricular cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283(1), 375-383.

²⁵ Erdei, N., Papp, Z., Pollesello, P., Édes, I., Bagi, Z. (2006). The Levosimendan metabolite OR-1896 elicits vasodilation by activating the K_{ATP} and BK_{CA} channels in rat isolated arterioles. *British Journal of Pharmacology*, 148(5), 696-702. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706781>

²⁶ Pataricza, J., Krassó, I., Höhn, J., Kun, A., Papp, J. G. (2003). Functional role of potassium channels in the vasodilating mechanism of Levosimendan in porcine isolated coronary artery. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 17(2), 115-121. <https://doi.org/10.1023/a:1025331617233>

²⁷ De Witt, B. J., Ibrahim, I. N., Bayer, E. Z., Fields, A. J., Richards, T. L., Banister, R. E., Kaye, A. D. (2002). An analysis of responses to Levosimendan in the pulmonary vascular bed of the cat. *Anesthesia & Analgesia*, 94(6), 1427-1433. <https://doi.org/10.1097/00000539-200206000-00009>

²⁸ Brixius, K., Reicke, S., Schwinger, R. H. G. (2002). Beneficial effects of the Ca^{2+} sensitizer levosimendan in human myocardium. *American Journal of Physiology-heart and Circulatory Physiology*, 282(1), H131-H137. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2002.282.1.h131>

²⁹ Choi, Y., Cowan, D. B., Wahlers, T., Hetzer, R., Del Nido, P. J., Stamm, C. (2009). Calcium sensitisation impairs diastolic relaxation in post-ischaemic myocardium: implications for the use of Ca^{2+} sensitising inotropes after cardiac surgery. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 37(2), 376-383. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2009.05.030>

³⁰ Szilágyi, S., Pollesello, P., Levijoki, J., Kaheinen, P., Haikala, H., Édes, I., Papp, Z. (2004). The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *European Journal of Pharmacology*, 486(1), 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.12.005>

2.4. Descripción de la diana biológica, sistema de troponinas cardíacas

El complejo de troponinas cardíacas, cTn, estructuralmente, se encuentran formadas por tres subunidades cuyos nombres provienen de acuerdo con la acción que desempeñan dentro del complejo³¹ y estas son: la subunidad donde se une el ion calcio llamada troponina C, cTnC; la subunidad de inhibición troponina I, cTnI; y por último, la troponina T, cTnT, que une ambas subunidades para formar el complejo de troponina y además fija el complejo a la tropomiosina.

La troponina cardíaca C se encuentra distribuida en dos dominios, el dominio regulador (dominio-N) y el dominio estructural (dominio-C) los cuales en solución adoptan la forma de una mancuerna unidas entre ellas a través de una cadena de aminoácidos flexible³² (figura 2). El dominio-C, cTnC, presenta dos sitios no selectivos de alta afinidad hacia los iones Ca^{2+} , que por lo general se encuentran ocupados provocando que este dominio se encuentre en una conformación abierta.

La estructura y función que tiene cTnC dentro de complejo de troponinas es fundamental para generar contracciones calcio dependientes, el principal evento que debe suceder es la unión del ion Ca^{2+} en el único sitio de unión del dominio regulatorio cTnC para generar un cambio conformacional a una disposición estructural abierta que expone el sitio hidrofóbico que se encontraba oculto en la forma apo de este dominio, este cambio conformacional permite la interacción con la troponina I específicamente con los residuos 147-163, cTnI₁₄₇₋₁₆₃, lo que ocasiona una estabilización de la conformación abierta de cTnC y por lo tanto, un aumento en la afinidad de este dominio hacia el ion Ca^{2+} ^{33, 34}.

Una vez establecida la interacción entre cTnC y cTnI₁₄₆₋₁₆₁ se produce el desplazamiento de las regiones inhibitorias cTnI₁₂₈₋₁₄₅ y cTnI₁₆₂₋₂₁₀ adyacentes a la región de unión cTnI₁₄₇₋₁₆₃ liberando los sitios activos de los monómeros de actina para permitir la interacción miosina-actina lo que provoca la contracción muscular.

³¹ Farah, C. S., Reinach, F. C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *The FASEB Journal*, 9(9), 755-767. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.9.7601340>

³² Sia, S. K., Li, M. X., Spyrapoulos, L., Gagné, S. M., Liu, B., Putkey, J. A., Sykes, B. D. (1997). Structure of cardiac muscle Troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain. *Journal of Biological Chemistry*, 272(29), 18216-18221. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18216>

³³ Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K., Maéda, Y. (2003). Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca^{2+} -saturated form. *Nature*, 424(6944), 35-41. <https://doi.org/10.1038/nature01780>

³⁴ Li, M. X., Spyrapoulos, L., Sykes, B. D. (1999). Binding of cardiac troponin-i₁₄₇₋₁₆₃ induces a structural opening in human cardiac troponin-C. *Biochemistry*, 38(26), 8289-8298. <https://doi.org/10.1021/bi9901679>

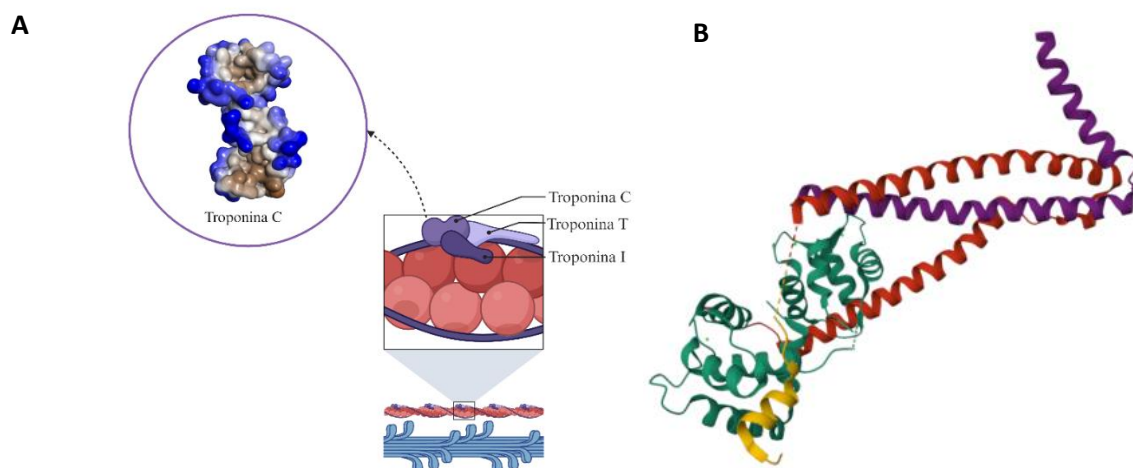


Figura 2. A. Esquema de ubicación de la diana biológica. B. Complejo de troponina cardíaca (PDB: 1J1E). En color rojo se muestra la subunidad cTnI, morado cTnT, amarillo cTnI (147-163) y verde cTnC (parte posterior correspondiente al C-dominio y delante N-dominio)

2.5 Química verde

El principal objetivo de la química verde es la integración de los conocimientos y habilidades en las actividades químicas con la finalidad de reducir o eliminar todos aquellos factores que representen un riesgo para el bienestar del medio ambiente y la salud humana, a través del diseño, planificación y aplicación de acuerdo con su Protocolo conocido como Los 12 Principios de la Química Verde³⁵. Estos principios fueron propuestos por Paul Anastas y John C. Warner³⁶, que representan en conjunto un paradigma que promueve en el sector académico, de investigación e industrial al total entendimiento de la naturaleza de los problemas ambientales generados por las actividades en el ámbito de la química, con el objetivo de prevenirlos en lugar de corregirlos³⁷.



1.- Prevenir la generación de residuos.



2.- Economía atómica.



3.- Síntesis química segura.



4.- Diseño de productos seguros.



5.- Empleo de disolventes seguros y auxiliares.



7.- Usar materias primas renovables.



8.- Reducción de derivados químicos.



9.- Catálisis



10.- Diseñar productos degradables.



11.- Seguimiento en tiempo real.

³⁵ Anastas, P. T. (1999). Green chemistry and the role of analytical methodology development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), 167-175. <https://doi.org/10.1080/10408349891199356>

³⁶ Anastas, P. T., Warner, J. C. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, New York.

³⁷ De Marco, B. A., Rechelo, B. S., Tótolí, E. G., Kogawa, A. C., Salgado, H. R. N. (2019). Evolution of Green Chemistry and its Multidimensional Impacts: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>

 6.- Eficiencia energética.

 12.- Prevenir accidentes.

Figura 3. Los 12 Principios de la Química Verde³⁷.

Entre algunos de los principios por resaltar dado a que tienen incidencia en el presente trabajo se encuentran el principio 2, 5, 6 y 11.

El principio 2 tiene como fundamento que toda transformación química debe de ser diseñada y planeada para incorporar el mayor número de átomos de los sustratos y reactivos empleados en la estructura del producto final, sin considerar disolventes ni catalizadores, por lo tanto, es una relación porcentual entre la masa molecular del producto y los sustratos y reactivos utilizados. En ese sentido, se calculó el valor de economía atómica para todos los productos obtenidos en el presente trabajo, obteniendo valores relativamente altos.

El principio 5 se refiere a evitar el uso de disolventes y auxiliares químicos cuando sea posible de acuerdo a la naturaleza intrínseca de la reacción, y cuando esto no sea posible deben ser lo más inocuos posible. Con respecto a los disolventes, estos han sido clasificados en base a sus características como presión de vapor, volatilidad, flamabilidad, toxicidad, entre otros, en donde se encuentran como disolventes seguros o recomendados para su uso el agua, etanol, y acetato de etilo, los cuales fueron los únicos disolventes empleados en la metodología experimental descrita en el presente manuscrito.

El principio 6 tiene como fundamento aumentar la eficiencia energética involucrada en las transformaciones químicas debido al alto impacto ambiental que representa la generación de energía eléctrica, esto mediante la modificación de las condiciones de reacción, o a través del uso de fuentes alternas de activación química que permitan abatir los tiempos de reacción y mejorar los rendimientos e incluso evitar la generación de subproductos. Una de las fuentes alternas de activación química más utilizada en la actualidad es el calentamiento por microondas, el cual a través de dos posibles mecanismos ya sea la polarización dipolar, la conducción iónica, o la combinación de ellos permite la distribución uniforme del calentamiento en todo el medio de reacción, lo que conlleva a un proceso más rápido y selectivo.³⁸

El principio 11 se refiere al seguimiento en tiempo real de una reacción química con el objetivo de determinar adecuadamente el tiempo en el que finaliza la transformación química evitando la formación de subproductos no deseados y un gasto sobrado de energía. En ese sentido, en el presente trabajo se realizó el seguimiento del avance de la reacción a través de un análisis "On-line" empleando la técnica de cromatografía en capa fina.

³⁸ Leadbeater, N. E. (2014). 9.10 Organic synthesis using microwave heating. *Elsevier eBooks* . p. 236-238. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-097742-3.00920-4>

3. Planteamiento del problema

En las últimas décadas se ha observado un incremento en el padecimiento de enfermedades no contagiosas en especial aquellas relacionadas con el sistema cardiovascular. Estas enfermedades han persistido y se han convertido en un problema de salud mundial debido a que se han favorecido comportamientos en nuestro estilo de vida que representan factores de riesgo ante nuestra salud cardiovascular, por lo que anualmente estas enfermedades son causantes de decenas de millones de muertes alrededor de todo el mundo.

En ese sentido, el desarrollo de nuevos fármacos que representen alternativas más potentes y específicas se ha convertido en una necesidad ineludible, por lo que se han creado estrategias que faciliten el desarrollo de nuevos compuestos con una actividad biológica determinada. Entre estas estrategias se encuentra el desarrollo de nuevos compuestos bioactivos a partir de mantener o mejorar las interacciones que tiene una clase determinada de fármacos con su respectivo receptor, permitiendo establecer novedosos análogos estructurales basados en fármacos potentes representando una opción para eliminar efectos adversos no deseados, facilitar la ruta de síntesis química y mejorar su afinidad hacia su respectivo receptor a través de la diversificación estructural.

Dentro de este interés hacia nuevos compuestos líderes dirigidos a pacientes con enfermedades cardiovasculares se han desarrollado nuevas metodologías de síntesis aplicando principios de la química verde, reafirmando la necesidad de una responsabilidad ambiental y de desarrollo sostenible que permitan mitigar las alteraciones en nuestro entorno ambiental. Entre estas nuevas metodologías destacan aquellas que se encuentran dirigidas a la síntesis de dihidropirimidinonas, heterociclos que han presentado a lo largo de las últimas décadas ensayos acerca de sus actividades hipotensoras y vasodilatadoras, representando una familia de compuestos con el potencial biológico para formar parte de novedosos candidatos a fármacos.

Por lo anterior, se planteó el desarrollo de una molécula análoga al Levosimendán, empleando el protocolo de la química verde, con la finalidad de generar alternativas viables en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda.

4. Hipótesis

La obtención de un análogo del Levosimendán mediante la variación del anillo de piridazina por una 3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-2-ona, dará origen a un compuesto con actividad inotrópica positiva.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Obtener un análogo estructural del Levosimendán modificando la estructura de piridazina por una 3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-2-ona, empleando el protocolo de la química verde para su posterior evaluación en un modelo *in vivo*.

5.2. Objetivos particulares

1. Emplear la reacción de Biginelli para la síntesis del intermediario sintético 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-5-carboxilato de etilo (**I**) utilizando microondas como fuente alterna de activación.
2. Comparar eficiencias entre las metodologías para la reacción de Biginelli empleando una fuente de activación alterna y una fuente de activación térmica.
3. Obtener el producto 4-(4-aminofenil)-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-5-carboxilato de etilo (**II**) a partir de la reducción de un grupo nitro aromático.
4. Obtener el producto 4-{4-[2-(1,3-dicianopropan-2-ilideno)hidrazinil]fenil}-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-5-carboxilato de etilo (**III**).
5. Caracterizar por espectroscopia y espectrometría mediante sus datos de RMN ^1H , ^{13}C , E.M baja resolución y alta resolución e IR los compuestos sintetizados.
6. Emplear la estrategia de acoplamiento molecular como una herramienta computacional para la racionalización de la unión ligando-diana biológica.
7. Realizar la evaluación biológica como inotrópico positivo de los compuestos sintetizados a través de un estudio ecocardiográfico y método de “tail cuff”.

6. Desarrollo experimental

6.1. Resumen gráfico

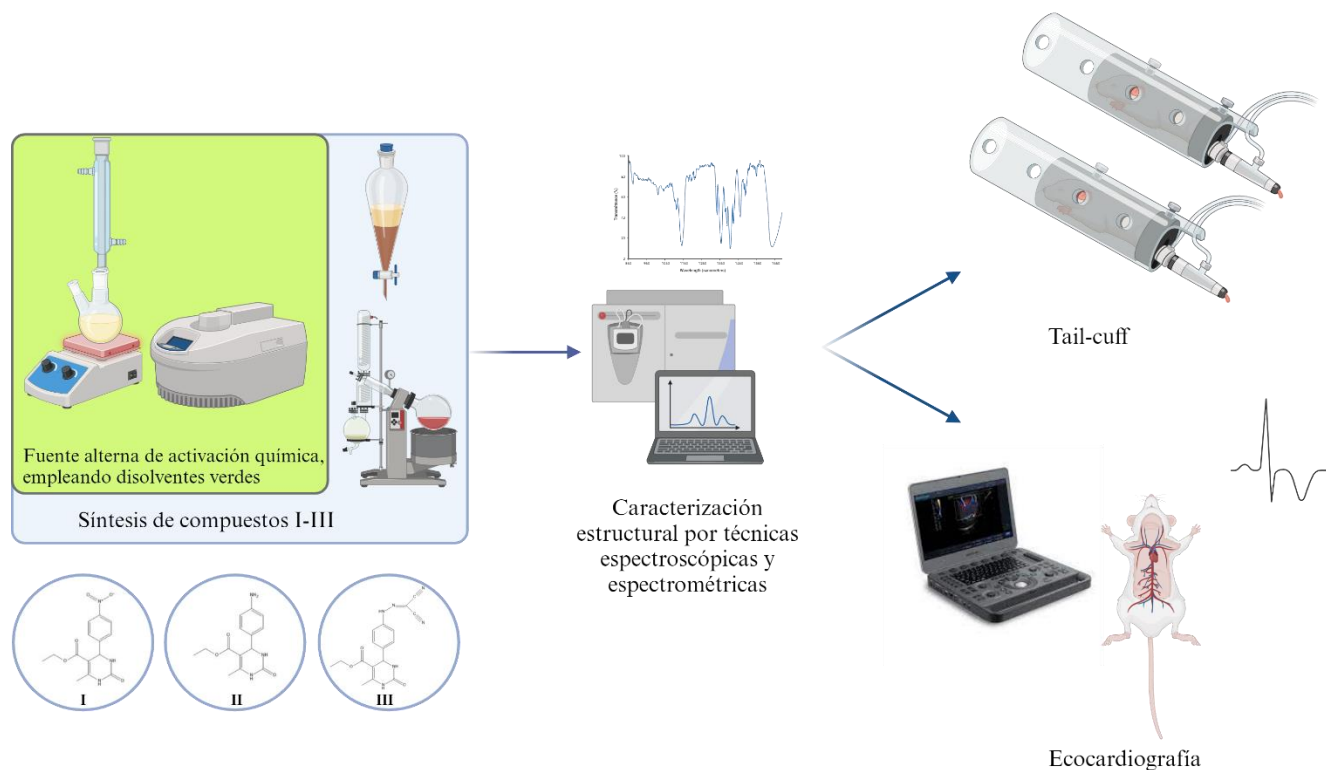


Figura 4. Resumen gráfico del desarrollo experimental

6.2. Equipos, materiales y reactivos

Los reactivos 4-nitrobenzaldehído, acetoacetato de etilo y malononitrilo fueron comprados en Sigma-Aldrich Co[®]. El avance de las reacciones se determinó mediante cromatografía en capa fina (*ccf*) empleando placas de gel de sílice 60-F₂₅₄ Merck[®] (0.25mm). El revelado de las placas cromatográficas se realizó mediante tres diferentes métodos: con una disolución etanólica de 2,4-dinitrofenilhidrazina, una disolución etanólica de ninhidrina y con una lámpara de luz ultravioleta a 254nm.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Jones, y no están corregidos. El equipo de microondas químico usado es de la marca SEV-PRENDO[®] modelo MIC-1 920 W. La espectrometría de masas se realizó en un equipo JEOL The AccuTOF: JMS-T100LC para la técnica de DART + (Direct Analysis in Real-Time)

6.3. Obtención de 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo (I)

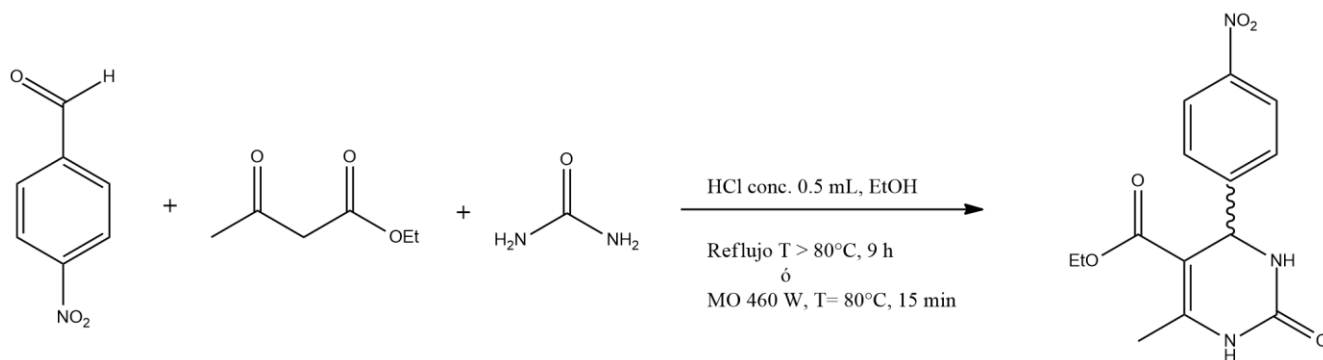


Figura 5. Condiciones de reacción para la obtención de 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo

- Energía convencional

En un matraz bola (50 mL) se agregó una mezcla de 4-nitrobenzaldehído (13.5 mmol), acetoacetato de etilo (16.2 mmol), urea (27 mmol), etanol previamente secado con malla molecular (4Å) como disolvente (15 mL) y ácido clorhídrico concentrado (0.5 mL).

Se utilizó un condensador de Liebig, y el matraz que contenía la mezcla de reacción, se colocó en una mantilla de calentamiento y se cubrió el exterior con una tela de asbesto para evitar pérdida térmica, se mantuvo a reflujo a 90°C y en agitación continua durante 9 h.

- Energía de microondas

En un tubo de reacción para microondas químico (50 mL) se agregó una mezcla de 4-nitrobenzaldehído (13.5 mmol), acetoacetato de etilo (16.2 mmol), urea (27 mmol), etanol previamente secado con malla molecular (4Å) como disolvente (8 mL) y ácido clorhídrico concentrado (0.5 mL).

Se utilizó un condensador de Allihn para evitar pérdida de disolvente ya que este se sobrecalentaba a lo largo de la reacción. Las condiciones de reacción programadas en el equipo fueron: 600 rpm, 80°C y 460W de potencia, con un tiempo total de reacción de 15 min.

