



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

---

---

***SÍNTESIS QUÍMICO-ENZIMÁTICA DE NUEVOS  
ANÁLOGOS DE RANOLAZINA Y METOPROLOL  
CON POTENCIAL ACTIVIDAD  
CARDIOVASCULAR***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
P R E S E N T A

**IVAN MONSALVO MONTIEL**

DIRECTOR: M. en C. MARIA PATRICIA SHIRLEY DEMARE NEGRETE  
ASESOR: DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS



**MÉXICO D.F.**

**DICIEMBRE 2012**



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.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Síntesis de Fármacos, L-9 Planta Alta de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza-UNAM, bajo la supervisión y dirección de la M. en C. María Patricia Shirley Demare Negrete y el Dr. José Ignacio Regla Contreras.

Hasta el momento, de este trabajo se han derivado dos participaciones en congresos nacionales y una publicación:

Participación en el LIV congreso nacional de Ciencias Fisiológicas 2011 con el trabajo **“Efecto de dos nuevos derivados diazabicíclicos de la ranolazina sobre las respuestas vasomotoras de anillos de aorta de ratas”**.

Participación en el VII congreso de Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM 2011 con el trabajo **“Síntesis y evaluación farmacológica de un nuevo híbrido diazabicíclico de ranolazina y metoprolol”**.

Paredes-Carbajal Cristina, **Monsalvo Ivan**, Hernández-Díaz Carlos, Regla Ignacio, Demare Patricia, Mascher Dieter. Effects of Ranolazine on Vasomotor Responses of Rat Aortic Rings. *Archives of Medical Research*, **2012**. Article in press, (ARCMED-D-12-00385). (**Anexo 11.8**).

### DEDICATORIAS

A mis Madres Paula Montiel Islas y Pascuala Montiel Islas, quienes son la bendición más grande que Dios me ha dado, y su gran amor ha sido la luz en un camino lleno de oscuridad y la energía necesaria para culminar todo en mi vida.

A mi hermano Manuel Monsalvo Montiel, quien con su apoyo y amor me ofreció al padre que siempre necesite.

A mi cuñada Ana María Ayala Salmerón, quien me brindo apoyo y amor durante todo este tiempo, y quien se ha ganado un lugar importante en vida.

A mis hermanos Laura Mera Montiel, David Villegas Montiel, Luz Villegas Montiel y Martin Aguilar Montiel, quienes siempre estuvieron ahí cuando los necesite y que sus palabras de apoyo me impulsaron a ser lo que hoy he logrado.

A mis primos Beatriz García Montiel, Héctor García Montiel y Rosio García Montiel, de quienes siempre tuve palabras de apoyo para salir adelante.

A todos mis sobrinos: Manuel-Fernando Monsalvo, Israel Monsalvo, Abigail Alonso, Paola Alonso, Oscar Alonso, Paulina Aguilar, Samuel Aguilar, Sebastián Aguilar, Eduardo López, Alan López, Héctor García, Daniela García, Danae Villegas, David-Ian Villegas y Ximena León, por la felicidad y esperanza que me produce saber que veré nuevas generaciones salir adelante.

A mis abuelos José Montiel<sup>†</sup> y Manuela Islas<sup>†</sup>, y a mi tío Luis Montiel<sup>†</sup>, porque sé que donde quiera que estén siempre estuvieron orgullosos de mi y siempre su amor me dio fuerzas para terminar las cosas que parecían imposibles. A Francisco Aguilar<sup>†</sup>, porque sus palabras me dieron lucidez en momentos oscuros, donde quiera que estés gracias.

## AGRADECIMIENTOS



Este trabajo contó con el financiamiento del proyecto ciencia básica CONACYT “Síntesis de nuevos derivados de (1S,4S) y (1R,4R)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano con potencial aplicación en química medicinal y catálisis asimétrica” con clave 101855.

Facultad de Medicina



Al grupo de investigación de fisiología cardiovascular de la Facultad de Medicina, UNAM: Dr. Dieter Mascher, Dr. Cristina Paredes y M.C. Carlos Hernández, por los estudios farmacológicos realizados a los compuestos descritos en el presente trabajo.



Al equipo de espectroscopia del Instituto de Química de la UNAM: Q. Ma de los Ángeles Peña y Dr. Rubén Gaviño, por la realización de los espectros de RMN. QFB Rocío Patiño y Dr. Javier Pérez, por la realización de las espectrometrías de masas y rotaciones ópticas.



A la empresa Novozymes-México por su generosa donación de la lipasa B de *C. antártica* (Novozym 435<sup>®</sup>).

A mis padres en la ciencia, Patricia Demare e Ignacio Regla, por los consejos, el apoyo y la sabiduría brindada durante todo este proceso, porque hay tanto que decir y no tengo palabras para describir lo que siento hacia ustedes, por todo gracias.

A mis amigos y hermanos, Tania Ruiz de Chávez, Ricardo Magaña, Luis Martínez y David Romero, por la amistad brindada durante toda mi estancia en la facultad y por esos momentos en donde sentía que las cosas no saldrían y estaban ahí para apoyarme.

A mis amigos y hermanos, Manuel López, Araceli Guevara, Axel Jardón y Ana Rosado, por todos los momentos vividos desde que llegue al L-9 y más aun por aquellas cosas que hacen a nuestra amistad tan grande, gracias por ser mi nueva familia.

A mis grandes amigos y confidentes, César Jiménez-Pierre, Arlette Reyes y Fernando Vázquez, por aquellos momentos tan felices que he pasado a su lado y sobre todo por las palabras de apoyo que tanto me has servido.

A mis amigos y colegas, Tania Ramírez, Adrián Neri, Vidal Ramos y Gabriel Cabrera, por todo el apoyo brindado durante este proyecto y mas aun por los grandes momentos que he pasado a su lado.

A mi queridísimo amigo Anwar Briseño Bonilla, porque siempre me has apoyado en todo y aunque el tiempo de conocernos es corto, te has convertido en alguien tan importante que no quisiera perder nunca.

Por ultimo, quiero agradecer a Dios y a la Vida, por darme la oportunidad de haber hecho tanto durante toda mi existencia en este mundo y por permitirme conocer a personas tan valiosas como las que nombre.

*“¡Triste época la nuestra!*

*Es más fácil desintegrar un átomo que un prejuicio”*

**Albert Einstein**

## ÍNDICE

	Página
1. Introducción	9
2. Fundamentación teórica	13
2.1 Cardiopatía isquémica	14
2.1.1 Clasificación	14
2.1.2 Incidencia	15
2.1.3 Tratamiento	15
2.1.4 Ranolazina	16
2.1.4.1 Propiedades químicas y físicas	16
2.1.4.2 Método de síntesis	17
2.1.4.3 Mecanismo de acción	18
2.2 Hipertensión arterial	19
2.2.1 Clasificación	19
2.2.2 Incidencia	20
2.2.3 Tratamiento	20
2.2.4 Metoprolol	21
2.2.4.1 Propiedades químicas y físicas	21
2.2.4.2 Métodos de síntesis	22
2.2.4.3 Mecanismo de acción	22
2.3 Enzimas	24
2.3.1 Aplicación en síntesis orgánica	25
2.3.2 Lipasa	26
2.4 Sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano	29
3. Planteamiento del problema	32
4. Objetivos	34
4.1 Objetivo general	35
4.2 Objetivos particulares	35
5. Hipótesis	37

6. Material y métodos	39
6.1 Métodos y técnicas generales	40
6.2 Materiales	41
6.2.1 Reactivos y materias primas	41
6.2.2 Disolventes grado técnico	42
6.2.3 Cristalería	42
6.2.4 Material y equipos	43
7. Parte experimental	44
7.1 Síntesis de ranolazina	45
7.2 Síntesis de [(S,S,S)(S,S,R)]-10	48
7.3 Síntesis de (S,S,S)-10	50
7.4 Síntesis de [(S,S,S)(S,S,R)]-13	52
7.5 Síntesis de (R)-12	54
8. Resultados y discusión	56
8.1 Tabla de resultados	57
8.2 Ranolazina	58
8.3 [(S,S,S)(S,S,R)]-10 y [(S,S,S)(S,S,R)]-13	61
8.4 (R)-12	65
8.5 Evaluación farmacológica de [(S,S,S)(S,S,R)]-10 y [(S,S,S)(S,S,R)]-13	67
8.6 (S,S,S)-10	70
8.7 Evaluación farmacológica de (S,S,S)-10	72
9. Conclusiones	75
10. Anexos	77
10.1 N-(2,6-dimeilfenil)-2-bromoacetamida	78
10.2 <i>rac</i> -7	80
10.3 (S,S)-8	84
10.4 (S,S)-9	88
10.5 [(S,S,S)(S,S,R)]-10	92
10.6 [(S,S,S)(S,S,R)]-13	95

10.7 (S,S,S)-10	97
10.8 Artículo aceptado	100
11. Bibliografía	105

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las primeras causas de muerte a nivel mundial y se pronostica que lo seguirán siendo, debido al crecimiento de éstas en países que se encuentran en vías de desarrollo y al incremento en la proporción de personas de edad avanzada en el mundo. Este grupo de padecimientos se clasifican en cuatro tipos generales:<sup>1</sup>

1. Enfermedades vascular-periféricas.
2. Isquémicas.
3. Cerebro-vasculares.
4. Otros.

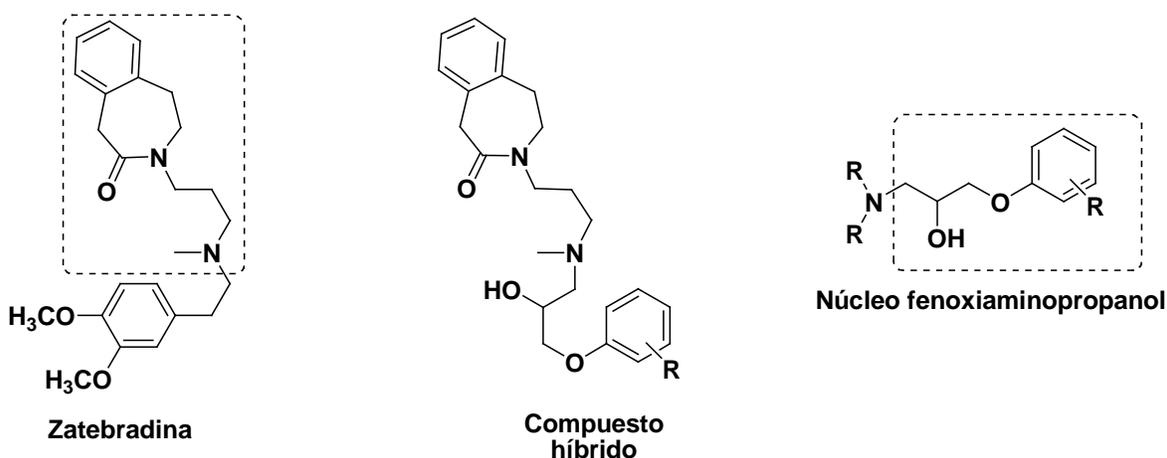
Uno de los más frecuentes padecimientos de tipo vascular-periférico es la hipertensión arterial (HA), la cual está definida como una alteración de la presión sanguínea normal, que ocurre cuando las arteriolas se estrechan, lo que hace que la sangre ejerza una presión excesiva sobre las paredes de los vasos;<sup>2</sup> una alternativa para el tratamiento de dicho padecimiento es el metoprolol (figura 2a), un compuesto antagonista selectivo de los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos.<sup>3</sup> La degradación del sistema cardiovascular causada por HA es una de las causas principales de cardiopatías isquémicas (CI's), las cuales, junto con las enfermedades cerebro-vasculares, inducen alrededor del 60% de las muertes causadas por padecimientos cardiovasculares.<sup>1</sup>

En el grupo de las CI's se encuentra la angina de pecho, la cual es un desorden en el aprovechamiento de oxígeno y nutrientes en el tejido cardíaco.<sup>4</sup> En junio de 2006 la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó el uso de ranolazina (figura 2a) en el tratamiento de esta enfermedad, siendo el primer fármaco autorizado en más de 20 años en los Estados Unidos para este padecimiento.<sup>5</sup> El mecanismo de acción de ranolazina no está totalmente dilucidado, pero se ha demostrado que inhibe el flujo tardío de  $\text{Na}^+$  en las células del tejido cardíaco, provocando un incremento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de las bombas de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .<sup>6</sup>

En la búsqueda de mejorar la calidad de vida para los pacientes con enfermedades cardiovasculares, el desarrollo de tratamientos farmacológicos más eficaces adquiere un

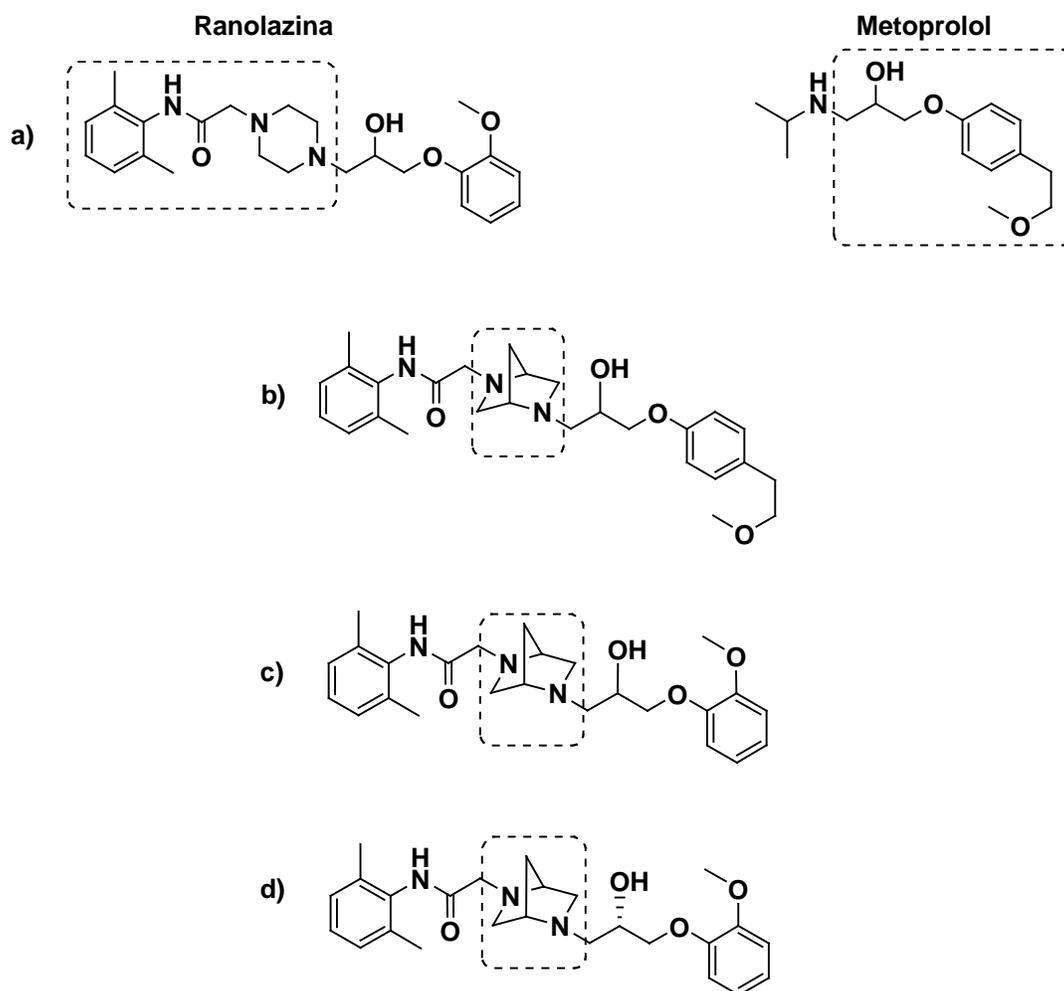
papel de gran importancia, debido a la necesidad de nuevos y más activos medicamentos cardiovasculares, con menos efectos secundarios.

El diseño de compuestos con actividad biológica puede realizarse empleando diversas estrategias, entre las cuales se encuentra la modificación estructural de fármacos y el análisis computacional para generar nuevos compuestos. Otra manera de crear nuevas moléculas con actividad farmacológica es por medio de la hibridación de dos o más fármacos; un ejemplo de ello es la síntesis de benzazepinonas como agentes bradicárdicos híbridos de zatebradina y el núcleo fenoxiaminopropanol de compuestos antagonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (figura 1).<sup>7</sup>



**Figura 1.** Estructura de Zatebradina, del núcleo fenoxiaminopropanol de compuestos antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y del compuesto híbrido.

El presente trabajo describe la síntesis de un nuevo compuesto diazabicclico análogo a ranolazina que sustituye el fragmento de piperazina, presente en este fármaco, por el sistema (1*S*,4*S*)-2-bencil-2,5-diazabicclico[2.2.1]heptano (figura 2c); la síntesis química del epímero (*S,S,S*) del análogo diazabicclico (figura 2d); la síntesis de la mezcla epimérica de un híbrido de ranolazina-metoprolol que integra el sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicclico[2.2.1]heptano (figura 2b) y la resolución químico-enzimática del oxirano precursor de este híbrido.



**Figura 2.** a) Estructuras de ranolazina y metoprolol; b) híbrido diazabicclico; c) análogo diazabicclico de ranolazina; d) epímero (*S,S,S*) del análogo diazabicclico.

## 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

## 2.1 Cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica es una condición que consiste en un desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno y nutrientes en los tejidos del corazón. Las causas son diversas, pero entre las principales se encuentra la obstrucción temporal de las arterias coronarias (ateroesclerosis). Un cambio en la dieta, aunado a un tratamiento farmacológico eficiente, disminuye el déficit de oxígeno suministrado al corazón, lo cual reduce el riesgo de presentar episodios isquémicos y conlleva a una mejora en la calidad de vida del paciente; sin embargo, existe un número creciente de pacientes que presentan tolerancia a los tratamientos farmacológicos disponibles para este tipo de síndrome.<sup>4,6</sup>

### 2.1.1 Clasificación

Existen tres tipos de cardiopatías isquémicas: Angina de pecho crónica estable, angina inestable e isquemia coronaria silenciosa.

- Angina de pecho crónica estable

Se manifiesta como un malestar doloroso localizado en el pecho o en sus áreas adyacentes debido a la baja en el suministro de oxígeno, pero sin generar necrosis en el tejido del miocardio; este padecimiento es acompañado por síntomas como mareos, debilidad y angustia. El malestar dura entre 5 y 20 minutos y puede ser provocado por esfuerzos, respiración profunda, movimiento del torso o del brazo izquierdo y desaparece con reposo.

- Angina inestable

Consiste en la presencia de dolor en el área donde se localiza el corazón; el dolor no está relacionado con el ejercicio y puede haber o no antecedentes de infarto. Aunque el dolor es semejante al de la angina de pecho crónica estable, la angina inestable se caracteriza por una mayor intensidad y duración; el tratamiento con reposo sólo produce mejoría temporal e incompleta, lo cual requiere de un tratamiento farmacológico específico para eliminar los síntomas.

- Isquemia coronaria silenciosa

Existen dos tipos de isquemia coronaria silenciosa: la denominada tipo 1, la cual se presenta en pacientes con daño grave en las arterias coronarias, y la tipo 2, la cual se presenta en pacientes con angina crónica, inestable o variable. Ambos tipos presentan episodios de isquemia indolora.<sup>4, 8</sup>

### **2.1.2 Incidencia**

La cardiopatía isquémica es actualmente la primera causa de muerte en los países desarrollados, en los cuales murieron 6.3 millones de personas por este padecimiento durante 1990, y se prevé que para 2020 se tengan similares índices de incidencia en muchos países en vías de desarrollo.<sup>9</sup>

En México es la primera causa de morbilidad y una de las primeras de mortalidad, debido al estilo de vida de sus habitantes y, según reportes recientes, su incidencia podría aumentar en los siguientes años, ya que enfermedades que son cada vez más frecuentes en México, como obesidad, diabetes mellitus e hipertensión, son factores determinantes para el desarrollo de la cardiopatía isquémica.<sup>10</sup> El 70% de los pacientes que presentan angina son varones y se encuentran entre los 50 y 70 años; cuando se presenta en mujeres, los factores de riesgo, entre los cuales está el tabaquismo, diabetes mellitus, obesidad o estrés, son más significativos.<sup>4</sup>

### **2.1.3 Tratamiento**

El tratamiento depende del tipo de cardiopatía isquémica y de la combinación con otros padecimientos que presente el paciente, el cual debe ser valorado individualmente con respecto a cuatro áreas:

1. Corrección de los factores de riesgo coronario

Valoración y tratamiento de los padecimientos vinculados a la cardiopatía isquémica.

2. Medidas generales y corrección del estilo de vida

Se refiere a la mejora en el tipo de alimentación y la implementación de medidas que mejoren el funcionamiento del sistema cardiovascular (disminuir el estrés, realizar ejercicio, etc.).

3. Angioplastia coronaria o cirugía de puente coronario

Procedimientos quirúrgicos correctivos.

4. Medicación farmacológica

Los tratamientos más comunes implican la administración de nitratos, los cuales inducen la relajación del músculo cardíaco, lo que provoca vasodilatación de las arterias coronarias y de la red venosa.<sup>4</sup>

#### 2.1.4 Ranolazina

La ranolazina es un fármaco actualmente empleado en el tratamiento de las CI's, el cual fue aceptado por la FDA en los EU en junio de 2006 para el tratamiento de angina de pecho crónica, debido a los resultados obtenidos en ensayos clínicos, los cuales mostraron que este compuesto presenta una mayor actividad anti-anginosa y anti-isquémica que los fármacos hasta entonces utilizados.<sup>5</sup> Actualmente se administra como diclorhidrato en forma racémica por vía oral, en dosis que van de 90 a 120 mg por día y por vía intravenosa, 50 a 250 µg por dosis.<sup>6</sup>

##### 2.1.4.1 Propiedades

El diclorhidrato de ranolazina [95635-56-6], [*N*-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propil]-1-piperazinileacetamida\*2HCl] (figura 3), es un producto cristalino blanco soluble en agua, con punto de fusión de 164-166 °C.<sup>11</sup>

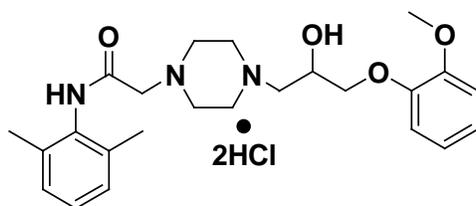
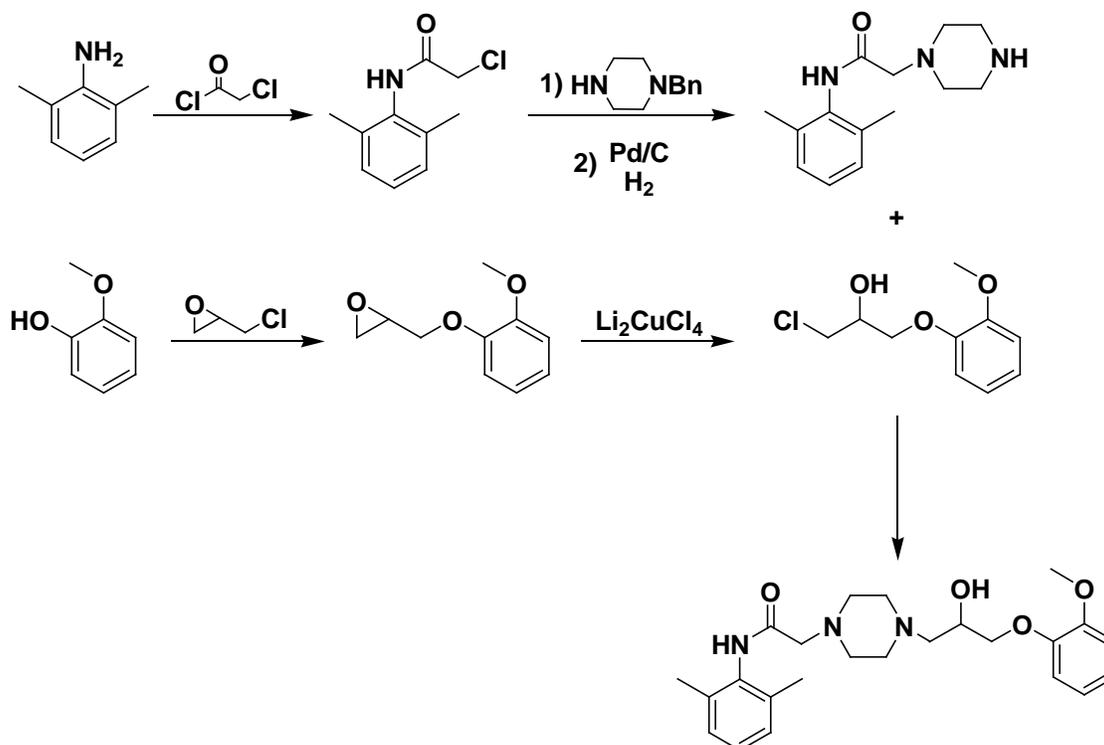


Figura 3. Estructura de ranolazina.

#### 2.1.4.2 Método de síntesis

La revisión de rutas sintéticas de ranolazina, realizada mediante SciFinder, arroja un resultado de más de 30 fuentes primarias, la mayoría de ellas patentes con no más de diez años de antigüedad; pocos son reportes de revistas indexadas, los cuales en su mayoría describen la obtención de los enantiómeros mediante resoluciones enzimáticas. Entre estas publicaciones se encuentra un método sencillo de preparación del racemato y los enantiómeros de ranolazina reportado por Riise Moen y col.,<sup>12</sup> en el cual emplean como materia prima a la 2,6-dimetilanilina, que mediante una serie de reacciones genera el racemato de Ranolacina con buen rendimiento global (esquema 1).



Esquema 1. Síntesis convencional del racemato de ranolazina.<sup>12</sup>

#### **2.1.4.3 Mecanismo de acción**

Aunque el mecanismo de acción de la ranolazina no está totalmente dilucidado, se ha encontrado que inhibe la corriente tardía de sodio en las células del músculo cardíaco, provocando un incremento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de las bombas de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , lo cual tendría como consecuencia una inestabilidad eléctrica y disfunción mecánica del músculo cardíaco, provocando disminución en la contracción y aumento en la presión diastólica.<sup>6</sup>

La ranolazina también podría tener otro mecanismo de acción: los estudios han sugerido que puede inhibir parcialmente la oxidación de ácidos grasos, lo cual provocaría un cambio en el metabolismo, dirigiéndolo hacia el aprovechamiento de glucosa durante la isquemia, aunque no se sabe qué tanta influencia tendría este efecto a favor de la actividad anti-anginosa de dicho fármaco.<sup>6</sup>

## 2.2 Hipertensión arterial (HA)

La presión arterial es la presión que ejerce la sangre contra la pared de las arterias; es imprescindible para que circule la sangre por los vasos sanguíneos y aporte el oxígeno y los nutrientes a todos los órganos del cuerpo. La presión arterial se mide normalmente en milímetros de mercurio. En adultos jóvenes y sanos es de aproximadamente de 120 mmHg durante la sístole (contracción del corazón) y desciende a 80 mmHg con la diástole (relajación del corazón).

La HA es una alteración de la presión sanguínea normal, que ocurre cuando los vasos sanguíneos pequeños (arteriolas) se estrechan (ateroesclerosis, descarga de adrenalina, etc.), lo que hace que la sangre ejerza una presión excesiva sobre las paredes de los vasos.<sup>2</sup>

### 2.2.1 Clasificación

La HA se puede clasificar<sup>13</sup> de acuerdo a los valores de presión arterial en:

- Normal: sistólica < 120 y diastólica < 80.
- Prehipertensión: sistólica 120-139 y diastólica 80-89.
- Hipertensión fase 1: sistólica 140-159 y diastólica 90-99.
- Hipertensión fase 2: sistólica > 160 y diastólica > 100.

Según su etiología, la hipertensión se categoriza como:

- Primaria o esencial

Es un aumento sostenido de la presión sanguínea que no tiene ninguna causa aparente. Representa el 90 – 95 % de los casos y suele presentarse en la edad adulta, típicamente en edades superiores a 40 años. Hay varios factores de riesgo asociados, como son: predisposición genética, obesidad, altos niveles de colesterol, alta ingesta de sal (NaCl), gran consumo de alcohol e inactividad física.

- Secundaria

La hipertensión secundaria, en la cual existe una alteración orgánica o fisiológica específica y potencialmente susceptible de ser corregida (renopatía, diabetes, etc.), representa el 5% de todos los casos.<sup>14</sup>

### **2.2.2 Incidencia**

En la actualidad, la hipertensión arterial afecta a más de 8 millones de personas en México y es una de las principales causas de mortalidad en nuestro país. La prevalencia de la HA va en aumento (en el año 2000, tres de cada diez personas de entre 20 a 60 años); en consecuencia, es la enfermedad cardiovascular más frecuente, siendo un factor de riesgo para estados agudos de enfermedad arterial coronaria y accidentes cerebro-vasculares. Así, las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar de morbimortalidad en el país; además, en aproximadamente 90 % de los casos se desconocen las causas, aunque se han descrito varios factores de riesgo, como la obesidad y la diabetes mellitus entre otros.<sup>15</sup>

### **2.2.3 Tratamientos**

El tratamiento depende en gran parte del tipo de hipertensión, además de otras afecciones que presente el paciente. Hay tres tipos principales de tratamiento:

- Diuréticos

Los diuréticos son fármacos cuyo efecto sobre el organismo (concretamente sobre el riñón) es aumentar la excreción de orina. Esto lo consiguen en general aumentando la eliminación renal de cloruro sódico, al que sigue pasivamente, por un mecanismo osmótico, el agua. Como resultado de la pérdida renal de sal y agua, se produce un aumento de volumen de orina, con la consiguiente pérdida de volumen sanguíneo y disminución de la presión arterial. Generalmente, el primer medicamento de elección en la hipertensión arterial es un diurético. Algunos ejemplos de fármacos diuréticos son: acetazolamida, eplerenona y manitol.<sup>4,8</sup>

- Antagonistas de calcio

Los antagonistas del calcio son un grupo muy heterogéneo de fármacos que inhiben selectivamente el flujo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales celulares dependientes de voltaje. El descenso de la concentración de calcio libre citosólico en las células musculares lisas arteriolares ocasiona la disminución del tono contráctil, de la resistencia vascular y por tanto, de las cifras de presión arterial. Algunos fármacos antagonistas de calcio usados en la actualidad son: nitrendipino, amlodipino, diltiazem y verapamilo.<sup>16</sup>

- Beta-bloqueadores

Los bloqueadores de los receptores  $\beta$  adrenérgicos son fármacos con gran especificidad y afinidad por ellos. Estos receptores se agrupan en tres categorías ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) y el tipo de bloqueo que presentan es competitivo, debido a que se revierte al aumentar la concentración del agonista. Algunos ejemplos son: propanolol, oxoprenolol, alprenolol, practolol, metoprolol, timolol y atenolol.<sup>17</sup>

## 2.2.4 Metoprolol

El metoprolol pertenece al grupo de medicamentos llamados bloqueadores beta y es un fármaco actualmente ocupado en el tratamiento de la HA, esto debido a que es un inhibidor selectivo de los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos. Este compuesto es utilizado en forma racémica como tartrato o succinato de metoprolol.<sup>3</sup>

### 2.2.4.1 Propiedades químicas y físicas

El metoprolol [37350-58-6], [1-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-3-[(1-metiletil)amino]-2-propanol] (figura 4), es un antagonista selectivo de los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos, utilizado en el tratamiento de la hipertensión arterial y angina de pecho. Es empleado como mezcla racémica, aunque el enantiómero activo es el (*S*), siendo 270 veces más potente que el enantiómero (*R*), el cual es causante de efectos secundarios, como vértigo y alucinaciones.<sup>11</sup>

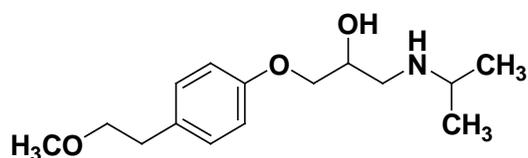
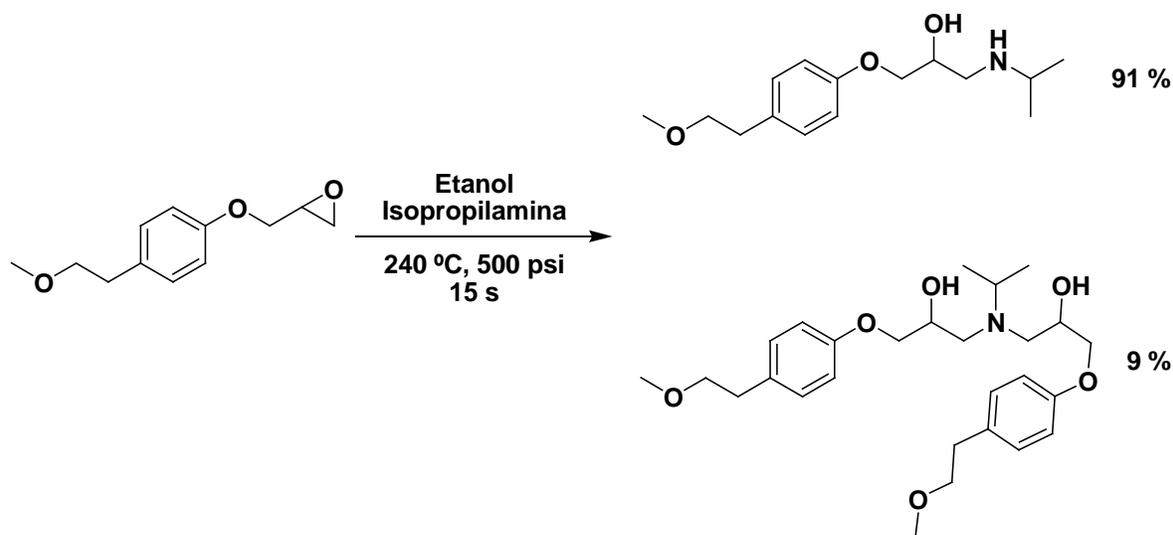


Figura 4. Estructura de metoprolol.

#### 2.2.4.2 Métodos de síntesis

La mayoría de las metodologías descritas en la literatura parten del 4-(2-metoxietil)fenol y epiclorhidrina para generar 2-(4-(2-metoxietil)fenoxi)metiloxirano, el cual es sometido a reacción con isopropilamina para formar metoprolol. La tecnología más recientemente reportada para la obtención de este compuesto, describe la reacción entre 2-(4-(2-metoxietil)fenoxi)metiloxirano e isopropilamina en etanol a 240° C/500 psi por 15 segundos, con rendimiento de 91 % (esquema 2).<sup>18</sup>

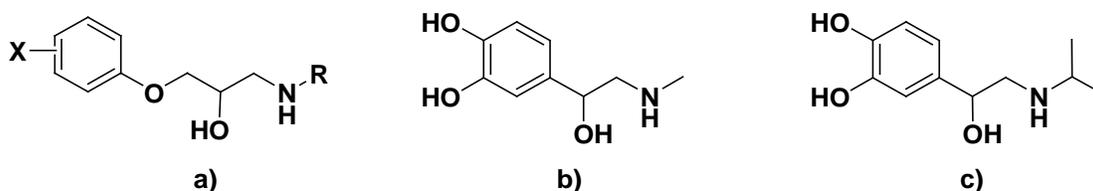


Esquema 2. Síntesis de metoprolol.