El avance de la reacción se realizó mediante *ccf* en intervalos de 30 min (energía convencional) y de 2.5 min (microondas químico) usando como eluyente una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (7:3). El revelado de las placas se realizó empleando una disolución etanólica de 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Una vez concluida la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y, posteriormente, la mezcla de reacción se colocó en baño de hielo durante 30 min. Acto seguido, se filtró a vacío y se lavó el sólido con agua destilada

fría, finalmente con etanol frío. El sólido obtenido se recrystalizó en etanol caliente y, una vez seco, se determinó su punto de fusión. Una muestra se empleó para su caracterización espectroscópica.

6.4. Obtención de 4-(4-aminofenil)-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo (II)

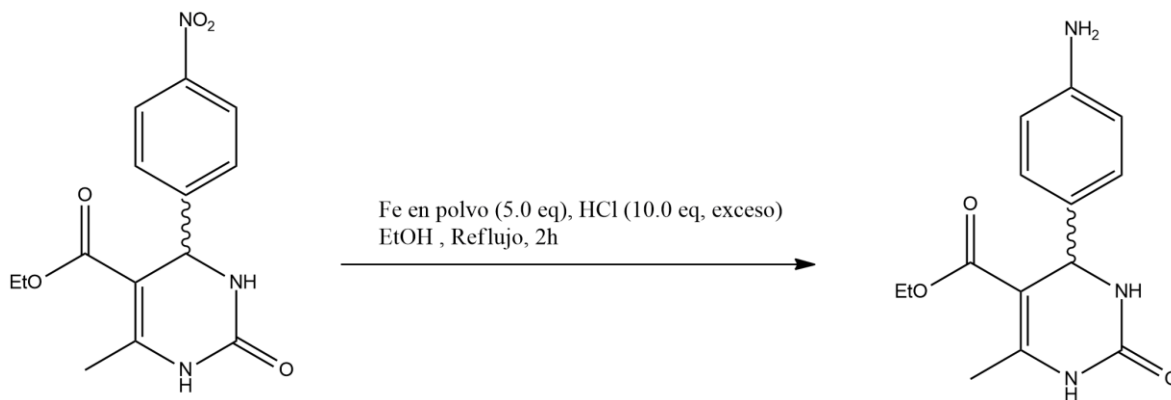


Figura 6. Condiciones de reacción para la obtención de 4-(4-aminofenil)-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo

- Reducción de Bechamp.

En un matraz bola (25 mL) se agregó 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo (5.07 mmol), hierro en polvo (25.36 mmol), etanol como disolvente (10 mL), y ácido clorhídrico concentrado (3 mL). La reacción se colocó a reflujo y en agitación vigorosa procurando que el hierro en polvo no se aglomere en el fondo del matraz bola durante 2 horas.

El avance de la reacción se realizó por *ccf* en intervalos de 30 minutos, usando acetato de etilo como fase móvil, mientras que para el revelado de las placas se utilizó una disolución etanólica de ninhidrina. Una vez que la reacción terminó, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y se le retiró hasta casi sequedad el disolvente en el rotavapor. Se adicionaron 10 mL de agua destilada y se ajustó lentamente el pH a 8 con una solución acuosa de NaOH 1M.

Posteriormente, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (3x10 mL), agregando cloruro de sodio para romper las emulsiones generadas durante el proceso de extracción líquido-líquido. Se resguarda la fase orgánica y se trata con Na₂SO₄ anhidro, se filtra a gravedad y se lleva a sequedad en rotavapor.

El sólido se purificó mediante cromatografía en columna con gel de sílice (Merck® Kieselgel 60, tamaño partícula 0.063 nm) como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla *n*-hexano:acetato de etilo (1:9). Una muestra se empleó para su caracterización espectroscópica.

6.5. Obtención de 4-{4-[2-(1,3-dicianopropan-2-ilideno)hidrazinil]fenil}-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-5-carboxilato de etilo (**III**).

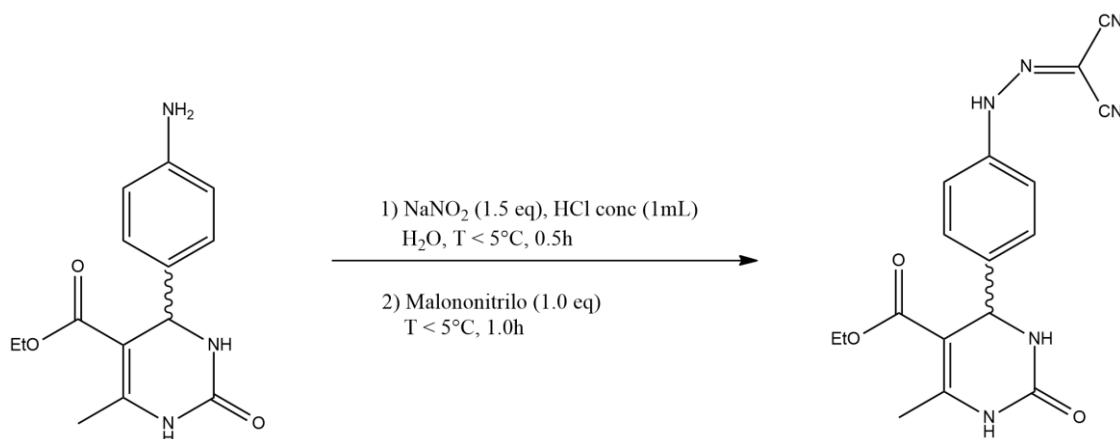


Figura 7. Condiciones de reacción para la obtención de 4-{4-[2-(1,3-dicianopropan-2-ilideno)hidrazinil]fenil}-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-5-carboxilato de etilo

En un matraz Erlenmeyer (50 mL) se agregó 4-(4-aminofenil)-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-5-carboxilato de etilo (1.82 mmol), agua destilada como disolvente (20 mL) y ácido clorhídrico concentrado (1 mL). La mezcla de reacción se colocó en un baño de hielo con agitación constante hasta alcanzar una temperatura inferior a 5°C, después se adicionó el nitrito de sodio (2.72 mmol) y se continuó la agitación durante 30 minutos. Después, se agregó malononitrilo (1.82 mmol), el cual se encontraba disuelto en la mínima cantidad de agua destilada fría. Se continúa con la agitación durante 1 hora.

El avance de la reacción se realizó mediante *ccf* en intervalos de 15 min, usando como eluyente acetato de etilo, se utilizó una lámpara de luz ultravioleta a 254nm como revelador.

Una vez que concluyó la reacción se ajustó lentamente hasta pH 6 empleando una solución acuosa de acetato de sodio 2.5M. La solución se mantuvo en agitación durante 30 minutos y se prosiguió a filtrar la solución a vacío.

El sólido se purificó mediante cromatografía en columna con gel de sílice (Merck® Kieselgel 60, tamaño partícula 0.063 nm) como fase estacionaria y utilizando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (2:8). Una muestra se empleó para su caracterización espectroscópica.

6.6. Sección de química computacional

6.6.1. Estudio de acoplamiento molecular

El ligando Levosimendán (control) y los estereoisómeros del compuesto **III** (figura 8) fueron construidos ocupando el programa para edición de estructuras moleculares, Avogadro. Primero los estados de protonación

fueron ajustados para cada uno de los compuestos de acuerdo con el diagrama de distribución de especies en función del pH generado para cada estructura a través de la aplicación Chemicalize³⁹, asumiendo un pH igual a 7.4, su geometría molecular fue optimizada empleando el método UFF “forcefield”.

La estructura de la proteína cardiaca troponina C dominio-N, ocupada en los cálculos fue obtenida a partir de la estructura de rayos-X del complejo con código de identificación 7SC3⁴⁰ de la plataforma de PDB⁴¹. Las coordenadas correspondientes a la subunidad de la troponina cardiaca I (residuos 136-159) y las moléculas de co-cristalización de agua fueron removidas de la macromolécula previo al acoplamiento ocupando el programa PyMOL⁴². Posteriormente, su geometría fue optimizada empleando el método YASARA 2 forcefield implementado en el servidor de minimización YASARA⁴³. La estructura resultante fue guardada en formato .pdbqt y fue utilizada para cada ligando.

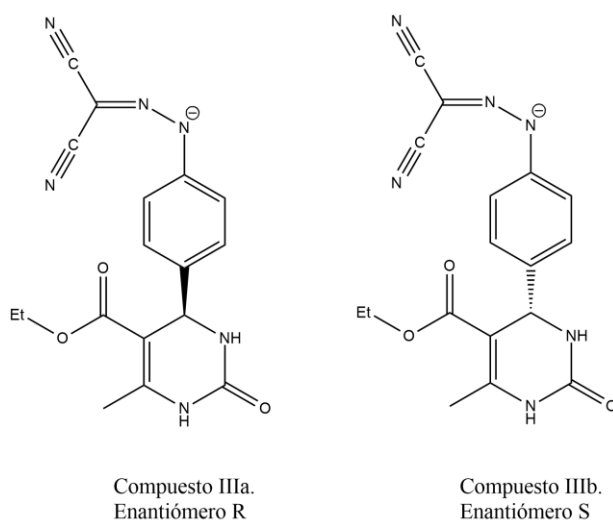


Figura 8. Estructuras moleculares a pH= 7.4 de los estereoisómeros del compuesto III ocupadas en el estudio de acoplamiento molecular.

Los resultados de cada una de las simulaciones de acoplamiento molecular fueron visualizados usando PyMOL, así como los diagramas de interacción en 2D fueron generados con el visualizador Discovery Studio 2021⁴⁴

³⁹ <https://chemicalize.com/app/calculation>

⁴⁰ Yan, C., Sack, J. S. (2022). X-ray structure of a human cardiac muscle troponin C/troponin I chimera in two crystal forms. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 78(1), 17-24. <https://doi.org/10.1107/s2053230x21012395>

⁴¹ <https://www.rcsb.org/>

⁴² The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC

⁴³ <http://www.yasara.org/minimizationserver.htm>

⁴⁴ BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer, v21, San Diego: Dassault Systèmes.

El protocolo para las simulaciones de acoplamiento molecular se describe a continuación: un acoplamiento molecular ciego fue realizado a través del programa de predicción de acoplamiento molecular, Autodock 4.2⁴⁵. La interfaz gráfica AutodockTools 1.7.1 se ocupó para preparar los archivos de entrada en formato .pdbqt y analizar los resultados de cada acoplamiento. Únicamente, se agregaron los hidrógenos polares a la macromolécula y fueron asignadas las cargas Gasteiger-Marsili a los átomos presentes en la proteína y en los ligandos. Las simulaciones de acoplamiento molecular usando Autodock 4.2 (usando la estructura optimizada de la proteína cardiaca troponina C dominio-N) fueron desarrolladas empleando un tamaño de caja de 110Å x 110Å x 110Å con un espaciado de 0.345Å en las coordenadas x = -8.842, y = -3.873, y z = -12.536. Los parámetros de búsqueda para Levosimendán y los estereoisómeros del compuesto **III** son: método de Lamarckian Genetic Algorithm, 100 corridas con un máximo número de 25,000,000 evaluaciones y una población inicial de 150 conformeros.

Finalmente, para cada ligando se seleccionó la conformación con menor energía de acoplamiento de la agrupación con mayor número de conformaciones para su posterior comparación y análisis.

6.7. Evaluación biológica de los compuestos sintetizados

6.7.1. Estudio ecocardiográfico

Se formaron 3 grupos (n=5) para cada compuesto y se midieron los parámetros ecocardiográficos antes y después de la administración de Levosimendán o de los compuestos **II** y **III**, por lo que los resultados se muestran como la diferencia de las mediciones después de la administración menos el resultado antes de la administración de cada compuesto.

El estudio ecocardiográfico se realizó una vez para cada rata durante 10 minutos, antes y después de la administración de cada compuesto (2 mg/Kg/l.p), bajo anestesia con Ketamina/Xylacina (40/5 mg/Kg, i.p.) en el ecocardiógrafo en modo M (Sonoscape X5V; Guangdong, China). La pared anterior del tórax se afeitó con crema, las ratas se colocaron en posición de decúbito lateral. La temperatura corporal se mantuvo a 37°C sobre una almohadilla durante el estudio. Se midió el volumen al final de la diástole (VFD), el volumen al final de la sístole (VFS), la fracción de eyección (FE), el volumen sistólico (VS) y la fracción de acortamiento (FA).

⁴⁵ Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 16, 2785-91.

6.7.2. Medición de presión arterial y frecuencia cardiaca

Los valores de presión arterial sistólica, diastólica y la frecuencia cardiaca se determinaron de manera no invasiva sin anestesia, mediante el método de “tail-cuff” por triplicado, antes y después del tratamiento farmacológico. En este método se utilizó un sujetador el cual está conectado a un osciloscopio computarizado y se coloca en la primera mitad de la cola de la rata para las mediciones a través del equipo SPEM y el software SIEVART1.

Se realizó un ANOVA pareada (prueba de Friedman) para comparar los resultados por cada parámetro. Se tomó una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa.

7. Resultados y discusión

7.1. Obtención de 6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo

El compuesto **I** cuya fórmula molecular es $C_{14}H_{15}N_3O_5$, es un sólido de color blanco con un intervalo de punto de fusión de 210-212°C, el cual corresponde con los valores reportados en literatura^{46,47}. El rendimiento de reacción para el método de calentamiento convencional fue 51.18%, mientras que para la irradiación de microondas fue 76.43%.

La activación mediante irradiación de microondas de una reacción multicomponente de Biginelli representa una mejor opción ya que produce un rendimiento de reacción significativamente mayor, además de que el tiempo de reacción disminuyó de 9 horas (energía convencional) a 15 minutos.

Mientras que el valor porcentual de economía atómica para esta reacción B3C es 89.37%, como resultado de una alta incorporación de los átomos en el producto final, y la pérdida de dos moléculas de baja masa molecular como es el agua.

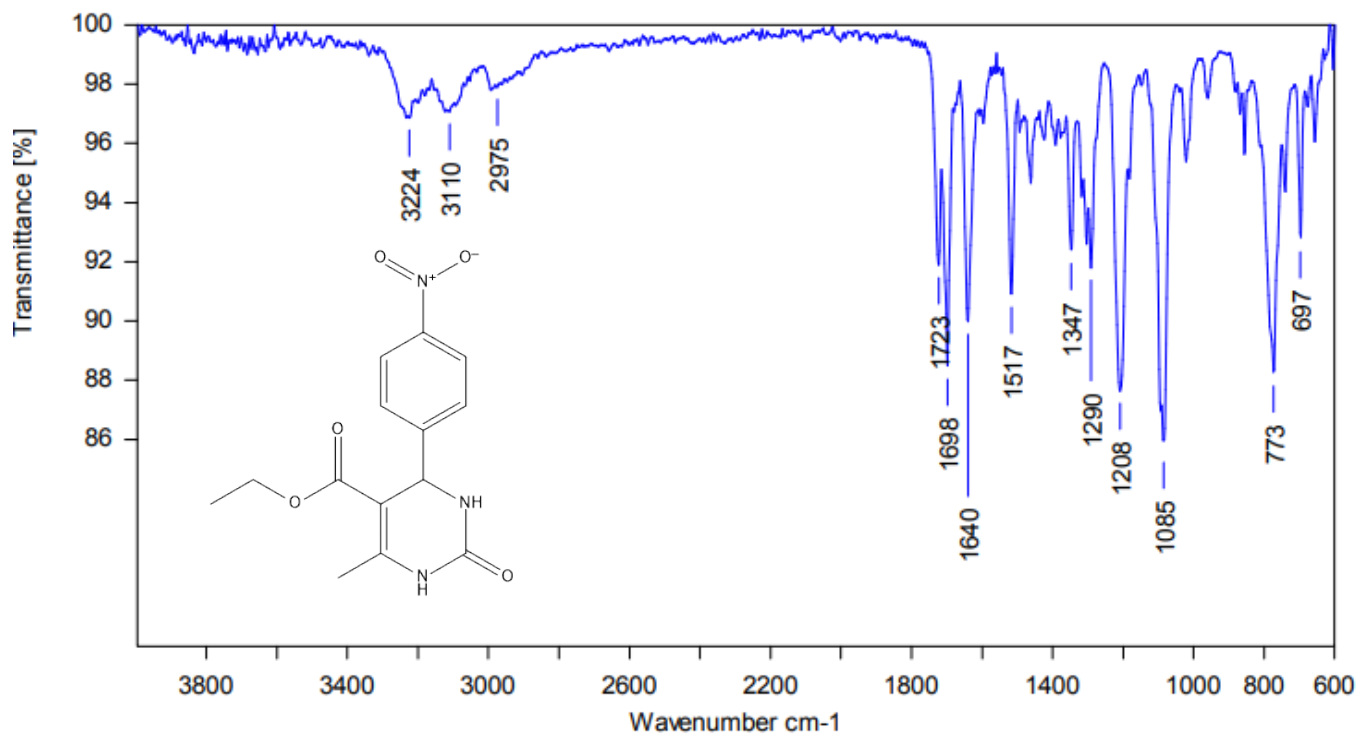
7.1.1. Espectrofotometría de absorción en la región del infrarrojo del compuesto **I**.

El espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto **I** muestra dos bandas en 3224 y 3110 cm^{-1} (espectro 1) correspondientes al estiramiento de los dos enlaces N-H del anillo de DHPM. En la región que va de 1800-1650 cm^{-1} característica del grupo carbonilo, aparecen dos bandas intensas y delgadas en 1723 y 1698 cm^{-1} asignadas al grupo cetona y éster, respectivamente.

⁴⁶ Moussaoui, Y., Salem, R. B. (2013). Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidinones via phase transfer catalysis. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 50(5), 1209-1212 <https://doi.org/10.1002/jhet.830>

⁴⁷ Moosavifar, M. (2012). An appropriate one-pot synthesis of dihydropyrimidinones catalyzed by heteropoly acid supported on zeolite: an efficient and reusable catalyst for the Biginelli reaction. *Comptes Rendus Chimie*, 15(5), 444-447. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2011.11.015>

Las bandas correspondientes al sustituyente fenilo se observan en 1640 cm^{-1} asignada al estiramiento de los dobles enlaces en el anillo aromático y en 773 cm^{-1} producido por la vibración fuera del plano de un fenilo 1,4-disustituido.



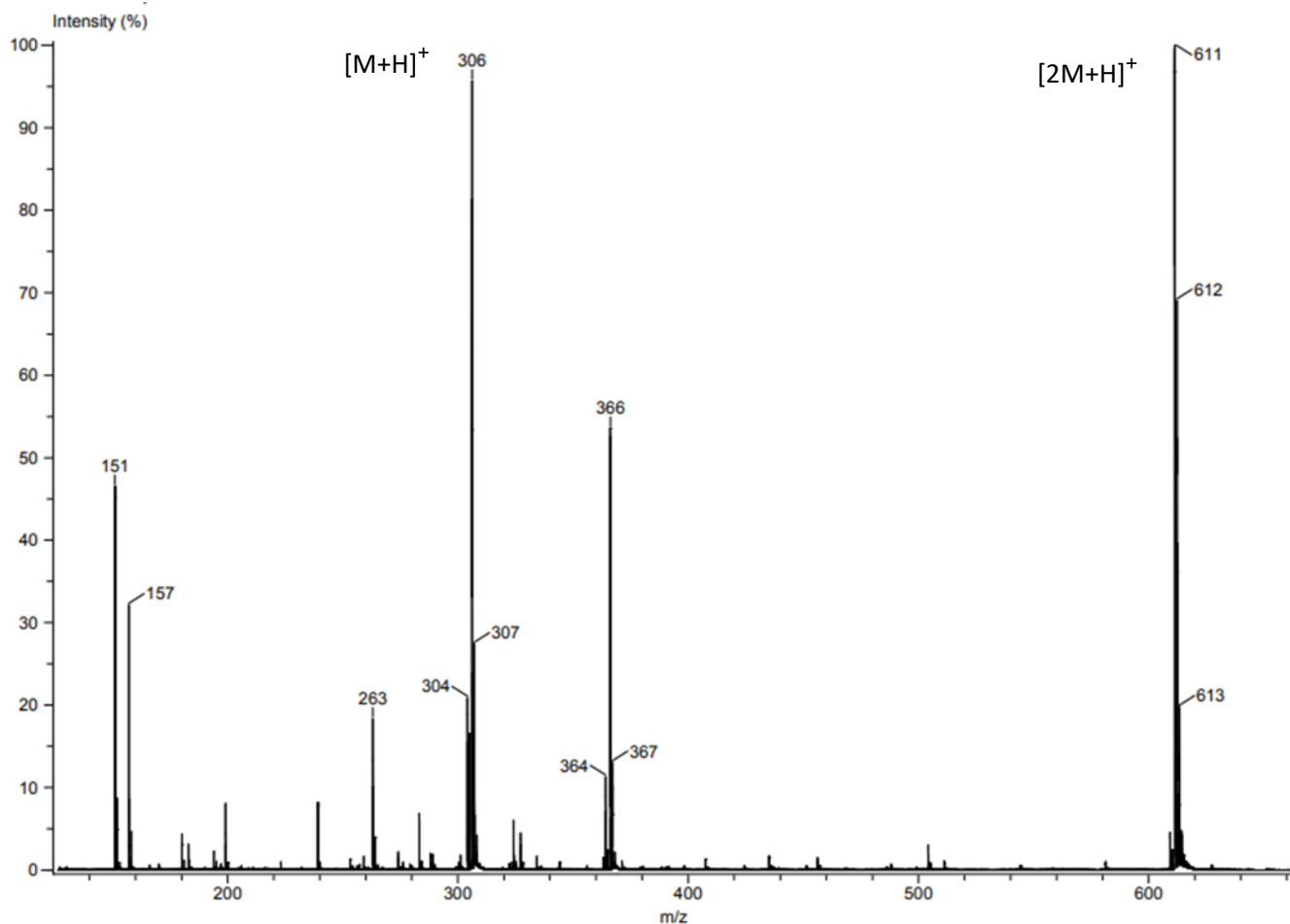
Espectro 1. Espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto I.