#### 2.2.4.3 Mecanismo de acción

Las catecolaminas son una familia de moléculas que en su estructura integran un fragmento proveniente del catecol y un grupo amino; son compuestos que actúan sobre receptores  $\alpha$  o  $\beta$  adrenérgicos y que provocan, entre muchas otras cosas, contracción del musculo cardiaco. Los compuestos antagonistas de los receptores adrenérgicos tipo  $\beta$  son

fármacos que inhiben competitivamente los efectos de las catecolaminas, causando relajación del músculo liso y consecuentemente vasodilatación, bronco-dilatación y estimulación cardíaca. Son estructuralmente similares a las catecolaminas endógenas (adrenalina) y al isoproterenol, los cuales presentan un anillo aromático con una cadena de amino-alcohol (en específico una cadena de *N*-alquiletanolamina) (figura 5).<sup>19</sup>

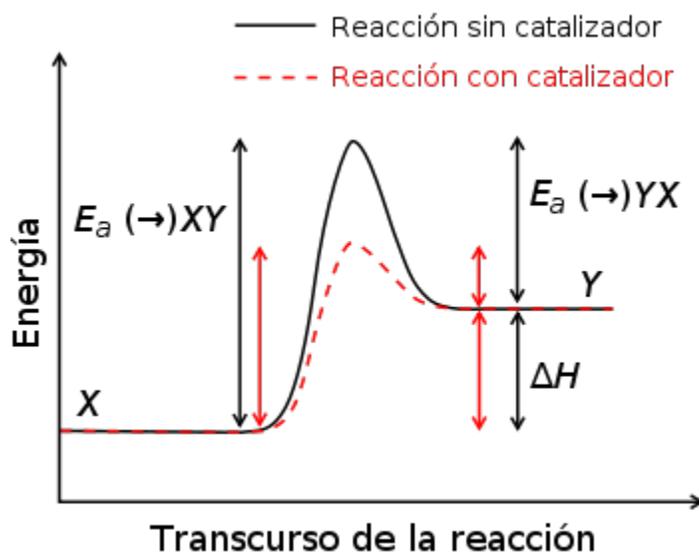


**Figura 5.** a) Estructura base de  $\beta$ -bloqueadores; b) adrenalina y c) isoproterenol.

El hidroxilo en la cadena alifática central influye en la afinidad por los receptores  $\beta$ , mientras que los sustituyentes en el anillo aromático son asociados a diferencias en los efectos farmacológicos provocados.<sup>20,21</sup> El metoprolol actúa sobre los receptores  $\beta_1$ , localizados principalmente en el corazón. Al disminuir o inhibir el efecto estimulante de las catecolaminas en el corazón, da como resultado una reducción de la frecuencia y de la contractilidad cardíaca.<sup>22</sup>

### 2.3 Enzimas

Las enzimas son compuestos proteicos que pertenecen a un grupo muy amplio de catalizadores naturales, producidos por células para promover reacciones químicas propias de los seres vivos. Un catalizador es una sustancia que altera la energía de activación de una reacción, modificando su velocidad y/o selectividad, y regenerándose al final de ésta. La energía de activación es la cantidad de energía necesaria para inducir en las moléculas un estado reactivo, y así sobrepasar la barrera energética que impide que las reacciones se den de manera espontánea (figura 6).



**Figura 6.** Diagrama que muestra la barrera energética seguida en una reacción sin catalizador y con un catalizador que disminuye la energía de activación.

Las enzimas son específicas para cierto tipo de sustratos, lo cual está íntimamente relacionado con su estructura tridimensional.

Para que una enzima catalice una reacción, el sustrato debe unirse al sitio activo; a esta unión se le llama complejo enzima-sustrato y el resultado es la disminución de la energía de activación, lo que lleva a la formación del producto y la regeneración de la enzima (figura 7).

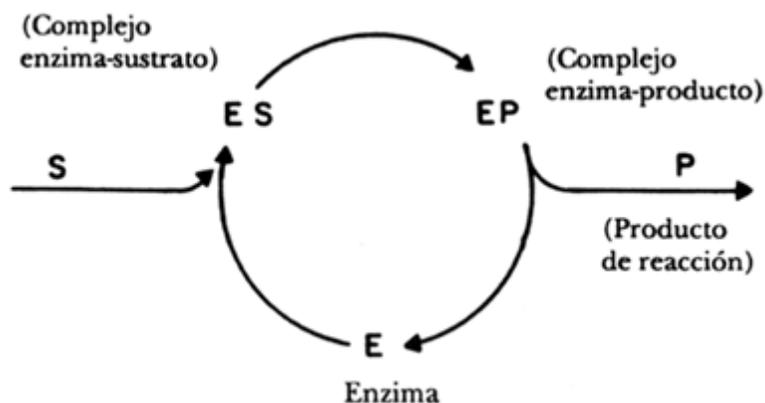


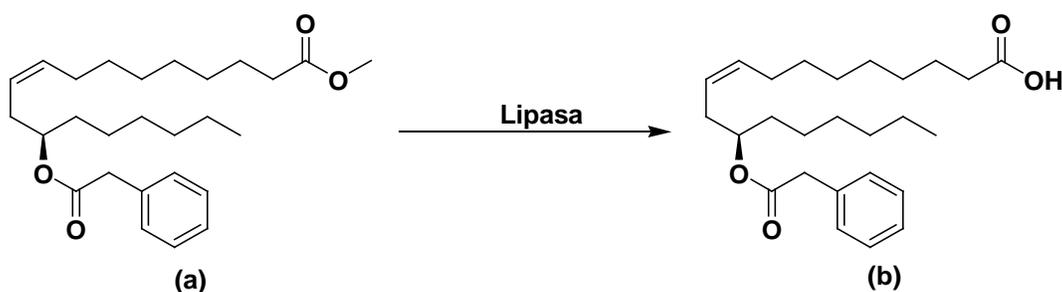
Figura 7. Diagrama de acción catalítica de una enzima.

### 2.3.1 Aplicación en síntesis orgánica

El estudio de las enzimas es de suma importancia para la comunidad científica y la sociedad en general, ya que son usadas en muchos procesos industriales, como en la fabricación de bebidas y alimentos. En épocas modernas, el papel de las enzimas en la preparación de productos de insumo y en la fabricación de productos químicos se ha ampliado enormemente. Hoy en día las aplicaciones de las enzimas son muy variadas, como es el caso de: síntesis estereoespecíficas, producción de detergentes, preparación de líquidos para limpieza de lentes de contacto, elaboración de lácteos, etc.<sup>23</sup>

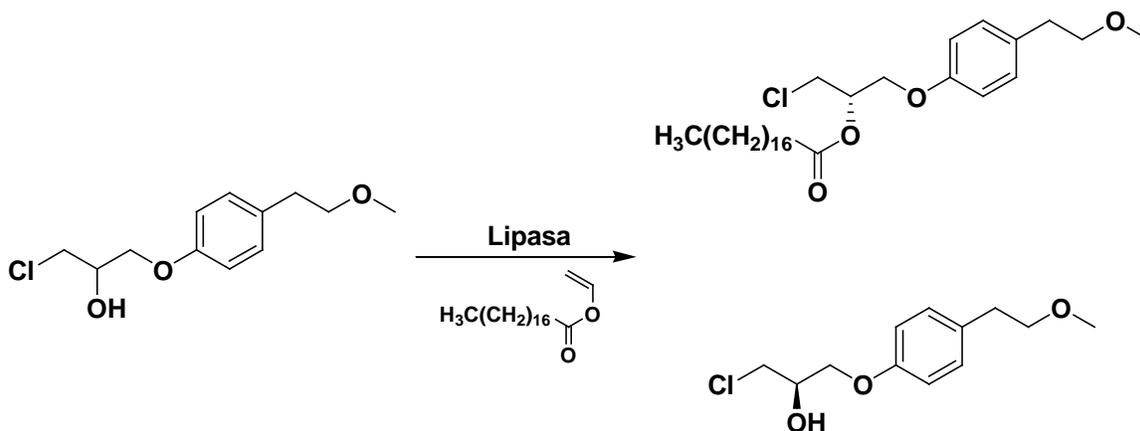
Entre las enzimas más ocupadas en síntesis orgánica y en procesos industriales se encuentran las hidrolasas.<sup>24</sup> Se estima que más del 70% de las enzimas empleadas en la industria pertenecen a este grupo. Las hidrolasas catalizan la hidrólisis selectiva de enlaces de tipo C-O, C-N e incluso de enlaces tipo P-O. Son enzimas comercialmente disponibles, que no requieren cofactor y que presentan una gran versatilidad catalítica, puesto que pueden adoptar diversas conformaciones, lo que les permite acomodar en su centro activo una amplia variedad de sustratos.<sup>25</sup> Dentro de este grupo de enzimas destacan las amidasas, esterasas, proteasas, nitrilasas y especialmente las lipasas, que catalizan la hidrólisis de amidas, ésteres, péptidos, nitrilos y triglicéridos, respectivamente. En la química orgánica, las enzimas tienen gran aplicación en reacciones estereoselectivas y enantioselectivas; ejemplo de ello es la síntesis del ácido 12-fenilacetilricinoleico

(esquema 3b) mediante una hidrólisis regioselectiva del 12-fenilacetilricinoleato de metilo (esquema 3a).<sup>26</sup>



Esquema 3. Síntesis de ácido 12-fenilacetilricinoleico.

Otro ejemplo es la resolución de alcoholes racémicos mediante la transesterificación de sustratos, como son el estearato de vinilo o el acetato de vinilo; un ejemplo es la resolución de la mezcla racémica de clorohidrina del epóxido precursor del metoprolol con lipasa (esquema 4).<sup>27</sup>



Esquema 4. Resolución enzimática de clorohidrinas de epóxido de metoprolol.

### 2.3.2 Lipasa B de *Candida antartica* (CaLB)

Una enzima altamente utilizada en la biocatálisis es la CaLB, debido al amplio grupo de reacciones que puede catalizar (figura 8); un ejemplo es la amidación regioselectiva de 12-fenilacetilricinoleato de metilo con vainillilamina recientemente reportada por Regla y colaboradores.<sup>28</sup>

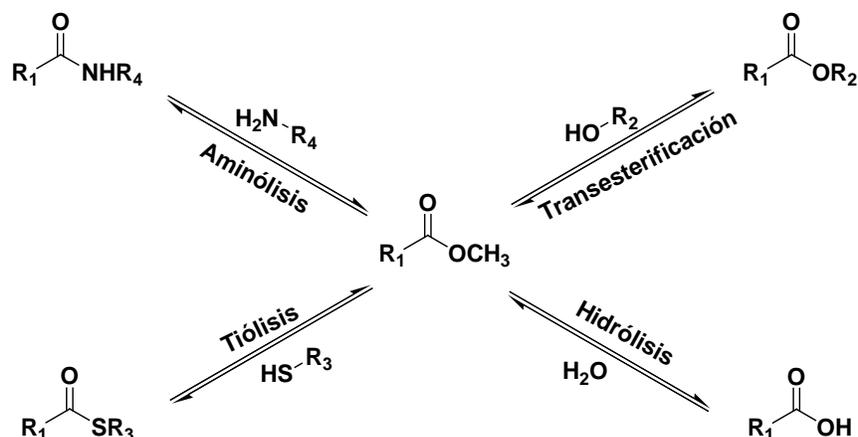


Figura 8. Tipo de reacciones catalizadas por CaLB.

La CaLB tiene un límite de eficiencia en temperatura de hasta 80 °C en su forma inmovilizada Novozym® 435, y puede ser empleada con disolventes orgánicos, gracias a su resistencia a la desnaturalización en ellos.<sup>29</sup> La preferencia enantiomérica de la CaLB hacia el enantiómero (*R*) en reacciones con alcoholes secundarios permite predecir la estereoquímica de los productos.<sup>30</sup> El mecanismo de acción de la CaLB se puede describir básicamente en tres etapas:<sup>31</sup>

1. El ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de una serina ubicada en el sitio activo de la enzima sobre el grupo carbonilo, para la formación del intermediario tetraédrico (figura 9).



Figura 9.<sup>31</sup>

2. Formación del complejo sustrato-enzima (figura 10).

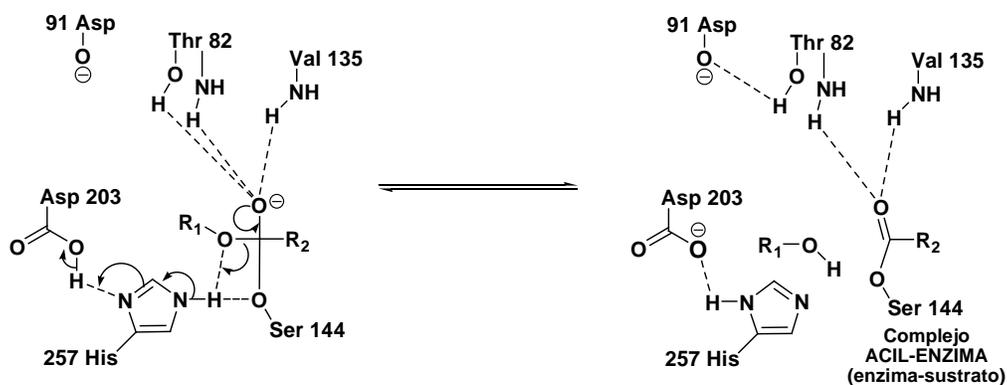


Figura 10<sup>31</sup>

3. El ataque nucleofílico sobre el complejo sustrato-enzima; formación del producto y regeneración del sitio activo (figura 11).

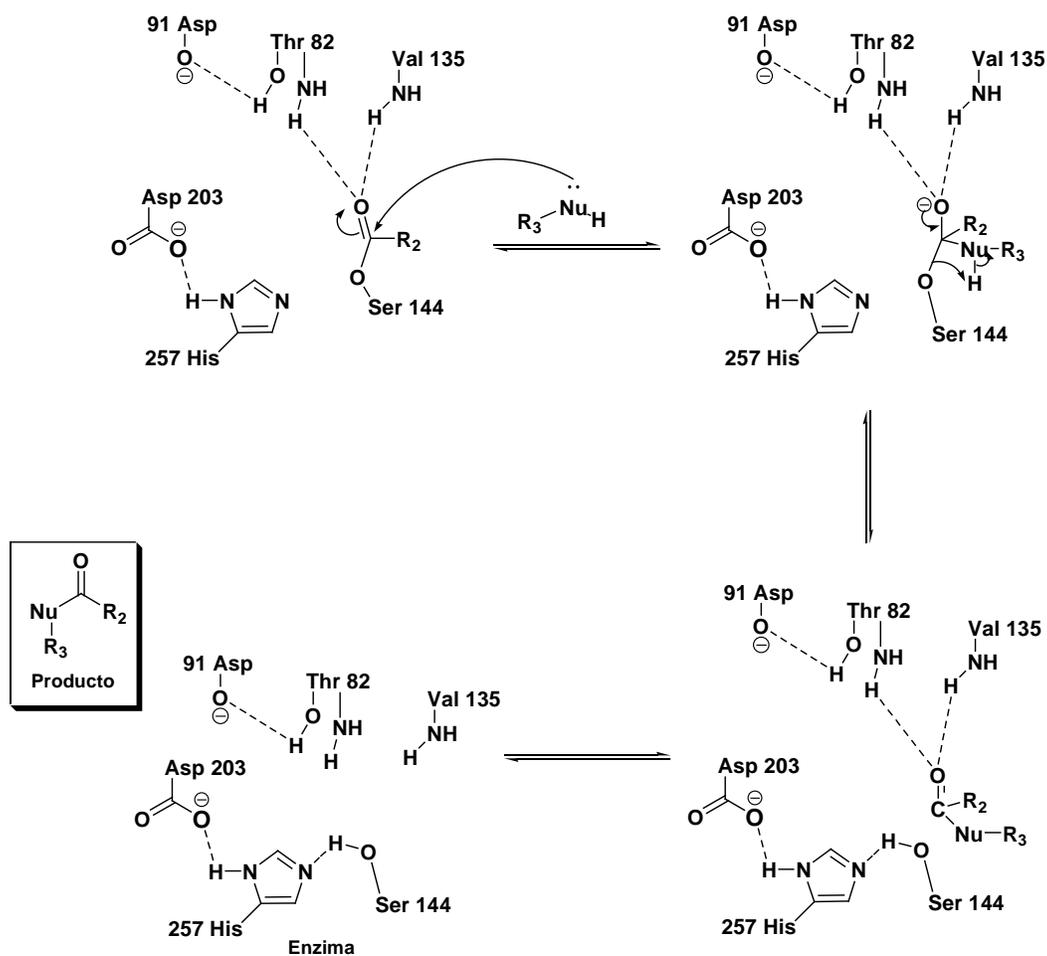


Figura 11<sup>31</sup>

## 2.4 Sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano

Dentro de la química orgánica, una de las áreas más estudiadas y desarrolladas ha sido la heterocíclica, debido a las propiedades estructurales y biológicas que induce la presencia de heteroátomos en moléculas cíclicas. El sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, descrito por primer vez en 1966,<sup>32</sup> es estructuralmente equivalente a una piperazina, pero con equilibrio conformacional restringido (figura 12).



Figura 12. (a) Piperazina; (b) 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.

El sistema diazabicyclico ha sido incorporado en algunas moléculas de carácter medicinal, como son ciertas quinolinas con actividad antibacteriana; tal es el caso de la danofloxacina, un análogo diazabicyclico de la ciprofloxacina (figura 13).<sup>33,34</sup>

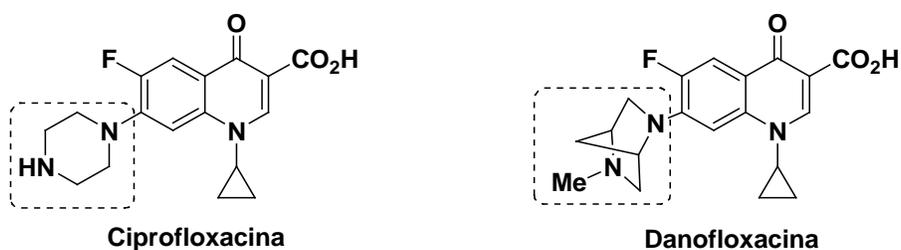


Figura 13. Estructuras químicas de la ciprofloxacina y danofloxacina, esta última sustituye el fragmento de la piperazina por el sistema diazabicyclico.

Otro compuesto que contiene el sistema diazabicyclico en su estructura es el análogo de la dietilcarbamazina, el cual presenta actividad antifilárica (figura 14).<sup>35</sup>

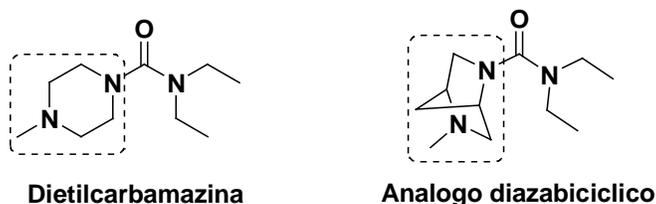
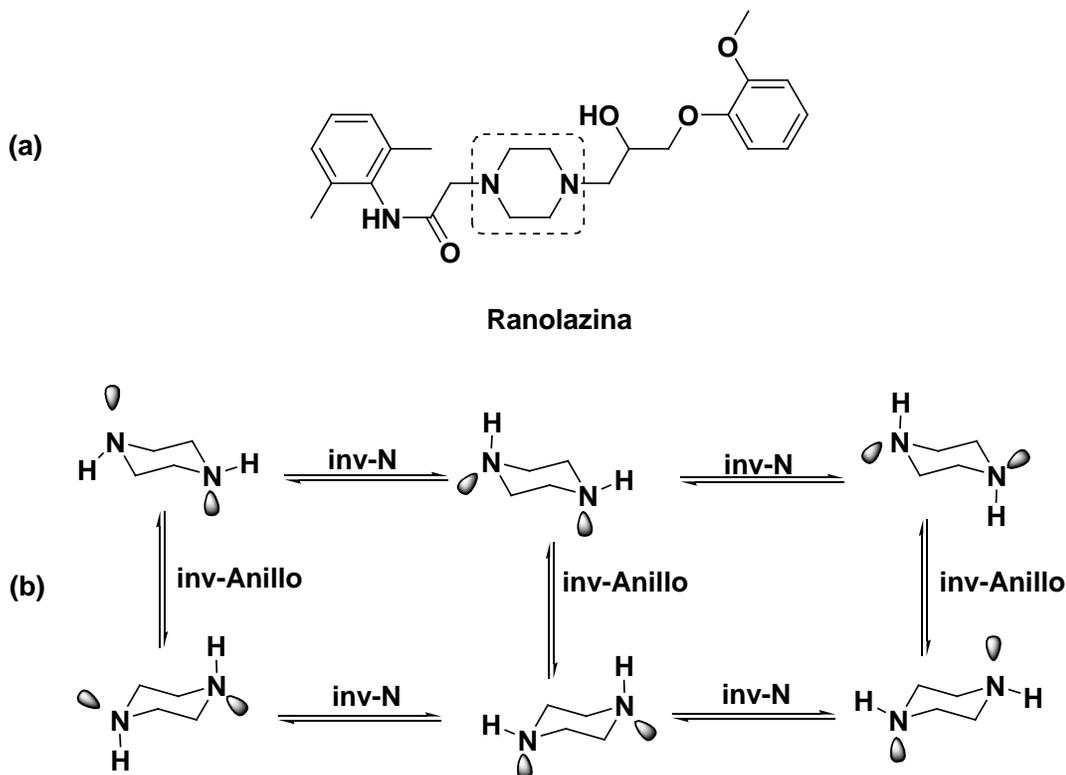


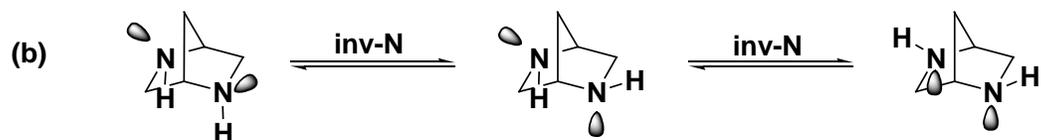
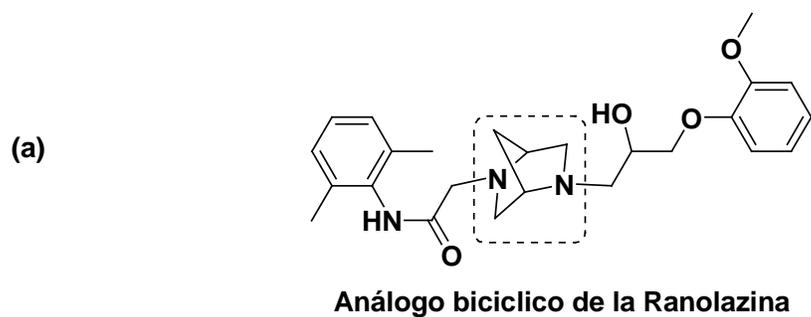
Figura 14. Estructuras de la dietilcarbamazina y su análogo diazabicyclico.

La ranolazina (figura 15a), cuenta con un anillo de piperazina, el cual sufre cambios de conformación como resultado de dos tipos distintos de procesos: la inversión piramidal de los sustituyentes del nitrógeno (*inv-N*) y la inversión del anillo (*inv-Anillo*) (figura 15b).<sup>36</sup>



**Figura 15.** (a) Estructura química de la ranolazina, compuesto utilizado en el tratamiento de angina de pecho, que incorpora un anillo de piperazina. (b) Equilibrio conformacional de la piperazina.

El sistema diazabíclico no sufre la inversión del anillo, debido al puente de metileno que le confiere rigidez, aunque sigue presentando la inversión piramidal del nitrógeno (figura 16b), además de integrar dos centros estereogénicos. En base a estas características, el diseño de compuestos que integren el sistema diazabíclico en sustitución del fragmento de la piperazina es la puerta a un campo amplio de investigación;<sup>37</sup> un ejemplo es el nuevo análogo diazabíclico de la ranolazina que se sintetizó como uno de los objetivos de este proyecto (figura 16a).



**Figura 16.** (a) Estructura química del análogo diazabicyclico de la ranolazina. (b) Equilibrio conformacional del sistema diazabicyclico.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En vista de lo descrito previamente, existe la necesidad de desarrollar fármacos antiisquémicos más activos y con menores efectos colaterales, por lo que se propuso la síntesis químico-enzimática de una serie de compuestos que incorporen fragmentos farmacóforos de la estructura de ranolazina y de metoprolol, y adicionalmente reemplacen el fragmento de piperazina por el sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (figura 17), esperando encontrar un tratamiento farmacológico adecuado que detenga el avance de la cardiopatía isquémica.

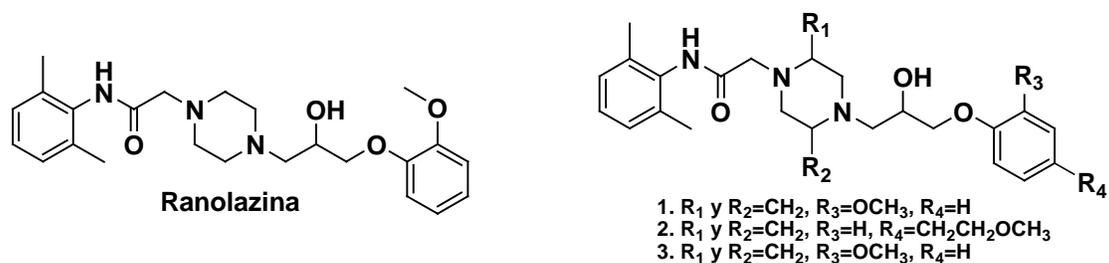


Figura 17. Ranolazina y análogos propuestos.

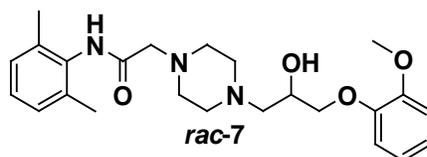
## 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

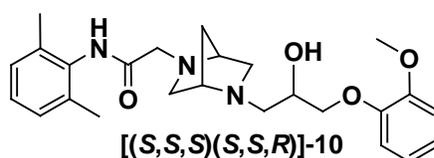
Sintetizar dos análogos diazabíclicos de ranolazina y un híbrido de ranolazina-metoprolol en los que se sustituya el fragmento de piperazina por el sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabíciclo[2.2.1]heptano.

#### 4.2 Objetivos particulares

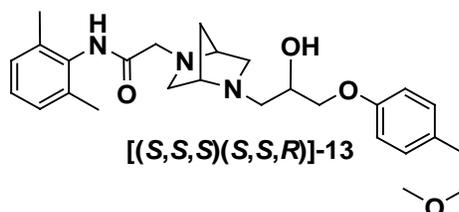
1. Sintetizar (±)-ranolazina (*rac-7*).



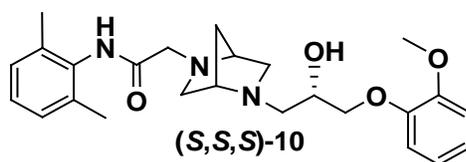
2. Sintetizar la mezcla epimérica de un análogo de ranolazina en el que se remplace el fragmento de piperazina por el sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabíciclo[2.2.1]heptano **[(*S,S,S*)(*S,S,R*)]-10**.



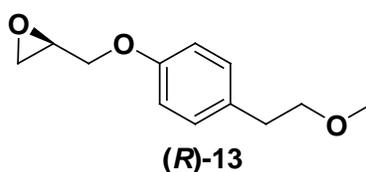
3. Sintetizar la mezcla epimérica del híbrido de ranolazina-metoprolol **[(*S,S,S*)(*S,S,R*)]-13**, en el cual se incorpora el sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabíciclo[2.2.1]heptano en sustitución del fragmento de piperazina.



4. Sintetizar el epímero análogo de ranolazina **(S,S,S)-10**, en el que se sustituye el fragmento de piperazina por el sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.



5. Realizar la síntesis químico-enzimática del epóxido quiral del 2-[[4-(2-metoetil)fenoxi]metil]oxirano **[(R)-13]**.



6. Remitir una muestra de 200 mg de cada uno de los compuestos **[(S,S,S)(S,S,R)]-10**, **[(S,S,S)(S,S,R)]-13** y **(S,S,S)-10** para su evaluación farmacológica preliminar como potenciales agentes antianginosos.

## 5. HIPÓTESIS

Es posible sintetizar los análogos diazabíclicos de ranolazina **[(S,S,S)(S,S,R)]-10**, **(S,S,S)-10** y el híbrido diazabíclico de ranolazina-metoprolol **[(S,S,S)(S,S,R)]-13**, con potencial actividad como agentes antihipertensivos y antiisquémicos, a partir de materias comercialmente disponibles y aplicando métodos químicos y enzimáticos de síntesis.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

## 6.1 Métodos y técnicas generales

Se empleó Lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) en su forma inmovilizada Novozym® 435 que fue un donativo de la empresa Novozymes® México. Los reactivos y materias primas fueron adquiridos de Aldrich®.

El curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina, empleando como fase estacionaria gel de sílice; los reveladores que se utilizaron son: radiación ultravioleta 254/366 nm y vapores de yodo. Para las columnas de cromatografía se empleó como fase estacionaria gel de sílice flash (malla 230 – 400).

La purificación de muestras para análisis de resonancia magnética nuclear (RMN), HPLC, rotación óptica y espectrometría de masas se realizaron en un equipo HPLC-preparativo **Büchi** mod. **C-615** con detector UV mod. **Monitor C-630**. Los productos se caracterizaron por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  realizada en un equipo **JEOL Eclipse** a 300 MHz, empleando tetrametilsilano como referencia interna y como disolventes se emplearon  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$  y  $\text{D}_2\text{O}$ , los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están expresados en partes por millón (ppm) a partir del tetrametilsilano. Para las reacciones enzimáticas se empleó una incubadora con agitación orbital **Heidolph** mod. **Unimax 1010**. Las espectrometrías de masas fueron determinadas en un equipo **JEOL** mod. **JMS – SX102A**. Para la determinación de los excesos enantioméricos se empleó un equipo HPLC **Waters** mod. **600E** con **detector de UV** mod. **486**. Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro **Perkin-Elmer** mod. **341** utilizando una celda de 1 dm de longitud. Para la medición se utilizó la línea-D del sodio (589 nm), a la temperatura del compartimiento de muestra del aparato (20°C) y con concentración del 1% p/v. Las rotaciones específicas se reportan junto con el disolvente empleado, así como la concentración de la muestra en % p/v.

## 6.2 Materiales

### 6.2.1 Reactivos y materias primas

- Ácido bromhídrico al 48 %\*\*
- Ácido (+)-tartárico\*
- Benzofenona\*
- Bromuro de 2-bromoacetilo\*
- Carbonato de sodio\*
- Cloruro de bencilo\*
- Cloruro de sodio\*
- 2,6-dimetilanilina\*
- (±)-epiclorohidrina\*
- (S)-epiclorohidrina\*
- Eterato de trifluoruro de boro\*
- Hidrógeno gas\*\*\*
- Hidróxido de potasio\*\*
- Malla molecular\*
- Nitrógeno gas\*\*\*
- Pd/C al 10 %\*
- Placas para CCF
- Sodio\*\*
- *trans*-Hidroxi-L-prolina\*\*
- Ácido clorhídrico concentrado\*\*
- Bencilamina\*
- Borohidruro de sodio\*
- Carbón activado
- Celita
- Cloruro de litio\*
- Cloruro de tosilo\*
- Drierita
- (R)-epiclorohidrina\*
- Estearato de vinilo\*
- Guayacol\*
- Hidróxido de amonio 28-32 %\*\*
- Hidróxido de sodio\*\*
- Metóxido de sodio\*
- Novozym 435\*
- Piperazina\*\*
- Sílice flash\*\*\*
- Sulfato de sodio anhidro\*
- Trietilamina\*\*

\*Reactivo Analítico Aldrich

\*\*Grado Reactivo Aldrich

\*\*\*Alta pureza

### 6.2.2 Disolventes grado técnico (destilados fraccionadamente)

- Acetato de etilo
- Agua
- Cloruro de metileno
- Hexano\*
- Metanol
- Tetrahidrofurano\*
- Acetona\*
- Cloroformo
- Etanol
- Isopropanol
- Metiliterbutileter
- Tolueno\*

\*Anhidro

### 6.2.3 Cristalería

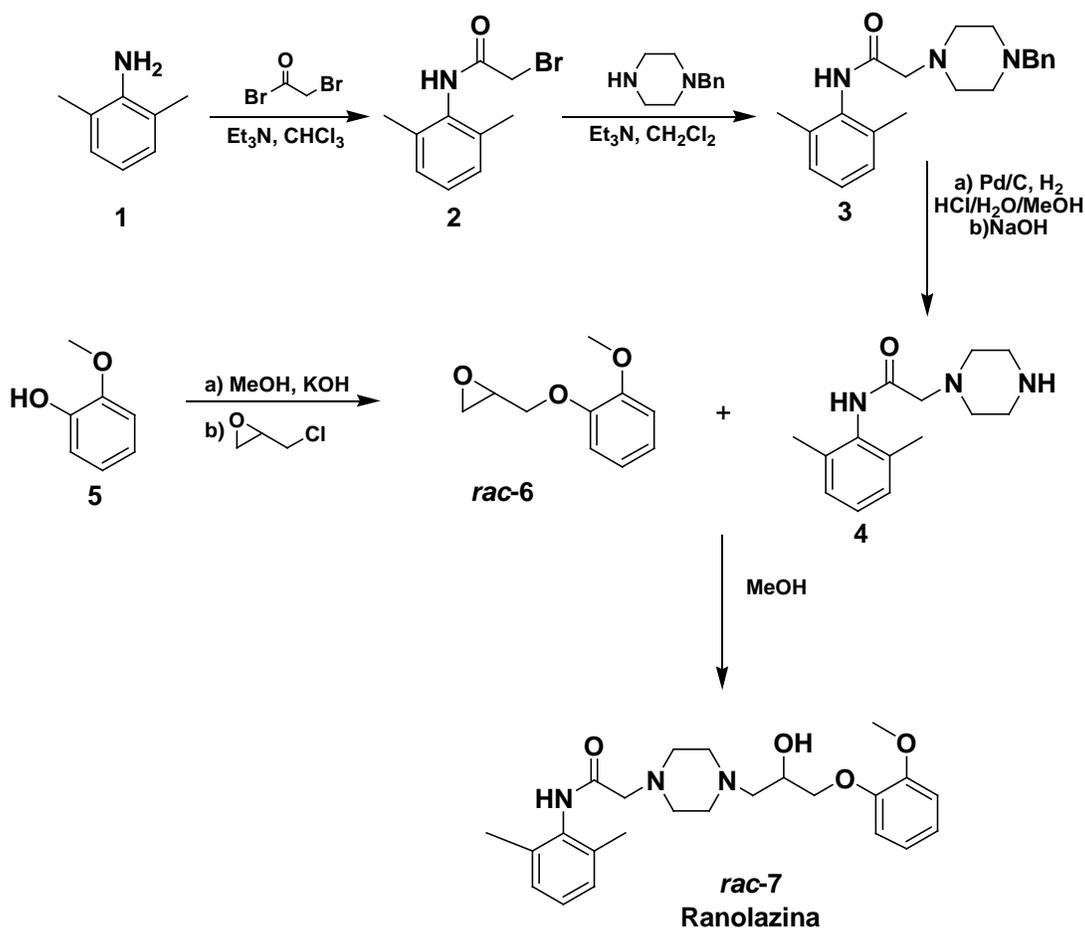
- Adaptador para termómetro
- Cámaras de elución
- Columna de fraccionamiento
- Cubreobjetos para Fisher Jones
- Embudos
- Embudos de separación
- Frascos para hidrogenación
- Matraces bola
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas
- Refrigerantes
- Trampas de humedad
- Viales
- Cabeza de destilación
- Cola de destilación
- Columnas para cromatografía
- Desecador
- Embudos de adición
- Frascos con sello hermético
- Llaves de paso
- Matraces bola de tres bocas
- Matraces kitazato
- Reductores
- Tapones
- Vasos de precipitados
- Vidrios de reloj

#### 6.2.4 Materiales y equipos

- Aceite para baños
- Algodón
- Balanza analítica; OHAUS mod. EP64C
- Canastillas
- Grasa de silicón
- Lámpara de UV; UVP mod. UVGL-58
- Micro-pipetas; Gilson mod. EK91997
- Papel filtro
- Reóstatos; ESTACO-ENERGY mod. 3PN1010B
- Sonicator; Aquasonic mod. 150D
- Termómetro de alcohol
- Agitadores magnéticos
- Anillo metálico
- Bomba de vacío; Vacuubrand mod. MZ2CNT
- Aparato Fisher Johns
- Hidrogenador Parr; Westonghouse mod. 316P347
- Mangueras de hule
- Parrilla de agitación; IKA mod. RET-CV-S1
- Pinzas de tres dedos
- Rotavapor; Büchi mod. R-205
- Soporte universal
- Termómetro de mercurio

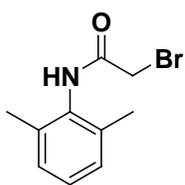
## **7. PARTE EXPERIMENTAL**

7.1 SÍNTESIS DE RANOLAZINA (*rac-7*)



Esquema 5.