Las bandas del espectro de infrarrojo correspondientes al producto **I** fueron las siguientes: IR(ATR) $\nu\text{ cm}^{-1}$: 3224 (str_{dihidropirimidinona} N-H), 3110 (str_{dihidropirimidinona} N-H), 2975 (str_{C_{sp3}-H}), 1723 (str_{dihidropirimidinona} C=O), 1698 (str_{éster} C=O), 1640 (str_{arom} C=C), 1517 (str_{dihidropirimidinona} C=C), 1347 (str C-O-C), 1208 y 1085 (str C-O)

7.1.2. Espectrometría de masas del compuesto **I**

En el espectro 2, en anexos se presenta el espectro de masas adquirido mediante la técnica de análisis directo en tiempo real, (DART, por sus siglas en inglés), en el que se observa un fragmento m/z 306, el cual corresponde a la molécula protonada $[M+H]^+$, este fragmento es característico de la técnica de ionización DART+ debido a que el patrón de fragmentación se desarrolla a través de la interacción de las especies metaestables y las moléculas de agua presentes bajo condiciones atmosféricas, generando agrupaciones de agua ionizada ($[(H_2O)_n+H]^+$) responsables de protonar todas aquellas especies presentes en la muestra de acuerdo a su capacidad de aceptar

dicho protón, lo cual, considerando la estructura molecular de compuesto **I**, es lógico esperar el fragmento $[M+H]^+$ observado.



Espectro 2. Espectro de masas adquirido por análisis directo en tiempo real del compuesto **I**

Compuesto **I**.- DART-EM modo ion positivo $m/z, (\%ar)[A]$: 611(100) $[2M+H]^+$, 306(97) $[M+H]^+$.

El pico base corresponde a un fragmento m/z 611 atribuido a la especie $[2M+H]^+$, fragmento generalmente no observado en técnicas como ionización electrónica (IE) debido a la naturaleza energética propia de la técnica. La especie $[2M+H]^+$ es un ion dimérico distintivo de la técnica DART⁴⁸, generado a partir de las interacciones ion-molécula, utilizado en varias ocasiones como especie esencial en la determinación estructural de diferentes compuestos.

⁴⁸ Chernetsova, E. S., Morlock, G. E., Revelsky, I. A. (2011). DART Mass Spectrometry and its applications in chemical analysis. *Russian Chemical Reviews*, 80(3), 235-255. <https://doi.org/10.1070/rc2011v080n03abeh004194>

Por lo tanto, si consideramos la capacidad del compuesto **I** para ser protonado bajo las condiciones de la técnica de ionización, se puede justificar la aparición del ion $[2M+H]^+$ a partir de las interacciones intermoleculares entre el ion $[M+H]^+$ una vez que se genera y otra molécula neutra del compuesto **I**, a través de sus grupos polares presentes en su estructura.

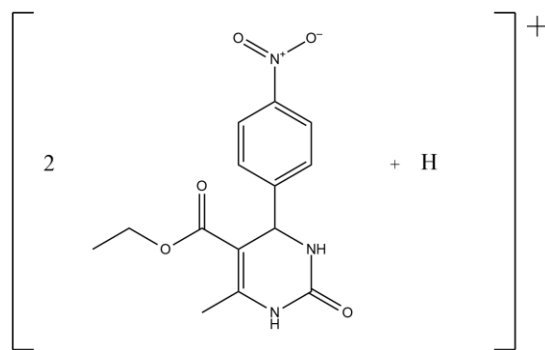


Figura 9. Estructura del ion dimérico $[2M+H]^+$, obtenido a través de la técnica DART+.

En el espectro 3, que se adquirió mediante la técnica de ionización electrónica se observa el ion molecular M^+ de m/z 305, y como pico base el fragmento m/z 183, sin embargo, al ser una técnica de mayor energía de ionización genera más fragmentos los cuales se justifican con los mecanismos de fragmentación que a continuación se muestran:

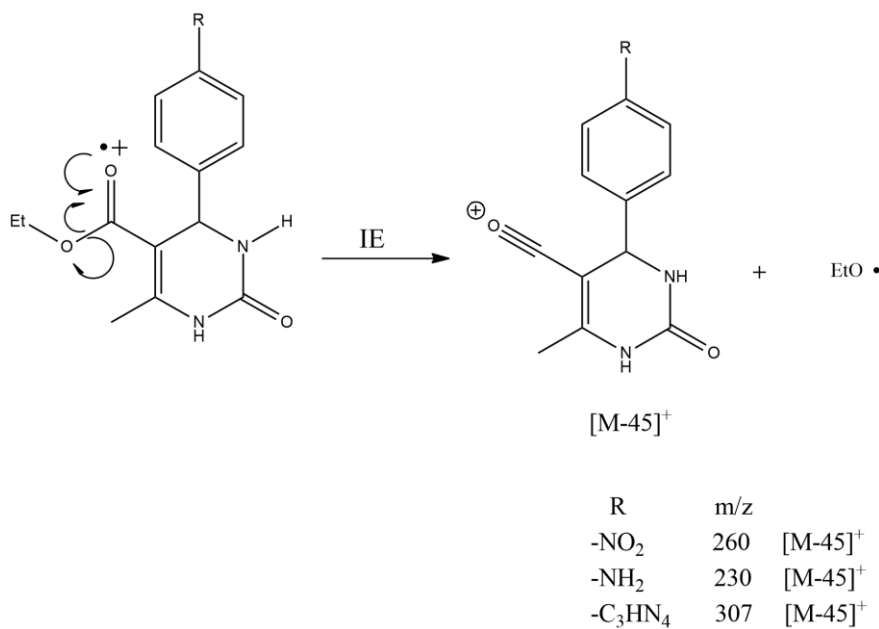


Figura 10. Mecanismo de fragmentación, pérdida del grupo etoxilo.

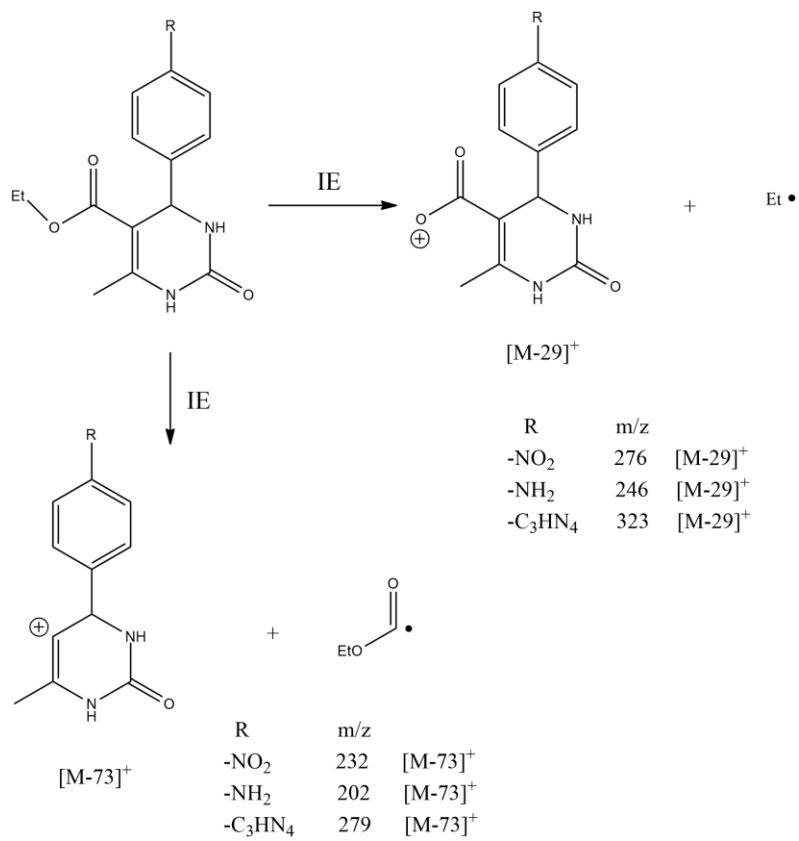


Figura 11. Mecanismo de fragmentación en la posición 5 del anillo de DHPM.

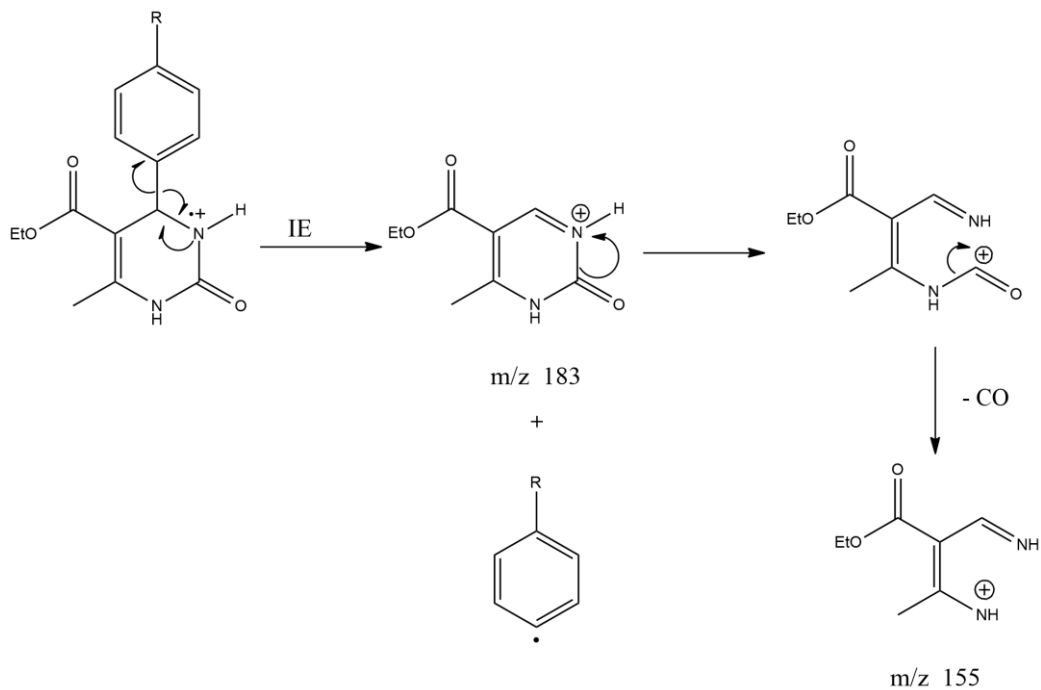
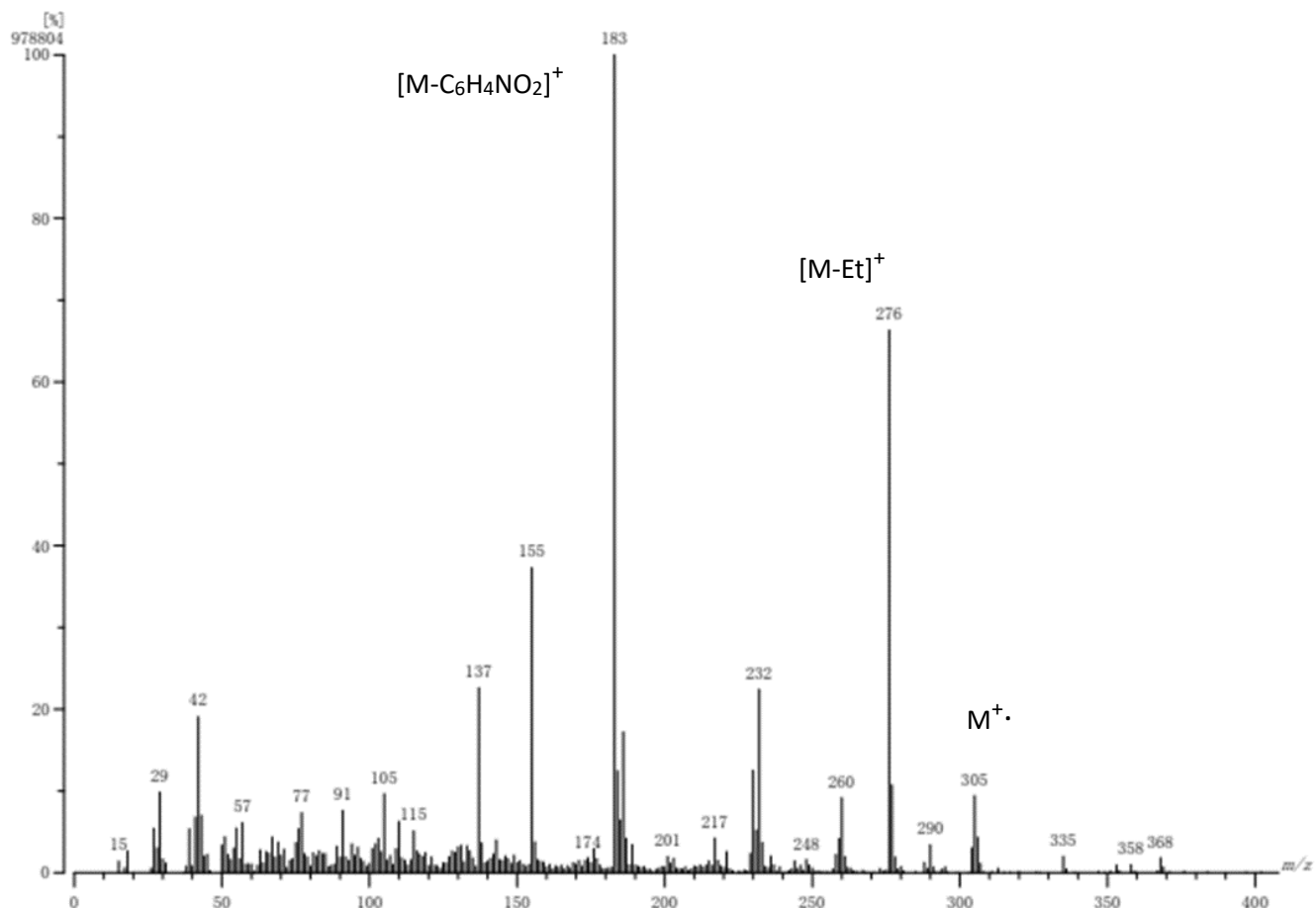


Figura 12. Mecanismo de fragmentación del anillo de DHPM.

En el espectro 3 se puede observar la presencia de los fragmentos correspondientes a la fragmentación descrita en la figura 10, 11 y 12.



Espectro 3. Espectro de masas adquirido por IE del compuesto I

Compuesto **I**.- IE-EM $m/z, (\%ar)[A]$: 305(10) M⁺, 276(68) [M-C₂H₅]⁺, 260(9) [M-C₂H₅O]⁺, 232(22) [M-C₃H₅O₂]⁺, 183(100) [M-C₆H₄NO₂]⁺, 155(38) [M-C₇H₄NO₃]⁺

En adición a la caracterización estructural del compuesto **I**, se muestran a continuación los resultados obtenidos en el experimento alta resolución en la figura 13, obteniendo una composición molecular C₁₄H₁₅N₃O₅ que correlaciona con una masa molecular 305.10 g/mol.

Sample : 2832 DHPM
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 RT : 0.45 min Scan# : (17,29)+(67,77)
 Elements : C 24/0, H 49/0, N 4/2, O 6/3
 Mass Tolerance : 5mmu
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
305.1016	29.53	305.1012	+1.4 / +0.4	9.0	14	15	3	5

Figura 13. Resultados del experimento alta resolución del compuesto I.

7.1.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear, RMN ^1H y ^{13}C del compuesto I.

A continuación, se muestran los resultados (tabla 1) de los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) de proton y carbono, RMN ^1H y ^{13}C , obtenidos en un equipo de 400 MHz utilizando dimetilsulfóxido deuterado como disolvente (DMSO- d_6).

Tabla 1. Resultados RMN ^1H y ^{13}C del compuesto I.

Compuesto I		Compuesto I	
No. de átomo	RMN ^1H (δ en ppm)	No. de átomo	RMN ^{13}C (δ en ppm)
13	1.07, t, $J = 7.1$ Hz	13	14.05
8	2.25, s	8	17.88
12	3.97, q, $J = 7.1$ Hz	12	59.41
6	5.25, d, $J = 3.5$ Hz	6	53.70
15, 18	7.50, ddd, $J = 8.79, 2.25, 1.80$ Hz	15, 18	127.68
5	7.86, s	5	-----
16, 17	8.20, ddd, $J = 8.61, 2.43, 1.69$ Hz	16, 17	123.85
3	9.32, s	3	-----
		1	98.21
		2	149.41
		4	152.01
		9	165.08
		14	151.77
		19	146.74

Los datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto I muestran la existencia de un metino en la posición 4 del anillo de 3,4-dihidro-1H-pirimidin-2-ona, el cual al encontrarse enlazado directamente al anillo del

sustituyente fenilo produce un acoplamiento con los hidrógenos de la posición *orto* obteniendo una señal doble con una constante de acoplamiento de 3.5 Hz, sin embargo, a pesar de que existen dos átomos de hidrógeno en posición *orto* solamente se observa una señal doble ya que estos hidrógenos son magnética y químicamente iguales. También como parte de la caracterización estructural del heterociclo se observan dos señales simples en 7.86 y 9.32 ppm, correspondientes a los hidrógenos enlazados a los átomos de nitrógeno que conforman el anillo de 3,4-dihidro-1*H*-pirimidin-2-ona, en el cual la señal que aparece en 9.32 ppm se le asignó a la posición 3 debido a que esa posición forma parte de un equilibrio tautomérico imina-enamina polarizando así el enlace N-H.

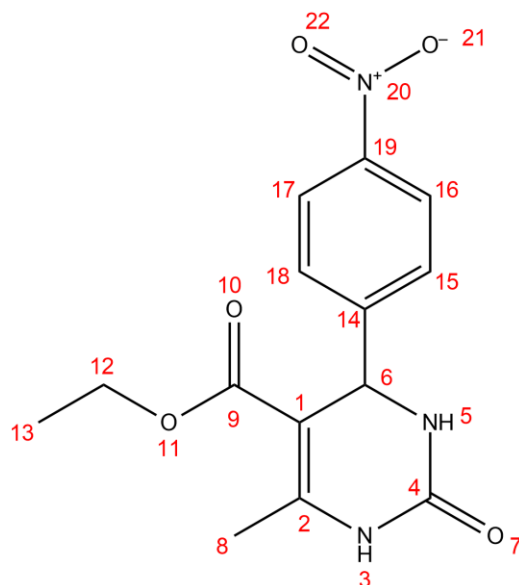
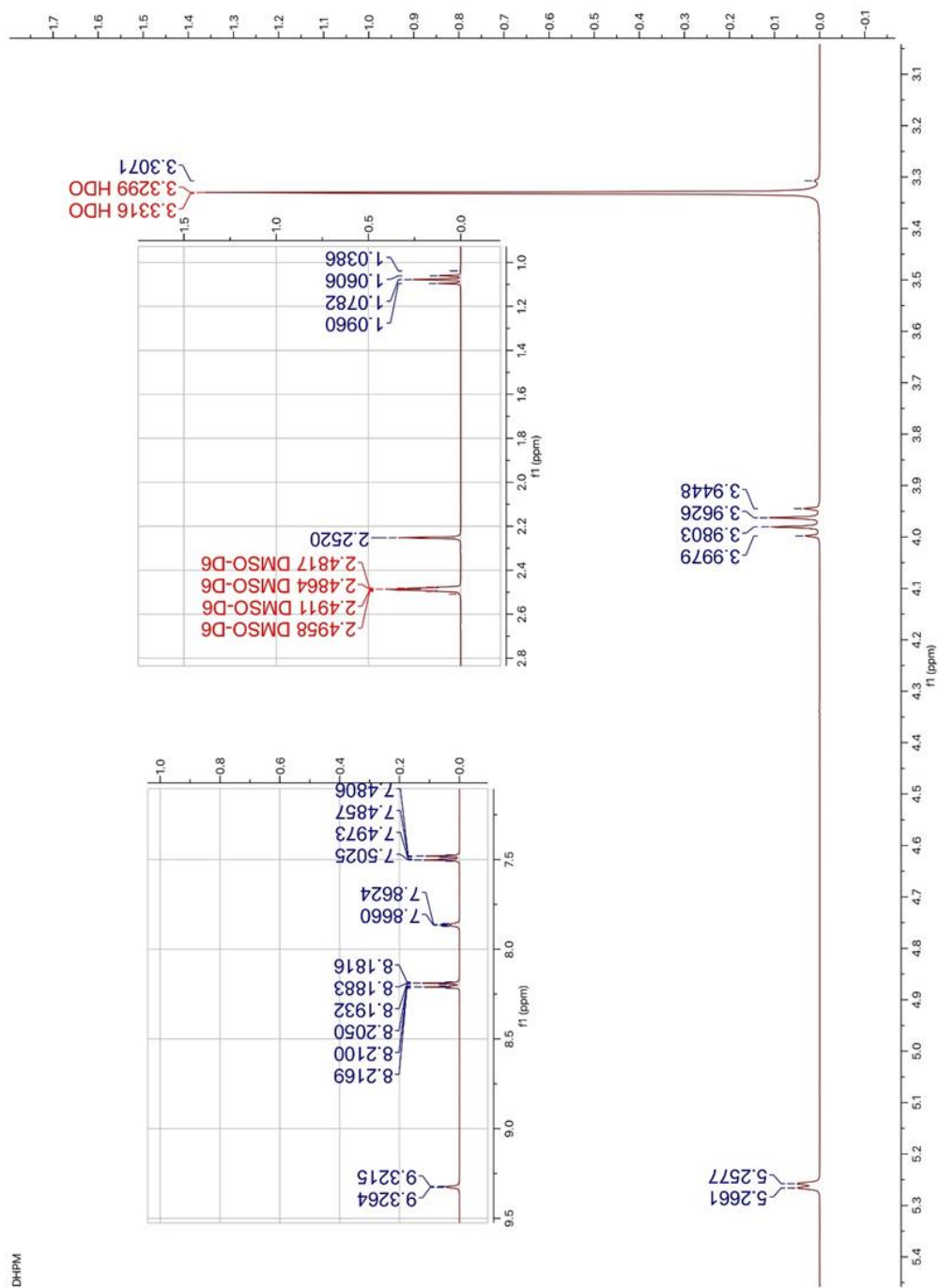
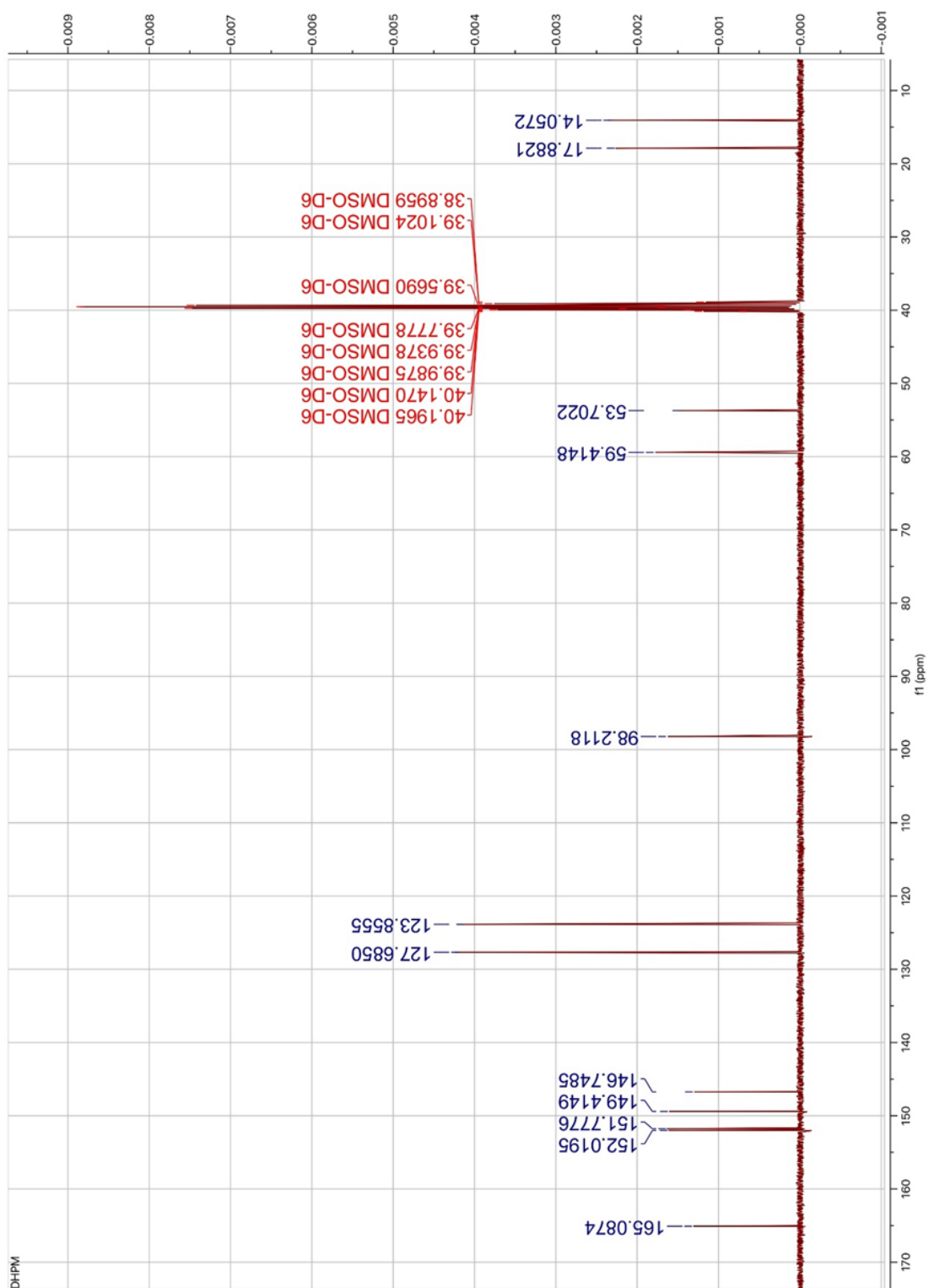


Figura 14. Estructura enumerada del compuesto I.

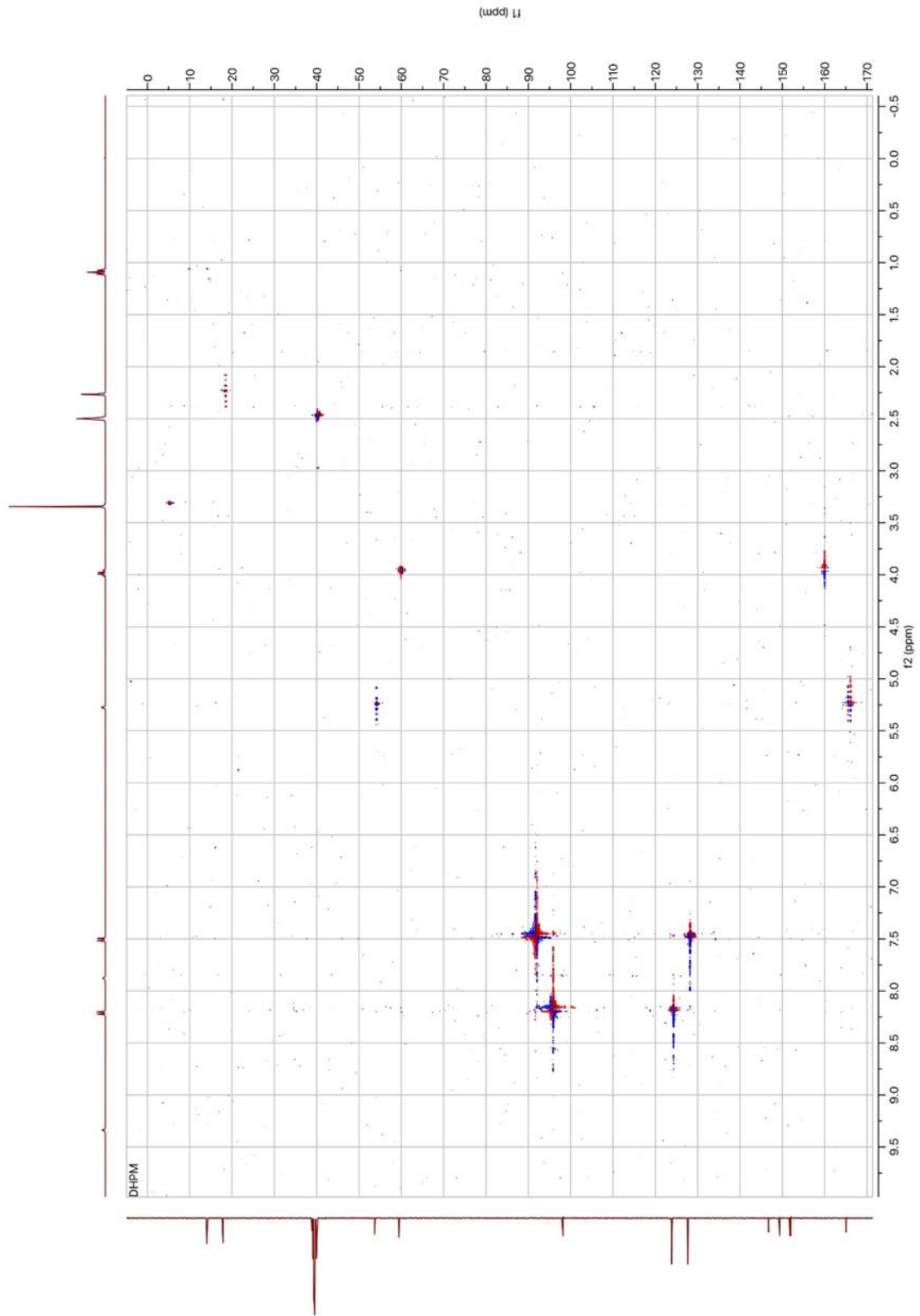
DHPM ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.32 (s, 1H), 8.20 (ddd, $J = 8.61, 2.43, 1.69$ Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.50 (ddd, $J = 8.79, 2.25, 1.80$ Hz, 2H), 5.25 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.97 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.07 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C : 14.05, 17.88, 53.70, 59.41, 98.21, 123.85, 127.68, 146.74, 149.41, 151.77, 152.01, 165.08



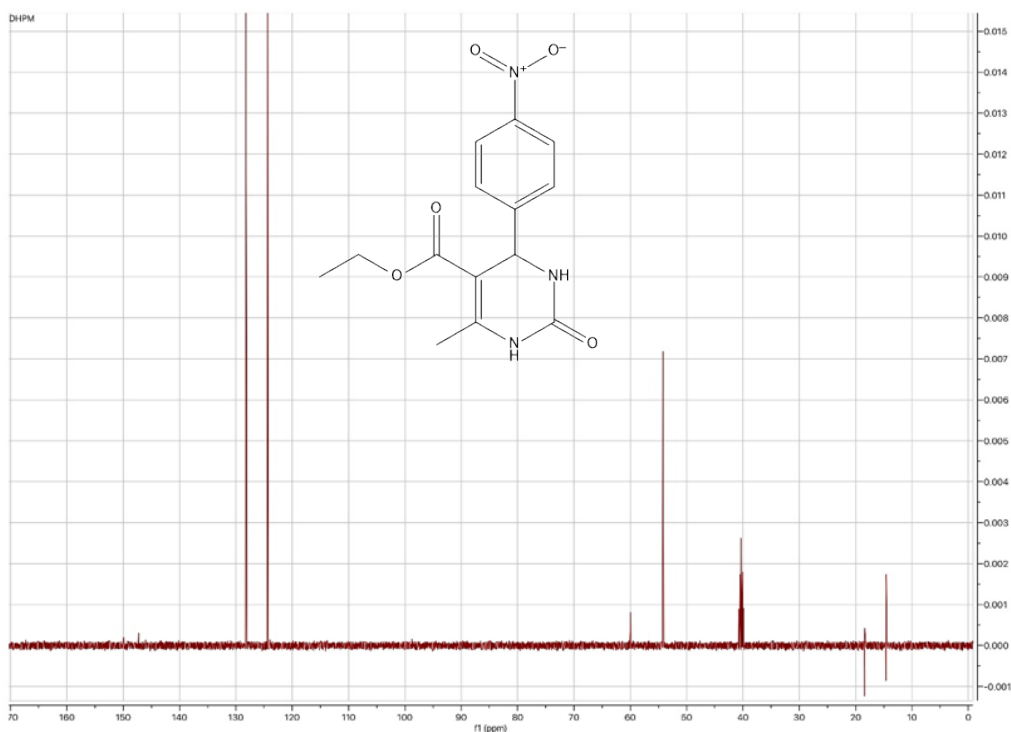
Espectro 4. Espectro RMN ^1H del compuesto I.



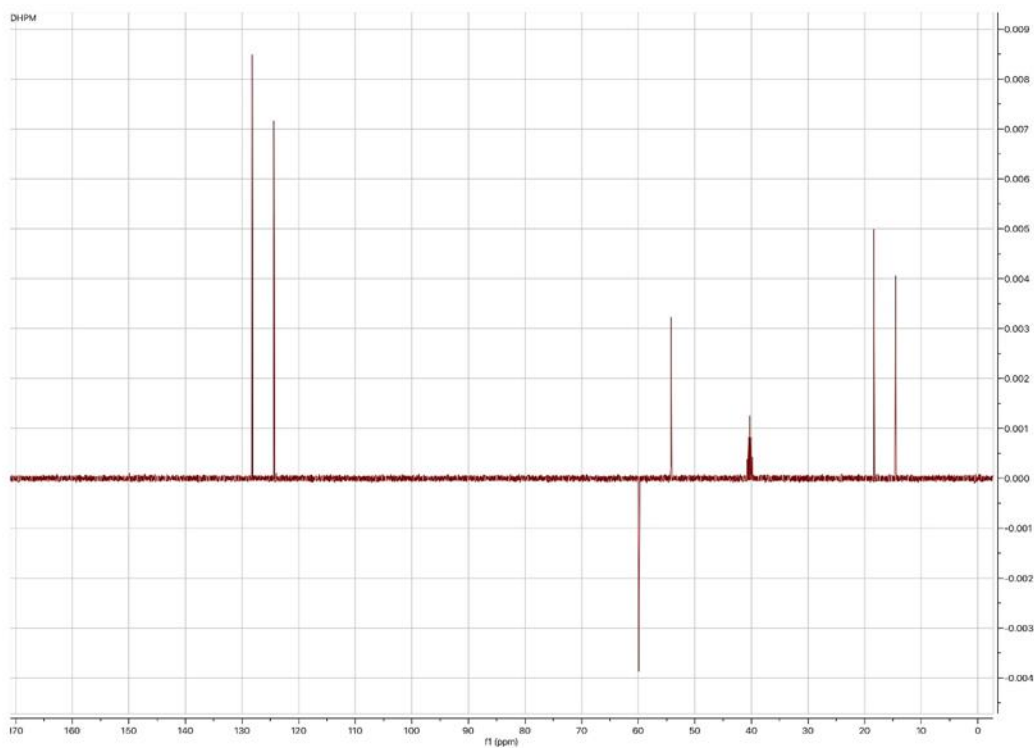
Espectro 5. Espectro RMN ¹³C del compuesto I.



Espectro 6. HSQC del compuesto I.



Espectro 7. DEPT 90 del compuesto I.



Espectro 8. DEPT 135 del compuesto I.

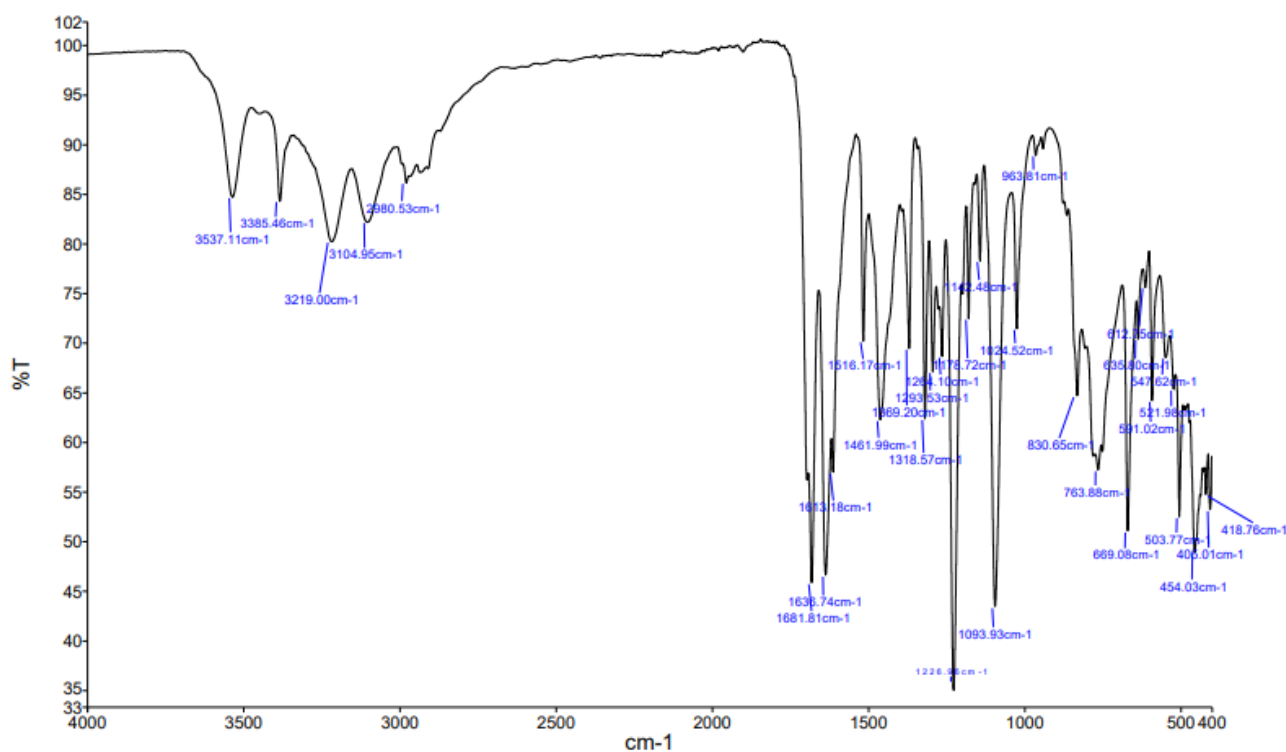
7.2. Obtención de 4-(4-aminofenil)-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo (**II**)

El compuesto **II** cuya fórmula molecular es $C_{14}H_{17}N_3O_3$, es un polvo de color amarillo claro con un punto de fusión de 225-228°C, obteniendo un rendimiento de reacción de 71.83%

El valor porcentual de economía atómica para esta reacción de reducción es 90.16%, considerando al hierro y ácido clorhídrico como el sistema catalítico y como sustrato el compuesto **I**.

7.2.1. Espectrofotometría de absorción en la región del infrarrojo del compuesto **II**.

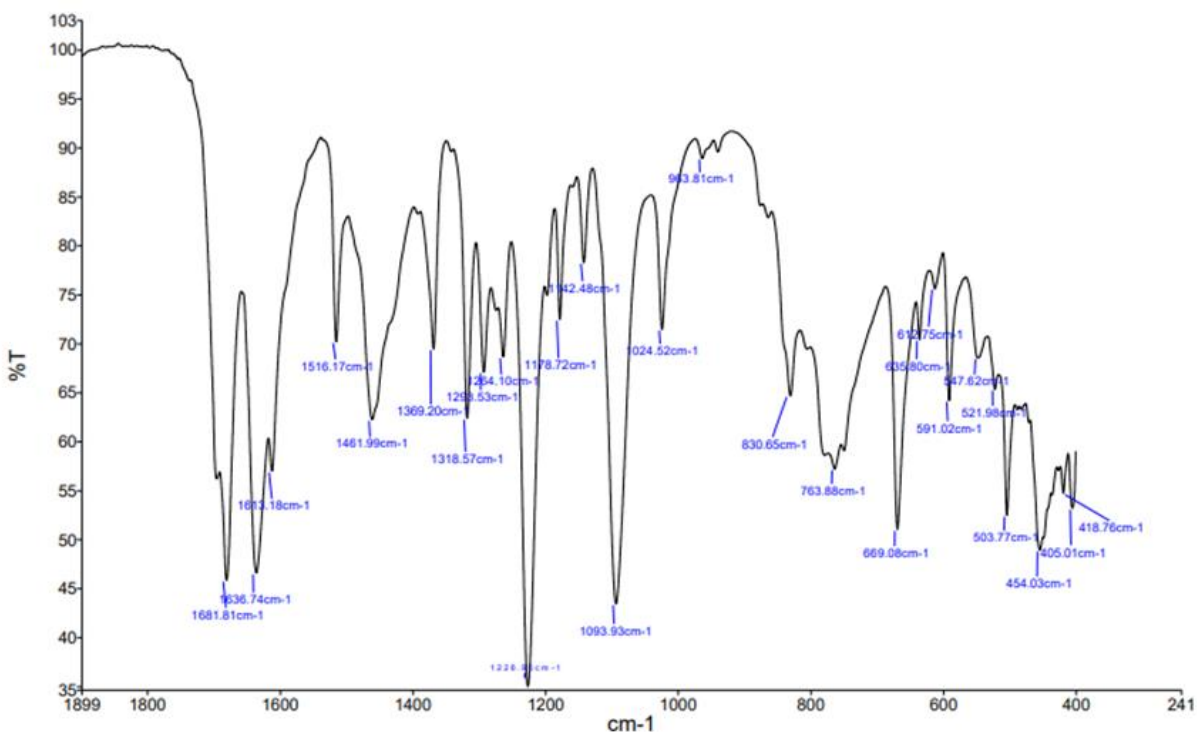
El espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto **II**, presenta cuatro bandas intensas en la región de 3550-3100 cm^{-1} , que corresponden a los cuatro enlaces N-H presentes en la estructura de este compuesto. En ese sentido, las bandas que aparecen en 3537 y 3383 cm^{-1} son producidas por los estiramientos simétrico y asimétrico de una amina primaria, que en este caso se encuentra en la posición 4 del sustituyente fenilo.



Espectro 9. Espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto **II**.