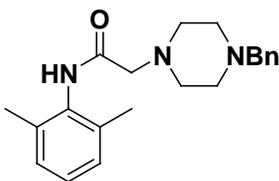
*$\alpha$ -Bromo-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida (2)*



En un matraz esférico de 500 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 19.2 g (158.4 mmol) de 2,6-dimetilanilina (**1**) en 200 mL de cloroformo y se adicionaron 22.1 mL (16 g, 158.4 mmol) de trietilamina. Se enfrió la mezcla a  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  en un baño hielo/sal/metanol; se dejó agitar durante 15 minutos y se adicionaron lentamente (durante 2 horas) 13.8 mL (32 g, 158.4 mmol) de bromuro de  $\alpha$ -bromoacetilo previamente disuelto en 80 mL de cloroformo. Se dejó agitando durante 15 minutos, se verificó el término de la reacción por CCF (Hex/MTBE 7:3) y se lavó con agua (3 x 50 mL) y HCl 1 N (2 x 20 mL) hasta un pH ácido en la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a

presión reducida en el rotavapor. El residuo sólido se recristalizó de metanol para dar 33.8 g de **2**.

### **2-(4-Bencilpiperazin-1-il)-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida (3)**



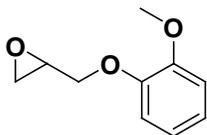
En un matraz esférico de 50 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 1.8 g (7.3 mmol) de **2**, 1.1 mL de trietilamina (0.8 g, 8 mmol) y 1.3 g de *N*-bencilpiperazina (7.3 mmol) en 25 mL de cloruro de metileno; se dejó con agitación durante 24 h, verificando el término de la reacción por CCF (AcOEt/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 85:15:10). Se lavó con agua (3 x 10 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad. El residuo sólido se recristalizó de hexano para obtener 2.2 g de **3**.

### **2-(Piperazin-1-il)-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida (4)**



En un frasco de hidrogenación de 500 mL se disolvieron 6.3 g (18.5 mmol) de **3** en 37 mL (37 mmol) de HCl 1 N, se adicionaron 63 mL de agua, 100 mL de metanol y 0.6 g (10 % con respecto al peso de **3**) de Pd/C al 10%. Se hidrogenó a 60 psi por 2 h verificando el término de la reacción por CCF (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 8:2:1). Se adicionaron 37 mL (37 mmol) de NaOH 1N, se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 25 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida en el rotavapor. Se obtuvieron 4.5 g de **4**. El producto se empleó en el siguiente paso sin previa purificación.

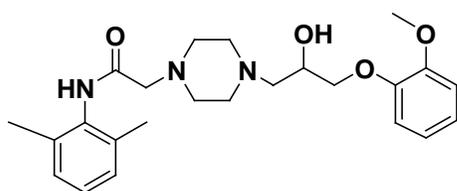
### **(±)-2-[(2-metoxifenoxi)metil]oxirano (rac-6)**



En un matraz esférico de 250 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 6.2 g (110 mmol) de hidróxido de potasio en 100 mL de metanol y se adicionaron 12.4 g (100 mmol) de **5**, dejando agitar la mezcla durante 30 minutos, para posteriormente concentrarla a presión reducida en el rotavapor. Se adicionaron 124 mL de (±)-epiclorohidrina (10 equivalentes con respecto al peso de **5**), dejando agitar a temperatura ambiente por 24 h y verificando el término de la

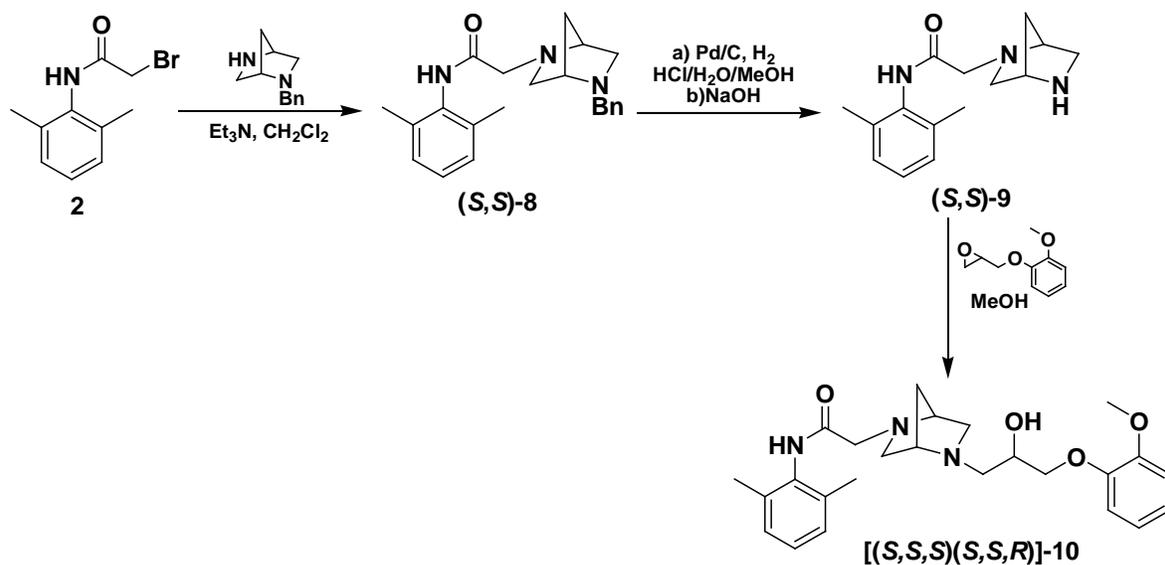
reacción por CCF (Hex/AcOEt 8:2). La mezcla de reacción se destiló (30 °C/0.005 mmHg); el residuo se resuspendió en 100 mL de acetato de etilo y se lavó con agua (3 x 50 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida en el rotavapor, obteniendo 16 g de crudo, el cual se purificó por cromatografía en columna (360 g de sílice flash, Hex/AcOEt 9:1) obteniendo 14.8 g de **rac-6**.

**(±)-Ranolazina (rac-7)**



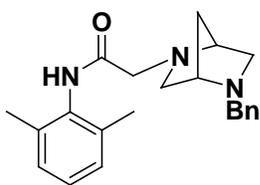
En un matraz esférico de 250 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 4.4 g (17.7 mmol) de **4** y 3.2 g (17.7 mmol) de **rac-6** en 100 mL de metanol; la mezcla se colocó a reflujo por 6 h, verificando el término de la reacción por CCF (Hex/AcOEt 8:2 para **rac-6** y CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 8:2:1 para **4** y **rac-7**). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida en el rotavapor y se recrystalizó de acetato de etilo, con lo que se obtuvieron 5.3 g de **rac-7** como producto puro.

## 7.2 SÍNTESIS DE [(S,S,S)(S,S,R)]-10



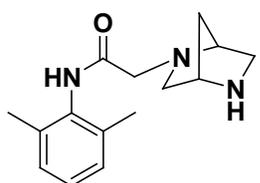
Esquema 6.

### **2-{5-bencil-(1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il}-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida [(S,S)-8]**



En un matraz esférico de 250 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 4.8 g (20 mmol) de **2**, 3.8 g (20 mmol) de 2-bencildiazabicyclo (base libre) y 2.8 mL (2 g, 20 mmol) de trietilamina en 100 mL de cloruro de metileno; la mezcla se dejó agitar durante 24 h, verificando el término de la reacción por CCF (AcOEt/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 85:15:10). Se lavó con agua (3 x 50 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad. Se recristalizó de hexano para obtener 6.3 g de **(S,S)-8**.

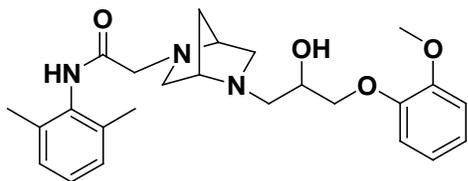
### **2-{5-H-(1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il}-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida [(S,S)-9]**



En un frasco de hidrogenación de 500 mL se disolvieron 6.5 g (18.5 mmol) de **(S,S)-8** en 37 mL (37 mmol) de HCl 1 N; se adicionaron 63 mL de agua, 100 mL de metanol y 0.6 g (10 % con respecto al peso de **(S,S)-8**) de Pd/C al 10%. Se hidrogenó a 60 psi por 2 h, verificando el término de la reacción por CCF (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 8:2:1). Se adicionaron 37 mL (37 mmol) de NaOH 1N, se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 25 mL), la fase orgánica se secó con sulfato

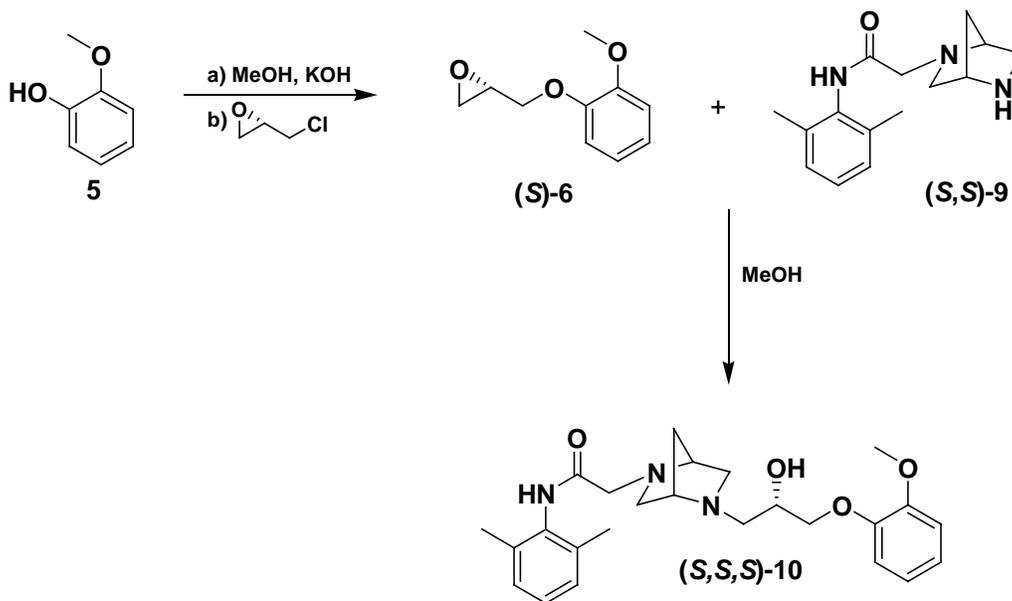
de sodio anhidro y se concentró a presión reducida en el rotavapor. Se obtuvieron 4.8 g de **(S,S)-9** puro. El producto se empleó en el siguiente paso sin previa purificación.

**2-{{(1S,4S)-5-[3-(2-metoxifenoxi)-2-hidroxiopropil]-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il}-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida}{{(S,S,S)(S,S,R)}-10}**



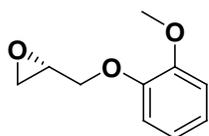
En un matraz esférico de 100 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 4.6 g (17.6 mmol) de **(S,S)-9** y 3.2 g (17.6 mmol) de **rac-6** en 40 mL de metanol; la mezcla se dejó agitando a reflujo por 12 h, verificando el término de la reacción por CCF (Hex/AcOEt 8:2 para **rac-6** y CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 8:2:1 para **(S,S)-9** y **[(S,S,S)(S,S,R)]-10**). Se concentró a sequedad en el rotavapor, se adicionaron 35.2 mL (35.2 mmol) de HCl 1 N y se lavó con acetato de etilo (3 x 20 mL). Se adicionaron 35.2 mL (35.2 mmol) de NaOH 1 N, se extrajo con acetato de etilo (3 x 25), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad. El residuo fue recrystalizado de acetato de etilo para obtener 4.5 g de **[(S,S,S)(S,S,R)]-10** puro.

7.3 SÍNTESIS DE (S,S,S)-10.



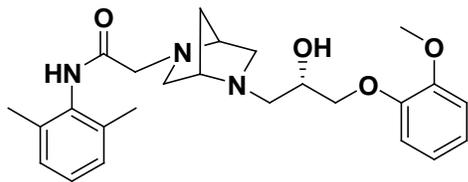
Esquema 7.

**(2S)-2-[(2-metoxifenoxi)metil]oxirano [(S)-6]**



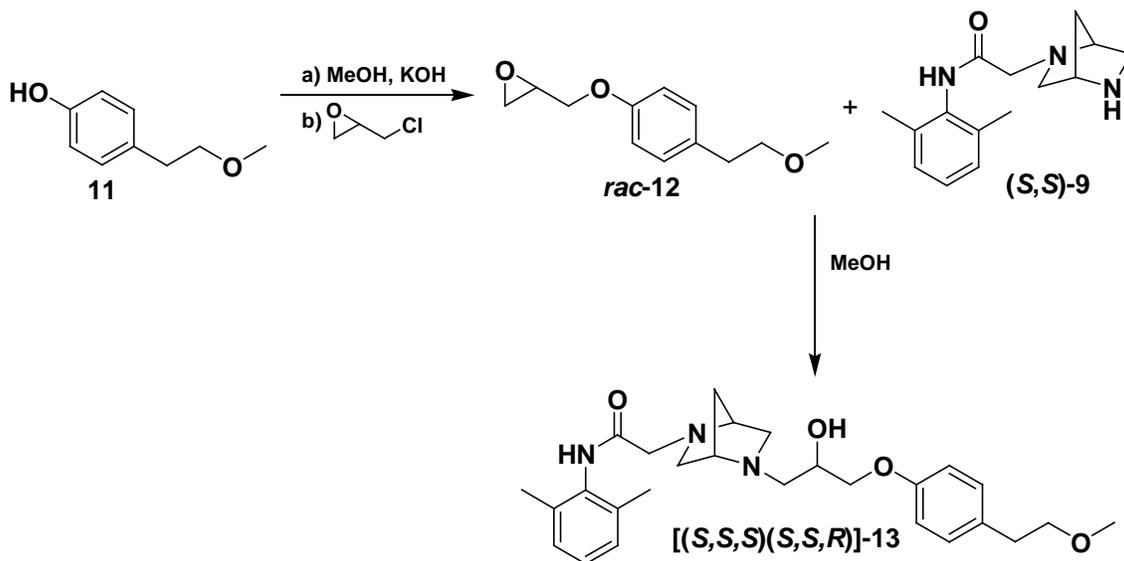
En un matraz esférico de 25 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 0.2 g (3.6 mmol) de hidróxido de potasio en 3 mL de metanol y se adicionaron 0.4 g (3.2 mmol) de **5** dejando agitar la mezcla durante 30 minutos, para posteriormente ser concentrada a presión reducida en el rotavapor. Se adicionaron 4 mL de (*R*)-epiclorohidrina (10 equivalentes con respecto al peso de **5**) y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente por 24 h, verificando el término de la reacción por CCF (Hex/AcOEt 8:2). La mezcla de reacción se destiló (30 °C/0.005 mmHg); el residuo se resuspendió en 5 mL acetato de etilo y se lavó con agua (3 x 3 mL). La fase orgánica se desecó con sulfato de sodio anhidro para ser concentrada a presión reducida en el rotavapor, obteniendo 0.51 g de crudo, el cual se purificó por cromatografía en columna (6 g de sílice flash, Hex/AcOEt 9:1) obteniendo 0.47 g de (**R**)-**6**.

**2-((1*S*,4*S*)-5-((2*S*)-3-(2-metoxifenoxi)-2-hidroxiopropil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il)-  
N-(2,6-dimetilfenil)acetamida [(*S,S,S*)-10]**



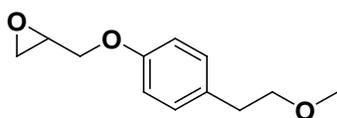
En un matraz esférico de 25 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 0.53 g (2 mmol) de (*S,S*)-**9** y 0.37 g (2 mmol) de (*S*)-**6** en 10 mL de metanol; la mezcla se dejó agitando a reflujo por 12 h, verificando el término de la reacción por CCF (Hex/AcOEt 8:2 para (*S*)-**6** y CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 8:2:1 para (*S,S*)-**9** y (*S,S,S*)-**10**). Se concentró a sequedad en el rotavapor y se purificó por cromatografía en columna (27 g de sílice flash, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) obteniendo 0.53 g de (*S,S,S*)-**10** puro.

7.4 SÍNTESIS DE [(S,S,S)(S,S,R)]-13



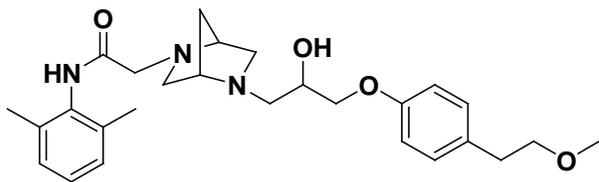
Esquema 8.

**(±)-2-[[4-(2-metoxietil)fenoxi]metil]oxirano (rac-12)**



En un matraz esférico de 250 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 6.2 g (110 mmol) de hidróxido de potasio en 100 mL de metanol y se adicionaron 15.2 g (100 mmol) de **11**, dejando agitar la mezcla durante 30 minutos, para posteriormente ser concentrada a presión reducida en el rotavapor. Se adicionaron 152 mL de (±)-epiclorohidrina (10 equivalentes con respecto al peso de **11**) y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente por 24 h, verificando el término de la reacción por CCF (Hex/AcOEt 8:2). La mezcla de reacción se destiló (30 °C/0.005 mmHg); el residuo se resuspendió en 100 mL acetato de etilo y se lavó con agua (3 x 50 mL). La fase orgánica se desecó con sulfato de sodio anhidro para ser concentrada a presión reducida en el rotavapor, obteniendo 22 g de crudo, el cual se purificó por cromatografía en columna (400 g de sílice flash, Hex/AcOEt 9:1), obteniendo 18.5 g de **rac-12** puro.

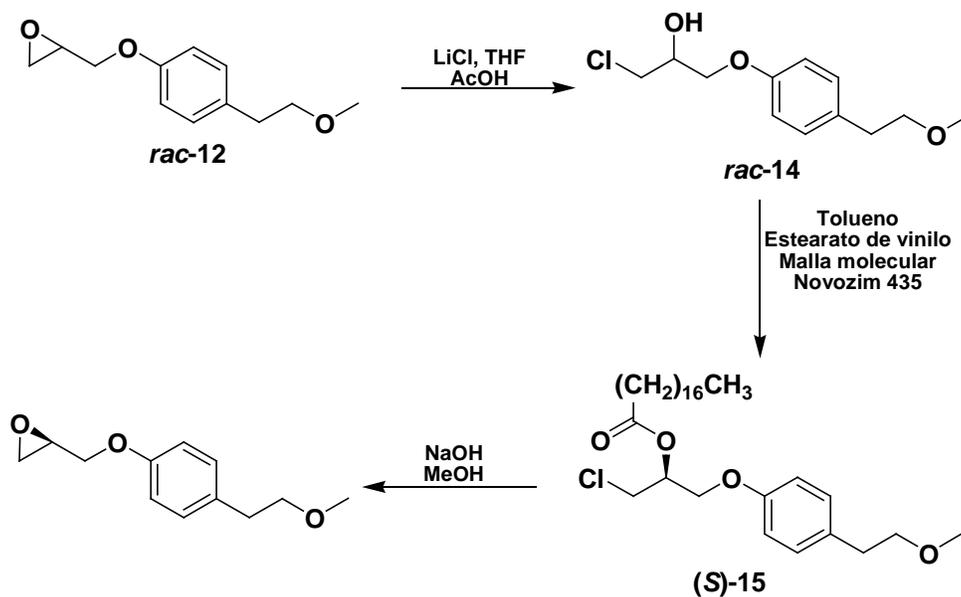
**2-{{(1*S*,4*S*)-5-[3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-2-hidroxiopropil]-2,5-diaza-bicyclo[2.2.1]heptan-2-il}-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida {{(1*S*,2*S*)-(1*S*,2*R*)}-13}**



En un matraz bola de 100 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 4.6 g (17.6 mmol) de **(*S,S*)-9** y 3.7 g (17.6 mmol) de ***rac*-12** en 40 mL de metanol; la

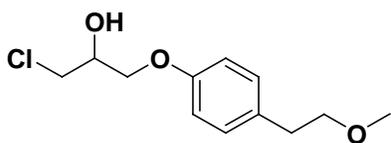
mezcla se dejó agitando a reflujo por 12 h verificando el término de la reacción por CCF (Hex/AcOEt 8:2 para ***rac*-12** y CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 8:2:1 para **(*S,S*)-9** y **[(*S,S,S*)(*S,S,R*)]-13**). La mezcla de reacción se concentró a sequedad en el rotavapor, se disolvió en 35.2 mL (35.2 mmol) de HCl 1 N y se lavó con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase acuosa se neutralizó con 35.2 mL (35.2 mmol) de NaOH 1 N y se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad para obtener 6.3 g del producto crudo que fue recristalizado de acetato de etilo, con lo que se obtuvieron 5.4 g de **[(*S,S,S*)(*S,S,R*)]-13** puro.

### 7.5 SÍNTESIS DE (R)-12.



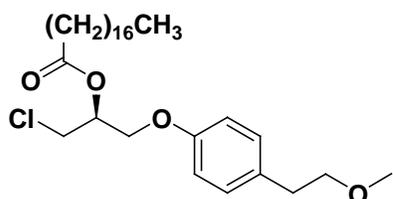
Esquema 9.

#### (±)-1-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-3-cloropropan-2-ol (*rac-14*)



En un matraz esférico de 250 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 7.5 g (35.8 mmol) de *rac-12* en 70 mL de THF, se adicionaron 5 mL (86.6 mmol) de ácido acético y 1.8 g (43.3 mmol) de cloruro de litio; la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente por 48 h, verificando el término de la reacción por CCF (Hex/AcOEt 8:2). Se concentró a sequedad en el rotavapor y se particionó en 100 mL de agua y 100 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (3 x 20 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad en el rotavapor para dar 8.7 g de *rac-14* puro.

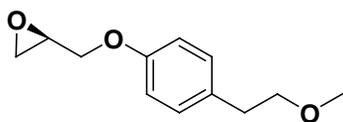
#### Estearato de (2S)-1-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-3-cloropropan-2-il [(S)-15]



En un frasco de 500 mL con cierre hermético se disolvieron 8.5 g (34.7 mmol) de *rac-14* en 200 mL de una mezcla hexano/acetona 9:1 y se adicionaron 2 g (100 mg/mL de fase) de tamiz molecular, 5.4 g (17.35 mmol, 0.5 equivalente molar) de estearato de vinilo y 0.2 g (1 mg/mL de fase) de Novozym

435; la mezcla se incubó por 28 h a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm, verificando el termino de la reacción por CCF (Hex/MTBE 97:3 para el estearato de vinilo). Se filtró sobre celita y se concentró a sequedad en el rotavapor obteniendo 14.9 g del producto crudo, el cual fue purificado por cromatografía en columna (150 g de sílice flash, Hex/AcOEt 95:5) obteniendo 6.3 g de **(S)**-15 puro.

***(2R)***-2-***{[4-(2-metoxietil)fenoxi]metil}oxirano*** ***[(R)***-12]



En un matraz esférico de 250 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 6 g (11.7 mmol) de **(S)**-15 en 120 mL de metanol y se adicionaron 12 mL de NaOH 1 N; la mezcla se dejó agitar por 24 h a temperatura ambiente verificando el término de la reacción por CCF (Hex/AcOEt 85:15). Se enfrió durante 1 h a 0 °C, se filtró al vacío lavando con 50 mL de metanol frío y se concentró en el rotavapor, obteniendo 3.5 g del producto crudo, el cual se purificó por columna (70 g de sílice flash, Hex/AcOEt 9:1) para dar 2.4 g de **(R)**-12 puro.

## **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

8.1 TABLA DE RESULTADOS

**TABLA 1**

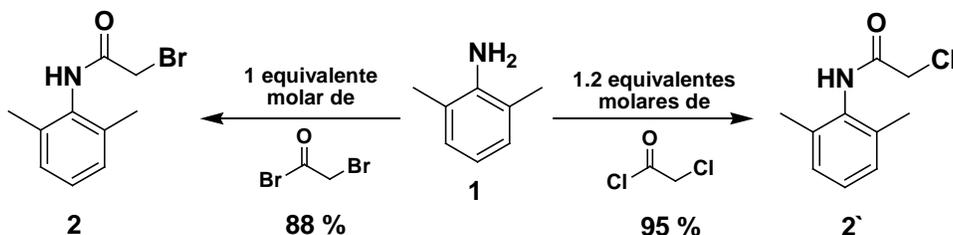
Rendimientos, apariencia y puntos de fusión de los compuestos preparados en este trabajo

Compuesto	Rendimiento (%)	Apariencia	Punto de fusión (°C)
<b>2</b>	88	Cristales blancos	146-150
<b>3</b>	90	Cristales blancos	114-116
<b>4</b>	99	Solido amorfo blanco	125-126
<b>rac-6</b>	82	Cera ligeramente amarilla	36-37
<b>(S)-6</b>	82	Aceite incoloro	
<b>rac-7</b>	70	Solido amorfo blanco	76-77
<b>(S,S)-8</b>	90	Cristales blancos	116-117
<b>(S,S)-9</b>	99	Cristales blancos	125-126
<b>[(S,S,S)-(S,S,R)]-10</b>	58	Solido amorfo blanco	78-81
<b>(S,S,S)-10</b>	59	Solido amorfo blanco	96-98
<b>rac-12</b>	89	Aceite incoloro	
<b>[(S,S,S)-(S,S,R)]-13</b>	65	Solido amorfo blanco	96-98
<b>rac-14</b>	99	Aceite incoloro	
<b>(S)-15</b>	35.4	Cristales blancos	43-42
<b>(R)-12</b>	96	Aceite incoloro	

## 8.2 RANOLAZINA

Para realizar los ensayos farmacológicos de los compuestos obtenidos en el presente trabajo, fue necesario emplear ( $\pm$ )-ranolazina (*rac-7*) como compuesto de referencia. Este compuesto se obtuvo mediante una modificación de la ruta sintética reportada por Riise Moen y col.<sup>12</sup> La estrategia desarrollada en este trabajo consistió en tres etapas de síntesis, mencionadas a continuación:

La primera etapa radica en la obtención de 2-(piperazin-1-il)-*N*-(2,6-dimetilfenil)acetamida (**3**), para ello fue necesario sintetizar 2-bromo-*N*-(2,6-dimetilfenil)acetamida (**2**), la cual se obtuvo mediante una aminólisis del bromuro de bromoacetilo con 2,6-dimetilanilina (**1**), con un rendimiento del 88 %. En comparación con lo reportado por Moen,<sup>12</sup> quien emplea un 20 % de excedente de cloruro de cloroacetilo y obtiene un 95 % de rendimiento de la cloroamida **2'**, en este trabajo se redujo la cantidad del reactivo acilante a proporciones del orden de equivalencia molar, manteniendo el rendimiento en un nivel aceptable (esquema 10) y obteniendo la bromoamida **2** con un mejor grupo saliente.

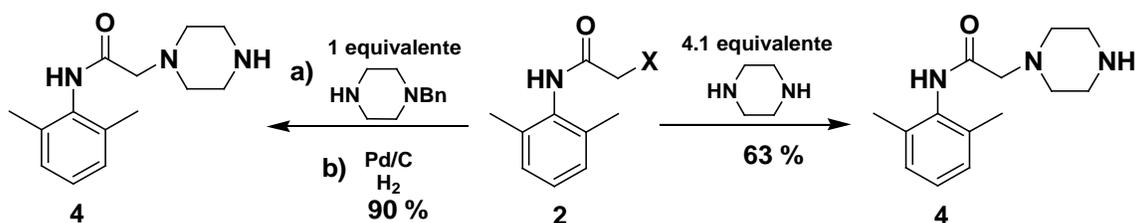


Esquema 10. Comparación de métodos de síntesis de haloamidas.

El compuesto **2** fue caracterizado por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN <sup>1</sup>H) (200 MHz):  $\delta$  2.21 (s, 6H), 4.02 (s, 2H), 7.08 (m, 3H), 7.81 (br, 1H). El intercambio con D<sub>2</sub>O permitió la identificación de manera inequívoca del hidrógeno sobre el heteroátomo, intercambiando la señal en 7.81 ppm por una señal en 4.8 ppm que corresponde a los protones de H<sub>2</sub>O generados *in-situ* (anexo 10.1).

De manera consecutiva, el bromo presente en el compuesto **2** fue desplazado mediante una reacción tipo S<sub>N</sub>2 con *N*-bencilpiperazina, para generar la diamina **3** con un rendimiento del 90 %; esta última, mediante una hidrogenólisis catalizada con paladio,

permitió obtener la diamina **4** de forma cuantitativa. Las ventajas que presentó este método de síntesis en comparación con el reportado por Moen,<sup>12</sup> fue el empleo de cantidades equimolares de reactivos y un rendimiento de 90 %, en comparación con el reportado de 63 %, a pesar de un paso adicional de síntesis (esquema 11).

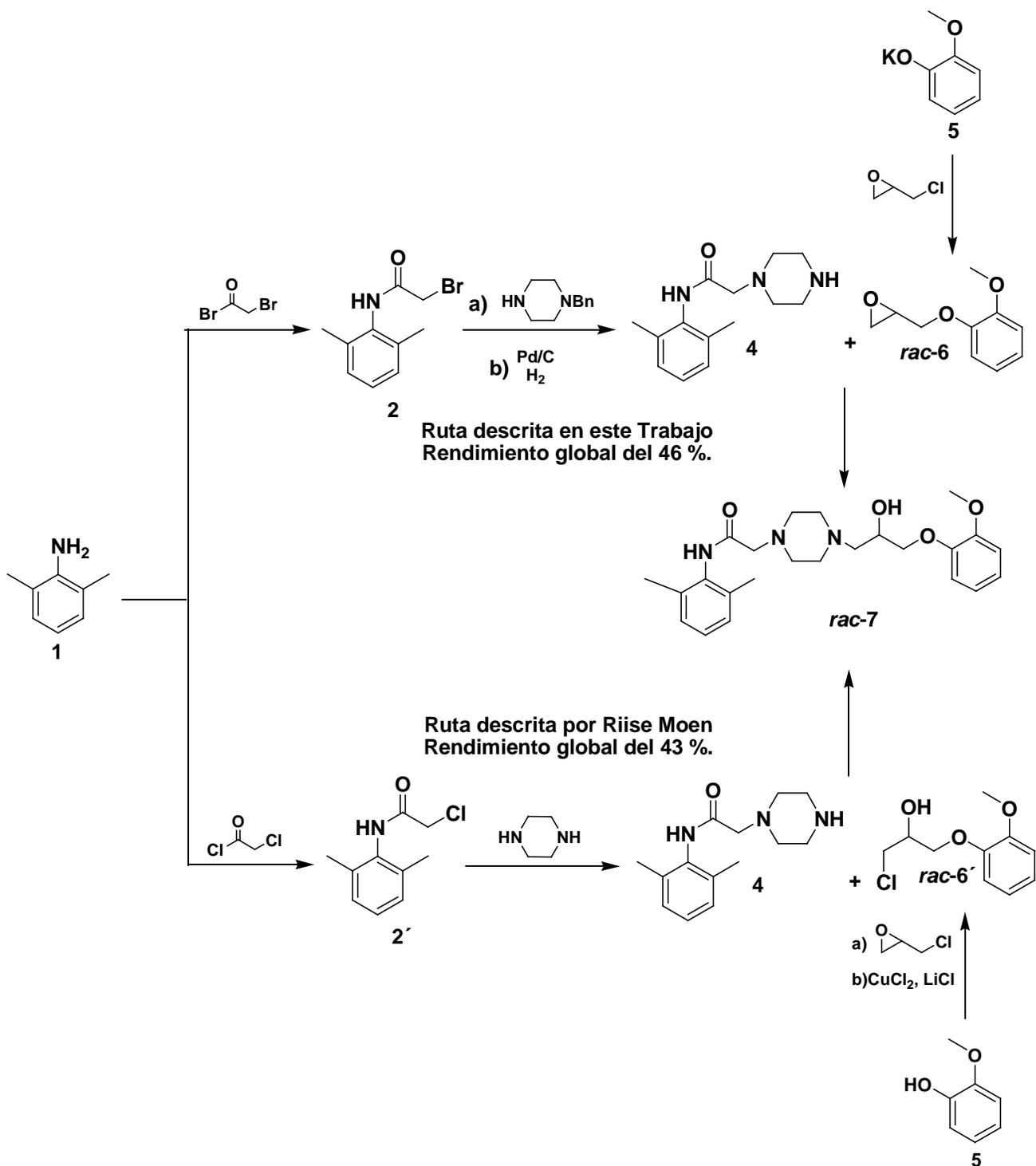


Esquema 11. Comparación de métodos de síntesis para el compuesto **4**.

La diamina **4** fue caracterizada por comparación del punto de fusión con el reportado en la literatura.

La segunda etapa de la síntesis de *rac-7* consistió en la obtención de (±)-2-[(2-metoxifenoxi)metil]oxirano (*rac-6*), que se consiguió mediante el ataque regioselectivo de la sal potásica del fenol **5** al carbono secundario del oxirano presente en la (±)-epiclorohidrina, y la posterior ciclación intramolecular, promovida por el ataque nucleofílico del alcóxido [formado durante la apertura de la (±)-epiclorohidrina] al carbono enlazado al cloro; de esta manera se obtuvo *rac-6* con un rendimiento del 82 % (esquema 12). La caracterización de *rac-6* se realizó mediante la comparación del punto de fusión reportado en la literatura.