Las bandas del espectro de infrarrojo correspondientes al producto **II** fueron las siguientes: IR(ATR) ν cm^{-1} : 3537 (str asim N-H), 3385 (str sim N-H), 3219 (strdihidropirimidinona N-H), 3104 (strdihidropirimidinona N-H), 2980 (str C_{sp^3} -H), 1681 (stréster C=O), 1636 (str_{arom} C=C), 1516 (strdihidropirimidinona C=C), 1461 (str C_{arom} -N), 1369 (str C-O-C), 1226 y 1093 (str C-O).

En el espectro 10 se obtuvo un acercamiento a la región de $1900\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ debido a la saturación que se presentaba en esta región, en 1681 y 1636 cm^{-1} se observan dos bandas intensas y delgadas que muestran un hombro creciendo hacia la izquierda y derecha, respectivamente, este comportamiento se debe a la falta de resolución en el espectro generada por la aparición de las bandas correspondientes a los dos grupos carbonilo presentes en la molécula, del estiramiento del anillo del sustituyente fenilo y del estiramiento del doble enlace carbono-carbono en el anillo de dihidropirimidinona.



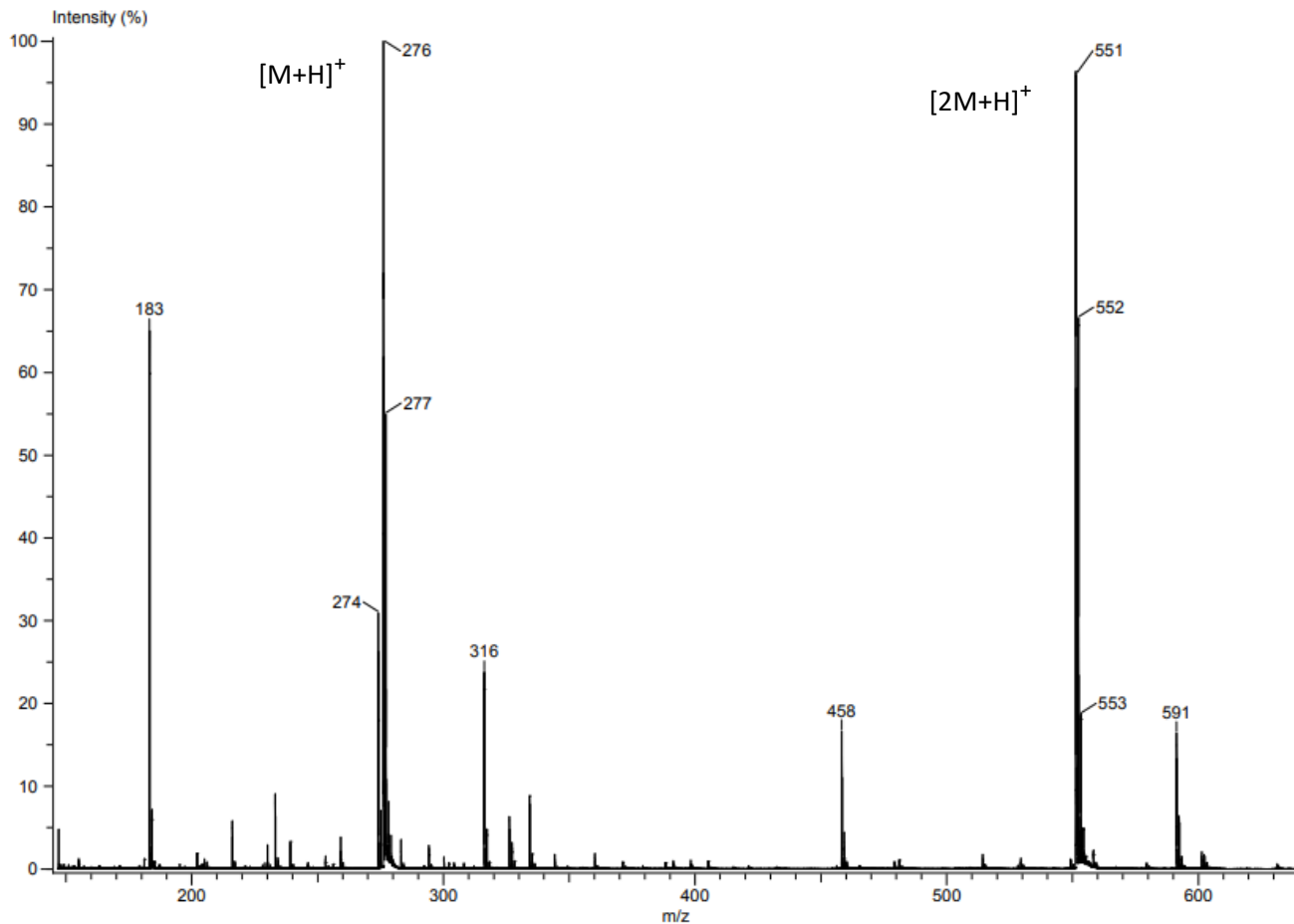
Espectro 10. Acercamiento a la región $1900\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ del espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto II.

7.2.2. Espectrometría de masas del compuesto II

En el espectro 11 se muestra el espectro de masas adquirido mediante la técnica de análisis directo en tiempo real, en éste se observa como pico base el fragmento m/z 276 correspondiente a la molécula protonada $[M+H]^+$, así como también aparece el ion dimérico $[2M+H]^+$ de m/z 551.

A partir del mecanismo de fragmentación presentado en la figura 12, se justifica la aparición del fragmento de m/z 183 generado por la pérdida del sustituyente 4-aminofenilo en la posición 4 de la estructura de 3,4-dihidro-1H-pirimidin-2-ona del éster de Biginelli.

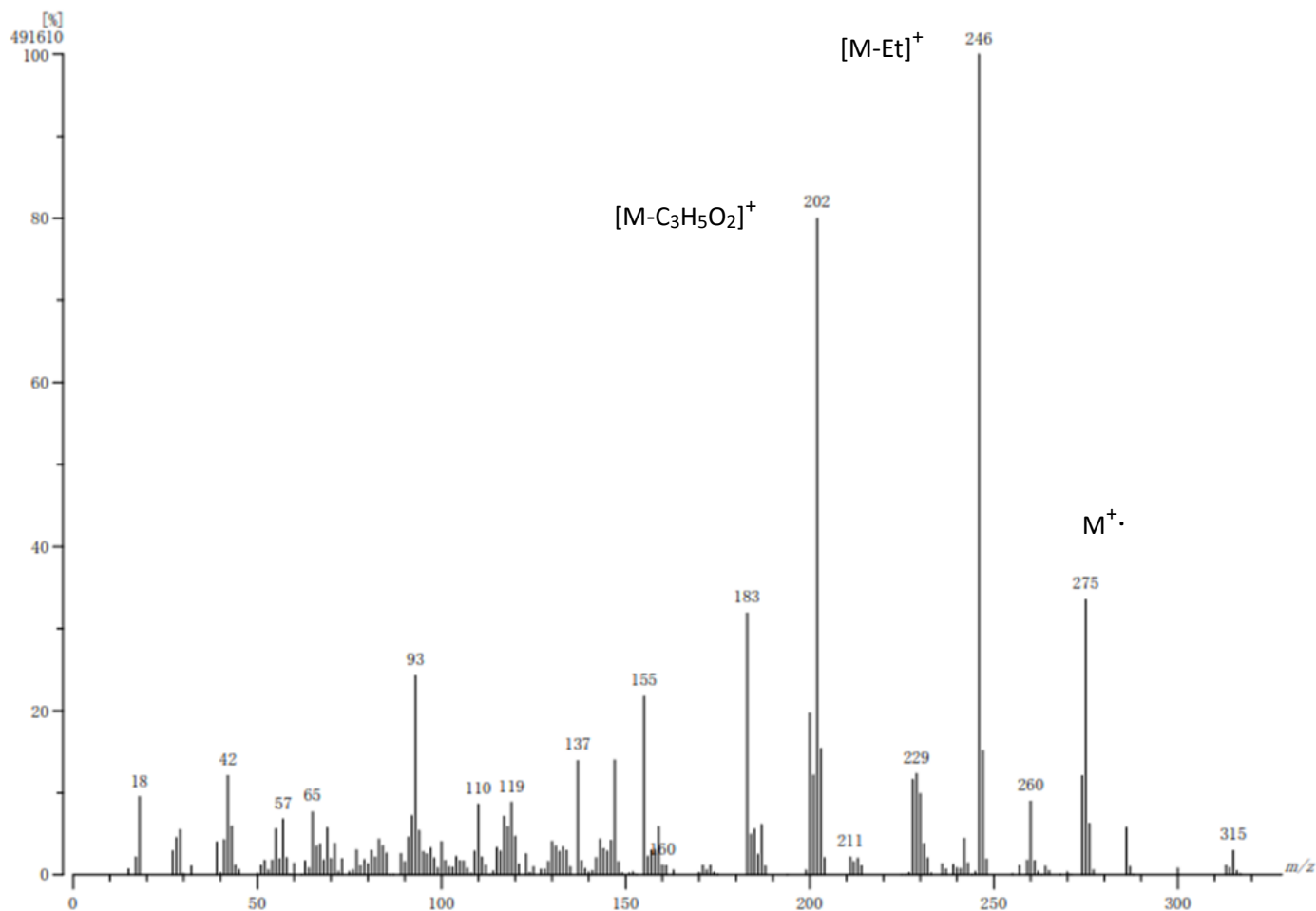
Estos resultados son consistentes con el comportamiento observado en los mecanismos de fragmentación del compuesto **I**, por lo tanto, el fragmento correspondiente al ion dimérico podrá ser producido debido a las interacciones intermoleculares ion-molécula del anillo de 3,4-dihidro-1*H*-pirimidinona del éster de Biginelli.



Espectro 11. Espectro de masas adquirido por análisis directo en tiempo real del compuesto II.

Compuesto **II**.- DART-EM modo ion positivo $m/z, (\%ar)[A]$: 551(96) $[2M+H]^+$, 276(100) $[M+H]^+$, 183(67) $[M-C_6H_6N]^+$.

En el sentido de obtener más información estructural del compuesto **II** se adquirió el espectro 12 mediante ionización electrónica, encontrando el ion molecular m/z 275, así como los fragmentos m/z 246, 202, 183 y 155 a partir de la fragmentación descrita en las figuras 11 y 12.



Espectro 12. Espectro de masas adquirido por IE del compuesto II.

Compuesto **II**.- IE-EM $m/z,(\%ar)[A]$: 275(35) M⁺, 246(100) [M-C₂H₅]⁺, 202(80) [M-C₃H₅O₂]⁺, 183(100) [M-C₆H₆N]⁺, 155(22) [M-C₇H₆NO]⁺

La composición molecular C₁₄H₁₇N₃O₃ se determinó mediante un experimento de alta resolución (figura 15), que correlaciona con una masa molecular 275.12 g/mol.

Sample : 2833 DHPMNH2
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 RT : 0.94 min Scan# : (30,35)+(69,71)
 Elements : C 24/0, H 49/0, N 4/2, O 4/2
 Mass Tolerance : 5mmu
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
275.1258	44.44	275.1270	-4.3 / -1.2	8.0	14	17	3	3

Figura 15. Resultados del experimento alta resolución del compuesto II.

7.2.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear, RMN ¹H y ¹³C del compuesto II.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para el compuesto II en los experimentos de RMN ¹H y ¹³C, adquiridos en un equipo de 400 MHz, usando como disolvente DMSO-d₆.

Tabla 2. Resultados RMN ¹H y ¹³C del compuesto II.

Compuesto II		Compuesto II	
No. de átomo	RMN ¹ H (δ en ppm)	No. de átomo	RMN ¹³ C (δ en ppm)
13	1.05, t, J = 7 Hz	13	14.14
8	2.17, s	8	17.73
12	3.92, q, J = 7.1 Hz	12	59.07
6	4.91, d, J = 3.1 Hz	6	53.54
20	4.93, s	20	-----
16, 17	6.43, ddd, J = 8.59, 3.25, 1.51 Hz	16, 17	113.57
15, 18	6.82, ddd, J = 8.24, 2.55, 1.86 Hz	15, 18	126.98
5	7.48, s	5	-----
3	8.99, s	3	-----
		1	100.02
		2	147.88
		4	152.29
		9	165.55
		14	132.29
		19	147.37

La semejanza estructural del compuesto II con respecto a la estructura molecular del compuesto I trae consigo que las señales correspondientes al anillo de 3,4-dihidro-1H-pirimidinona y del éster resulten en desplazamientos químicos similares, sin embargo, debido a la transformación del grupo nitro por un grupo amino la distribución

electrónica del sustituyente fenilo cambió significativamente provocando que las señales de los átomos 16 y 17 aparezcan en 6.43 ppm, mientras que para el compuesto **I** estas mismas señales aparecen en 8.20 ppm, de acuerdo a sus espectros de RMN ^1H .

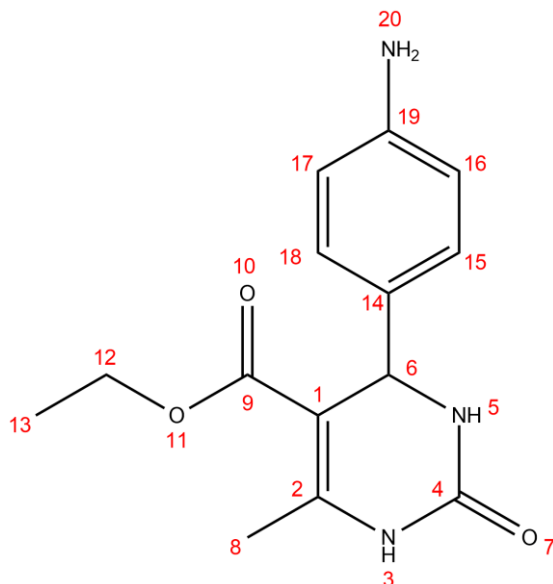
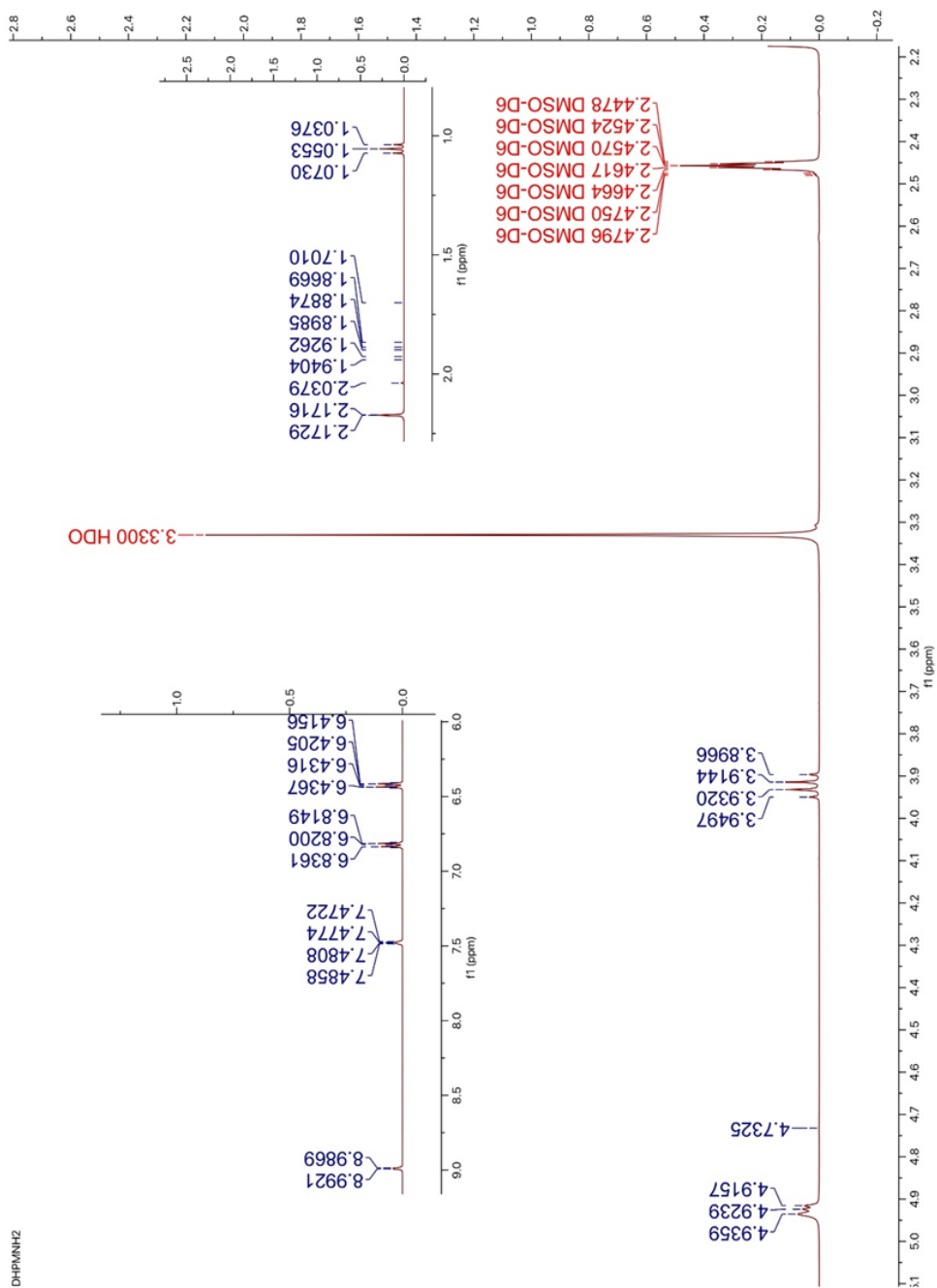


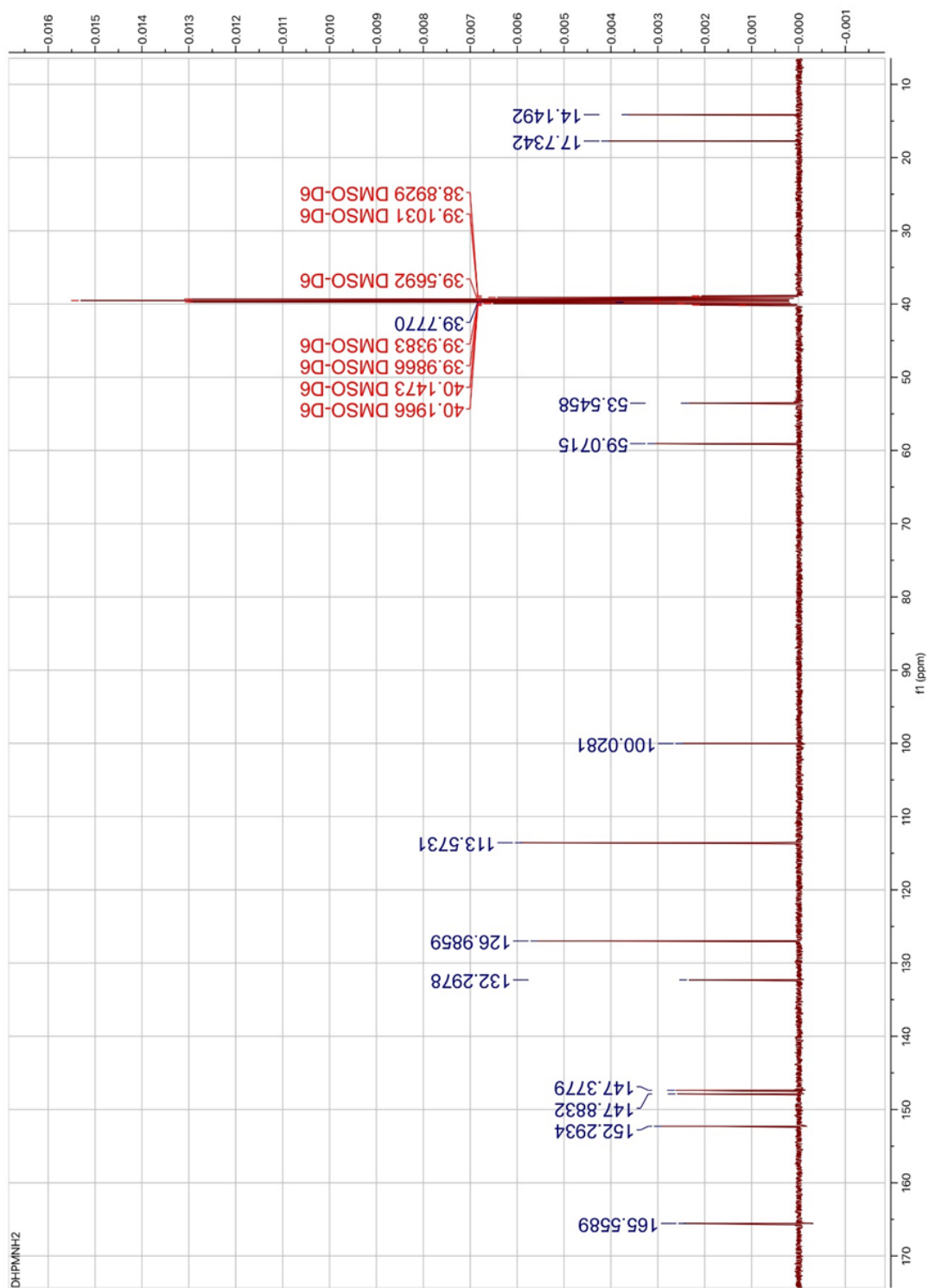
Figura 16. Estructura enumerada del compuesto II.