La tercera etapa en la estrategia sintética fue la apertura del oxirano *rac-6*, mediante el ataque nucleofílico de la diamina **4** sobre el carbono secundario, para dar como resultado (±)-ranolazina (*rac-7*) con un rendimiento del 70 % (esquema 12). El rendimiento global reportado por Moen,<sup>12</sup> en 5 pasos de síntesis para la obtención de *rac-7*, es de 43 % mientras que el obtenido en este trabajo en el mismo número de pasos fue de 46 % (esquema 12).



**Esquema 12.** Comparación de estrategias sintéticas para la obtención de ranolazina (*rac-7*).

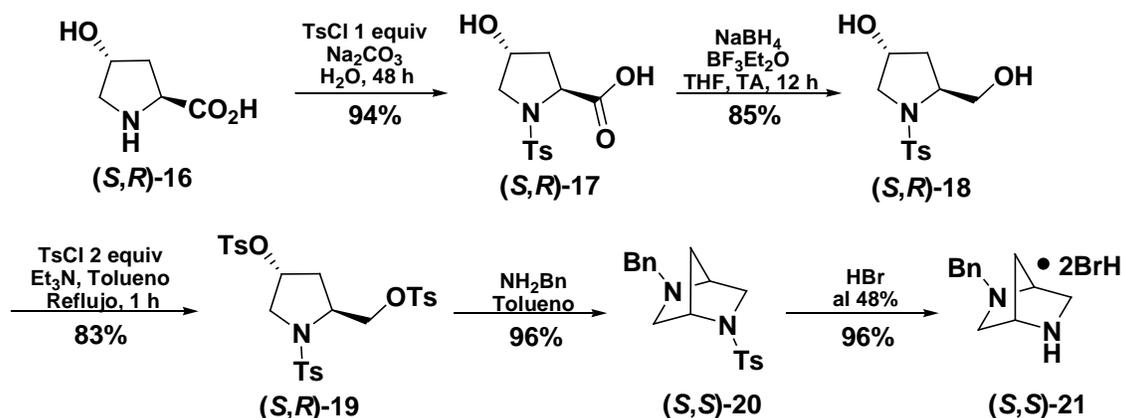
La ranolazina (*rac-7*) se caracterizó mediante **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz):  $\delta$  2.05 (s, 6H), 3.43 (d,  $J=5.7$  Hz, 2H), 3.59 (br, 4H), 3.67 (br, 4H), 3.73 (s, 3H), 3.93-4.03 (m, 2H), 4.17 (d,  $J=14.4$ , 2H), 4.36-4.42 (m, 1H), 6.87-7.12 (m, 7H); **RMN <sup>13</sup>C** (300 MHz):  $\delta$  18.07, 50.12, 50.33,

56.51, 57.96, 59.31, 64.69, 71.01, 113.33, 114.49, 122.43, 123.23, 129.08, 129.31, 132.94, 136.72, 147.78, 149.18, 165.83; Espectrometría de Masas (EM) ( $EI^+$ ) (% m/z): 427 [ión molecular ( $C_{24}H_{33}N_3O_4$ ), 3 %], 321, 379, 260 [pico base ( $C_{15}H_{22}N_3O$ ), 100 %], 18 (**anexo 10.2**).

Las ventajas del método desarrollado en este trabajo son: a) Un moderado incremento en el rendimiento global ( $\pm$ )-ranolazina empleando el mismo número de pasos, b) el empleo de cantidades estequiométricas en cuatro de los cinco pasos realizados para la obtención de ( $\pm$ )-ranolazina.

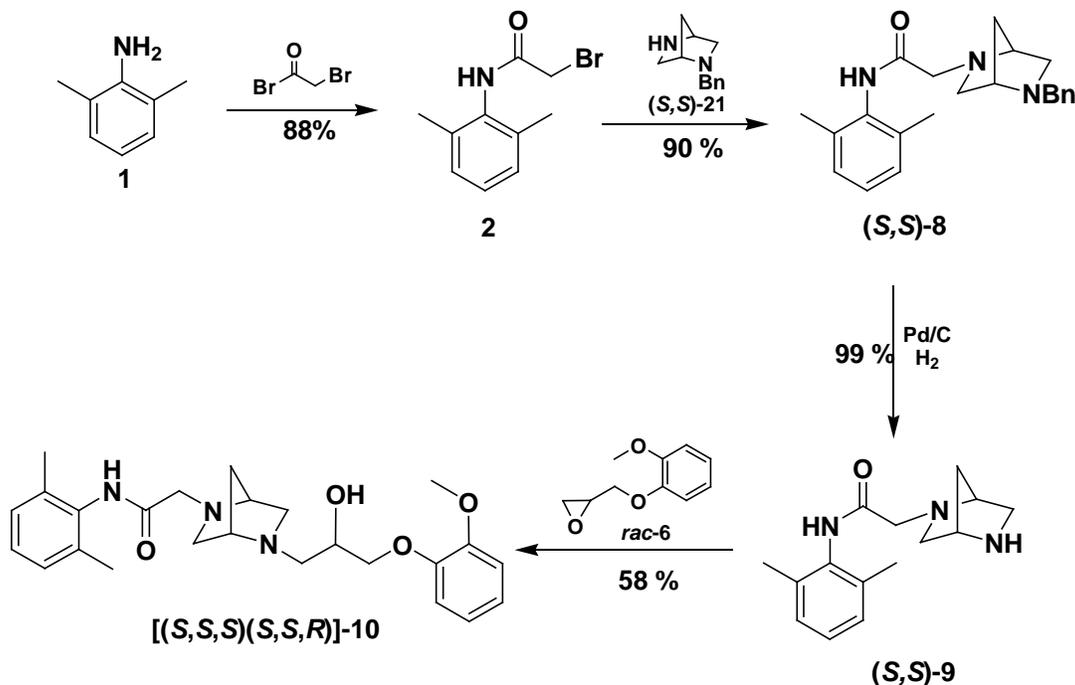
### 8.3 [(*S,S,S*)(*S,S,R*)]-10 y [(*S,S,S*)(*S,S,R*)]-13

Para la preparación de los compuestos diazabíclicos [(*S,S,S*)(*S,S,R*)]-10 y [(*S,S,S*)(*S,S,R*)]-13, se sintetizó el (1*S*,4*S*)-2-bencil-2,5-diazabíciclo[2.2.1]heptano [(*S,S*)-21], análogo rígido de *N*-bencilpiperazina, partiendo de *trans*-hidroxi-*L*-prolina, según el método reportado por Melgar y col.<sup>37</sup> en un rendimiento global de 61 % (esquema 13).



Para la obtención de la mezcla epimérica del análogo diazabíclico [(*S,S,S*)(*S,S,R*)]-10 (esquema 14), se partió de la bromoacetamida **2**; esta última, mediante el desplazamiento del bromuro con (*S,S*)-21, generó la diamina diazabíclica (*S,S*)-8 con rendimiento del 90 %. La diamina (*S,S*)-9 se preparó de forma cuantitativa mediante la hidrogenólisis, catalizada con paladio, del grupo protector bencilo de (*S,S*)-8. La obtención de

[[*(S,S,S)*(*S,S,R*)]-10 se logró mediante la apertura nucleofílica del oxirano en *rac*-6 con la diamina (*S,S*)-9, con un rendimiento del 58 %. La síntesis global de [[*(S,S,S)*(*S,S,R*)]-10, partiendo de 2,6-dimetilanilina (**1**), se alcanzó en un rendimiento del 37.3 %.



Esquema 14. Ruta de síntesis de [[*(S,S,S)*(*S,S,R*)]-10.

El compuesto (*S,S*)-8 se caracterizó mediante RMN <sup>1</sup>H (300 MHz): δ 1.79 (dd, J<sub>1</sub>=41.7 Hz, J<sub>2</sub>=9.9 Hz, 2H), 2.23 (s, 6H), 2.75 (d, J=9.9 Hz, 1H), 2.80 (dd, J<sub>1</sub>=9.6 Hz, J<sub>2</sub>=2.4 Hz, 2H), 3.10 (d, J=9.6 Hz, 1H), 3.39 (dd, J<sub>1</sub>=41.4 Hz, J<sub>2</sub>=16.8 Hz, 2H), 3.40 (s, 2H), 3.73 (dd, J<sub>1</sub>=15.9 Hz, J<sub>2</sub>=13.5 Hz, 2H), 7.08-7.10 (m, 3H), 7.21-7.37 (m, 5H), 8.72 (s, 1H); RMN <sup>13</sup>C (300 MHz): δ 18.53, 33.92, 57.70, 58.09, 58.35, 59.44, 61.53, 63.80, 126.89, 127.11, 128.14, 128.27, 128.37, 133.69, 135.06, 139.37, 169.41; EM (E<sup>+</sup>) (% m/z): 349 [ión molecular (C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O), 7 %], 321, 258, 229, 187, 158 [pico base (C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sup>+</sup>), 100 %], 91, 28 (anexo 10.3).

La identificación de (*S,S*)-9 se realizó mediante RMN <sup>1</sup>H (300 MHz): δ 1.75 (dd, J<sub>1</sub>=45 Hz, J<sub>2</sub>=9.9 Hz, 2H), 2.22 (s, 6H), 2.76 (d, J=10.2 Hz, 1H), 2.84 (s, 1H), 2.96 (dd, J<sub>1</sub>=10.5 Hz, J<sub>2</sub>=2.4 Hz, 1H), 3.01 (dd, J<sub>1</sub>=10.5 Hz, J<sub>2</sub>=2.4 Hz, 1H), 3.13 (dd, J<sub>1</sub>=10.5 Hz, J<sub>2</sub>=0.9 Hz, 1H), 3.37 (dd, J<sub>1</sub>=31.5 Hz, J<sub>2</sub>=16.8 Hz, 2H), 3.47 (s, 1H), 3.66 (s, 1H), 7.08-7.10 (m, 3H), 8.65 (s, 1H); RMN <sup>13</sup>C (300 MHz): δ 18.46, 35.97, 49.66, 57.10, 59.17, 62.67, 63.22, 127.09, 128.11, 133.63,

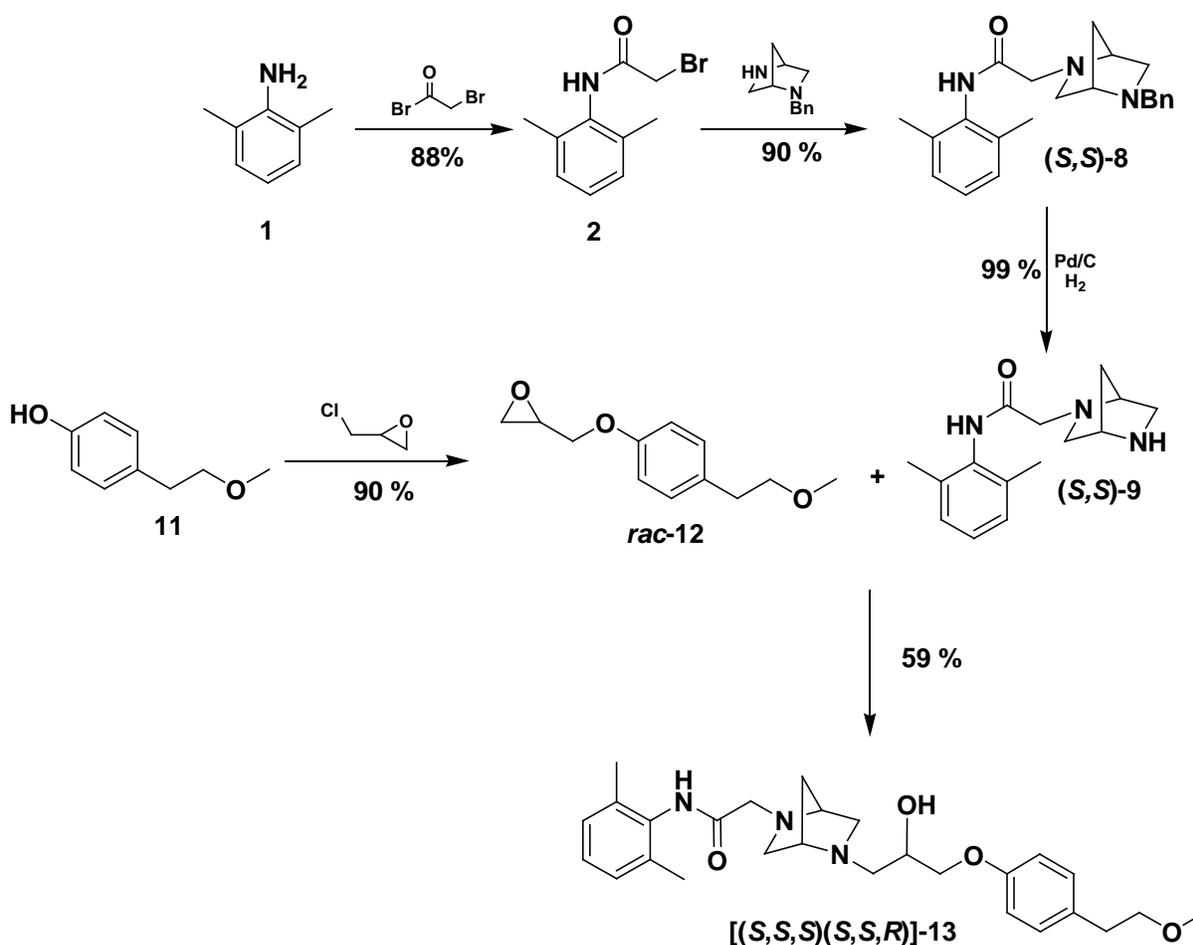
135.01, 169.18; **EM** ( $EI^+$ ) (% m/z): 259 [ión molecular ( $C_{15}H_{21}N_3O$ ), 4 %], 230, 111 [pico base ( $C_6H_{11}N_2^+$ ), 100 %], 88, 28 (**anexo 10.4**).

La caracterización de la mezcla epimérica del análogo diazabíclico de Ranolazina **[(S,S,S)(S,S,R)]-10** se realizó mediante **RMN  $^1H$**  (300 MHz):  $\delta$  1.73-1.85 (m, 2H), 2.22 (s, 6H), 2.61-2.89 (m, 4H), 2.93 (dd,  $J_1=9.9$  Hz,  $J_2=2.4$  Hz, 1H), 3.01 (dd,  $J_1=10.2$  Hz,  $J_2=4.5$  Hz, 1H), 3.36 (dd,  $J_1=33$  Hz,  $J_2=16.5$  Hz, 2H), 3.41 (s, 2H), 3.59 (br, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.93-4.07 (m, 3H), 6.87-6.95 (m, 4H), 7.05-7.12 (m, 3H), 8.64 (s, 1H); **RMN  $^{13}C$**  (300 MHz):  $\delta$  18.52, 34.30, 34.86, 55.79, 57.54, 57.99, 58.65, 59.37, 63.24, 63.62, 67.70, 71.95, 111.93, 114.67, 120.85, 121.82, 127.12, 128.16, 133.67, 135.03, 148.23, 149.78, 169.19; **EM** ( $EI^+$ ) (% m/z): 439 [ión molecular ( $C_{25}H_{33}N_3O_4$ ), 7 %], 291, 272 [pico base ( $C_{16}H_{22}N_3O^+$ ), 100 %], 248, 229, 82, 80, 44, 42, 28 (**anexo 10.5**).

Las señales observadas en el espectro de **RMN  $^1H$**  para **[(S,S,S)(S,S,R)]-10** que hicieron posible la caracterización del mismo fueron: la señal múltiple que aparece entre 1.73 y 185 ppm corresponde a los hidrógenos del metileno puente del sistema diazabíclico presente en la molécula; la señal simple en 2.22 ppm corresponde a los hidrógenos de los dos metilos del anillo aromático en el nitrógeno de la acetamida; la señal múltiple que aparece entre 2.61 y 2.89 ppm se atribuye a los hidrógenos de uno de los metilenos junto con los de los centros asimétricos del sistema diazabíclico; los dos dobles de dobles que aparecen entre 2.93 y 3.01 ppm corresponden a los hidrógenos del metileno de la cadena de isopropilo que se encuentra entre el nitrógeno y el carbono asimétrico del alcohol; la señal doble de dobles que aparece en 3.36 ppm corresponde a los hidrógenos de uno de los metilenos del diazabíclico; la señal simple que aparece en 3.41 ppm corresponde a los hidrógenos del metileno de la acetamida; la señal simple ensanchada que se encuentra en 3.59 ppm corresponde al hidrógeno del alcohol; la señal simple de los hidrógenos del metoxilo aparece en 3.83 ppm; la señal múltiple que aparece entre 3.93 y 4.07 ppm corresponde a los hidrógenos del metileno de la cadena de isopropilo entre el carbono asimétrico y el oxígeno del anillo junto con el hidrógeno del mismo carbono asimétrico; los hidrógenos del sistema aromático provenientes del fenóxido aparecen entre 6.87 y 6.95 ppm; los hidrógenos del sistema aromático unido al nitrógeno de la acetamida aparecen

en 7.09 ppm; el hidrógeno ácido de la acetamida aparece en 8.68 ppm. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  permitió observar el carbonilo de la amida, el cual aparece en 169.19 ppm.

Simultáneamente, se sintetizó el compuesto  $[(S,S,S)(S,S,R)]$ -13 partiendo del oxirano *rac*-12, el cual se preparó de acuerdo a lo reportado por Regla y col.;<sup>27</sup> *rac*-12 reaccionó vía apertura del oxirano con la diamina (S,S)-9, en un rendimiento de 59 %. El rendimiento global de la síntesis de  $[(S,S,S)(S,S,R)]$ -13 partiendo de 2,6-dimetilanilina (1) fue del 41.6 % (esquema 15).



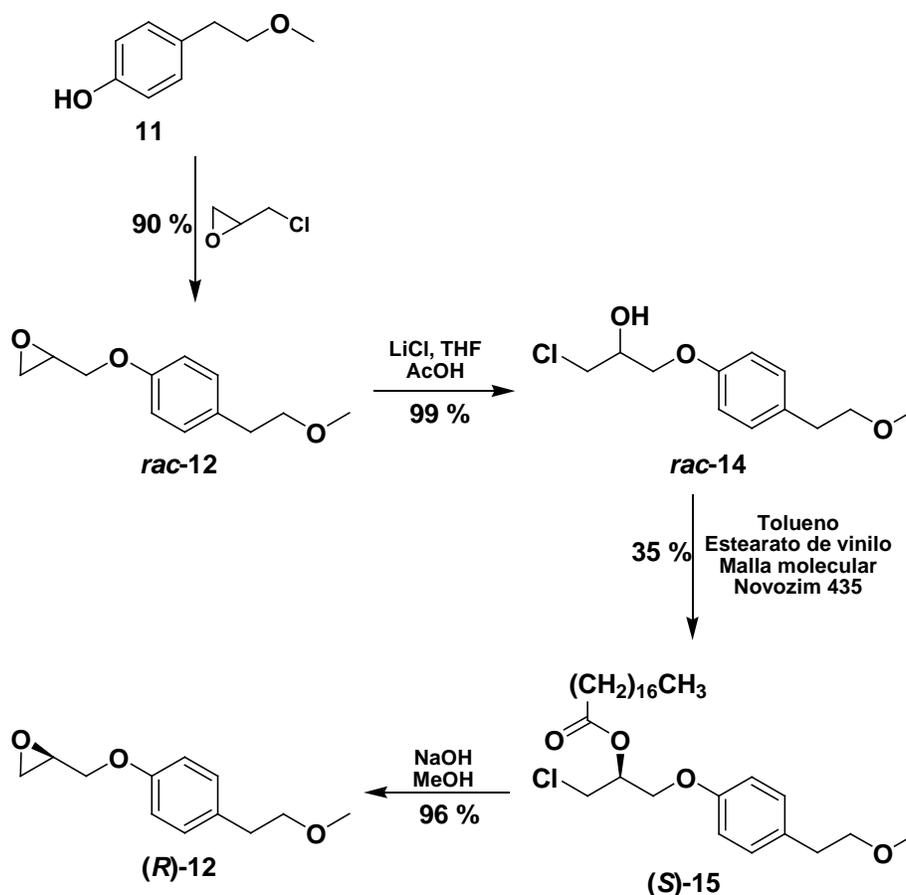
Esquema 15. Ruta de síntesis de  $[(S,S,S)(S,S,R)]$ -13.

El compuesto final **[(S,S,S)(S,S,R)]-13** se caracterizó por **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz): δ 1.76-1.92 (d, J=32 Hz, 1H), 2.01 (s, 6H), 2.05-2.23 (m, 1H), 2.54-2.76 (m, 4H), 3.15 (s, 3H), 3.24-3.42 (m, 4H), 3.52 (t, J=12 Hz, 2H), 3.61-3.75 (m, 3H), 3.81-4.02 (m, 3H), 4.18-4.30 (m, 1H), 4.34 (s, 2H), 6.78-6.82 (d, J=8.6 Hz, 2H), 6.98-7.11 (m, 5H); **EM** (E<sup>l</sup>) (% m/z): 468 [ión molecular (C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), 7 %], 319, 305, 272 [pico base (C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup>), 100 %], 229, 82, 28 (**anexo 10.6**).

Las señales observadas en el espectro de **RMN <sup>1</sup>H** para **[(S,S,S)(S,S,R)]-13** que hicieron posible la caracterización del mismo fueron: el doble y la señal múltiple que aparece en 1.78 y 2.23 ppm se atribuyen a los hidrógenos del puente de metileno del sistema diazabíclico presente en la molécula; la señal simple en 2.01 ppm corresponde a los hidrógenos de los dos metilos del anillo aromático en el nitrógeno de la acetamida; la señal simple que aparece en 3.15 ppm correspondiente al metoxilo del sustituyente en 4 en el anillo aromático; 2 hidrógenos del sistema 1-4 disustituido en el anillo aromático aparece entre 6.78 y 6.82 ppm y los 5 hidrógenos aromáticos restantes aparecen entre 6.98 y 7.11 ppm. La espectrometría de masas nos ayudó a ratificar la existencia del compuesto.

#### **8.4 (R)-12**

La síntesis químico-enzimática del oxirano (*R*)-2-[[4-(2-metoxietil)fenoxi]metil]oxirano **[(R)-12]** se realizó de acuerdo a lo reportado por Regla y col.,<sup>27</sup> empleando un método que consiste en la resolución enzimática de la mezcla racémica de la clorhidrina **rac-14**, aprovechando la capacidad de las lipasas para reconocer un isómero sobre otro. En este trabajo se optimizó el paso enzimático reportado por Regla,<sup>27</sup> el cual consiste en una transesterificación del estearato de vinilo con el enantiómero **(S)-14** selectivamente (esquema 16), en donde se disminuyó la cantidad de enzima empleada y se aumentó el número de ciclos de la misma (para un total de tres ciclos sin observar deterioro apreciable en la estereoselectividad ni en el tiempo de reacción), produciendo así un método que es más sustentable.



Esquema 16. Ruta de síntesis de (*R*)-12.

También se debe de tomar en cuenta que los métodos de resolución de alcoholes empleando lipasas, en comparación con otros (cristalización diastereomérica y modificación química), presentan ventajas, como son tiempos más cortos y condiciones menos agresivas de reacción, además de producir mezclas enantioméricamente enriquecidas, lo que tiene como consecuencia una menor cantidad de productos secundarios de reacción, aunque presentan la gran desventaja de que actúan con una gama muy reducida de sustratos debido a su alta especificidad. Por otra parte, los métodos resolutivos cinéticos sólo permiten alcanzar un 50 % de rendimiento, esto debido a que una mezcla racémica contiene 50 % de un enantiómero y 50 % del otro enantiómero.

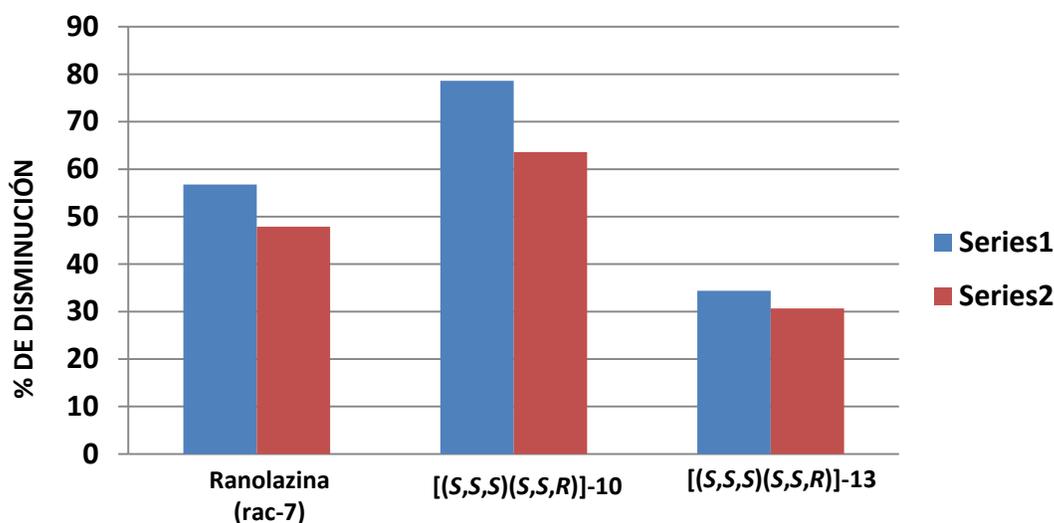
### 8.5 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE [(S,S,S)(S,S,R)]-10 y [(S,S,S)(S,S,R)]-13

La evaluación farmacológica se realizó analizando la respuesta vasomotora inducida por los compuestos [(S,S,S)(S,S,R)]-10 y [(S,S,S)(S,S,R)]-13, sobre anillos de aorta de ratas Wistar macho adultas precontraídos con fenilefrina (FEN  $10^{-5}$  M). En cada experimento se utilizó un par de anillos (con y sin endotelio) de la misma aorta y superfundidos en el mismo baño.

En una primera serie de experimentos se estudiaron los efectos de concentraciones crecientes ( $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  M) de los compuestos sobre la tensión máxima inducida por la FEN ( $10^{-5}$  M) (tabla 1 y gráfica 1).

	% de disminución de la tensión máxima	
	Con endotelio	Sin endotelio
Ranolazina (rac-7)	56.8	47.9
[(S,S,S)(S,S,R)]-10	78.6	63.6
[(S,S,S)(S,S,R)]-13	34.4	30.7

**Tabla 1.** Porcentaje de disminución de la tensión máxima inducida por FEN; concentración empleada para cada compuesto de  $10^{-6}$  M.

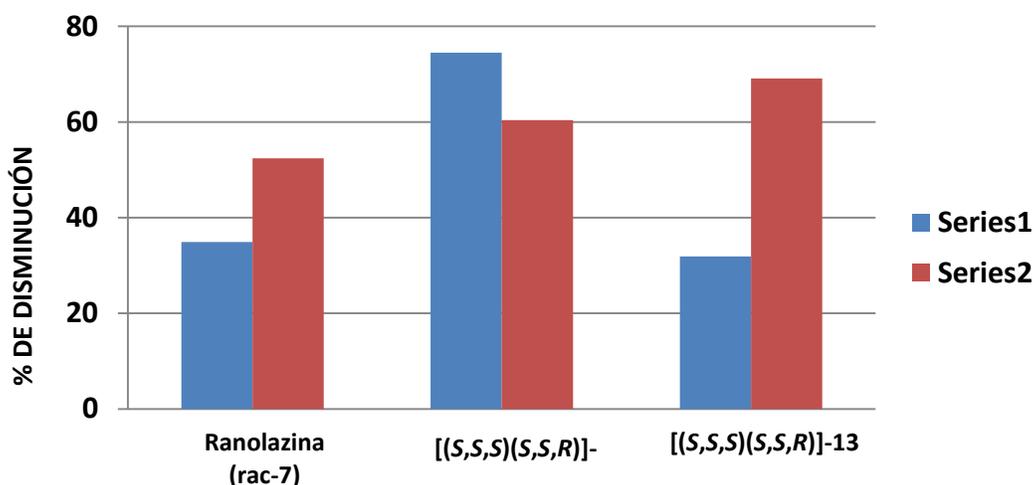


**Gráfica 1.** Porcentaje de disminución en la tensión máxima inducida por FEN; **Serie1:** con endotelio; **Serie2:** sin endotelio.

La segunda etapa consistió en evaluar la vía de acción de  $[(S,S,S)(S,S,R)]-10$  y  $[(S,S,S)(S,S,R)]-13$ , para lo cual se reprodujo el protocolo empleado y se evaluaron en presencia de L-NAME como inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (ON), e indometacina como inhibidor de ciclo-oxigenasa (CO) (tablas 2 y 3; gráficas 2 y 3).

	% de disminución de la tensión máxima en presencia de L-NAME	
	Con endotelio	Sin endotelio
Ranolazina (rac-7)	34.9	52.4
$[(S,S,S)(S,S,R)]-10$	74.5	60.4
$[(S,S,S)(S,S,R)]-13$	31.9	69.1

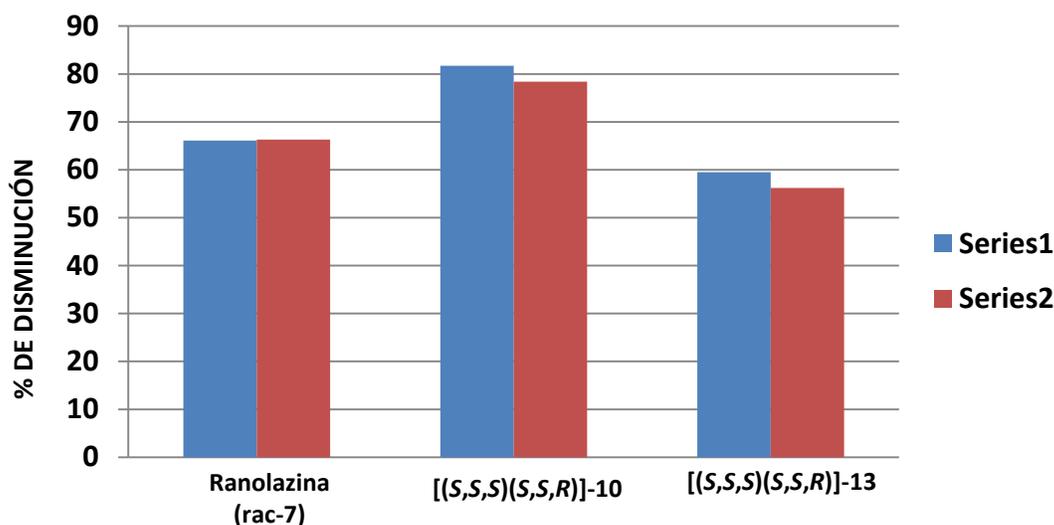
**Tabla 2.** Porcentaje de disminución en presencia de L-NAME, de la tensión máxima inducida por FEN; concentración empleada para cada compuesto de  $10^{-6}$  M.



**Gráfica 2.** Porcentaje de disminución en presencia de L-NAME, de la tensión máxima inducida por FEN; **Serie1:** con endotelio; **Serie2:** sin endotelio.

	% de disminución de la tensión máxima en presencia de indometacina	
	Con endotelio	Sin endotelio
Ranolazina (rac-7)	66.1	66.3
$[(S,S,S)(S,S,R)]-10$	81.7	78.4
$[(S,S,S)(S,S,R)]-13$	59.5	56.2

**Tabla 3.** Porcentaje de disminución en presencia de indometacina, de la tensión máxima inducida por FEN; concentración empleada para cada compuesto de  $10^{-6}$  M.



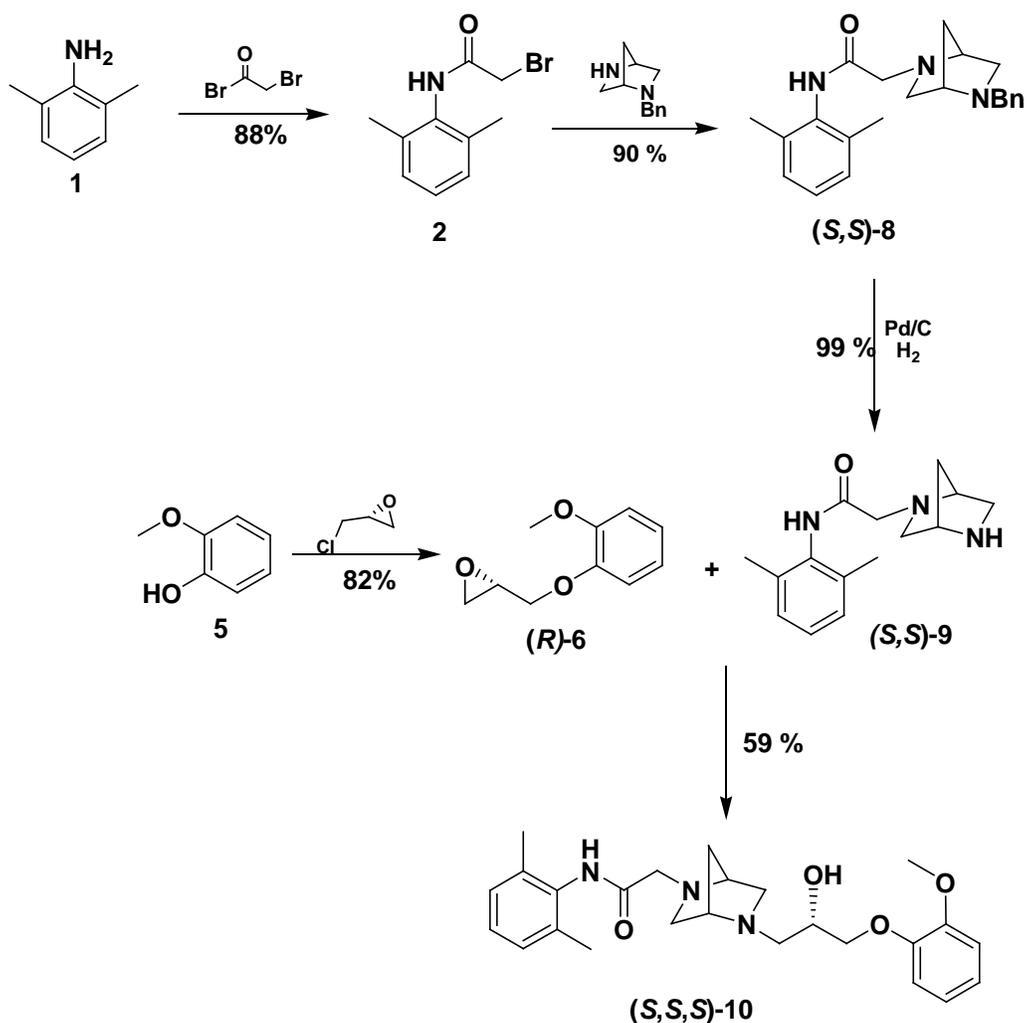
**Gráfica 3.** Porcentaje de disminución en presencia de indometacina, de la tensión máxima inducida por FEN; **Serie1:** con endotelio; **Serie2:** sin endotelio.

Los resultados anteriores muestran que el compuesto **[(S,S,S)(S,S,R)]-10** tiene una mayor actividad que la ranolazina y que presenta, al igual que ésta, dos distintos tipos de mecanismos de acción: inducción de la liberación de óxido nítrico y promoción de la liberación de algún prostanoides, con la consecuente relajación de los anillos aórticos y por tanto, la disminución de la presión aortica, disminuyendo de esta manera los factores determinantes del episodio isquémico. Por otro lado, el compuesto **[(S,S,S)(S,S,R)]-13** mostró actividad sólo mediante el mecanismo relacionado con la liberación de algún prostanoides, pero con menor actividad en comparación con ranolazina y con el compuesto **[(S,S,S)(S,S,R)]-10**.

En vista de los resultados obtenidos, se decidió sintetizar únicamente uno de los epímeros del compuesto **[(S,S,S)(S,S,R)]-10** y por tanto, postergar la síntesis de los epímeros del híbrido diazabíclico de ranolazina-metoprolol **[(S,S,S)(S,S,R)]-13**, el cual presentó resultados menos trascendentes de actividad como agente anti-anginoso, pero con la expectativa de ser evaluado como agente anti-hipertensivo.

### 8.6 SÍNTESIS DE (S,S,S)-10

Para la preparación del epímero diazabíclico (S,S,S)-10 fue necesario sintetizar el oxirano (S)-6 mediante la apertura de la (R)-epiclorohidrina con la sal sódica del compuesto 5, obteniendo un rendimiento de 82 %. La apertura del oxirano del compuesto (S)-6 con la diamina (S,S)-9 generó el epímero puro (S,S,S)-10 con un rendimiento del 59 % (esquema 17). El rendimiento global de síntesis para el epímero (S,S,S)-10 partiendo de 1 fue de 38 %.



Esquema 17. Ruta de síntesis de (S,S,S)-10.

El compuesto (S)-6 se caracterizó por comparación de su punto de fusión y valor de rotación específica con los datos reportados en la literatura

El compuesto final **(S,S,S)-10** se caracterizó por **RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz):  $\delta$  1.79 (dd,  $J_1=16.3$  Hz,  $J_2=8.7$  Hz, 2H), 2.21 (s, 6H), 2.79-2.84 (m, 4H), 2.98 (dd,  $J_1=34.9$  Hz,  $J_2=9.9$  Hz, 2H), 3.36 (dd,  $J_1=35.8$  Hz,  $J_2=16.8$  Hz, 2H), 3.44 (d,  $J=17.8$  Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.94-4.07 (m, 3H), 4.16 (br, 1H), 6.87-6.95 (m, 4H), 7.08-7.10 (m, 3H), 8.65 (s, 1H); **RMN <sup>13</sup>C** (300 MHz):  $\delta$  18.64, 34.34, 55.87, 57.71, 58.53, 58.84, 59.41, 63.51, 63.56, 67.63, 72.00, 111.97, 114.62, 120.97, 121.91, 127.25, 128.26, 133.76, 135.16, 148.23, 149.77, 169.28 (**anexo 10.7**).

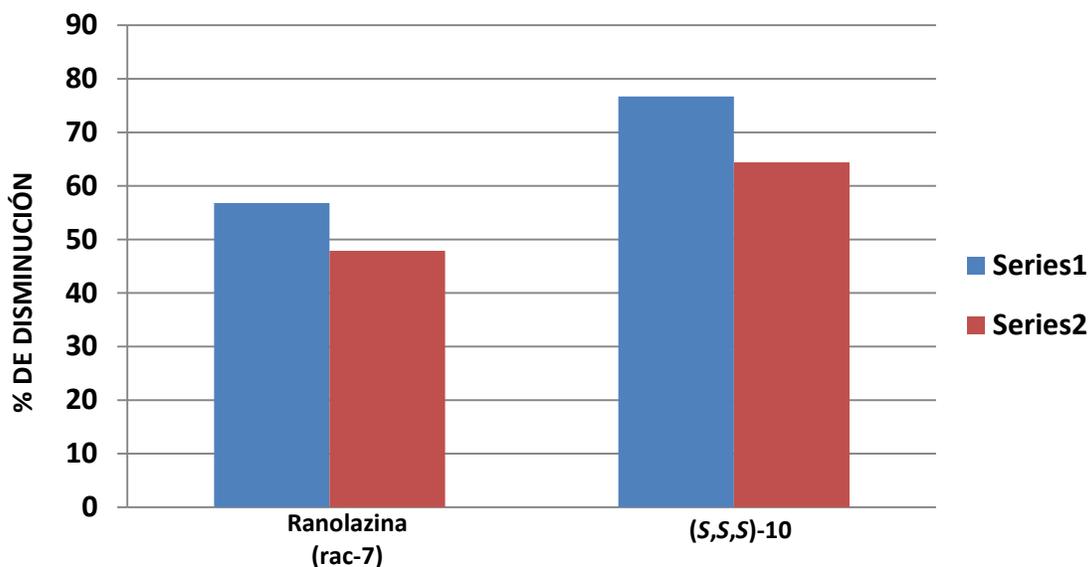
Las señales observadas en el espectro de **RMN <sup>1</sup>H** para **(S,S,S)-10** que hicieron posible la caracterización del mismo fueron: El doble de dobles que aparece en 1.79 ppm corresponde a los hidrógenos del puente de metileno del sistema diazabíclico presente en la molécula; la señal simple en 2.21 ppm corresponde a los hidrógenos de los dos metilos del anillo aromático en el nitrógeno de la acetamida; la señal múltiple que aparece entre 2.79 y 2.84 ppm corresponde a los hidrógenos de uno de los metilenos junto con los de los centros asimétricos del sistema diazabíclico; el dobles de dobles que aparece en 2.98 ppm corresponde a los hidrógenos del metileno de la cadena de isopropilo que se encuentra ente el nitrógeno y el carbono asimétrico del alcohol; el doble de dobles que aparece en 3.36 ppm corresponde a los hidrógenos de uno de los metilenos del diazabíclico; la señal doble que aparece entre 3.44 ppm corresponde a los hidrógenos del metileno  $\alpha$  al carbonilo; la señal simple de los hidrógenos del metoxilo aparece en 3.83 ppm; la señal múltiple que aparece entre 3.94 y 4.07 ppm corresponde a los hidrógenos del metileno de la cadena de isopropilo entre el carbono asimétrico y el oxígeno del arilo junto con el hidrogenó del mismo carbono asimétrico; la señal simple ensanchada que se encuentra en 4.16 ppm corresponde al hidrógeno del alcohol; los hidrógenos del sistema aromático provenientes del fenóxido aparecen entre 6.87 y 6.95 ppm; los hidrógenos del sistema aromático del nitrógeno de la acetamida aparecen entre 7.08-7.10 ppm; el hidrógeno ácido de la amida aparece en 8.65 ppm. El espectro de **RMN <sup>13</sup>C** permitió observar el carbonilo de la amida, el cual aparece en 169.19 ppm.

### 8.7 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE (S,S,S)-10

La evaluación farmacológica del epímero (S,S,S)-10 se realizó cuantificando la respuesta vasomotora inducida sobre anillos de aorta de ratas Wistar macho adultas, precontraídos con FEN ( $10^{-5}$  M). En cada experimento se utilizó un par de anillos (con y sin endotelio) de la misma aorta y superfundidos en el mismo baño. En una primera serie de experimentos se estudiaron los efectos de concentraciones crecientes ( $10^{-6}$  - $10^{-4}$  M) de los compuestos sobre la tensión máxima inducida por la FEN ( $10^{-5}$  M) (tabla 4 y gráficas 4).

	% de disminución de la tensión máxima	
	Con endotelio	Sin endotelio
Ranolazina (rac-7)	56.8	47.9
(S,S,S) -10	76.7	64.4

**Tabla 4.** Porcentaje de disminución de la tensión máxima inducida por FEN; concentración empleada para cada compuesto de  $10^{-6}$  M.

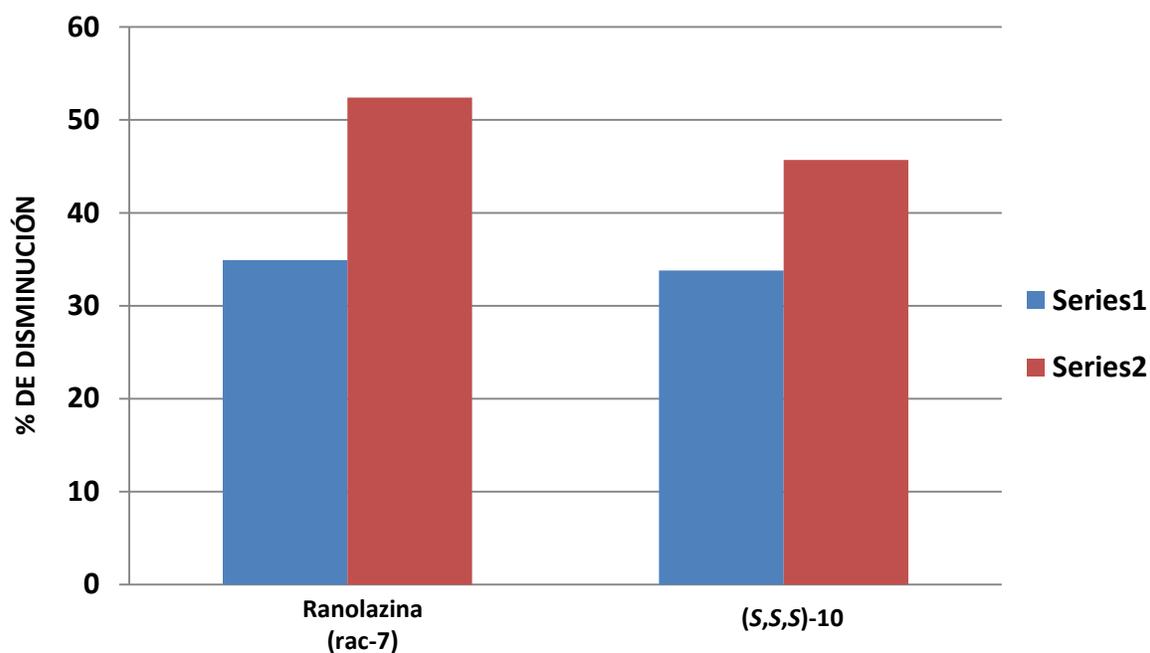


**Gráfica 1.** Porcentaje de disminución en la tensión máxima inducida por FEN; **Serie1:** con endotelio; **Serie2:** sin endotelio.

La segunda etapa consistió en evaluar la vía de acción de (S,S,S)-10, para lo cual se reprodujo el protocolo empleado y se evaluó en presencia de L-NAME como inhibidor de la síntesis de ON e indometacina como inhibidor de CO (tablas 4,5 y 6; gráficas 4,5 y 6).

	% de disminución de la tensión máxima en presencia de L-NAME	
	Con endotelio	Sin endotelio
Ranolazina (rac-7)	34.9	52.4
(S,S,S)-10	33.8	45.7

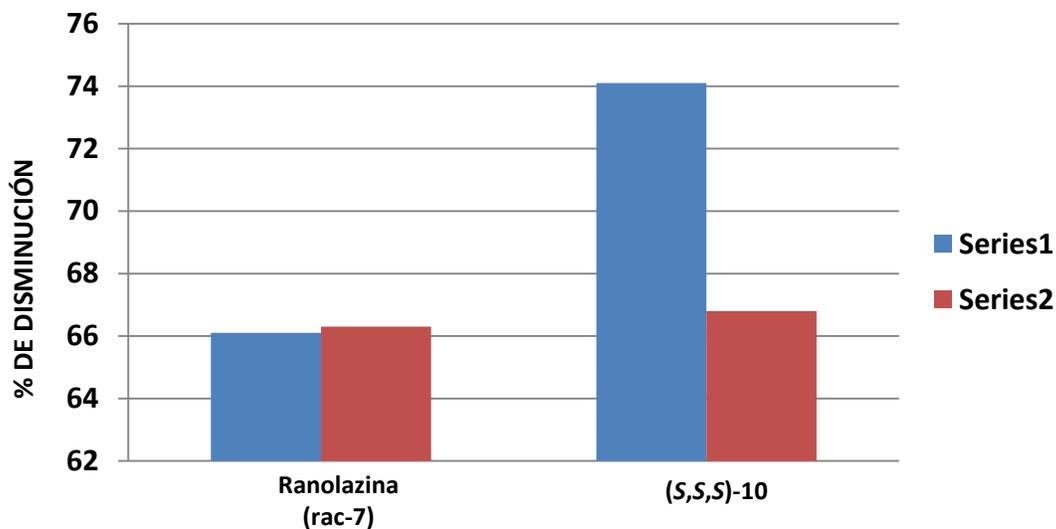
**Tabla 5.** Porcentaje de disminución en presencia de L-NAME, de la tensión máxima inducida por FEN; concentración empleada para cada compuesto de  $10^{-6}$  M.



**Gráfica 5.** Porcentaje de disminución en presencia de L-NAME, de la tensión máxima inducida por FEN; **Serie1:** con endotelio; **Serie2:** sin endotelio.

	% de disminución de la tensión máxima en presencia de indometacina	
	Con endotelio	Sin endotelio
Ranolazina (rac-7)	66.1	66.3
(S,S,S)-10	74.1	66.8

**Tabla 3.** Porcentaje de disminución en presencia de indometacina, de la tensión máxima inducida por FEN; concentración empleada para cada compuesto de  $10^{-6}$  M.



**Gráfica 3.** Porcentaje de disminución en presencia de indometacina, de la tensión máxima inducida por FEN; **Serie1:** con endotelio; **Serie2:** sin endotelio.

Los resultados anteriores muestran que el compuesto **(S,S,S)-10** presenta mayor actividad como agente antianginoso que la ranolazina, y que este efecto es producido solamente por el mecanismo que induce la liberación de óxido nítrico.

## 9. CONCLUSIONES

Se confirmó la viabilidad de sintetizar los análogos diazabíclicos de ranolazina **[(S,S,S)(S,S,R)]-10**, **(S,S,S)-10** y el híbrido diazabíclico de ranolazina-metoprolol **[(S,S,S)(S,S,R)]-13**, a partir de materias primas que fueron fácilmente accesibles y aplicando estrategias químicas y enzimáticas de síntesis.

Se mejoraron los procesos descritos en la literatura para la obtención de ranolazina (**rac-7**) y de (*R*)-2-[[4-(2-metoxietil)fenoxi]metil]oxirano **[(R)-12]**.

La ranolazina induce, en los anillos aórticos con endotelio, la síntesis/liberación de ON y la liberación de algún prostanoide vasoconstrictor.

El compuesto **[(S,S,S)(S,S,R)]-10** induce una relajación en mayor magnitud que la ranolazina, dependiente de la dosis y predominantemente independiente del endotelio, además de que en los anillos aórticos con endotelio induce la síntesis/liberación de ON y la liberación de algún prostanoide vasoconstrictor.

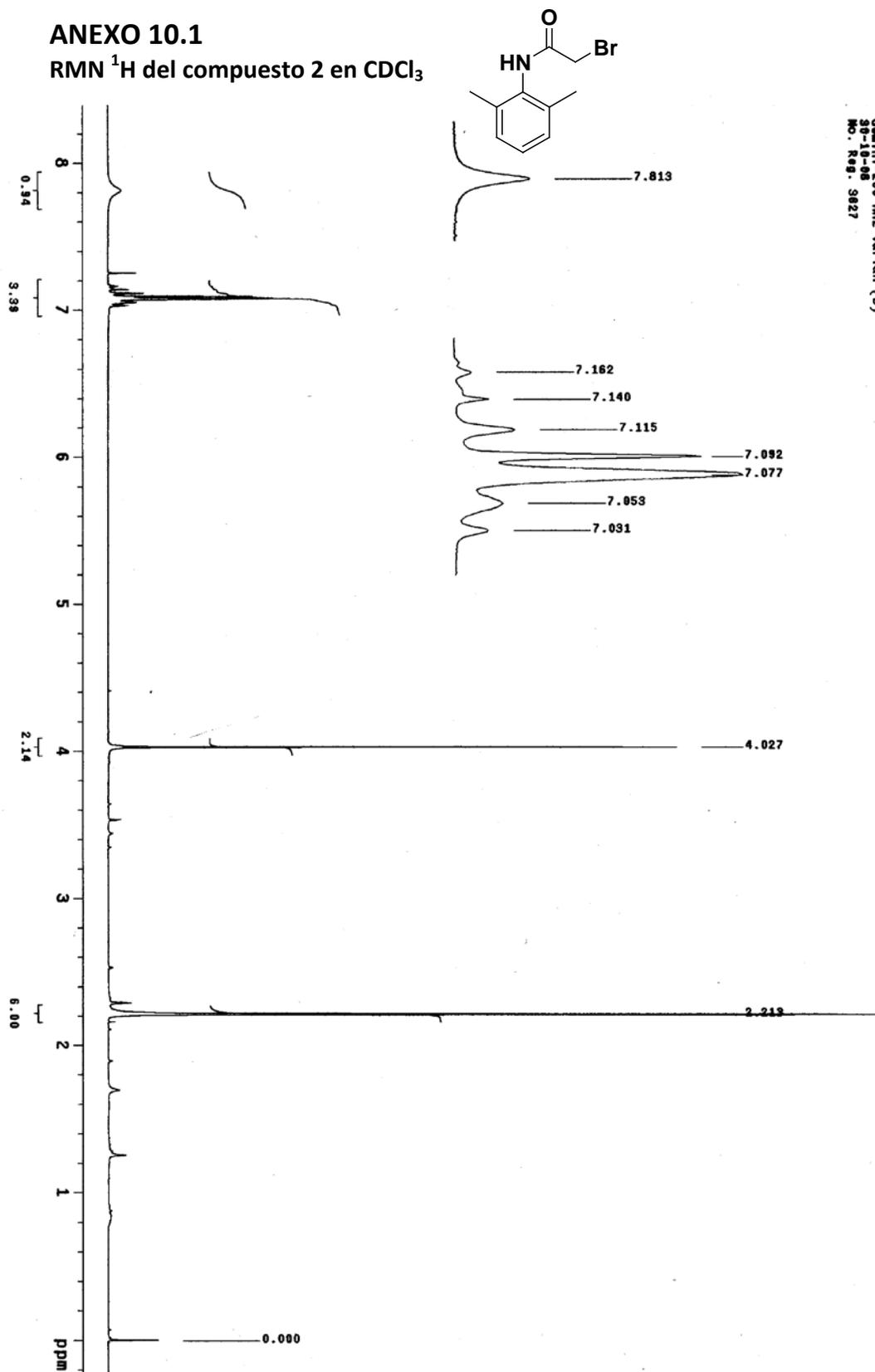
El compuesto **[(S,S,S)(S,S,R)]-13**, además de inducir, en forma directa, una relajación del músculo liso vascular induce, en el endotelio, la síntesis/liberación de algún prostanoide vasoconstrictor, pero en menor magnitud que ranolazina.

El compuesto **(S,S,S)-10** induce una relajación de mayor magnitud que ranolazina, promovida por la síntesis/liberación de ON en el endotelio.

## 10. ANEXOS

ANEXO 10.1

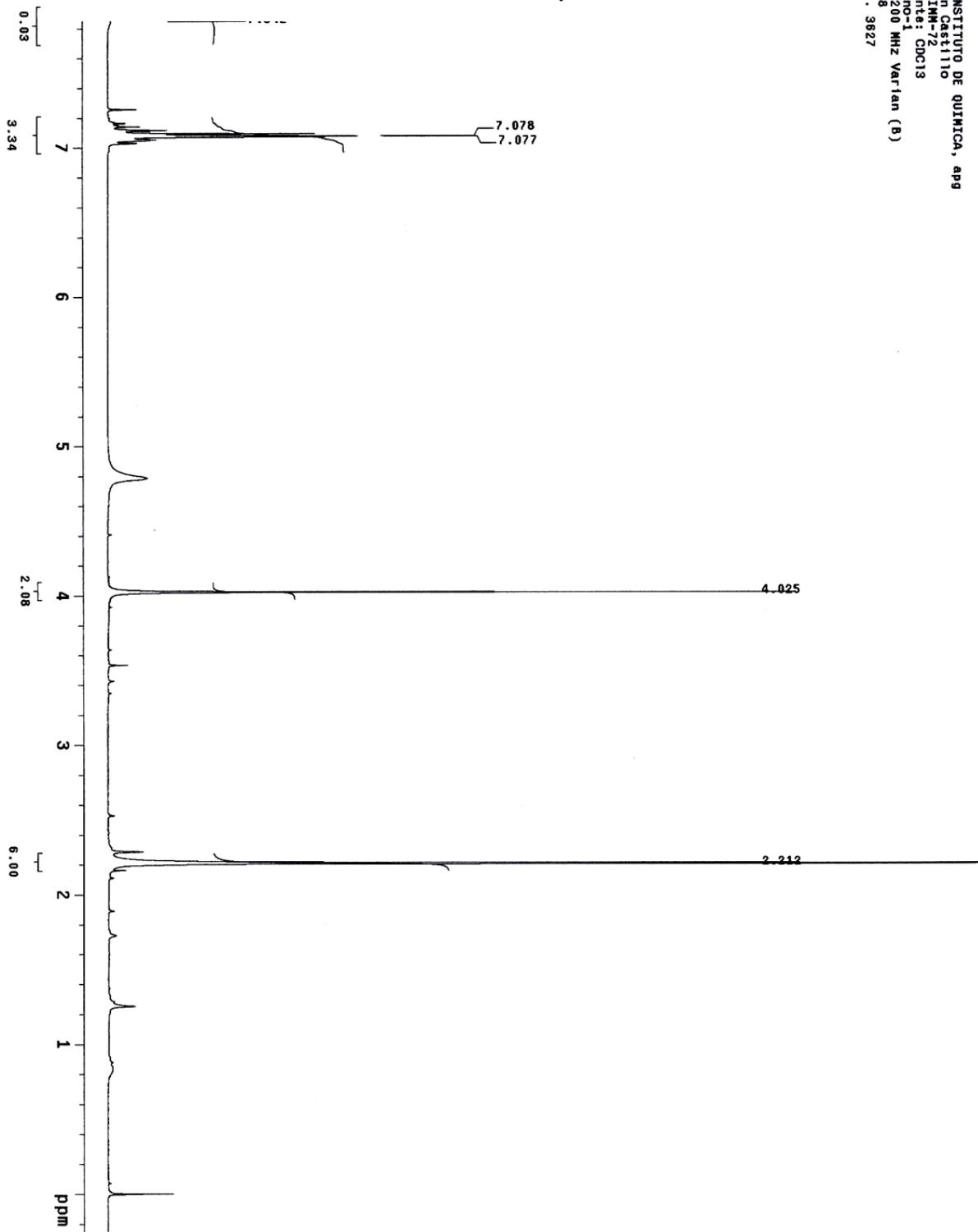
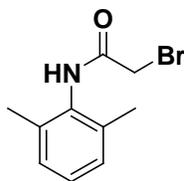
RMN <sup>1</sup>H del compuesto 2 en CDCl<sub>3</sub>



UNAM, INSTITUTO DE QUÍMICA, APS  
Dr. Ivan Castillo  
Diana, RMN-20013  
Hidropono-1  
Quimi-200 MHz Varian (B)  
30-10-06  
No. Reg. 5827

**ANEXO 10.1**

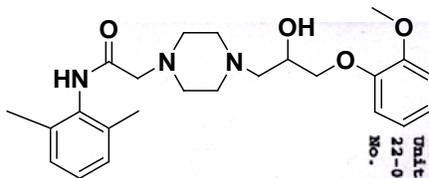
RMN <sup>1</sup>H del compuesto 2 en CDCl<sub>3</sub>  
Intercambio con D<sub>2</sub>O



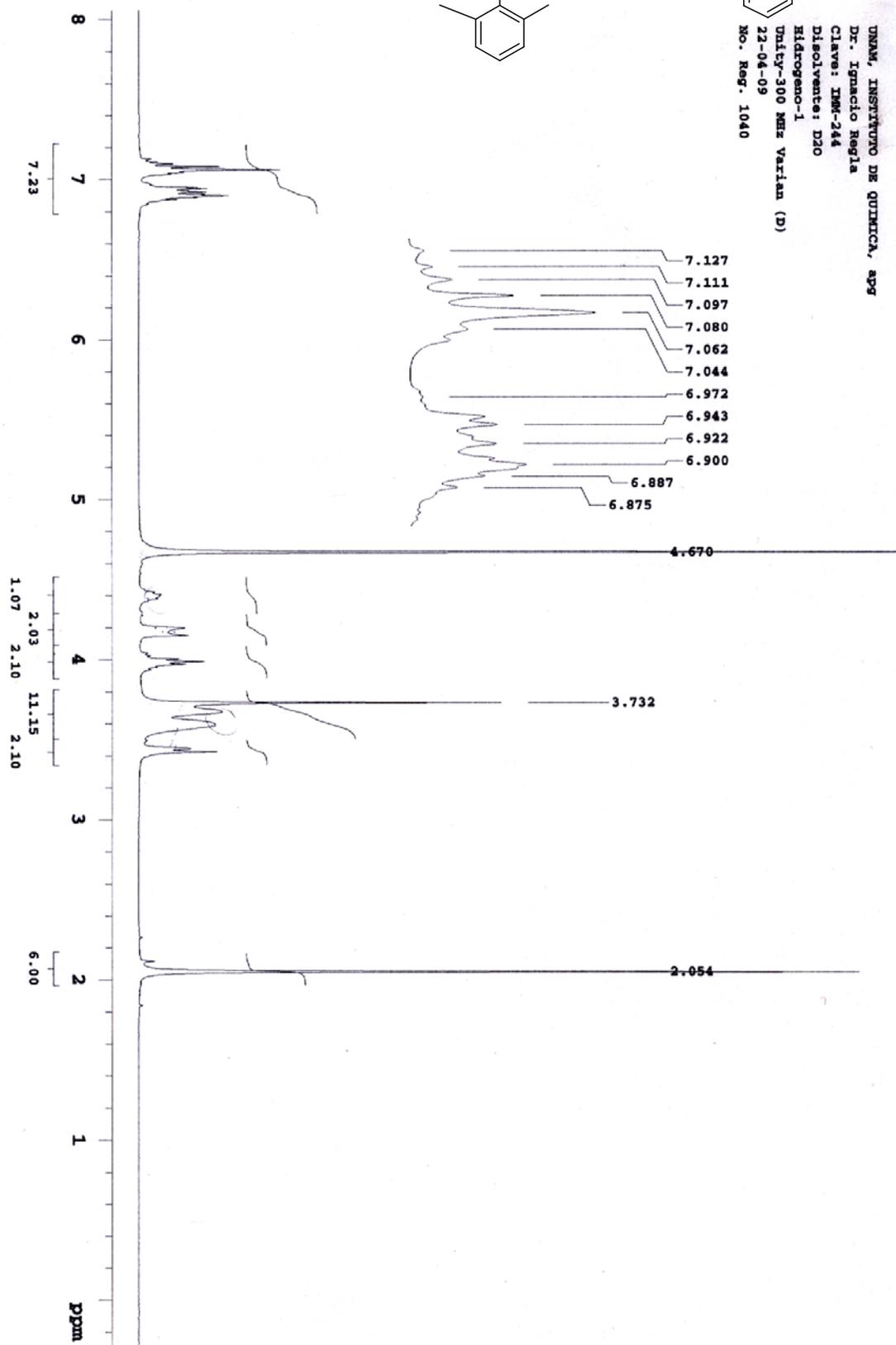
UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg  
Dr. Ivan Castillo  
Clave: IMN-72  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
Hidrogeno-1  
Gemini 200 MHz Varian (8)  
30-10-08  
No. Reg. 3827  
4d20

ANEXO 10.2

RMN <sup>1</sup>H del compuesto *rac-7* en D<sub>2</sub>O

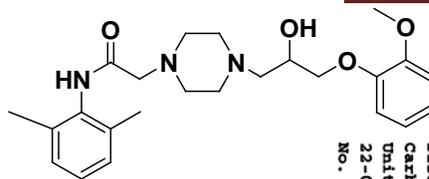


UNAM, INSTITUTO DE QUÍMICA, apq  
Dr. Ignacio Regla  
Clave: IQM-244  
Disolvente: D2O  
Hidrogeno-1  
Unity-300 MHz Varian (D)  
22-04-09  
No. Reg. 1040

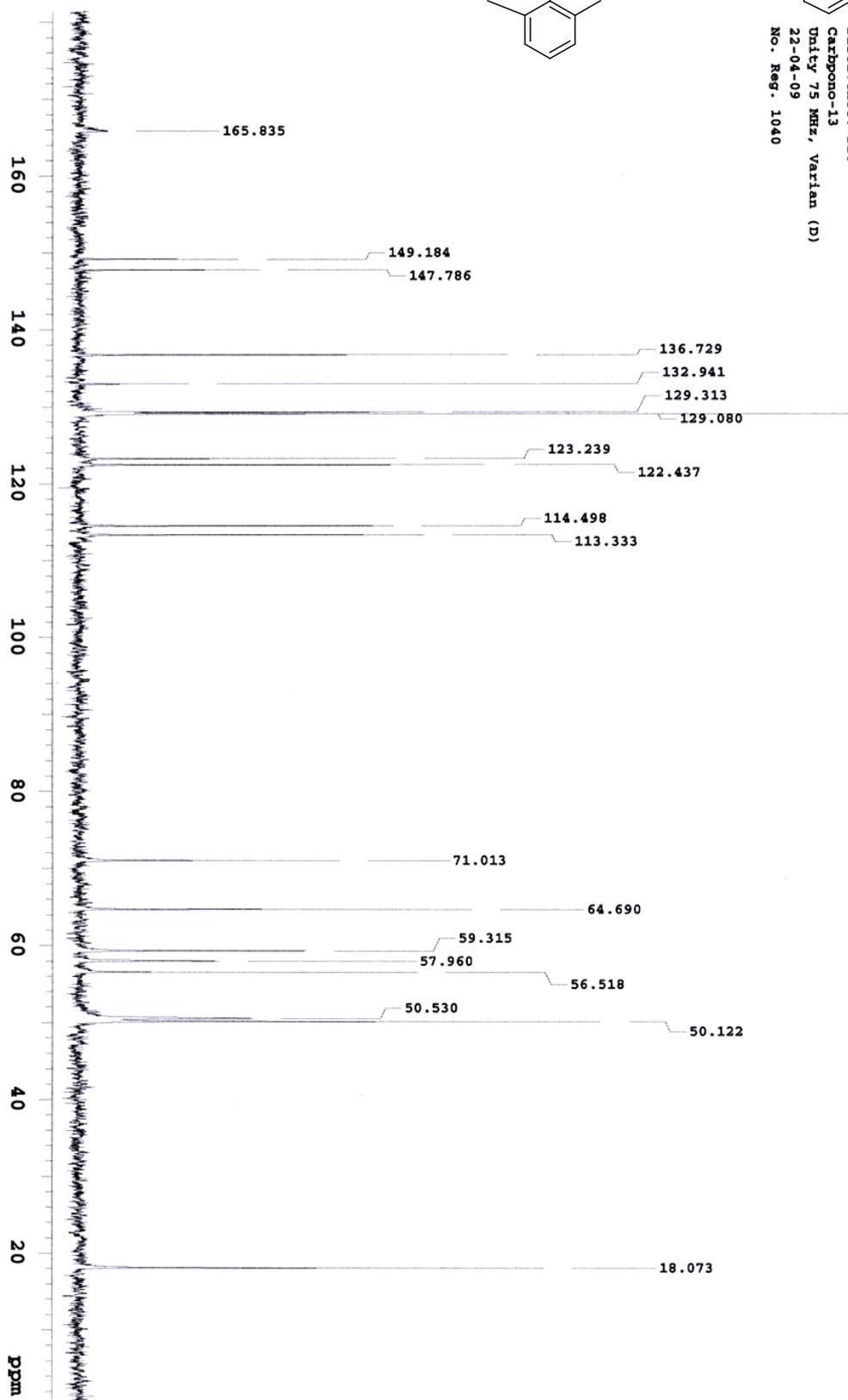


ANEXO 10.2

RMN <sup>13</sup>C del compuesto *rac-7* en D<sub>2</sub>O



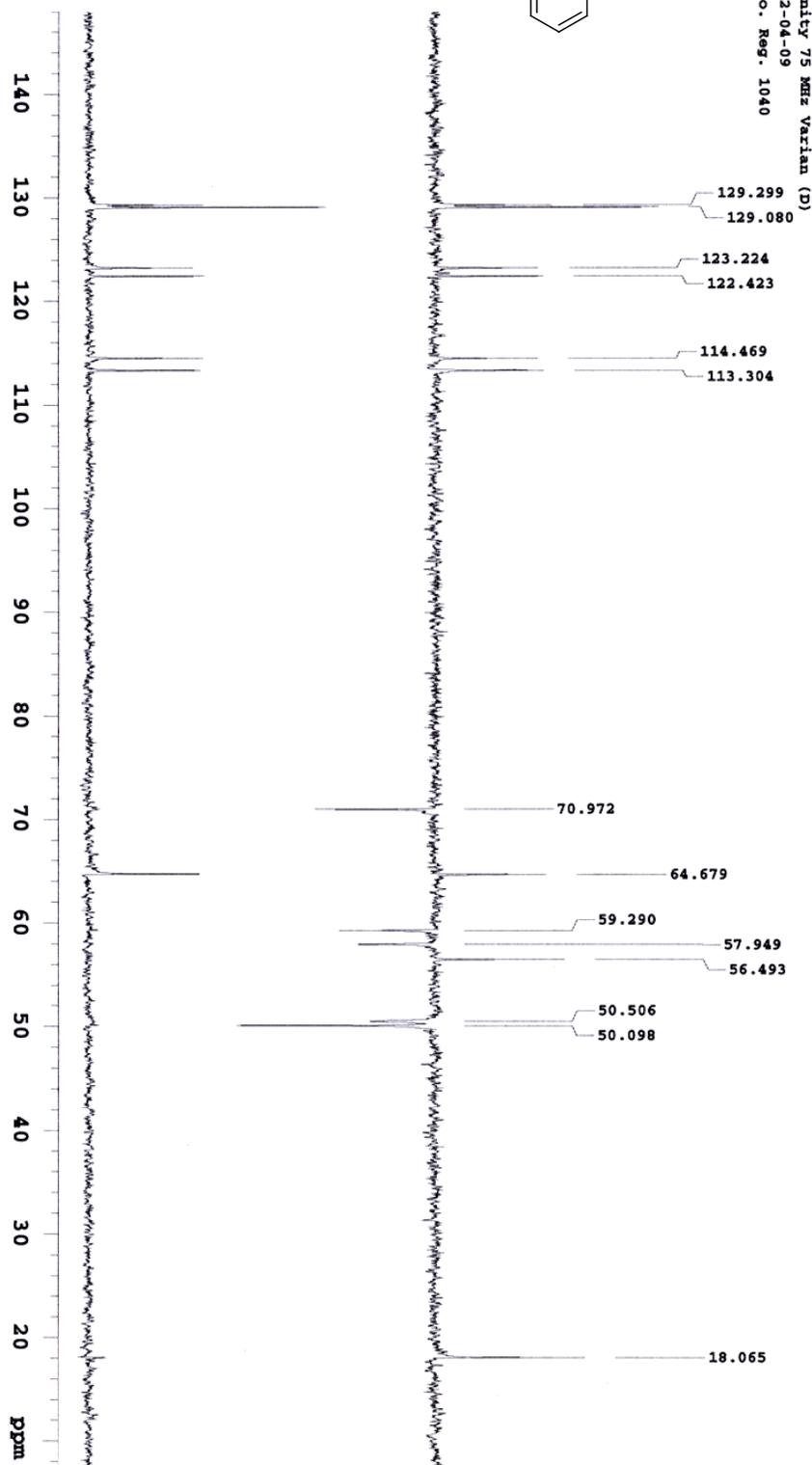
UNAM, INSTITUTO DE QUÍMICA, APG  
Dr. Ignacio Regia  
Clave: IMM-244  
Disolvente: D<sub>2</sub>O  
Carbóno-13  
Unity 75 MHz, Varian (D)  
22-04-09  
No. Reg. 1040