El grupo amino en la posición 19 (figura 16), al no encontrarse polarizado en magnitud equiparable con respecto a los otros dos átomos de hidrógeno unidos a los nitrógenos presentes en el heterociclo, su señal aparece a campo más alto en 4.93 ppm como una señal simple con una integral de 2H. Para confirmar que la señal en 4.93 ppm corresponde al grupo amino se realizaron los experimentos DEPT 90 y DEPT 135 (espectro 12 y 13), en los cuales no aparece ninguna señal en ese valor de desplazamiento químico, lo que indica que son átomos de hidrógenos unidos a un heteroátomo.

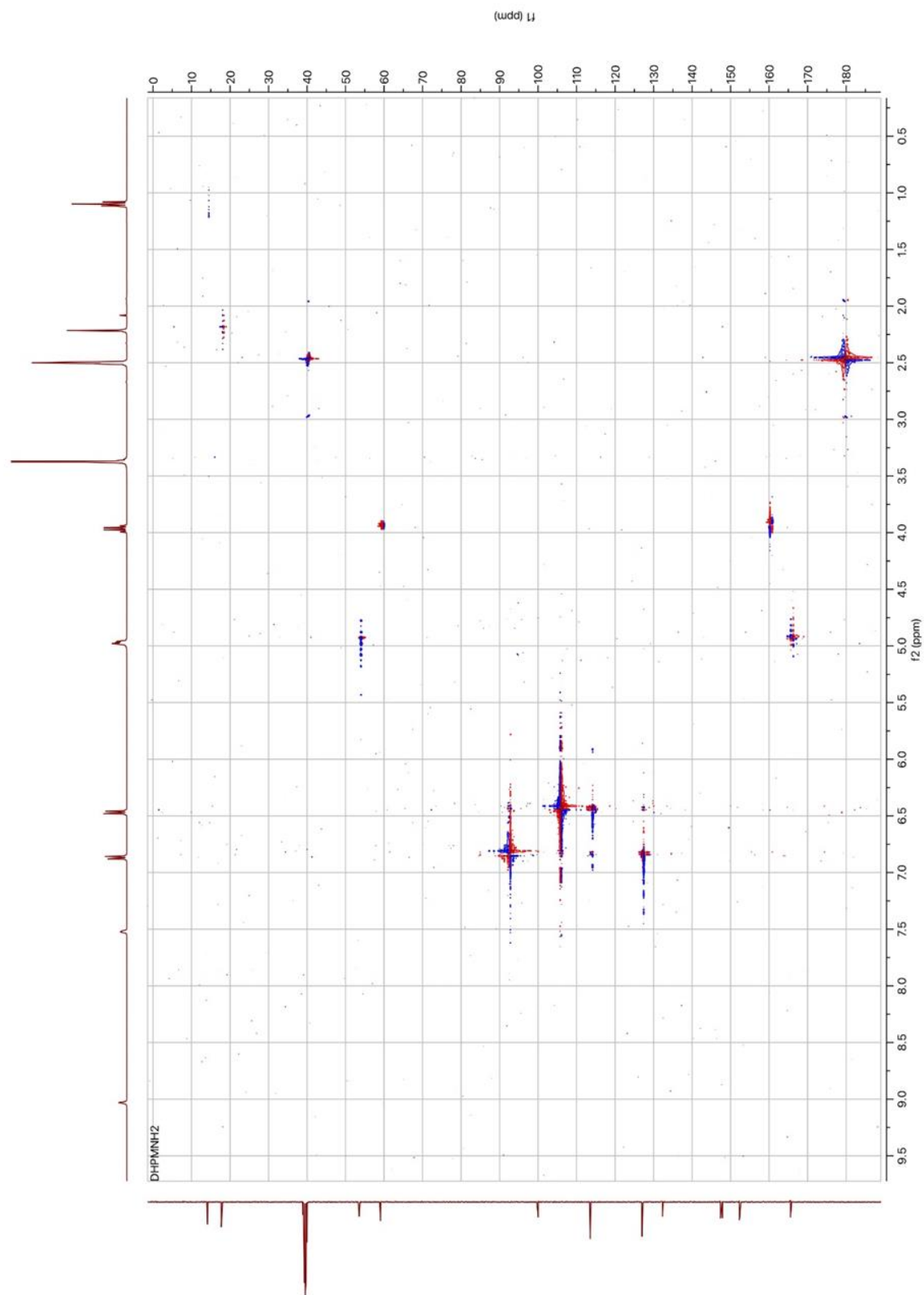
Comp. II ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.99 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 6.82 (ddd, $J = 8.24, 2.55, 1.86$ Hz, 2H), 6.43 (ddd, $J = 8.59, 3.25, 1.51$ Hz, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.91 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 3.92 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.05 (t, $J = 7$ Hz, 3H). ^{13}C : 14.14, 17.73, 53.54, 59.07, 100.02, 113.57, 126.98, 132.29, 147.37, 147.88, 152.29, 165.55



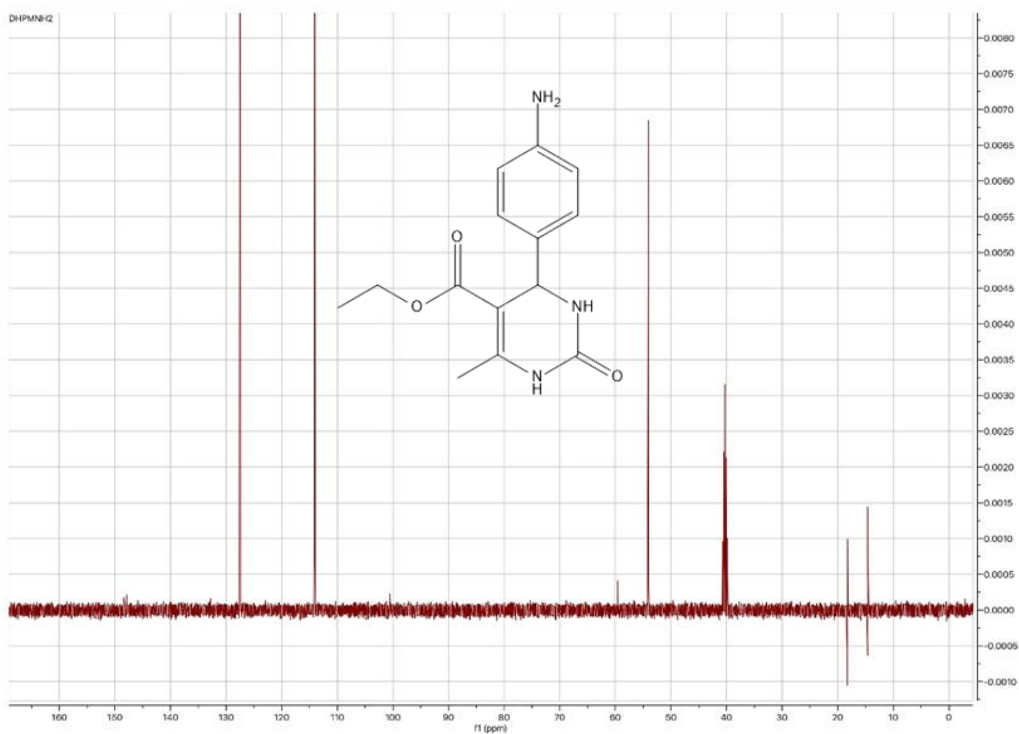
Espectro 13. Espectro RMN ^1H del compuesto II.



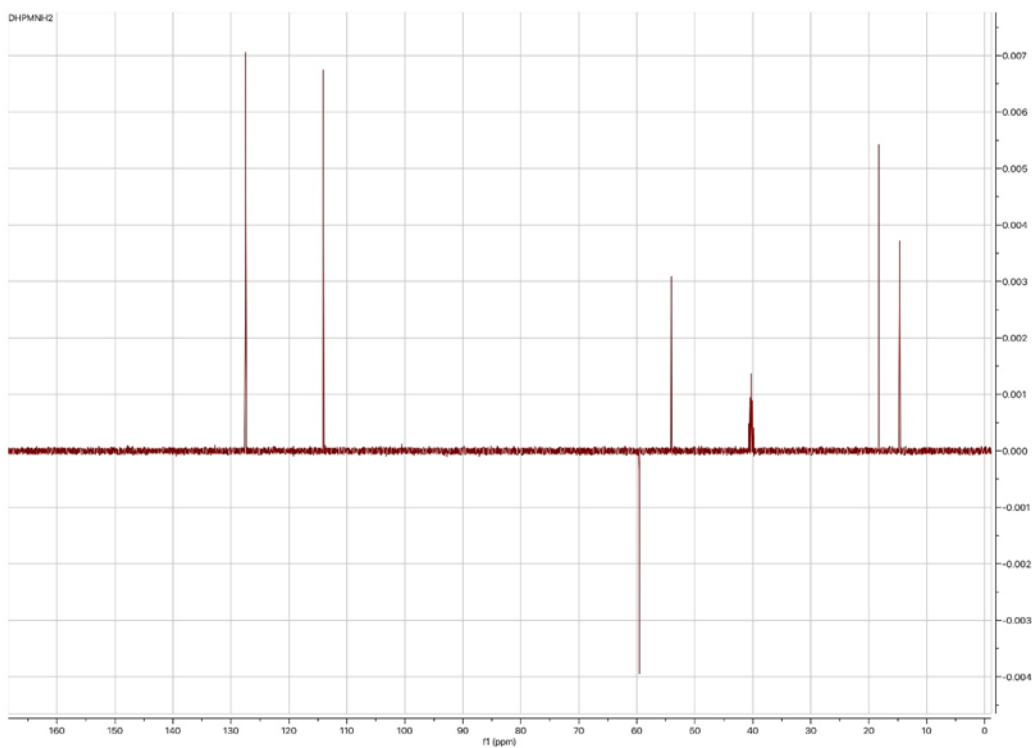
Espectro 14. Espectro RMN ^{13}C del compuesto II.



Espectro 15. HSQC del compuesto II.



Espectro 16. DEPT 90 del compuesto II.



Espectro 17. DEPT 135 del compuesto II.

7.3. Obtención de 4-{4-[2-(1,3-dicianopropan-2-ilideno)hidrazinil]fenil}-6-metil-2-oxo-3,4-dihidro-1H-pirimidin-5-carboxilato de etilo (**III**).

El compuesto **III** cuya fórmula molecular es $C_{17}H_{16}N_6O_3$, es un polvo de color anaranjado con un punto de fusión de $154^{\circ}C$, obteniendo un rendimiento de reacción de 73.91%.

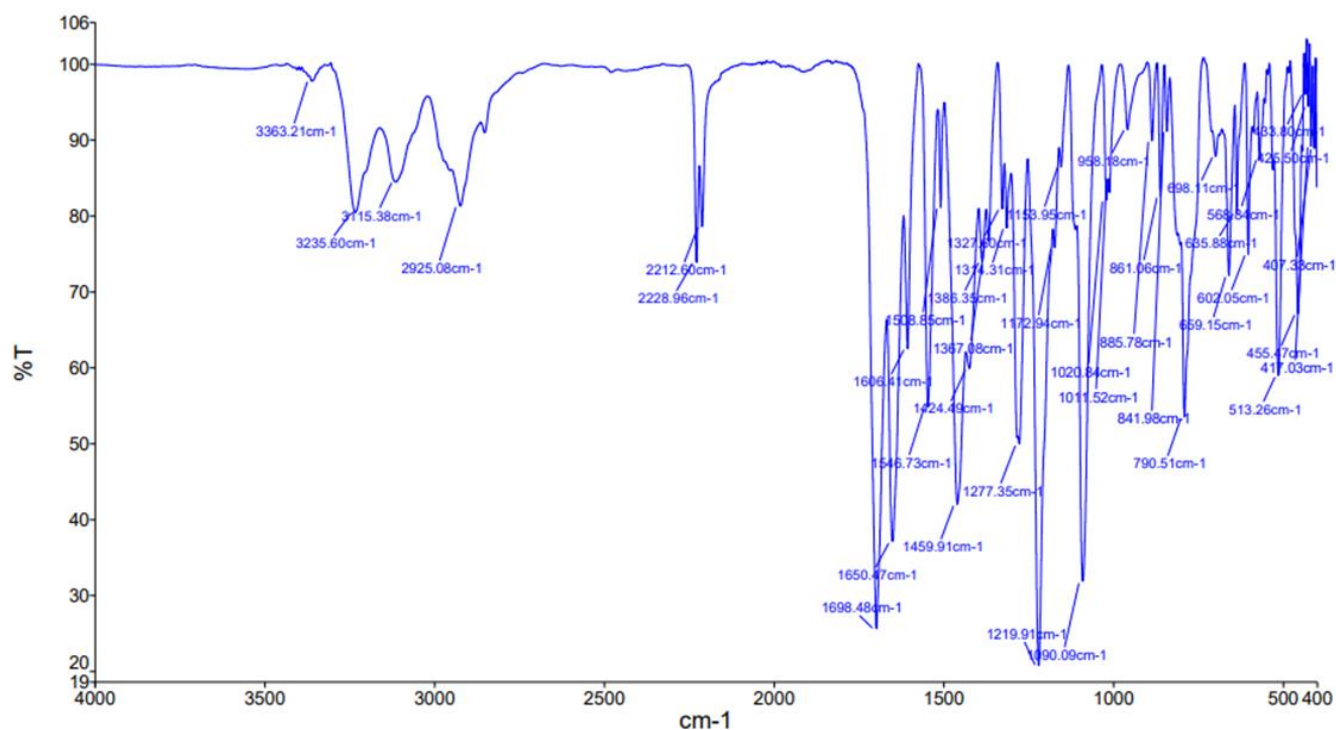
El valor porcentual de la economía atómica para la obtención del compuesto **III** es 78.86%, obteniendo un valor relativamente alto debido a que se incorporó a la estructura del producto final un equivalente del reactivo malononitrilo, y un átomo de nitrógeno proveniente de la adición del electrófilo ion nitrosonio.

7.3.1. Espectrofotometría de absorción en la región del infrarrojo del compuesto **III**.

El espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto **III** (espectro 18) muestra solamente tres bandas en la región de $3400-3100\text{ cm}^{-1}$ producidas por el estiramiento de los tres enlaces N-H, siendo una de las bandas generadas por el grupo amino presente en el compuesto **II** la que desapareció, por lo tanto, la introducción de un nuevo grupo de átomos sucedió en el átomo de nitrógeno de la amina aromática.

En 2228 y 2212 cm^{-1} se observan dos bandas medianas y delgadas que corresponden a los dos sustituyentes ciano presentes en la molécula, producidos por el estiramiento del triple enlace carbono-nitrógeno.

En la región de $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ se continúan observando, así como sucedió con los compuesto **I** y **II** las bandas correspondientes al estiramiento del grupo carbonilo del éster en 1698 cm^{-1} , el estiramiento del anillo del sustituyente fenilo en 1650 cm^{-1} , el estiramiento del doble enlace del anillo de dihidropirimidinona en 1546 cm^{-1} , así como la vibración fuera del plano del sustituyente fenilo 1,4-disustituido en 790 cm^{-1} .



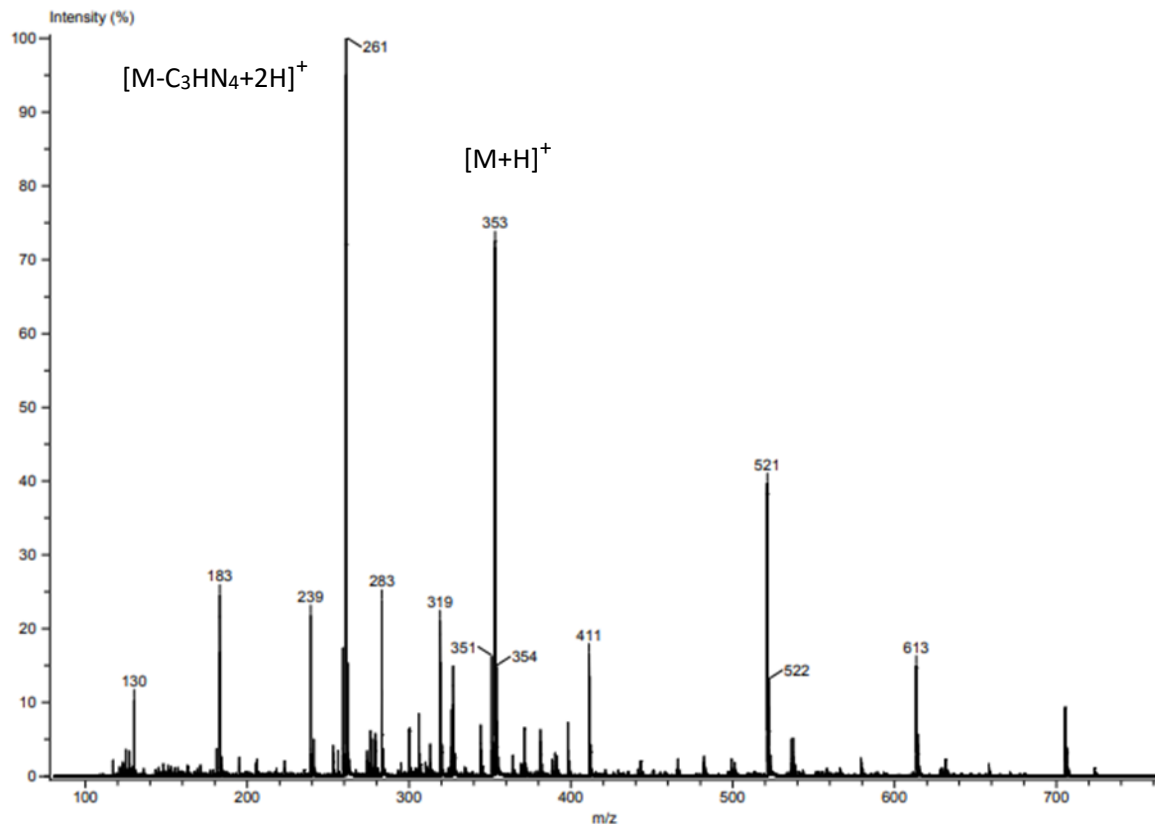
Espectro 18. Espectro de absorción en la región del infrarrojo del compuesto III.

Las bandas del espectro de infrarrojo correspondientes al compuesto **III** fueron las siguientes: IR(ATR) ν cm^{-1} : 3363 (str N-H), 3235 (str dihidropirimidinona N-H), 3115 (str dihidropirimidinona N-H), 2925 (str C_{sp^3} -H), 2228 (str $\text{C}\equiv\text{N}$), 2212 (str $\text{C}\equiv\text{N}$), 1698 (str éster C=O), 1650 (str arom C=C), 1546 (str pirimidinona C=C), 1459 (str C_{arom} -N), 1369 (str C-O-C), 1219 y 1090 (str C-O).

7.3.2. Espectrometría de masas del compuesto **III**

En el espectro 19 se muestra el espectro de masas adquirido mediante la técnica de análisis directo en tiempo real, en éste se observa el fragmento m/z 353 correspondiente a la molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$, ganando 77 u.m.a con respecto a la masa molecular del compuesto **II** debido a la formación del grupo 2-hidrazinilpropanodinitrilo que equivale a una ganancia de un grupo C_3N_3 y la pérdida de un átomo de hidrógeno, confirmando la adición de este grupo a la estructura molecular.

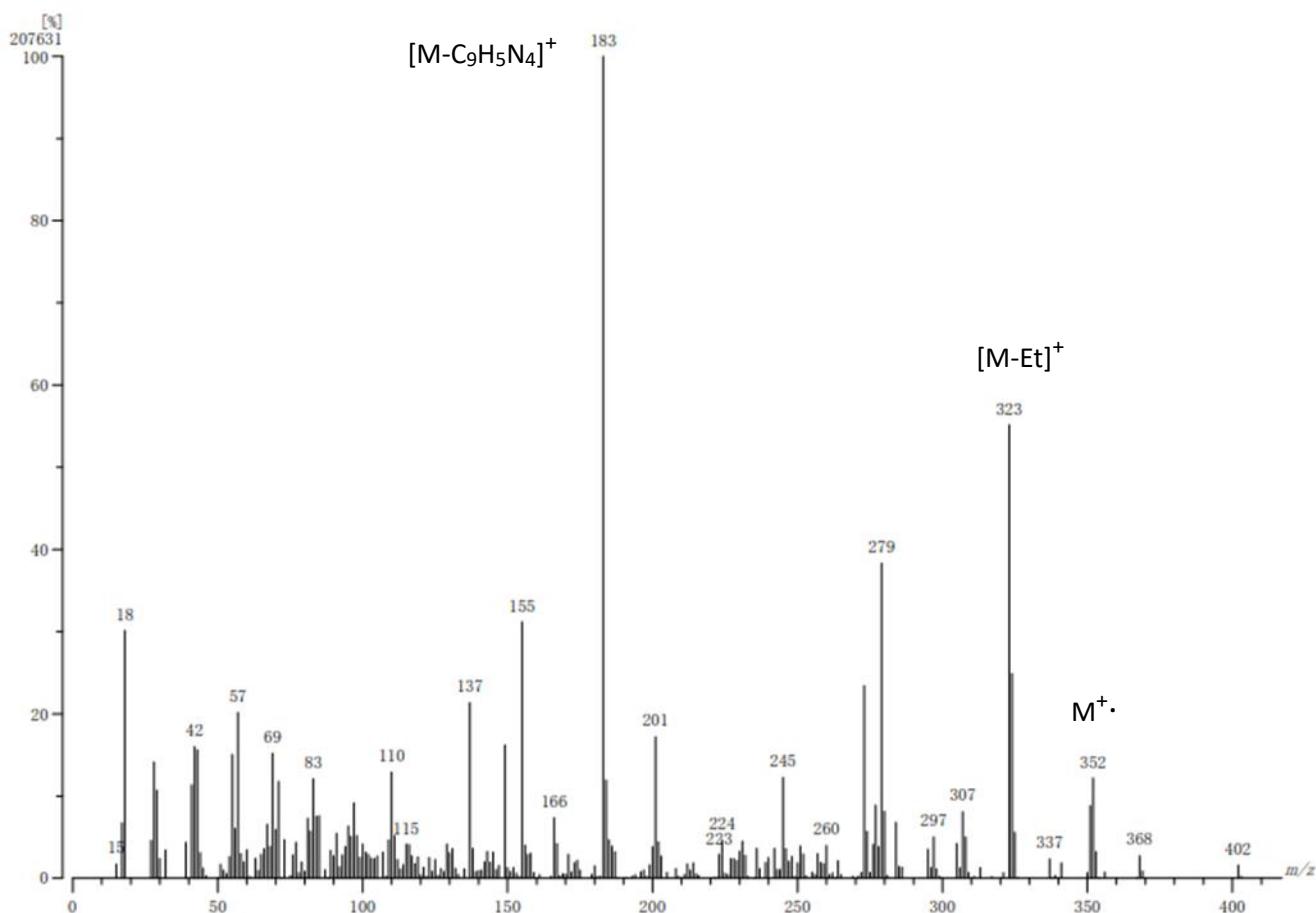
El pico base es el de una relación m/z 261 que se refiere a la especie $[M-C_3HN_4+2H]^+$, correspondiente a la pérdida del sustituyente hidrazonilo ubicado en la posición 4 del fenilo. Además, se muestra el fragmento correspondiente a la especie descrita en el mecanismo de fragmentación presentado en la figura 12, de m/z 183.