### ANEXO 10.2

RMN <sup>13</sup>C del compuesto *rac-7* en D<sub>2</sub>O

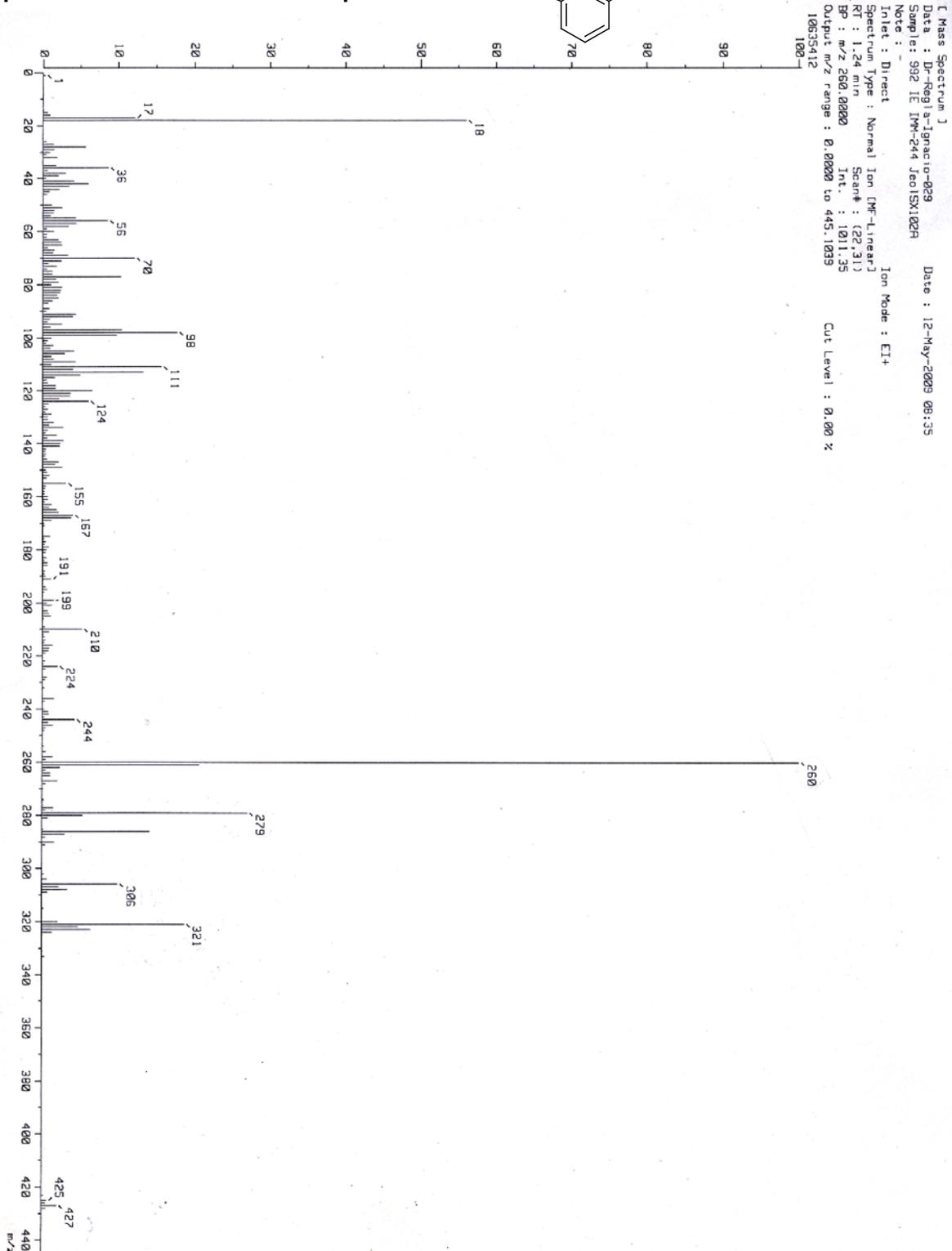
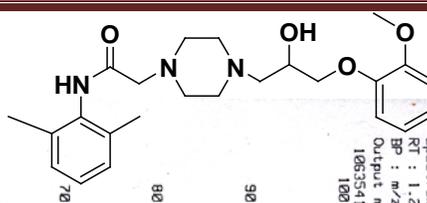
Experimento DEPT



UNAM, INSTITUTO DE QUÍMICA, apq  
Dr. Ignacio Regla  
Clave: IM-244  
Disolvente: D<sub>2</sub>O  
DEPT  
Duty 75 MHz Varian (D)  
23-04-09  
No. Reg. 1040

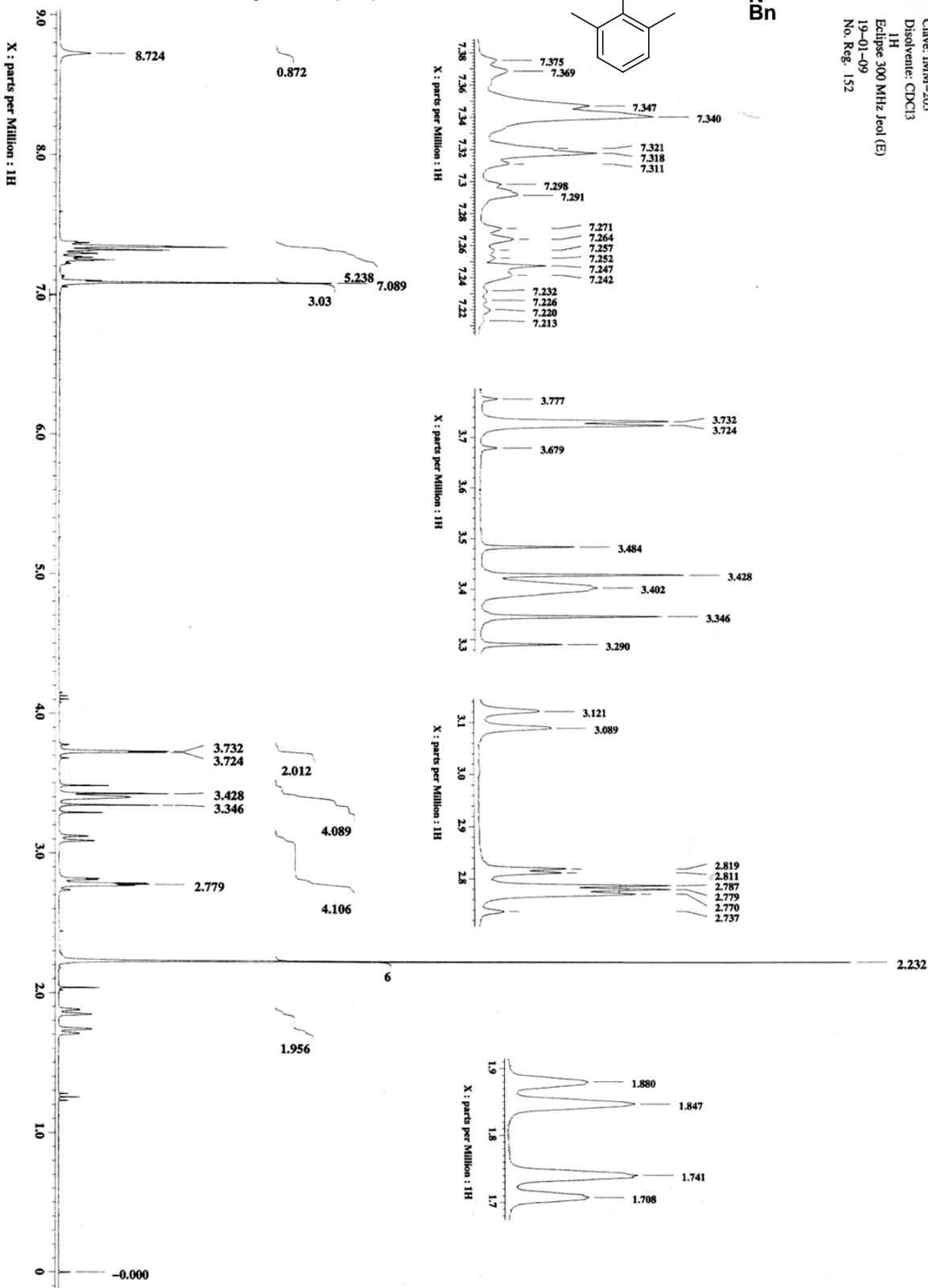
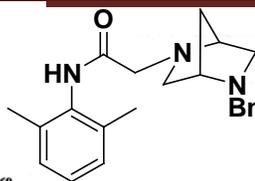
## ANEXO 10.2

### Espectrometría de masas del compuesto *rac-7*



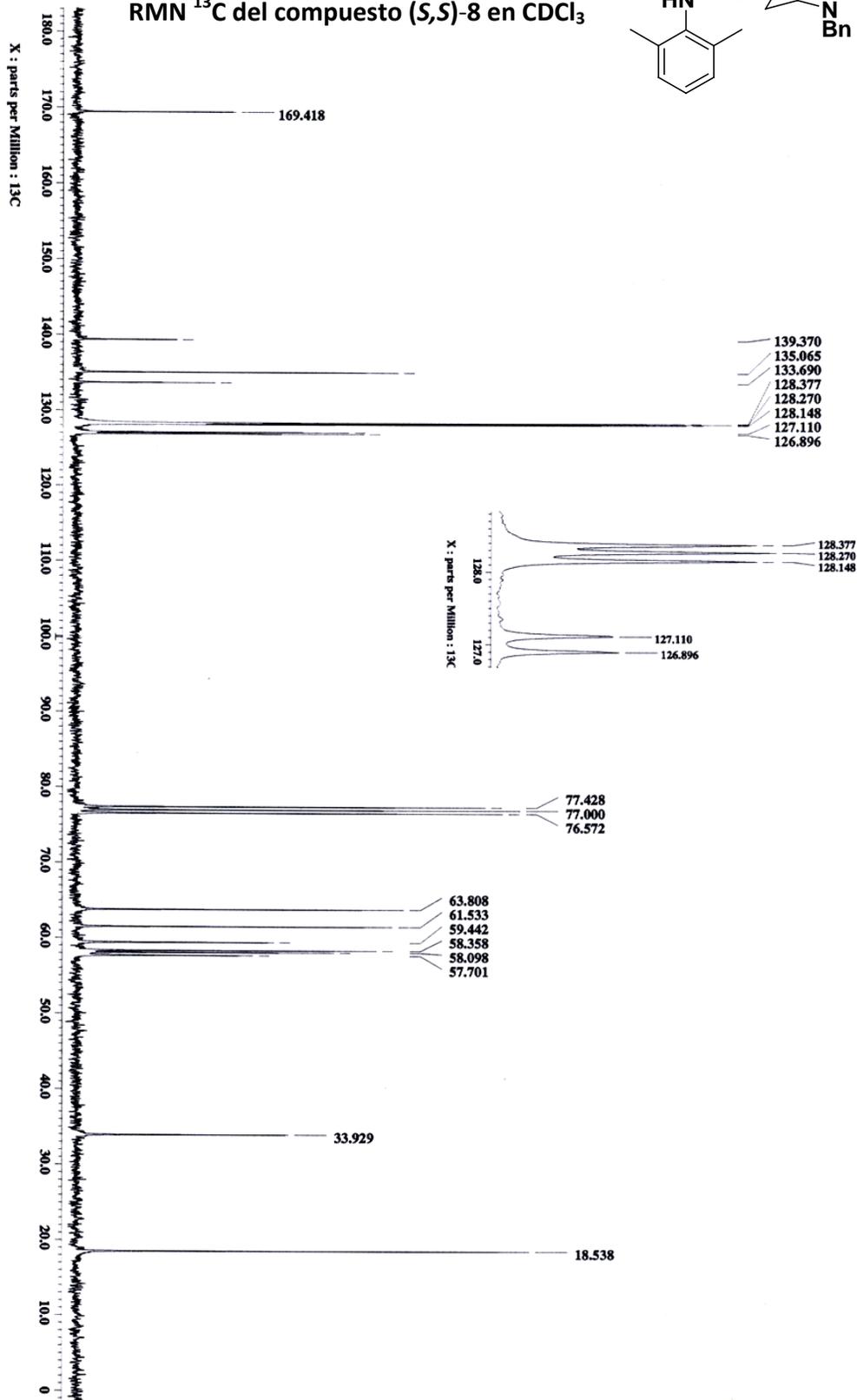
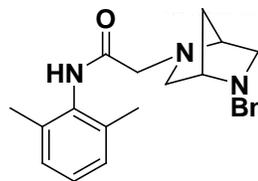
**ANEXO 10.3**

RMN <sup>1</sup>H del compuesto (S,S)-8 en CDCl<sub>3</sub>



UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apc  
Dr. Ignacio Regla  
Clave: IMM-205  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
Eclipse 300 MHz Jeol (E)  
1H  
19-01-09  
No. Reg. 152

**ANEXO 10.3**  
RMN <sup>13</sup>C del compuesto (S,S)-8 en CDCl<sub>3</sub>

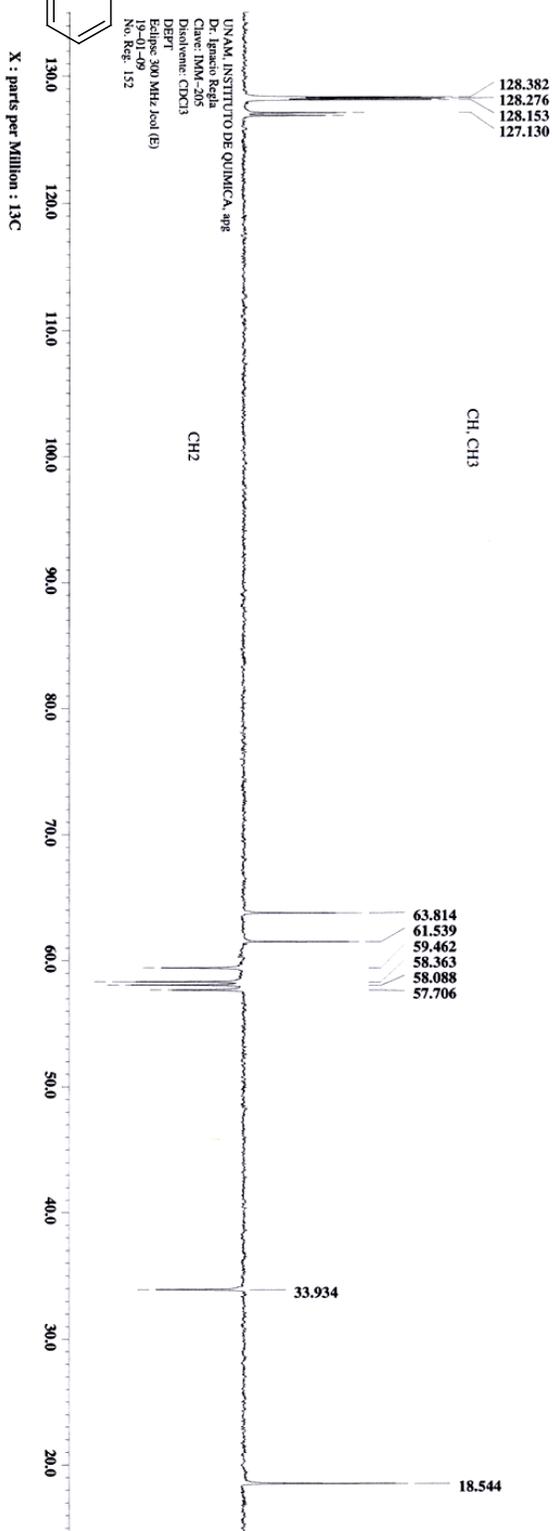
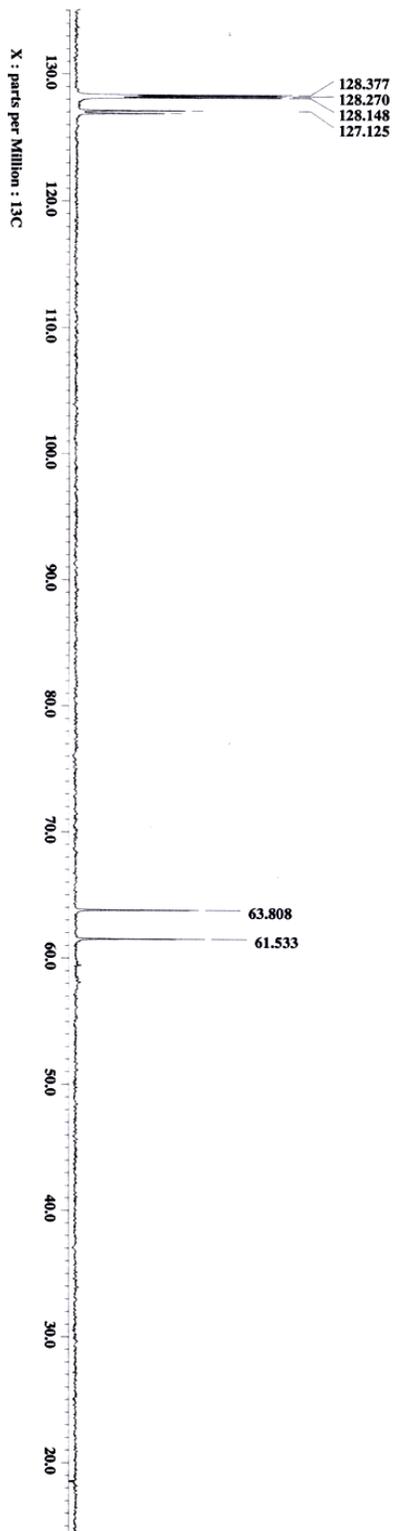
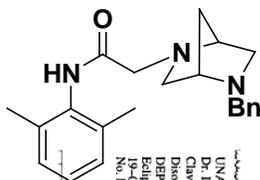


UNAM, INSTITUTO DE QUÍMICA, apg  
Dr. Ignacio Regla  
Clave: IMM-205  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
13C  
Eclipse 300 MHz Jeol (E)  
19-01-09  
No. Reg. 152

### ANEXO 10.3

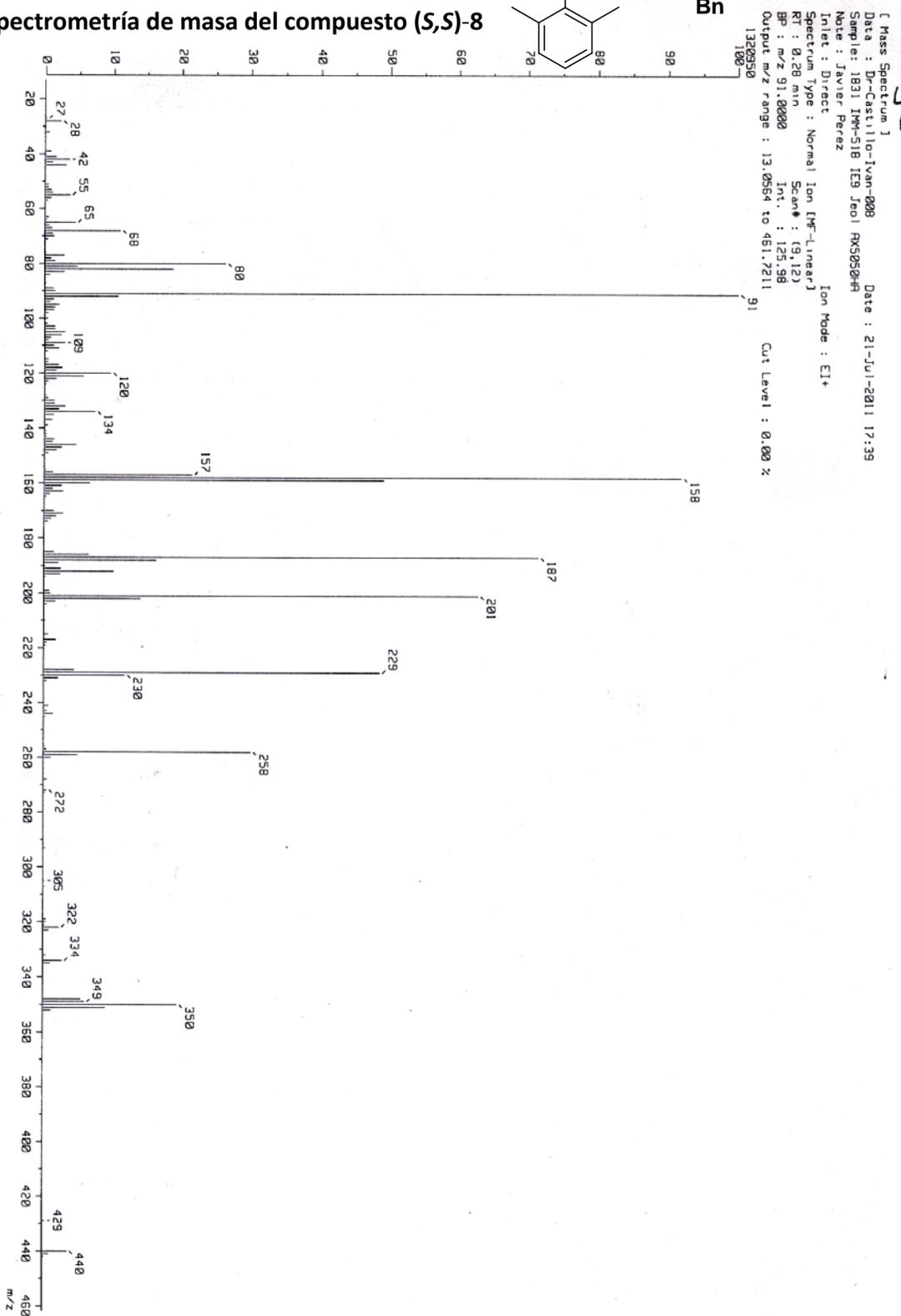
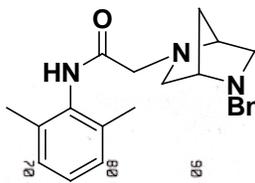
RMN <sup>13</sup>C del compuesto (S,S)-8 en CDCl<sub>3</sub>

Experimento DEPT



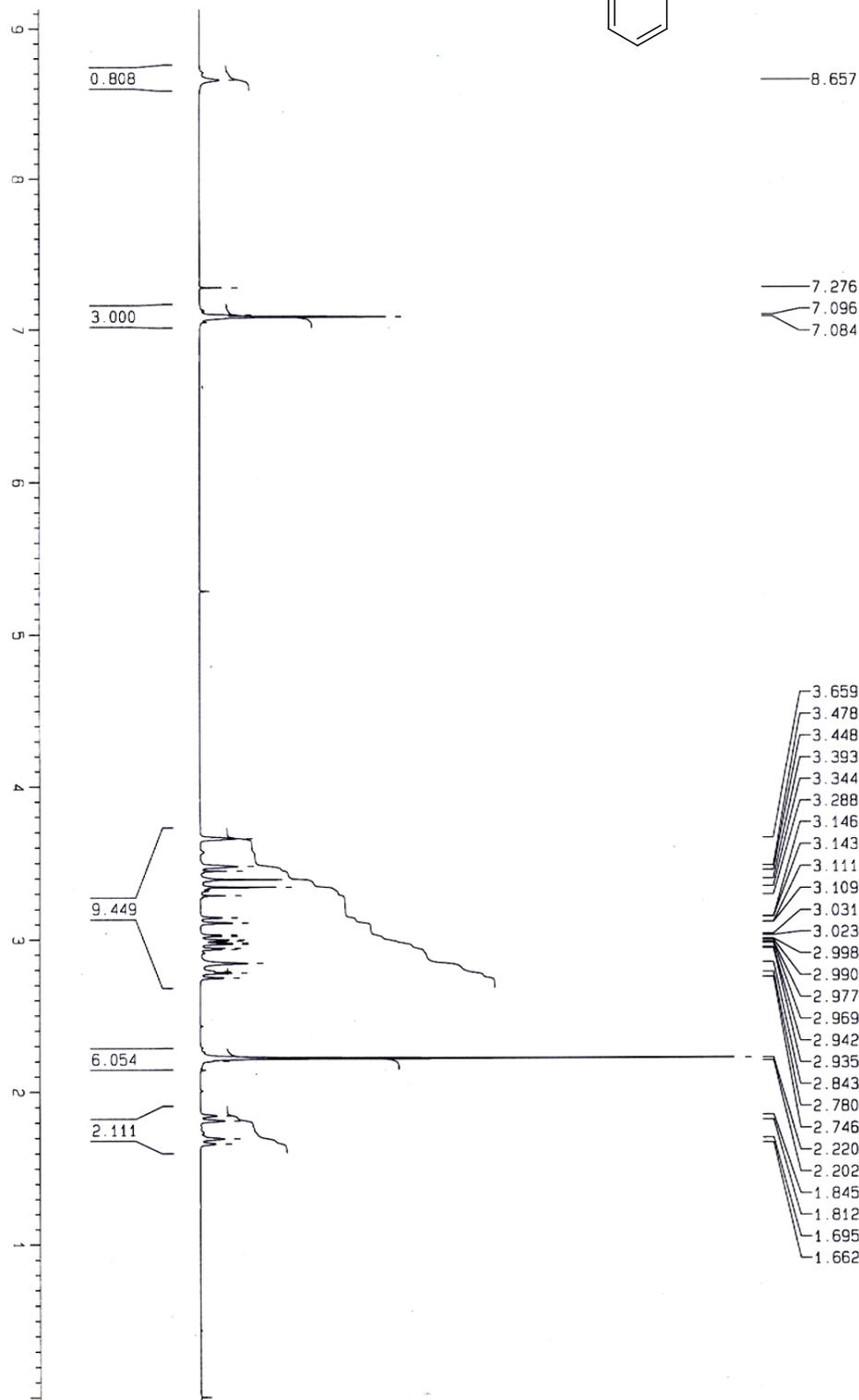
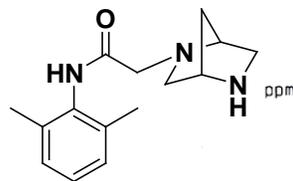
### ANEXO 10.3

#### Spectrometría de masa del compuesto (S,S)-8



**ANEXO 10.4**

RMN <sup>1</sup>H del compuesto (S,S)-9 en CDCl<sub>3</sub>

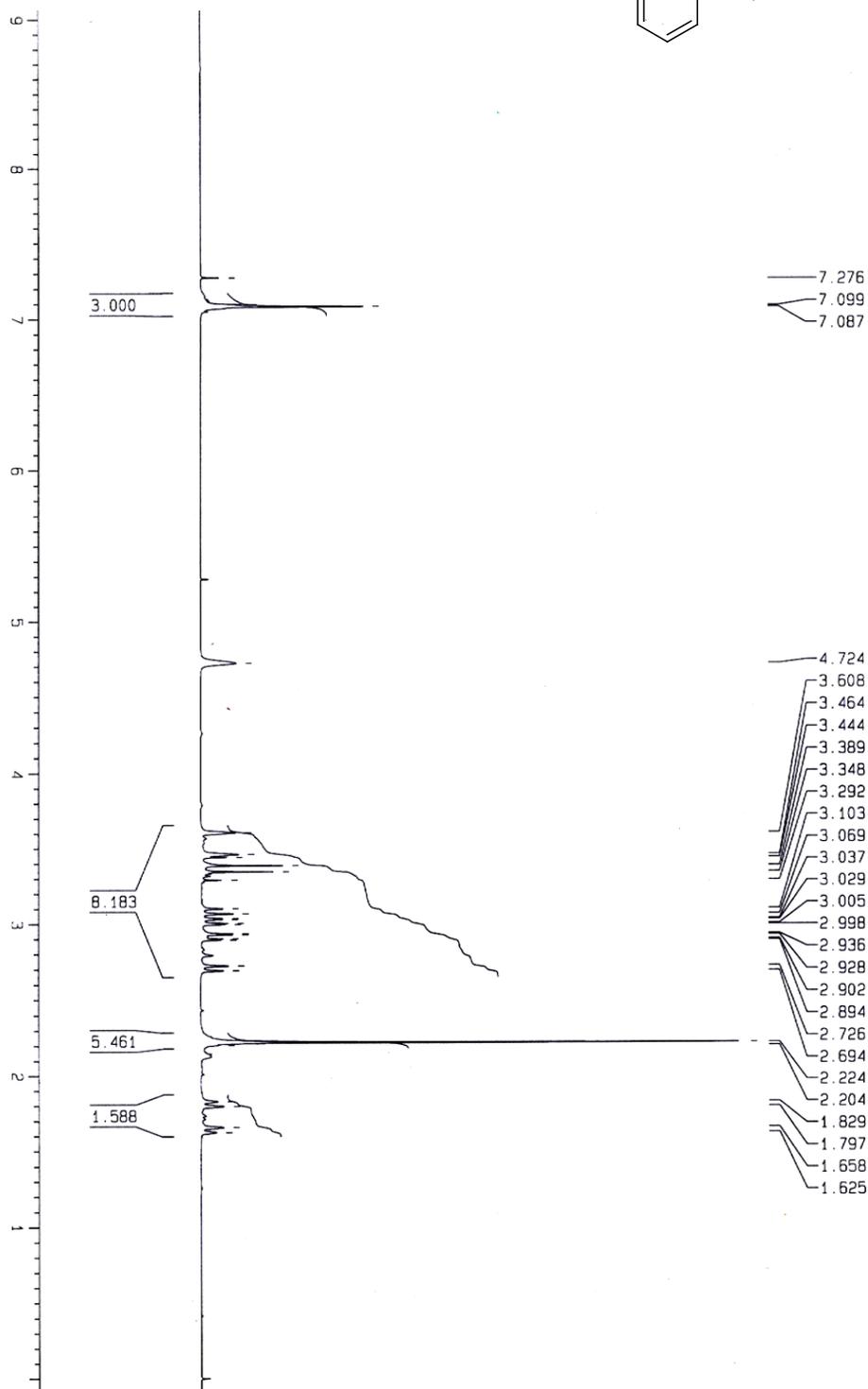
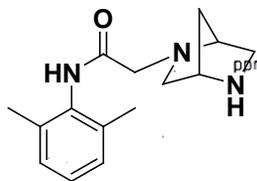


Instituto de Química UNAM (IQIG)  
Dr. I. Regla  
Clave: IM-75  
No. de Registro: 3792  
Experimento: 1H  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
Bruker-Avance (F) 300 MHz  
18-11-2008

ANEXO 10.4

RMN <sup>1</sup>H del compuesto (S,S)-9 en CDCl<sub>3</sub>

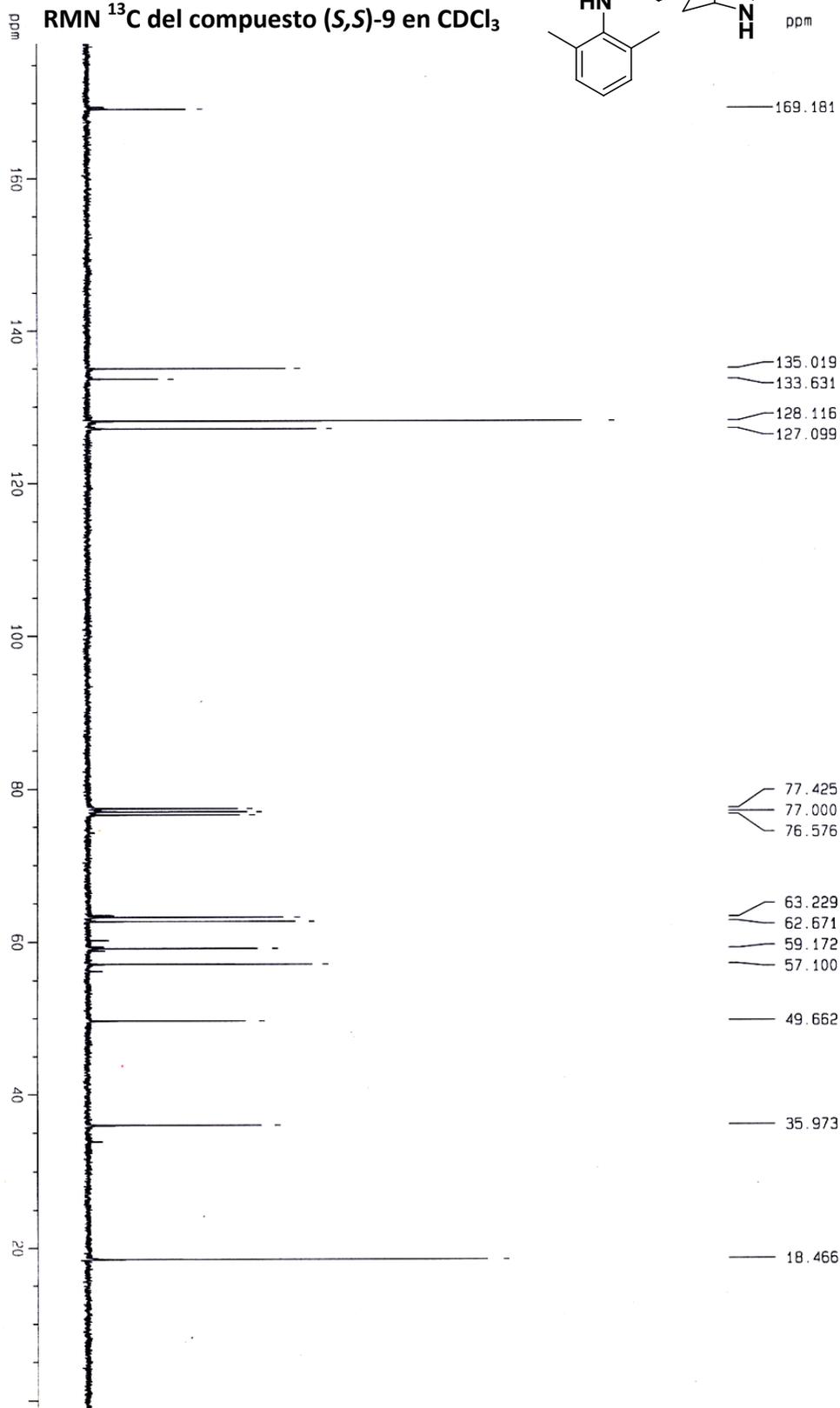
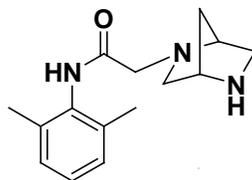
Intercambio con D<sub>2</sub>O



Instituto de Química UNAM (IQG)  
Dr. I. Regla  
Clave: IM-75  
No. de Registro: 3792  
Experimento: 1H  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O  
Bruker-Avance (F) 300 MHz  
18-11-2008

**ANEXO 10.4**

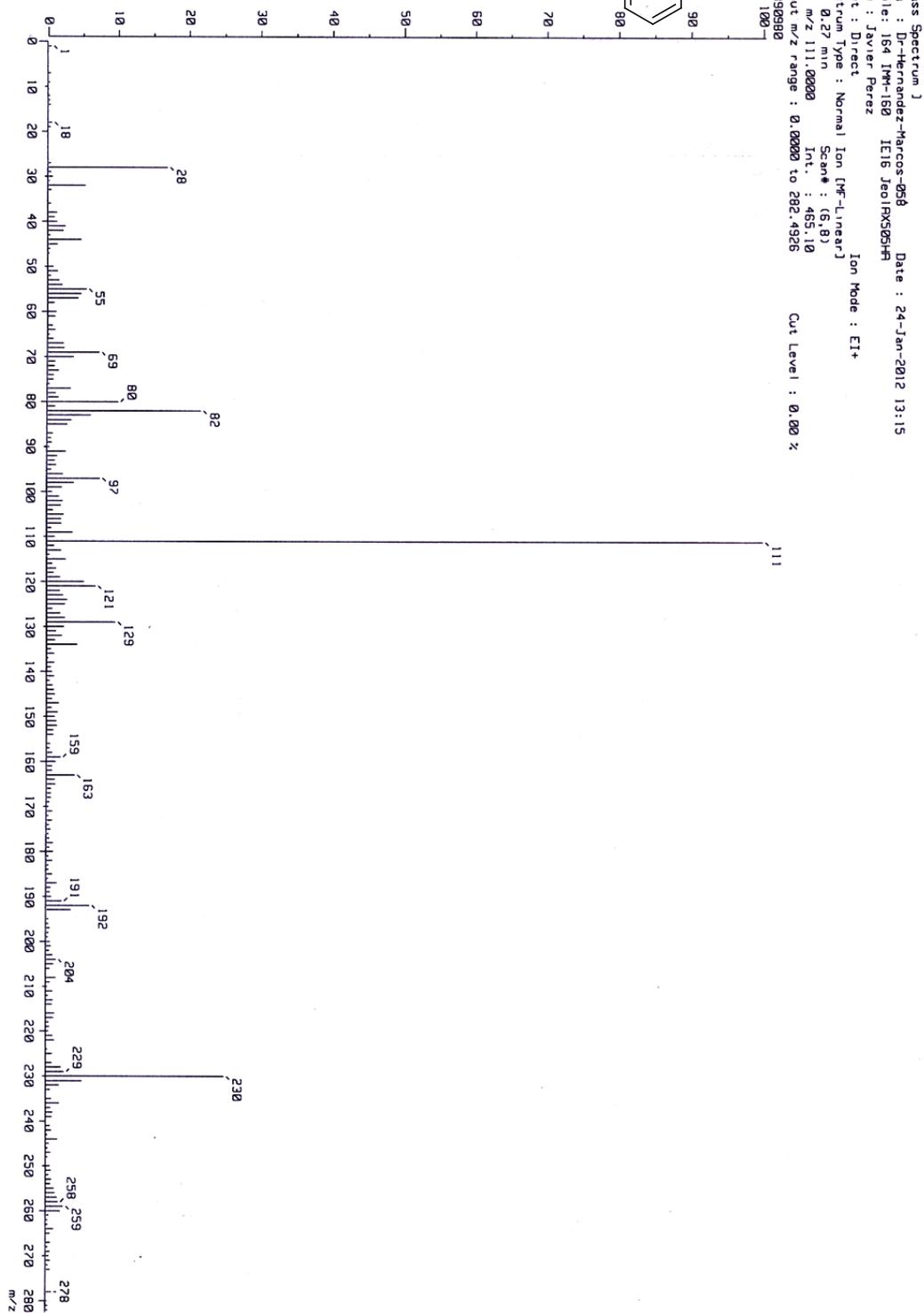
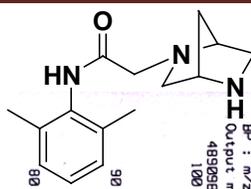
RMN <sup>13</sup>C del compuesto (S,S)-9 en CDCl<sub>3</sub>



Instituto de Química UNAM (BQI)  
Dr. I. Regla  
Clave: IM-75  
No. de Registro: 3792  
Experimento: 13C  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
Bruker-Avance (F) 75 MHz  
18-11-2008

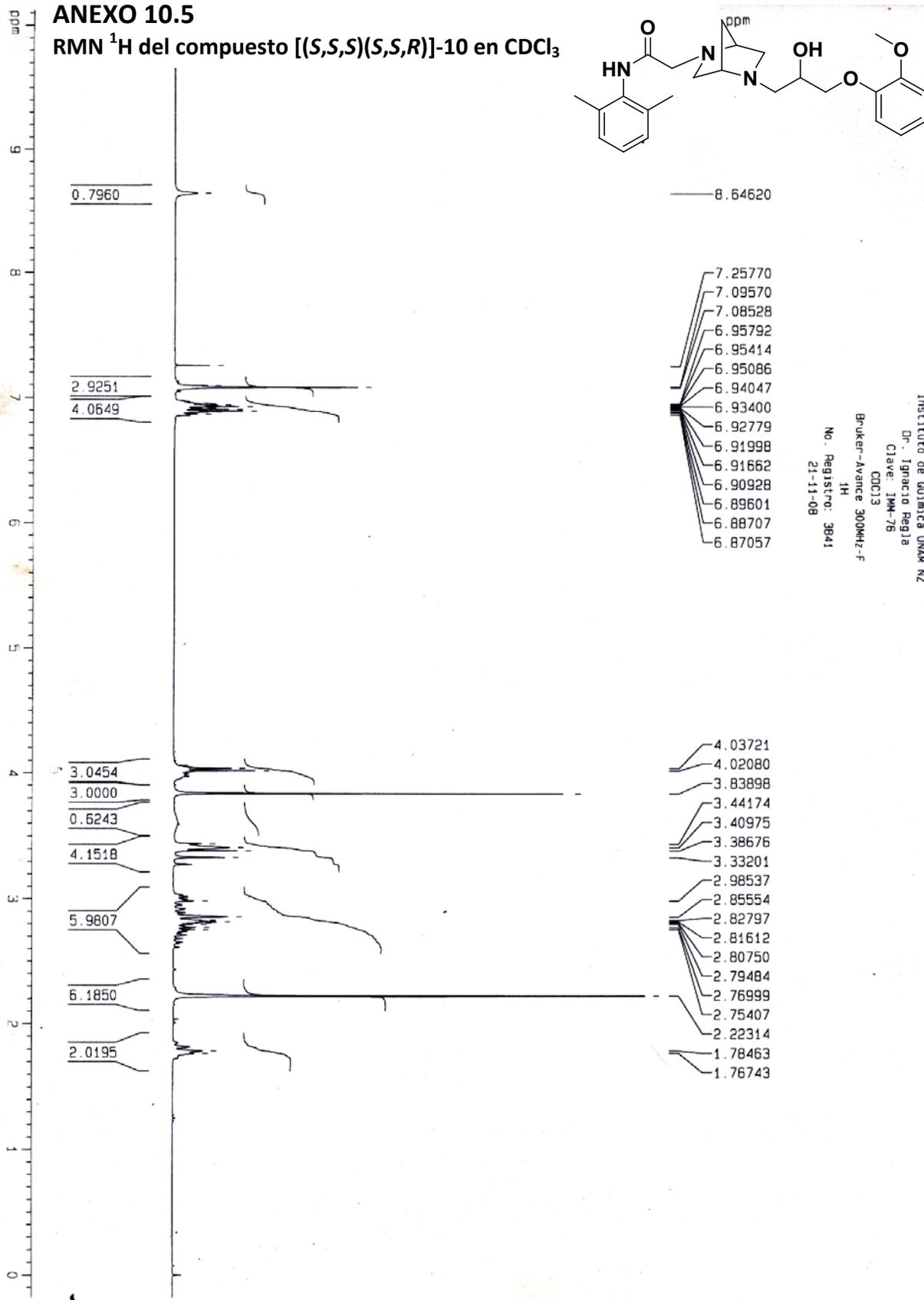
### ANEXO 10.4

### Espectrometría de masas del compuesto (S,S)-9

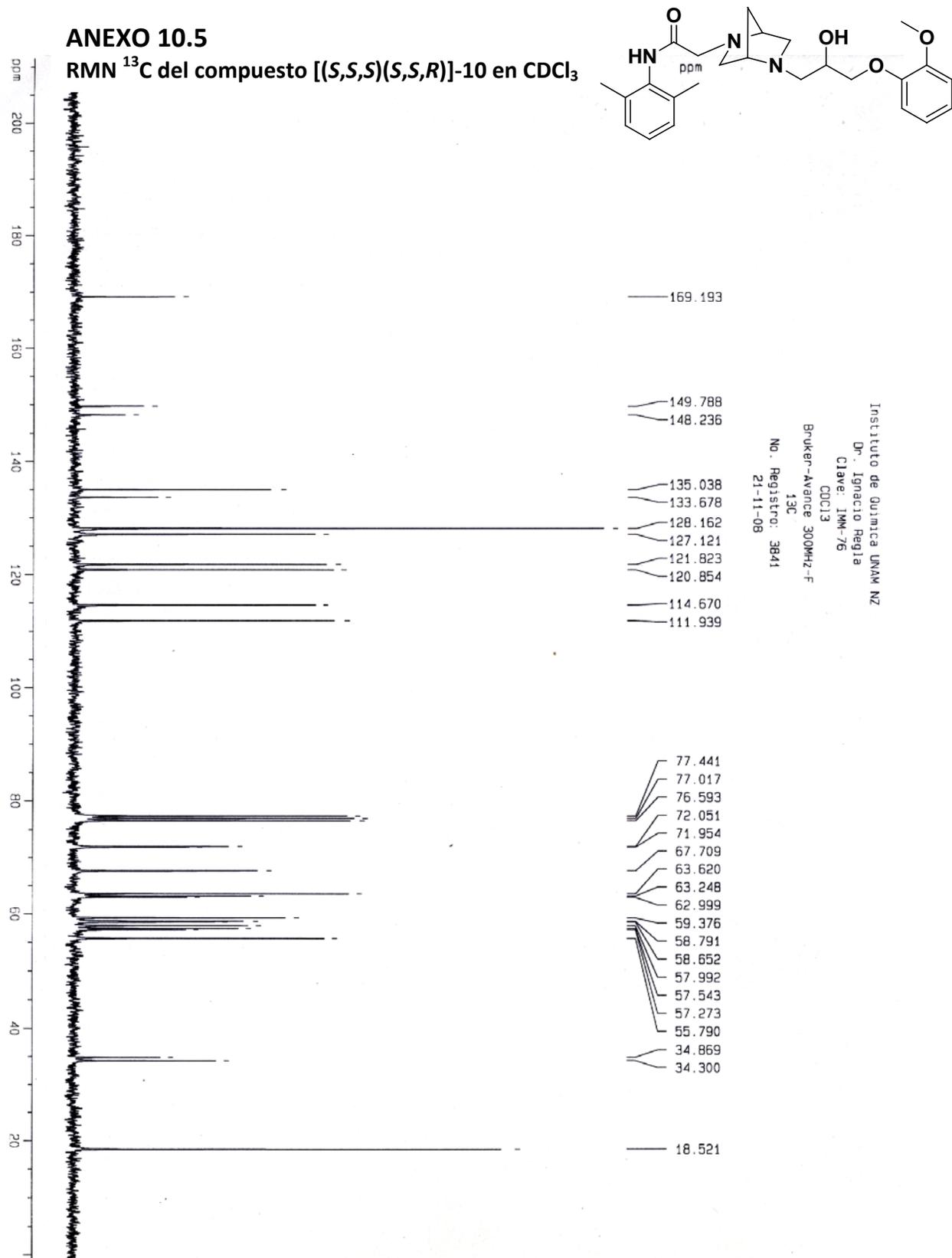


**ANEXO 10.5**

RMN <sup>1</sup>H del compuesto [(S,S,S)(S,S,R)]-10 en CDCl<sub>3</sub>

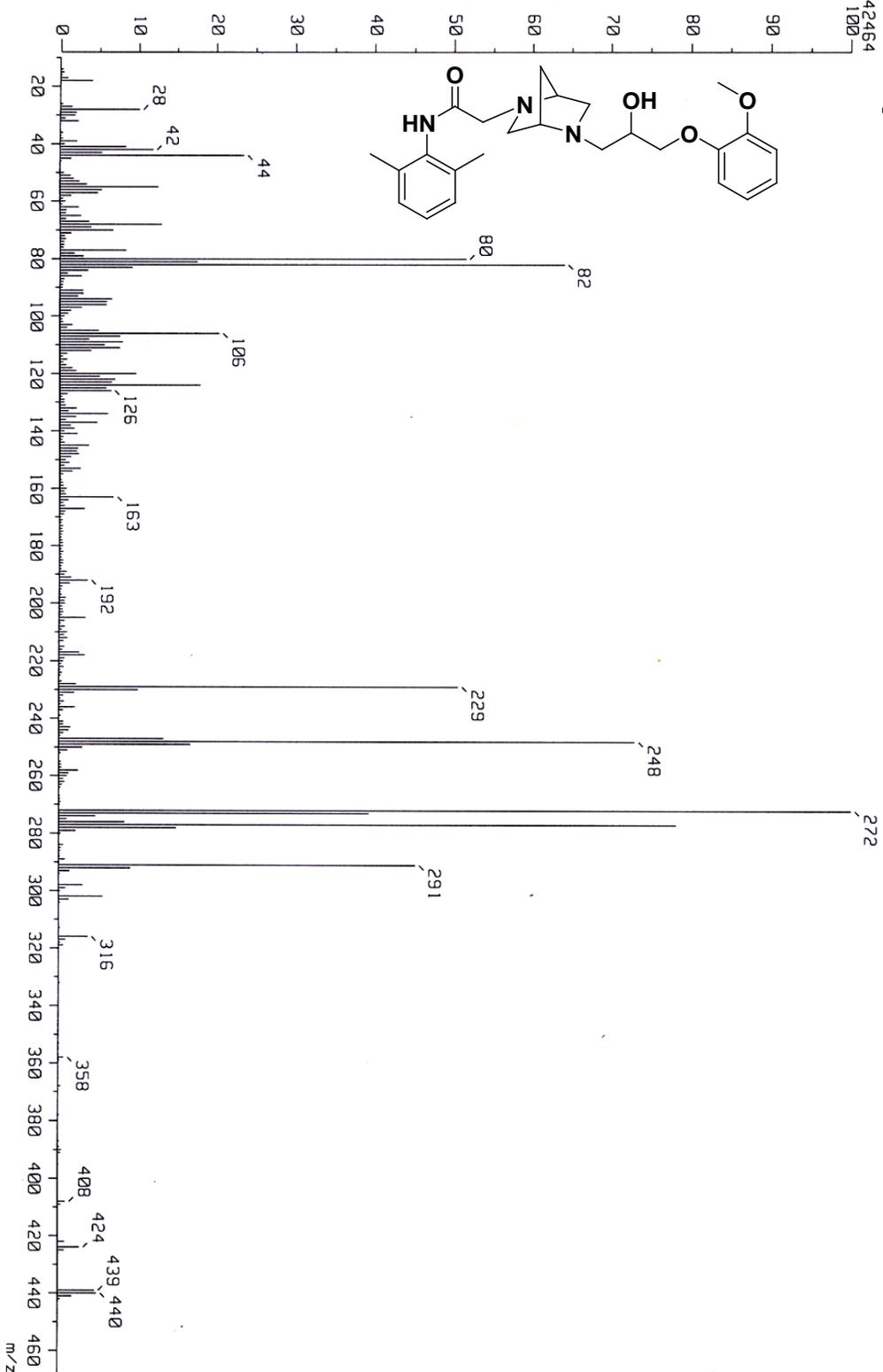


Instituto de Química UNAM NZ  
Dr. Ignacio Regla  
Clave: 1M-76  
CDCl<sub>3</sub>  
Bruker-Avance 300MHz-F  
1H  
No. Registro: 3841  
21-11-08



### ANEXO 10.5

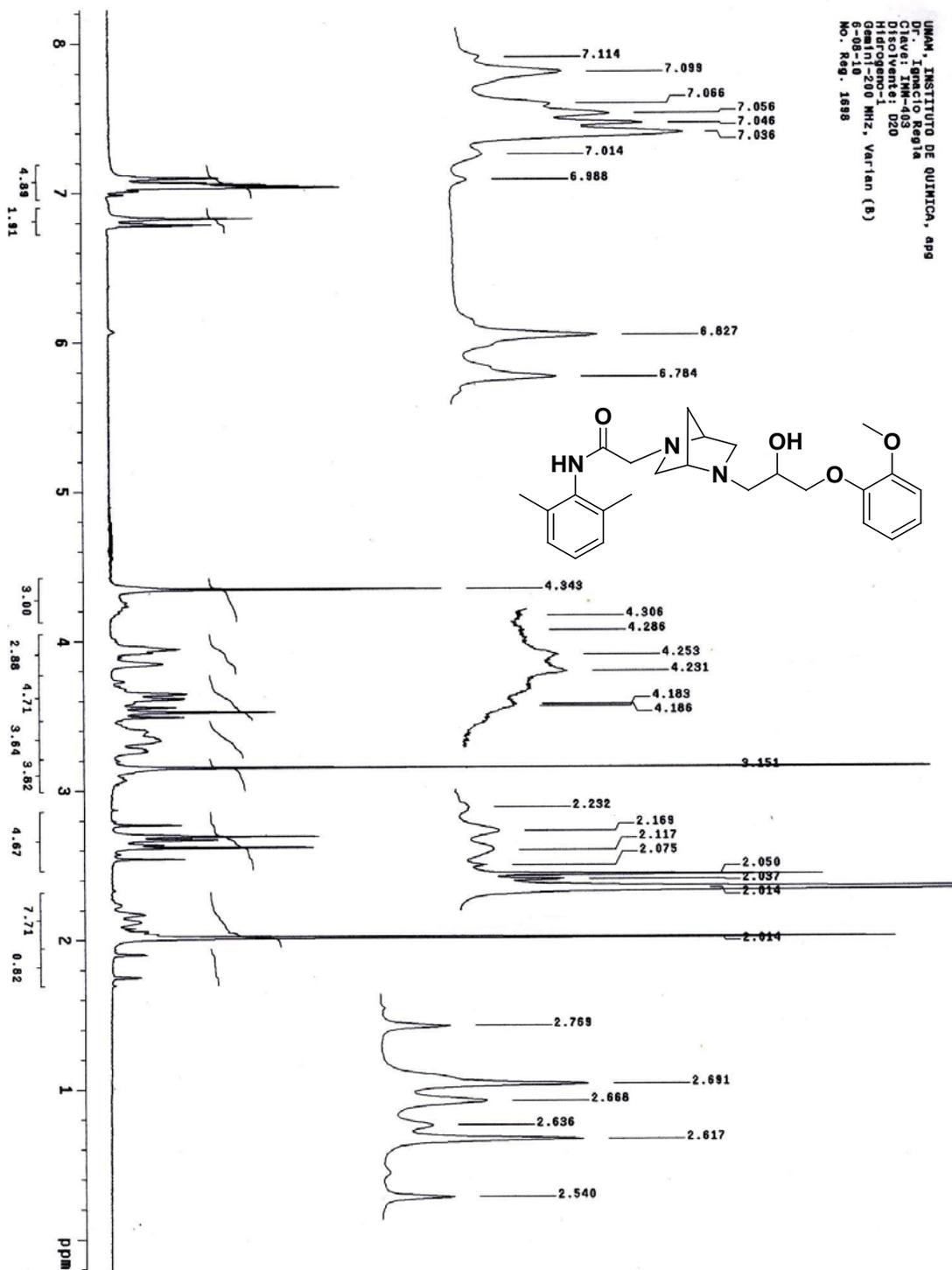
#### Espectrometría de masas del compuesto [(S,S,S)(S,S,R)]-10



[ Mass Spectrum ]  
Data : Dr-Regla-Ignacio-013 Date : 20-Nov-120 10:20  
Sample: 2751 M242 IMM-76 JeolIRX505HR  
Note : Javier-Perez  
Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear] Scan# : (11,18)  
RT : 0.52 min Int. : 1444.10 Temp : 242.0 deg.C  
BP : m/z 272.0000 Output m/z range : 10.0000 to 468.2938  
15142464 100 Cut Level : 0.00 %

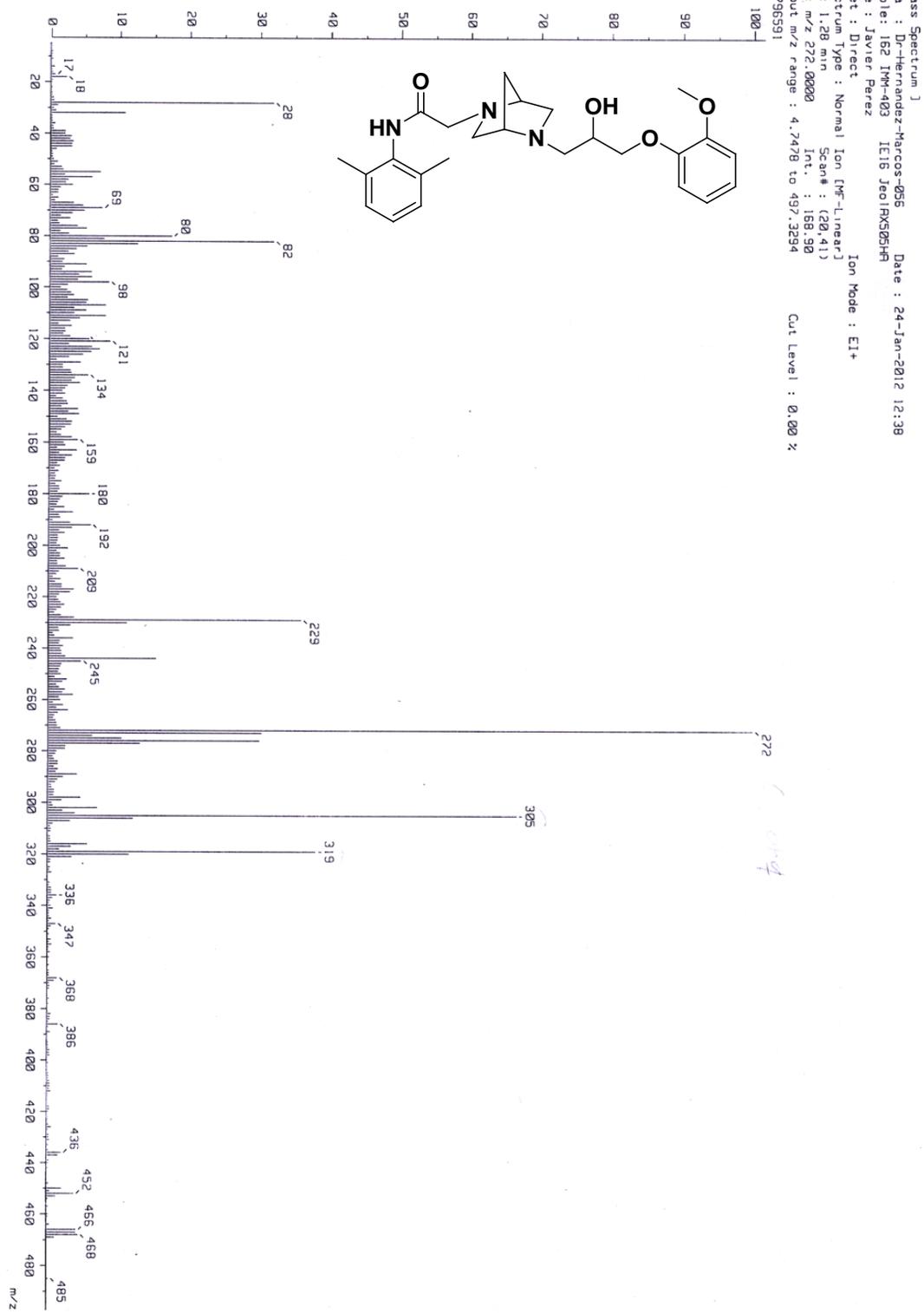
### ANEXO 10.6

RMN <sup>1</sup>H del compuesto [(S,S,S)(S,S,R)]-13 en D<sub>2</sub>O

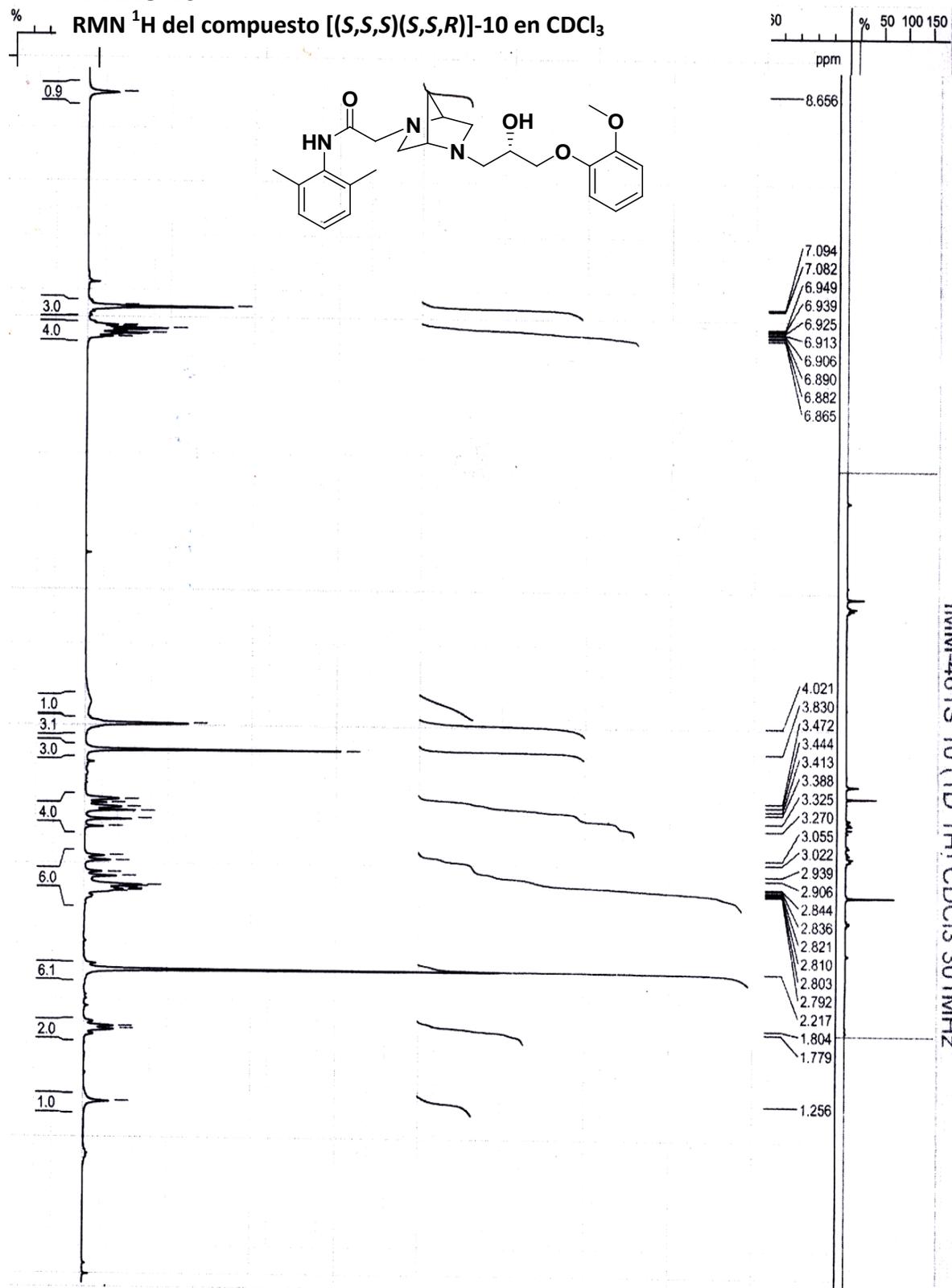


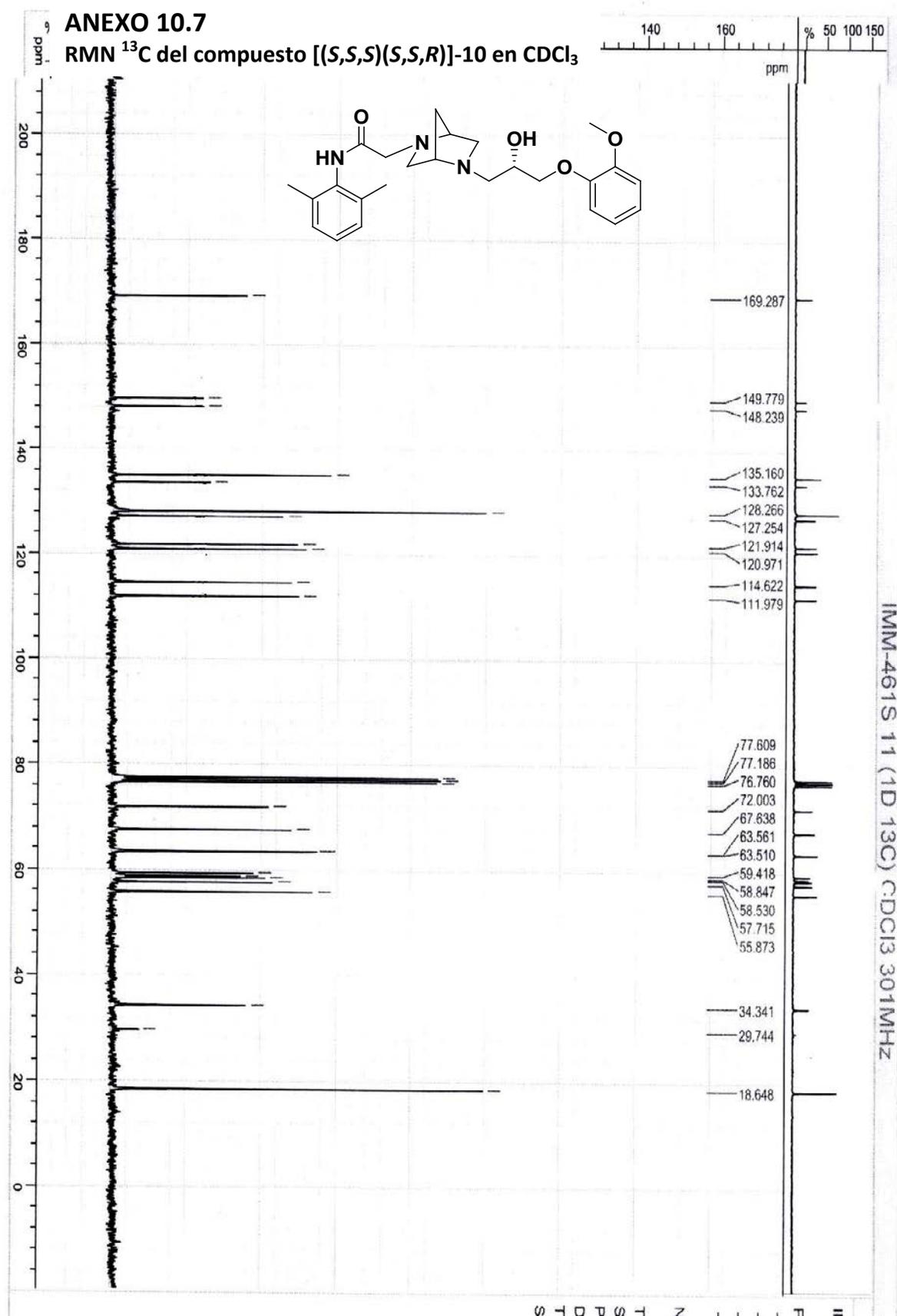
## ANEXO 10.6

### Espectrometría de masas del compuesto [(S,S,S)(S,S,R)]-13



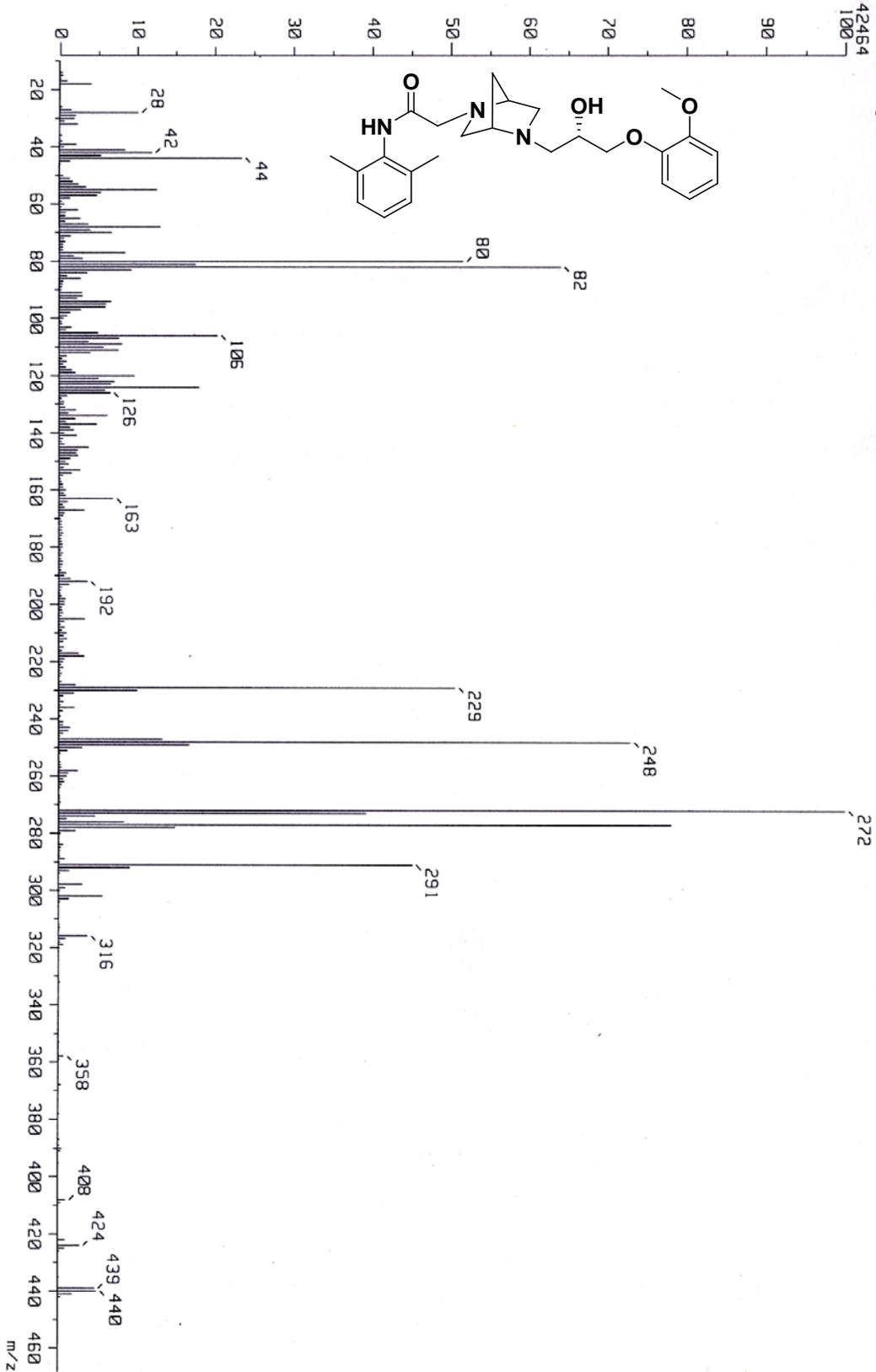
ANEXO 10.7





### ANEXO 10.7

#### Espectrometría de masas del compuesto [(S,S,S)(S,S,R)]-10





ELSEVIER

Archives of Medical Research ■ (2012) ■

---

**Archives  
of Medical  
Research**


---

## ORIGINAL ARTICLE

## Effects of Ranolazine on Vasomotor Responses of Rat Aortic Rings

 Ma. Cristina Paredes-Carbajal,<sup>a</sup> Ivan Monsalvo,<sup>b</sup> Carlos Hernández-Díaz,<sup>a</sup> Ignacio Regla,<sup>b</sup>  
 Patricia Demare,<sup>b</sup> and Dieter Mascher<sup>a</sup>
<sup>a</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México<sup>b</sup>Laboratorio Síntesis de Fármacos, UMIEZ, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, D.F., México

Received for publication July 29, 2012; accepted October 29, 2012 (ARCMED-D-12-00385).

**Background and Aims.** Ranolazine is a piperazine derivative that was approved in 2006 for the treatment of chronic stable angina. Compared with first-line drugs currently used to treat angina, beneficial effects of ranolazine occur without changing hemodynamic parameters such as heart rate and blood pressure. In the present study the effects of ranolazine on vasomotor responses of rat aortic rings were examined.

**Methods.** Pharmacological evaluation was performed by analyzing the vasomotor responses of ranolazine on aortic rings of adult male Wistar rats precontracted with phenylephrine ( $10^{-5}$  M). In each experiment we used a pair of rings (with and without endothelium) from the same aorta and superfused in the same bath.

**Results.** Ranolazine ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$ M) induced a concentration-dependent relaxation of phenylephrine-precontracted rings. The relaxation was only partially dependent on the presence of the endothelium ( $56.78 \pm 6.81\%$  in rings with endothelium and  $47.88 \pm 4.70\%$  in rings without endothelium). In rings with endothelium, L-NAME induced a shift to the right of the concentration-response curve to ranolazine. Blocking the cyclooxygenase pathway induced a leftward shift of the concentration relaxation curve to ranolazine in both types of rings and increased the ranolazine-induced relaxation in rings without endothelium.

**Conclusions.** Ranolazine has a vasodilatory effect that is predominantly endothelium-independent. The synthesis/release of nitric oxide by the endothelium may, however, contribute to its relaxing action. These effects of ranolazine may contribute to its beneficial effects in patients with stable angina. © 2012 IMSS. Published by Elsevier Inc.

**Key Words:** Nitric oxide, Stable angina, Vasodilation, Smooth muscle, endothelium.

**Introduction**

Ranolazine (*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-[4-[2-hydroxy-3-(2-methoxyphenoxy)-propyl]piperazin-1-yl] acetamide) is a piperazine derivative that was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in January 2006 for use in chronic angina therapy.

The effects of ranolazine have been tested in multiple clinical trials where it has been shown to safely and effectively reduce angina symptoms and to increase exercise tolerance in patients with symptomatic coronary artery disease (1–7).

Action of ranolazine is in large part due to preservation of myocardial blood flow during events that induce ischemia, through its effects of inhibition of the late inward sodium current ( $I_{NaL}$ ) (8), prevention of myocardial cellular sodium overload, and consequent calcium overload, and thereby prevention of compression of intramyocardial nutritive blood vessels by diastolic myocardial stiffness (8). In animal models, the drug was shown to be a potent inhibitor of the  $I_{NaL}$  through a concentration-voltage and frequency-dependent inhibition (9,10). Ranolazine and TTX, inhibitors of the late  $Na^+$  current, attenuated the palmitoyl-L-carnitine-induced ventricular contractile dysfunction and the increase of coronary resistance in guinea pig isolated heart (11).

In addition to its action to reduce late  $I_{Na}$ , ranolazine also reduces Herg  $K^+$  current (9) and is a weak  $\beta_1$ - and

Address reprint requests to: Ma. Cristina Paredes-Carbajal, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. C.P. 04510, México; E-mail: cparedes54@yahoo.mx

125  $\beta_2$ -adrenergic receptor antagonist (12), and it has been  
126 reported that it is a weak  $\alpha$  adrenergic receptors antagonist  
127 (13,14).

128 Because the effects of ranolazine on vascular reactivity  
129 are not yet clearly established, in this study we analyzed  
130 the effects of ranolazine on the vasomotor responsiveness  
131 of rat aortic rings.  
132

## 133 Materials and Methods

### 134 In Vitro Measurements of Vascular Responses

135 Experiments were performed in adult male Wistar rats  
136 weighing 250–300 g. Animals were killed by cervical  
137 dislocation followed by decapitation. All animals were  
138 cared for in compliance with the guidelines of Animal Care  
139 (NOM-062-ZOO, Mexico) (15). Immediately thereafter,  
140 a midsternal thoracotomy was performed, and the thoracic  
141 aorta was excised and placed in a dissecting chamber filled  
142 with aerated Tyrode's solution. Under a stereoscopic micro-  
143 scope the aorta was cleaned of connective and adipose  
144 tissue. From the central portion of the aorta, 2-mm-long  
145 rings were cut carefully to avoid damage to the endothe-  
146 lium. In every other ring, the endothelium was removed  
147 afterwards by gently rubbing the intimal surface.  
148

149 For each experiment a pair of rings from the same aorta  
150 (one with intact endothelium, the other without a functional  
151 endothelium) was used. Each of these rings was suspended  
152 horizontally in the same miniature organ chamber (volume  
153 0.5 mL) between a stainless steel post fixed to the bottom of  
154 the bath and a stainless steel hook attached to an isometric  
155 force transducer (Grass, FT 03, Grass Instruments, Quincy,  
156 MA). The vessels were continuously superfused with pre-  
157 warmed (37°C) aerated (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) modified  
158 Tyrode's solution (composition in mM: NaCl, 137; KCl,  
159 2.7; MgCl<sub>2</sub>, 0.69; NaHCO<sub>3</sub>, 11.9; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4; CaCl<sub>2</sub>,  
160 1.8 and glucose, 10; pH was adjusted to 7.4). The rings  
161 were initially stretched until resting tension reached 2 g  
162 and allowed to equilibrate for 1 h; during this period the  
163 resting tension was continuously monitored (Grass, Model  
164 79 Polygraph, Grass Instruments) and, if needed, readjusted  
165 to 2 g by further stretching.  
166

167 Before starting an actual experiment, the functional  
168 integrity of both the smooth muscle layer and the endothe-  
169 lium was confirmed using phenylephrine and carbachol  
170 responsiveness as described elsewhere (16,17).  
171

### 172 Experimental Protocol

173 In a first series of experiments, the effects of successively  
174 increasing concentrations of ranolazine (10<sup>-11</sup>–10<sup>-3</sup> M)  
175 on the basal tension were analyzed in the absence or in  
176 the presence of either the cyclooxygenase inhibitor indo-  
177 methacin (10<sup>-6</sup> M) or the competitive inhibitor of nitric  
178 oxide synthase N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester L-NAME  
179 (300  $\mu$ M).

To investigate a possible relaxant action of ranolazine,  
the effects of successively increasing concentrations of  
ranolazine (10<sup>-11</sup>–10<sup>-3</sup> M) on phenylephrine (10<sup>-5</sup> M)  
precontracted aorta rings were analyzed. These effects were  
determined in the absence and in the presence of either  
indomethacin (10<sup>-6</sup> M) or L-NAME (300  $\mu$ M).

### Reagents

Glucose was from Merck (Darmstadt, Germany). Ranola-  
zine was prepared as described in the literature (19). All  
other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO).  
Indomethacin was dissolved in 4% sodium carbonate.  
Ranolazine, L-phenylephrine hydrochloride, carbachol  
(carbamoylcholine chloride) and N $\omega$ -nitro-L-arginine  
methyl ester hydrochloride (L-NAME) were dissolved in  
deionized water.

### Data Analysis

Ranolazine-induced relaxations are expressed as the  
percent of the maximal tension induced by phenylephrine  
(10<sup>-5</sup> M). IC<sub>50</sub> (–log of the mean molar concentration of  
ranolazine producing 50% of the maximal response) was  
determined with the software package Graph Pad Prism  
(v.5) (San Diego, CA). Data are expressed as mean  $\pm$  SD  
for tension development and as mean  $\pm$  SE for IC<sub>50</sub> values.

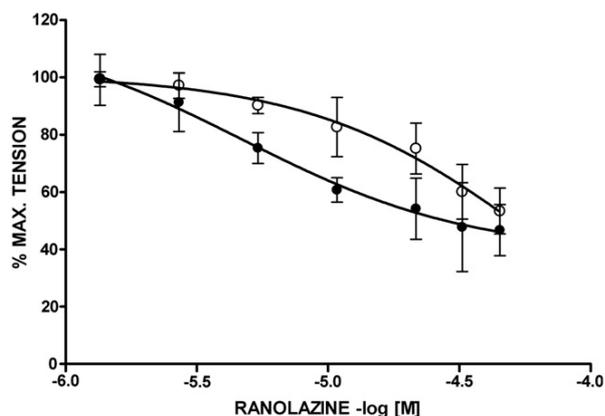
Comparisons of means were made by one-way analysis  
of variance (ANOVA) and differences between groups were  
evaluated using Student-Newman-Keuls method (Graph  
Pad Prism (v.5) software; St. Louis, MO); *p* value of 0.05  
or less was considered significant.

## Results

### Effects of Ranolazine on Basal Tension

In order to analyze the effects of ranolazine on basal  
tension, rat aortic rings, either with or without endothelium,  
were exposed to successively increasing concentrations of  
ranolazine (10<sup>-11</sup>–10<sup>-3</sup> M). No change was observed in  
basal tension in either of these rings. Similarly, when expo-  
sure to increasing concentration of ranolazine was repeated  
in the presence of either indomethacin or L-NAME, no  
change in basal tension was observed in either type of rings.

Afterwards, the rings were washed with Tyrode solution  
for 30 min. Rings were then exposed successively to phen-  
ylephrine (10<sup>-5</sup> M) and carbachol (10<sup>-5</sup> M). Under these  
conditions, the contractile response to phenylephrine in  
both types of rings was markedly depressed in comparison  
with that recorded during the control phenylephrine- chal-  
lenge. In rings with endothelium, tension reached, respec-  
tively, 1.233  $\pm$  0.33 and 2.511  $\pm$  0.379, whereas in rings  
without endothelium, the contractile responses amounted  
to 2.078  $\pm$  0.527 and 2.69  $\pm$  0.358 g, respectively. The  
relaxation induced by carbachol was, however, similar to  
that observed during the control challenge.



**Figure 1.** Concentration-response curves to successively increasing concentrations of ranolazine ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M) in aortic rings precontracted with phenylephrine ( $10^{-5}$  M), with endothelium (●) and without endothelium (○). In this figure and subsequent figures, the curves represent the percentage of relaxation induced by ranolazine, relative to the maximal tension induced by phenylephrine. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).

#### Concentration-response Curves to Ranolazine of Phenylephrine-precontracted Rings

Concentration response curves to ranolazine ( $10^{-11}$ – $10^{-3}$  M) were performed in phenylephrine ( $10^{-5}$  M)-precontracted aortic rings with or without endothelium. Concentrations between  $10^{-6}$  and  $10^{-4}$  M induced relaxant responses, which were concentration- and partially endothelium-dependent. Concentrations below  $10^{-6}$  M did not cause any effect and concentrations higher than  $10^{-4}$  M produced a long-lasting inhibition of the contractile response to phenylephrine that could not be reversed even after prolonged washing. Therefore, in all subsequent experiments, concentrations of ranolazine between  $10^{-6}$  and  $10^{-4}$  M were used. The maximal relaxation induced by  $10^{-4}$  M ranolazine in rings with endothelium was  $56.78 \pm 6.81$  (Figure 1, Table 1).

Although in rings without endothelium, concentration-response curve to ranolazine showed a similar pattern (Figure 1), the curve was significantly shifted to the right, relative to the curve of rings with endothelium ( $IC_{50}$  with endothelium  $4.61 \pm 0.05$  vs.  $IC_{50}$  without endothelium  $4.27 \pm 0.02$ , Table 1). The maximal relaxation was, however, similar in both rings ( $56.78 \pm 6.81$  vs.  $47.88 \pm 4.70$  %, in rings with or without endothelium, respectively, Table 1).

#### Indomethacin Effects on the Concentration-Response Curves to Ranolazine

In the presence of indomethacin ( $10^{-6}$  M), the concentration response curve to ranolazine of rings with endothelium was shifted to the left of the curve observed in the absence of this cyclooxygenase inhibitor ( $IC_{50}$   $4.61 \pm 0.05$  vs.  $IC_{50}$   $5.39 \pm 0.17$ , respectively, Figure 2A, Table 1). Maximal relaxation to ranolazine of phenylephrine precontracted rings with endothelium in the absence or presence of

indomethacin was similar ( $56.78 \pm 6.81$  vs.  $66.05 \pm 10.70$ , respectively, Figure 2A, Table 1).

In phenylephrine-precontracted rings without endothelium, indomethacin ( $10^{-6}$  M) shifted the concentration response curve to ranolazine to the left ( $IC_{50}$   $4.27 \pm 0.02$  vs.  $IC_{50}$   $4.61 \pm 0.04$ , in the presence and the absence of indomethacin, respectively) (Figure 2B). Maximal relaxations to ranolazine in the absence or presence of indomethacin were significantly different ( $47.88 \pm 4.70$  vs.  $66.25 \pm 4.45$ , respectively, Figure 2B, Table 1).

#### L-NAME Effects on the Concentration-response Curves to Ranolazine

Inhibition of nitric oxide synthase with L-NAME decreased the relaxant effect of ranolazine on phenylephrine-precontracted rings with endothelium (Figure 3A). The concentration-response curve to ranolazine of these rings was shifted to the right ( $IC_{50}$   $4.61 \pm 0.05$ – $IC_{50}$   $3.98 \pm 0.09$ , in the presence and absence of L-NAME, respectively, Figure 3A, Table 1). Maximal relaxation to ranolazine in the presence of L-NAME was lower than in its absence ( $34.94 \pm 9.88$  vs.  $56.78 \pm 6.81$ , respectively).

#### Discussion

The present study showed that ranolazine relaxes phenylephrine-precontracted rat aortic rings in a concentration-dependent manner. This relaxation was predominantly endothelium independent. However, in rings with endothelium, inhibition of the synthesis/release of nitric oxide induced a shift to the right of the concentration-relaxation curve to ranolazine and significantly reduced the maximal relaxation.

Blocking the cyclooxygenase pathway induced a leftward shift of the concentration-relaxation curve to ranolazine in rings with and without a functional endothelium.

These results show that ranolazine relaxes phenylephrine-precontracted aortic rings by acting directly on the smooth muscle of the vessel with only a minor participation of the endothelium. Recently, Deng et al. reported quite similar effects of ranolazine in rat intrarenal arterial rings (19). This author also explored the possible mechanisms underlying the action of ranolazine on the vascular smooth muscle. Their experiments demonstrated that the relaxing effect of ranolazine is mediated mainly by ranolazine acting as an  $\alpha_1$ -adrenergic antagonist, and that at higher concentrations the blockade of the L-type  $Ca^{2+}$  channel may play a role. It is thus reasonable to assume that similar mechanisms are involved in the case of rat aortic rings.

In line with this interpretation it should be mentioned that Nieminen et al. (14) in a quite different experimental model, i.e., intracoronary or intrafemoral bolus injection of ranolazine in anesthetized pigs, reported a vasodilator effect of ranolazine, which the authors also

**Table 1.** Relaxant effects of ranolazine on rat aortic rings, with and without endothelium, precontracted with phenylephrine ( $10^{-5}$  M)

Drug	With endothelium IC <sub>50</sub>	Max. tension (%)	Without endothelium IC <sub>50</sub>	Max. tension (%)
Ranolazine	4.61 ± 0.05	56.78 ± 6.81	4.27 ± 0.02*	47.88 ± 4.70
+ Indom.	5.39 ± 0.17 <sup>1,3</sup>	66.05 ± 10.70 <sup>3</sup>	4.61 ± 0.04 <sup>1,3,*</sup>	66.25 ± 4.45 <sup>1</sup>
+ L-NAME	3.98 ± 0.09 <sup>1</sup>	34.94 ± 9.88 <sup>1</sup>	4.42 ± 0.03 <sup>1,*</sup>	52.38 ± 9.76

IC<sub>50</sub>, molar concentration causing 50% of the relaxation induced by ranolazine ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M). Max. (%), percentage of decrease in tension compared to the maximum tension developed in response to phenylephrine ( $10^{-5}$  M).

+ Indom., with indomethacin ( $10^{-6}$  M).

+ L-NAME, with L-NAME (300 μM).

Percentages of maximum relaxation are presented as mean ± SD. Data of IC<sub>50</sub> are presented as mean ± SE.

$n = 5$  for all groups.

<sup>1,2,3</sup>Denotes significant differences among the same group (<sup>1</sup> vs. ranolazine <sup>2</sup> vs. + Indom<sup>3</sup> vs. +L-NAME, ( $p < 0.05$ ).

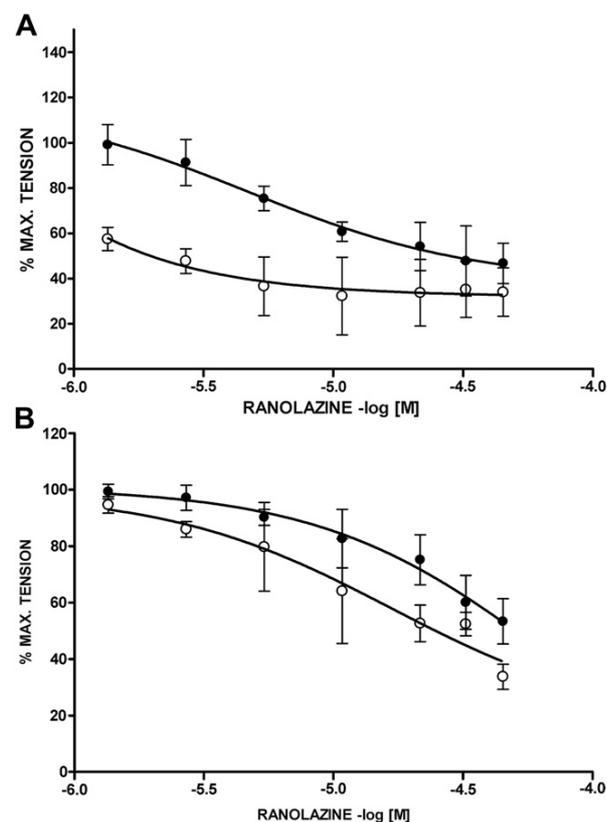
\*Denotes significant differences between groups with or without endothelium ( $p < 0.05$ ).

attributed to the blockade of vascular smooth muscle  $\alpha_1$ -adrenoceptors (14).

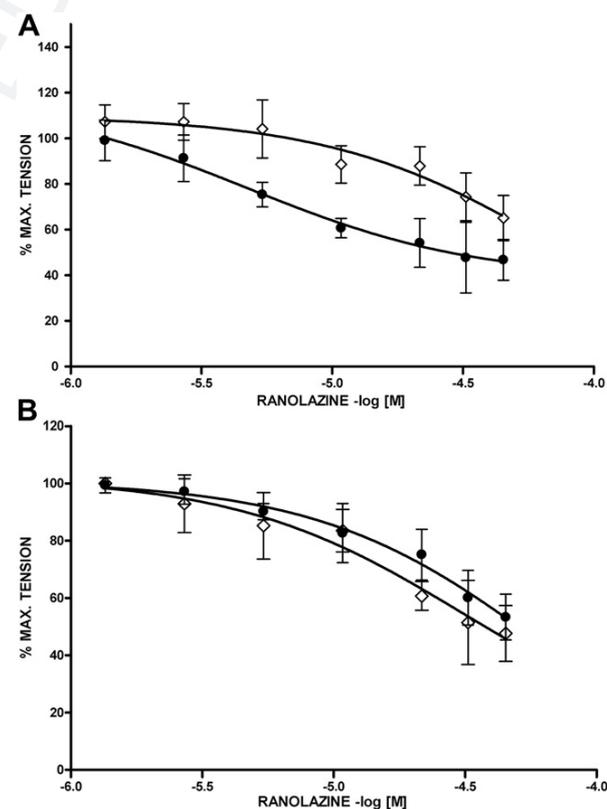
The small endothelium-dependent fraction of the relaxing effect of ranolazine in our experiments is evidently mediated by the nitric oxide because it was abolished after inhibiting its synthesis. In the study by Deng et al. (19), inhibition of nitric oxide synthesis did not alter the relaxing effect of ranolazine, suggesting that, in intrarenal arteries,

ranolazine induces the release of a hyperpolarizing factor from the endothelium.

Regarding the potentiation (significant leftward shift of the concentration-relaxation curve) of the relaxing effects of ranolazine by indomethacin, it may tentatively be explained by the suppression of the synthesis of a cyclooxygenase-dependent vasoconstrictor prostanoid, which in the absence of indomethacin generates a substantial fraction of



**Figure 2.** Concentration-response curves to successively increasing concentrations of ranolazine ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M) in phenylephrine-precontracted rings [ $10^{-5}$  M with (A) or without endothelium (B)]. In the absence (●) or in the presence (○) of indomethacin ( $10^{-6}$  M). Data are expressed as mean ± SD ( $n = 5$ ).



**Figure 3.** Concentration-response curves to successively increasing concentrations of ranolazine ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M) of phenylephrine-precontracted aortic rings [ $10^{-5}$  M with (A) or without endothelium (B)], in the absence (●) or the presence (◇) of L-NAME (300 μM). Data are expressed as mean ± SD ( $n = 5$ ).

455 the tension induced by phenylephrine. In fact, both in rings  
456 with and without a functional endothelium the contractile  
457 response to phenylephrine is markedly reduced by the inhi-  
458 bition of the cyclooxygenase pathway (see Table 1 in  
459 Paredes-Carbajal et al., 1997) (17).  
460

461 The results of the present study suggest that the vasodi-  
462 latory effect of ranolazine may contribute to its beneficial  
463 effects in patients with stable angina.  
464

#### 465 Disclosures

466 None of the participants in this project has any relation with  
467 Gilead Sciences, Inc. or has a financial relationship with  
468 this company.  
469

#### 470 Uncited reference

471 Q4 18.

#### 472 Acknowledgments

473 The authors thank Mr. Constantino Ramírez-Miranda and Mrs.  
474 Ana Lilia Ocampo-Belmont for their technical skills, María de  
475 los Angeles Peña, Elizabeth Huerta, and Rocío Patiño-Maya from  
476 Instituto de Química-UNAM for spectroscopic analysis. I.R. is  
477 grateful to the Instituto de Química for the fellowship 'Cátedra  
478 Especial Jesús Romo Armería', granted by the Instituto de Quími-  
479 ca-UNAM. This work was partially supported by grant #101855  
480 from CONACyT.  
481

#### 482 References

- 483 1. Chaitman BR, Pepine CJ, Parker JO, et al. Effects of ranolazine with  
484 atenolol, amlodipine, or diltiazem on exercise tolerance and angina  
485 frequency in patients with severe chronic angina. A randomized  
486 controlled trial. *JAMA* 2004;291:309–316.
- 487 2. Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, et al. Anti-ischemic effects and  
488 long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with  
489 chronic severe angina. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1375–1382.
- 490 3. Clarke B, Spedding M, Patmore L, et al. Protective effects of ranola-  
491 zine in guinea-pig hearts during low-flow ischaemia and their associa-  
492 tion with increases in active pyruvate dehydrogenase. *Br J Pharmacol*  
493 1993;109:748–750.
- 494 4. Clarke B, Wyatt KM, McCormack JG. Ranolazine increases  
495 active pyruvate dehydrogenase in perfused normoxic rat hearts:

- 496 evidence for an indirect mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 1996;  
497 28:341–350.
- 498 5. Rousseau MF, Pouleur H, Cocco G, et al. Comparative efficacy of ra-  
499 nolazine versus atenolol for chronic angina pectoris. *Am J Cardiol*  
500 2005;95:311–316.
- 501 6. Stone PH, Chaitman BR, Stocke K, et al. The anti-ischemic mecha-  
502 nism of action of ranolazine in stable ischemic heart disease. *J Am*  
503 *Coll Cardiol* 2010;56:934–942.
- 504 7. Reffelmann T, Kloner RA. Ranolazine: an anti-anginal drug with  
505 further therapeutic potential. *Exp Rev Cardiovasc Ther* 2010;8:  
506 319–329.
- 507 8. Belardinelli L, Shryock JC, Fraser H. Inhibition of the late sodium  
508 current as a potential cardioprotective principle: effects of the late  
509 sodium current inhibitor ranolazine. *Heart* 2006;92:iv6–iv14.
- 510 9. Antzelevitch C, Belardinelli L, Zygmunt AC, et al. Electrophysiologi-  
511 cal effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiar-  
512 rhythmic properties. *Circulation* 2004;110:904–910.
- 513 10. Song Y, Shryock JC, Wu L, et al. Antagonism by ranolazine of the  
514 pro-arrhythmic effects of increasing late  $I_{Na}$  in guinea pig ventricular  
515 myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:192–199.
- 516 11. Wu Y, Song Y, Belardinelli L, et al. The late  $Na^+$  current ( $I_{Na}$ ) inhi-  
517 bitor ranolazine attenuates effects of palmitoyl-L-carnitine to increase  
518 late  $I_{Na}$  and cause ventricular diastolic dysfunction. *Am Soc Pharma-  
519 col ExpTherap* 2009;330:550–557.
- 520 12. Létienne R, Viè B, Puech A, et al. Evidence that ranolazine behaves as  
521 a B1 and B2-adrenoceptor antagonist in the rat cardiovascular system.  
522 *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001;363:464–471.
- 523 13. Zhao G, Walsh E, Shryock J, et al. Anti-adrenergic and hemodynamic  
524 effects of ranolazine in conscious dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;  
525 57:639–647.
- 526 14. Nieminen T, Caio AM, Tavares CAM, et al. Ranolazine injection into  
527 coronary or femoral arteries exerts marked, transient regional vasodi-  
528 lation without systemic hypotension in an intact porcine model. *Circ*  
529 *Cardiovasc Interv* 2011;4:481–487.
- 530 15. NOM-062-ZOO. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999,  
531 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los ani-  
532 males de laboratorio.
- 533 16. Paredes-Carbajal MC, Juárez-Oropeza MA, Ortiz Mendoza CM, et al.  
534 Effects of acute and chronic estrogenic treatment on vasomotor  
535 responses of aortic rings from ovariectomized rats. *Life Sci* 1995;  
536 57:473–486.
- 537 17. Paredes-Carbajal MC, Torres-Durán PV, Díaz-Zagoya JC, et al.  
538 Effects of dietary *Spirulina maxima* on endothelium dependent  
539 vasomotor responses of rat aortic rings. *Life Sci* 1997;61:  
540 PL211–PL219.
- 541 18. Riise-Moen A, Karstad R, Anthonsen T. Chemo-enzymatic synthesis  
542 of both enantiomers of the anti-anginal drug ranolazine. *Biocatal*  
543 *Biotrans* 2005;23:45–51.
- 544 19. Deng CY, Kuang SJ, Rao F, et al. Effect of ranolazine on rat intrarenal  
545 arteries *in vitro*. *Eur J Pharmacol* 2012;683:211–216.

## **11. BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup> Corella, D.; Ordovás, J. *Investigación y ciencia*, Noviembre **2007**; 74-83.
- <sup>2</sup> Tortora, G.; Grabowsky, S. *Principios de anatomía y fisiología*. 9<sup>a</sup> ed., Oxford University Press, Mexico D.F., **2002**; 686-700.
- <sup>3</sup> Cerqueria, P.; Cesario, E.; Mateus, F.; Mere, Y.; Silva, R.; Lanchote, V. *Chirality*, **1999**, 11(7); 591-597.
- <sup>4</sup> Halabe, J.; Lifshitz, A.; Lopez, B.; Ramiro, M. *El internista, medicina interna para internistas*. 1<sup>ra</sup> ed., México, McGraw-Hill, **1997**; 258-264 pp.
- <sup>5</sup> Abrams, J.; Jones, A.; Kirkpatrick, P. *Nature reviews Drug Discovery*, Junio **2006**, 5; 243-245.
- <sup>6</sup> Asif, M.; Siddiqui, A.; Keam, J. *Adis Drug Evaluation*, **2006**, 66(5); 693-710.
- <sup>7</sup> a) Bisi, A.; Rampa, A.; Budriesi, R.; Gobbi, S.; Belluti, F.; Loan, P.; Valoti, E.; Chiarini, A.; Valenti, P. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2003**, 11; 1353-1361; b) Henry, C. *Chemical & Engineering News*, November **2007**, 85(46); 46-48.
- <sup>8</sup> Feltes, R. y colaboradores. *Manual CTO de medicina y cirugía*. 7<sup>ta</sup> ed., España, McGraw-Hill, **2007**; 62-69.
- <sup>9</sup> Arribas, B.; Gabriel, R. *Cardiavascular Risk Factors*, **2000**, 9(4); 258-262.
- <sup>10</sup> Naranjo, G. *Revista diabetes mellitus*, Universal, Noviembre **2006**; consulta en línea 25 de agosto de 2012: <http://mellitusmagazines.blogspot.com/2006/11/prevn-aumento-de-casos-de-cardiopata.html>.
- <sup>11</sup> O'Neil, M. J. *et al.* (Ed.) *The Merck Index*. 13<sup>th</sup> ed., Merck: USA, **2001**.
- <sup>12</sup> Riise, A.; Karstad, R.; Anthonsen, T. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2005**, 23(1); 45-51.
- <sup>13</sup> Chobanian, A. *The seventh report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure*. U.S. Department of health and human services, National High Blood Pressure Education Program, **2003**.
- <sup>14</sup> Page, C.; Curtis, M.; Sutter, M.; Hoffman. *Farmacología Integral*. Edit. Har Court Brace, España, **1998**; 178-188.
- <sup>15</sup>. (a) Cruz-Corchado M. *Arch. Card. Méx.*, **2001**, 71; 192-197; (b) Velásquez, M.; Rosas, P.; Lara, E.; Pastelin, G.; Attie, F.; Conyer, T. *Arch. Card. Méx.*, **2002**, 72: 71-84.

- <sup>16</sup> a) Doering, C.; Zamponi, G. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **2003**, 6; 491-505; b) Hardman, J.; Limbird, I.; Molinoff, P.; Ruddon, R.; Goodman, A. *Goodman & Gilman's. The pharmacological basic of therapeutics*. 9<sup>th</sup> ed., Mc Graw Hill, E.U.A., **1996**; 238-241, 780-781; c) Velazco, A.; Lorenzo, P.; Serrano, J.; Trelles, A.; Velásquez, F. *Farmacología*. 16<sup>a</sup> ed., Internacional- Mc Graw Hill, España, **1993**; 11-19.
- <sup>17</sup> a) Bolli, P.; Fernandez, P.; Buhler, F. *Beta- Blockers in the Treatment of Hipertensión*. edited by J.H. Laragh and B.M. Brenner, Raven Press, New York **1990**; 2181-2203: b) Mehvar, R.; Brocks, D. *J Pharmaceutic Sci*, **2001**, 4(2); 185-200.
- <sup>18</sup> Bedore, W.; Zaborenko, N.; Jensen, F.; Jamison, F. *Organic process reserch and development*, **2010**, 14; 432-440.
- <sup>19</sup> Bolli, P.; Fernandez, P.; Buhler, F. *Beta-blockers in the treatment of hypertension*. Edited Laragh and Brenner, Raven Press, New York, **1990**; 2181-2203.
- <sup>20</sup> Katzung, B. *Basic and clinical pharmacology*. 8<sup>th</sup> ed, Mc.Graw-Hill, USA, **2001**; 155-180.
- <sup>21</sup> Buhler, F.; Brunner, H.; Hansson, L.; Prichard, B.; Vetter, W.; Zanchetti, A. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **1986**, 8, suppl. 6, S1-S4.
- <sup>22</sup> Velasco, M.; Romero, B.; Betancourt, M.; Suarez, N.; Contreras, F. *Uso de los antagonistas beta-adrenérgicos en la hipertensión arterial*. AVFT, julio 2, **2002**.
- <sup>23</sup> Copeland, R. *Enzymes, a practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. 2<sup>a</sup> ed. WILEY-VCH, USA, **2000**; 7-10.
- <sup>24</sup> Roberts, S. *J. Chem. Soc., Perkin trans. I*, **2001**; 1475-1499.
- <sup>25</sup> Bomscheuer, U.; Kaszlauskas, R. *Hydrolases in organic synthesis: Regio and stereoselective biotransformation*. Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- <sup>26</sup> López-Ortíz, M.; Herrera-Solís, A.; Luviano-Jardón, A.; Reyes-Prieto, N.; Castillo, I.; Monsalvo, I.; Demare, P.; Méndez-Días, M.; Regla, I.; Prospéro-García, O. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, **2010**, 20; 3231-3234.
- <sup>27</sup> Regla, I.; Luviano-Jardón, A.; Demare, P.; Hong, E.; Torres-Gavilán, A.; López-Munguía, A. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19; 2439-2442.
- <sup>28</sup> Castillo, E.; Regla, I.; Demare, P.; Luviano-Jardón, A.; López-Munguía, A. *Synlett*, **2008**; 2869-2873.

- <sup>29</sup> Salis, A.; Svensson, I.; Monduzzi, M.; Solinas, V.; Adlercreutz, P. *Biochim Biophys Acta: Proteins & Proteomics.*, **2003**, 1646; 145-151.
- <sup>30</sup> Kazlauskas, R.; Weissfloch, A.; Rappaport, A.; Cuccia, L. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56; 2656-2665.
- <sup>31</sup> Schmid, R.; Verger, R. *Angew Chem Int Ed.*, **1998**, 37; 1608-1633.
- <sup>32</sup> Portuguese, P.; Mikhail, A. *J Org Chem*, **1966**, 31; 1059-1062.
- <sup>33</sup> (a) Remuzon, P.; Bouzard, D.; Guiol, C.; Jacquet, J. *J Med Chem.* **1992**, 35; 2898-2909; (b) Remunzon, P.; Massoudi, M.; Bouzard, D.; Jacquet, J. *Heterocycles*, **1992**, 34; 679-684.
- <sup>34</sup> (a) Bouzard, D.; Di Cesare, P.; Essiz, M.; Jacquet, J.; Kiechel, J.; Remuzon, P. *J Med Chem.*, **1990**, 33; 1344-1352; (b) McGuirk, P.; Jefson, M.; Mann, D.; Elliott, N.; Chang, P.; Cisek, E. *J Med Chem.*, **1992**, 35; 611-620.
- <sup>35</sup> Sturm, P.; Henry, D. *J Med Chem*, **1974**, 17; 481-487.
- <sup>36</sup> Gilchrist T. *Heterocyclic Chemistry*. 2<sup>th</sup> ed, Wilmington, Addison-Wesley Iberoamericana, **1999**.
- <sup>37</sup> a) Melgar-Fernández, R.; González-Olvera, R.; Olivares-Romero, L.; González-López, V.; Romero-Ponce, L.; Ramírez-Zárate, R.; Demare, P.; Regla, I.; Juaristi E. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 2008 (4); 655-672; b) González-Olvera, R.; Demare, P.; Regla, I.; Juaristi, E. *ARKIVOC*, **2008** (vi); 61-72.