Espectro 19. Espectro de masas adquirido por análisis directo en tiempo real del compuesto III.

Compuesto **III**.- DART-EM modo ion positivo $m/z, (\%ar)[A]$: 353(75) $[M+H]^+$, 261(100) $[M-C_3HN_4+2H]^+$, 183(27) $[M-C_9H_5N_4]^+$.

En el espectro 20, se observan tres fragmentos cuya abundancia relativa es superior a 30% de m/z 323, 279 y 183 a partir de la fragmentación descrita en las figuras 11 y 12. El ion molecular se observa en una relación m/z 352 y una abundancia relativa 10%, mientras que el pico base corresponde al fragmento m/z 183.



Espectro 20. Espectro de masas adquirido por IE del compuesto III.

Compuesto **III**.- IE-EM $m/z, (\%ar)[A]$: 352(12) M⁺, 323(53) [M-C₂H₅]⁺, 307(8) [M-C₂H₅O]⁺, 279(40) [M-C₃H₅O₂]⁺, 183(100) [M-C₉H₅N₄]⁺, 155(30) [M-C₁₀H₅N₄O]⁺

En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos en el experimento alta resolución, obteniendo una composición molecular C₁₇H₁₆N₆O₃ que correlaciona con la masa molecular 352.12 g/mol.

Sample : 2834 DHPMDZ
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 RT : 2.68 min Scan# : (150,175)+(289,329)+(286,350)
 Elements : C 24/0, H 49/0, N 7/4, O 4/2
 Mass Tolerance : 5mmu
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 15.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U. S.	C	H	N	O
352.1267	23.56							
1 352.1284			-4.8 / -1.7	13.0	17	16	6	3

Figura 17. Resultados del experimento alta resolución del compuesto III.

7.3.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear, RMN ¹H y ¹³C del compuesto III.

En la tabla 3 que a continuación se muestra se encuentran los resultados obtenidos en los experimentos de RMN ¹H y ¹³C, adquiridos en un equipo de 400 MHz, usando como disolvente DMSO-*d*₆ para el compuesto III.

Tabla 3. Resultados RMN ¹H y ¹³C del compuesto III.

Compuesto III		Compuesto III	
No. de átomo	RMN ¹ H (δ en ppm)	No. de átomo	RMN ¹³ C (δ en ppm)
13	1.05, t, J = 7.1 Hz	13	14.61
8	2.22, s	8	18.33
12	3.95, q, J = 7 Hz	12	59.75
6	5.11, d, J = 3.4 Hz	6	54.14
20	13.02, s	20	-----
16, 17	7.24, ddd, J = 8.79, 2.50, 1.85 Hz	16, 17	128.05
15, 18	7.40, ddd, J = 8.64, 2.43, 1.84 Hz	15, 18	117.16
5	7.69, s	5	-----
3	9.17, s	3	-----
		1	99.51
		2	149.04
		4	152.48
		9	165.80
		14	141.29
		19	143.05
		22	84.77
		23	110.62
		25	115.09

La semejanza estructural con el compuesto I y II, genera que prevalezcan las señales correspondientes al éster de Biginelli, sin embargo, el compuesto III muestra un sustituyente en la posición 4 del fenilo conformado por 3 átomos de carbono sin enlaces hacia átomos de hidrógeno (espectro DEPT 135, espectro 25), a estos tres átomos

de carbono se les asignó en el espectro RMN ^{13}C las posiciones de 84.77, 110.62 y 115.09 ppm, que corresponden a los átomos número 22, 23 y 25, respectivamente (figura 18).

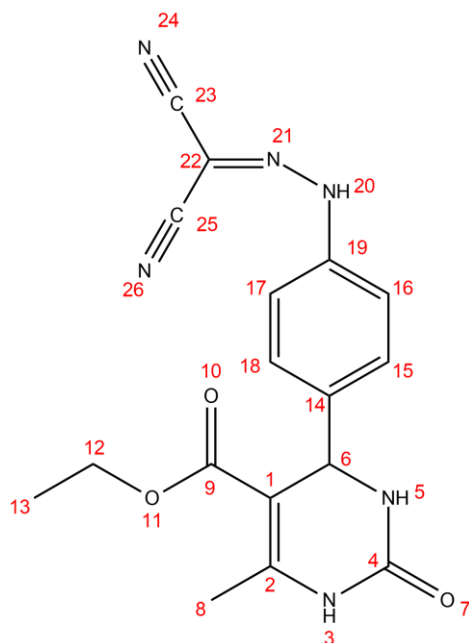


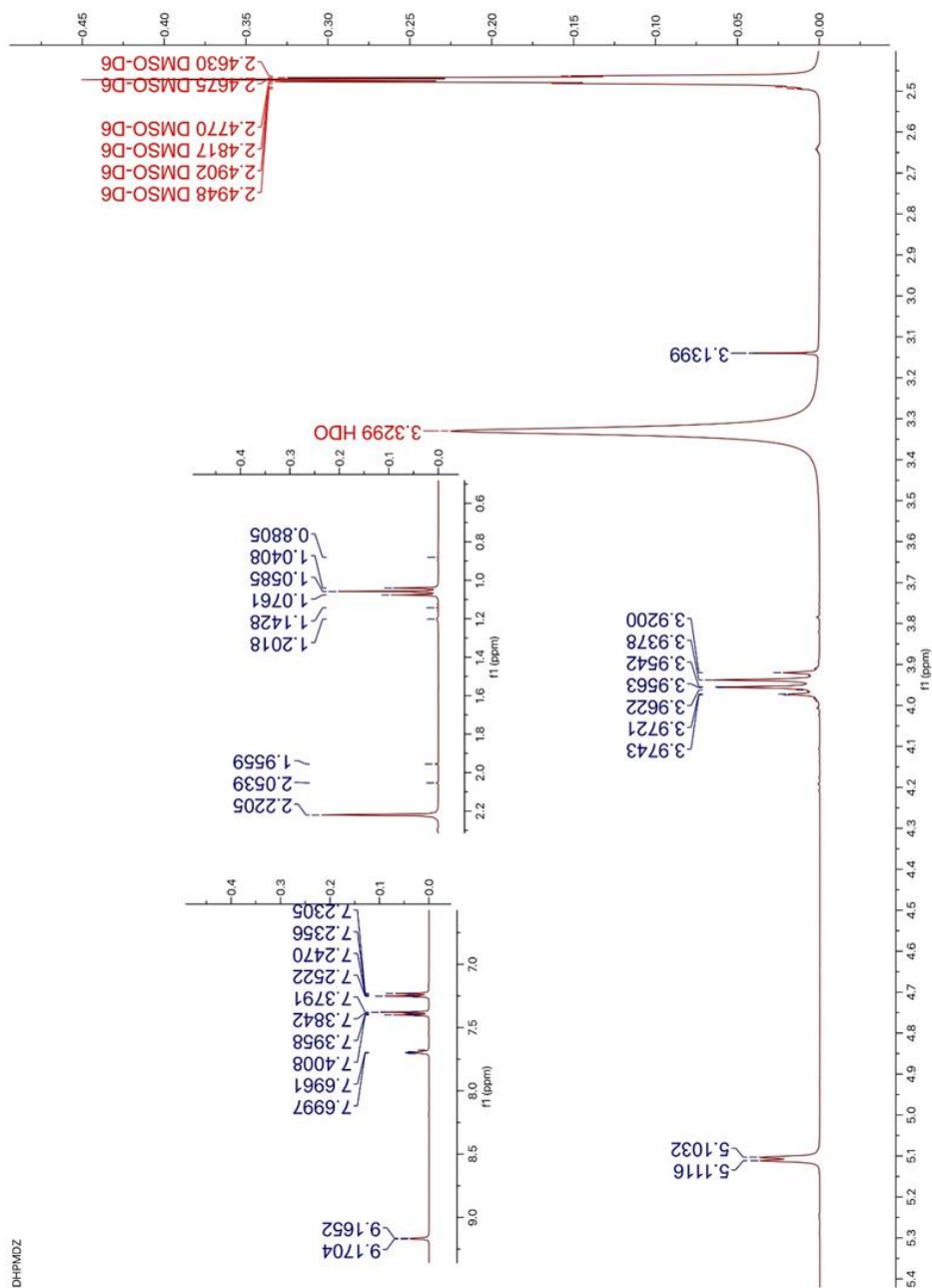
Figura 18. Estructura enumerada del compuesto III.

La existencia de estas señales permite confirmar inequívocamente la estructura del compuesto **III**, ya que nos muestra que el sustituyente en la posición 4 del fenilo se encuentra formado por 3 átomos de carbono sin hidrógenos y 3 átomos de nitrógeno incorporados a la molécula en la síntesis del presente compuesto, confirmando así la conectividad, número de enlaces múltiples y posición del grupo hidrazona.

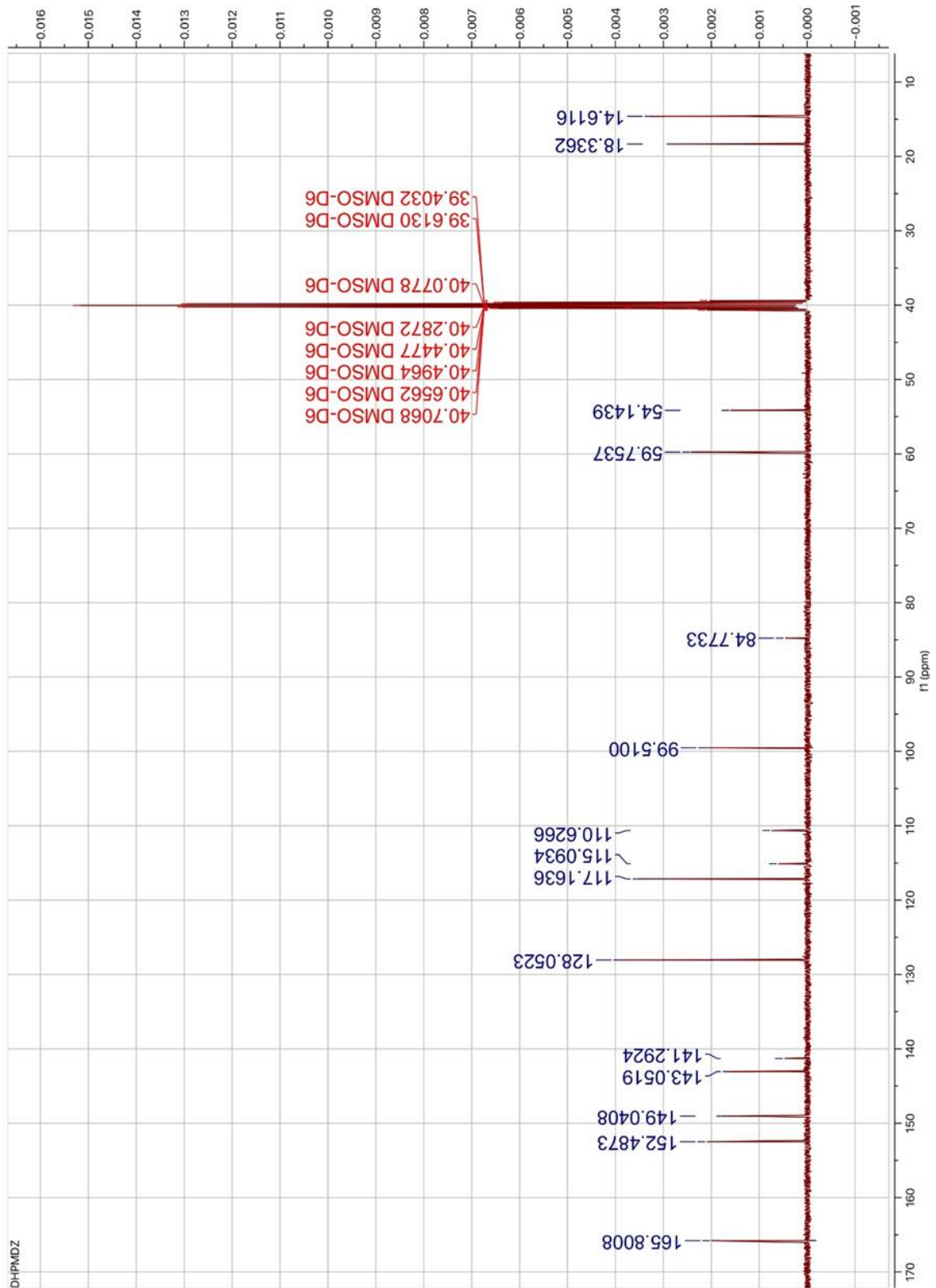
Si comparamos los valores de desplazamiento químico obtenidos en RMN ^1H para las posiciones orto con respecto a la posición 4 del sustituyente fenilo (número 16 y 17, en la figura 18) con respecto a las mismas posiciones pero del compuesto **II**, podemos observar que si bien el grupo hidrazona se encuentra donando densidad electrónica por efecto de resonancia hacia el anillo aromático, este grupo no dona tanta densidad como el grupo amino del compuesto **II**, generando que las posiciones 16 y 17 en el espectro de RMN ^1H resulten a campo más bajo en 7.24 ppm, mientras que para el compuesto **II** las posiciones 16 y 17 aparecen en 6.47 ppm.

Cabe destacar que la resonancia existente en la región de la molécula donde se encuentra el grupo funcional hidrazona tiene como efecto aumentar la densidad electrónica de los átomos de carbono número 22, 23 y 25, generando que en el espectro de RMN ^{13}C se obtengan señales cuyo desplazamiento químico son menores en magnitud con respecto a los valores comúnmente reportados para grupos nitrilos (cercano a 120 ppm) e hidrazona (140-100 ppm).

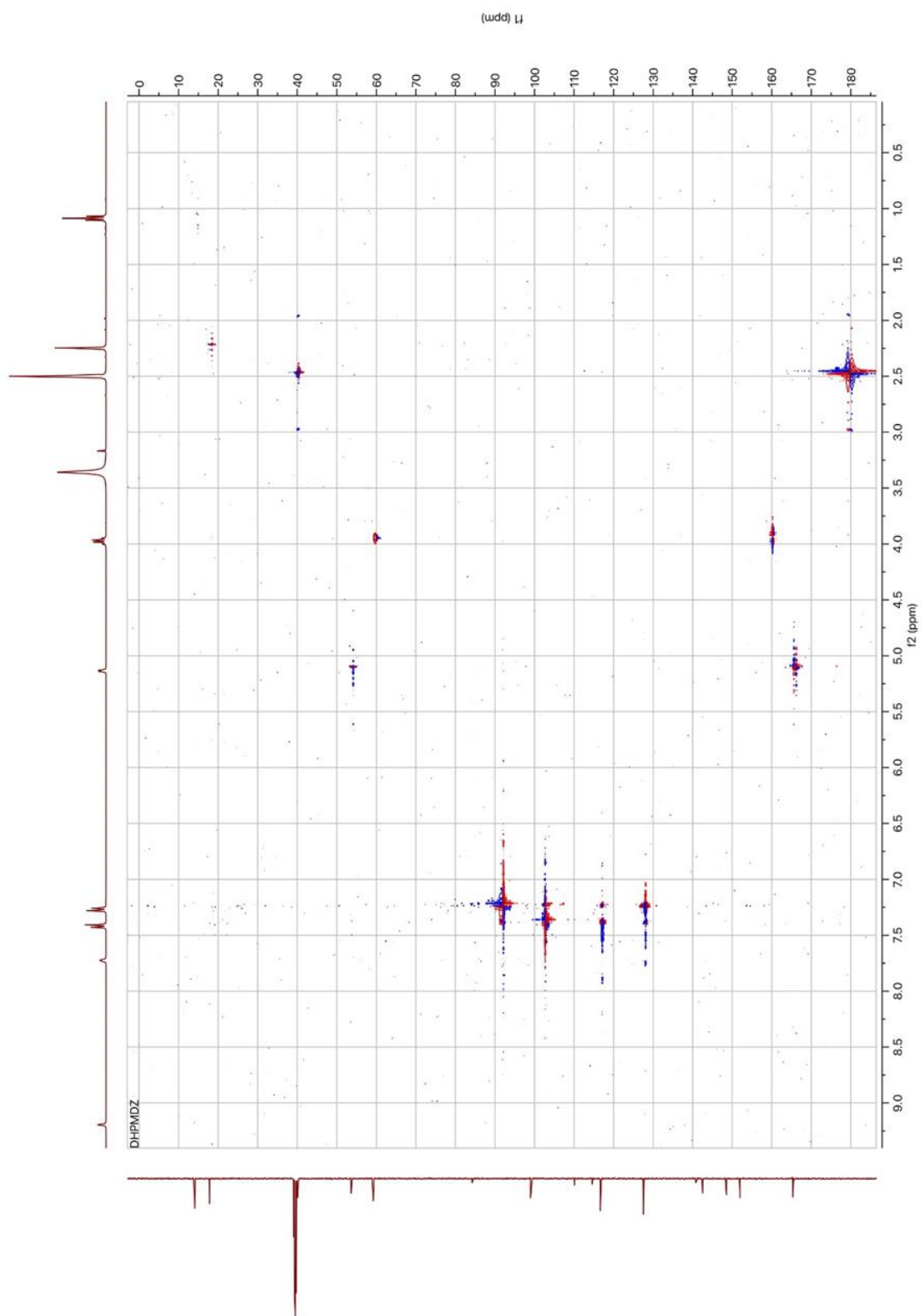
Comp. **III** ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.17 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.40 (ddd, $J = 8.64, 2.43, 1.84$ Hz, 2H), 7.24 (ddd, 8.79, 2.50, 1.85 Hz, 2H), 5.11 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 3.95 (q, $J = 7, 2\text{H}$), 3.13 (s, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.05 (t, $J = 7.1, 3\text{H}$). ^{13}C : 14.61, 18.33, 54.14, 59.75, 84.77, 99.51, 110.62, 115.09, 117.16, 128.05, 141.29, 143.05, 149.04, 152.48, 165.80



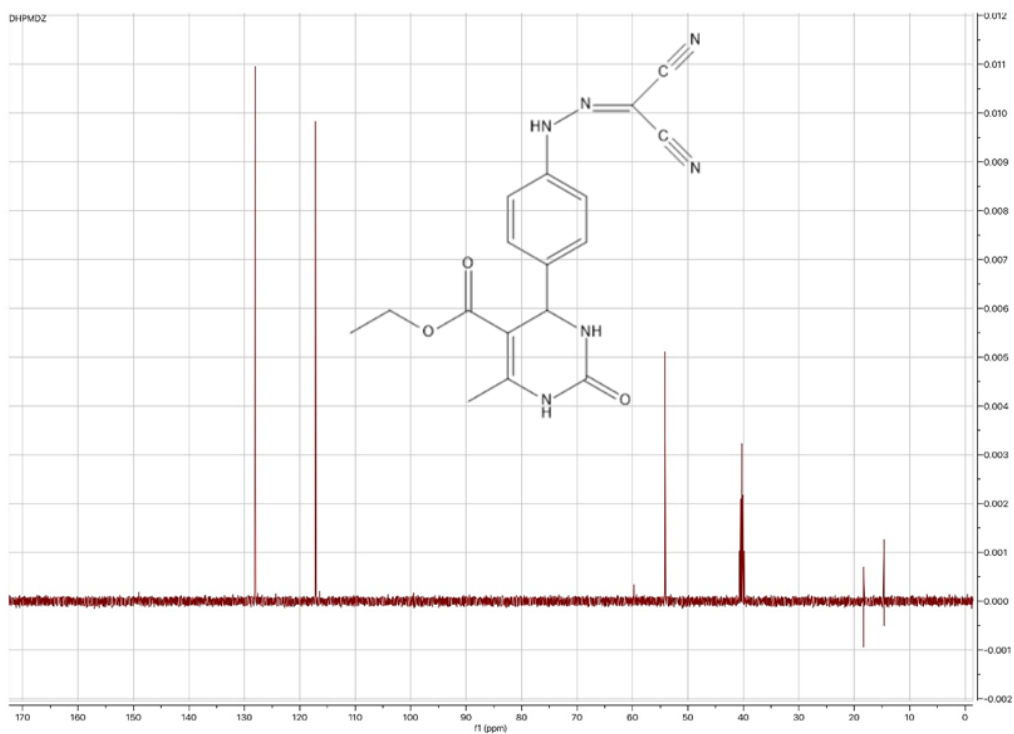
Espectro 21. Espectro RMN ^1H del compuesto III.



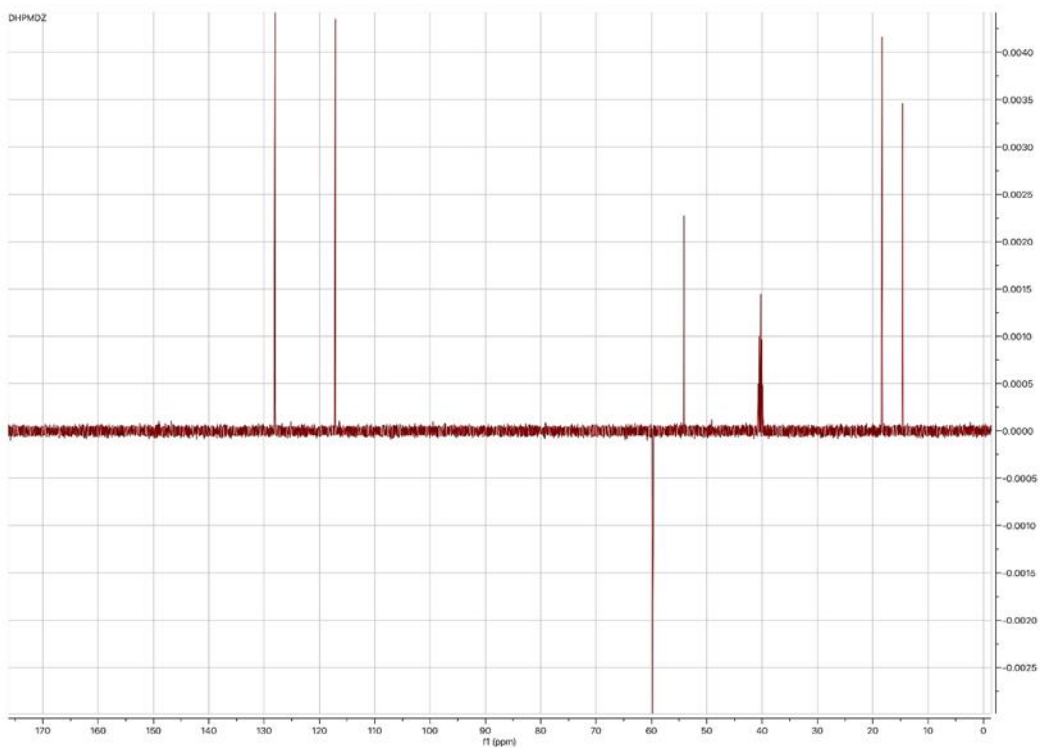
Espectro 22. Espectro RMN ¹³C del compuesto III.



Espectro 23. HSQC del compuesto III.



Espectro 24. DEPT 90 del compuesto III.



Espectro 25. DEPT 135 del compuesto III.

7.4. Evaluación biológica de los compuestos **II** y **III**.

7.4.1. Estudio ecocardiográfico

A continuación, se presentan los resultados de la evaluación biológica como inotrópico positivo de los compuestos **II** y **III**. Lo anterior para evaluar la contribución del sustituyente que se adicionó a la molécula de DHPM.

Tabla 4. Resultados de la evaluación ecocardiográfica del compuesto **II** y **III**, empleando Levosimendán como control

	Levosimendán	Compuesto II	Compuesto III
VFD (mL)	*-0.138 ±0.04	*0.32±0.08	0.026±0.07
VFS (mL)	*-0.02±0.005	0.09±0.02	-0.004±0.01
FE %	*3.86±1.3	*-14.22±6.5	0.56±3.2
VS (mL)	*-0.118±0.04	0.24±0.08	0.032±0.06
FA %	11.56±6.8	*-20.64±6.9	0.19±6.3

Levosimendán disminuye los volúmenes de sangre en los ventrículos al final de la sístole y diástole, por lo tanto, aumenta la fracción de eyección y acortamiento que representan el porcentaje de sangre del corazón cada vez que se contrae.

Estos parámetros son importantes al evaluar a un posible inotrópico positivo ya que al ser su mayor efecto el aumento de la fuerza de contracción del corazón, los parámetros que debe impactar son los antes mencionados con el fin de bombear mayor cantidad de sangre al organismo y cumplir con demandas energéticas del cuerpo. El compuesto **III**, aunque aumenta los parámetros de fracción de eyección y acortamiento no tiene un impacto sobre el volumen de sangre que eyecta el ventrículo a circulación sistémica. El compuesto **II** aumenta los volúmenes al final de la sístole y diástole, disminuye la fracción de eyección y la fracción de acortamiento, por lo que no se recomendaría como un buen inotrópico positivo por lo menos a la dosis de 2 mg/Kg.

Las diferencias mostradas por ambos compuestos en los resultados del estudio ecocardiográfico indican que el aumento de la fracción de eyección y de acortamiento producidos en el ensayo con el compuesto **III** se deben a la presencia del grupo 2-hidrazinilpropanodinitrilo, por lo tanto, este grupo es indispensable para alcanzar dicha respuesta biológica convirtiéndolo en un elemento farmacofórico. En este sentido, el compuesto **II** al no contener dentro de su estructura molecular este elemento farmacofórico no produjo un aumento en estos parámetros, e inclusive generó la respuesta biológica contraria.

7.4.2. Presión arterial y frecuencia cardiaca

Los resultados se muestran como muestras pareadas dadas por la diferencia después de la administración menos antes de la administración de los fármacos.

Tabla 5. Resultados de presiones arteriales y frecuencia cardiaca, empleando Levosimendán como control.

	Levosimendán	Compuesto II	Compuesto III
PAS (mmHg)	*5 ±4.9	*10.15±7.79	-2.12±7.15
PAD (mmHg)	*9.8±10	*15.5±13.07	11.16±10.7
FC (lat/min)	41.42±81.6	*87.4±48.6	-122±93.83

PAS (presión arterial sistólica), PAD (presión arterial diastólica) y FC (frecuencia cardiaca).

El Levosimendán y el compuesto **II** muestran resultados similares al aumentar la presión arterial sistólica, diastólica y la frecuencia cardiaca. El compuesto **III** disminuye la presión arterial sistólica y la frecuencia cardiaca. Esto podría indicar que el compuesto **III** tiene más influencia sobre el funcionamiento de la vasculatura que en el aumento de la fuerza contráctil del miocardio.

7.5. Racionalización de unión por acoplamiento molecular

Para investigar el sitio de unión y su potencial de interacción de las estructuras **IIIa** y **IIIb** dentro de la estructura del receptor, que en este caso se refiere al dominio regulatorio de la troponina cardiaca C, se llevó a cabo inicialmente la simulación del acoplamiento entre Levosimendán (como control) y el receptor, esto abarcando toda la estructura del receptor dentro de la caja de búsqueda, o también llamado grid.

La simulación Levosimendán-receptor muestra la existencia de dos cavidades potenciales de unión, de las cuales una de ellas, sitio 1, presenta una mayor población de confórmeros, por lo tanto, una mayor probabilidad de preferencia por ese sitio a pesar de mostrar una menor energía de unión. Las coordenadas del sitio son $x = -5$, $y = -5$, y $z = -12$, con 28 conformaciones dentro de la agrupación.

Mientras que la otra potencial cavidad, sitio 2, presenta las coordenadas $x = -17$, $y = 0$, y $z = -10$, con 19 conformaciones dentro de la misma agrupación.

De acuerdo con la investigación desarrollada por Robertson y colaboradores⁴⁹, se definió como el sitio de unión del fármaco Levosimendán dentro del complejo formado por el dominio regulatorio de la troponina C y una

⁴⁹ Robertson, I. M., Baryshnikova, O. K., Li, M. X., Sykes, B. D. (2008). Defining the binding site of levosimendan and its analogues in a regulatory cardiac troponin C-Troponin I complex. *Biochemistry*, 47(28), 7485-7495. <https://doi.org/10.1021/bi800438k>

región de la troponina I (residuos 144-163), a la cavidad de naturaleza hidrofóbica cuyos residuos Ala²³, Phe²⁴, Met⁴⁵ y Ile⁶¹ muestran una mayor interacción con Levosimendán (figura 19).

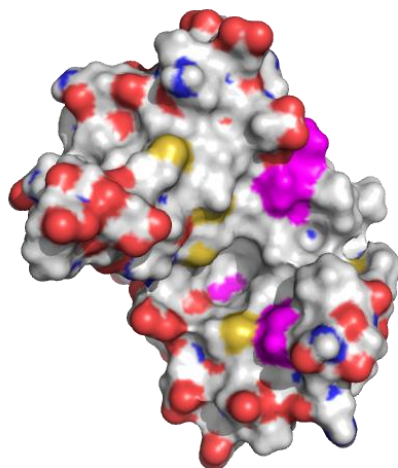


Figura 19. Dominio regulatorio de la troponina cardiaca C, en color magenta se muestran los residuos con mayor interacción con Levosimendán, por lo tanto, definiendo el sitio de unión experimental.

Por lo tanto, la cavidad que corresponde a esta posición de unión determinada experimentalmente es la del sitio 1.

El mismo procedimiento se realizó con los ligandos **IIIa** y **IIIb**, obteniendo como resultado que el compuesto **IIIa** presenta una preferencia considerable por el sitio 1, aún mayor que la presentada por Levosimendán, con una agrupación de 35 conformaciones dentro de este sitio. El compuesto **IIIa** se acopla dentro del sitio 1 con una energía de unión similar con respecto al fármaco Levosimendán, sugiriendo un buen potencial de unión. Este compuesto establece dos puentes de hidrógeno con el sitio 1, con los residuos Glu⁶³ y Arg⁸³ (figura 21). Además, interacciones hidrofóbicas π -alquil con los residuos Phe²⁷, Met⁶⁰, Val⁶⁴ y Phe⁷⁷, e interacciones alquil-alquil con Leu⁴¹, Val⁴⁴, Met⁴⁵, Leu⁴⁸ y Met⁸⁰.

Mientras que el compuesto **IIIb** presenta una extensa agrupación de 47 conformaciones dentro de la cavidad correspondiente al sitio 2. El compuesto **IIIb** se acopla al sitio 2 con una mejor energía de unión que Levosimendán, sin embargo, es un ligando que no se une al sitio 1 responsable de la respuesta biológica deseada. El compuesto establece dos puentes de hidrógeno con Glu⁷⁶ y Arg⁸³, así como interacciones hidrofóbicas de tipo alquil-alquil con los residuos Val⁶⁴, Val⁷⁹ y Met⁸⁰ dentro del sitio 2.

Tabla 6. Resultados del acoplamiento molecular ciego, de los ligandos Levosimendán, IIIa y IIIb con cNTnC

Compuesto	Sitio de Unión	Coordenadas del sitio	Energía de Unión Kcal/mol
Levosimendán	Sitio 1	$x = -5, y = -5, z = -12$	-5.85
	Sitio 2	$x = -17, y = 0, z = -10$	-6.88
IIIa	Sitio 1	$x = -5, y = -5, z = -12$	-5.79
IIIb	Sitio 2	$x = -17, y = 0, z = -10$	-7.10

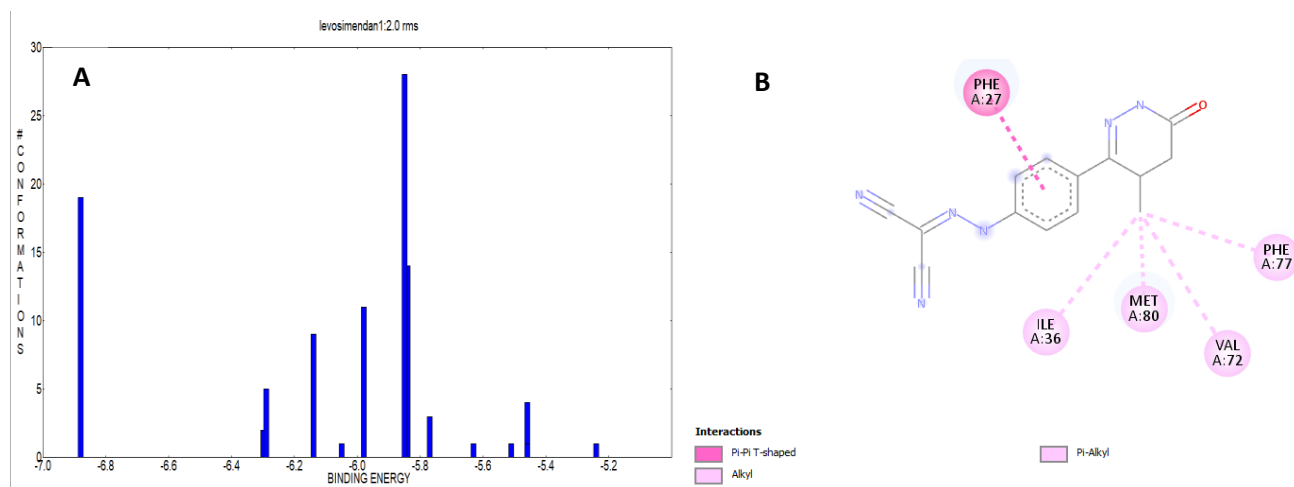


Figura 20. A. Agrupaciones obtenidas a partir de la simulación de acoplamiento molecular Levosimendán-dominio regulatorio cNTnC. B. Diagrama 2D de las interacciones ligando-receptor dentro del sitio 1.

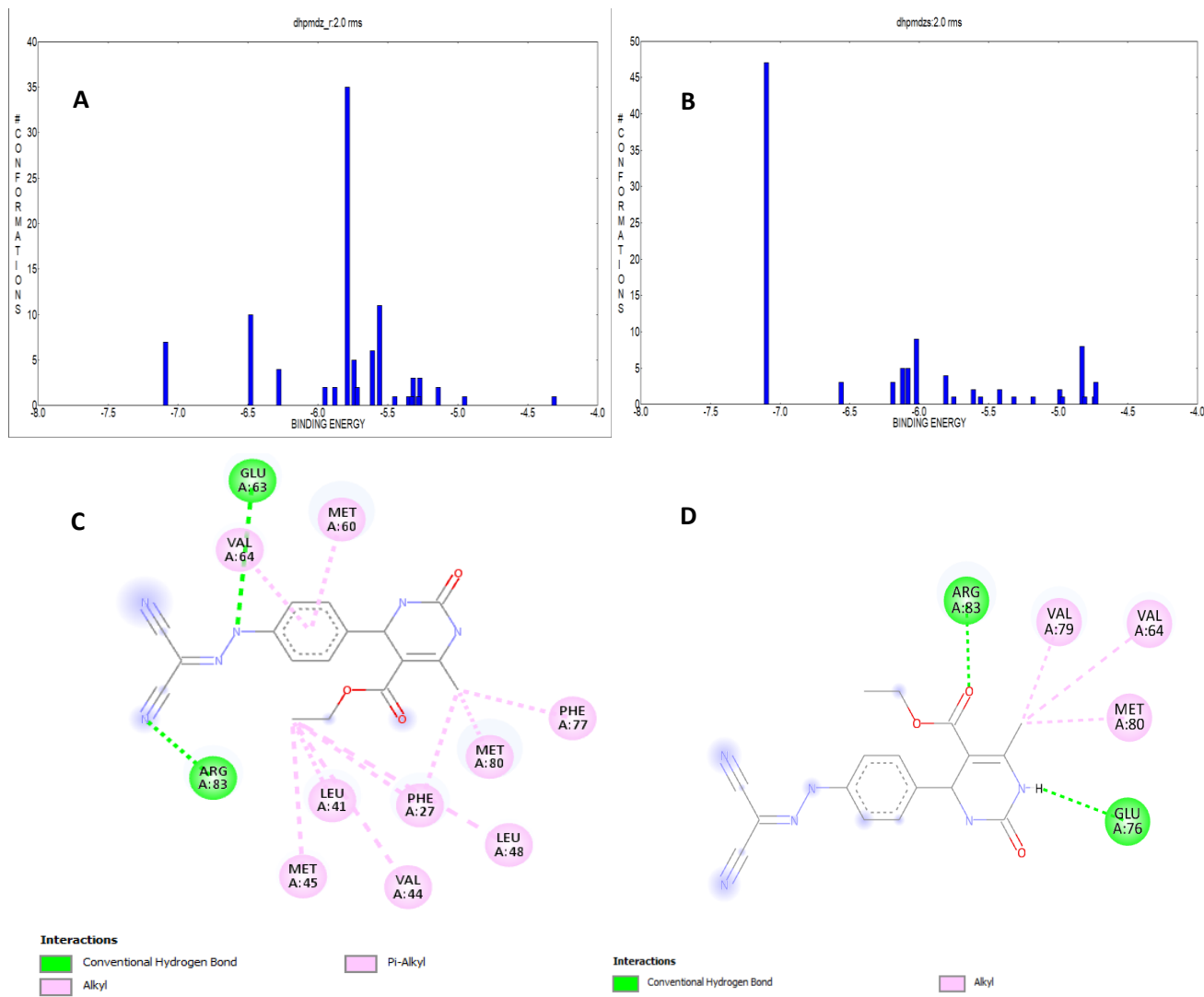


Figura 21. A. Agrupaciones obtenidas a partir de la simulación de acoplamiento molecular compuesto IIIa-dominio regulatorio cTnC. B. Compuesto IIIb-dominio regulatorio cTnC. C. Diagrama 2D de las interacciones IIIa -receptor dentro del sitio 1. D. Diagrama 2D de las interacciones IIIb -receptor dentro del sitio 2.

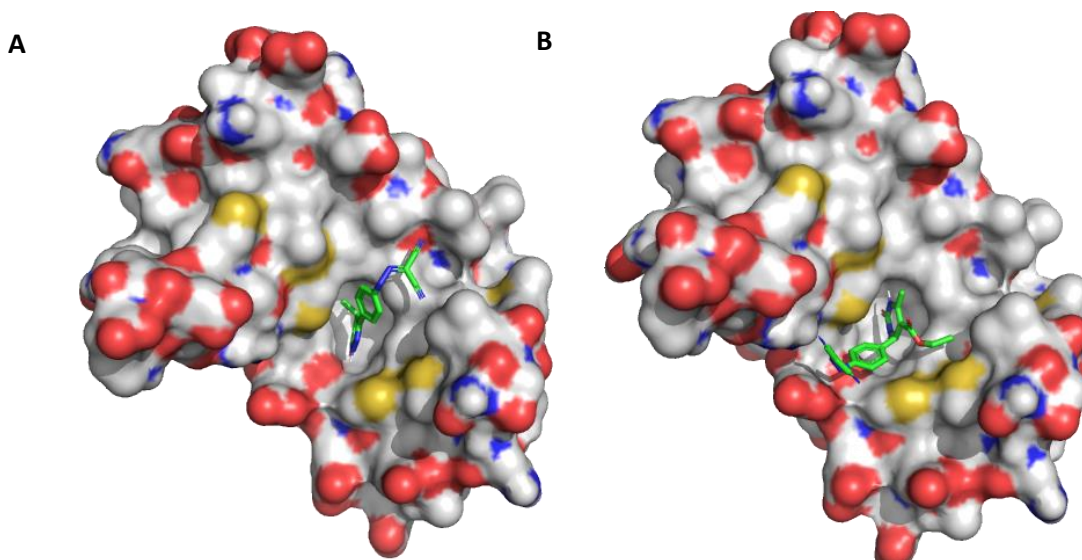


Figura 22. A. Diagrama 3D de la pose de unión más estable en el acoplamiento Levosimendán-receptor en el sitio 1. B. Compuesto IIIa - receptor en el sitio 1

8. Conclusiones

Se obtuvo un análogo del Levosimendán, compuesto **III**, empleando metodologías basadas en el protocolo de la química verde, obteniendo altos valores de economía atómica, disminución de tiempos de reacción a partir del empleo de una fuente alterna de activación química y el uso de disolventes seguros.

El compuesto **III** fue evaluado *in vivo*, obteniendo que presenta actividad biológica cardíaca produciendo un aumento en la cantidad de sangre bombeada, pero a través de un mecanismo que no afecta la fuerza contráctil ventricular.

9. Prospectivas

En el desarrollo de esta fase del proyecto se obtuvo un análogo estructural del fármaco Levosimendán, mostrando que la variación del anillo por una 3,4-dihidro-1*H*-pirimidinona representa una estrategia potencial para obtener moléculas que generen un efecto positivo en las características cardiovasculares. Esto con la finalidad de que en una siguiente fase se obtengan más compuestos análogos realizando variaciones en los sustituyentes del núcleo de pirimidina, preservando el elemento farmacofórico identificado, para aumentar su actividad como agentes inotrópicos positivos.

En este sentido, en una fase posterior a través de la evaluación biológica de los demás análogos por obtener se podrá proponer una estructura líder para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda.