
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

**SÍNTESIS Y ACTIVIDAD DE HÍBRIDOS DE
LOSARTÁN Y ANTIOXIDANTES.**

Gonzalo García Navazo

Alcalá de Henares, Enero 2008

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

**SÍNTESIS Y ACTIVIDAD DE HÍBRIDOS DE
LOSARTÁN Y ANTIOXIDANTES.**

MEMORIA

Que para optar al grado de

Doctor en Química

presenta

Gonzalo García Navazo

Alcalá de Henares, Enero 2008

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Campus Universitario
Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Tel. 918855138
Fax 918854686

DPTO. DE QUÍMICA ORGÁNICA

Dra. María Luisa Izquierdo Ceinos, Profesora Titular y Directora del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá.

CERTIFICA: Que **D. Gonzalo García Navazo**, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá bajo la dirección del **Prof. Dr. Julio Álvarez-Builla Gómez** y del **Prof. Dr. Ramón Alajarín Ferrández** el trabajo experimental recogido en la presente Memoria titulada: “**Síntesis y Actividad de Híbridos de Losartán y Antioxidantes**”, y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Alcalá de Henares, Enero 2008

Fdo. Dra. María Luisa Izquierdo Ceinos

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Campus Universitario
Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Tel. 918855138
Fax 918854686

DPTO. DE QUÍMICA ORGÁNICA

Los abajo firmantes, **Prof. Dr. Julio Álvarez-Builla Gómez** y **Prof. Dr. Ramón Alajarín Ferrández**, Profesores del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá.

CERTIFICAN: Que la Memoria presentada por **D. Gonzalo García Navazo**, con el título: “**Síntesis y Actividad de Híbridos de Losartán y Antioxidantes**”, ha sido realizada bajo su dirección en el departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá, y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, firman el presente certificado.

Alcalá de Henares, Enero 2008

Fdo. Dr. Julio Álvarez-Builla Gómez

Fdo. Dr. Ramón Alajarín Fernández

Esta Memoria ha sido realizada en el Departamento de Química orgánica de la Universidad de Alcalá bajo la dirección del Dr. D. Julio Álvarez-Builla Gómez, a quien deseo expresar mi agradecimiento por su acogida en el grupo, su dirección y apoyo y al Dr. D. Ramón Alajarín Ferrández, el cual me ha orientado constantemente, además de ayudarme en todos los problemas químicos que han surgido durante estos años y sin el cual no habría sido posible la realización de esta tesis.

Hago extensivo mi agradecimiento al Dr. Juan José Vaquero por la colaboración prestada en el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a la Dra. María Luisa Izquierdo Ceinos, directora del departamento de Química Orgánica, así como al resto del profesorado del Departamento, su acogida y atención.

También quiero agradecer la ayuda prestada por el P.A.S., al Dr. Mijail Galakhov, con la Resonancia Magnética Nuclear, a los miembros del Servicio de Espectrometría de Masas y Análisis Elemental y a la Planta Piloto de Química Fina de la Universidad de Alcalá.

De manera muy especial, quiero expresar mi agradecimiento, a todos mis compañeros de laboratorio durante estos años, Patricia, Álvaro, Elena, Vanesa, por sus consejos en el terreno profesional y personal, haciendo extensivo mi agradecimiento al resto de compañeros.

Quiero expresar con especial cariño mi agradecimiento a todos los miembros de mi familia y amigos por el apoyo que me han prestado a lo largo de mi etapa académica, sin el cual la realización de ésta Tesis Doctoral no hubiese sido posible.

A Flor, como agradecimiento a su constante apoyo.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico en ppm
Δ	Reflujo
μm	Micras
μM	Micromolar
(nBu ₄)NI	Yoduro de tetrabutilamoneo
μw	Microondas
¹³ C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
2-CITr	2-Clorotritilo
3 β -HSD	3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa
5,6-DHT	5,6-Dihidrotriptamina
5,7-DHT	5,7-Dihidrotriptamina
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
A β 25-35	Betaamiloide 25-35
ABTS	[2,2'-Azino-di(3-etilbenzotiazolina sulfonato)]
ACE (ECA)	Enzima convertidora de angiotensina
AcOEt	Acetato de Etilo
AcOH	Ácido acético
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFR	Semidehidroascorbato
Ang	Angiotensina
Anh	Anhídrido
ANP	Péptido natriurético auricular
APA	Aminopeptidasa A
APCI	Ionización Química a Presión Atmosférica
API-ES	Ionización a presión atmosférica por electrospray
ARA II	Antagonistas de los receptores de angiotensina II
Arg	Arginina
ARNm (RNAm)	Ácido ribonucleico mensajero
ASC	Área superficial celular
Asp	Ácido Aspártico
AT ₁	Subtipo receptor de membrana
Atm	Atmósfera
ATP	Adenosín Trifosfato
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Bn	Bencilo
BOSS	Biomarcadores del estrés oxidativo
BRA	Bradiquinina
c	Cuadruplete

CAGE	Chymostain-sensitive Ang II Generating Enzyme
c-AMP	3,5-Adenosina monofosfato cíclico
Cat	Catalizador
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CDI	Carbonilimidazol
CE	Células endoteliales
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CHCl ₃	Cloroformo
CML	Células musculares lisas
CMLV	Células musculares lisas vasculares
COX	Citocromo oxidasa mitocondrial
CPh ₃	Tritilo
CPII	Fosfatasa de proteína tipo 1
cpm	Cuentas por minuto
CREB	c-AMP response element binding protein. (c-AMP elemento de respuesta proteína obligatoria.)
Cyp	Citocromo
d	Doblete
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7ene
dd	Doblete de doblete
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicianobenzoquinona
DEAD	Dietilazadicarboxilato
DHA	Dehidroascorbato
DIP-IE	Impacto electrónico
DIP-IQ	Ionización química
dl	Decilitro
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimetilaninopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DOCA	Desoxicortisona
dt	Doblete de triplete
DTT	Ditiotreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECA (ACE)	Enzima convertidora de angiotensina
ED ₃₀	Dosis efectiva para un 30%
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error experimental de la medida
EGF	Epidermal Growth Factor

EM	Espectroscopia de masas
eONs	Oxido Nitrico Sintetasa Endotelial
EP	Enfermedad de Parkinson
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
equiv	Equivalentes
ERK	Señal extracelular relacionada a quinasa
EROs	Especies reactivas del oxígeno
ES (ESI)	Electrospray
ESR	Espectroscopia
ET-1	Endotelina 1
Et ₂ O	Dietiléter
Et ₃ N	Trietilamina
EtOH	Etanol
eV	Electronvoltio
EXP-3174	Metabolito activo de Losartán
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FDA	Administración Federal de Fármacos y Alimentos
fig	Figura
fta	Ftalimida
G	Aceleración gravedad (m/s ²)
g	Gramos
GH	Glutación peroxidasa
GOT	Transaminasa glutámico oxalacética
GP	Grupo protector
GPCR	G-Protein Coupled Receptors
GPR	Proteína G
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
GTP	Transaminasa glutámico-pirúvica
h	Horas
hv	Radiación
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
Hcy	Homocisteina
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución-Masas
HTA	Hipertensión arterial
HV	Hipertrofia Ventricular
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
Hz	Hercios

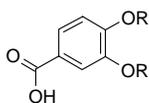
IC	Insuficiencia cardiaca
IC ₅₀	Concentración de inhibidor al 50%
IE	Impacto electrónico
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IGF	Factor de crecimiento de tipo insulina
IKS	Componente lento de la corriente rectificadora demorada de salida de K ⁺
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP3R	Receptor 1,4,5-trifosfato de inositol
IQ	Ionización química
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
IRA	Insuficiencia Renal Aguda
IRC	Insuficiencia Renal Crónica
iv	Vía intravenosa
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
JAK/STAT	Janus-activated kinase/Signal Transduction and Activators Transcription
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
L [·]	Radical alquilo
L	Litro
LDH	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Leu	Leucina
LH	Lípido inactivo
LiAlH ₄	Hidruro de litio y aluminio
Lit	Literatura
L-NAME	Éster metílico de N-nitro-L-arginina
LO [·]	Radical lipídico alcóxil
LOH	Hidróxido lipídico
LOO	Radical lipídico peróxil (Peroxilo)
LOOH	Hidroperóxido lipídico
m	Multiplete
m/e	relación masa/carga
m/z	Unidades de masa
MADO	Metabolitos activos del oxígeno
man-6-P	Manosa-6-fosfato
MAP	Proteína asociada a los microtúbulos
MAPK	Proteincinasas activadas por mitógenos
MAS	Receptor formado por una proteína con siete dominios con carácter G-PCR

MCP-1	1-Metilciclopropeno
MeC	Matriz extracelular
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertzios
min	Minuto
MKP-1	MAP quinasa fosfatasa-1
mL	Militros
MLCK	Kinasa de la cadena liviana de miosina
MLCP	Miosin Light Cain Phosphatasa
MLV	Músculo liso vascular
mm	Milímetros
mmol	Milimoles
MMP	Metaloproteinasa
MMP-9	Metaloproteinasa-9 (Gelatinasa B)
MnO ₂	Oxido de Manganeso
n	Número
NADH	Nicotiamida-Adenina Dinucleótido
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleótido Fosfato
NaH	Hidruro sódico
NaOH	Hidróxido sódico
NBS	N-bromosuccimidina
NCX	Intercambio reverso de Na ⁺ /Ca ⁺
NEP	Endopeptidasa neutra
ng	Nanogramo
NH ₂ OH.HCl	Hidroxilamina clorohidrato
NHE	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺
nM	Nanomolar
NO	Oxido nítrico
NOGMPc	Oxido Nítrico Guanosinmonofosfato Cíclico
NR	No realizado
O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
°C	Grado centígrado
OH [·]	Radical hidroxilo
ONOO [·]	Anión peroxinitrilo
OPN	Osteopontina
P.e.	Punto de ebullición
P.f.	Punto de fusión
p.p.	Producto de partida
PA	Presión arterial
PAF	Paraformaldehído
Pág	Página

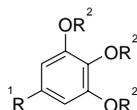
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibition 1
Pd/C	Paladio sobre carbono
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGF-A	Platelet Derived Growth Factor A
PFF	Pentafluorofenol
PGI ₂	Prostaciclina
Ph ₃ CCl	Cloruro de tritilo
Ph ₃ P	Trifenilfosfina
Phe	Fenilalanina
PKC	Protein Kinasa C
PM	Peso molecular
PMB	<i>p</i> -Metoxibencilo
PMBCl	Cloruro de <i>p</i> -metoxibencilo
PP2A	Proteína Fosfatasa 2
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
ProR	Procesamiento de Prorenina
Pt/C	Platino sobre carbono
quint	Quintuplete
Rend	Rendimiento
RHR	Ratas Hipertensas Renales.
RL	Radicales libres
RLO	Radicales libres del oxígeno
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Rto	Rendimiento
s	Singlete
S _{ancho}	Singlete ancho
SAR (SRA)	Sistema Renina-Angiotensina
Sar	Sarcosina
sat	Saturada
Seg	Segundos
sext	Sextuplete
SHP-1	Fosfotirosina fosfatasa
SHR	Modelos de Hipertensión Esencial de Renina
SHRSP	Segmentos aórticos aislados de ratas
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SOD	Superóxido Dismutasa
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

T	Temperatura
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBAI	Ioduro de tetrabutilanomio
TBDMSCl	Cloruro de <i>terc</i> -Butildimetilsilano
<i>t</i> -Bu	<i>terc</i> -Butilo
td	Triplete de dobles
TEA	Trietilamina
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil
TFA	Ácido trifluoroacético
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
THF	Tetrahidrofurano
Tic	1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico
TiCl ₄	Tetracloruro de titanio
TIMP-1	Inhibidor tisular de metaloproteinasas tipo I
TLC	Cromatografía en capa fina
<i>t</i> -PA	Tisular Plasminogen Activator
Tr	Tritilo
Try	Tirosina
TsCl	Cloruro de tosilo
UI	Unidad internacional
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VitE [•]	Radical tocoferilo
v_{max}	Frecuencia de absorción máxima
<i>vs</i>	Frente (versus)

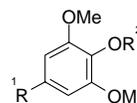
GLOSARIO DE ESTRUCTURAS



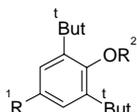
- 10a**, R = H
13a, R = TBDMS



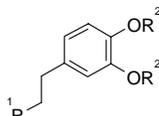
- 10b**, ¹R = COOH, ²R = H
13b, ¹R = COOH, ²R = TBDMS
52b, ¹R = COOH, ²R = Bn
57b, ¹R = CH₂OH, ²R = Bn
60b, ¹R = CH₂OH, ²R = H



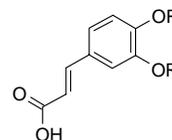
- 10c**, ¹R = COOH, ²R = H
52c, ¹R = COOH, ²R = Bn
57c, ¹R = CH₂OH, ²R = Bn
60c, ¹R = CH₂OH, ²R = H



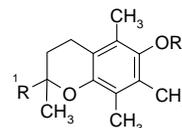
- 10f**, ¹R = COOH, ²R = H
24f, ¹R = CO₂PFF, ²R = H
10g, ¹R = CH₂COOH, ²R = H
60g, ¹R = CH₂CH₂OH, ²R = H



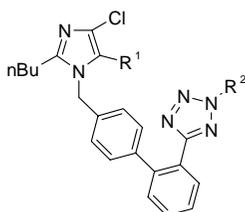
- 10e**, ¹R = COOH, ²R = H
13e, ¹R = COOH, ²R = TBDMS
34e, ¹R = COOH, ²R = PMB
38e, ¹R = COOH, ²R = PMB = H
52e, ¹R = COOH, ²R = Bn
57e, ¹R = CH₂OH, ²R = Bn
60e, ¹R = CH₂OH, ²R = H
77e, ¹R = CH₂NH₂, ²R = Bn
79e, ¹R = CH₂fta, ²R = Bn
80e, ¹R = ²R = Bn



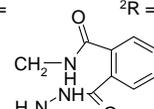
- 10d**, R = H
13d, R = TBDMS



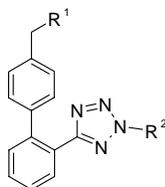
- 10h**, ¹R = COOH, ²R = H
13h, ¹R = COOH, ²R = TBDMS
57h, ¹R = CH₂OH, ²R = Bn
60h, ¹R = CH₂OH, ²R = H



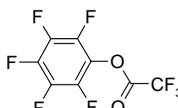
- 1**, ¹R = CH₂OH, ²R = H
6, ¹R = COOH, ²R = H
12, ¹R = CH₂OH, ²R = Tr
32, ¹R = CH₂OH, ²R = ¹Bu
37, ¹R = CH₂OCOCH₃, ²R = ¹Bu
40, ¹R = CHO, ²R = Tr
41, ¹R = CHO, ²R = H
42, ¹R = CHO, ²R = PMB
43, ¹R = CH₂OH, ²R = PMB
46, ¹R = CHO, ²R = 2ClTr
47, ¹R = CH₂OH, ²R = 2ClTr
56, ¹R = COOH, ²R = Tr
69, ¹R = CH₂NH₂, ²R = Tr
70, ¹R = CH=NOH, ²R = H
71, ¹R = CH₂NH₂, ²R = H
72, ¹R = CH=NOH, ²R = Tr
73, ¹R = CH=NOTr, ²R = Tr
81, ¹R = COOEt, ²R = H



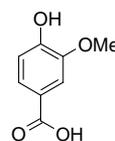
- 89e**, ¹R = CH₂OTs, ²R = Bn



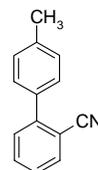
- 18**, ¹R = H, ²R = SnBu₃
19, ¹R = H, ²R = Tr
20, ¹R = Br, ²R = Tr
28, ¹R = H, ²R = H
29, ¹R = H, ²R = Na+
30, ¹R = H, ²R = ¹Bu
31, ¹R = Br, ²R = ¹Bu
39, ¹R = H, ²R = PMB



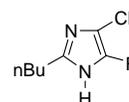
22



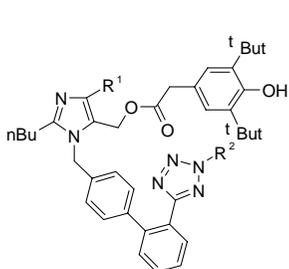
10i



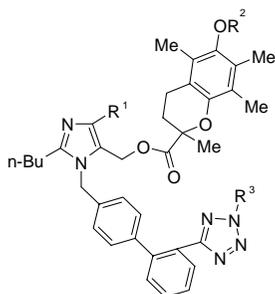
17



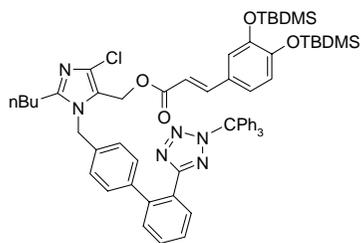
- 21**, R = CHO
61, R = COOH
62, R = COOEt



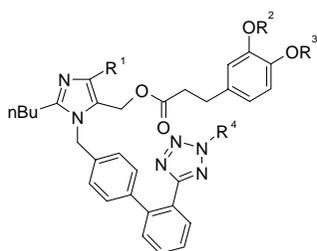
25g, $^1R = Cl$, $^2R = Tr$
11g, $^1R = Cl$, $^2R = H$
27g, $^1R = H$, $^2R = H$



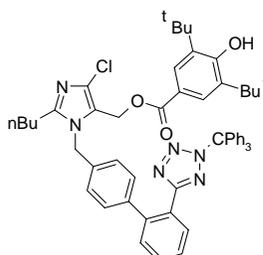
25h, $^1R = Cl$, $^2R = H$, $^3R = Tr$
26h, $^1R = Cl$, $^2R = TBDMS$, $^3R = Tr$
11h, $^1R = Cl$, $^2R = H$, $^3R = H$
27h, $^1R = H$, $^2R = H$, $^3R = H$



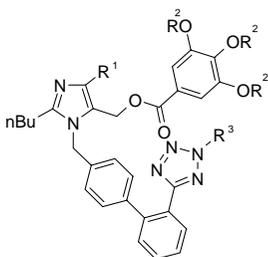
26d



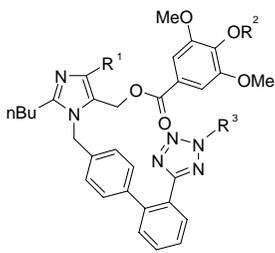
26e, $^1R = Cl$, $^2R = ^3R = TBDMS$, $^4R = Tr$
11e, $^1R = Cl$, $^2R = ^3R = ^4R = H$
27e, $^1R = H$, $^2R = ^3R = H$, $^4R = H$
35e, $^1R = Cl$, $^2R = ^3R = PMB$, $^4R = ^tBu$
36e, $^1R = Cl$, $^2R = ^3R = H$, $^4R = ^tBu$
44e, $^1R = Cl$, $^2R = ^3R = ^4R = PMB$
48e, $^1R = Cl$, $^2R = ^3R = PMB$, $^4R = 2CITr$
49e, $^1R = Cl$, $^2R = PMB$, $^3R = H$, $^4R = 2CITr$
50e, $^1R = Cl$, $^2R = ^3R = PMB$, $^4R = H$
53e, $^1R = Cl$, $^2R = ^3R = Bn$, $^4R = Tr$



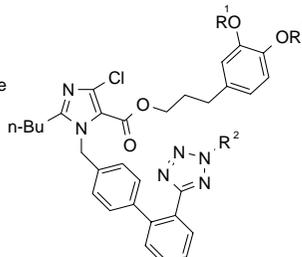
26f



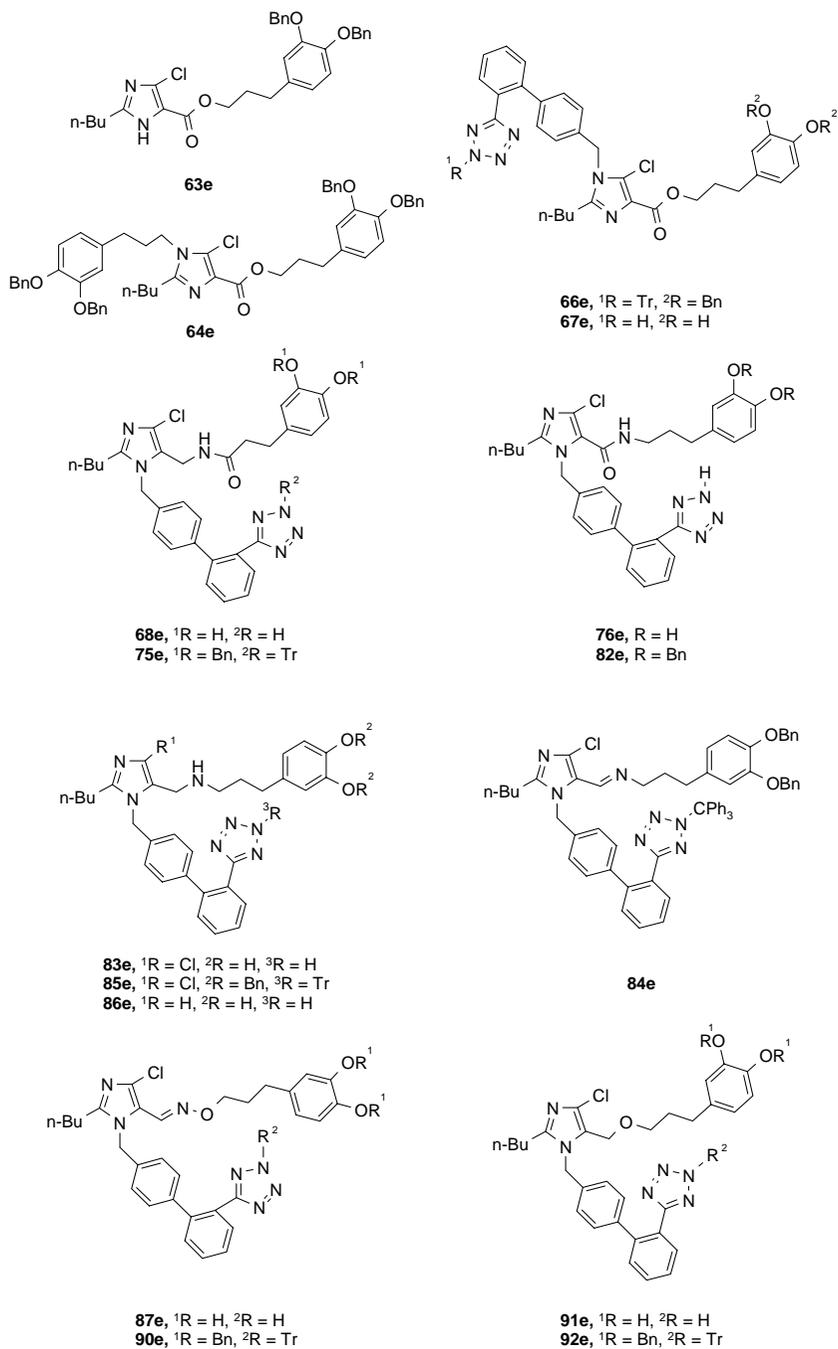
27b, $^1R = H$, $^2R = H$, $^3R = H$
53b, $^1R = Cl$, $^2R = Bn$, $^3R = Tr$



27c, $^1R = H$, $^2R = H$, $^3R = H$
53c, $^1R = Cl$, $^2R = Bn$, $^3R = Tr$



54e, $^1R = H$, $^2R = H$
65e, $^1R = Bn$, $^2R = Tr$



GLOSARIO DE TÉRMINOS

Acción mitogena: Acción que induce a la mitosis.

Adventicia: Dicho de un órgano o parte de un animal o de un vegetal: Que se desarrolla en lugar distinto del habitual.

Agente citoprotectivo: Agente que protege la integridad de las células.

Alteración cognitiva: Alteración progresiva de las funciones corticales y subcorticales.

Angiotensinógeno: Proteína producida por el hígado, está formada por aproximadamente 400 aminoácidos y participa de manera fundamental en el denominado sistema renina angiotensina aldosterona.

Apoproteína: Son péptidos que constituyen la parte proteica de las lipoproteínas, éstas se clasifican en apoproteína A-I, apoproteína A-II, apoproteína-B (apo-B), apoproteína C-I, apoproteína C-II, apoproteína C-III, apoproteína-D y apoproteína-E. Son esenciales para la correcta función de las lipoproteínas.

AT₁: Subtipo de receptor de membrana.

Aterogenico: Sustancia con capacidad de provocar aterosclerosis.

Barorreflejos: Respuesta de los barorreceptores al aumento de la presión arterial. El aumento de la presión dilata los vasos sanguíneos, que activan los barorreceptores en las paredes vasculares. La respuesta neta del sistema nervioso central consiste en una reducción de la salida simpática central. Ello reduce la presión arterial tanto por la disminución de la resistencia vascular periférica como por la disminución del gasto cardíaco. Como los barorreceptores están tonalmente activos, el barorreflejo puede compensar rápidamente los aumentos y las disminuciones de la presión arterial.

Calmodulina: Proteína citosólica que se une al calcio de forma reversible, teniendo por ello función como modulador enzimático y desempeñar un papel fundamental en las señales celulares y desarrollo del vegetal. Se ha postulado la participación del Ca-Calmodulina como mensajero secundario en la secreción de la amilasa de cebada.

Cápsula suprarrenal: Órgano situado encima del extremo superior de cada riñón. Las dos partes de la glándula —la porción interna o médula y la externa o corteza— son órganos endocrinos independientes, están compuestas por tipos de tejidos diferentes y realizan funciones distintas. La médula, que contiene gránulos cromafines, secreta la hormona adrenalina como respuesta a la estimulación por el sistema nervioso simpático en momentos de estrés. También secreta la hormona noradrenalina, que desempeña su papel manteniendo normal la circulación de la sangre.

Célula espumosa: Célula con una apariencia vacuolada típica por la presencia de complejos lipoides. Estas células pueden ser macrófagas o células modificadas del músculo liso, que constituyen un componente significativo de las lesiones iniciales de la aterosclerosis.

Células cebadas: La célula cebada es el lugar predominante de almacenamiento de la histamina en casi todos los tejidos; la concentración de esta sustancia es particularmente grande en tejidos que contienen gran número de dichas células, como piel y mucosa del árbol bronquial y de las vías intestinales.

c-fos y c-jun: Material genético sintético, oncogenes, que podría reducir o paralizar el crecimiento de células cancerosas.

Cronotropo: Factores capaces de modificar la frecuencia cardiaca.

Diabetes mellitus: Proceso eminentemente cardiovascular de origen metabólico.

Dipsogénica: Aumento del apetito por la sal.

ED₃₀: Dosis efectiva (30%) Dosis mínima capaz de producir el efecto deseado del fármaco en un 30% de la población.

Efecto inotrópico: Efecto aplicado a la fuerza de las contracciones musculares.

Endopeptidasas: Subclase de péptido hidrolasas que catalizan la división interna de péptidos y proteínas.

Estiramiento: Acción de la elongación de las paredes del vaso.

Factores neurotróficos: Los factores tróficos necesarios para la supervivencia de las neuronas. Factores tróficos: moléculas de señalización difusibles. Dichas señales son requeridas para la supervivencia de todas las células, su ausencia provoca la muerte celular.

Feocromocitoma: Tumor de la glándula suprarrenal que hace que el cuerpo produzca demasiada adrenalina. Por lo general, los feocromocitomas son benignos (no cancerosos), pero pueden causar presión arterial peligrosamente alta y otros síntomas; inclusive, dolores de cabeza martilleantes, palpitaciones del corazón, enrojecimiento de la cara, náuseas y vómitos.

Fibroblastos: Célula mesenquimal, fusocelular y con el núcleo alargado, que se encarga de la síntesis de sustancia intercelular del tejido conectivo y que, al finalizarla, se convierte en fibrocyto.

Glucuronidación.- La reacción consiste en agregar un grupo glucuronil en un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del tóxico. La enzima que cataliza la reacción es la UDP glucuronil transferasa y el donador del grupo polar es el ácido UDP glucurónico. La enzima se encuentra localizada en el retículo endoplásmico, a diferencia de las otras enzimas de la Fase II que se localizan en el citosol. Los

compuestos glucuronidados son muy solubles en agua y aparecen en la orina y en la bilis. Existe un número muy grande de xenobióticos que son sustrato de esta enzima.

Glutación peroxidasa: Enzima que participa en las transformaciones de especies reactivas del oxígeno, catalizando la reducción del peróxido o lipoperóxido.

Herencia poligénica: Esta representa el resultado de interacciones complejas entre un número variable de genes menores (predisposición genética) que actúan por acción aditiva con factores ambientales usualmente desconocidos.

Hiperhomocistinemia: Niveles elevados de homocisteína, contribuyen a la trombosis arterial, venosa y al desarrollo de aterosclerosis.

Hiperlipoproteinemia: Bajos valores de grasas en sangre.

Hiperplasia: Aumento cuantitativo de un tejido por un incremento del número de células que conservan su normalidad anatómica y funcional. También se denomina hipertrofia numérica o hipergénesis.

Hipóxicos: Con baja cantidad de oxígeno.

IC₅₀: Concentración de inhibidor que produce el 50% de la inhibición.

Inotropismo: Se dice de la sustancia que posee un efecto sobre la contractilidad muscular, específicamente la cardíaca. Los inotrópicos positivos aumentan la contractilidad cardíaca, como por ejemplo los digitálicos, mientras que los inotrópicos negativos, por ejemplo los betabloqueantes, disminuyen la contractilidad.

Íntima: Estructura que cubre el interior de las arterias, integrada por el endotelio y el tejido conectivo subendotelial inmerso en la matriz extracelular.

Isquemia: Sufriamiento celular causado por la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno de un tejido biológico.

Lipoperoxidación: Producto de la oxidación de las lipoproteínas.

Lipoproteínas: Complejos macromoleculares esféricos, están formadas por un núcleo que contiene lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) y una capa externa polar formada por fosfolípidos, colesterol libre y proteínas (apolipoproteínas).

MAS: Receptor formado por una proteína con siete dominios con carácter GPCR.

Métaloendopeptidasas: Endopeptidasas que usan un metal como el zinc en el mecanismo catalítico.

Miocitos: Fibra muscular. Célula muscular, fusiforme y multinuclear.

Nefritis: Síndrome glomerular en el que predomina la aparición brusca de hematuria macroscópica (hematíes en la orina).

Neointima: Hiperplasia de la íntima.

Neovascularización tumoral o angiogénesis: La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes. La angiogénesis es un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. Sin embargo también en un proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral.

Parénquima: Tejido de un órgano. Tejido celular esponjoso. Es la porción funcional de un órgano, a diferencia del estroma que es la porción de sostén.

Parenquimatoso: Tejido celular denso. Son órganos parenquimatosos el hígado, el bazo y los riñones.

Placa aterosclerótica: Masa central gredosa con abundantes sustancias grasas (ateroma) y en forma de cápsula, en tejido colágeno denso (esclerosis). El ateroma corresponde a un foco de necrosis con abundantes lípidos. El tejido colágeno que lo circunda, forma la placa de cubierta junto al lume.

Presión portal: La presión portal se calcula indirectamente por el gradiente de presión venosa hepática menos el gradiente entre la presión venosa hepática de enclavamiento (u oclusión) y la presión venosa hepática libre. El gradiente normal es inferior a 5 mm Hg.

Producción celular autocrina: Acción de una sustancia química actúa sobre la misma célula que la produce para regular su secreción.

Proteinuria: Presencia en la orina de proteína.

Protooncogenes: Genes celulares que controlan los procesos de proliferación y diferenciación. Si se producen mutaciones en estos pueden producirse variantes alteradas u oncogenes que codifican proteínas que desencadenan señales positivas de proliferación que mantienen a la célula estimulada para pasar de una mitosis a otra.

Quimiotaxis: Es el desplazamiento que realizan las células móviles en el medio líquido en el que se encuentran, a favor o en contra de un gradiente químico. Para ello las células poseen receptores celulares que captan las sustancias químicas y se mueven en la dirección donde se encuentran dichas sustancias quimiotácticas.

Retículo sarcoplásmico: El retículo sarcoplásmico (RS) es el principal almacén de calcio intracelular en el músculo estriado y participa de forma importante en la regulación del proceso acoplamiento-excitación-contracción en el músculo esquelético y cardíaco, regulando las concentraciones intracelulares de calcio durante la contracción y la relajación muscular.

Tisular: Tejidos del organismo.

Tracto gastrointestinal: El tracto gastrointestinal empieza en la boca y conduce al esófago, al estómago, al intestino delgado, al colon y, finalmente, al recto y al ano. El tracto gastrointestinal es un tubo muscular largo y hueco a través del cual pasa la comida y se absorben los nutrientes.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HTA)	9
2.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA)	18
2.2.1. Aspectos fisiológicos del sistema renina-angiotensina (SRA)	18
2.2.1.1. Vías alternativas aparte de la ECA	28
2.2.1.2. SRA tisular	29
2.2.1.3. Receptores de Angiotensina	30
2.2.2. Acciones de la Ang II	33
2.2.3. La Ang II y el estrés oxidativo	36
2.2.4. Aldosterona	37
2.3. ANTAGONISTAS PEPTÍDICOS DE ANGIOTENSINA II	42
2.3.1. Inhibidores de los receptores de ang II	42
2.3.1.1. Relación estructura-actividad de agonistas de Ang II	42
2.3.1.2. Relación estructura-actividad de inhibidores peptídicos de Ang II	45
2.3.1.3. Relación estructura-actividad para los subtipos de receptores peptídicos	47
2.4. ANTAGONISTAS NO PEPTÍDICOS DE ANG II SELECTIVOS DE AT ₁	49
2.4.1. Imidazoles iniciales de Takeda	49
2.4.2. Desarrollo de Losartán y SK&F 108566 a partir de los imidazoles iniciales de Takeda	50
2.4.3. Antagonistas de Ang II análogos a Losartán	55
2.4.4. Variaciones en el anillo de imidazol del Losartán	58
2.4.4.1. Antagonistas con anillos de imidazol fusionados	58
2.4.4.2. Antagonistas con anillos de cinco miembros	60
2.4.4.3. Antagonistas con anillos de seis miembros	61
2.4.4.4. Sustitución por análogos acíclicos	62
2.4.5. Variaciones del resto unido al N del anillo de imidazol de Losartán	63
2.4.5.1. Modificaciones del puente de unión del bifenilo al heterociclo	63
2.4.5.2. Reemplazamiento del grupo bifenilo	64
2.4.5.3. (Benzoilamino)imidazoles	66

2.5. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	67
2.5.1. Relaciones estructura-actividad para antagonistas selectivos de AT ₁	67
2.6. EL ESTRÉS OXIDATIVO	72
2.6.1. Introducción	72
2.6.2. Radicales libres	73
2.6.2.1. Fuentes de radicales libres	75
2.6.2.2. Peroxidación lipídica	76
2.6.2.3. Daño oxidativo a proteínas	78
2.6.2.4. Daño oxidativo a ADN	78
2.6.2.5. Estrés oxidativo: métodos de medida	79
2.6.3. Antioxidantes	80
2.6.4. Enfermedades vinculadas al estrés oxidativo	85
2.6.4.1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. (EPOC)	85
2.6.4.2. Estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular	86
2.6.4.3. Cáncer	88
2.6.4.4. Enfermedad de Parkinson, de Alzheimer y otras demencias	88
2.6.4.5. Cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica	89
2.6.4.6. Insuficiencia renal aguda (IRA), crónica (IRC) y diálisis	90
2.6.4.7. Diabetes mellitus	91
2.6.5. Terapias antioxidantes	91
3.DISCUSIÓN DE RESULTADOS	93
3.1. INTRODUCCIÓN	95
3.2. OBJETIVOS	97
3.3. ELECCIÓN DE LOS FRAGMENTOS ANTIOXIDANTES	98
3.4. SÍNTESIS DE ÉSTERES 11	100
3.4.1. Síntesis de losartán protegido 12	100
3.4.2. Síntesis de los ácidos carboxílicos 13	101
3.4.3. Reacción de esterificación	103
3.4.3.1 Esterificación con ésteres de pentafluorofenol	103
3.4.3.2. Esterificación aplicando la reacción de Mitsunobu	104
3.4.3.3. Desprotección del grupo sililéter	105
3.4.3.4. Desprotección del grupo tritilo	106
3.4.3.4.1. Desprotección en medio ácido	106
3.4.3.4.2. Desprotección por hidrogenación catalítica	107

3.4.4. Protección del anillo de tetrazol con bromuro de terc-butilo	108
3.4.5. Protección de 10e utilizando PMBCl	109
3.4.6. Síntesis del éster protegido 35e	109
3.4.7. Desprotección del éster 35e	109
3.4.7.1. Desprotección por medio de ácido trifluoroacético (TFA)	109
3.4.7.2. Desprotección por medio de ácido acético	110
3.4.8. Protección del anillo de tetrazol con PMBCl	111
3.4.9. Protección del anillo de tetrazol con el grupo 2-clorotritilo	113
3.4.10. Revisión de la reacción de hidrogenación catalítica	115
3.4.10.1. Protección de los ácidos 11 con bromuro de bencilo	115
3.4.10.2. Esterificación de Mitsunobu	116
3.4.10.3. Desprotección mediante hidrogenación catalítica	116
3.4.10.3.1. Desprotección utilizando Pd-C 30%	116
3.4.10.3.2. Desprotección utilizando Pt-C 5%	117
3.4.10.3.3. Optimización de la desprotección utilizando Pd-C 30%	118
3.4.11. Ensayos farmacológicos <i>in vitro</i>	119
3.4.11.1. Medida de la capacidad antioxidante total	119
3.4.11.2. Medida del desplazamiento de la angiotensina II (Ang II) de su receptor	120
3.4.11.3. Medida de la inhibición de la contracción celular en presencia de Ang II	120
3.4.11.4. Medida de la capacidad para bloquear la contracción celular en presencia de Ang II y de peróxido de hidrógeno	122
3.4.12. Experimentación <i>in vivo</i>	123
3.5. SÍNTESIS DEL ÉSTER INVERSO 54e	128
3.5.1. Preparación de alcoholes protegidos 57	129
3.5.2. Desprotección de los alcoholes 57	130
3.5.3. Oxidación del aldehído 40	130
3.5.4. Oxidación del 2-butil-5-cloro-3H-imidazol-4-carbaldehído 21	132
3.5.5. Síntesis de los ésteres híbridos 54e y 67e	133
3.6. SÍNTESIS DE LA AMIDA 68e	136
3.7. SÍNTESIS DE LA AMIDA INVERSA 76e	140
3.8. SÍNTESIS DE LA AMINA 83e	143
3.9. SÍNTESIS DEL ÉTER DE OXIMA 87e	145

3.10. SÍNTESIS DEL ÉTER 91e	146
3.11. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	147
4. PARTE EXPERIMENTAL	151
4.1. SÍNTESIS DE ÉSTERES 11	155
4.1.1. Síntesis de Losartán	155
4.1.2. Síntesis de ácidos antioxidantes protegidos con cloruro de terc-Butil-dimetil-silano 13	159
4.1.3. Síntesis de ésteres 25	163
4.1.4. Desprotección del sililéter 26h	166
4.1.5. Desprotección mediante hidrogenación catalítica	167
4.1.6. Variación de los grupos protectores en la síntesis del éster 11e	174
4.1.6.1. Protección del anillo de tetrazol con bromuro de terc-butilo	174
4.1.6.2. Protección de 10e utilizando PMBCl	179
4.1.6.3. Síntesis del éster protegido 35e	180
4.1.6.4. Síntesis del éster protegido 44e	181
4.1.7. Síntesis de ácidos antioxidantes protegidos con cloruro de bencilo	182
4.1.8. Esterificación de Mitsunobu de los ácidos protegidos 52 con el precursor de Losartán 12	185
4.2. SÍNTESIS DEL ÉSTER INVERSO 54e	188
4.2.1. Síntesis de alcoholes antioxidantes protegidos 57	188
4.2.2. Síntesis de alcoholes antioxidantes desprotegidos 60	193
4.2.3. Síntesis del éster inverso 54e	196
4.3. SÍNTESIS DE LA AMIDA 68e	203
4.4. SÍNTESIS DE LA AMIDA INVERSA 76e	210
4.5. SÍNTESIS DE LA AMINA 83e.	215
4.6. SÍNTESIS DEL ÉTER DE OXIMA 87e	218
5. CONCLUSIONES	223
6. SUMMARY	227

Nota: La numeración de los distintos esquemas, figuras, tablas, gráficos y bibliografía se inicia en cada capítulo.

1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son, en la actualidad, la principal causa de muerte en los países desarrollados. Los conocimientos actuales sugieren que tanto la angiotensina II (Ang II) como los metabolitos activos derivados de oxígeno (MADO) juegan un papel fundamental en el desarrollo del daño tisular de las enfermedades cardiovasculares, constituyen la vía final común de una serie de procesos, como la hipertensión arterial, la diabetes, las dislipemias o el tabaquismo, y se caracterizan por la aparición de lesiones en órganos tan importantes como el sistema nervioso central, el corazón o el riñón.

El sustrato anatómico de estas enfermedades se caracteriza por la aparición de diversos grados de desestructuración de la pared arterial, disminución de la luz vascular e isquemia tisular, con el subsiguiente daño de los distintos parénquimas.¹

Los mecanismos responsables de estas alteraciones son muy complejos, pero tanto la Ang II como los MADO parecen jugar un papel central en la génesis del daño vascular. Esto ha sido demostrado de forma repetida en estudios *in vitro* y en modelos experimentales de enfermedad cardiovascular.² En concreto, el losartán (Figura 1),³ primer antagonista del receptor de Ang II activo por vía oral que se sintetizó, ha demostrado, de forma repetida, su capacidad de protección tisular en pacientes hipertensos.⁴ Por otra parte, también existen evidencias de que los antioxidantes pueden resultar beneficiosos en estos pacientes.⁵

La hipótesis que ha conducido a elaborar la siguiente propuesta ha sido la siguiente: si se diseñan fármacos antihipertensivos capaces

¹Kaplan N.M. "Clinical hypertension", 8th ed. chp. 4, pp 144-154. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. USA, 2002.

²Berry C., Brosnan M. J., Fenell J., Hamilton C. A., Dominiczak A. F. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2001,10, 247; Luft F.C. *Hypertension* 2001, 37, 594.

³Carini, D. J.; Duncia, J. V.; Aldrich, P. E.; Chiu, A. T.; Johnson, A. L.; Pierce, M. E.; Price, W. A.; Santella III, J. B.; Wells, G. J.; Wexler, R. R.; Wong, P. C.; Yoo, S.E.; Timmermans, P. B. M.W. M. *J. Med Chem.* 1991, 34, 2525; Carini, D. J.; Duncia, J. J.Wang, P. C. B. 1988, US 5138069, CA:1338238; Campbell, Jr., G. C.; Dwivedi, A. M.; Levorse, D. A.; McCauley, J. A.; Raghavan, K. S. 1995, US 5608075, CA:2179067

⁴Dahlof B., Devereux R., de Faire U., Fyhrquist F., Hedner T., Ibsen H., Julius S., Kjeldsen S., Kristianson K., Lederballe-Pedersen O., Lindholm L.H., Nieminen M.S., Omvik P., Oparil S., Wedel H. *Am J Hypertens.* 1997, 10, 705.

⁵Beswick R. A., Zhang H., Marable D., Catravas J. D., Hill W. D., Webb R. C. *Hypertension* 2001, 37, 781.

de bloquear a la vez la Ang II y los MADO, sus efectos beneficiosos en pacientes hipertensos serán superiores a los que ejercerían otros fármacos que bloquearan únicamente uno de estos dos sistemas.⁶

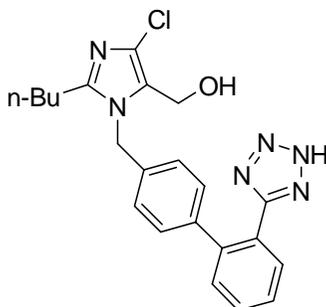


Figura 1

Los antagonistas de los receptores AT₁ de la Ang II (ARA-II) son un grupo de fármacos que antagonizan las acciones que la Ang-II ejerce por mediación de éstos, independientemente de cuál sea su vía de síntesis.

Los *terc*-butilfenoles y algunos sistemas análogos se han utilizado previamente asociados químicamente con diversos antagonistas del calcio. Los compuestos resultantes han mostrado, en algunos casos, una acción terapéutica dual como agentes citoprotectores.⁷ Estos precedentes avalan nuestra estrategia de modificación estructural de antagonista de Ang II dirigida a conferirles actividad antioxidante mediante la incorporación de fenoles en su estructura química básica. Los fenoles elegidos (Figura 2) han sido seleccionados por su utilización previa en el campo de los antagonistas de calcio.⁸

⁶ Sowers J. R. *New Eng. J. Med.* **2002**, 346, 1999-2001.

⁷ Hellberg, M. R.; Barnes, G.; Collier, R. J.; *US Patent* n° 5.424.321, **1995**.

⁸ Hellberg, M. R.; Barnes, G.; Collier, R. J.; *PTC Patent*, WO95/15958, **1995**.

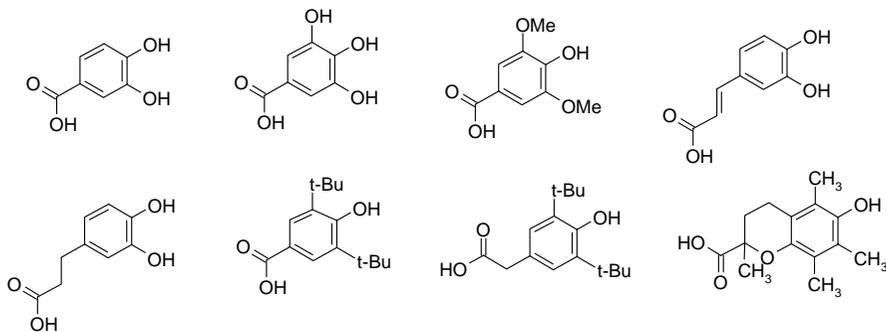
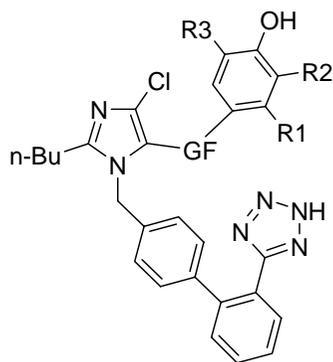


Figura 2

El proyecto de Tesis Doctoral presentado en esta Memoria se enmarca en el contexto de una búsqueda de derivados del producto losartán, un antagonista de angiotensina II, con fragmentos fenólicos antioxidantes, tanto en forma de base como de sal farmacológicamente aceptable (Figura 3).



GF = Grupo funcional

Figura 3

2. Antecedentes

2.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HTA)

La hipertensión arterial (HTA) constituye una enfermedad del sistema cardiovascular frecuente en la población adulta y es el principal factor de riesgo después de los 45 años de edad. Es una causa importante de accidente vascular encefálico, insuficiencia cardíaca (IC), cardiopatía isquémica, insuficiencia renal y retinopatía y se demuestra que el tratamiento de las formas ligeras de HTA previene la aparición de la cardiopatía isquémica¹.

La HTA es una elevación de la presión arterial sistólica o diastólica, ya sea primaria (hipertensión esencial) o secundaria. La hipertensión primaria no está vinculada a una etiología única. Puede ser una desviación cuantitativa del promedio y un reflejo de una herencia poligénica de la presión arterial. La hipertensión secundaria depende de la nefropatía parenquimatosa bilateral o de trastornos potencialmente curables como el feocromocitoma, el síndrome de Cushing, el aldosterismo primario, el hipertiroidismo y la coartación de aorta o la administración de anticonceptivos hormonales.

No existe ningún medio de curar la HTA primaria pero el tratamiento adecuado puede modificar su evolución. Existen una serie de medidas generales como la sedación, el reposo adicional, la disminución del estrés, el adelgazamiento, la restricción de sodio en la dieta y la corrección de la hiperlipoproteinemia. Estas medidas son importantes y en ciertos casos de hipertensiones leves bastan para un adecuado control de la tensión arterial. Pero casi siempre es necesario el empleo de antihipertensivos. Inicialmente puede recurrirse a la administración de un único fármaco (monoterapia), pero a veces hay que recurrir al empleo de combinaciones medicamentosas, con el objeto de disminuir la dosis de cada fármaco, reducir el riesgo de toxicidad y lograr una favorable potenciación del efecto terapéutico de cada uno de los componentes de la combinación.

Los mecanismos fisiopatológicos implicados en la HTA, así como el lugar y mecanismo de acción de los más importantes antihipertensivos se resumen en la Figura 1. En la Tabla 1 se clasifican los antihipertensivos con arreglo a su lugar y mecanismo de acción.

¹ Fármacos Antihipertensivos. García del Pozo J.; Velasco Martín A.; Diuréticos y anti-diuréticos. Pérez-Accino Picatoste C.; Velasco Martín A. FARMACOLOGÍA FUNDAMENTAL. *McGraw Hill* 2003.

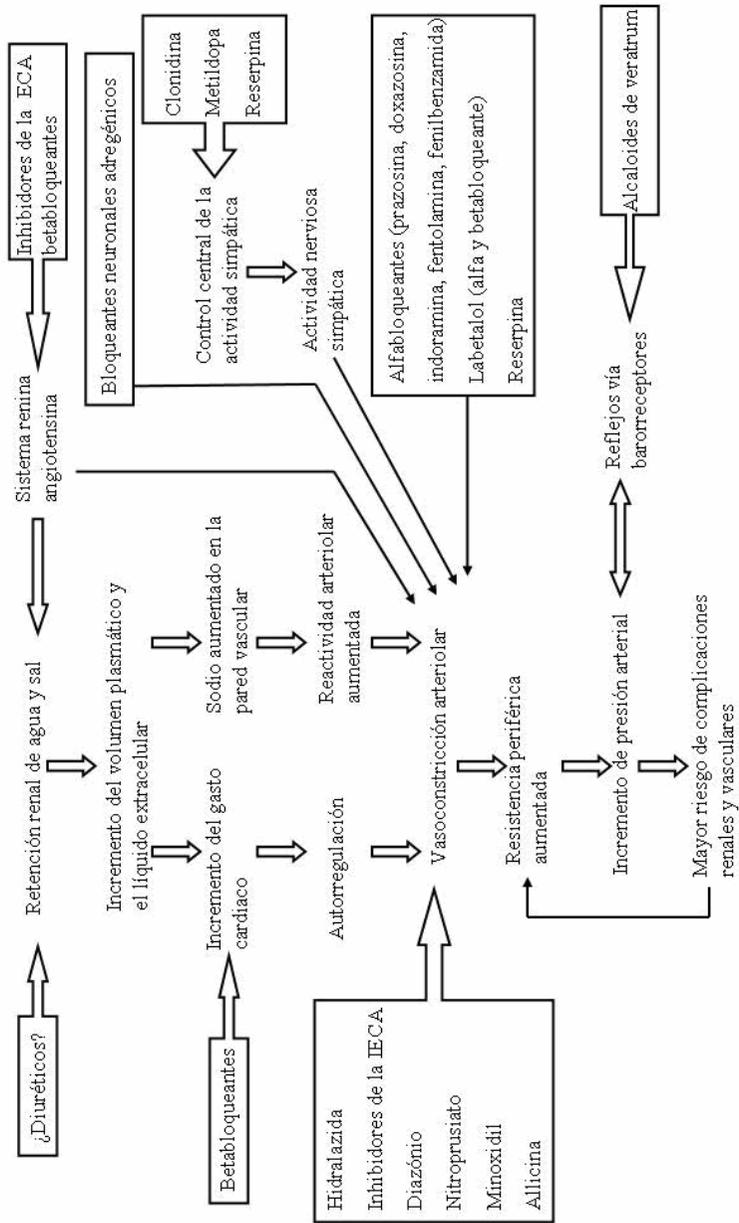


Figura. 1 Fisiopatología de la hipertensión. Lugar y mecanismo de acción de los antihipertensivos ECA = enzima de conversión de la angiotensina.

Grupo terapéutico	Mecanismo de acción
Diuréticos Saluréticos Diuréticos de ASA	Disminución de sodio, vasodilatación, reducción temporal de la volemia, modificación de la respuesta vascular a los medicamentos presores. (Figura 2)
Betabloqueantes (acebutolol, atenolol, bisoprolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol, propranolol)	Reducción del gasto cardíaco, inhibición de la liberación de renina, efectos sobre el sistema nervioso central, inhibición de la liberación de noradrenalina (Figura 3)
Bloqueantes de los receptores adrenérgicos α	Pueden ser selectivos bloqueando selectivamente los receptores adrenérgicos α_1 , como la prazosina y sus análogos, o no selectivos, como la fenoxibenzaamida y la fentolamida. (Figura 4)
Bloqueantes de los receptores adregénicos α y β (labetalol)	Aparte de su efecto α y β -adrenolítico bloquean la recaptación de catecoaminas y son vasodilatadores directos y estabilizadores inespecíficos de membrana. (Figura 5)
Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (captopril, enalapril, lisinopril, perindopril, quinapril)	Reducción de las concentraciones plasmáticas de angiotensina II (vasoconstrictores) e incremento de las concentraciones de cininas vasodilatadoras. También reducen la concentración de aldosterona. (Figura 6)
Bloqueantes de receptores AT_1 de angiotensina II. (irbesartán, losartán, valsartán, candesartán, telmisartán, eprosartán)	Bloquean las acciones vasculares (vasoconstricción) y renales de la angiotensina II, no producen tos en algunos IECAS. (Figura 7)
Antagonistas del calcio: Dihidropiridinas, verapamilo	Reducción de la entrada de calcio en la célula actuando sobre los canales dependientes de voltaje de membrana. (Figura 8)
Vasodilatadores directos (Hidralazina, minoxidil, nitroprusiato de sodio)	La hidralazina es un vasodilatador arteriolar selectivo que produce cambios en la permeabilidad de la membrana. El diazóxido y el minoxidil facilitan la apertura de los canales de potasio regulados por la concentración intracelular de ATP. El nitroprusiato sódico actúa de forma similar a óxido nítrico (NO). (Figura 9)
Agonistas de receptores en el SNC (agonistas α_2 : metildopa, clonidina, agonistas I_1 : moxonidina)	Reducen la eferencia simpática del SNC. (Figura 10)
Otros fármacos que interfieren en la acción vasomotora del simpático: (reserpina, guanfazina, guanetidina, guanacina, debrisoquina, trimetafán)	La reserpina disminuye las catecolaminas e indolaminas central y periféricamente. La guanfazina es un agonista de los receptores adrenérgicos α_2 . La guanetidina, la debrisoquina, la guanacina o el bretilio inhiben la liberación de catecolaminas, aunque sensibilizan a ellas en el feocromocitoma. (Figura 11)

Tabla 1: Fármacos antihipertensivos: lugar y mecanismo de acción.

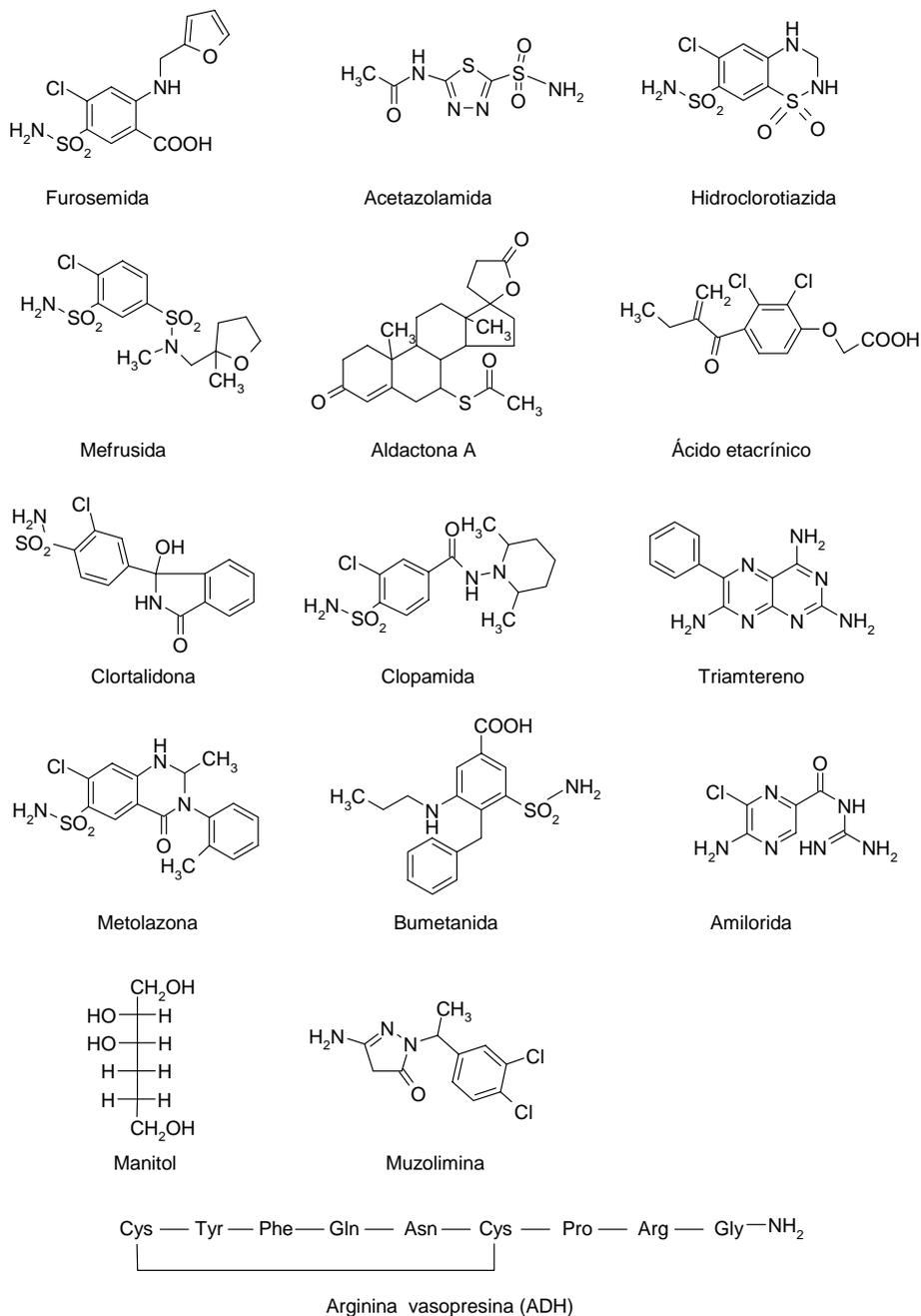


Figura 2. Estructuras de los principales diuréticos y antidiuréticos. La arginina-vasopresina es un octapéptido considerando a la cistina como un aminoácido y es un nonapéptido considerando que la cistina son dos cisteínas unidas por un enlace disulfuro.

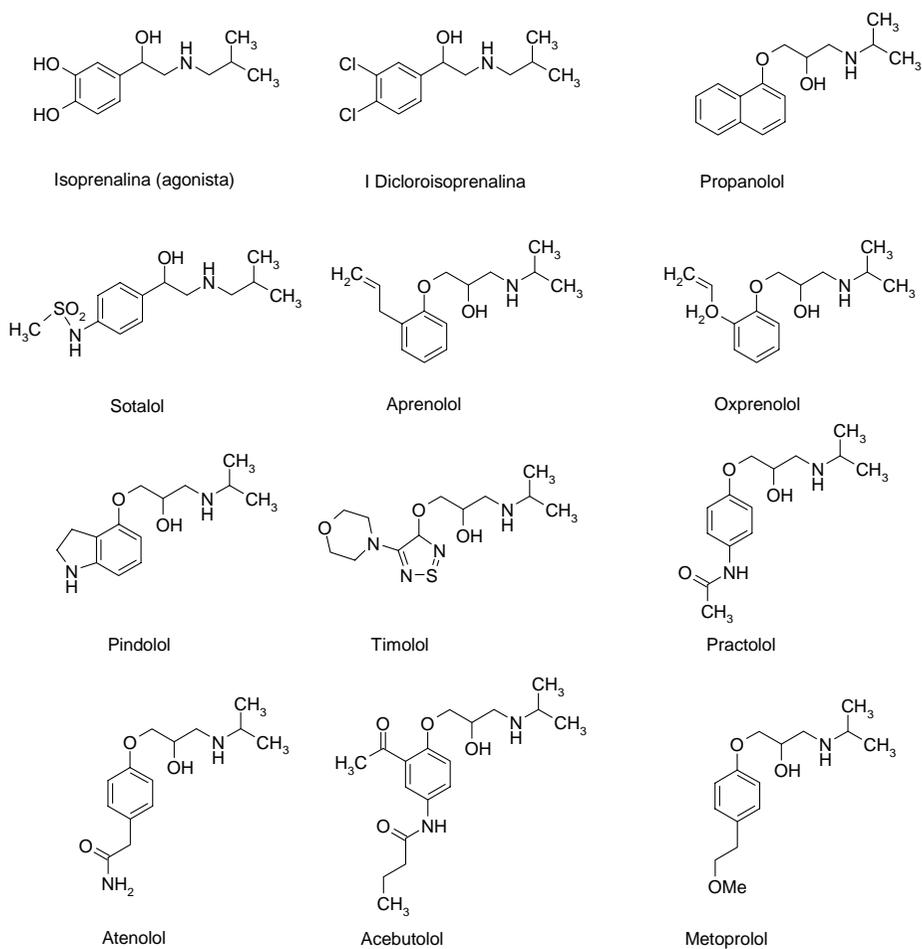


Figura 3. Fórmula estructural de los principales bloqueantes β -adrenérgicos.

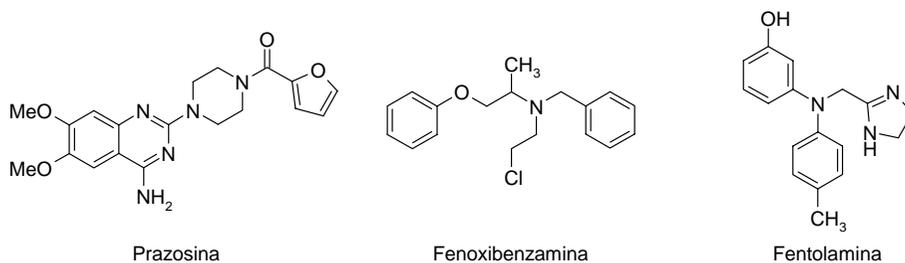
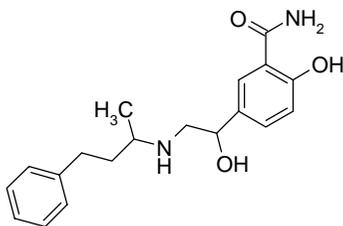
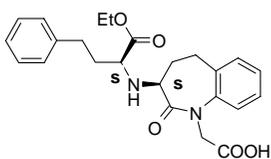


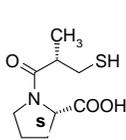
Figura 4. Bloqueantes de los receptores adregénicos α .



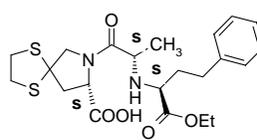
Labetalol

Figura 5. Bloqueantes de los receptores adregénicos α y β .

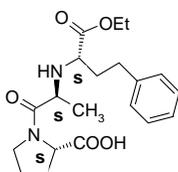
Benazepril



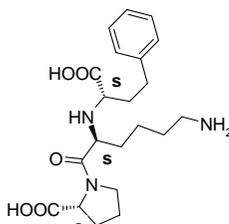
Captopril



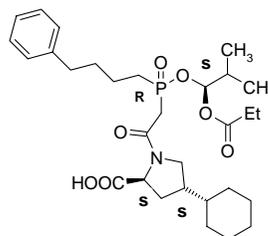
Espirapril



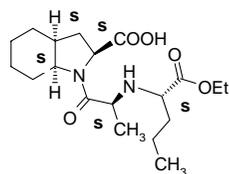
Enalapril



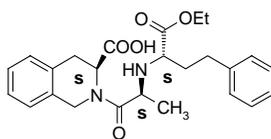
Lisinopril



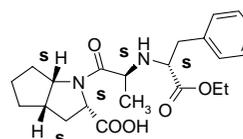
Fosinopril



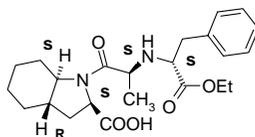
Perindopril



Quinapril



Ramipril



Trandolapril

Figura 6. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

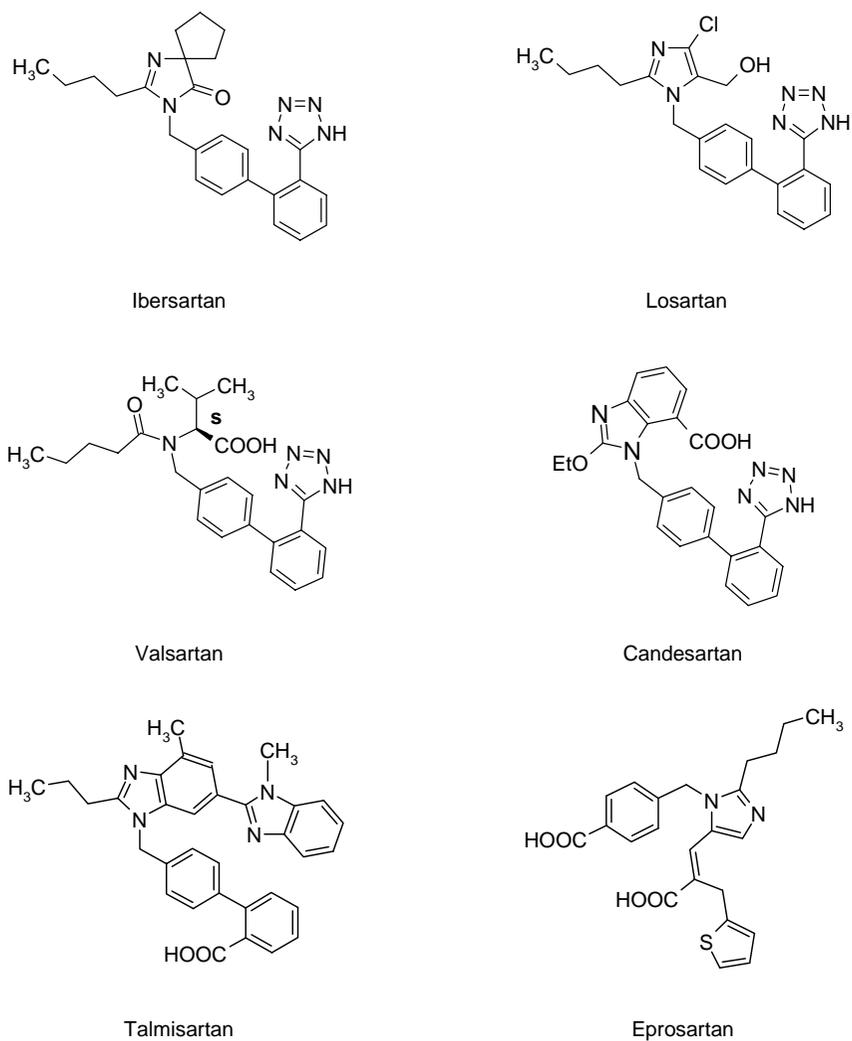


Figura 7. Bloqueantes de receptores AT₁ de angiotensina II.

TIPO	DESCRIPCION	MEDICAMENTOS
Tipo 1	Acción exclusiva sobre canales de Ca. Acción “ <i>in vitro</i> ” e “ <i>in vivo</i> ” sobre la conducción cardíaca, prolongando la conducción AV y el período refractario.	Fenilalquilaminas: Verapamilo Benzotiazepinas: Diltiazem
Tipo 2	Acción exclusiva sobre canales de Ca. Acción “ <i>in vitro</i> ”, pero no “ <i>in vivo</i> ”, sobre la conducción cardíaca	Dihidropiridinas: Amlodipina Felodipina Isradipina Lacidipina Lercanidipina Nifedipina Nicardipina Nisoldipina Nitrendipina Nimodipina
Tipo 3	Acción exclusiva sobre canales de Ca. Sin acción sobre la conducción cardíaca, ni “ <i>in vitro</i> ” ni “ <i>in vivo</i> ”.	Cinarizina Flunarizina
Tipo 4	Actúan también sobre canales de Na. Propiedades electrofisiológicas complejas	Lidoflazina

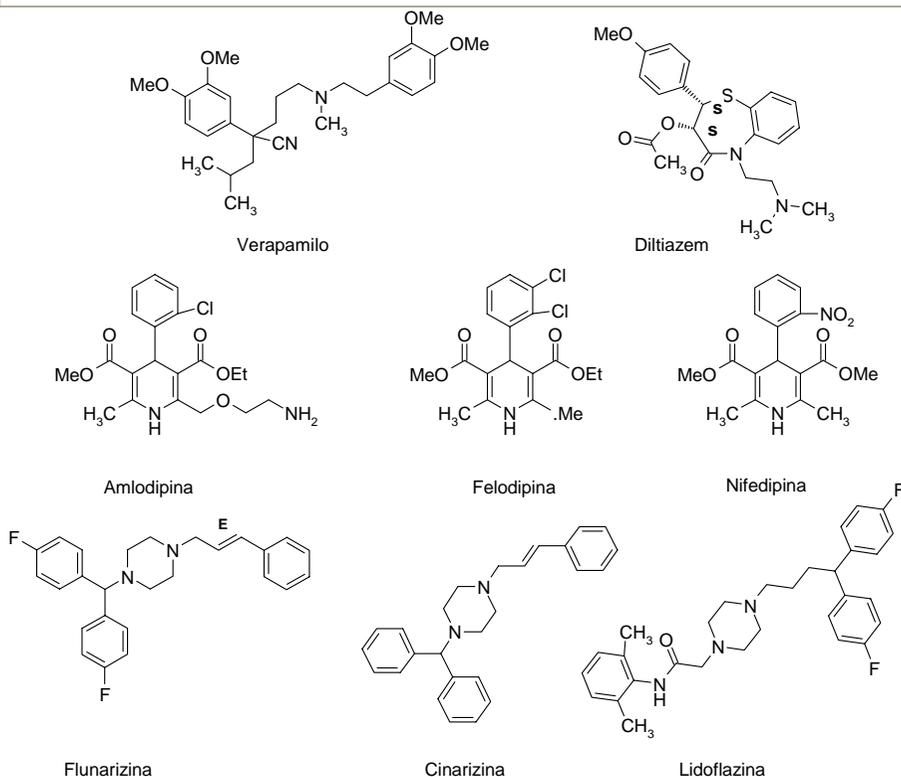


Figura 8. Antagonistas del calcio.



Figura 9. Vasodilatadores directos.

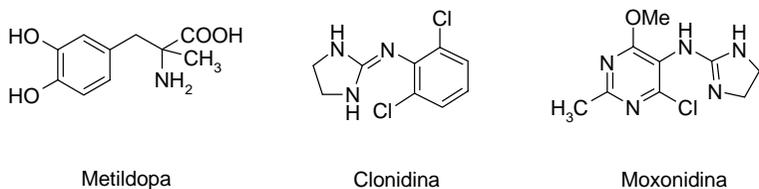


Figura 10. Agonistas de receptores en el SNC.

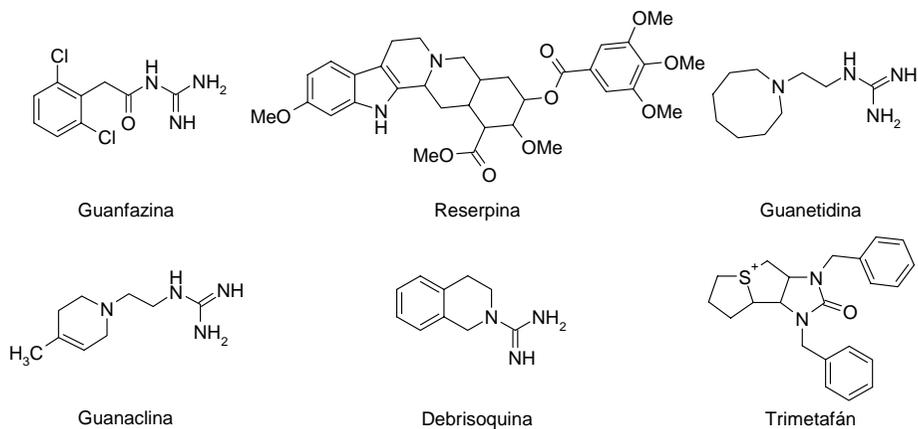


Figura 11. Otros fármacos que intervienen en la acción motora del simpático.

2.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA)

2.2.1. Aspectos fisiológicos del sistema renina-angiotensina (SRA)

La insuficiencia cardiaca (IC) se define como la incapacidad del corazón de aportar sangre con sus nutrientes en una tasa acorde con los requerimientos metabólicos de los tejidos en reposo o durante ejercicio ligero. Esta incapacidad despierta una respuesta neurohormonal que se interrelaciona con las alteraciones hemodinámicas vinculadas a las cargas ventriculares, más los problemas funcionales y estructurales del miocardio que puedan existir.

En la fisiopatología de la IC tiene importante participación el Sistema Renina Angiotensina (SRA) (Figura 12), cuyas acciones principales incluyen la de regular la presión arterial, el tono vascular, y la volemia, y facilitar la transmisión simpática. Participa en la remodelación ventricular del infartado y del hipertenso, así como en la remodelación vascular. Este sistema es mucho más complejo de lo que se había pensado y capaz de generar una gran cantidad de péptidos biológicamente activos capaces de producir diversas acciones.

Renina inactiva (prorenina)

El procesamiento de prorenina (ProR) a renina sólo ha sido demostrado en el riñón², posiblemente mediado por una proteasa, que hasta ahora se desconoce. La difusión de ProR en el espacio intracelular cardíaco se produce mediante receptores. Uno de estos receptores es *manosa-6-fosfato/ factor de crecimiento de insulina-II* (man-6-P/IGF-II).

Renina

La renina es una proteína glicosilada de PM entre 36-40 kDa, dependiendo de la especie. Si bien el riñón continúa siendo el principal órgano productor de renina, la mayoría de componentes del SRA se expresan, en grado variable en diferentes tejidos^{3,4,5,6,7,8,9,10}. La renina

² van den Eijnden MMED; Saris, J.J.; de Bruin, R.J.A. *Arteriosclerosis, Thombosis and Vascular Biology* **2001**, *21*, 911-916.

³ Dzau, V.J.; Ellison, K.E.; Brody, T.; Ingelfinger, J.; Pratt, R.E. *Endocrinology* **1987**, *120*, 2334-2338.

se produce en las células yuxtaglomerulares renales a partir de un precursor, la prorrenina. En tejido cardíaco, la renina sería captada de la circulación, al igual que en el caso de ProR, a través del receptor man-6-P/IGF-II^{11,12}. Se puede sugerir una integración bioquímica del SRA circulante clásico con un sistema vascular local, el cual podría resultar tanto de una síntesis *de novo* o de una entrada de renina y angiotensinógeno desde la sangre¹³.

La renina actúa sobre su sustrato, el angiotensinógeno, una glicoproteína de la familia de las α -2-globulinas, sintetizada en el hígado.

⁴ Wagner, N.J.; Morgan, K.; Brammer, W. J.; Swales, J.D. *J. Hyperten* **1988**, *6*, 247-252.

⁵ Samani, N.J.; Morgan, K.; Brammer, W.J.; Swales, J.D. *J. Hyperten* **1987**, *5*, S19-21.

⁶ Rosenthal, J.H.; Pfeifle, B.; Michalov, M.L.; Pschorr, J. *Hypertension* **1984**, *6*, 383-390.

⁷ Field, L.J.; McGowan, R.A.; Dickinson, D.P.; Gross, K.W. *Hypertension* **1984**, *6*, 597-603.

⁸ Pandey, K.N.; Maki, M.; Inagami, T. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1984**, *125*, 662-667.

⁹ Sealey, J.E.; Rubattu, S. *Am. J. Hyperten.* **1989**, *2*, 358-366.

¹⁰ Poisner, A.M.; Wood, G.W. Poisner, R.; Inagami, T. *Endocrinology* **1981**, *109*, 1150-1155.

¹¹ van Kesteren C.A.M.; Danser, A.H.J.; Derkx, F.H.M., Dekkers, D.H.W. Lamers, J.M.J.; Saxena, P.R.; Schalekamp, M.A.D.H *Hypertension* **1997**, *30*, 1389-1396.

¹² Admiraal, p.J.J.; van Kesteren, C.A.M.; Danser, A.H.J.; Derkx, F.H.M.; Sluiter, W.; Schalekamp, M.A.D.H. *J. Hypertens.* **1999**, *17*, 621-629.

¹³ Campbell, D.J. *J. Clin. Inves.* **1987**, *79*, 1-6.

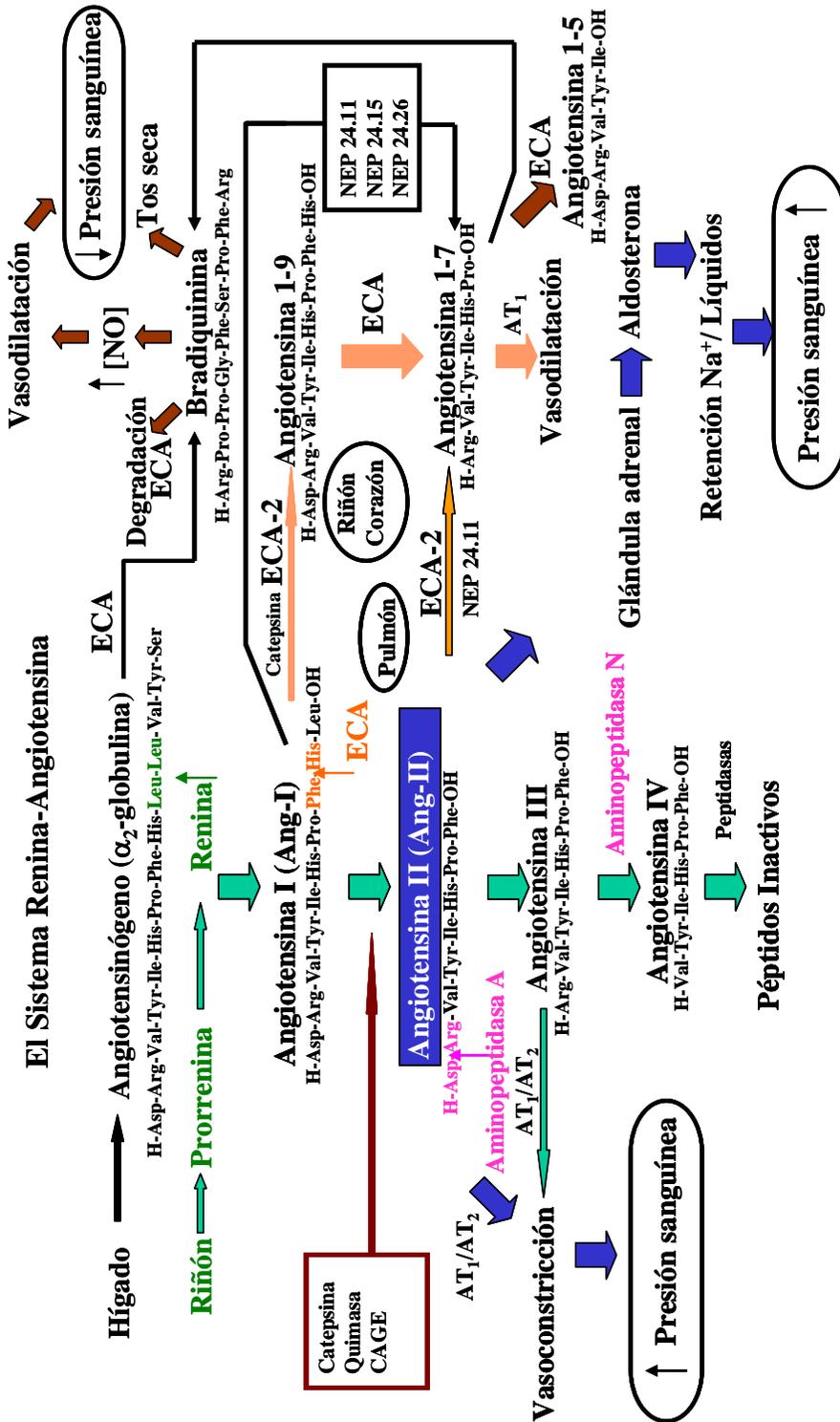


Figura 12. Sistema Renina-Angiotensina.

Los estímulos principales de secreción de renina son: 1) la disminución de flujo de la arteria aferente del glomérulo renal; 2) la disminución de Na^+ plasmático; 3) estímulos simpáticos (estimulación β -1-adrenérgica de las células yuxtglomerulares); 4) factores locales como las prostaglandinas, la dopamina, la adenosina, y el óxido nítrico (NO).

Angiotensinógeno

El angiotensinógeno (ANG) es una glucoproteína de 452 aminoácidos cuya síntesis y secreción está regulada en hígado por un complejo mecanismo fisiológico. Por acción de la renina es fragmentado por el enlace peptídico entre los aminoácidos Leu-10 y Leu-11 perdiendo 4 aminoácidos y así se transforma en angiotensina I (Ang I), deca péptido. Los estudios realizados permiten suponer un rol importante del ANG en el proceso y mantenimiento de la hipertensión arterial (HTA), aunque no está claro de qué manera y condiciones. Además, queda también sin responder por qué el organismo sintetiza una proteína de 452 aminoácidos para utilizar sólo 10.

Angiotensina I (Ang I)

La Ang I es un deca péptido que posee un efecto mínimo sobre la presión arterial. Sin embargo es un metabolito importante en el SRA como intermedio de otros péptidos por acción de diversas peptidasas. Así, es convertido en angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), catepsina y quimasa, y en angiotensina (1-9) (Ang 1-9) por ECA2. La Ang I puede también ser convertida en el hexapéptido Ang (1-7) por ciertas endopeptidasas tisulares tales como las endopeptidasas neutras (NEP) 24.11, NEP 24.15 y NEP 24.26^{14,15,16,17}.

Enzima convertora de Ang I (ECA)

La enzima convertora de Ang I: peptidil dipeptidasa A, kininasa II, endopeptidasa EC 3.4.5.1 (ECA), es una enzima transmembranal

¹⁴ de la Riva I. Control de la presión arterial. En Fisiología Humana, Edit. por Horacio E. Cingolani y Alberto B. Houssay. 7ma Edición. *El Ateneo*, Buenos Aires, **2000**.

¹⁵ De Mello, WC.; Danser, A.; *Hypertension* **2000**, *35*, 1183-88.

¹⁶ Ferrario, C.; Brosnihan, K.; Diz, D.; Jaiswal, N.; Khosla, M.; Milsted, A.; Tallan, E. *Hypertension* **1991**, *18* (suppl III):III, 126-133.

¹⁷Touyz, R.; Schiffrin, E. *Pharmacolog Rev* **2000**, *52*, 639-72.

zinc metalopeptidasa. El importante rol que juega en la regulación de la presión arterial (PA) y en metabolismo salino, lo efectúa fragmentando el enlace peptídico entre los aminoácidos Phe-8 y His-9 de Ang I y transformándolo en el potente vasoconstrictor angiotensina II (Ang II), octapéptido. Ambos participan en la regulación del tono vascular y en la función cardíaca. Además, actúa degradando el péptido vasodilatador bradiquinina (BRA). La ECA humana se presenta en dos formas, una de PM entre 150-180 kDa (ECA somática) con dos dominios homólogos que se denominan, de acuerdo a su posición en la cadena: N-terminal o Dominio-N y C-terminal o Dominio-C; conteniendo ambos zinc en el sitio de unión y un centro activo¹⁸. La otra es de bajo PM (90-100 kDa), se encuentra en testículo (ECA germinativa) y contiene solamente Dominio-C. La ECA también tiene la propiedad de procesar angiotensina (1-7) a angiotensina (1-5), haciéndolo 100 veces más rápido por el dominio-N que por el Dominio-C¹⁹.

La ECA está ubicada en la membrana de las células endoteliales (CE) parenquimatosas y también inflamatorias.^{20,21,22,23,24,25,26,27} En el endotelio y en los fibroblastos predomina la expresión de ECA. Cuando hay disfunción endotelial se produce una perturbación en la regulación vasomotora, en el crecimiento celular y el estado inflamatorio de la pared vascular, y activación de la ECA tisular, incrementándose la producción local de Ang II y degradación de BRA, factores que perturban profundamente la homeostasis circulatoria. Aparte de su importante función endotelial la ECA participa en la fisiopatología de la placa aterosclerótica. El tejido de conducción contiene poca cantidad de ECA. Menos del 10% de la ECA circula en el plasma, y su función precisa - probablemente mínima - es incierta. Es decir, la ECA es una enzima fundamentalmente tisular.²⁸ Hay importantes niveles de

¹⁸ Deddish, P.A.; Wang, L.; Jackman, H.L.; Michel, B.; Wang, J.; Skidgel, R.A. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **1996**, *279*, 1582-1589.

¹⁹ Sim, M.K.; Yuan, H.T. *Eur. J. Pharmacol* **1995**, *278*, 175-178.

²⁰ Dzau, V. J. *Hypertens Suppl.* **1988**, *6*, S7-12.

²¹ Hirsch, A.; Pinto, Y.; Schunkert, H.; Dzau, V. *Am. J. Cardiol* **1990**, *66*, 22D-30D.

²² Ruzicka, M.; Leenen, F. *Curr. Opinion Cardiol* **1997**, *12*, 347-53.

²³ Kurabayashi, M.; Yazaki, Y. *Circulation* **1995**, *95*, 1104-07.

²⁴ Luchner, A.; Stevens, T.; Borgeson, D.; Redfield, M.; Bailey, J.; Sandberg, S.; Heublein, D.; Burnett, J. *Hypertension* **1996**, *28*, 472-77.

²⁵ Urata, H.; Nishimura, H.; Ganten, D. *Am. J. Hypertens* **1996**, *9*, 277-84.

²⁶ Dzau, V.; Bernstein, K.; Celermajer, D.; Cohen, J.; Dahlof, B.; Deanfield, J. *Am. J. Cardiol* **2001**, *88(Suppl 1)*, 1-20.

²⁷ Re RN : The clinical implication of tissue rennin angiotensin systems. *Curr Opinion Cardiol* **2001**, *16*, 317-27.

²⁸ Dostal, D.; Baker, K. *Circ. Res.* **1999**, *85*, 643-50.

la enzima en el lecho capilar de los pulmones, mientras que el corazón tiene bajos niveles, encontrándose mayores concentraciones en las aurículas que en los ventrículos, y mayores en la aurícula derecha que en la izquierda.²⁹ Poco o nada de la enzima existe en los miocitos, pero hay regulación positiva de ECA en corazones hipertróficos, y en los seniles; es probable que el estrés incremente sus niveles. Dzau y col.²⁶ señalan que se ha comprobado que los miocitos pueden producir ECA activados por el estiramiento. La enzima así formada es transportada por los macrófagos que la trasladan al intersticio. El 80% de la Ang I local se forma a través de la acción de la renina sobre el angiotensinógeno tisular local; los mismos fibroblastos generan Ang II contribuyendo a la fibrosis miocárdica. Parece ser que se necesita un SRA local intacto para la proliferación de fibroblastos y desarrollo de fibrosis.^{26,28}

Los inhibidores de la ECA tienen la capacidad de revertir en buena parte esas alteraciones. Después del empleo del captopril, primer inhibidor conocido de la ECA, diversos compuestos fueron sintetizados y empleados en el tratamiento de la HTA, enfermedad cardíaca congestiva y prevención del daño miocárdico post-infarto.

Angiotensina II (Ang II)

La Ang II es uno de los péptidos reguladores de la HTA en el SRA, de intensa acción vasoconstrictora y corta vida de aproximadamente un minuto. Debido a que el desarrollo de análogos de un antagonista (losartán) del receptor AT₁ de Ang II es el objetivo fundamental de esta Memoria, más adelante se le dará a este octapéptido un tratamiento aparte.

Angiotensina III (Ang III)

En el organismo (sobre todo en los glóbulos rojos) existen angiotensinasas, que inactivan a la Ang II. Estas son peptidasas como la aminopeptidasa A (APA, EC 3.4.11.7), una zinc metalopeptidasa, que ha adquirido relevancia fisiológica, la principal enzima responsable de la formación de Ang III, que rompe el enlace peptídico entre los aminoácidos Asp-1 y Arg-2 y convierte a la Ang II en Ang III (heptapéptido con el 50 % de la actividad presora de la primera). Así, la

²⁹ Bunneman, B.; Fuxe, K.; Ganten, D. J. *Cardiovasc. Pharmacol* **1992**, *19*(suppl 6), 51-62.

Ang III es el primer metabolito de la Ang-II. La Ang III conserva muchas propiedades biológicas de Ang-II y tiene la misma afinidad por receptores tipo AT₁ y AT₂. Por otro lado, la aminopeptidasa N rompe el enlace entre Arg-1 y Val-2 de Ang III para dar el hexapéptido angiotensina IV (Ang IV), considerado inactivo.

En diversos tipos de hipertensión experimental y genética, un aumento de la actividad del SRA en el sistema nervioso central (SNC) parece estar vinculado con el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. Empleando inhibidores selectivos de las aminopeptidasas A y N, Reaux y col.³⁰ demostraron que Ang-III y no Ang-II es el principal péptido efector del SRA cerebral en el control de la presión arterial. La inhibición central, pero no periférica, de aminopeptidasa A provoca un descenso de la PA. Esta observación ha despertado el interés de hallar un inhibidor selectivo de la enzima que pueda atravesar la barrera hemato-encefálica y actúe a nivel central en el tratamiento de la HTA. De esta forma la Ang III también se convierte en un blanco posible de la terapéutica de la HTA.

Angiotensina IV

El hexapéptido Ang-IV proviene de Ang-II por el efecto sucesivo de las aminopeptidasas A y N. La producción de Ang-IV parece jugar un rol muy importante a nivel tisular pero no en plasma. Se le atribuye un rol funcional en la regulación del flujo sanguíneo en diferentes tejidos.

Ang IV puede interactuar con los clásicos receptores AT₁ y AT₂ de Ang II, pero se han identificado sitios específicos de unión: los receptores AT₄³¹ que se encuentran en cerebro, membranas cardíacas y riñón. Especialmente ha aumentado el interés por el rol que Ang IV juega en el SNC, donde la activación de estos receptores por Ang IV parece estar asociada con el proceso de memoria, aprendizaje y desarrollo neuronal. Kramar y col.³² comprobaron que agonistas y antagonistas de receptores AT₄ activan o inhiben el proceso de

³⁰ Reaux, A.; Fournie-Zaluski, M.C.; Llorens-Cortes, C.; Trends. *Endocrinol Metab* **2001**, *12*, 157-162.

³¹ Swanson, G.N.; Hanesworth, J.M.; Sardinia, M.F.; Coleman, J.K.M. *Regul. Pept.* **1992**, *40*, 409-419.

³² Kramar, E.A.; Armstrong, D.L.; Ikeda, S.; Wayner, M.J.; Harding, J.W.; Wright, J.W. *Brain Res.* **2001**, *897*, 114-121.

aprendizaje y memoria y sugieren que el receptor AT₄ estaría involucrado en la plasticidad sináptica.

ECA2

Muy recientemente Tipnis y col.³³ y Donoghue y col.³⁴ han identificado a la ECA-2, que tiene la particularidad de hidrolizar el aminoácido terminal leucina de la Ang I generando Ang (1-9) (nonapéptido), que no tiene acción vascular. La ECA-2 se expresa en las células endoteliales cardiacas, en las epiteliales tubulares del riñón, en el tracto gastrointestinal, y en menor cantidad en los pulmones. Crackower y col.³⁵ han demostrado que tiene efectos directos sobre la función cardiaca, desempeñando un papel protector del sistema cardiovascular, y cumple una función en la morfogénesis cardiaca. Además, es probable que intervenga de forma importante en la fisiopatología de distintas enfermedades renales, por lo que su acción no se limitaría a efectos sobre el SRA.

Aunque la ECA-2 compite con ACE por el sustrato Ang I, no es afectada por los inhibidores de la ECA (IECA) habituales.³⁶ Además, ECA2 hidroliza también Ang-II produciendo Ang (1-7), pero no hidroliza bradiquinina. ECA-2 es particularmente abundante en la circulación coronaria, jugando un papel importante en la generación de Ang (1-7).³⁷ La Ang I es hidrolizada muy lentamente por la ECA-2, mientras que la Ang II es hidrolizada a Ang (1-7) con la más alta eficiencia catalítica que se pueda ver en los péptidos de angiotensina.³⁸ Por ello, se puede decir que la ECA-2 parece regular la producción de Ang II por la ECA ya sea a través de estimular un camino alternativo para la degradación de Ang I en Ang (1-9) (inactiva) o facilitando la degradación de Ang II (vasoconstrictora) en Ang (1-7) (vasodilatadora). Además, Ang (1-9) puede ser convertida por la ECA en angiotensina (1-7).³⁹ Así, ECA y ECA-2 parecen tener funciones contrabalanceadas, por lo que se puede inferir que ECA-2 previene el

³³ Tipnis, S.; Hooper, N.; Hyde, R.; Karran, E.; et al. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 33238-43.

³⁴ Donoghue, M.; Hsieh, F.; Baronas, E.; et al. *Circ. Res.*, **2000**, *87*, E1-E9.

³⁵ Crackower, M.; Sarao, R.; Oudit, G.; Yagil, C.; Kozieradzki, I.; Scanga, S.; et al. *Nature* **2002**, *20*, 417(6891), 822-8.

³⁶ Turner, A.J.; Tipnis, S.R.; Guy, J.L.; Rice, G.; Hooper, N.M. *Can J. Physiol Pharmacol*, **2002**, *80*, 346-353.

³⁷ Reudelhuber, T.L. *Hypertension*, **2006**, *47*, 1-5.

³⁸ Danilczyk, U; Penninger J.M. *Circ Res* **2006**, *98*, 463-471.

³⁹ Boehm, M.; Nabel, E. *New Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 1795-97.

efecto vasoconstrictor de la Ang II actuando como un regulador negativo sobre el SRAA y tiene un rol esencial en la fisiopatología cardiovascular.

Este nuevo concepto de la regulación cardiaca descubierto por Crackower y col.³⁵ puede ser un importante objetivo terapéutico que debería generar importantes investigaciones científicas que dieran lugar a nuevos fármacos que específicamente incrementen la producción de ECA-2, para unirse al arsenal terapéutico ya existente (IECAs, BRAs, bloqueantes de aldosterona, betabloqueantes), y permitir la modulación del SRAA a través de terapias combinadas.

Angiotensina (1-9)

Ha sido postulada como una de las vías puente de formación de Ang II sorteando la ECA. En el corazón humano la captosina A y la ECA-2 son responsables de procesar Ang I en Ang (1-9). El rol más importante de este péptido parecería estar centrado en los tejidos como corazón, vasos sanguíneos y sistema nervioso, donde modularía una vía importante para la formación de Ang II y Ang (1-7). La Ang (1-9) y Ang (1-7) potencian el efecto de kininas sobre el receptor B2 (bradiquinina 2) aumentando la liberación de NO.

Angiotensina (1-7)

Con respecto a la Ang (1-7) se ha dicho más arriba que se forma a través de un mecanismo enzimático independiente de la ECA.^{40,41,42,43} Se genera a partir de la Ang I por medio de la thimet-oligo-peptidasa (E.C. 3.4.24.15) en las células musculares lisas vasculares (CMLV); de la endopeptidasa neutra (NEP 3.4.24.11) en células endoteliales (CE), y también a partir de la Ang II; y de la propilendopeptidasa (E.C. 3.4.24.26) en el cerebro canino y en células vasculares de la aorta y venas umbilicales. También, se genera a partir de Ang II por ECA-2. Por otro lado, la Ang (1-7) se forma en la circulación a partir de Ang-I por una vía independiente de la generación de Ang-II. Se genera a partir de Ang (1-9) por medio de la ECA, siendo sustrato específico del

⁴⁰ Ferrario, C. *Circulation* **2000**, *105*, 1523-24.

⁴¹ Heitsch, H.; Brovkovich, S.; Malinski, T.; Wiemer, G. *Hypertension* **2001**, *37*, 72-76.

⁴² Roks, A.; van Geel, P.; Pinto, Y.; Buikema, H.; Henning, R.; de Zeeuw, D.; van Gilst, W. *Hypertension* **1999**, *34*, 296-301.

⁴³ Loot, A.; Roks, A.; Henning, R.; et al. *Circulation* **2002**, *105*, 1548-1550.

Dominio-N y además inhibidor del Dominio-C⁴⁴. Este hecho resulta importante para el desarrollo de futuras generaciones de IECAs que reaccionen específicamente sobre uno de los sitios activos.

Las acciones de la Ang (1-7) son principalmente vasodilatadoras y antitróficas (inhibición de síntesis proteica). La Ang (1-7) puede ser considerada como una hormona paracrina que contrabalancea negativamente las acciones de Ang-II en el sistema cardiovascular, riñón y sistema nervioso central. Interviene en la regulación de la PA y posee efectos antiproliferativos. Aunque las evidencias indican que Ang (1-7) actúa como vasodilatador, los inhibidores selectivos de receptores AT₁ y AT₂ no alteran la vasodilatación inducida por el péptido. El efecto vasodilatador estaría mediado por un aumento de la síntesis de bradiquinina, quien a su vez estimula la liberación de vasopresina, NO y prostaglandinas, y abolido por inhibidores de NO sintetasa⁴⁵. La moderada liberación de NO por Ang (1-7) se asocia con producción de anión superóxido. La Ang (1-7) no es dipsogénica ni secretadora de aldosterona. También inhibe el crecimiento del músculo liso vascular (MLV). Es un vasodilatador en lechos vasculares y bloquea la vasoconstricción inducida por Ang II en arterias humanas.⁴⁶ Se ha identificado a la Ang (1-7) como el agonista endógeno del receptor MAS. El receptor MAS está formado por una proteína con 7 dominios con características de GPCR (G-Protein Coupled Receptors). El MAS antagoniza al receptor AT₁⁴⁷.

Los estudios realizados avalan el concepto de un mecanismo regulador diferencial para Ang II y Ang (1-7). La afinidad de la Ang II para sus receptores es cerca de mil veces mayor que la que tiene para la ECA2 que la convierte en Ang (1-7), significando que antes de que haya la suficiente cantidad de Ang II como para alimentar la generación de la vasodilatadora Ang (1-7) a través de la ECA-2, el receptor vasoconstrictor AT₁ estará saturado. Pero si se bloquea el AT₁ (por ejemplo, por un BRA), la Ang II se acumulará y se convertirá en Ang (1-7) sin que se estimule el receptor AT₁. Los niveles de Ang (1-7)

⁴⁴ Deddish, P.A.; Marcic, B.; Jackman, H.L.; Wang, H.Z.; Skidgel, R.A.; Erdos, E.G. *Hypertension* **1998**, *31*, 912-917.

⁴⁵ Almeida, A.P.; Frábregas, B.C.; Madureira, M.M. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2000**, *33*, 709-713

⁴⁶ Roks, A.; van Geel, P.; Pinto, Y.; Buikema, H.; Henning, R.; de Zeeuw, D.; van Gilst, W. *Hypertension* **1999**, *34*, 296-301.

⁴⁷ Ferrario, C.M.K.; Jessup, J.; Chappell M.C.; et al. *Circulation* **2005**, *111*, 2605-2610.

aumentan casi 25 veces después de inhibición con IECA o BRA. Se ha comprobado que los niveles plasmáticos de Ang (1-7) aumentan tempranamente en pacientes tratados durante 6 meses con captopril⁴⁸, lo que se debería a la inhibición de la conversión de Ang (1-7) a Ang (1-5) mediada por la ECA. Con animales y cultivos celulares, parece que Ang (1-7) inhibe por sí misma la actividad de la ECA, también antagoniza los receptores AT₁, incrementa los efectos inducidos por BK y estimula la liberación de prostanoides y de NO. Estos conceptos indican que Ang (1-7) juega por diversos mecanismos un rol modulador del SRA.

Angiotensina (1-5)

Esta angiotensina no se encuentra prácticamente en plasma y parece intervenir exclusivamente a nivel tisular, principalmente en el SNC. No se ha encontrado, por lo menos hasta el presente, ningún efecto ya sea estimulación o bloqueo de señal o estimulación o interferencia con receptores, que pueda asociarlas con la hipertensión arterial. Parece que sus funciones están ligadas con procesos de memoria, aprendizaje y desarrollo neuronal pero se ignora de que manera y a través de que mecanismos participa en estos procesos.

2.2.1.1. Vías alternativas aparte de la ECA

Es importante conocer que hay caminos alternativos de transformación de la Ang I en Ang II, que no requieren la presencia de la ECA, a través de otras enzimas como la quimasa, la catepsina G y la CAGE (**C**hymostatin-sensitive **A**ng **I**I **G**enerating **E**nzyme). La distinta distribución celular y regional en el corazón y los vasos de estas enzimas que promueven Ang II indican distintos papeles fisiopatológicos; por ejemplo habría formación de Ang II independiente de ECA en corazones isquémicos o hipóxicos.

Según Katugampola y Davenport⁴⁹ la quimasa es la enzima predominante entre las que media la conversión de Ang I a Ang II en el corazón humano. Es una proteasa presente en los gránulos secretores de las células cebadas que ha sido detectada en el ventrículo izquierdo.⁵⁰ Adquiere la capacidad de actuar enzimáticamente transformando la Ang I en Ang II después de que las células cebadas son activadas por

⁴⁸ Rowe, B.P.; Dixon, B. *Hypertension* **2000**, *35*, 130-035.

⁴⁹ Katugampola, S.; Davenport, A. *Clin. Sci.* **2002**, *102*, 15-21.

⁵⁰ Lindpaintner, K.; Ganten, D. *Cardiology* **1991**, *79(Suppl 1)*, 32-44.

un fuerte estímulo como puede ser la injuria vascular producida por catéter.^{51,52,53} Chen y col.⁵⁴ han demostrado una expresión selectiva del gen de la quimasa humana en el corazón de ratones transgénicos, abonando la hipótesis de una doble vía de formación de la Ang II (a través de ECA y de quimasa) en el tejido cardiaco.

2.2.1.2. SRA tisular

Aparte de la formación de Ang II por ECA o por caminos alternativos a nivel renal, debe tenerse en cuenta la existencia de Sistemas Renina-Angiotensina (SRA) locales, tisulares.^{55,56,57,58,59,60,61,62}

Aún no está claro si la actividad tipo renina tisular resulta de la presencia local de renina o de la presencia de enzimas proteolíticas como catepsinas, o si la renina presente en ciertos tejidos proviene del plasma sin ser resultado de síntesis local.⁶² Para Ruzicka⁵⁷ en condiciones fisiológicas la renina tisular proviene de la circulación, siendo captada por un proceso activo a nivel local. Pero las evidencias actuales permiten afirmar que si bien el SRA es un sistema endocrino, el miocardio y otros tejidos contienen y sintetizan componentes del sistema,^{63,64,65,66,67,68} actuando la Ang II producida localmente como

⁵¹ Miyazaki, M.; Takai, S. *Hypertens. Res.* **2001**, *24*, 189-93.

⁵² McDonald, J.; Padmanabhan, N.; Petrie, M.; Hillier, C.; Connell, J.; McMurray, J. *Circulation* **2001**, *104*(15), 1805-8.

⁵³ Nishimoto, M.; Takai, S.; Kim, S.; Jin, D.; Yuda, A.; Sakaguchi, M.; Yamada, M.; Sawada, Y.; Kondo, K.; Asada, K.; Iwao, H.; Sasaki, S.; Miyazaki, M. *Circulation* **2001**, *104*(11), 1274-9.

⁵⁴ Chen, L.; Li, P.; He, Q.; Jiang, L.; Cui, C.; Xu, L.; Liu, L. *J. Hypertens* **2002**; *20*(10), 2047-55.

⁵⁵ Dzau, V. J. *Hypertens Suppl.* **1988**, *6*, S7-12.

⁵⁶ Hirsch, A.; Pinto, Y.; Schunkert, H.; Dzau, V. *Am. J. Cardiol* **1990**, *66*, 22D-30D.

⁵⁷ Ruzicka, M.; Leenen, F. *Curr. Opinion Cardiol* **1997**, *12*, 347-53.

⁵⁸ Kurabayashi, M.; Yazaki, Y. *Circulation* **1995**, *95*, 1104-07.

⁵⁹ Luchner, A.; Stevens, T.; Borgeson, D.; Redfield, M.; Bailey, J.; Sandberg, S.; Heublein, D.; Burnett, J. *Hypertension* **1996**, *28*, 472-77.

⁶⁰ Urata, H.; Nishimura, H.; Ganten, D. *Am. J. Hypertens* **1996**, *9*, 277-84.

⁶¹ Dzau, V.; Bernstein, K.; Celermajer, D.; Cohen, J.; Dahlof, B.; Deanfield, J. *Am. J. Cardiol* **2001**, *88*(Suppl 1), 1-20.

⁶² Re RN : The clinical implication of tissue rennin angiotensin systems. *Curr Opinion Cardiol* **2001**, *16*, 317-27.

⁶³ Barlucchi, L.; Leri, A.; Dostal, D.; et al. *Circ. Res.* **2001**, *88*, 298-304.

⁶⁴ Dostal, D.; Baker, K. *Circ. Res.* **1999**, *85*, 643-50.

⁶⁵ Pieruzzi, F.; Abassi, Z.; Keiser, H. *Circulation* **1995**, *92*, 3105-12.

⁶⁶ Kawaguchi, H.; Kitabatake, A. *J. Card. Fail.* **1996**, *2*, S13-S19.

regulador. En el tejido cardíaco se ha encontrado expresión de genes de todos los componentes del SRA, incluyendo el RNA mensajero (RNAm) del gen de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA).⁶⁹ El nivel del RNAm de renina en los miocitos es el 1% de los niveles producidos por el riñón.⁷⁰ La concentración de angiotensinógeno en los miocitos ventriculares es el 4% de la existente en el plasma. En el cerebro y el ovario habría seguridad de la síntesis local,^{71,72} observándose producción autónoma en el cerebro y de prorrénina en el ovario.

2.2.1.3. Receptores de Angiotensina

La Ang II tiene dos tipos de receptores, el AT₁ y el AT₂.^{73,74,75,76} (Tabla 2). También han sido descritos los receptores tipo AT₃ y AT₄, pero aun no han sido aceptados en la nomenclatura internacional de receptores. Los AT₁ presentan en la especie murina dos subtipos, AT_{1a} y AT_{1b}. El AT₁ es un receptor con 7 dominios transmembrana, del tipo acoplado a la proteína G (GPR), que interviene en múltiples caminos de señalamiento intracelulares que comprenden al calcio, fosfolípidos, kinasas y radicales libres derivados del oxígeno. Los AT₁ se encuentran en las glándulas suprarrenales, en el cerebro, en el riñón, en el músculo liso vascular y en el corazón, mientras que los receptores AT₂ se encuentran en grandes cantidades en los tejidos fetales para luego disminuir después del nacimiento. En el humano es probable que existan en condiciones normales cantidades iguales de cada uno de los

⁶⁷ Dzau, V.; Re, R. *Circulation* **1987**, *75*, I-134-I-136.

⁶⁸ Dzau, V. *Hipertensión* **2001**, *37*, 1047-52.

⁶⁹ Luchner, A.; Stevens, T.; Borgeson, D.; Redfield, M.; Bailey, J.; Sandberg, S.; Heublein, D.; Burnett, J. *Hypertension* **1996**, *28*, 472-77.

⁷⁰ Matsusaka, T.; Katori, H.; Homma, T. *Trends. Cardiovasc. Med.* **1999**, *9*, 180-84.

⁷¹ Bunneman, B.; Fuxe, K.; Ganten, D. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **1992**, *19*(suppl 6), 51-62.

⁷² Li, C.; Ansari, R.; Yu, Z.; et al. *Hypertension* **2000**, *36*, 159-64.

⁷³ Risler, N.; Miatello, R.; Montserrat, C.; Castro, C.; Bardi, V. *Procardio*, **1998**, *1er Ciclo, Modulo 2*, 19-63.

⁷⁴ de Gasparo, M.; Whitebread, S.; Mele, M.; Motani, A.; Whitcombe, P.; Ramjoue, H.; Kamber, B. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **1990**, *16*(Suppl 4), S31-5.

⁷⁵ Regitz-Zagrosek, F.; Friedel, N.; Heymann, A.; Bauer, P.; Neub, M.; Rolfs, A.; Steffen, C.; Hildebrandt, A.; Hetzer, R.; Fleck, E. *Circulation* **1995**, *91*, 1461-71.

⁷⁶ Asano, K.; Dutcher, D.; Port, D.; Minobe, W.; Tremmel, K.; Roden, R.; Bohlmeyer, T.; Bush, E. *Circulation* **1997**, *95*, 1193-2043. Oliverio, M.; Best, C.; Smithies, O.; Coffman, T. *Hypertension* **2000**, *35*, 550-54.

receptores.⁷⁷ En la vasculatura están presentes en gran número en las células musculares lisas, y en baja cantidad en la adventicia (casi no se expresan en las CE).⁷⁸ Ambos receptores difieren en la proteína G que activan preferencialmente y en la variedad de señales que inician.

Tabla 2. Acciones de los receptores de angiotensina⁷³

RECEPTOR AT ₁	RECEPTOR AT ₂
Acciones cronotropas y presoras	Inhibición de acciones cronotropas y presoras
Promoción de proliferación y síntesis del MeC	Inhibe señales mitogénicas y síntesis MeC
Producción de radicales libres	Aumenta la apoptosis
Remodelado vascular	Aumentan citoquinas vasculares y renales

En el estudio de las acciones de cada receptor se han producido hallazgos contrapuestos en distintas investigaciones: Según Schneider y Lorell⁷⁷ la función del AT₂ depende del contexto, o sea de la relación entre AT₁ y AT₂ (que no es estática) en el momento dado. Por ejemplo en la hipertrofia ventricular aumenta la relación AT₂:AT₁, es probable que el AT₂ module el accionar del AT₁ por interacción directa, por ejemplo, Lorell y col. han demostrado que la sobreexpresión de AT₂ en los ventrículos lleva a miocardiopatía dilatada con hipertrofia miocítica e IC⁷⁹.

La interacción del receptor AT₁ con la Ang II estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-difosfato. Esto ocurre en la glándula suprarrenal por la fosfolipasa C-β, pero en el músculo liso vascular por la fosforilación de tirosina kinasa por la fosfolipasa C-γ1. Como resultado de esta hidrólisis se producen los mensajeros intracelulares inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y de diacilglicerol (DAG). El IP3 activa la liberación de Ca²⁺ intracelular desde el Retículo Sarcoplásmico a través de los receptores de IP3 (IP3R). El catión se combina con calmodulina, formando un complejo con éste que activa a la kinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK), la cual va a fosforilar a la cadena

⁷⁷ Yan, X.; Price, R.; Nakayama, M.; Ito, K.; Schuldt, A.; Manning, W. Sanbe, A.; Borg, T.; Robbins, J.; Lorell, B. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **2003**, *285*, H2179-87.

⁷⁸ Touyz, R.; Schiffrin, E. *Pharmacol Rev.* **2000**, *52*, 639-72.

⁷⁹ Booz, G. *Hypertension* **2004**, *43*, 1162-63.

liviana de miosina, permitiendo la formación del puente cruzado de actina-miosina y produciéndose así la contracción del músculo liso. Por otro lado, el DAG activa a la proteínkinasa C (PKC). El DAG, que también deriva de la conversión del ácido fosfatídico por la fosfolipasa D, activa la proteínkinasa C (PKC), la cual actúa potenciando a una proteína inhibitoria de la fosfatasa de proteína tipo 1 (CPI1), inhibiendo directamente la actividad de la fosfatasa de la miosina de cadena liviana (MLCP).⁸⁰ Esto resulta en una mayor amplitud de la fosforilación de miosina para una dada elevación de Ca^{2+} , es decir, sensibiliza el miofilamento a la acción del Ca^{2+} , lo que se traduce en la contracción del músculo. El AT_1 también activa la entrada de Ca^{2+} por canales de la membrana.

Se han indicado cuatro caminos de señalamiento a partir del AT_2 : 1) Activación de fosfatasas proteínicas y desfosforilación proteica; 2) regulación del sistema bradiquinina-NOGMPc; 3) activación de la fosfolipasa A2 y liberación de ácido araquidónico; y 4) formación de ceramida.

Ambos receptores están regulados negativamente en la IC. La regulación negativa del receptor AT_1 puede atenuar el efecto inotrópico negativo de la Ang II (probablemente vinculado a alteración del manejo del Ca^{2+} que se ve en la IC); pero si ocurre con el AT_1 pero no con el AT_2 pueden aparecer efectos perniciosos sobre el desempeño cardíaco al producir un incremento en los niveles de Ang II, al potenciarse los efectos sobre los AT_2 .

Para Pérez y col. la Ang II, en bajas dosis, induce la liberación de ET-1 quien activa al intercambiador Na^+/H^+ (NHE), aumentando así el Na^+ intracelular, promoviendo la entrada de Ca^{2+} a la célula por medio del intercambio reverso de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), obteniéndose así un efecto inotrópico positivo.⁸¹

Los AT_2 inhiben el crecimiento celular e inducirían apoptosis, y participan también en antiproliferación de células endoteliales coronarias, inhibición de neointima y diferenciación celular. Henrion y col.⁸² han comunicado que la estimulación del receptor AT_2 *in vitro* induce la producción de NO, es decir, efecto vasodilatador, inhibe el

⁸⁰ Kanaide, H.; Ichiki, T.; Nishimura, J.; Hirano, K. *Circ. Res.* **2003**, *93*, 1015-7.

⁸¹ Pérez, N.; Villa-Abrille, M.; Aiello, E.; Dulce, R.; Cingolani, H.; Camillón de Hurtado, M. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *60*, 589-97.

⁸² Henrion, D.; Kubis, N.; Lévy, B. *Hypertension* **2001**, *38*, 1150-57.

crecimiento y proliferación del músculo liso vascular y cardíaco, estimula apoptosis, y promueve la síntesis de la matriz extracelular. *In vivo* la estimulación crónica del receptor AT₂ lleva a hipertrofia cardíaca y fibrosis.

2.2.2. Acciones de la Ang II

Las acciones múltiples de la Ang II están mediadas por sistemas de señalamiento complejos que se ponen en marcha cuando la hormona se liga a su receptor. Así recibirán información proteínas intracelulares que intervienen en la contracción, crecimiento celular, migración celular, mitogénesis, apoptosis, diferenciación, etc⁷⁸ (Tabla 3).

Tabla 3. Acciones múltiples de la Ang II.

Efectos vasculares	Manifestaciones
Vasoconstricción	Estimula AT ₁ . Libera ET-1 y N-A. Reduce actividad NO y produce peroxinitrilo.
Inflamación	Activa NADH/NADPH oxidasa y produce anión superóxido. Induce MCP-1, VCAM, TGF-β, IL-6
Remodelamiento	Estimula migración CML, hipertrofia, reprecación. Induce PDGF, bFGF, IGF-1, TGF-β Estimula producción de glucoproteínas y MMP de la matriz extracelular.
Trombosis	Estimula síntesis de PA-1 y altera tPA/PAI-1. Activa plaquetas con aumento de agregación y adhesión.

La Ang II juega un importante papel en la regulación de las funciones renales, vasculares y cardíacas. Sus funciones principales se vinculan a modulación favorecedora de la transmisión sináptica, estimulación de secreción de la vasopresina u hormona antidiurética hipotálamo-hipofisaria, estimulación de la sed, vasoconstricción, estimulación de la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal, y acción mitogénica. Modula la excreción renal de Na⁺, la contracción y relajación miocárdica y el tono vascular.⁷⁸ Participa en la regulación del crecimiento celular y de apoptosis. Ejerce influencias sobre la

acumulación colágena en los tejidos y sobre la migración celular. Tiene características proinflamatorias y estimula la producción de factores de crecimiento como el PDGF y vasoconstrictores como la ET-1. De esta forma es un factor muy importante de la integridad anátomo-funcional de la pared arterial y en procesos que regulan la presión arterial.

El mecanismo por el cual Ang II induce contracción ya se mencionó al hablar del receptor AT₁. Su acción promotora de crecimiento está dirigida a distintas células, incluyendo las mesangiales, las endoteliales y las musculares lisas. La Ang II puede actuar directamente sobre el miocito para influenciar el crecimiento celular.^{83,84} Esto lo hace a través de receptores AT_{1a} siendo importante la contribución del receptor de EGF (Epidermal Growth Factor).

Además del crecimiento miocítico, afecta también a la función cardíaca. Hay evidencias que vinculan a la glucoproteína multifuncional osteopontina (OPN) como mediadora crítica de los efectos cardíacos proinflamatorios y profibróticos de la Ang II. En el ser humano, la hipertrofia y fibrosis miocíticas muestra una sustancial inmunoreactividad para la OPN. En cultivos de células cardíacas y endoteliales se ha demostrado que la Ang II estimula la expresión de OPN en las mismas, probablemente por acción de radicales libres y MAPKs, siendo mediadora la aldosterona.⁸⁵

Hay una acción directa de la Ang II sobre el fibroblasto, como factor causal en el desarrollo de fibrosis,^{86,87} probablemente a través de receptores en esas células del tipo AT₁. Según Leri y col.⁸⁸ la Ang II puede inducir apoptosis de miocitos aunque no de fibroblastos. En el corazón hipertrofiado, la Ang II deprime la función diastólica, y los IECAs la mejoran.^{89,90} La activación a largo plazo del SRA cardíaco

⁸³ Harrap, S.; Dominiczak, A.; Fraser, R. *Circulation* **1996**, *93*, 1148-54.

⁸⁴ Schlaich, M.; Schmieder, R. *Am. J. Hypertens.* **1998**, *11*, 1394-404.

⁸⁵ Diez, J. *Hypertension* **2004**, *43*, 1164-65.

⁸⁶ Brilla, C.; Zhou, G.; Rupp, H.; Maisch, B.; SWeber, K. *Am. J. Cardiol* **1995**, *76*, D8-13.

⁸⁷ Thomas, W.; Brandenburger, Y.; Autelitano, D.; Pham, T.; Qian, H.; Hannan, R. *Circ. Res.* **2002**, *90*, 135-42.

⁸⁸ Leri, A.; Claudio, P.; Li, Q.; Wang, X.; Reiss, K.; Wang, S.; Malhotra, A.; Kajstura, J. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 1326-42.

⁸⁹ Friedrich, S.; Lorell, B.; Rousseau, M.; Hayashida, W.; Hess, O.; Douglas, P.; Gordon, S.; Keighley, C.; Benedict, C.; Krayenbuehl, H.; et al. *Circulation* **1994**, *90*, 2761-71.

lleva a hipertrofia cardíaca, que es independiente de los niveles sistémicos de Ang II. El aumento del estrés de pared activaría el SRA, con consiguiente incremento de la Ang II, quien sería la responsable de la mayor rigidez cardíaca, de la remodelación y de la fibrosis. Se observa además, en la IC, activación del gen de la ECA. Se ha postulado que la Ang II es la responsable directa de la hipertrofia ventricular (HV); de allí la importancia que se le asigna a su receptor, el AT₁, ubicado en la superficie de los miocitos cardíacos. Los IECA, los bloqueantes β -adrenérgicos y los antagonistas cálcicos reducen la HVI, siendo los efectos mas pronunciados con los primeros.⁹¹

La Ang II, aisladamente, o sobre todo en combinación con otros factores de crecimiento, tiene un significativo efecto en la producción de colágeno; intervienen importantes factores generados por los miocitos cardíacos que interactúan con los fibroblastos.⁸⁶ Es probable que la Ang II sea reguladora indirecta de la función de los fibroblastos cardíacos a través de factores de crecimiento específicos, tales como el TGF- β , la osteopontina (OPN) y la ET-1.⁹² Además la Ang II regula la degradación del colágeno atenuando la producción de MMPs en los fibroblastos cardíacos y aumentando la producción de TIMP-1 (Tissue Inhibitor MetalloProteinase-1) por las células endoteliales (CE). Por otro lado, la Ang II regula el sistema funcional local miocítico de aldosterona que participa de forma muy importante en la fibrosis cardíaca. Parece ser responsable de la acumulación de colágeno fibrilar en el intersticio cardíaco en la enfermedad hipertensiva. Niveles circulantes elevados de aldosterona se asocian con acumulación excesiva de colágeno que produce fibrosis miocárdica. La alta ingesta de sal incrementa los niveles de aldosterona.⁹⁰ Cuando los niveles de Ang II circulante o locales son muy elevados en relación a las necesidades de regulación vascular y de balance electrolítico la hormona pasa a convertirse en un factor de riesgo.⁹³

Los efectos sobre variables hemodinámicas y en ciertos tejidos incluyen la isquemia miocárdica, la HVI, arritmias y trastornos de la coagulación con tendencia a la trombosis, aumento de estrés oxidativo y actividad proinflamatoria. La hipertensión arterial causada por angiotensina depende de la producción de anión superóxido, es decir,

⁹⁰ Weinberg, E.; Schoen, F.; George, D.; Kagaya, Y.; Douglas, P.; Litwin, S.; Schunkert, H.; Benedict, C.; Lorell, B. *Circulation* **1994**, *90*, 1410-22.

⁹¹ Newby, D. *Congest Heart Fail* **1999**, *5*, 254-59.

⁹² Dostal, D. *Hypertension* **2001**, *37*, 841-44.

⁹³ Dzau, V.; Gibbons, G.; Pratt, R. *Hypertension* **1991**, *18* (Suppl), II100-05.

de la presencia de estrés oxidativo.⁹⁴ La oxidasa de NADPH es la fuente del anión, y es activada por la angiotensina II *in vitro*.

Dentro de los efectos vasculares de la Ang II están las trombosis.⁶⁸ El endotelio produce t-PA (Tisular Plasminogen Activator), de acción crucial en la fibrinólisis endógena. La Ang II inhibe la fibrinólisis al aumentar la expresión de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1).^{95,96,97}

Aparte de lo señalado la Ang II tiene efecto anoréxico central y provoca disminución de peso.^{98,99}

2.2.3. La Ang II y el estrés oxidativo

El estrés oxidativo es la alteración del equilibrio entre la producción de radicales libres que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes a favor de los primeros.

Laursen y col.¹⁰⁰ han sugerido que la hipertensión arterial que se induce en ratas por medio de la Ang II está asociada a una gran producción del anión superóxido, quien va a impedir la acción vasodilatadora vascular del Oxido Nítrico (NO).

La fuente mayor de anión superóxido en los vasos es una oxidasa que usa NADH como sustrato. El anión superóxido y otros radicales libres no solamente interfieren la formación de NO, sino que participan en la oxidación de LDL, en la activación de proto-oncogenes tales como el c-fos y c-jun, y en promover crecimiento celular y en la activación de moléculas proinflamatorias.^{101,102,103}

⁹⁴ Landmesser, U.; Cai, H.; Dikalov, S.; McCann, L.; Hwang, J.; Jo, H.; Holland, S.; Harrison, D. *Hypertension*, **2002**, *40*, 511-5.

⁹⁵ Gavras, I.; Gavras, H. *J. Hum. Hypertens.* **2002**, *16*(suppl 2) S2-6.

⁹⁶ Newby, D. *Congest Heart Fail* **1999**, *5*, 254-59.

⁹⁷ Yoshida, M.; Naito, Y.; Urano, T.; Takada, A.; Takada, Y. *Thromb. Res.* **2002**, *105*, 531-36.

⁹⁸ Brink, M.; Wellen, J.; Delafontaine, P. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 2509-16.

⁹⁹ Berry, C.; Clark, A. *Eur. Heart J.* **2000**, *21*, 521-32.

¹⁰⁰ Laursen, J.; Rajagopalan, S.; Galis, Z.; Tarpey, M.; Freeman, B.; Harrison, D. *Circulation* **1997**, *95*, 588-93.

¹⁰¹ Oskarsson, H.; Heistad, D. *Circulation* **1997**, *95*, 557-59.

¹⁰² Nakane, H.; Miller, F.; Faraci, F.; Toyoda, K.; Heistad, D. *Hypertension* **2000**, *35*, 595-601.

La Ang II induce hipertrofia miocítica en la rata a través de la producción celular autocrina de endotelina que a su vez dispara la producción de especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés: ROS), llevando a la puesta en marcha del intercambiador Na^+/H^+ y éste a su vez al $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (acción reversa), siendo el resultado aumento del inotropismo.¹⁰⁴

La Ang II provoca una reacción inflamatoria en las CMLV a través de estimulación de citoquinas y activación de factores nucleares. La activación inflamatoria de la pared vascular por un SRA no regulado puede contribuir a la fisiopatología de la aterosclerosis.¹⁰⁵

Rajagopalan y col.¹⁰⁶ han encontrado que ciertas formas de HTA asociadas con altos niveles de Ang II circulante muestran singulares efectos vasculares por el aumento de MLV, debido a un incremento de la producción de anión superóxido vascular (por un mecanismo dependiente de la activación de la oxidasa NADPH).

2.2.4. Aldosterona

La corteza suprarrenal produce hormonas mineralo-corticoideas y glucocorticoideas. De las primeras la principal es la aldosterona, que actúa principalmente en el epitelio de los riñones, glándulas salivales y colon. Tiene receptores de gran afinidad que se encuentran en el hígado, cerebro, hipófisis y monocitos.¹⁰⁷ Su característica acción hormonal es de producir retención de sodio y excreción de potasio.

El sustrato para la síntesis de aldosterona es el colesterol, que después de ser captado por la mitocondria es convertido en pregnenolona en el llamado “camino precoz” (con intervención de la enzima P450). La pregnenolona, por acción de la isoenzima II de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) es convertida en progesterona. La progesterona es hidroxilada a 17α -hidroxipregnenolona por medio de la actividad de la CYP 17α -hidroxilasa. La hidroxilación de progesterona en la zona glomerulosa, o de la 17α -OH

¹⁰³ Kerr, S.; Brosnan, J.; McIntyre, M.; Reid, J.; Dominiczak, A.; Hamilton, C. *Hypertension* **1999**, *33*, 1353-58.

¹⁰⁴ Cingolani, H.; Villa-Abrille, M.; Cornelli, M.; et al. *Hypertension* **2006**, *47*, 1-8.

¹⁰⁵ Kranzhöfer, R.; Schmidt, J.; Pfeiffer, C.; Hagl, S.; Libby, P.; Kübler, W. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **1999**, *19*, 1623-1629.

¹⁰⁶ Rajagopalan, S.; Kurz, S.; Munzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B.; Griendling, K.; Harrison, D. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 1916-23.

¹⁰⁷ Wilson, J.; Foster, D.; Kronenberg, H.; Larsen, P.; *Adrenal Cortex. In Williams Textbook of Endocrinology. 9th Edition. WB Saunders Co., Philadelphia, USA, 1998.*

en la zona fasciculada es mediada por la 21-hidroxilasa produciéndose desoxicorticosterona u 11-desoxicortisol. El paso final en la biosíntesis del cortisol se produce en la mitocondria, a través de la conversión del 11-desoxicortisol en cortisol por medio de la enzima Citocromo P11B1 (CYP11B1) o 11 β -hidroxilasa. En la zona glomerulosa la progesterona por acción de la 21-hidroxilasa se convierte en desoxicorticosterona, luego en corticosterona por medio de la 11 β -hidroxilasa o la CYP11B2 (aldosterona sintetasa) pudiendo esta última ser requerida para la conversión de corticosterona en aldosterona a través de la intermedia 18-hidroxi-corticosterona (este último es el “camino tardío”). Es decir que CYP11B2 puede producir 11 β -hidroxilación, 18-hidroxilación y 18-metiloxidación.

La presencia de exceso de aldosterona es un factor fisiopatológico importante en la HVI y en la IC, más allá de las alteraciones de la presión arterial que puedan existir.^{108,109,110} Se encuentran receptores mineralocorticoides en el corazón, cerebro y riñón de la rata, que han sido clonados y que tienen alta afinidad tanto para aldosterona como para cortisol. Hay un receptor mineralocorticoide específico en los miocitos cardiacos.¹¹¹ Además, se ha demostrado que el miocardio mismo es capaz de producir aldosterona.¹¹²

Los mayores reguladores de la secreción de aldosterona son la Ang II, el ión K⁺, y el ACTH.¹¹³ Sin embargo, con respecto a ACTH, cuando la estimulación por el mismo es continua, tal como puede ocurrir en el estrés crónico, se produce disminución de la secreción de aldosterona. Ejercen una acción estimulante menor la Ang III, la ET-1, vasopresina y serotonina, siendo inhibidores la somatostatina, el ANP, la endorfina beta, dopamina, y la digoxina. La hormona regula el transporte de Na⁺ en las células cardiacas.¹¹⁴ Directamente estimula la

¹⁰⁸ Duprez, D.; Bauwens, F.; De Buyzere, M.; De Backer, T. *Am. J. Cardiol* **1993**, *71*, 17A-20A.

¹⁰⁹ Brilla, C.; Maisch, B.; Weber, K. *Eur. Heart J.* **1992**, *13(suppl D)*, 24–32.

¹¹⁰ Lombes, M.; Alfaidy, N.; Eugene, E.; Lessana, A.; Farman, N.; Bonvalet, J. *Circulation* **1995**, *92*, 175–182.

¹¹¹ Silvestre, J.; Robert, V.; Heymes, C.; Aupetit-Faisant, B.; Mouas, C.; Moalic, J.; Swynghedauw, B.; Delcayre, C. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 4883–4891.

¹¹² Ikeda, U.; Hyman, R.; Smith, T.; Medford, R. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12058–12066.

¹¹³ Williams, G. *Heart Fail Rev.* **2005**, *10*, 7-13.

¹¹⁴ Mihailidou, A.; Buhagiar, K.; Rasmussen, H. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274*, C175–C181.

síntesis del ARNm de la Na^+ , K^+ -ATPasa y la acumulación de proteínas en las células cardíacas.¹¹⁵ También activa al cotransportador Na^+ - K^+ - 2Cl^- para aumentar la entrada de Na^+ y estimular la bomba Na^+ - K^+ .^{115,116} Otra acción es la de regular la entrada de Ca^{2+} en los miocitos.^{117,118}

En el tratamiento de la IC con IECA se observa que los efectos beneficiosos disminuyen progresivamente a través del tiempo. Esto ha sido interpretado vinculado a “escape de producción de Ang II” o a “escape de producción de aldosterona”. El primero se explica por la presencia de vías alternativas de producción de la hormona como la de la quimasa. En el caso de la aldosterona se debería al aumento de la potasemia inducido por los IECA. La aldosterona formada por este “escape” atenuaría los efectos de los IECA, dando lugar a la llamada “resistencia a los IECA”.¹¹⁹

Dentro de los efectos perjudiciales de la aldosterona tenemos^{120,121,122,123,124} (Figura 14): 1) Pérdida de magnesio y potasio por aumento de la excreción urinaria del mismo, mas retención de sodio; 2) Potenciación de las catecolaminas; 3) Inducción de arritmias ventriculares; 4) Inducción de hipertrofia y fibrosis miocárdica; 5) Vasculopatía por disfunción endotelial, con aumento de retención de Na^+ por las CMLV, mayor generación de radicales libres, hipertrofia de CMLV, estimulación de la síntesis de $\text{TGF}\beta$ -1 y regulación positiva de receptores de Ang II; 6) Aumento de la síntesis de PAI-1, inhibiendo así la fibrinólisis; 7) Atenuación de los barorreflejos; y 8) Desarrollo de nefrosclerosis maligna. Además causa retención de Na^+ y eleva la presión arterial.¹⁰⁸ Estos efectos perjudiciales de la aldosterona explican

¹¹⁵ Korichneva, I.; Puceat, M.; Millanvoeye-Van Brussel, E.; Geraud, G.; Vassort, G. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1995**, *27*, 2521–2528.

¹¹⁶ Wehling, M.; Neylon, C.; Fullerton, M.; Bobik, A.; Funder, J. *Circ. Res.* **1995**, *76*, 973–997.

¹¹⁷ Bénitah, J.; Vassort, G. *Circ. Res.* **1999**, *85*, 1139–45.

¹¹⁸ Mulrow, P.; Franco-Saenz, R. *J. Hipertensión*, **1996**, *14*, 173–76.

¹¹⁹ Struthers, A. *Am. Heart J.* **2002**, *144*, S2–7.

¹²⁰ McMahon, E. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2001**, *Apr 1(2)*, 190–6.

¹²¹ Christ, M.; Günther, A.; Heck, M. et al. *Circulation*, **1999**, *99*, 1485–91.

¹²² Bonvalet, J.; Alfaidy, N.; Farman, N.; Lombès, M. *Eur. Heart J.* **1995**, *16(suppl N)*, 92–97.

¹²³ Struthers, A.: Aldosterone in chronic heart failure: have we forgotten it ?. In *Heart Failure in Clinical Practice*, John JV McMurray and John GF Cleland, Eds., Martin Dunitz Ltd., London, **1996**.

¹²⁴ Brilla, C.; Matsubara, L.; Weber, K. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1993**, *25*, 563–575.

por qué los antagonistas de la hormona son beneficiosos en el tratamiento de la IC.

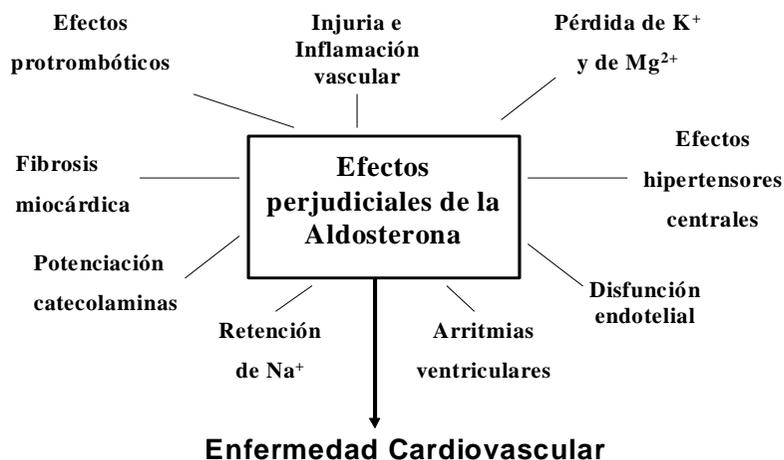


Figura 14. Efectos perjudiciales de la aldosterona. Según McMahon.¹¹¹

La aldosterona: 1) Aumenta el contenido de NADPH, favoreciendo la formación de anión superóxido aumentando así el estrés oxidativo,. 2) Induce inflamación vascular, 3) Induce isquemia y necrosis miocárdica, 4) Aumenta la síntesis de colágeno en los fibroblastos, 5) Regula el PAI-1, 6) Disminuye la actividad de los barorreceptores y la función refleja autonómica, 7) Bloquea la captación miocárdica de N-A, 8) Estimula apoptosis, 9) Inhibe la síntesis de óxido nítrico, 10) Promueve disfunción endotelial.

Es decir, la hormona tiene efectos específicos sobre el corazón. Es probable que su acción a nivel celular se centre en el intercambio iónico. La aldosterona tiene además la capacidad de inducir o inhibir la síntesis de numerosas proteínas y de colágeno por los fibroblastos.^{125,126,127,128,129}

¹²⁵ Brilla, C.; Zhou, G.; Matsubara, L.; Weber, K. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1995**, *28*, 809–820.

¹²⁶ Robert, V.; Thiem, N.; Cheav, S.; Mouas, C.; Swynghedauw, B.; Delcayre, C. *Hypertension* **1994**, *24*, 30–36.

¹²⁷ Young, M.; Fullerton, M.; Dilley, R.; Funder, J. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 2578–2583.

¹²⁸ Delcayre, C.; Silvestre, J. *Cardiovasc Res.* **1999**, *43*, 7-12.

¹²⁹ Tanhehco, E.; Rudolph, A.; Susuki, G. et al. *Circulation* **2002**, *106*, II-510(2521-abstract).

Se han descrito efectos “no genómicos” de la aldosterona en células epiteliales, CMLV, células musculares esqueléticas y colónicas renales.^{130,131} Son así denominados por su velocidad, independencia de la síntesis proteica, y no ser inhibidos por la espironolactona. Se producirían a través de cambios en distintos tejidos del pH intracelular, del Ca^{2+} intracelular y del Na^+ intracelular. Así se ha visto que la aldosterona tiene efectos rápidos en el intercambio Na^+/H^+ . No está aclarado aún el mecanismo del efecto rápido inotrópico de la aldosterona. Oberleithner¹³² ha demostrado que la aldosterona, actuando a través de los receptores de mineralocorticoides, estimula la entrada de Na^+ y agua dentro de las células. Los efectos estimuladores de los canales de sodio serían inducidos por un efecto genómico de la aldosterona, que produce entrada de sodio y despolarización, creándose un gradiente electroquímico que provoca la acumulación de agua. La hinchazón celular activa la bomba Na^+/K^+ ATPasa (mayor entrada de K^+).

El mismo investigador ha demostrado que la aldosterona induce crecimiento del 15 al 28% del núcleo de las CE, el cual desaparece a los 30 minutos. La hinchazón de las CE provocada por la aldosterona podría afectar la resistencia al flujo de las pequeñas arterias.

Schiffrin,¹³¹ comentando el trabajo de Oberleithner, señala que la aldosterona ha sido implicada en la inducción de fibrosis en el corazón, vasos y el riñón, sobre todo cuando hay una dieta rica en sodio.

¹³⁰ Barbato, J.; Rashid, S.; Mulrow, P.; Shapiro, J.; Franco-Saenz, R. *Hypertension* **2004**, *44*, 751-7.

¹³¹ Schiffrin, E. *Hypertension* **2004**, *43*, 938-40.

¹³² Oberleithner, H.; Ludwig, T.; Riethmüller, C.; Hillebrand, U.; Altermann, L.; Schafer, C.; Shahin, V. *Hypertension* **2004**, *43*, 952-56.

2.3. ANTAGONISTAS PEPTÍDICOS DE ANGIOTENSINA II

Dado que Ang II es la hormona efectora del SRA, un acercamiento más directo para bloquear el mismo sería al nivel de los receptores de Ang II. Así, el desarrollo de moléculas que inhiben la unión de la hormona a su receptor ha sido el objetivo de numerosas investigaciones después del desarrollo de los IECAs.

2.3.1. Inhibidores de los receptores de Ang II

2.3.1.1. Relación estructura-actividad de agonistas de Ang II

Los primeros ensayos de la actividad de Ang II fueron farmacológicos.¹³³ *In vitro*, consistieron fundamentalmente en la valoración de la respuesta contráctil en una variedad de tejidos que se conocían que eran sensibles a Ang II (aorta de conejo, útero de rata y estómago de rata). *In vivo*, se midió la capacidad de algunos compuestos de antagonizar Ang II administrados por vía intravenosa. El desarrollo y utilización de receptores de Ang II aislados a finales de los años 70¹³⁴ facilitó mucho el estudio de nuevos análogos. Todos los ensayos de afinidad se realizaron en tejido vascular, ahora se sabe que están mediados por el subtipo de receptor de Ang II. Se ha establecido recientemente que este subtipo de receptor media todas las acciones cardiovasculares primarias de Ang II.¹³⁵

Los estudios iniciales contribuyeron mucho a la evaluación sistemática de los requerimientos de los aminoácidos de cada posición de Ang II (Figura 15). Esto condujo al descubrimiento de que la modificación en la posición 1 de Asp por Sar (Figura 16) aumentaba marcadamente la potencia, y que la sustitución de Phe, aminoácido aromático, en la posición 8 convertía un agonista en antagonista¹³⁶, aunque con alguna actividad residual como agonista. Catt y colaboradores¹³⁷ postularon cuales eran los requerimientos mínimos del

¹³³ D. Regoli, W. K. Park, F. Rioux, *Physiol. Rev.*, **1974**, 26, 69-123.

¹³⁴ G. J. Douglas, M. Michailov, M. C. Khosla, F. M. Bumpus, *Endocrinology*, **1980**, 106, 120-24. b) G. J. Moore, Y. C. Kwok, *Biochem. Arch.*, 1988, 4, 145-49.

¹³⁵ P. C. Wong, S. D. Hart, A. M. Zaspel et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, 255, 584-92.

¹³⁶ D. T. Pais, F. D. Masucci, F. Sipos et al. *Circ. Res.* **1971**, 29, 664-72.

¹³⁷ A. M. Cappom, D. J. CafI, *J. Biol. Chem.*, **1979**, 284, 5120-7.

péptido para la activación y unión al receptor. Más recientemente este trabajo ha sido extendido a otros fragmentos de Ang II, que a su vez han sido acotados por uno o varios extremos¹³⁸. Pendleton y colaboradores¹³⁸ han demostrado que un hexapéptido parece ser el fragmento mínimo para que se una al receptor, y que los tres posibles hexapéptidos desplazan completamente Ang II de su receptor. Adicionalmente, los dos hexapéptidos que carecen de Phe-(8) denominados AII[1-6] y AII[2-7] muestran propiedades agonistas débiles.

El grupo de Escher¹³⁹ ha estudiado extensivamente la relación estructura-actividad de agonistas análogos de Tyr-(4). Ellos han demostrado la importancia de sustituyentes electrodonadores en la posición 4 del arilo del aminoácido para la potencia. Se ha explorado^{140,141} también el papel conformacional de Pro-(7). Se piensa que este residuo participa en un segundo giro del esqueleto carbonado de Ang II. Estudios del residuo de His-(6) han proporcionado interesantes descubrimientos: Así, parecen ser agonistas altamente selectivos en tejidos cerebrales de Ang II, y para el subtipo de receptor AT₂, como el compuesto denominado [4-NH₂-Phe⁶]-AII¹⁴² (Figura 17). En estos análogos no se ha determinado actividad vascular, pero parece que tienen efecto en ciertas áreas del cerebro.

Se han descrito¹⁴³ análogos cíclicos de Ang II. En éstos se ha postulado la presencia de un giro del esqueleto carbonado en el residuo de Tyr-(4). Estudios adicionales¹⁴³ de este tipo de análogos han proporcionado la primera evidencia de la existencia de requerimientos conformacionales diferentes para los dos subtipos de receptores AT₁ y AT₂. Así, mientras que [Sar-(3), Hcy-(5)]-AII es esencialmente equipotente a Ang II respecto a su afinidad por los receptores AT₁ aislados de hígado de rata, estos mismos análogos son 30 unidades de magnitud menos activos que Ang II respecto a la afinidad por los receptores AT₂ aislados en útero de rata. Por el contrario un análogo cíclico denominado [Sar-(1), t-4-Mpr-(3), Hcy-(5)]-AII es 30 unidades

¹³⁸ R. G. Pendleton, G. Gessner, E. Homer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, 250, 31-6.

¹³⁹ G. Guillemete, M. Bemier, P. Parent, R. Leduc, E. Escher, *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 315-20. b) E. Escher, M. Bemier, P. Parent. *Helv. Chim. Acta*, **1983**, 66, 1355-65.

¹⁴⁰ E. A. Tallant, N. Jaiswal, D. I. Diz et al. *Hypertension* **1991**, 18, 32-9.

¹⁴¹ J. Samaman, T. Cash, N. Narindry, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 303 6-43.

¹⁴² R. C. Speth, K. M. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 169, 997-1006.

¹⁴³ G. A. Marshall, T. Kataoka, K. Plucinska *In peptides: Chemistry and Biology*. J. A. Smith, J. E. Rivier (Eds). *Escom: Leiden* **1992**, 260-1.

menos potente que AII al receptor AT₁ y 15 unidades más potente que AII respecto al receptor AT₂ (Figura 15).

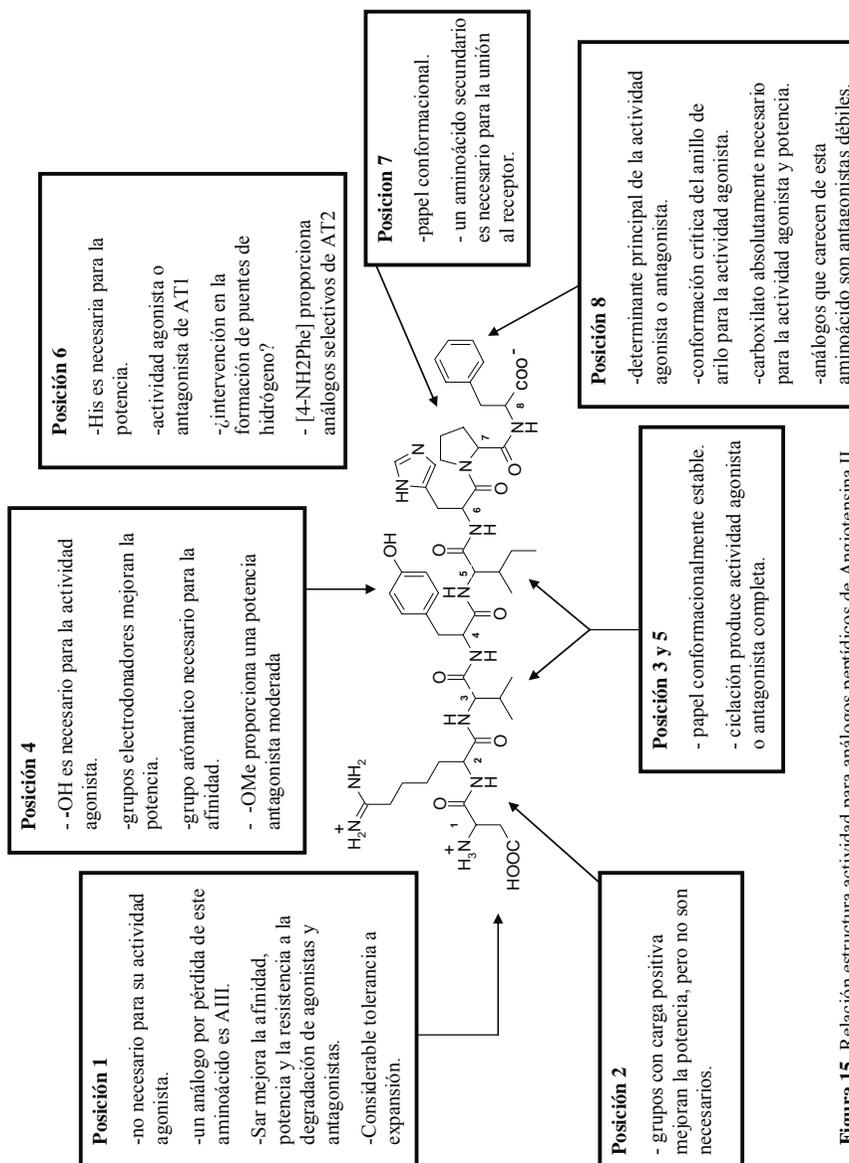


Figura 15. Relación estructura actividad para análogos peptídicos de Angiotensina II.

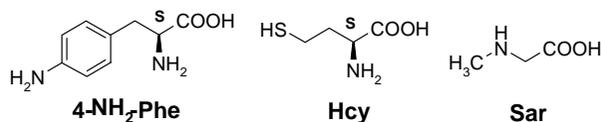


Figura 16. Aminoácidos poco comunes usados en los análogos peptídicos de Ang II.

2.3.1.2. Relación estructura-actividad de inhibidores peptídicos de Ang II

Los trabajos iniciales sobre antagonistas de Ang II surgieron tras el descubrimiento de que la sustitución de Phe-(8) por otros residuos no aromáticos convertían agonistas en antagonistas. El primer receptor peptídico antagonista de Ang II fue publicado por Marshall y colaboradores en 1970. Este compuesto es un análogo muy próximo a Ang II, donde los residuos de Phe y Tyr están invertidos: [Phe-(4), Tyr-(8)]-AII. Saralasin [Sar-(1), Val-(5), A1a-(8)]-AII, alcanzó eventualmente la aceptación de la FDA para indicaciones limitadas. Otros análogos más potentes como [Sar-(1), Ile-(8)]-AII y [Sar-(1), Thr-(8)]-AII han sido estudiados con considerable detalle y han servido como punto de referencia para nuevos antagonistas peptídicos¹⁴⁴. Trabajos adicionales con variaciones en la posición 8 han conducido al diseño de análogos muy potentes, fundamentalmente con sustituyentes voluminosos o lipófilos en esta posición. Aunque algunos de estos análogos, como por ejemplo [Sar-(1), Car-(8)]-AII¹⁴⁵, no son tan potentes *in vitro* como otros antagonistas con modificaciones en la posición 8, la alta lipofilidad les confiere mayor duración de acción *in vivo*. [Sar-(1), Br₃Phe-(8)]-AII¹⁴⁶ es otro de estos inhibidores “cuasi irreversibles” con una prolongada duración de acción. D-aminoácidos en posición 8 también producen potentes inhibidores¹⁴⁷. Se han realizado varios estudios^{147,148} sobre los aspectos conformacionales de la cadena lateral de Phe-(8), y todos apuntan a una orientación favorecida muy específica del grupo aromático para la actividad agonista. Así, tanto las sustituciones α -Me[Ph-(8)]¹⁴⁹ y N-Me-[Ph-

¹⁴⁴ M. J. Peach, *Physiol. Rev.*, **1977**, *57*, 313-70.

¹⁴⁵ E. Escher, G. Guillemette, O. Leukart, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **1980**, *66*, 267-72.

¹⁴⁶ J. Samaman, T. Cash, N. Narindry, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 303 6-43.

¹⁴⁷ J. Samanan, D. Narindray, Jr. W. Adams et al. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 510-6.

¹⁴⁸ a) P. Balasubramanian, G. R Marshall, *In peptides: Chemistry and Biology*. G. R Marshall (Ed.). ESCOM: Leiden **1988**, 452-6. b) K. Hsieh, T. R. LaHann, R. C. Speth, *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 898-903.

¹⁴⁹ J. Samanan, D. Narindray, Jr. W. Adams et al. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 510-6.

(8)]¹⁵⁰ son compatibles con una potente afinidad de enlace, sin embargo mientras que el primero es un potente agonista, el último es un fuerte antagonista. Análogos cíclicos de Phe como el ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic) introducido en la posición 8 confiere un fuerte agonismo¹⁴⁸, mientras otro análogo cíclico [Ind-(8)]-AII es un antagonista puro. Así, análogos incapaces de adoptar la orientación preferida de agonista, se comportan usualmente como antagonistas.

Se ha observado que los análogos obtenidos por eliminación completa del residuo C-terminal de Ang II presentan propiedades antagonistas, además de un débil agonismo¹⁵¹. Esto está de acuerdo con los estudios realizados por Pendleton y colaboradores¹³⁸ como se mencionó anteriormente. La potencia de estos análogos es considerablemente más débil que la de los octapéptidos antagonistas, pero sin embargo parece que funcionan *in vivo*, y lo hacen bloqueando los receptores de Ang II más ampliamente que la acción agonista específica en tejidos que el heptapéptido AII[1-7]¹⁵² propuesto.

La relación estructura-actividad, posición por posición, de agonistas ha sido reexaminada y aplicada a la posición 8 de antagonistas, principalmente análogos de [Ile-(8)]-AII, en una serie de publicaciones de SmithKline.^{149,146} En la mayoría de los casos, la relación estructura-actividad de antagonistas no es paralela a la de agonistas. En la posición 4, por ejemplo, la fuerte electronegatividad dependiente para agonistas no es extensiva a antagonistas, y en la posición 6, varios aminoácidos aromáticos pueden reemplazar a His conservando la actividad agonista.

La estrategia de ciclación que fue efectiva para agonistas de Ang II funciona igual de bien para el tipo de antagonistas de [Ile-(8)]-Ang II.¹⁵³ Tanto en agonistas como en antagonistas, [Sar-(1)]¹, Hcys-(3,5)]-AII tienen actividad y afinidad de enlace equivalente a los correspondientes análogos de Ang II. Al igual que sucedía con

¹⁵⁰ C. Pena, J. M. Steward, T. C. Goodfriend, *Life Sci.*, **1974**, *14*, 1331-6.

¹⁵¹ a) P. R. Bovy, A. J. Trapani, E. G. McMahon, M. A. Palomo, *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 520-22. b) P. R. Bovy, M. J. O'Neal, G. M. Olins, et al., *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 1477-82.

¹⁵² C. M. Ferrario, K. L. Banes, C. H. Block et al., *Hypertension* **1990**, *15* (Supl. I): 1, 13-I-19.

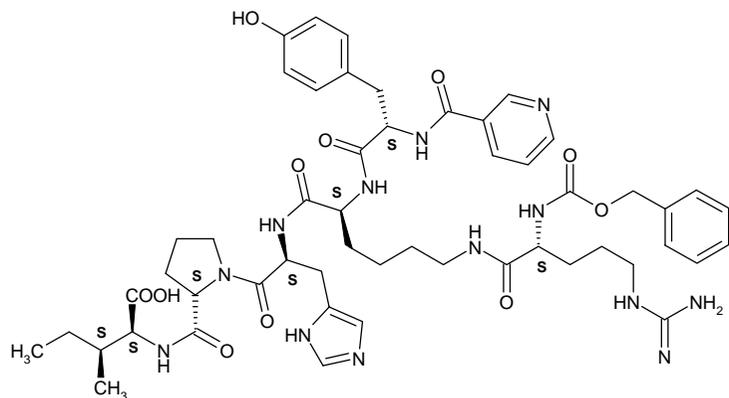
¹⁵³ K. L. Pear, M. S. Brown, E. J. Reinhard, *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 1935-40.

agonistas, el tamaño del anillo tiene una influencia importante en la potencia.

2.3.1.3 Relación estructura-actividad para los subtipos de receptores peptídicos

El conocimiento de subtipos de receptores de Ang II introduce una fuente de complejidad en la interpretación de muchos resultados de los primeros estudios sobre análogos peptídicos de Ang II. Como se indicó anteriormente, la relación estructura-actividad para la mayoría de los agonistas y antagonistas de Ang II conocidos, reflejan supuestamente interacciones con el subtipo de receptor AT₁, al menos desde el punto de vista de que estos ensayos están basados en la contracción de tejidos. Esta suposición es a menudo incongruente, al menos con alguno de los primeros datos de unión al receptor basados en ensayos que inducían DTT. Puesto que muchos péptidos análogos de Ang II se unen a AT₁ y AT₂ casi con la misma afinidad, es posible que exista una correlación equívoca entre los ensayos de contracción en tejidos y los que inducen DTT. Será necesario reexaminar muchas de estas primeras observaciones con el fin de tener una comprensión completa de la relación estructura-actividad de péptidos con respecto a los subtipos de receptores de Ang II. La única información hasta el momento referente a relación estructura-actividad de análogos peptídicos de Ang II con respecto a la selectividad de los receptores AT₁/AT₂ aparece en unas publicaciones donde describen CGP 42112A¹⁵⁴ y [4-NH₂-Phe⁶]-AII¹⁴² como péptidos específicos de AT₂ y en una serie de análogos cíclicos AII-[3,5]¹⁴³ donde dan datos de afinidades de enlace para AT₁ y AT₂. Las diferencias estructurales entre los compuestos CGP 42112A y [4-NH₂-Phe⁶]-AII no presentan ninguna relación estructura-actividad obvia para la selectividad por AT₂ (Figura 17).

¹⁵⁴ T. Balla A. J. Baukal, S. Eng, K. Catt, *Mol. Pharmacol.*, **1991**, *40*, 401-6.



CGP42112A

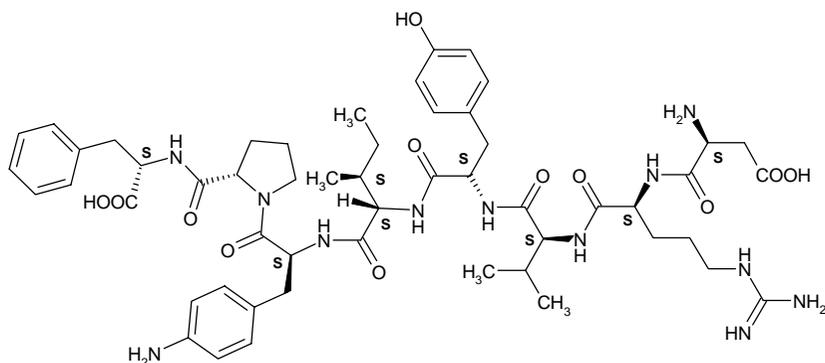
[4-NH₂-Phe⁶]-All

Figura 17.

Mientras que estos antagonistas peptídicos de Ang II se han usado para un mejor entendimiento del sistema renina-angiotensina y del papel funcional de Ang II, su utilidad clínica es limitada. Saralasin ha sido utilizada como un agente de diagnóstico para la detección de hipertensión dependiente de angiotensina. Sin embargo, debido a la baja biodisponibilidad inherente a su naturaleza y debido a la actividad agonista residual de algunos de estos antagonistas, el uso terapéutico de antagonistas peptídicos de Ang II no ha sido posible, por el momento.

2.4. ANTAGONISTAS NO PEPTÍDICOS DE ANG II SELECTIVOS DE AT₁

Debido a la clara relación entre receptores de AT₁ y control de la presión sanguínea, numerosos antagonistas selectivos de AT₁ han emergido en los últimos años. Con la excepción de SK&F 108566^{155,156} y derivados análogos del ácido 5-acrílico y el antagonista más reciente de Lilly¹⁵⁷ estos antagonistas no peptídicos están basados en modificaciones de uno o más fragmentos del losartán (Figura 18). La mayoría de estos compuestos han resultado de la estrategia de modificar o reemplazar el anillo de imidazol del losartán.

2.4.1. Imidazoles iniciales de Takeda

Furukawa y colaboradores¹⁵⁸ de Takeda, descubrieron en 1982 la primera serie de antagonistas no peptídicos de Ang II. Esta serie de derivados de imidazol polisustituidos (Figura 18) inhiben *in vitro* la respuesta contráctil inducida por Ang II en aorta de conejo aislada (4×10^{-9} M).

- A. X = Y = Z = H; R = Na
- B. X = Cl; Y = Z = H; R = Na
- C. X = NO₂ Y = Z = H; R = Na
- D. X = CH₃; Y = OCH₃ Z = H; R = Na
- E. X = Y = R = H; Z = NO₂
- F. X = NO₂; Y = Z = H; R = CH₃
- G. X = Y = R = H; Z = NH₂

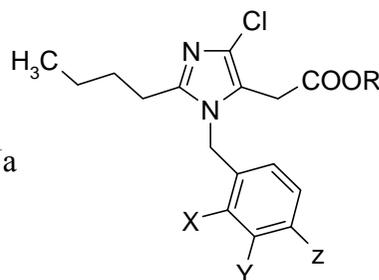


Figura 18.

Alguno de estos imidazoles, además de su acción *in vitro*, presentaban actividad *in vivo* cuando se administraba de forma intravenosa a ratas anestesiadas en las que la presión sanguínea fue elevada aproximadamente hasta 45 mm Hg por infusión continua de

¹⁵⁵ J. Weinstock, R. M. Keenan, J. Samanen, et al. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1514-1517.

¹⁵⁶ M. R. Keenan et al. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1880-92.

¹⁵⁷ M. I. Steinberg et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 51-6.

¹⁵⁸ a) Y. Furukawa, S. Kishimoto, K. Nishikawa, *Eur. Pat. Appl.*, **1984**, 103,647. b) Y. Furukawa, S. Kishimoto, K. Nishikawa, *U.S. Patent*, **1982**, 4,340,598. c) Y. Furukawa, S. Kishimoto, K. Nishikawa, *US. Patent*, **1982**, 4,355,040.

Ang II (20 ng / Kg / min.). Las tablas 4 y 5 muestran los resultados obtenidos por Furukawa y colaboradores para alguna de estas estructuras.

Tabla 4. Propiedades antagonistas de Ang II para algunos de los derivados de imidazol^{a,b}.

ESTRUCTURA	CONCENTRACIÓN (μ M)	INHIBICIÓN (%)
A	1	22 ^c , 55 ^d
B	0,1	75 ^d
C	0,001	30 ^d

a. Datos recogidos de ref. 159; b. Antagonismo expresado como porcentaje de inhibición de la respuesta contráctil de Ang II en aorta aislada de conejo (4×10^{-9} M); c. Ref. 158^b; d. Ref. 158^c.

Tabla 5. Acción antagonista de Ang II (administrado por vía intravenosa, 20 ng / Kg / min.), del incremento de la presión sanguínea en ratas anestesiadas, por algunos derivados de imidazol^{a, b}.

ESTRUC.	DOSIS (mg/Kg,i.v.)	N	INHIBICIÓN		
			10 min	30 min.	90 min.
A	0,1	3	19,6 \pm 1,5	64,3 \pm 15,3	60 \pm 21,5
	0,3	1	25	94	94
B	0,1	1	38	100	86
C	0,5	4	33 \pm 15	60 \pm 18	62 \pm 7

a, b. Datos recogidos en referencias 158^c y 159.

2.4.2. Desarrollo de losartán y SK&F 108566 a partir de los imidazoles iniciales de Takeda

Los potentes receptores antagonistas de Ang II con alta afinidad por AT₁, de los cuales losartán es el prototipo, tienen su origen en la serie derivada del ácido 1-benzimidazol-5-acético descubiertos por Furukawa y colaboradores (Takeda).

¹⁵⁹ P. B. M. W. M. Timmermans, D. J. Carini, A. T. Chiu et al., In: Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management, Vol. 2. J. H. Laragh and B. M. Brenner (Eds.), Raven Press, New York **1990**, 23351-60.

Grupos de investigadores de DuPont¹⁶⁰ y SmithKline Beecham¹⁶¹ usaron dos modelos moleculares diferentes de la supuesta conformación activa de Ang II, que alineaban el prototipo de Takeda S-8307 con la región terminal de Ang II^{138,161}. Estos dos modelos proporcionaron dos pautas racionales diferentes para la modificación sistemática de la estructura S-8307, cada una de las cuales condujo a clases estructurales nuevas de compuestos con mayor afinidad por AT₁.

En el esquema de la Figura 19 se muestra un resumen de la evolución química de antagonistas no peptídicos de AT₁, a partir del compuesto inicial de Takeda (S-8307). La estrategia de modelado de DuPont condujo al compuesto EXP 6155 por introducción de un grupo carboxilo, el cual muestra un incremento en la actividad de 10 unidades con respecto a S-8307. Mayor extensión en la región N-terminal del modelo, produjo una serie de análogos del ácido ftálico con un incremento de actividad de un segundo orden de magnitud con respecto al compuesto inicial. Se observó que el compuesto EXP 6803 de esta serie era un antagonista específico de Ang II tanto en modelos farmacológicos *in vitro* como *in vivo*. Aunque tanto EXP 6155 como EXP 6803 causaron un rápido decrecimiento en la presión arterial principal cuando se administró por vía intravenosa a ratas conscientes con arteria renal ligada, sin embargo carecían de actividad oral. El siguiente paso fue el reemplazamiento de la agrupación del ácido N-fenilftálico (EXP 6803) por un grupo bifenilo que condujo al compuesto (EXP 7711). Este bifenil derivado, que era activo por vía oral (ED₃₀= 11 mg/Kg), resultó ser ligeramente menos potente que EXP 6803 en la inhibición de la unión de [³H]Ang II (IC₅₀= 0,23 μM comparado con IC₅₀= 0,12 μM) y en antagonizar la contracción inducida por Ang II en aorta de conejo. En ratas hipertensas renales y conscientes, EXP 7711 administrado por vía intravenosa tuvo un valor de ED₃₀= 3,7 mg/Kg comparado con 11 mg/Kg para EXP 6803.¹⁶² Con el fin de mejorar la actividad oral de los bifenil derivados, una serie de grupos ácidos fueron sistemáticamente evaluados como sustituyentes bioisostéricos del grupo carboxílico. Este esfuerzo culminó en la identificación de losartán como candidato clínico. En el losartán, el ácido carboxílico fue reemplazado con un tetrazol, el cual condujo a un

¹⁶⁰ J. V. Duncia, A. T. Chiu, D. J. Carini et al. *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 1312-29.

¹⁶¹ J. Weinstock, R. M. Keenan, J. Samanen, et al. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1514-1517.

¹⁶² P. B. M. W. M. Timmermans, P. C. Wong, W. A. Price et al., *Blood Vessels*. **1990**, *27*, 295.

aumento significativo en potencia y actividad antihipertensiva cuando se administró por vía oral.

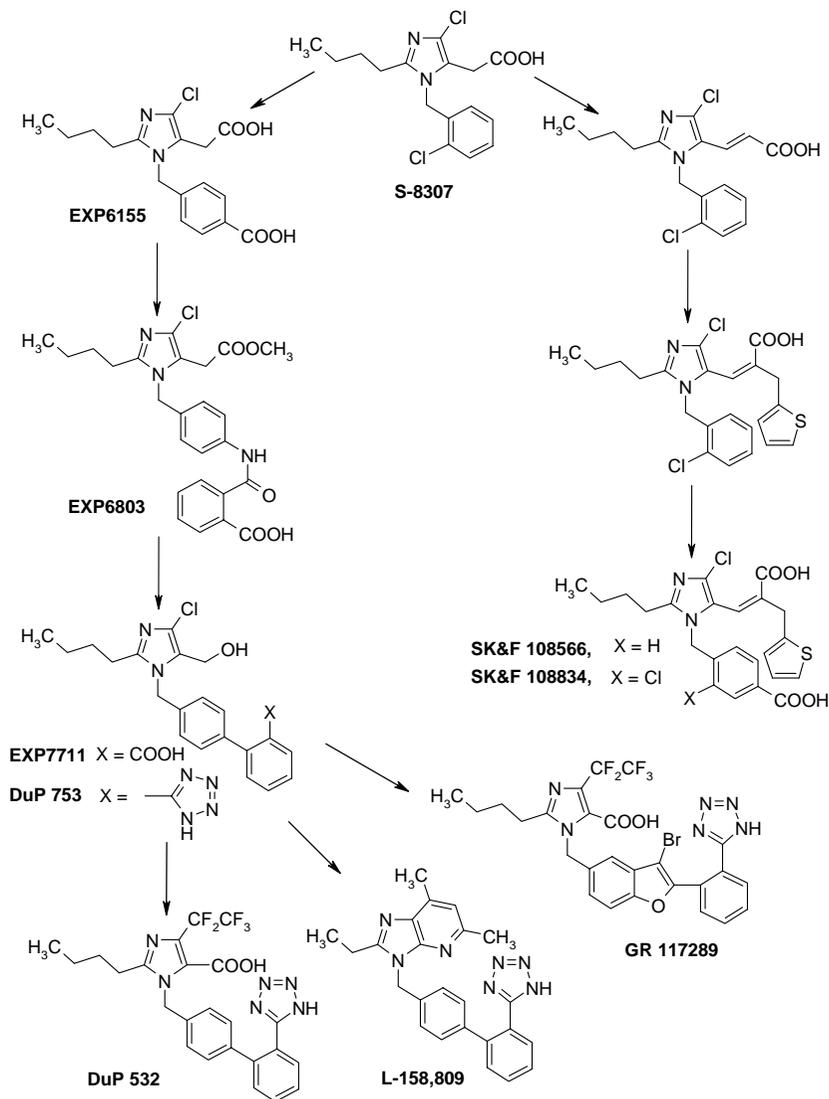


Figura 19. Evolución química de antagonistas no peptídicos de AT₁

Investigadores de DuPont fueron los pioneros en el desarrollo de antagonistas no peptídicos de Ang II e identificaron con éxito el primer candidato clínico (losartán ó DuP 753).¹³⁸ El descubrimiento de losartán, el primer antagonista oralmente activo, provocó en la industria farmacéutica de todo el mundo una frenética investigación hacia la búsqueda de nuevos antagonistas no peptídicos de Ang II. En la figura

20 se recogen unos pocos ejemplos de nuevos antagonistas no peptídicos de AT₁ que han aparecido en patentes y publicaciones.

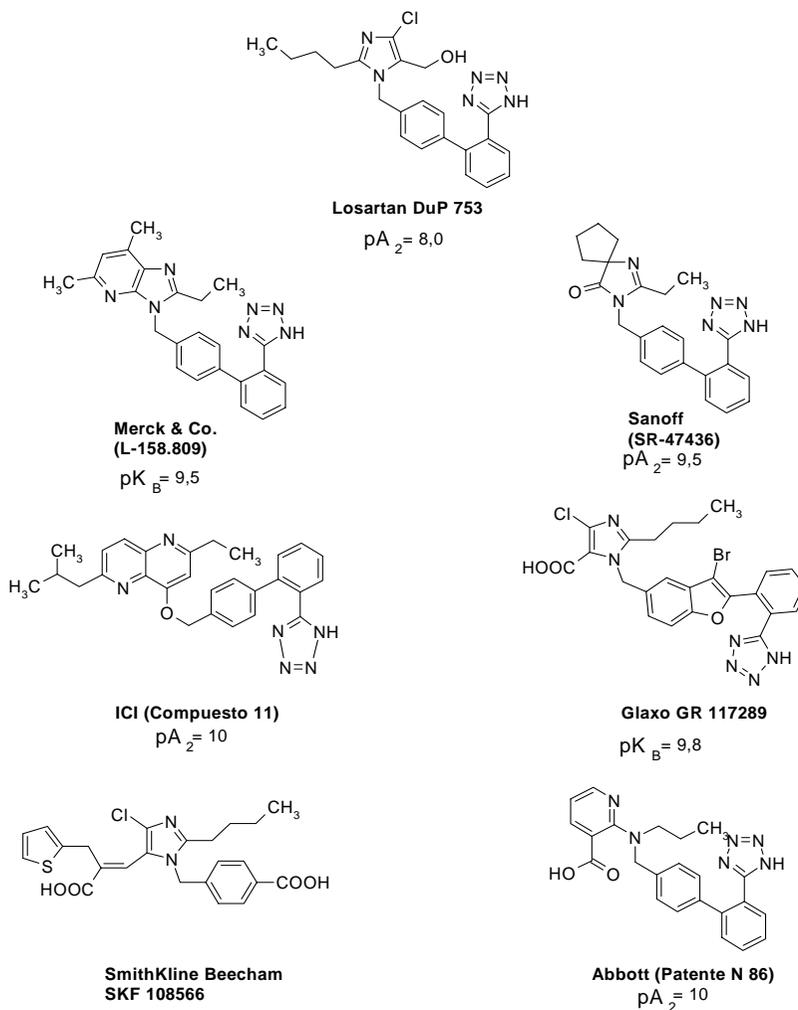


Figura 20. Antagonistas no peptídicos de AT₁. pA₂ Se define como el logaritmo negativo de la concentración molar de antagonista que obliga a duplicar la dosis de agonista para conseguir el mismo efecto que se obtenía con el agonista en ausencia de antagonista. pK_B Se define como el logaritmo negativo de la constante de afinidad (1/K disociación del antagonista competitivo).

Losartán es un antagonista selectivo de AT₁ con valores de IC₅₀ de 19 y 20 μ M en corteza adrenal y músculo liso vascular de rata respectivamente y prácticamente sin afinidad para el subtipo de receptor AT₂.¹⁶³ Es un antagonista competitivo de Ang II ($pA_2 = 8,48$, aorta de conejo) y no posee la actividad agonista parcial característica de receptores antagonistas no peptídicos como saralasin.¹⁶⁴ En ratas hipertensas renales (RHR) losartán mostró efectos antihipertensivos a 0,1 mg/Kg cuando se administró por vía intravenosa (ED₃₀ = 0,78 mg/Kg) y a 0,3 mg/kg o superior cuando se administró oralmente (ED₃₀ 0,59 mg/Kg), sin afectar la frecuencia cardiaca, y con eficacia antihipertensiva comparable con los inhibidores de ACE (no se observó ninguna caída en la presión sanguínea cuando se administró una gran dosis de captoprilo a la vez, con respecto al pico de la actividad de losartán). En RHR la duración de acción de losartán fue superior a 24 horas. Losartán administrado por vía oral o intravenosa también reduce la presión arterial en ratas conscientes espontáneamente hipertensas.¹⁶⁵

La administración intravenosa de losartán a RHR (1 mg/Kg) produjo una respuesta antihipertensiva bifásica. Esto sugiere la implicación de uno o más metabolitos activos. Esta suposición está apoyada por la observación de que los valores de ED₃₀ orales, son inferiores o al menos comparables a los valores de ED₃₀ intravenosos. EXP 3174¹⁶⁶ el ácido 5-imidazocarboxílico resultante de la oxidación del grupo 5-hidroximetilo del imidazol, fue identificado en plasma de rata como el metabolito más potente del losartán¹⁶⁷. Contrariamente a losartán, EXP 3174 es un antagonista no competitivo ($pA_2 = 10,09$, aorta de conejo) de Ang II.

El efecto antihipertensivo de losartán ha sido demostrado en modelos experimentales de hipertensión genética y renal.¹⁶² En modelos de hipertensión esencial de renina (SHR), losartán y otros

¹⁶³ A. T. Chiu, W. H Herblin, D. E. McCall et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 165, 196-203.

¹⁶⁴ a) A. T. Chiu, D. E. McCall, W. A. Price et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, 252, 711-18. b) P. C. Wong, W. A. Price, A. T. Chiu et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, 252, 719-25.

¹⁶⁵ P. C. Wong, W. A. Price, A. T. Chiu et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, 252, 726-32.

¹⁶⁶ P. C. Wong, W. A. Price, A. T. Chiu et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, 255(1), 211-17.

¹⁶⁷ D. D. Christ, T. Kilkson, N. Wong et al. *International Society for the Study of Xenobiotica (ISSX)*, **1990**, October, 21-25.

antagonistas selectivos de AT₁ disminuyeron la presión sanguínea y redujeron la hipertrofia cardiaca y vascular.^{162,168}

Como se indicó anteriormente, el candidato clínico de SmithKline Beecham (SK&F 108566; Figuras 19 y 20) es representativo de una de las pocas series de antagonistas de Ang II que derivan del imidazol de Takeda y no del Losartán. Igual que DuPont, el grupo de SmithKline Beecham basó su estrategia de diseño inicial en una combinación de modelado molecular y del conocimiento de las relaciones estructura-actividad del péptido AII^{161,169,170}. Asumieron que los grupos bencilo y ácido carboxílico de S-8307 imitaban el residuo de Tyr-(4) y el C-terminal de AII. La extensión de la cadena en la posición 5 del imidazol con un ácido *trans*-5-acrílico seguido de un grupo α -bencilo que imitaba el Phe-(8) de la cadena lateral condujo a un aumento de la afinidad de enlace de 15 unidades de magnitud. Reemplazando el α -bencilo por un grupo lipófilo (2-tienilmetilo) seguido de la sustitución del grupo 2-clorobencilo por el grupo 2-carboxibencilo, que se aproximaba mejor al grupo fenólico de Tyr-(4), dio lugar al compuesto SK&F 108566 (Eprosartan), un potente antagonista selectivo de AT₁, con un modo de inhibición competitivo.

2.4.3. Antagonistas de Ang II análogos a Losartán

Modificaciones estructurales en las posiciones C4 y C5 del imidazol de DuP 753 son posibles con una gran variedad de sustituyentes que siguen manteniendo buena afinidad de enlace, ya que parece ser que las propiedades electrónicas y estéricas no son críticas para la afinidad por el receptor.

Aunque no hay ningún requerimiento para la unión a AT₁, un sustituyente en C4 a menudo incrementa la potencia y también confiere efectos favorables de las propiedades *in vivo*. Con una serie de derivados de 4-haloimidazoles se observó un incremento pequeño de afinidad al aumentar el tamaño del halógeno (I>Br>Cl).¹⁷¹ La posterior introducción de sustituyentes perfluorados para investigar la posibilidad de que el receptor pudiera acomodar un grupo altamente lipófilo y

¹⁶⁸ R. D. Smith, P. B. M. W. M. Timmermans, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **1994**, *3*, 112.

¹⁶⁹ M. R. Keenan et al. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1880-92.

¹⁷⁰ J. M. Samamen, C. E. Peishoff, R. M. Keenan et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, *3*, 909.

¹⁷¹ D. J. Carini, J. V. Duncia., P. E. Aldrich et al. *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 2525-47.

electroatractor, resultó en una serie de 4-(perfluoroalquil)imidazoles, donde DuP 532¹⁷² es el más potente de esta serie (Figuras 19 y 21). Más recientemente, se ha encontrado que simples sustituyentes 4-alquílicos conducen a antagonistas muy potentes tanto *in vivo* como *in vitro* (Figura 21). De hecho, DMP 581 y DMP 811 (AT₁ IC₅₀ = 2,1 y 6 nM, cápsula suprarrenal de rata) representan los antihipertensivos más potentes preparados en el programa de DuPont, con valores de ED₃₀ de 0,027 y 0,03 mg/Kg respectivamente por administración oral a RHR. DMP 581 es absorbido entre un 60-70 % cuando se administra en polvo a ratas y perros y es totalmente absorbido cuando se administra en solución. Al igual que losartán es metabolizado a su metabolito diácido más potente DMP 811, lo que contribuye significativamente a su efecto antihipertensivo y a su duración de acción, sin embargo al igual que otros diácidos, la biodisponibilidad oral de DMP 811 es moderada, aproximadamente del 8 % y 13 % cuando se administra en polvo a ratas y perros respectivamente, y similar a la de DuP 532.¹⁷³

Igual que Losartán, DMP 581 es un antagonista competitivo, mientras que DMP 811 y otros diácidos como DuP 532 y EXP 3174 se comportan como antagonistas no competitivos, es decir, estos compuestos causan un desplazamiento hacia la derecha no paralelo de las curvas de la concentración de Ang II-respuesta contráctil y reduce la respuesta contráctil máxima a Ang II en los ensayos funcionales (aorta aislada de conejo). Los compuestos que se comportan como Losartán mostrando desplazamiento paralelo hacia la derecha sin depresión de la respuesta máxima a Ang II han sido denominados antagonistas competitivos, mientras los diácidos similares a EXP 3174 los cuales muestran un desplazamiento no paralelo con depresión de la respuesta máxima han sido denominados antagonistas no competitivos.

Debido a la biodisponibilidad moderada de estos diácidos, varios grupos han evaluado profármacos. Uno de estos profármacos es HN-65021 (Hafslund Nycomed) (Figura 21).¹⁷⁴

¹⁷² D. J. Carini, A. T. Chiu, P. C. Wong et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 895-98.

¹⁷³ P. C. Wong, S. M. Huang, R. J. Ardecky et al. *Clin. Exp. Hypertens.* **1995**, 17 (8), 1233-56.

¹⁷⁴ D. Stinmmeder, H. Stroissnig, E. Kuhberger et al. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1994**, 72, 122.

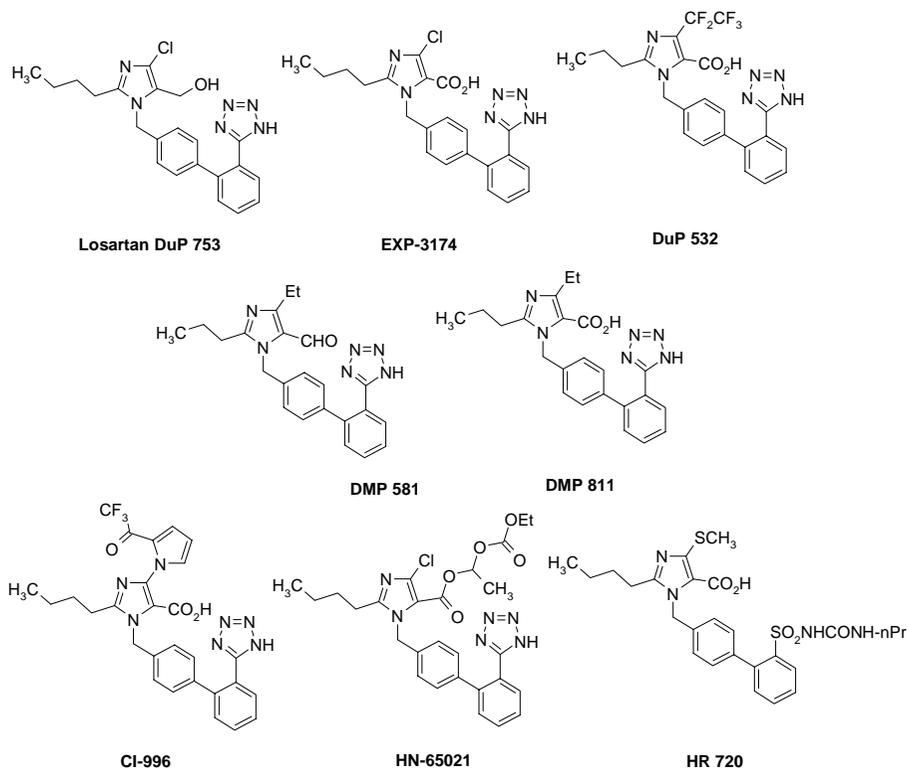


Figura 21

Retrocediendo a la relación estructura-actividad (SAR) de la posición C4, la tolerancia de un grupo voluminoso en esta posición está confirmada por la alta afinidad de imidazoles que contienen sustituyentes 4-aril¹⁷⁵ o heteroaril¹⁷⁶ voluminosos. Un ejemplo de estos derivados es CI-996 (Warner-Lamber). CI-996 es un potente receptor antagonista de AT₁ no competitivo.

Otros derivados de imidazoles 4-sustituidos que han sido explorados incluye 4-(alquiltio)imidazoles. Un ejemplo de esta serie es HR 720¹⁷⁷, el cual incorpora un grupo sulfinilurea en lugar del tetrazol.

¹⁷⁵ a) D. J. Carini, J. V. Duncia, P. C. Wong, *PCT Patent application WO 91/00281*, **1991**. b) W. T. Ashton, S. M. Hutchins, W. J. Greenlee et al., *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 3595-3605.

¹⁷⁶ I. Sircar, J. C. Hodges, J. Quikn III et al. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2253-65.

¹⁷⁷ J. P. Vevert, R. H. A. Becker, J. C. Caille et al., *XIII th International Symposium on Medicinal Chemistry*. Paris, **1994**, P90 y P91 (abstract).

2.4.4. Variaciones en el anillo de imidazol del Losartán

2.4.4.1. Antagonistas con anillos de imidazol fusionados

La posibilidad de incorporar una gran variedad de funcionalidades en las posiciones C4 y C5 del imidazol en las series de antagonistas del losartán, sugiere que estos sustituyentes podrían unirse para dar sistemas con anillos de imidazol fusionados (Figura 22). Varios 1-(arilmetil)benzimidazoles han sido investigados por varios grupos, y antagonistas de AT₁ muy potentes se han publicado incluyendo: TCV-116 y BIBR 277 los cuales están actualmente bajo evaluación clínica.

TCV-116 (Takeda), es un profármaco que rápidamente evoluciona *in vivo* a CV-11974¹⁷⁸. Este compuesto es un potente inhibidor no competitivo de AT₁.

El grupo de Thomae ha realizado un estudio extensivo de antagonistas con estructura de benzimidazol, particularmente centrándose en la posición C6 del heterociclo. Los primeros antagonistas publicados por Thomas presentaron afinidad de enlace para ambos subtipos de receptores AT₁ y AT₂. Posteriormente prepararon el compuesto BIBR 277 donde el anillo de tetrazol ha sido reemplazado por un ácido carboxílico. Al contrario que en otras series de antagonistas, el ácido bifenilcarboxílico ha resultado ser más potente que el análogo tetrazólico.

La idea de introducir un átomo de nitrógeno en la posición C7 del benzimidazol con el propósito de introducir un grupo capaz de formar enlace por puente de hidrógeno para mejorar la potencia, ha sido ampliamente explorada. Los compuestos más minuciosamente estudiados han sido la serie de imidazo[4,5-b]piridina de Merck, donde el compuesto L-158,909^{179,180} es un antagonista de AT₁ con una potencia extraordinaria.

¹⁷⁸ a) K. Kubo, Y. Yohara, E. Ymamiya et al. *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 2182-2195. b) M. Noda, Y. Shibouta, Y. Ynada et al. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 311-18.

¹⁷⁹ N. B. Mantlo, P. K. Chakravarty, D. L. Ondeyka et al. *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 2919-22.

¹⁸⁰ R. S. L. Chang, P. K. S. Siegl, B. V. Clineschmidt et al, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *262* (1), 133-38.

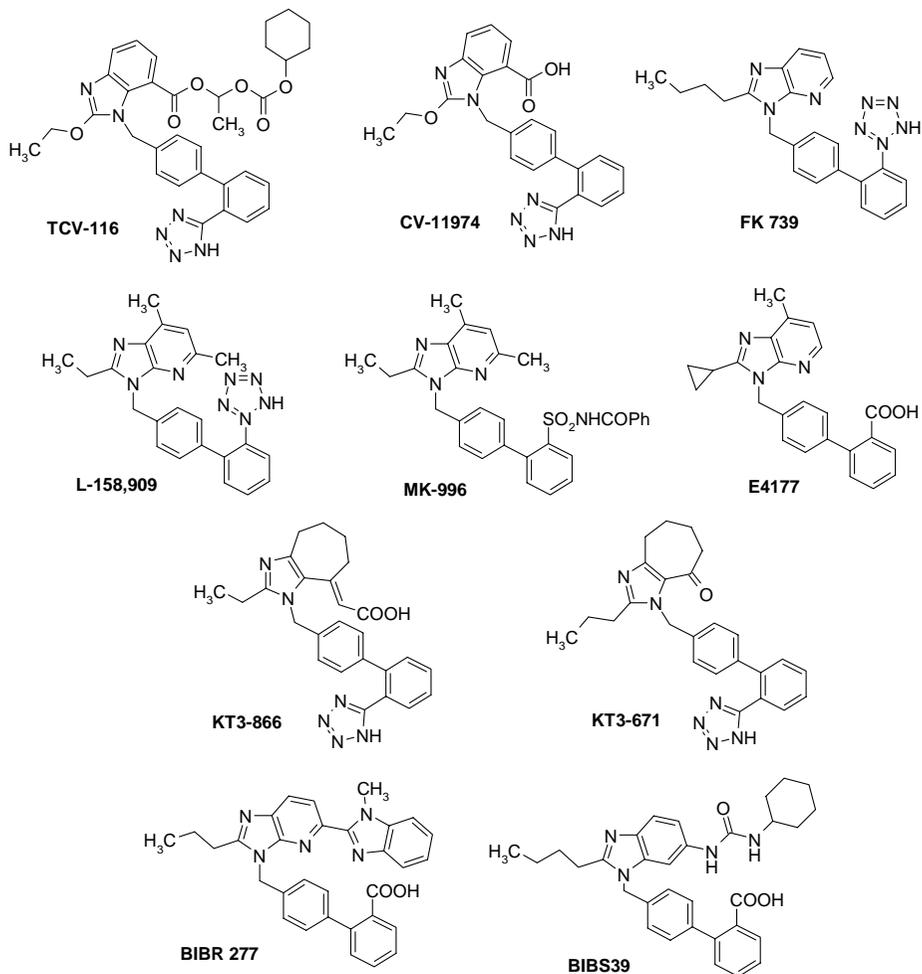


Figura 22

Con las series de imidazol e imidazoles fusionados se han realizado considerables esfuerzos en identificar un grupo isómero del tetrazol, que mantenga la potencia, duración de acción y biodisponibilidad oral del losartán y otros bifeniltetrazol análogos. La sustitución del tetrazol de L-158,909 por un grupo benzoilsulfonamida condujo al descubrimiento de MK-996 (L-159,282). Este grupo acilsulfonamida fue escogido porque no se produce N_2 glucuronidación como ha sido observado con el tetrazol en L-158,909. En este compuesto se han observado excelentes propiedades *in vitro* y *in vivo*.

Dos imidazopiridinas adicionales, FK739¹⁸¹ y E4177¹⁸² han sido descritas en Japón. Ambos son potentes antagonistas selectivos de AT₁, con larga duración de acción y con un modo de acción competitivo.

Otros antagonistas que contienen anillos de siete miembros fusionados a un anillo de imidazol están siendo evaluados clínicamente. KT3-671¹⁸³ presenta excelente afinidad por AT₁. Un carboximetilideno derivado de KT3-671 ha sido descubierto por Kotobuki (KT3- 866).¹⁸⁴ Este compuesto a diferencia de KT3-671 es un antagonista no competitivo, y es 5 veces más potente que KT3-671 en bloquear la respuesta presora de Ang II en ratas (0,3 mg/Kg) y tiene una duración de acción mayor de 24 h.

2.4.4.2. Antagonistas con anillos de cinco miembros

Se han preparado varios antagonistas adicionales donde el anillo de imidazol presente en el Losartán ha sido reemplazado por varios anillos de cinco miembros. Entre estos compuestos destaca el pirazolotriazol sustituido YM358¹⁸⁵ de Yamanouchi en el que el grupo bifenilmetilo se une al nitrógeno del anillo de pirazol y el compuesto SR 47436¹⁸⁶ publicado por Sanofi que incorpora un anillo de imidazolinona (Figura 23).

¹⁸¹ K. Hamada, Y. Nakajima, H. Nirei et al. *Jpn. J. Pharmacol.* **1993**, *63*, 335-43.

¹⁸² a) K. Miyake, M. Matsukura, N. Yoneda et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 213-18. b) H. Okunishi, K. Song, et al. *Jpn. J. Pharmacol.* **1993**, *62*, 239-44.

¹⁸³ T. Yanagisawa, N. Ueyama, T. Kawai et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1559-64.

¹⁸⁴ N. Ueyama, T. Yanagisawa, H. Baba et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1637-42.

¹⁸⁵ a) A. Fujimori, M. Shibasaki, T. Tokioka et al. *Jpn. J. Pharmacol.* **1993**, *61*, 262P. b) M. Shibasaki, A. Fujimori, T. Yatsu et al. *Jpn. J. Pharmacol.* **1993**, *61*, 212P.

¹⁸⁶ a) C. A. Bernhart, P. M. Perreaut, B. P. Ferrari et al. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 371-80. b) B. Christophe, R. Libon, C. Cazaubon et al. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *281*(2), 161-71.

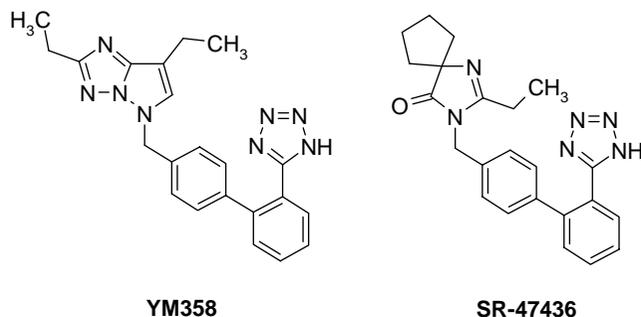


Figura 23

2.4.4.3. Antagonistas con anillos de seis miembros

También se han obtenido antagonistas potentes por sustitución del anillo de imidazol del losartán por otros de seis miembros y por heterociclos de seis miembros fusionados. Los sistemas de anillos de quinazolinona tienen la misma disposición 1,3 de nitrógenos que el losartán y puede contener el requisito de la cadena lipofílica en posición 2. Adicionalmente el grupo carbonilo de la quinazolinona se asemeja al grupo hidroximetilo del losartán. Hasta el momento, las quinazolinonas han resultado ser una fuente rica de antagonistas de Ang II con una potencia extraordinaria (Figura 24). Estos compuestos han sido descubiertos por MRL, Lederle, Ciba y Takeda. En el trabajo inicial del grupo de Merck se puso en evidencia que la posición 6 del anillo benzílico era un punto de intervención para modificaciones sistemáticas con varios sustituyentes con el fin de mejorar la potencia. Un ejemplo es el potente análogo de urea L-159,093.¹⁸⁷

Dos pirimidinonas antagonistas de Ang II han sido evaluadas clínicamente, LRB081 (Lusofármaco)¹⁸⁸, el compuesto inicial en una serie de N3 heteroaril pirimidinonas sustituidas, y SL 910102.¹⁸⁹ Ambos son antagonistas selectivos de AT₁ y muestran actividad antihipertensiva cuando se administran oralmente.

¹⁸⁷ S. E. de Laszlo, E. E. Allen, C. S. Quagliato, et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 1299.

¹⁸⁸ A. Salimbeni, L. Belvise, S. Caliarì et al. *XIIth International Symposium on Medicinal Chemistry*, Paris, **1994**, P94.

¹⁸⁹ C. Hoornaert, M. Daumas, M. Aletru et al. *Europe Patent 500409-A*, **1992**.

Otros compuestos con anillos heterocíclicos de seis miembros han sido publicados, incluyendo triazolopirimidinona (UP 269-6),¹⁹⁰ piperidinona (RWJ 46458)¹⁹¹ y derivados de morfolina (RWJ 47639).¹⁹²

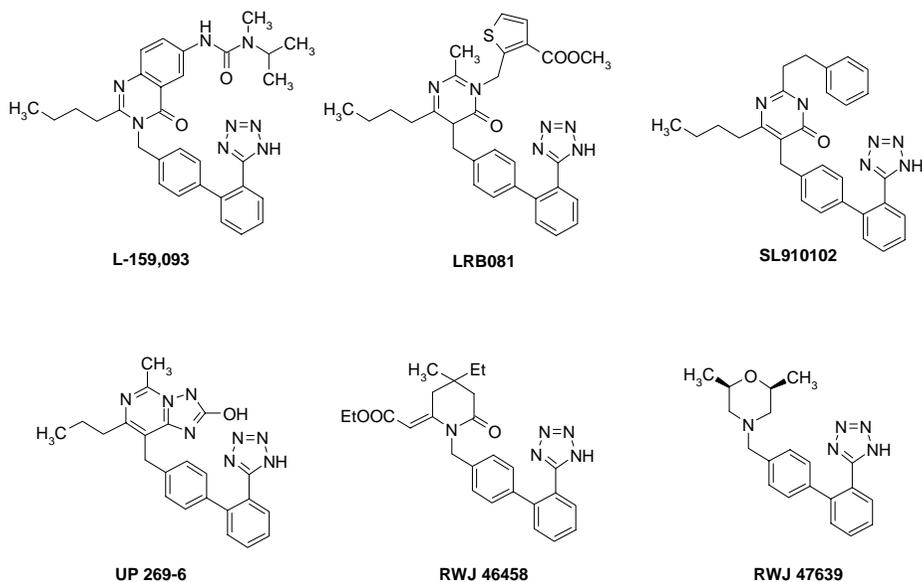


Figura 24

2.4.4.4. Sustitución por análogos acíclicos

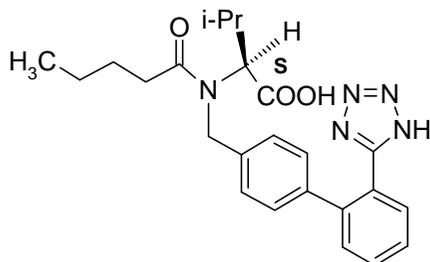
Ciba ha descrito antagonistas no heterocíclicos donde el anillo de imidazol del losartán se ha reemplazado con un aminoácido acilado.¹⁹³ Valsartán (CGP-48933), un compuesto con dos grupos ácido igual que EXP 3174 (metabolito activo de losartán) es un potente antagonista selectivo de AT₁ que ha sido elegido para evaluación clínica. (Figura 25).

¹⁹⁰ a) E. Nicolau, G. Curé, J. Goyard et al. *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 2371-86. b) A. Cloaree, A. Versigny, D. Provost et al. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1994**, 72, 129.

¹⁹¹ a) W. V. Murray, P. Lalan, A. Gill et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 1775-79. b) W. V. Murray, P. Lalan, A. Gil, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 87-92.

¹⁹² J. D. Hsi, W. V. Murray, A. Gill, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 1523-26.

¹⁹³ P. Buhlmayer, P. Furet, L. Criscione et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 29-34.



CGP-48933

Figura 25

2.4.5. Variaciones del resto unido al N del anillo de imidazol de Losartán

2.4.5.1. Modificaciones del puente de unión del bifenilo al heterociclo

Se han descrito varios compuestos heterocíclicos donde el sustituyente bifenilo se une al heterociclo a través de un puente oximetileno o aminometileno en lugar de unirse directamente al anillo heterocíclico con un simple metileno. Estos antagonistas presentan alta potencia de afinidad de enlace a pesar de la posibilidad de que estos elementos de unión puedan resultar en una diferencia de orientación del bifenilo con relación al heterociclo.

El grupo de Zeneca ha utilizado un puente oximetileno para unir el bifeniltetrazol con el heterociclo en la preparación de potentes antagonistas como la quinolina ZD-8731¹⁹⁴ o la tetrahydroquinolina análoga ZD-6888.¹⁹⁵ También se ha utilizado el puente oximetileno en la preparación de derivados de piridina como está ejemplificado en el compuesto ME 3221¹⁹⁶ (Figura 26).

¹⁹⁴ A. A. Holdham, C. P. Allot, J. S. Major et al. *Br. J. Pharmacol.* **1992**, *105*, 83P. b) R. H. Bradbury, C. P. Allot, M. Dennis et al. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4027-38.

¹⁹⁵ C. P. Allot, R. H. Bradbury, M. Dennis et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 899-904.

¹⁹⁶ a) J. Nagura, K. Fujishima, J. Nagura et al. *J. Hypertens.* **1994**, *12*, S99. b) K. Kawano, S. Yasuda, K. Fijishima et al. *Jpn. J. Pharmacol.* **1994**, *64*, 331P.

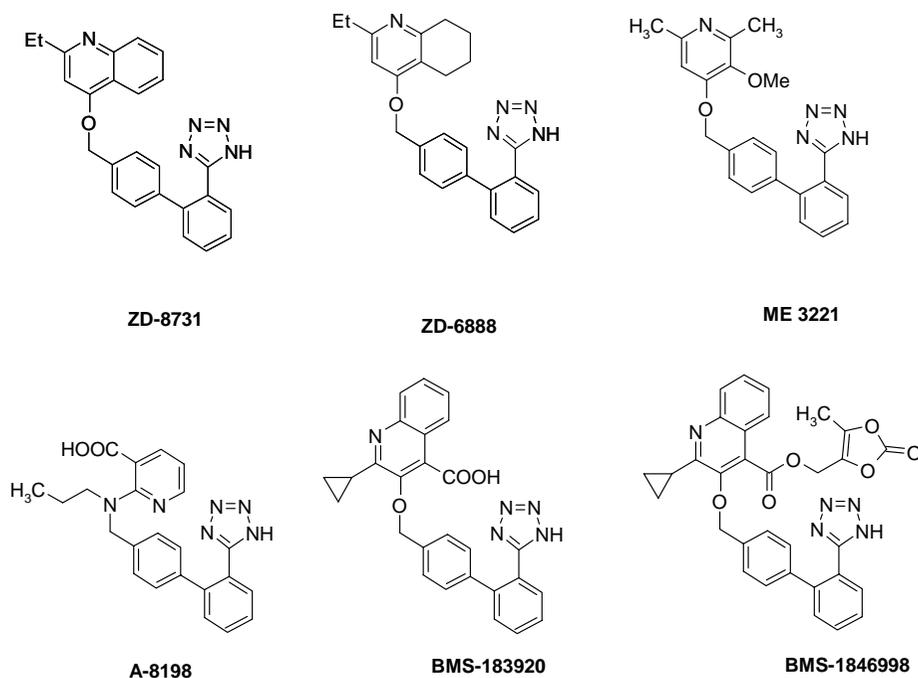


Figura 26

Abbot ha utilizado satisfactoriamente un puente aminometileno para conectar piridinas y pirimidinas sustituidas al bifeniltetrazol. El más potente de esta serie es la aminopiridina A-8198¹⁹⁷ en el que el sustituyente n-propilo hace la función del sustituyente C2 en el losartán y el ácido carboxílico el del sustituyente de EXP 3174.

El puente oximetileno también ha sido utilizado por Bristol-Myers Squibb en la preparación de los compuestos BMS-183920¹⁹⁸ y BMS-1846998¹⁹⁹ donde el heterociclo es una quinolina.

2.4.5.2. Reemplazamiento del grupo bifenilo

Mientras que la estrategia de reemplazar el anillo de imidazol del losartán ha sido una dirección de investigación muy utilizada, relativamente muy pocos compuestos se han publicado hasta el

¹⁹⁷ B. De. M. Winn, T. M. Zydowsky et al., *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 3714-17.

¹⁹⁸ J. Lloyd, D. E. Riono, J. E. Bird et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 195-200.

¹⁹⁹ D. E. Ryono, J. Lloyd, M. A. Poss et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 201-6.

momento con modificaciones estructurales del resto bifenilo (Figura 27).

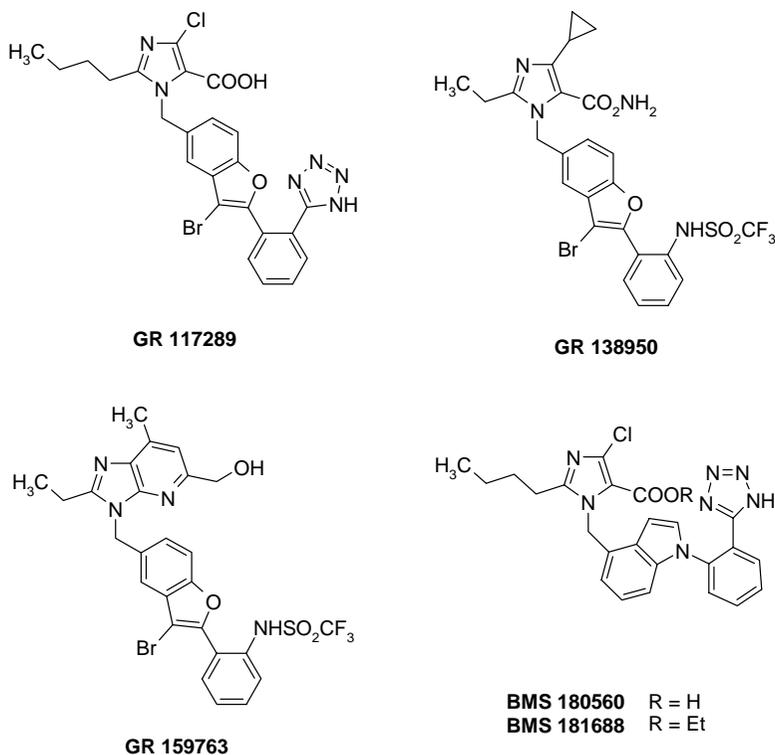


Figura 27

Glaxo publicó recientemente en una patente su primer candidato clínico, donde el fenilo del EXP 3174 fue reemplazado por un bromobenzofurano, GR117289.²⁰⁰ En este compuesto, al igual que en el resto de benzofuranos de la serie, el sustituyente 3-bromo es esencial para la potencia y esto se ha atribuido al aumento del efecto inductivo electroattractor. El segundo candidato clínico de Glaxo ha sido el compuesto GR 138950²⁰¹ y fue el resultado de la estrategia de mejorar la biodisponibilidad oral del bromobenzofurano diácido GR 117289. La idea inicial era que un monoácido sería mejor absorbido después de la administración oral, por lo que se mejoraría la biodisponibilidad oral. Con este fin el ácido carboxílico del imidazol fue reemplazado por una carboxamida neutra. Esto combinado con el reemplazamiento del

²⁰⁰ a) D. Middlemis, G. M. Drew, B. C. Ross et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 711-16. b) A. Hilditch, A. A. E. Hunt, C. J. Gardner et al. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *111*, 137-44.

²⁰¹ D. B. Judd, M. D. Dowle, D. Middlemiss et al. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3108-20.

tetrazol por un trifluorometanosulfonamido, en la cual el grupo de Glaxo ya había observado que proporcionaba mejor absorción que el tetrazol, condujo al compuesto GR 138950. Datos preliminares de estudios clínicos indican que la alta biodisponibilidad oral de este compuesto en ratas y perros también es extrapolable a humanos.

La estrategia de preparar compuestos monoácidos para mejorar la absorción oral condujo a la sustitución del anillo de imidazol por una 5,7-dimetilimidazopiridina, utilizada previamente por Merck en el compuesto MK-996 (Figura 22). Esto condujo al potente benzofurano GR 159763²⁰² con una duración de acción superior a 24 horas.

Un compuesto análogo a GR 117289 es BMS-180560²⁰³ donde el anillo de benzofurano es sustituido por un indol.

2.4.5.3. (Benzoilamino)imidazoles

Lilly ha descrito otra serie de compuestos. LY235656²⁰⁴ inhibe la respuesta contráctil de Ang II en aorta de conejo con un valor de $K_B = 0,078 \mu\text{M}$ (Figura 28). Adicionalmente se prepararon (benzoilamino)imidazoles con el fin de mejorar la potencia y la biodisponibilidad oral. LY301875²⁰⁵ es un inhibidor no competitivo de Ang II con un valor de pK_B de 9,1 - 9,9 comparado a losartán el cual tiene un valor de 8,2 en este mismo ensayo.

Utilizando modelado molecular, Lilly ha superpuesto la estructura LY301875 con losartán, donde la cadena alquílica, el ácido carboxílico y el ácido sulfónico son alineados con el grupo butilo, grupo hidroximetilo y tetrazol respectivamente. El grupo (carboximetil)fenoxilo accede al sitio de unión al receptor estereoespecíficamente, el cual no es alcanzado por el losartán.

²⁰² a) D. B. Judd, K. S. Cardwell, T. A. Panchal et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 725-28. b) D. Middlemiss, S. P. A. Watson, *Tetrahedron* **1994**, *50(46)*, 13049-80.

²⁰³ M. A. Poss, Z. Gu, D. E. Ryono, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 145-50.

²⁰⁴ C. A. Whitesitt, M. I. Steinberg, K. M. Zimmerman et al., *FASEB J.* **1992**, *5*, A1871, 5412.

²⁰⁵ M. I. Steinberg, A. D. Palkowitz, J. A. Finkelstein et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 51-6.

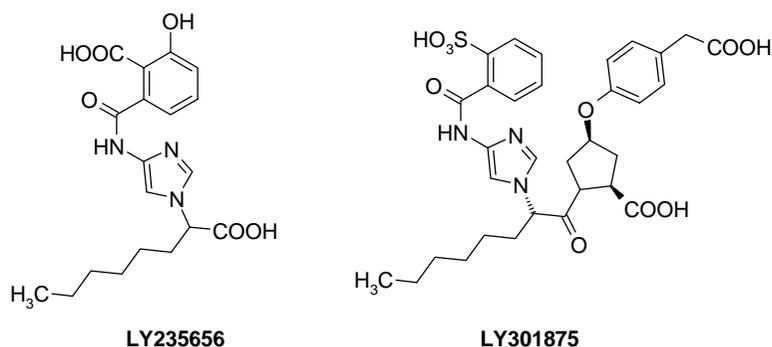


Figura 28

2.5. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

2.5.1. Relaciones estructura-actividad para antagonistas selectivos de AT_1

El amplio número de antagonistas de AT_1 que se han preparado hasta el momento, sugiere un número importante de rasgos estructurales para esta clase de compuestos que son esenciales para que se comporten como potentes antagonistas de Ang II. A continuación se resumen las observaciones apreciadas de la relación estructura-actividad en término de sustituyentes en las diferentes posiciones del anillo de imidazol y del bifenilo, para las series iniciales, S-8307, EXP 6155 y EXP 6159 y en especial para losartán y los compuestos más potentes derivados de éste^{160, 206} (Figura 29).

²⁰⁶ a) D. J. Carini, J. V. Duncia, et al. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1330-36.

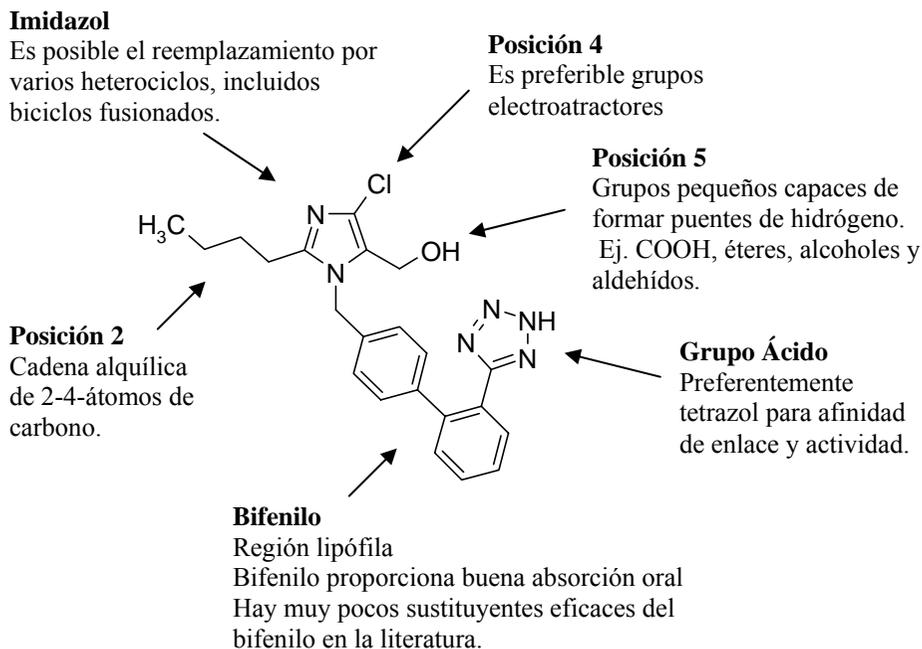


Figura 29. Relación estructura-actividad en losartán.

1. Una función ácida en la posición terminal es crítica para que la afinidad por el receptor sea buena. $-\text{COOH}$, $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{NH}-$, tetrazol, etc. Se ha observado pérdida de afinidad de enlace cuando esta función ácida es reemplazada por una función ácida débil ($-\text{OH}$), neutra ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$) o básica ($-\text{NH}_2$).

De todos los grupos ácidos examinados, en general el sustituyente tetrazol-5-ilo es el que proporciona la mejor combinación de afinidad de enlace a AT_1 y eficacia antihipertensiva oral.¹⁷¹ La sustitución por el ácido carboxílico resulta en general en una pérdida de potencia, y en algunos casos ausencia de actividad oral.

Los tetrazoles son comúnmente usados como isómeros de los ácidos carboxílicos,²⁰⁷ sin embargo en su estado ionizado la distribución de carga negativa del tetrazol sobre los cuatro átomos de nitrógeno está mucho más deslocalizada, por lo que interaccionará mejor con el centro

²⁰⁷ A. Korolkovas, *Essentials in Medicinal Chemistry 2nd Edn.*, Wiley-Interscience, 1988, p 81.

de carga positiva del receptor que el correspondiente ácido carboxílico. Además el grupo tetrazol ayuda a mantener la alineación apropiada del grupo bifenilo en disposición ortogonal (Figura 30).

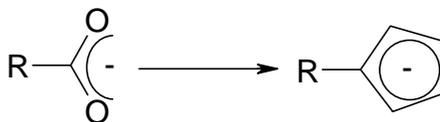


Figura 30

Cuando el anillo de tetrazol se metila (perdiendo el carácter ácido), ó se reemplaza por un buen grupo capaz de formar puentes de hidrógeno (amidas), causa aproximadamente una reducción en potencia de 1000 unidades de magnitud. De estos datos puede deducirse que la interacción con el receptor es iónica más que por puentes de hidrógeno.²⁰⁸

2. La localización de la función ácida terminal en el anillo aromático es muy importante. En la serie EXP 6155 debe estar en la posición *para* del anillo (Figura 31). Mientras que en la serie más extendida EXP 6159 y EXP 7711 debe estar en posición *orto*. El cambio de la función ácida a otras posiciones del anillo resulta en una pérdida de potencia. Esto indica que existe una orientación espacial preferente para esta función.

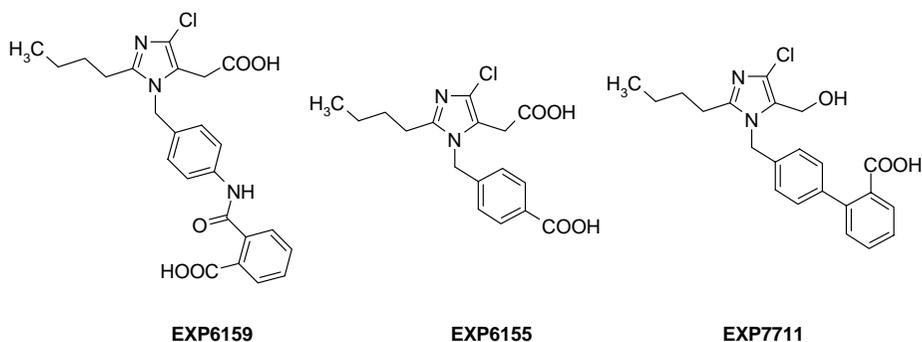


Figura 31

Si el anillo terminal en la serie EXP 6159 es reemplazado por una cadena alquílica menos rígida, la afinidad de enlace disminuye

²⁰⁸ P. R. Andrews, D. J. Craik, J. L. Martín, *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 1648.

porque el grupo ácido terminal ahora tiene más grados de libertad y esto disminuye la probabilidad de encontrar el centro de carga positiva que se supone está presente en el receptor.

Bovy y colaboradores²⁰⁹ prepararon un ácido 2',6'-dimetoxi-2-bifenilcarboxílico análogo a EXP 7711, el cual restringe el anillo de fenilo a una conformación ortogonal (conformación supuestamente activa). Este análogo restringido conformacionalmente es un orden de magnitud menos activo que el correspondiente compuesto no sustituido (EXP 7711). No está claro si la disminución de actividad se debe a una interacción desfavorable de los grupos metoxi con el receptor o a una conformación desfavorable del sistema de bifenilo debido a los sustituyentes en 2' y 6'.

3. La presencia de un sustituyente electroatractor y lipófilo en posición 4 del anillo de imidazol actúa como un modificador electrónico útil para ajustar el pK_a de esta unidad básica y así aumentar la absorción oral. Esto está ejemplificado por el sustituyente trifluorometilo y pentafluorometilo en la posición C4 de los potentes antagonistas de AT_1 EXP 3892 y DuP 532, respectivamente (Figura 32).

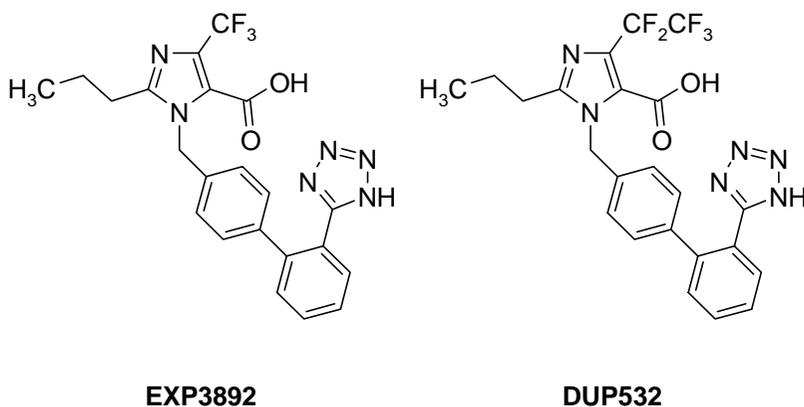


Figura 32

4. La segunda función ácida presente en S-8307 (cadena lateral de ácido acético en posición C5 del anillo de imidazol) es importante, pero no esencial (Figura 19). Puede ser reemplazado por una gran variedad de grupos funcionales que contengan en su estructura un heteroátomo

²⁰⁹ P. R. Bovy, J. T. Collins, G. M. Olins et al. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2410-4.

capaz de actuar como aceptor de enlace por puentes de hidrógeno (-CH₂OH, -CH₂OCH₃, -CH₂OCOCH₃, -CH₂CO₂CH₃, etc).

La introducción de una función neutra (amida) causa únicamente una pequeña disminución de la potencia, por eso parece improbable que el sustituyente en la posición C5 del imidazol participe únicamente en una interacción iónica con el receptor, si este fuera el caso, tal modificación produciría una caída en potencia más drástica, como se observó en modificaciones similares en la región del tetrazol.²¹⁰ Los cambios de potencia observados son más consistentes con una interacción de enlace por puentes de hidrógeno entre el sustituyente la posición C5 del imidazol y el receptor.

5. La longitud y complejidad de la cadena alquílica en la posición C2 del anillo de imidazol es importante, los compuestos se unen al receptor más efectivamente cuando la cadena alquílica es corta (2-5 átomos de carbono) y sin ramificaciones (Figura 33).

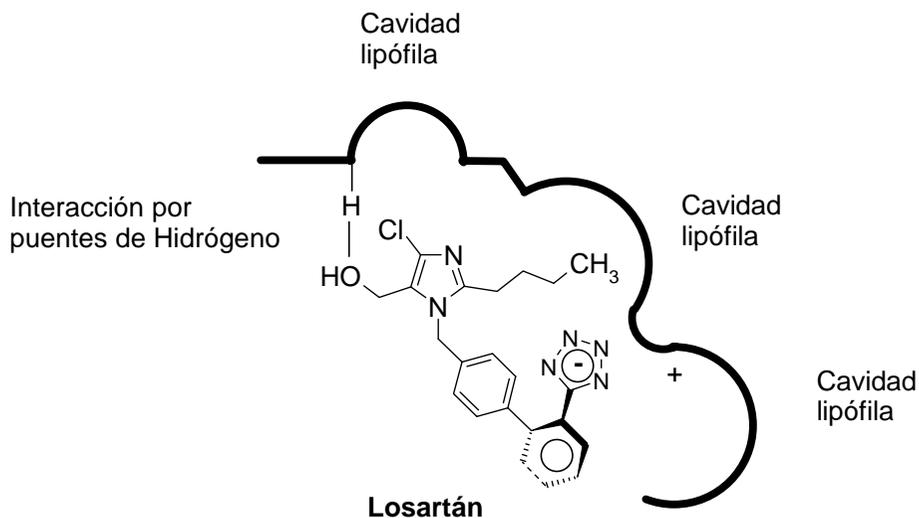


Figura 33

²¹⁰ D. Middlemiss, S. P. Watson. *Tetrahedron Report* 363, **1994**, 50(46), 13049-80.

2.6. EL ESTRÉS OXIDATIVO

2.6.1. Introducción

Se suele admitir que los primeros experimentos controlados que demostraron el efecto tóxico del oxígeno sobre los organismos animales fueron realizados por Paul Bert a finales del siglo pasado. Desde entonces, y a pesar de la gran acumulación de descripciones sobre los efectos nocivos del oxígeno a muchos niveles de observación, durante mucho tiempo se careció de teorías que pudiesen explicar su toxicidad. El primer mecanismo general propuesto consistió en suponer que el oxígeno inactivaba enzimas que presentaban grupos tiólicos esenciales en su forma reducida, -SH. Aunque este mecanismo está claro, hoy en día no puede explicar más que una pequeña parte de los procesos celulares alterados por el oxígeno. Sin embargo, uno de los principales sistemas protectores frente a este tipo de inactivación es el tripéptido glutation, una sustancia importante en la defensa frente a los radicales libres.²¹¹

En la naturaleza casi todo es oxidado por el oxígeno, las reacciones de óxido-reducción, como la fotosíntesis y el metabolismo aeróbico de eucariotas y muchos procariontes, son muy importantes, puesto que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de ellas. Pero este oxígeno que es imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada de radicales libres de oxígeno (RLO) que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc). Este proceso se denomina estrés oxidativo.

En la actualidad numerosas enfermedades han sido vinculadas a estrés oxidativo. Se tienen evidencias que permiten postular mecanismos a través de los cuales se produce, por ejemplo, la aterosclerosis. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes está asociado a la fisiopatología de aterosclerosis, cáncer, porfirias, cataratas, sobrecarga de hierro y cobre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y otras demencias, diabetes, malaria, artritis,

²¹¹ Scheele, C.W. (1977), *Chemische Abhandlung von der Luft und dem Feuer*. Uppsala and Leipzig. Section 2. En: Scheele, C.W. *"The collected papers of Carl Wilhelm Scheele"*. Bell and sons, London 1931 y Kraus Reprint Co. New York, 1971, pp. 85-178.

enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas y otras. Asimismo, el proceso biológico del envejecimiento se acelera en relación directa con la magnitud del estrés oxidativo.

Para evitar el exceso de radicales libres han aparecido una serie de defensas antioxidantes. Unas son endógenas, como las enzimas antioxidantes y el glutatión, y otras exógenas, como las vitaminas E y C, los carotenoides, y se pueden obtener de una dieta equilibrada.

2.6.2. Radicales Libres

Hoy sabemos que la mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que la utilización del oxígeno por las células da lugar a la generación de radicales libres. Un radical libre es una molécula o átomo que posee un electrón desapareado en su orbital más externo. La teoría de la toxicidad del oxígeno por radicales libres fue propuesta por primera vez por la investigadora argentina Rebeca Gershman en 1954.²¹²

La vía univalente de reducción del oxígeno (Figura 34) da lugar a tres formas incompletamente reducidas del oxígeno entre éste y el agua, el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, que no es un radical pero puede generarlos, y el radical hidroxilo.

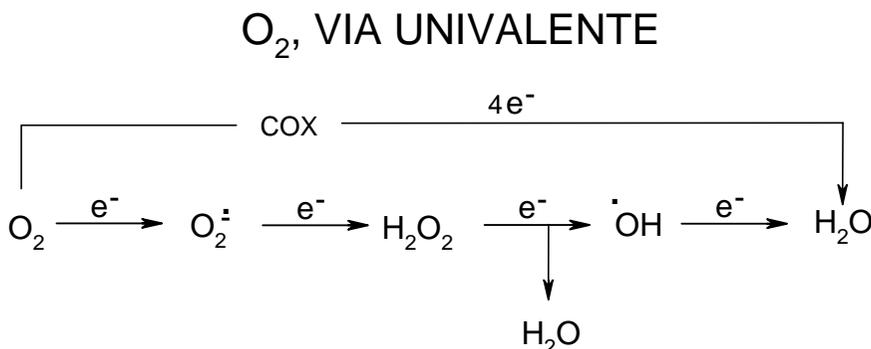


Figura 34. En la vía univalente de reducción del oxígeno se forman especies activas incompletamente reducidas por adición secuencial de electrones de uno en uno en el siguiente orden: radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). En cambio, la adición de cuatro electrones al oxígeno, como ocurre en la citocromo oxidasa mitocondrial (COX), permite su reducción a agua sin que se liberen radicales de oxígeno.

²¹² Gershman, R.; Gilbert, D.L.; Nye, S.W.; Dwyer, P.; Fenn, W.O. *Science* **1954**, 119, 623-626.

El radical superóxido carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas. Sin embargo, en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, la combinación del radical superóxido y del peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton o Haber-Weiss da lugar a radical hidroxilo (Figura 35).

HABER-WEISS, FENTON

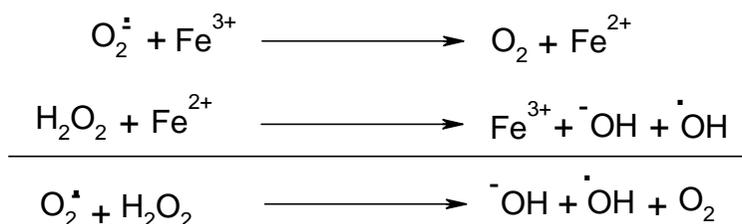


Figura 35. En la reacción de Haber-Weiss o de Fenton, el superóxido reduce el hierro férrico a ferroso, y éste se reduce monoeléctricamente al peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación del radical hidroxilo, altamente reactivo. El hierro no se consume en el proceso, actuando como catalizador del mismo. El cobre puede substituir al hierro oscilando entre las valencias +2 y +1.

La presencia de peróxido de hidrógeno en las células a concentraciones muy superiores a las del radical superóxido, convierte a aquel en una especie con gran capacidad de generar daño oxidativo a pesar de no ser un radical libre y es por ese motivo que se le clasifica dentro del grupo de reactivos biológicos llamados especies reactivas de oxígeno (EROs). El radical hidroxilo es considerado hoy el principal indicador del ataque a todo tipo de macromoléculas, aunque existen otros iniciadores propuestos, y es una de las especies más reactivas del organismo. Puede reaccionar inespecíficamente con casi cualquier molécula a 2-3 diámetros moleculares de su lugar de formación. Debido a su reactividad, su difusión a larga distancia está disminuida y sería el peróxido de hidrógeno el responsable del daño oxidativo entre fracciones subcelulares. Se ha demostrado generación de peróxido de hidrógeno y radical superóxido en casi todas las fracciones celulares. La presencia de metales de transición de la reacción de Fenton convierte al hierro y al cobre en agentes esenciales como catalizadores del daño oxidativo.

Por otra parte, si al oxígeno basal (forma triplete) se le suministra energía suficiente, sufre una inversión de espín, lo que le confiere una gran reactividad (forma singlete). Las reacciones oxidativas en las que interviene el oxígeno singlete se manifiestan por la emisión espontánea de quimioluminiscencia de baja intensidad en todo tipo de células.

2.6.2.1. Fuentes de radicales libres

En los tejidos sanos la fuente principal de radicales libres son las mitocondrias debido a que son las responsables del 80% de consumo del oxígeno celular y a que los radicales libres en los sistemas biológicos proceden, en último término, del metabolismo del oxígeno por vía univalente. De los cuatro complejos responsables del transporte electrónico en la cadena respiratoria, se ha observado producción de radicales libres en mitocondrias aisladas en el Complejo I y en el Complejo II.^{213,214} En el caso del Complejo I los generadores de radicales libres son los centros hierro-sulfurados, mientras que en el Complejo II pueden ser la semiquinona o el citocromo b.^{214,215,216} Entre las posibles consecuencias de la producción mitocondrial de radicales libres está el Parkinson,²¹⁶ el proceso de envejecimiento,²¹⁷ caracterizado por un acusado daño del ADN mitocondrial, lo que podría contribuir a la acumulación de deleciones y mutaciones encontradas en los tejidos post-mitóticos de este ADN en los individuos viejos.

La segunda fuente principal de radicales libres son los fagocitos del sistema inmune. Al encontrarse con un agente infeccioso, éstos experimentan un aumento acusado de consumo de oxígeno (estallido respiratorio) en la membrana plasmática donde el complejo enzimático NADPH oxidasa, se activa y produce radicales de oxígeno a partir de oxígeno basal. Estos RLs contribuyen de forma acusada a la destrucción o inactivación del agente infeccioso de modo directo. Aunque esto es útil para el organismo, en muchos procesos patológicos se produce infiltración secundaria de estas células del sistema inmune

²¹³ Turrens, J.F.; Boveris, A. *Biochem. J.* **1980**, *191*, 421-427.

²¹⁴ Boveris, A.; Cadenas, E.; Stoppani, O.M. *Biochem. J.* **1976**, *153*, 435-444.

²¹⁵ Herrero, A.; Barja, G. *Mech Ageing Dev* 1997 (buscar referencia esta en prensa)

²¹⁶ Shaspira, A.H.V. *Oxidative Stress and Aging*. Birkhäuser, *Basel*, **1995**, pp. 159-169.

²¹⁷ Harman, D. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1972**, *20*, 145-147.

en los órganos afectados. Así, se ha propuesto que el daño oxidativo durante la hiperóxía, el síndrome de isquemia-reperfusión, el ejercicio, la endotoxina en el choque séptico, la esclerosis múltiple, el humo del tabaco o las fibras de asbestos, puede deberse a la producción excesiva de RLs por células fagocíticas. Además, la inflamación crónica está asociada con muchos tipos de cánceres, lo que podría deberse al daño prolongado por células fagocíticas en el material genético del tejido inflamado.²¹⁸

De todos modos, cuando los niveles de RLs se controlan adecuadamente, estos también intervienen en procesos útiles para el individuo como la defensa frente a la infección, la destoxicación de xenobióticos, la reducción de ribonucleósidos, las acciones de hidrolasas y dioxigenasas, la carboxilación del glutámico o la señalización celular por óxido nítrico (un radical libre).

2.6.2.2 Peroxidación lipídica

Todo proceso de peroxidación de macromoléculas ocurre en tres etapas bien definidas: iniciación, propagación y terminación. En la peroxidación lipídica la iniciación consiste en la extracción de un electrón de un átomo de carbono contiguo a un doble enlace por parte de un iniciador como el radical hidroxilo (Figura 36).

²¹⁸ Ames, B.N.; Shigenaga, M.K. DNA and Free Radicals. Ellis Horwood, Chichester, England, **1993**, pp. 1-15.

PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

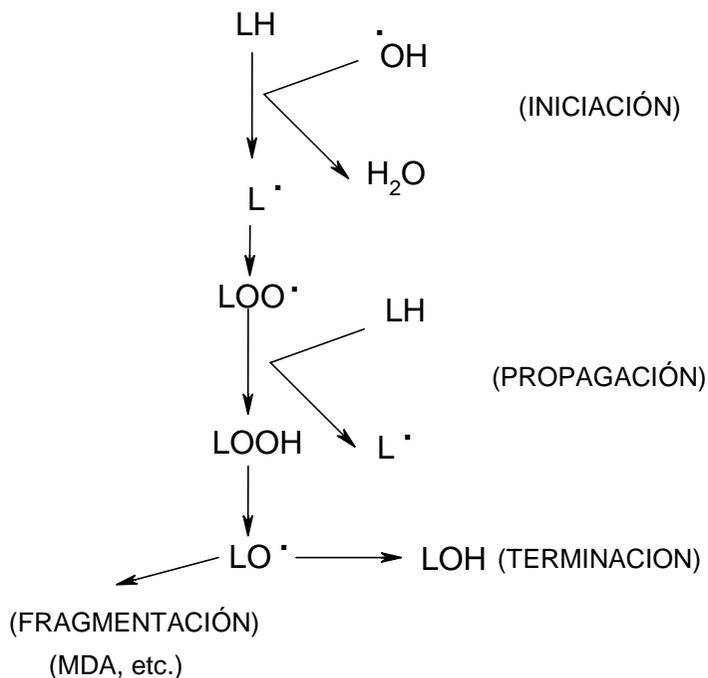


Figura 36. Esquema resumen de las reacciones principales de la peroxidación lipídica. LH = lípido inactivo; LO = radical lipídico alquilo; LOO = radical lipídico peroxilo; LOOH = hidroperóxido lipídico; LO = radical lipídico alcoxil; LOH = Hidróxido lipídico (estable).

Los ácidos grasos poliinsaturados son los más sensibles al ataque por radicales libres debido a la posesión de dobles enlaces. Se forma así un radical alquilo ($\text{L}\cdot$) que se convierte en peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) por adición de oxígeno y que en varias reacciones, como su reducción a hidroperóxido (LOOH), puede dar lugar a la propagación de la peroxidación al generar otro radical alquilo ($\text{L}\cdot$) en el ácido graso contiguo de la membrana. La propagación explica que una sola iniciación pueda dañar un gran número de moléculas. La reacción se termina por la reacción de radicales contiguos, dando lugar a puentes cruzados (L-L), o mediante la fragmentación del ácido graso en gran número de productos como el malondialdehído (el marcador más ampliamente utilizado), el 4-hidroxinonenal o alcanos que aparecen en el aire suspirado (base del único método de medida no invasivo).²¹⁹

²¹⁹ Porter, N.A.; Cldwell, S.E.; Mills, K.A. *Lipids* **1995**, 30, 277-290.

El hierro es un estimulador de la peroxidación lipídica, pudiendo participar en las reacciones de iniciación o propagación. Se estimula mediante concentraciones bajas de un reductor como ascorbato (peroxidación no enzimática), o tiene lugar con la participación de NADPH como reductor y de cadenas de transporte electrónico como la microsomal (peroxidación enzimática). También puede ser estimulada por el oxígeno singlete, ozono o radicales halógeno. *In vivo*, la medida de hidroperóxidos de fosfolípidos se ha realizado por detección quimioluminiscente post-columna tras separación mediante HPLC.^{220,221}

2.6.2.3 Daño oxidativo a proteínas

Las proteínas pueden ser atacadas incluso a nivel de estructura primaria. Muchos estudios han dado lugar a la conclusión de que el peróxido de hidrógeno y las formas reducidas del hierro y el cobre, generados por oxidasas de función mixta, interaccionan en los sitios de unión de estos metales a las proteínas, produciendo RLs que oxidan inmediatamente a los residuos de aminoácidos vecinos. Este proceso se considera específico del sitio de unión del metal. Los aminoácidos más sensibles al daño oxidativo son His, Pro, Arg, Lys y Cys. Como consecuencia se forman grupos carbonilo o se producen conversiones de unos aminoácidos en otros. La medida del daño oxidativo en muestras biológicas se suele realizar mediante la valoración de grupos carbonilo por barrido espectrofotométrico o mediante isótopos.

2.6.2.4 Daño oxidativo al ADN

Los RLs reaccionan con los componentes del ADN mediante adición o abstracción. En presencia de oxígeno, se forman radicales peroxilo por adición del mismo a las bases o al azúcar del ADN. Las reacciones posteriores de los radicales formados en el ADN dan lugar a más de una veintena de productos. También se forman puentes cruzados ADN-proteína. Según los estudios liderados por Bruce Ames,²²² el daño oxidativo al ADN y la mitogénesis son dos causas importantes del cáncer.

²²⁰ Miyazawa, T.; Fujimoto, K.; Suzuki, T.; Yasuda, K. *Methods in Enzymol* **1994**, *233C*, 324-332.

²²¹ Cadenas, S.; Lertsiri, S.; Otsuka, M.; Barja, G.; Miyazawa, T. *Free. Rad. Res.* **1996**, *26*, 485-493.

²²² Ames, B.N.; Shigenaga, M.K. DNA and Free Radicals. Ellis Horwood, Chichester, England, **1993**, pp. 1-15.

En el caso del ADN nuclear se cree que el hierro juega un papel importante en el daño oxidativo, al ser uno de los contraiones de la macromolécula. Si el peróxido de hidrógeno llega al núcleo, reacciona con el hierro ferroso, generando radical hidroxilo que ataca en ese mismo lugar al azúcar o la base, produciendo roturas de la hebra y modificaciones en las bases. Estas lesiones pueden dar lugar a mutaciones y a fenómenos carcinogénicos.

El daño oxidativo al ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear.²²³ Esto se debe, sobre todo, a la cercanía de dicho ADN al lugar principal de generación de RLs en la célula sana, la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Además, carece de histonas y poliaminas que puedan protegerlo y su capacidad de reparación es mínima en relación con la del ADN nuclear. Como consecuencia, las deleciones y mutaciones son mucho más frecuentes.

De todas formas, la mayor parte de los genes se encuentran en el núcleo, no en la mitocondria. El problema actual es la falta de conocimiento acerca del mecanismo por el cual el daño oxidativo se transmite desde las mitocondrias hasta el núcleo. En cualquier caso, se sabe que en la membrana nuclear existe también una cadena de transporte electrónico de función fisiológica incierta que también genera RLs, aunque de modo mucho menos intenso que en las mitocondrias.

2.6.2.5 Estrés oxidativo: métodos de medida

El estrés oxidativo es un proceso de daño celular desencadenado por radicales libres, principalmente de oxígeno, que puede afectar uno o varios componentes de la célula (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos), lo cual altera seriamente sus funciones.^{224,225} El concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas que da lugar a un aumento en la concentración celular de los radicales libres y que pueden desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular.²²⁶

²²³ Richter, Ch.; Park, J.W.; Ames, B.N. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 6465-6467.

²²⁴ Kalra, J.; Martha, S.; Prasad, K. *Lab. Med. Int.* **1994**, *11(2)*, 16-21.

²²⁵ Ferreira, R.; *Estrés oxidativo y antioxidantes*. Buenos Aires: Bagó; **1998**.

²²⁶ Guerra, J.; *An. Med. Interna (Madrid) [online]*. **2001**, *18*, p.50-59.

En la actualidad no hay métodos estandarizados para medir el estatus de estrés oxidativo en humanos. Es decir ninguno de los llamados biomarcadores del estrés oxidativo (BOSS) consiguen de forma aislada una valoración precisa y definitiva del estrés oxidativo que pueda ser directamente aplicado a la clínica humana. El daño mediado por radicales libres incluye modificación oxidativa de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La peroxidación lipídica es un proceso mediado por radicales libres que conduce a la formación de peróxidos lipídicos en las membranas celulares y es detectada a través de la estimación de malonodialdehído, bien sea por luz ultravioleta, cromatografía líquida de alta eficacia o por el ácido tiobarbitúrico. La detección directa de radicales libres se realiza por espectroscopía (ESR), aunque con esta prueba no es posible detectar concentraciones bajas de los mismos.

Otros métodos para evaluar el estrés oxidativo incluyen: la determinación de dienos conjugados, la medición de gases como etanos, pentano e isopropano en el aire exhalado, la mediciones de la relación redox y del contenido y actividad de antioxidantes endógenos y cuantificación de hidroperóxidos lipídicos. El daño mediado por los radicales libres es posible, que cuando se disponga de métodos más precisos para la medición del estrés oxidativo, éste se podrá utilizar en la práctica clínica como un factor de riesgo para determinadas patologías.

2.6.3. Antioxidantes

El hecho de que siempre exista un cierto nivel de daño oxidativo supone que una fracción de los RLs generados en el organismo son capaces de alcanzar sus dianas moleculares antes de que puedan ser eliminados por mecanismos antioxidantes. Sin embargo, la mayor parte de los radicales libres son eliminados mediante antioxidantes. Los antioxidantes son aquellas sustancias presentes a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas) que retarda o previene su oxidación. El antioxidante, al chocar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico.

De hecho, el mantenimiento de la homeostasis redox del tejido sólo es posible mediante un equilibrio entre la intensidad de generación y la intensidad de eliminación de RLs. Así, cuando aumenta la producción de RLs, debido a causas exógenas, o endógenas como puede ocurrir en

el ejercicio o el hipermetabolismo, se puede dar una regulación compensadora a la alza en las defensas antioxidantes. Cuando este equilibrio entre generación y destrucción de RLs se altera, la célula entra en un proceso degradativo patológico.

Existen diversos sistemas antioxidantes celulares:

Superóxido dismutasas

Las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas que eliminan el radical superóxido. Durante la reacción una molécula de superóxido se oxida hasta O_2 , mientras la otra se reduce a H_2O_2 . Por tanto, más que eliminar formas activas de oxígeno, esta enzima transforma una en otra. En animales existen en dos formas: la SOD Cu-Zn que abunda en el citoplasma, y la SOD Mn, que abunda en las mitocondrias.

Catalasas

La catalasas catalizan dos tipos de reacciones. En la reacción catalítica se produce la dismutación de dos moléculas de H_2O_2 en dos moléculas de H_2O . En la reacción peroxidativa se utiliza un sustrato inespecífico como reductor para transformar una sola molécula de H_2O_2 en dos de H_2O . Es decir, en este caso la enzima actúa como una peroxidasa. La enzima tiene una K_M y una V_{max} muy altas por el H_2O_2 , lo que la convierte en principio en más adecuada para eliminar el H_2O_2 celular cuando su concentración sube mucho. Se encuentra en el citosol.

Glutation peroxidasa

Las glutatión peroxidasas (GPx) eliminan hidroperóxidos, tanto orgánicos (ROOH) como inorgánicos (H_2O_2), utilizando glutatión reducido (GSH) como reductor. Está presente tanto en el citosol como en las mitocondrias. No pueden trabajar en la fracción lipídica, por lo que eliminarían los ROOH lipídicos, reduciéndoles a sus formas estables (ROH), sólo tras la liberación previa del ácido graso peroxidado desde la membrana al citosol por parte de las fosfolipasas.

Glutation reductasas

Las glutatión reductasas reducen una molécula de glutatión oxidado (GSSG) a dos de GSH a expensas de equivalentes de reducción en

forma de NADPH. Presentan flavina adenina dinucleótido (FAD) como coenzima. Están presentes en el citosol y las mitocondrias.

Regulación génica de enzimas antioxidantes

Las concentraciones de enzimas antioxidantes en las células están sujetas a regulación génica, de forma que aumentan rápidamente en respuesta a factores de transcripción que detectan cambios en el nivel de estrés oxidativo.²²⁷

Ascorbato

Los antioxidantes de bajo peso molecular son también muy importantes para la homeostasis redox. El ascorbato puede existir en tres estados redox: ascorbato (reducido), radical semidehidroascorbato (AFR) y dehidroascorbato (DHA). Puede eliminar radical superóxido, radical hidroxilo o el H_2O_2 , y también extinguir O_2 singlete.²²⁸ Según algunos autores, el carácter preventivo ampliamente aceptado de las dietas ricas en frutas y verduras frente a muchos cánceres podría deberse a su alto contenido en antioxidantes como el ascorbato.

Glutathion

Se trata de un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina que constituye el principal tiol no proteico celular. Su actividad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiólico de la cisteína. Puede actuar como antioxidante en reacciones enzimáticas (como la de la GPx) o no enzimáticas. Protege a la oxidación de los grupos $-SH$ esenciales de las proteínas. También puede reaccionar con RLs como el superóxido o el hidroxilo. Al reaccionar con oxidantes el GSH se oxida a GSSG, que es muy tóxico para las células, por lo que éstas tienden a mantener una relación GSSG/GSH hepática enormemente baja, mediante la reducción del GSSH a GSH con la glutatión reductasa o exportándolo activamente al exterior celular. También se ha descrito la capacidad del GSH para realizar reacciones de extinción del O_2 singlete, devolviéndolo a su estado basal no reactivo (triplete).

²²⁷ Harris, E.D. *FASEB J.* **1992**, 6, 2675-2683.

²²⁸ Sies, H.; Stahl, W. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1992**, 669, 7-20.

Vitamina E

En la naturaleza existen ocho sustancias con actividad de vitamina E, el d- α , d- β , d- γ , y el d- δ -tocoferol y los correspondientes tocotrienoles. De ellos, el α -tocoferol es el que muestra más actividad biológica. La vitamina E suele ser el principal antioxidante de las membranas en las células animales. Su actividad antioxidante se debe al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol. Su solubilidad en la membrana le permite la accesibilidad directa a radicales peroxilo (ROO \cdot) que serían reducidos a hidroperóxidos, los cuales serían entonces degradados hasta alcoholes por la GPx). Esta reacción impide que los radicales peroxilo oxiden otra sustancia orgánica, es decir, impide la reacción de propagación, que es la principal causante de la peroxidación lipídica. De otra manera, también es posible la reacción con los radicales alcoxilo (RO \cdot), lo que podría ser de utilidad en caso de que la reacción anterior no fuera eficiente. En ambos casos, la vitamina E se convierte en radical tocoferilo (VitEO \cdot), pero el sistema sólo es funcional si la forma reducida de la vitamina E (VitEOH) se regenera a la misma velocidad con la que se degrada. Se ha propuesto que este papel regenerador podría correr a cargo del ascorbato, ocurriendo la interacción en la interfase citosol-membrana.

La vitamina E es especialmente importante en orgánulos, tejidos y dietas que contienen niveles relativamente altos de ácidos grasos poliinsaturados, para evitar su degradación oxidativa.

Carotenoides

Junto con la vitamina E, los carotenoides son los antioxidantes principales de las membranas biológicas. Tiene una gran capacidad para dar lugar a reacciones de extinción de O $_2$ singlete y también pueden reaccionar con RLs. Aparecen en cantidades apreciables en los tejidos y en el plasma. Los más importantes son el α - y β -caroteno, la luteína, el licopeno, la zeaxantina y la criptoxantina. El β -caroteno y los tocoferoles se protegen mutuamente frente a la pérdida por oxidación y muestran efectos sinérgicos en microsomas.^{229,230}

²²⁹ Palozza, P.; Krinsky, N.I. *Free Rad. Biol. Med.* **1991**, *11*, 407-414.

²³⁰ Palozza, P.; Krinsky, N.I. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *297*, 184-187.

Otros antioxidantes

Existen otras muchas sustancias con capacidad antioxidante que pueden producirse en el organismo o provenir de la dieta, como el ácido úrico, la bilirrubina, la transferrina, la ferritina, los quelantes de iones metálicos, proteínas con actividad ferroxidasa, polifenoles, flavonoides, amins aromáticos o el ácido lipóico. Entre los antioxidantes fenólicos potentes presentes en el mundo vegetal se encuentran la curcumina, las catequinas, la quercetina, el kaempferol o el ácido caféico. La ubiquinona (coenzima Q) se ha mostrado que actúa como antioxidante.²³¹

Para que una sustancia sea un antioxidante *in vivo*, la reacción debe darse a las concentraciones que ocurren en los tejidos y el líquido extracelular. Eso se cumple en el caso de los antioxidantes endógenos.

Existe un gran número de antioxidantes sintéticos. Algunos de ellos que cabe mencionar son: N-acetilcisteína, ésteres de GSH, probucol, nitecapona, penicilamina, aminosalicilatos, nitróxidos o el tamoxifeno.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos encontrados en las plantas como frutas y vegetales, que son excelentes antioxidantes. Comúnmente se encuentran también en el té, principalmente té verde, en el vino y en las frutas que fueron cosechadas hasta su maduración se encuentran gran cantidad de flavonoides, carotenoides, licopenes, todos con una potente acción antioxidante.

En el caso de los antioxidantes sintéticos de tipo bifenol la acción se realiza sobre el radical libre obteniendo la quinona correspondiente neutralizando el radical (Figura 37).²³² Estudios computacionales indican que el bifenol adopta una geometría *cisoid* con los dos anillos aromáticos formando un ángulo dihedro de 50° donde los dos grupos OH están estabilizados entre ellos a través de enlaces intramoleculares. Al unirse un radical, los grupos OH se estabilizan por un único enlace intramolecular. Este enlace intramolecular, junto con el efecto electrónico desfavorable de los sustituyentes de la ciclohexadiona, hace que el segundo OH fenólico

²³¹ Kanno, T.; Utsumi, T.; Takehara, Y.; Ide, A.; Akiyama, J.; Yoshioka, T.; Horton, A.; Utsumi, K. *Rad. Biol. Med.* **1996**, *24*, 281-289.

²³² Amorati, R.; Lucarini, M.; Mugnaini, V.; Pedulli, G.F. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5198-5204.

sea mucho menos reactivo que el primero. Al unirse el segundo radical se forman dos quinonas neutralizando el radical.

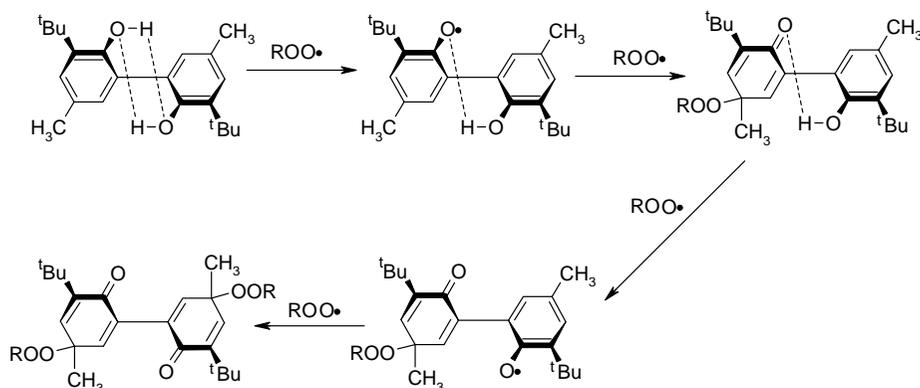


Figura 37. Antioxidante bifenoxy neutralizando un radical libre.

La contaminación atmosférica, el humo del tabaco, los herbicidas, pesticidas o ciertas grasas son algunos ejemplos de elementos que generan radicales libres que ingerimos o inhalamos. Este exceso no puede ya ser eliminado por el cuerpo y, en su labor de captación de electrones, los radicales libres dañan las membranas de nuestras células, llegando finalmente a destruir y mutar su información genética, facilitando así el camino para que se desarrollen diversos tipos de enfermedades.

2.6.4. Enfermedades vinculadas al estrés oxidativo

2.6.4.1. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica: (EPOC)

La EPOC es un término que se utiliza ampliamente para definir varios trastornos específicos con manifestaciones clínicas, alteraciones anatomopatológicas, necesidades patológicas, necesidades terapéuticas y pronósticos diferentes. Todas las formas de EPOC tienen una estrecha relación fisiopatológica con el tabaquismo.^{233,234}

Muchas de las sustancias que se liberan durante la combustión del cigarro son potentes oxidantes químicos, ya que producen, tanto estas, como sus derivados, irritación a nivel del parénquima pulmonar y

²³³ Matthay, R.; Arroliga, A. *Tratado de Medicina Interna. 20 ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 2001*, 433-42.

²³⁴ Finkelstein, R.; Fraser, R.; Ghezzi, H.; Cosío, M. *EPOC, 2002, 1(2)*, 27-8.

estimulan la quimiotaxis, lo cual aumenta la afluencia de polimorfonucleares y macrófagos a dicho tejido, facilitan la activación y la adherencia de dichas células al endotelio vascular, las cuales producen grandes cantidades de radicales superóxido y de enzimas proteolíticas como la elastasa, o de gran poder oxidativo como la mieloperoxidasa.²³⁵

2.6.4.2. Estrés Oxidativo y Enfermedad Cardiovascular

Insuficiencia cardíaca

Hay evidencias que indican que el estrés oxidativo está aumentado, tanto sistémicamente como en el miocardio en pacientes con insuficiencia cardíaca (IC). Esto puede ser debido a disminución de la capacidad antioxidante o a un aumento de las EROs, lo cual puede ser consecuencia de una sobrecarga mecánica sobre el miocardio o la estimulación de citoquinas inflamatorias. Los pacientes con insuficiencia cardíaca tienen valores elevados de malondialdehído, lo cual es compatible con el aumento de la peroxidación lipídica por radicales libres, se han hallado evidencias de actividad insuficientes de la catalasa en corazones insuficientes y creciente evidencia de que la apoptosis está incrementada en la IC, la causa de la apoptosis o muerte celular programada, es desconocida, pero se cree que un aumento del estrés oxidativo puede contribuir a ello, las ERO pueden inducir daño al ADN con la consiguiente apoptosis.²³⁶

Hipertensión arterial

En la HTA se ha encontrado aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así como un aumento en la cantidad total de lípidos y una disminución de la capacidad antioxidante. La HTA predispone a acelerar la aterosclerosis, al menos en parte a causa de la sinergia entre elevación de presión sanguínea y otros estímulos aterogénicos que inducen estrés oxidativo en los vasos arteriales.

²³⁵ Fernández, J.; Delgado, A.; García, R.; Brown, C.; León, O. www.bvs.sld.cu/revistas/med/vol41_5_02/med01502.htm

²³⁶ Marin, A.; Marin, M.; Marin, E. www.svmi.org.ve/revistas/v19-n1/vol19n1.htm

Ateroesclerosis

La formación de la placa arteriosclerótica se inicia con la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos que se transforman así en células espumosas. Estas células son captadas por el endotelio mediante moléculas de adhesión y se acumulan en el espacio subendotelial, donde inducen la migración de células musculares, su proliferación e hipertrofia. En determinadas condiciones oxidativas las lipoproteínas se fragmentan y alteran determinados residuos de aminoácidos de la apoproteína de la LDL. Estas LDL oxidadas o productos liberados de ellas, van a tener mayor poder aterogénico ya que son captadas más ávidamente por los macrófagos, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de factores vasoactivos, de adhesión, trombóticos y de proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión ateroesclerótica. Se ha demostrado una estrecha relación entre RLO y lipoproteínas de baja densidad (LDL) y se sabe que su aumento tiene un conocido valor para la predicción directa en la aparición de ateroesclerosis.

Síndrome de isquemia-reperfusión

Los RLs tienen también una formación acusada durante el síndrome de isquemia-reperfusión. La isquemia cerebral y de miocardio es la principal causa de muerte en las sociedades avanzadas. El daño irreversible durante la isquemia se debe fundamentalmente a la falta de oxígeno que da lugar, entre otras cosas, a acumulación de hipoxantina. La reperfusión a tiempo es esencial para evitar la necrosis tisular. Sin embargo, durante la reperfusión se produce un daño adicional debido a la producción de radicales de oxígeno. Durante la isquemia la enzima xantina deshidrogenasa se convierte a la forma xantina oxidasa. Al llegar la reoxigenación, se produce la conversión de hipoxantina en xantina y ácido úrico. Los electrones liberados por la hipoxantina no pasan al NAD como ocurre con la forma deshidrogenasa de la enzima, ya que la forma oxidasa los cede al oxígeno molecular, formando RLs.²³⁷ Otro mecanismo alternativo es el aumento del grado de reducción de los transportadores de electrones de la cadena mitocondrial durante la isquemia. Al aparecer súbitamente el oxígeno durante la reperfusión, dichos electrones son fácilmente cedidos al mismo a partir de dicha cadena, aumentando de forma acusada la

²³⁷ McCord, J. *Fed. Proc.* **1987**, *46*, 2402-2406.

generación de RLs. Se ha propuesto también la intervención de los fagocitos. Los RLs están implicados en la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, lo que es esencial para su fagocitosis por los macrófagos que los convierte en células espumosas, las cuales intervienen en la formación de la placa arteriosclerótica, un proceso básico que estimula la aparición de las enfermedades cardiovasculares.

Existen complejos mecanismos que intervienen en las lesiones isquémicas y de reperfusión miocárdica. Interaccionan muchos tipos de tejidos como: células endoteliales coronarias, células sanguíneas circulantes y los miocitos cardiacos, los cuales son capaces de generar EROs, estos tienen el potencial de lesionar las células vasculares y los miocitos y pueden iniciar una serie de reacciones químicas y alteraciones genéticas que al final terminan en una amplificación de la citotoxicidad y disfunción del cardiomiocito.²³⁶

2.6.4.3. Cáncer

Se ha sugerido la implicación de los RL en el desarrollo tumoral. El humo del tabaco, en el que se encuentran RL en abundancia, es el causante del cáncer de pulmón (además de la nicotina y del alquitrán), que atacan los tejidos y destruyen las sustancias protectoras presentes en ellos. Existen óxidos radicalarios de nitrógeno que forman con las proteínas carcinógenos como las nitrosaminas. Los RL estimulan el crecimiento de las células musculares lisas, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en la neovascularización tumoral o angiogénesis. Se han detectado niveles disminuidos de enzimas antioxidantes en diversos tipos de células tumorales, así como alteraciones en el estado de los tioles celulares.²³⁸

2.6.4.4. Enfermedad de Parkinson, de Alzheimer y otras demencias

El estrés oxidativo se da tanto en la enfermedad de Parkinson (EP) como en la Alzheimer (EA), dos procesos degenerativos asociados a la edad que pueden llegar a coexistir en un mismo paciente. Ambos trastornos afectan a los ganglios basales, por lo que aparecen alteraciones motoras (Parkinson) y afectación del hipocampo y la corteza cerebral, por lo que también pueden presentarse alteraciones cognitivas (Alzheimer). Dentro del cerebro existen dos grandes poblaciones de células: las neuronas, que constituyen la unidad

²³⁸ Hazen, S. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 28, 1683-1684.

anatómica y funcional, y los astrocitos que tienen un papel metabólico. Éstas últimas, proporcionan a las neuronas substratos para la generación de energía, poseen enzimas antioxidantes, fabrican factores neurotróficos y controlan el medio en que se desenvuelven éstas. La función de los astrocitos también es de protección, ya que separa una zona dañada del cerebro del resto para que la lesión no se extienda. Tanto en la EP como en la EA se han encontrado alteraciones neuroquímicas que sugieren claramente la existencia de estrés oxidativo. Éste, se convierte en la vía final de la muerte neuronal, aunque la degeneración neuronal final se manifieste de forma diferente en una y otra enfermedad. Algunos autores proponen un modelo molecular unificado, con base en estudios *in vitro* e *in situ*. Proponen un modelo molecular unificado de estrés oxidativo en EA y EP, inducido por los estímulos tóxicos, la dopamina (DA), la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), la 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT), la 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT), el beta-amiloide 25-35 (A β 25-35) y los metales (hierro [Fe²⁺], cobre [Cu²⁺], zinc [Zn²⁺], manganeso [Mn²⁺]) como posible explicación a la pérdida neuronal en algunos casos mixtos con EA/EP. Esta hipótesis podría contribuir a una mejor comprensión de las cascadas fisiopatológicas en ambos desórdenes y valida la idea de que el estrés oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) representa una vía fundamental de señalización de muerte celular.²³⁹

2.6.4.5. Cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica

Se ha propuesto la intervención de mediadores vasoactivos en la fisiopatología de estas enfermedades. Uno de estos mediadores puede ser el 8-iso-PGF2a, un producto de la peroxidación lipídica por los RLO, que ha demostrado elevar la presión portal en ratas cirróticas. De esta forma, la cirrosis, la peroxidación lipídica secundaria al daño hepático por alcohol, la sepsis u otras enfermedades hepáticas están relacionadas, al menos en parte, con el estrés oxidativo causado por la producción de RLO y por un descenso de los antioxidantes.

²³⁹ Jimenez del Rio, M. *Modelo Molecular Unificado de estres oxidativo en las enfermedades de alzheimer y parkinson*.SICC Salud En: www.siicsalud.com/dato/dat038/04601011.htm.

2.6.4.6. Insuficiencia renal aguda (IRA), crónica (IRC) y diálisis

El daño tubular por isquemia/reperfusión está, al menos en parte, ocasionado por el aumento del estrés oxidativo en la IRA. Los RLO producen la activación de la enzima xantina-oxidasa y de los neutrófilos, mecanismos importantes del daño renal por isquemia/reperfusión. El NO (óxido nítrico) parece aumentar en la fase isquémica y los RLO en la de reperfusión, por lo que el balance NO/RLO condicionará la magnitud del daño, así como los dadores de NO tendrán un potencial papel citoprotector frente a la acción de los RLO.

En las nefritis por formación de inmunocomplejos, se estimula a los leucocitos polimorfonucleares y a los macrófagos a producir radicales aniones superóxido. Los RLO van a jugar un importante papel en el desarrollo del daño renal y en la formación de la proteinuria. La pérdida de nefronas conduce a una mayor producción de RLO. El aumento de la peroxidación de lípidos de la membrana de los glóbulos rojos está consistentemente documentada en pacientes con IRC, lo cual es un reflejo del aumento del estrés oxidativo por los RLO.

Los pacientes en hemodiálisis por IRC tienen un aumento del estrés oxidativo por una inadecuada eliminación de los RLO continuamente generados. El contacto entre la membrana dializadora, los componentes séricos y los polimorfonucleares produce ciquitonas y RLO. Esta situación lleva a la peroxidación lipídica, una desnaturalización de proteínas, daño de las células endoteliales y a un continuo estrés oxidativo.

La nefrotoxicidad de algunos fármacos habitualmente utilizados, como la gentamicina, daunorubicina y ciclosporina y la de otros compuestos como el mercurio, parece mediado por un aumento del estrés oxidativo.

Parece demostrado que las profundas alteraciones en el sistema redox extracelular que ocurren en la IRC y en la hemodiálisis pueden ser una explicación adecuada para las complicaciones cardiovasculares de estos pacientes.

2.6.4.7. Diabetes mellitus

Los altos niveles de glucosa característicos de la diabetes inducirían la glicosilación no enzimática de proteínas. Esta glicosilación no enzimática altera la estructura y la función de las proteínas. Es sabido que la autoxidación de azúcares genera especies de RLO. A concentraciones altas de glucosa, típicas de estados diabéticos, la producción de RLO se incrementa en presencia de metales de transición. Pero el aumento de estrés oxidativo descrito en los diabéticos, no está únicamente relacionado con la aceleración en la producción de RLO, sino también por la disminución de antioxidantes. La vía del poliol es un posible mecanismo por el que la hiperglucemia puede alterar la función y la estructura de las células afectadas por las complicaciones diabéticas. La activación de la vía del poliol disminuiría el NADPH y los niveles de glutatión, aumentando de esta manera el estrés oxidativo.

2.6.5. Terapias antioxidantes

Las terapias antioxidantes y dietas ricas o enriquecidas en antioxidantes, parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo, pese a estudios con resultados positivos también existen otro grupo de ellos en que la intervención a base de antioxidantes no ha resultado eficaz.

Estos resultados contradictorios se pueden deber a múltiples causas: inicio precoz o tardío de la intervención, intervenciones poblacionales o en grupos reducidos con riesgo aumentado, mezcla de intervenciones profilácticas con curativas así como prevención primaria y secundaria de diversas enfermedades, dosis insuficientes, utilización de un solo antioxidante o una combinación de dos o más, evaluación con parámetros concretos de laboratorio, con variables biológicas o clínicas, estudios experimentales sobre tejidos concretos, animales o humanos, etc. Actualmente, todos los autores coinciden en destacar la necesidad de grandes estudios clínicos para aclarar el papel de los antioxidantes en la salud humana.^{240, 241}

²⁴⁰ Nagao, N.; Nakayama, T.; Etoh, T.; Saiki, I.; Miwa, N. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* **2000**, *126*, 511-518.

²⁴¹ De las Heras, G.; García de la Paz, A.; Fernández, M.; Fernández, J. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **2000**, *92*, 375-385.

3. Discusión de resultados.

3.1. Introducción

El desarrollo de antagonistas de receptores AT₁ de naturaleza no peptídica ha sido objeto de considerable interés en los últimos años. Varios grupos de investigación han trabajado en este campo en el intento de obtener compuestos con mayor afinidad de enlace *in vitro* y mejor actividad antihipertensiva oral *in vivo*. Así, se han desarrollado fármacos como losartán **1**, irbesartán, valsartán y candesartán, cuyas analogías se ponen de manifiesto en la estructura bifenílica y en el anillo de tetrazol, o como el talmisartán y el eprosartán donde el tetrazol es sustituido por un grupo ácido carboxílico (Figura 1).

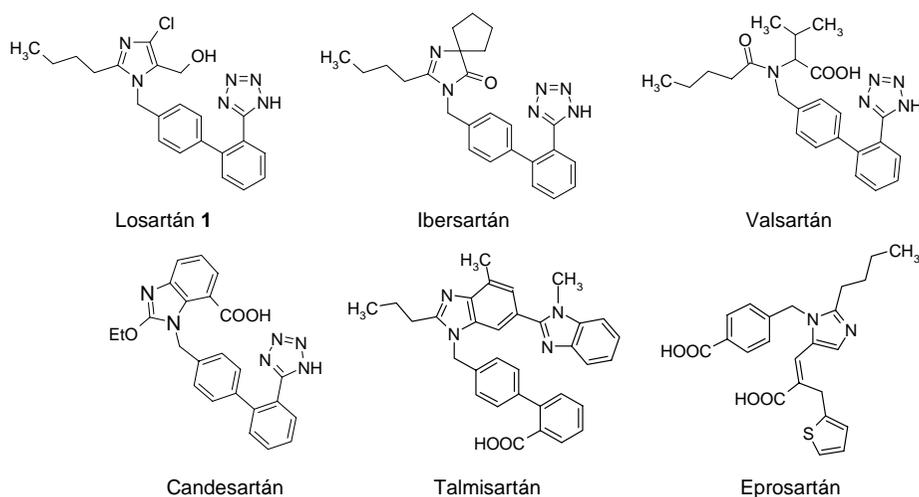


Figura 1. Receptores de AT₁ no peptídicos

El losartán **1** fue el primer antihipertensivo aprobado perteneciente a la clase de antagonistas del receptor de angiotensina II. Fue descubierto en 1986 por la compañía The DuPont Merck Pharmaceutical Company que lo lanzó al mercado en Suecia en 1994. Sus áreas de aplicación terapéutica incluyen la hipertensión, la ansiedad, el infarto y el fallo cardiaco, entre otras. Se formula como sal potásica o con hidroclorotiazida. Algunas marcas registradas son Cozar, Avasta, Hyzaa y Losacor D. Actualmente existen derivados en

el mercado con perfil farmacológico mejorado pertenecientes a la familia de sartanes (Figura 1).¹

Otra aportación novedosa y reciente en el campo de los antihipertensivos ha sido el desarrollo de fármacos híbridos que, manteniendo dicha actividad, añaden otra actividad adicional al potencial terapéutico del fármaco mejorando su perfil o disminuyendo sus efectos adversos dentro del tratamiento de la enfermedad cardiovascular. Así, se han desarrollado compuestos que tienen tanto actividad de antagonistas del calcio (antihipertensivo) como actividad antioxidante (protector contra el estrés oxidativo) que se han reivindicado como agentes citoprotectores.² Estos son piperazinas como **2**, de la familia de la flunarizina, que llevan unidos en uno de los átomos de nitrógeno un fenol a través de una cadena hidrocarbonada de longitud variable (Figura 2). También, se ha descrito más recientemente una nueva clase de híbridos **3**, llamados NO-sartanes, que conjugan losartán (antagonista de AT₁) con un donador lento de NO (vasorrelajante) (Figura 2).³ Además, se ha desarrollado previamente toda una serie de fármacos antihipertensivos de otras familias conjugados con donadores de NO.^{4,5,6,7,8,9}

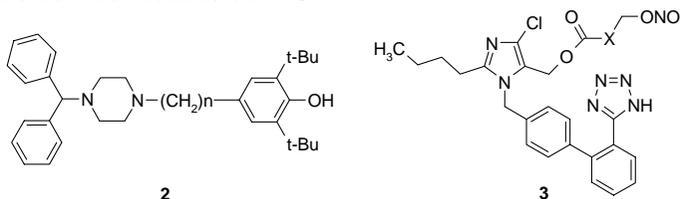


Figura 2. Antihipertensivos híbridos.

¹ Cabri, W.; Difabio, R.; *From Bench to Market: The Evolution of Chemical Synthesis*, Chapter 6, Oxford University Press, Oxford **2000**.

² Hellberg, M. R.; Barnes, G.; Collier, Jr., R. J. *PCT Int. Appl.* **1995**, WO 9515958 A1 19950615, CAN 123:340186

³ Breschi, Maria, C.; Calderone, V.; Digiaco, M.; Martelli, A.; Martinotti, E.; Minutolo, F.; Rapposelli, S.; Balsano, A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5597-5600.

⁴ Shaffer, J. E.; Lee, F.; Thomson, S.; Han, B. J.; Cooke, J.P.; Lo Scaizo, J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *256*, 704-709.

⁵ Nakae, I.; Takahashi, M.; Kinoshita, T.; Matsumoto, T.; Kinoshita, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *274*, 40-46.

⁶ Korzycka, L.; Owezarek, J.; Czarnecka, E. *Acta Pol. Pharm.* **2002**, *59* (5), 365-369.

⁷ Villarroya, M.; Herrero, C. J.; Ruiz-Nuno, A.; de Pascual, R.; del Valle, M.; Michelena, P.; Grau, M.; Carrasco, E.; Lopez, M. G.; Garcia, A. G. *J. Pharmacol.* **1999**, *128* (8), 1713-1722.

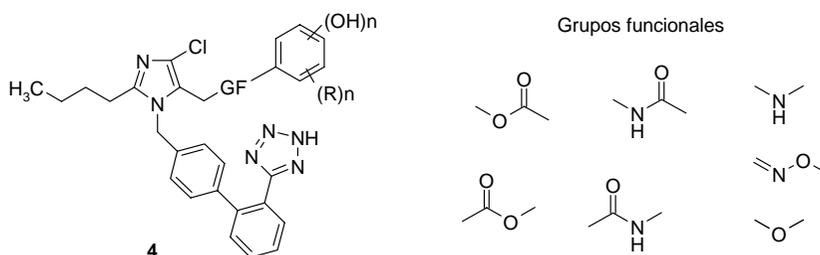
⁸ Boschi, D.; Di Stilo, A.; Cena, C.; Lolli, M.; Fruttero, R.; Gasco, A. *Pharmacol. Res.* **1997**, *14* (12), 1750-1758.

⁹ Di Stilo, A.; Visentin, S.; Cena, C.; Gasco, A. M.; Ermondi, G.; Gasco, A. *J. Med. Chem.* **1988**, *41*, 5393-5401.

3.2. Objetivos

Dentro del concepto de fármacos híbridos, nos hemos propuesto llevar a cabo la síntesis y estudio farmacológico de una nueva familia de fármacos híbridos que muestren actividad antagonista del receptor AT₁ produciendo un efecto antihipertensivo y tengan un comportamiento antioxidante capaz de producir un efecto citoprotector. Para la realización de este proyecto, objetivo de la Tesis Doctoral que se presenta en esta Memoria, hemos elegido al losartán **1** como componente que produzca el efecto vasorrelajante y, por otro lado, una serie de fenoles como antioxidantes.

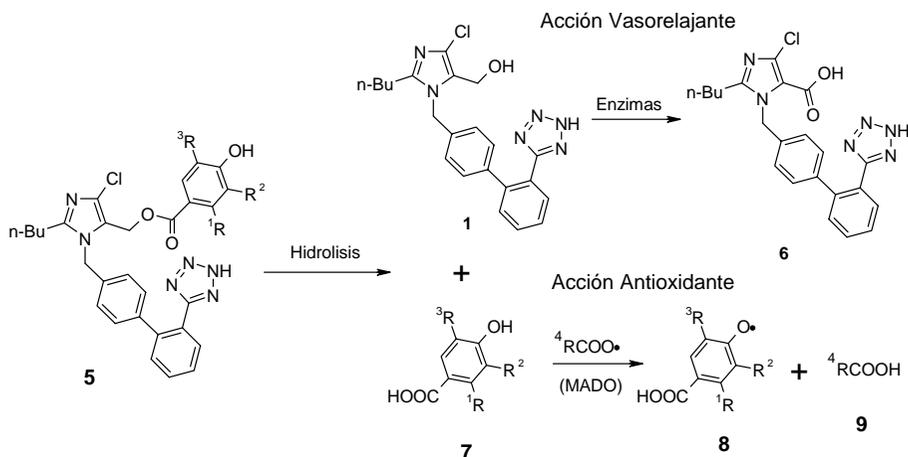
Este estudio deberá implicar una primera selección de los fenoles en función de la medida de su capacidad actividad antioxidante. En segundo lugar, los fenoles más activos, se unirán al losartán a través de una serie de grupos funcionales, hidrolizables o no, para así crear los fármacos híbridos **4**. El lugar de unión ideal para llevar a cabo esta unión es el grupo hidroximetilo del losartán. Finalmente, estos fármacos se someterán a un estudio farmacológico *in vitro* de capacidad antioxidante, afinidad por el receptor AT₁ e inhibición de la contracción celular en presencia de Ang II, y a un estudio farmacológico *in vivo* con ratas hipertensas. Los grupos funcionales que nos proponemos estudiar para la unión de **1** a fenoles antioxidantes son éster, amida, amina y éter (Esquema 1).



Esquema 1. Posición y grupos funcionales propuestos para la unión de **1** a fenoles antioxidantes.

En función del tipo de grupo funcional es de esperar que este se hidrolice o no en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, en el caso de un éster de losartán del tipo **5** (Esquema 2), la hidrólisis del grupo liberaría **1**, bloqueando el receptor AT₁ directamente o a través de su metabolito más activo **6**, y provocando su efecto antihipertensivo. Por

otra parte, liberaría el fenol **7** que al entrar en contacto con los radicales libres resultantes de los metabolitos activos derivados de oxígeno (MADO) cederían electrones y se oxidarían para transformarse en radicales libres estables y no tóxicos **8**, regenerando el metabolito **9**. Como consecuencia, se produce una protección de las células de la musculatura cardiovascular. Además, este doble efecto podría producirse cuando el grupo funcional no fuera hidrolizable en condiciones fisiológicas.



Esquema 2. Acción doble de un híbrido **5** de losartán.

3.3. Elección de los fragmentos antioxidantes

En primer lugar se seleccionó un grupo de nueve ácidos fenol-carboxílicos comerciales **10a-i** (Figura 3). Todos ellos contienen, al menos, un grupo fenólico en su estructura, y fueron seleccionados por sus propiedades redox y su utilización previa en el campo de los antagonistas del calcio.¹⁰

Para realizar la selección de los fragmentos antioxidantes más potentes se llevó a cabo el estudio de la capacidad antioxidante total utilizando el kit “Total Antioxidant Status Assay” (Calbiochem Cat No 615700). Esta prueba analiza la capacidad de los antioxidantes para bloquear la oxidación del ABTS [2,2'-Azino-di(3-etilbenzotiazolina sulfonato)], en presencia de metmioglobina y peróxido de hidrógeno.¹¹

¹⁰ Hellberg, M.; Burnes, G.; Collier, R. J.; *PTC Patent*, WO95/15958, **1995**.

¹¹ Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V., Milner A., *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407.

Se analizó la capacidad antioxidante de concentraciones equimolares (1 μM) de las sales potásicas de los fenoles propuestos, en comparación con **1** (Gráfico 1). Los datos que se muestran son la media \pm EEM de 3 experimentos. Los resultados se expresan en concentración mM de peróxido de hidrógeno eliminado, y demuestra que los fragmentos antioxidantes con mayor capacidad fueron el **10b**, **10c**, **10e**, **10g** y **10h**.

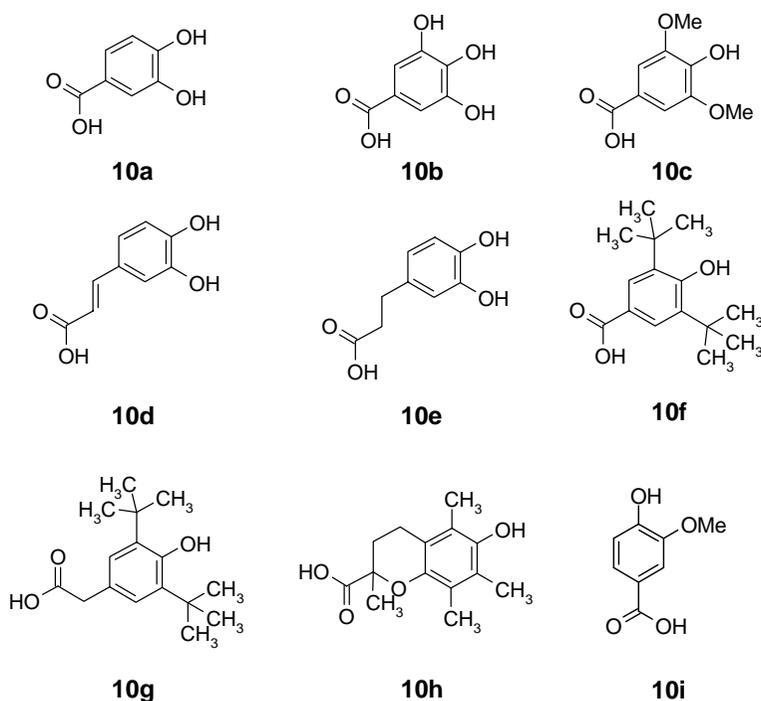


Figura 3. Fragmentos antioxidantes **10** seleccionados.

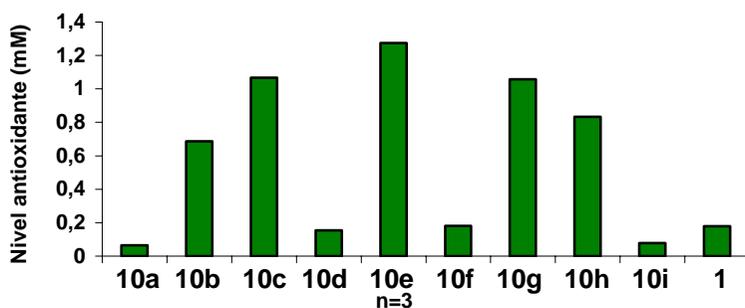
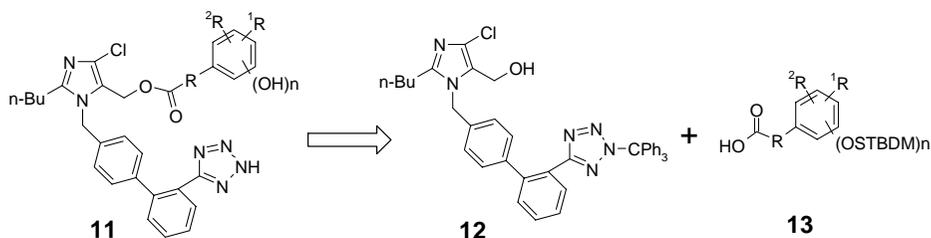


Gráfico 1. Medida de la capacidad antioxidante total.

3.4. Síntesis de ésteres 11

La síntesis de ésteres **11** de losartán se diseñó a través de la esterificación entre losartán protegido **12** con un grupo tritilo en el anillo de tetrazol, y ácidos carboxílicos **13** protegidos como sililéteres en los hidroxilos fenólicos (Esquema 3).



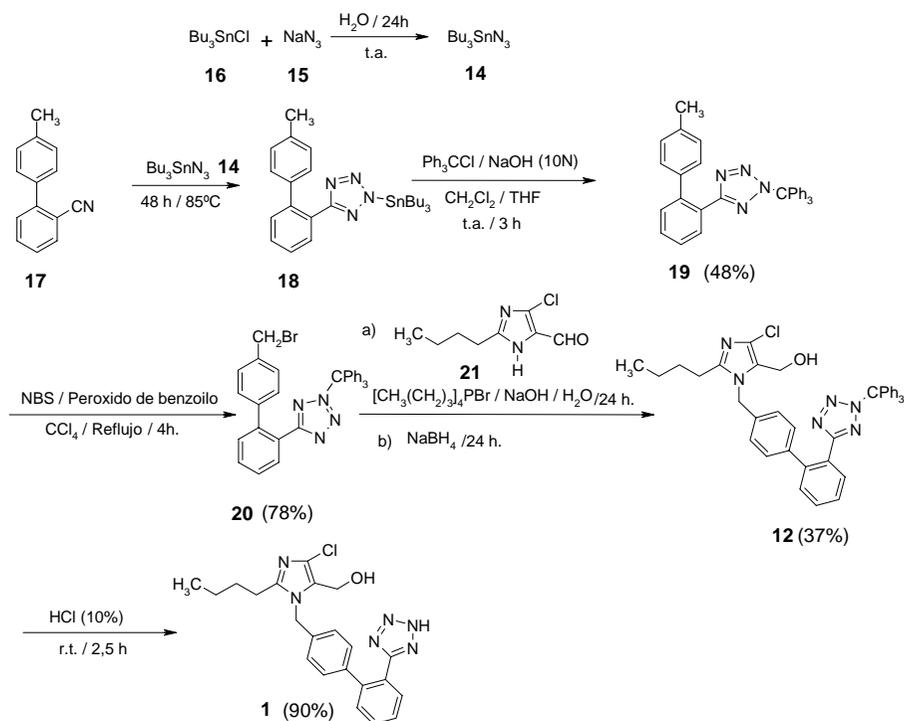
Esquema 3. Esquema general de síntesis de ésteres **11**.

3.4.1. Síntesis de losartán protegido 12

La síntesis de **12** se llevó a cabo siguiendo el procedimiento previamente descrito para la síntesis de **1** (Esquema 4).¹² En primer lugar, se sintetizó la azida de tributilestaño (Bu_3SnN_3) **14** a partir de azida sódica (NaN_3) **15** y cloruro de tributilestaño (Bu_3SnCl) **16** en agua a temperatura ambiente durante 24 horas, obteniéndose cuantitativamente un aceite transparente que puede almacenarse a baja temperatura y bajo atmósfera de argón hasta un máximo de 60 días. Por otro lado, a partir de 4'-metil-2-cianobifenilo comercial **17** y **14** se llevó a cabo la formación del anillo de tetrazol. La reacción se realiza sin disolvente durante 48 horas a 85° C obteniéndose el tetrazol intermedio **18** que no se purifica y se emplea tal cual en la siguiente reacción. El crudo de la reacción anterior se trató con NaOH (10N) y cloruro de tritilo (Ph_3CCl), para obtener **19** con un rendimiento del 48%, que se aísla por precipitación con hexano del crudo de reacción. La reacción no puede monitorizarse por TLC debido a que la acidez de la gel de sílice produce la desprotección del tetrazol, por lo que el producto no se puede purificar por cromatografía en columna. El seguimiento de la reacción se realizó por ^1H -RMN observando la desaparición de la señal del grupo NH del tetrazol a aproximadamente 10 ppm. A continuación, la bromación de **19** se llevó a cabo por medio

¹² Carini, D. J.; Duncia, J. V.; Aldrich, P. E.; Chiu, A. T.; Jonson, A. L.; Pierce, M. E.; Price, W. A.; Santella III, J. B.; Wells, G. J.; Wexler, R. R.; Wong, P. C.; Too, S.-E.; Timmermans, P. B. M. W. M. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2525-2547.

de una reacción radicalica con N-bromosuccimidina (NBS) y peróxido de benzoilo en CCl₄ a reflujo para obtener el producto bromado **20** (78%). Para conseguir un buen rendimiento en esta reacción es importante separar mediante extracción el agua que lleva el peróxido de benzoilo comercial (25%), disolviéndolo en CCl₄. La disolución filtrada se añade posteriormente a la reacción.



Esquema 4. Síntesis de losartán **1**.

El imidazol comercial **21** se alquiló por catálisis en transferencia de fase líquido-líquido con **20** utilizando como catalizador [CH₃(CH₂)₃]₄PBr y como base NaOH (10N). Terminada la reacción y sin aislar el producto de alquilación, se llevó a cabo la reducción del grupo aldehído con NaBH₄ para dar el losartán protegido **12** (37%). Finalmente, la desprotección del grupo tritilo con HCl (10%) a temperatura ambiente durante 3 h conduce a losartán **1** (90%).

3.4.2. Síntesis de los ácidos carboxílicos **13**

Con el fin de evitar reacciones de autoesterificación de los ácidos carboxílicos **10** en la esterificación con **1**, éstos se deben proteger. Así, los ácidos carboxílicos **10** se protegieron con TBDMSCl

utilizando DBU como base para dar los correspondientes sililéteres fenólicos **13** (Esquema 5).^{13,14}



Esquema 5. Síntesis de los ácidos carboxílicos **13**.

En general, los rendimientos obtenidos son buenos (**13a**, **13c** y **13e**) o medios (**13d**). El bajo rendimiento para **13h** es mejorable y se debe a problemas en el proceso de aislamiento (Figura 4).

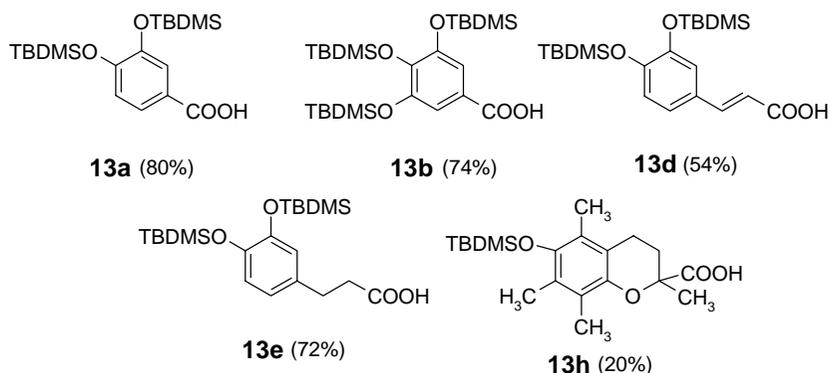


Figura 4. Ácidos carboxílicos **13** preparados.

Sin embargo, cuando existen dos grupos *tert*-butilo o metoxilo en posición *orto* respecto al grupo hidroxilo, este no se protege debido probablemente al notable impedimento estérico (**10f**, **10g** y **10c**). Por ello, se decidió utilizar estos fragmentos sin proteger para el proceso posterior de esterificación (Figura 5). El hecho de que se produzca **13b** parece indicar que en este caso el grupo que primero se protege debe ser el 4-hidroxi de **10b** debido a su mayor acidez como consecuencia de los dos grupos hidroxilo en *orto* (Figuras 3 y 4).

¹³ Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191.

¹⁴ Wissner, A.; Grudzinskas, C. V. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3972-3974.

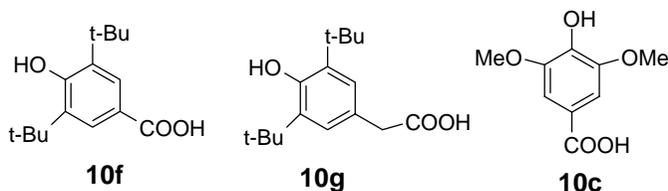
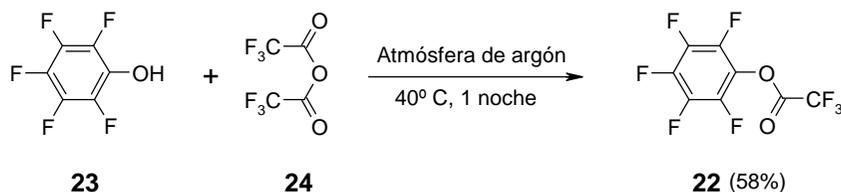


Figura 5. Fragmentos antioxidantes que no se protegen por su impedimento estérico.

3.4.3. Reacción de esterificación

3.4.3.1. Esterificación con ésteres de pentafluorofenol

En primer lugar, se investigó la reacción de esterificación de **12** con ésteres de pentafluorofenol de los ácidos **10** ó **13**. Para ello, se preparó trifluoroacetato de pentafluorofenol **22** (58%) por reacción de pentafluorofenol **23** y anhídrido trifluoroacético **24** según se ha descrito previamente (Esquema 6).¹⁵

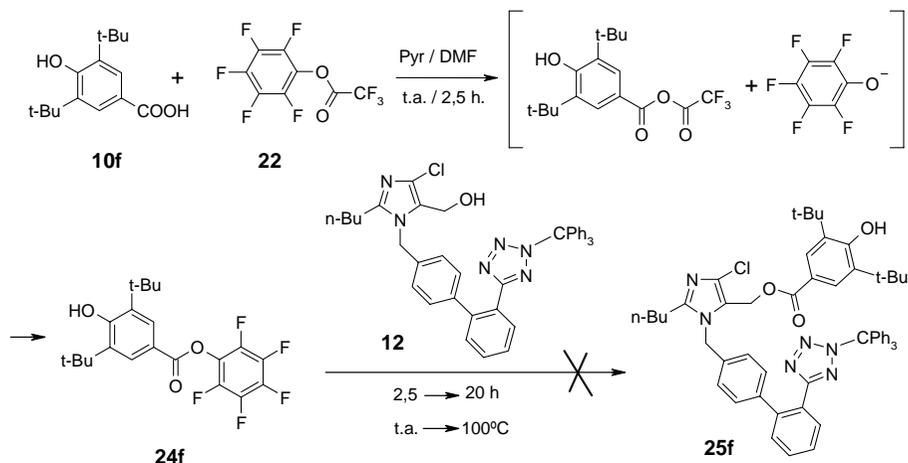


Esquema 6. Síntesis de trifluoroacetato de pentafluorofenol **22**.

La reacción de esterificación se estudió primero con el ácido **10f**. Así, la reacción con **22** en presencia de piridina permitió preparar el éster activado **24f**. Después, al añadir *in situ* **19** no se observó formación del éster **25f**, aún después de elevar la temperatura progresivamente con el tiempo hasta 100 °C durante 20 h, recuperándose **19** y el éster **24f** (Esquema 7).¹⁶

¹⁵ Green, M.; Berman, J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5851-5852.

¹⁶ Rajappan, V. P.; Hosmane, R. S. *Synthetic Commun.* **1998**, *28*, 753-764.

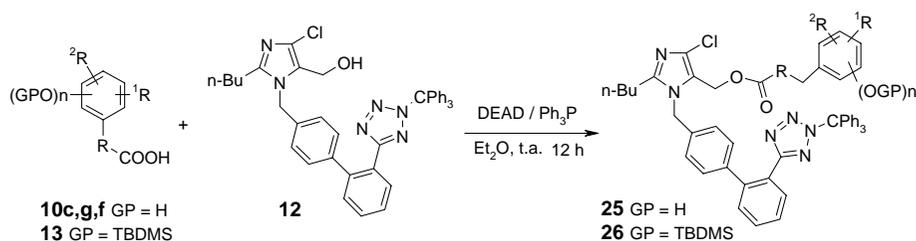


Esquema 7. Intento de esterificación utilizando el éster de pentafluorofenol **24f**.

Debido a que se pretendía buscar un método general de esterificación para todos los ácidos **13** y **10c,f,g**, se abandonó esta vía y se ensayó la reacción de Mitsunobu.

3.4.3.2. Esterificación aplicando la reacción de Mitsunobu

La aplicación de la reacción Mitsunobu ha resultado ser un método muy versátil que permite realizar reacciones de esterificación de forma eficaz en condiciones suaves.¹⁷ Así, la reacción de **19** con ácidos **10c,f,g** y **13**, en presencia de trifenilfosfina y DEAD, permitió preparar una serie de ésteres **25** y **26** (Esquema 8).



Esquema 8. Síntesis de ésteres **25** y **26** mediante esterificación de Mitsunobu.

La reacción se llevó a cabo con los compuestos **10g**, **13d**, **13e**, y **13h**, obteniéndose los correspondientes ésteres **25** y **26** con rendimientos buenos o moderados (Figura 6).

¹⁷ Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1-28.

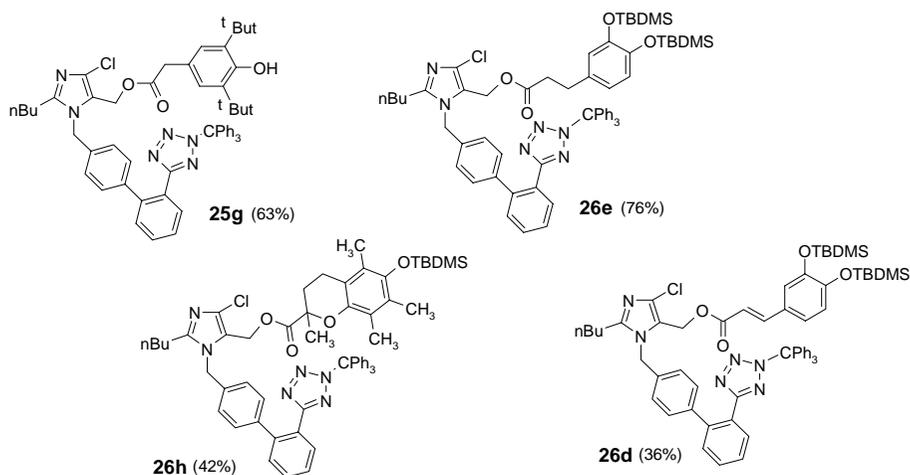
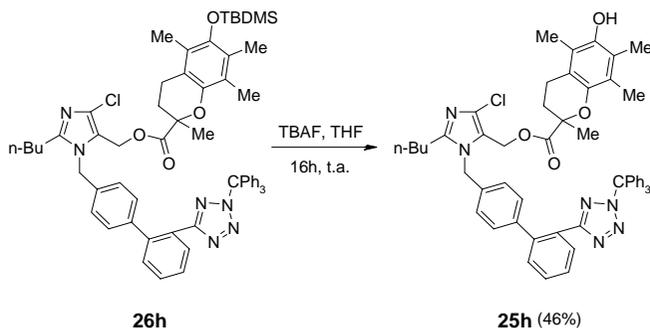


Figura 6. Ésteres **25** y **26** sintetizados mediante la reacción de Mitsunobu.

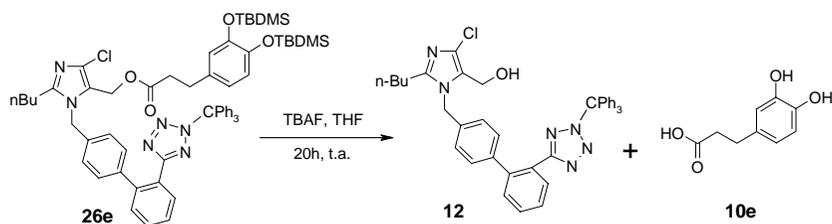
3.4.3.3. Desprotección del grupo sililéter

La desprotección del grupo sililéter se llevó a cabo tratando el éster **26h** con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) a temperatura ambiente, según el método descrito previamente, obteniéndose un rendimiento aceptable de **25h** (46%) (Esquema 9).^{13,14}



Esquema 9. Desprotección del grupo sililéter con TBAF.

Por otro lado, al llevar a cabo la reacción sobre el éster **26e**, en las mismas condiciones, se aisló el alcohol **12** (44%) como consecuencia de la desprotección del grupo sililéter y la posterior hidrólisis del grupo éster en el proceso de aislamiento (Esquema 10).



Esquema 10. Desprotección e hidrólisis de **26e** con TBAF.

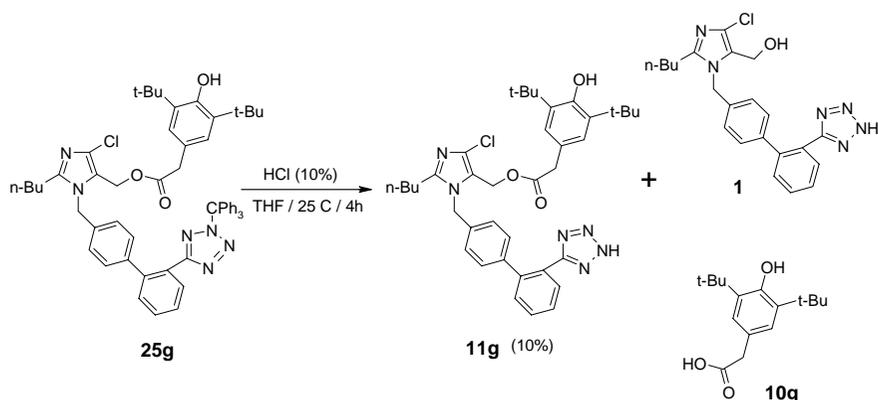
Como consecuencia del resultado obtenido con **26e**, era previsible un resultado similar con **26d**, y por ello, se abandonó el uso del grupo TBDMS y se ensayaron otros grupos protectores.

3.4.3.4. Desprotección del grupo tritilo

3.4.3.4.1. Desprotección en medio ácido

Antes de elegir el grupo protector más adecuado para el fragmento antioxidante se estudiaron las condiciones de desprotección del grupo tritilo del anillo de tetrazol.^{12,18} Se eligió el producto **25g** debido a que sólo contiene un grupo tritilo y de este modo se puede valorar si los métodos de desprotección afectan al éster formado. Se ensayó la desprotección con HCl (10%), con una disolución saturada de HCl (gas) en MeOH y con TFA (exceso y estequiométrica), pero únicamente se pudo identificar el producto final **11g** en los dos primeros ensayos, aunque con unos rendimientos muy bajos. En el tratamiento con HCl (10%), se observó que, además, se producía la hidrólisis del grupo éster, identificando los productos **1** y **10g** en la mezcla de reacción. Estos resultados muestran que el grupo éster de los híbridos **11** es muy sensible a las condiciones de desprotección de un grupo tritilo. Por ello, se descartó esta vía de desprotección del anillo de tetrazol (Esquema 11).

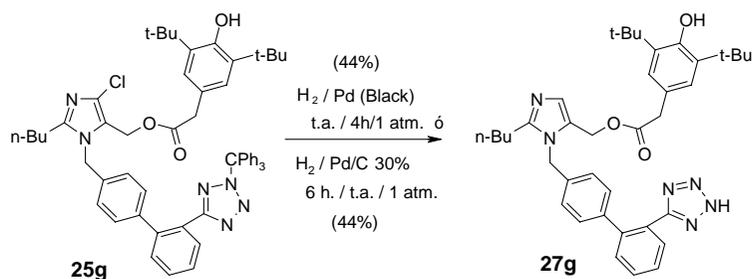
¹⁸ Elguero, J.; Jaramillo, C.; Pardo, C. *Synthesis* **1997**, 563-566.



Esquema 11. Desprotección del grupo tritilo en medio ácido.

3.4.3.4.2. Desprotección por hidrogenación catalítica

Al no poder utilizar medios ácidos suaves se cambió el método de desprotección. Sometiendo el producto **25g** a condiciones de hidrogenación catalítica con 5% Pd/C bajo una presión de hidrógeno de 1 atm no se observó reacción.¹⁹ A continuación, la hidrogenación con polvo negro de paladio produjo, además, la deshalogenación del anillo de imizadol para dar **27g** (44%).²⁰ La utilización de paladio menos activo (30% Pd/C) condujo al mismo resultado (Esquema 12). Aunque por un lado, el producto deshalogenado podía ser interesante para los estudios farmacológicos, estábamos interesados en obtener análogos de losartán con el átomo de halógeno en su posición, lo que se ha descrito como un requerimiento para una mayor potencia, por lo que abordamos estudiar otros grupos protectores para el anillo de tetrazol.



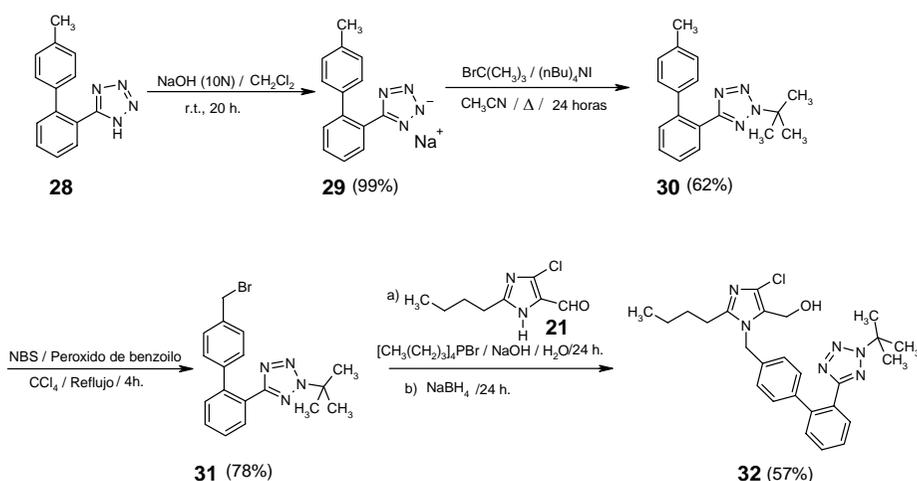
Esquema 12. Desprotección del grupo tritilo por hidrogenación catalítica.

¹⁹ Pearson, C.; Rinehart, K. L.; Sugano, M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 411-414.

²⁰ Zervas, L.; Theodoropoulos, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1359-1363.

3.4.4. Protección del anillo de tetrazol con bromuro de *tert*-butilo

Tanto DuPont/Merck en la síntesis de **1**, como la compañía Wyeth-Ayerst en la síntesis de tasosartán han utilizado el grupo *tert*-butilo como grupo protector del anillo de tetrazol.²¹ Por otro lado, el grupo *tert*-butilo es ligeramente más sensible a ácidos que el grupo tritilo.²² Por ello, nos planteamos utilizar el grupo *tert*-butilo como grupo protector del anillo de tetrazol (Esquema 13).²³



Esquema 13. Síntesis de losartán protegido **32** con el grupo *tert*-butilo.

La protección del anillo de tetrazol se realizó sobre el producto comercial **28**. En primer lugar, se preparó su sal sódica **29**, con un rendimiento cuantitativo, por tratamiento con NaOH (10 N). La reacción posterior de **29** con bromuro de *tert*-butilo permitió aislar **30** con un rendimiento medio (62%). A continuación, se aplicó el mismo esquema de síntesis de **1** (Esquema 1). Así, la halogenación bencílica de **30** permitió obtener **31** (78%), que se utilizó para la alquilación del aldehído comercial **21** seguido de reducción al alcohol **32** (57%).

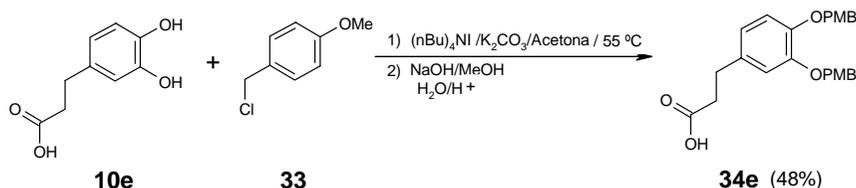
²¹ From Bench to Market. The Evolution of Chemical Synthesis. Walter Cabri and Romano Di Fabio Oxford University Press 2000.

²² Protective Groups in Organic Synthesis. Theodora W. Greene, Peter G.M. Wuts JOHN WILEY & SONS, INC 1991.

²³ Huff, B. E.; LeTourneau, M. E.; Staszak, M. A.; Ward, J. A. *Tetrahedron Lett.* 1996, 37, 3655-3658.

3.4.5. Protección de 10e utilizando PMBCl

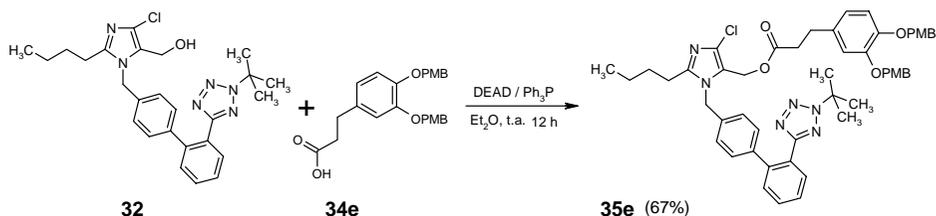
Por otro lado, nos planteamos introducir en los fragmentos antioxidantes **10** un grupo protector sensible a ácidos. El grupo *p*-metoxibencilo (PMB) es un grupo protector de estas características ya que su desprotección se realiza en condiciones suaves usando TFA.^{24,25} La protección del fragmento antioxidante **10e** se llevó a cabo usando cloruro de *p*-metoxibencilo **33**, K₂CO₃ como base y TBAI como catalizador para dar el ácido **34e** (Esquema 14).



Esquema 14. Protección del fragmento antioxidante **10e** con PMBCl.

3.4.6. Síntesis del éster protegido 35e

De forma análoga a como se hizo anteriormente, la reacción de Mitsunobu entre el alcohol **32** y el ácido carboxílico **34e** permitió la formación del éster **35e** con buen rendimiento (67%) (Esquema 15).



Esquema 15. Síntesis de **35e** en condiciones de Mitsunobu.

3.4.7. Desprotección del éster 35e

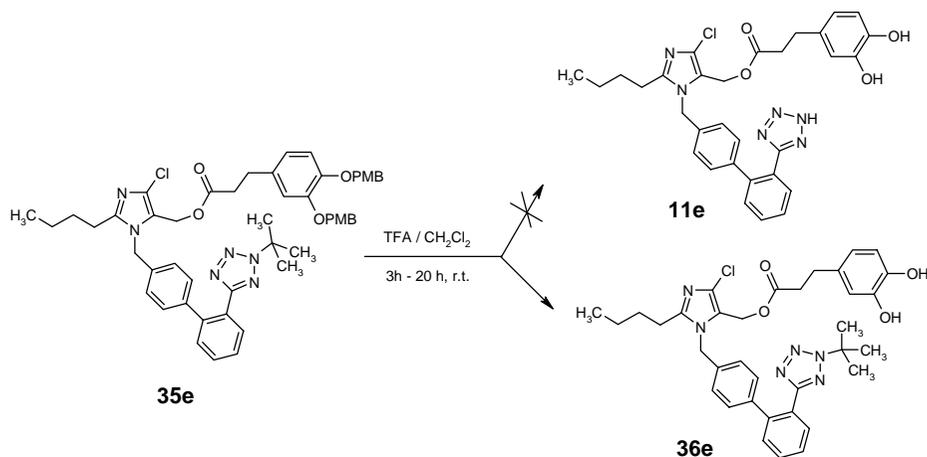
3.4.7.1. Desprotección por medio de ácido trifluoroacético (TFA)

Se llevaron a cabo varios intentos de desprotección utilizando distintas proporciones de TFA/CH₂Cl₂ a temperatura ambiente y a

²⁴ White, J. D.; Amedio, J. C. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 738-743.

²⁵ Buckle, D. R.; Rockell, J. M. *J. C. S. Perkin I*, **1982**, 627-630.

distintos tiempos.^{24,25} Sin embargo, las condiciones ensayadas no suponen la desprotección completa de **35e** para obtener **11e**, produciéndose sólo la desprotección de los grupos *p*-metoxibencilo, pero no del grupo *tert*-butilo, para dar **36e** (Esquema 16).

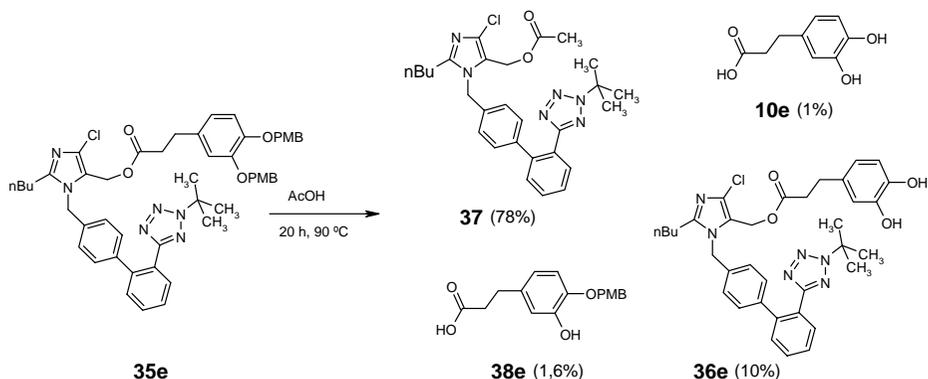


Esquema 16. Desprotección de **35e** con TFA.

3.4.7.2. Desprotección por medio de ácido acético

También se ensayó la desprotección de los grupos PMB por medio de AcOH a 90 °C durante 20 h.²⁶ El producto mayoritario de la mezcla de reacción aislada resultó ser el de transacilación **37** (78%), obteniéndose, además, el producto **36e** de desprotección de los grupos PMB con bajo rendimiento (10%). También, se identificaron trazas del ácido **10e** y su derivado monoprotectido **38e**. Se realizaron ensayos en microondas a distintas potencias y tiempos obteniendo resultados similares (Esquema 17).

²⁶ Hodgetts, K. J.; Wallace, T. W. *Synthetic Commun.* **1994**, *24*, 1151-1155.

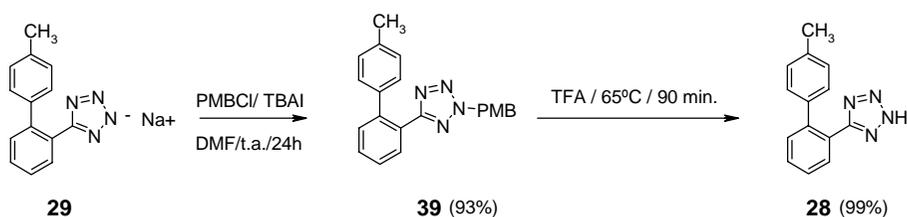


Esquema 17. Desprotección de **35e** con AcOH.

3.4.8. Protección del anillo de tetrazol con PMBCl

Debido a la imposibilidad de desproteger el grupo *terc*-butilo del anillo de tetrazol en condiciones suaves que no afectaran al grupo éster, se ensayó la utilización del grupo p-metoxibencilo (PMB) como protector de los hidroxilos fenólicos y del anillo de tetrazol.²⁷

Para comprobar si el grupo PMB era un grupo protector adecuado para el anillo de tetrazol, se tomó como modelo **29**. Inicialmente, se trató con PMBCl para dar el tetrazol protegido **39** (93%), y sobre éste se llevaron a cabo pruebas de desprotección. El tratamiento con TFA condujo a la desprotección completa para dar **28** (99%) (Esquema 18).

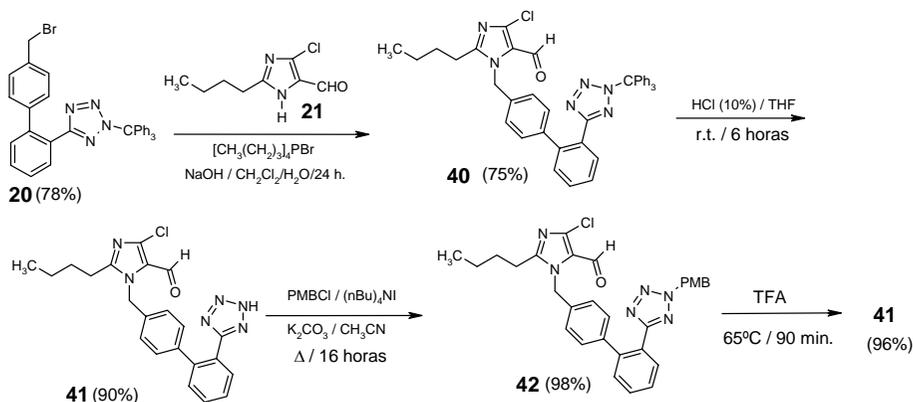


Esquema 18. Protección del anillo de tetrazol de **29** con PMBCl y su desprotección.

A continuación, se llevó a cabo la síntesis de **1** protegido con el grupo PMB en el anillo de tetrazol. Primero, la alquilación del fragmento imizadólico comercial **21** con el bromuro **20** por catálisis en transferencia de fase, utilizando como catalizador $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_4\text{PBr}$ y

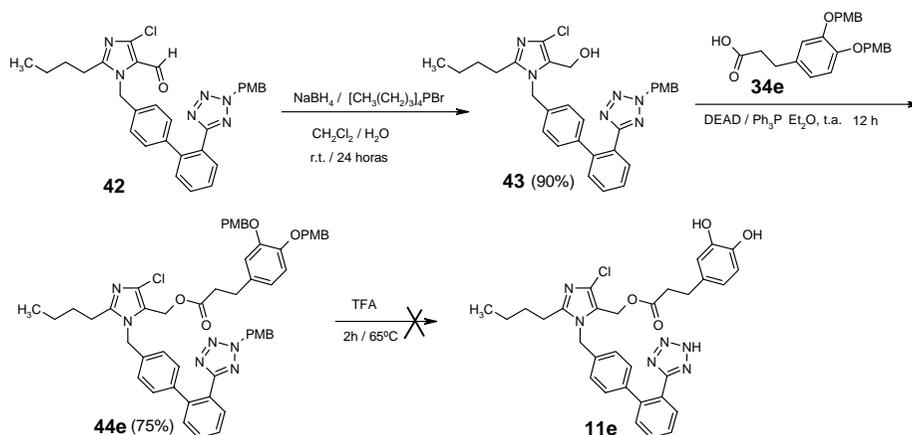
²⁷ Subramanyam, C. *Synthetic Commun.* **1995**, 25, 761-774.

como base NaOH (10N), condujo al aldehído **40** (75%). El tratamiento posterior en medio ácido produjo la desprotección del grupo tritilo para obtener **41** (90%). Entonces, el anillo de tetrazol fue reprottegido con PMBCl, K₂CO₃ y TBAI para obtener **42** (98%). Finalmente, se ensayó la desprotección del anillo de tetrazol por tratamiento de **42** con TFA, produciéndose la eliminación del grupo PMB con muy buen rendimiento para dar **41** (96%) (Esquema 19).



Esquema 19. Síntesis del aldehído **41** protegido con PMBCl y su desprotección.

Una vez confirmada la desprotección del tetrazol en el aldehído **42** se llevó a cabo la reducción al correspondiente alcohol **43** (90%). A continuación, la esterificación de **43** con el ácido **34e**, utilizando las condiciones de la reacción de Mitsunobu, permitió obtener el éster **43e** (75%). Sin embargo, el tratamiento posterior de **43e** con TFA a 65 °C durante 2 horas conduce a una mezcla compleja de reacción en la que no se detectó **11e** (Esquema 20).

Esquema 20. Síntesis de **44e**.

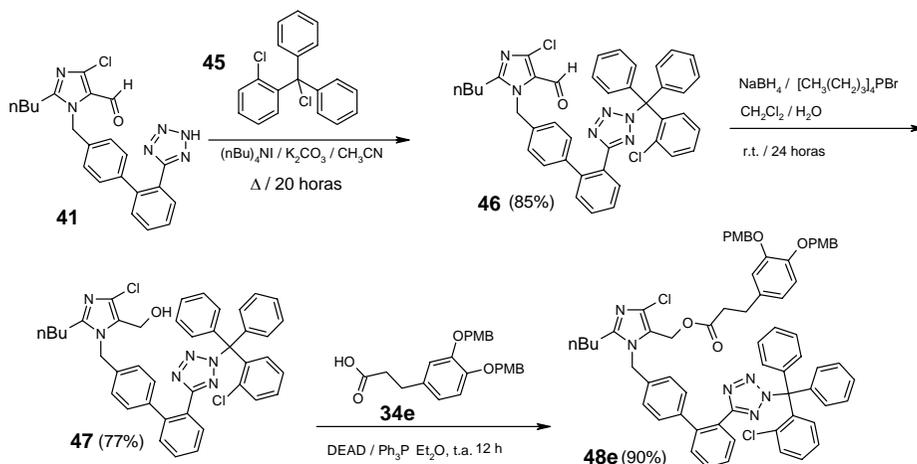
3.4.9. Protección del anillo de tetrazol con el grupo 2-clorotritilo

Los resultados obtenidos parecen indicar que el anillo de tetrazol protegido con grupos *t*-Bu, Tr o PMB es mucho más resistente a su desprotección por TFA cuando se encuentra formando parte de la estructura de los ésteres híbridos que pretendemos preparar. Aunque el motivo no es claro, es obvia la gran congestión estérica entorno al enlace lábil a ácidos de los compuestos **35e** y **44e** anteriormente preparados.

Para favorecer la desprotección del anillo de tetrazol se cambió el grupo protector por el grupo 2-clorotritilo (2-ClTr), que es capaz de desprotegerse en condiciones ácidas más suaves que los grupos ensayados anteriormente.^{28,29} Así, el aldehído **41** se trató con cloruro de 2-clorotritilo **45** para dar el producto protegido **46**. La reducción posterior con borohidruro sódico condujo al alcohol **47**. Finalmente, la esterificación de **47** con **3e** proporcionó el éster **48e** con alto rendimiento (90%) (Esquema 21).

²⁸ Athanassopoulos, P.; Barlos, K.; Gatos, D.; Hatzi, O.; Tzavara, C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5645-5648

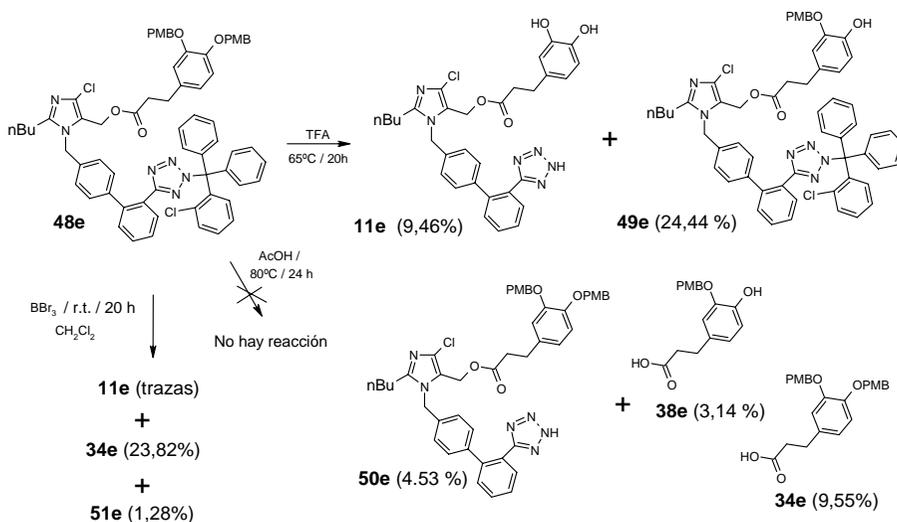
²⁹ Corey, E. J.; Danheiser, R. L.; Chandrasekaran, S.; Keck, G. E.; Gras, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 8031-8034.



Esquema 21. Protección del anillo de tetrazol con el grupo 2-clorotritilo.

Sobre el compuesto **48e** se realizaron ensayos de desprotección del grupo 2-ClTr para obtener el producto **11e** (Esquema 22). El tratamiento con TFA a 65 °C durante 20 h condujo a una mezcla compleja de compuestos entre los que se identificó por HPLC-MS **11e** como un producto minoritario. Además, se han identificado productos de desprotección parcial **49e** y **50e**, así como productos de hidrólisis e hidrólisis-desprotección **34e** y **51e**. Por otro lado, se ensayó la desprotección con tribromuro de boro.³⁰ En este caso, sólo se identificaron por HPLC-MS trazas de **11e** así como los productos de hidrólisis e hidrólisis-desprotección **34e** y **51e**. Finalmente, el tratamiento con ácido acético caliente condujo al producto de partida inalterado. Estos resultados vienen a corroborar, una vez más, la dificultad de eliminar grupos protectores del anillo de tetrazol en los híbridos **11**, por otro lado fácilmente eliminables en condiciones ácidas suaves cuando el anillo de tetrazol no presenta la congestión estérica de estos productos. Además, cuando las condiciones se fuerzan, la desprotección va acompañada de la ruptura del enlace éster.

³⁰ Paliakov, E.; Strekowski, L. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4093-4095.

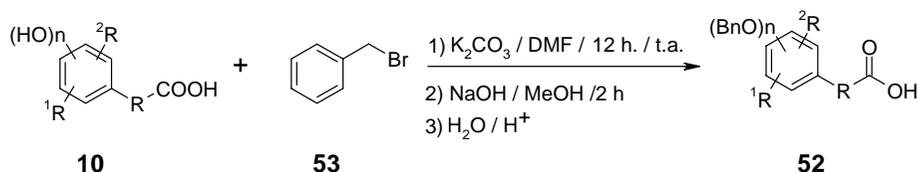


Esquema 22. Ensayos de desprotección de **48e**.

3.4.10. Revisión de la reacción de hidrogenación catalítica

3.4.10.1. Protección de los ácidos **11** con bromuro de bencilo

Al encontrar las dificultades arriba comentadas para la desprotección de los grupos protectores utilizados, se decidió ensayar el grupo bencilo como grupo protector de los ácidos carboxílicos **11** y reinvestigar la reacción de hidrogenolisis (Esquema 23). Primero, se prepararon los benciléters **52** por reacción de los ácidos **10** de mayor capacidad antioxidante con exceso de bromuro de bencilo **53**, seguido de hidrólisis básica. Así, se obtuvieron los ácidos carboxílicos **52b,c,e** con buenos rendimientos (Figura 7).³¹



Esquema 23. Protección de **10** con bromuro de bencilo.

³¹ Venuti, M. C.; Loe, B. E.; Jones, G. H.; Young, J. M. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2132-2136.

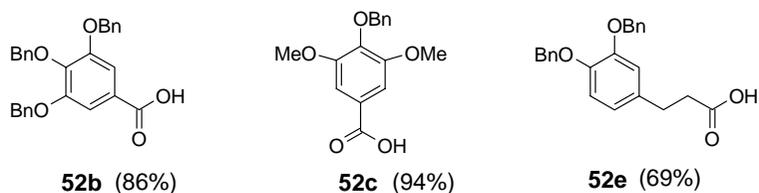
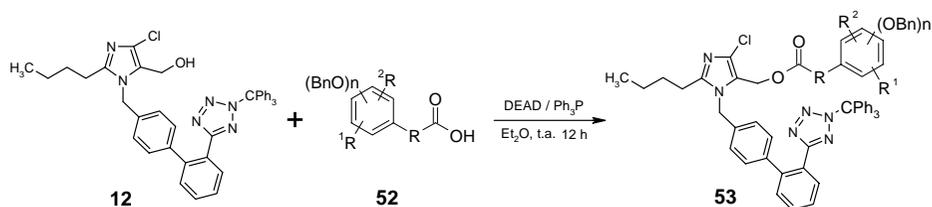


Figura 7. Ácidos **52** preparados.

3.4.10.2. Esterificación de Mitsunobu

Con los ácidos **52b,c,e** y el alcohol **12** se llevó a cabo la esterificación mediante la reacción de Mitsunobu obteniéndose los ésteres **53b,c,e** con rendimientos aceptables (Esquema 24; Figura 8).



Esquema 24. Síntesis de ésteres **53**.

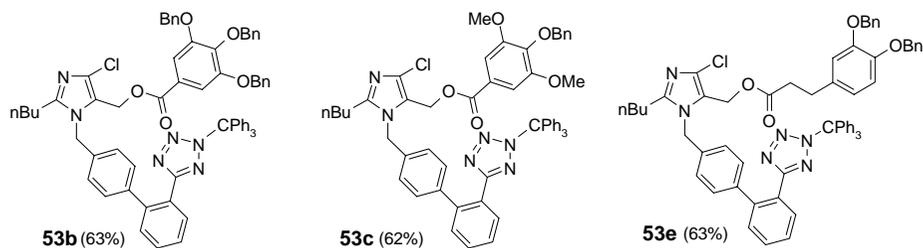
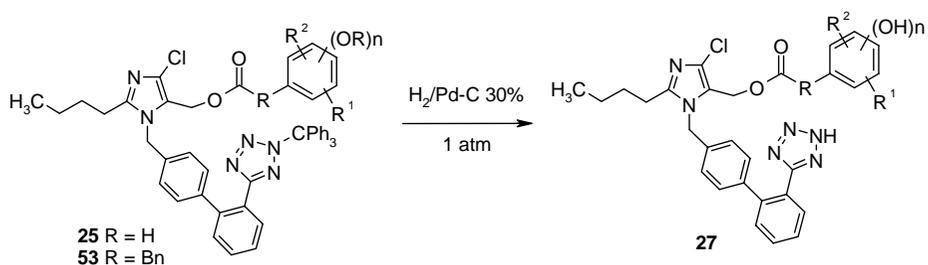


Figura 8. Ésteres **53b,c,e** preparados.

3.4.10.3. Desprotección mediante hidrogenación catalítica

3.4.10.3.1. Desprotección utilizando Pd-C 30%

A partir de los ésteres **25** y **53**, la hidrogenación utilizando el catalizador Pd-C 30% transcurrió con la pérdida del grupo tritilo y de los grupos bencilos, y provocó, además, la deshalogenación del anillo de imidazol, obteniéndose los ésteres **27** con rendimientos entre buenos y moderados (Esquema 25; Figura 9).



Esquema 25. Síntesis de ésteres **27** mediante hidrogenación con Pd-C 30%.

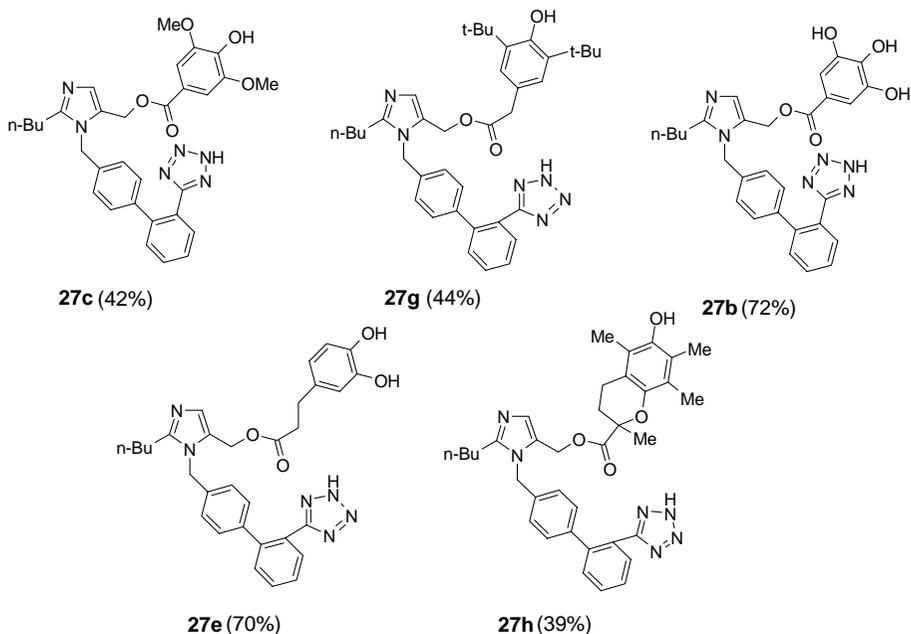
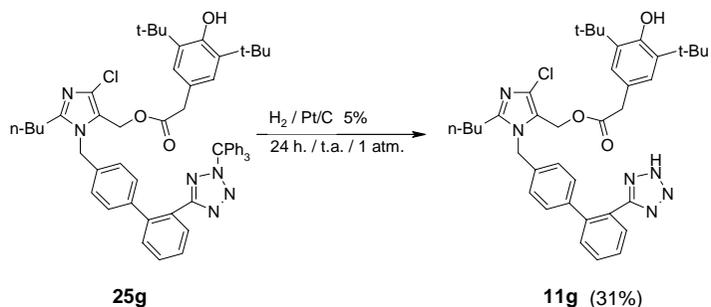


Figura 9. Ésteres **27** sintetizados mediante hidrogenación con Pd-C 30%.

3.4.10.3.2. Desprotección utilizando Pt-C 5%

Para evitar la deshalogenación del enlace C-Cl del anillo de imidazol se utilizó un catalizador de platino (Pt/C 5%). Así, la hidrogenación del éster **25g** permitió obtener el producto **11g** con un rendimiento bajo (Esquema 26).



Esquema 26. Hidrogenación de **25g** con Pt/C 5%.

El procedimiento se aplicó también a los ésteres **25h** y **53e** para dar, respectivamente, los ésteres **11e** y **11h** (Figura 10).³² Tanto en estos casos como en **11g** se recuperó producto de partida después de 24 h de reacción.

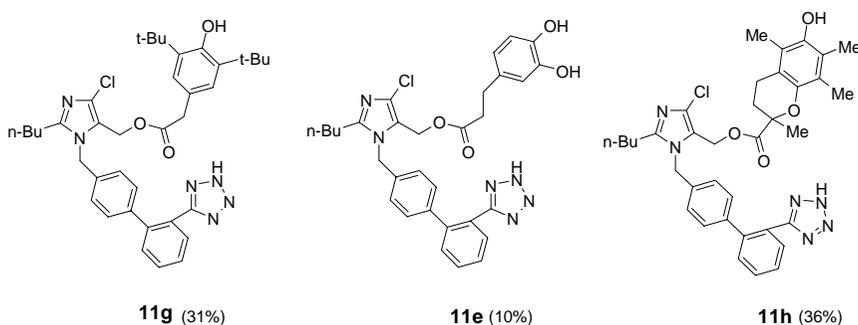


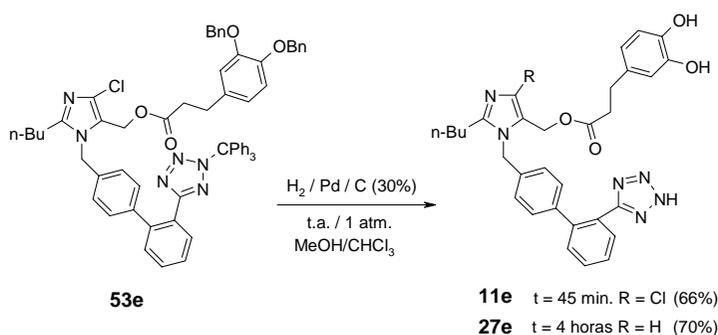
Figura 10. Ésteres **11** sintetizados con Pt/C 5%.

3.4.10.3.3. Optimización de la desprotección utilizando Pd-C 30%

Teniendo en cuenta los bajos rendimientos obtenidos en la desprotección de los ésteres **25** y **53**, se intentó optimizar la hidrogenación usando como catalizador Pd-C 30%. Así, para evitar el problema de la deshalogenación, se llevó a cabo la reacción de hidrogenación a distintos tiempos. Para el caso del éster **53e**, cuando la reacción se para después de 45 minutos, el halógeno se mantiene, obteniéndose un rendimiento medio de **11e** del 66%, junto con un 8% de producto de deshalogenación **27e**. Al aumentar el tiempo a 4 horas

³²R. Alajarin, J. Álvarez-Builla, M. L. Díez Marqués, G. García Navazo, D. Rodríguez Puyol, M. Rodríguez Puyol, J. J. Vaquero. **2005**, ES 2242543.

se produce la deshalogenación obteniendo **27e** con un rendimiento similar (70%), además de un 10 % de producto halogenado **11e** (Esquema 27). También se optimizó el aislamiento con el fin de evitar trazas de producto no requerido. En primer lugar el bruto de reacción se llevó a sequedad eliminando así el tolueno formado en la reacción por la desprotección de los grupos bencilos. A continuación el trifenilmetano formado se separó por precipitación en éter etílico y filtración. Finalmente se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con AcOEt:MeOH:CH₃COOH (3:1:0,02).³²



Esquema 27. Optimización de la hidrogenación de **53e** con Pd-C 30%.

3.4.11. Ensayos farmacológicos *in vitro*

Los ensayos farmacológicos *in vitro* se llevaron a cabo por parte del grupo de investigación de Fisiología y Fisiopatología Renal de la Universidad de Alcalá. La medida de la capacidad antioxidante se realizó en todos los casos. Dado que los experimentos de desplazamiento de la angiotensina II (Ang II) marcada de su receptor y de inhibición de la contracción analizan un mismo fenómeno, la capacidad bloqueante de la Ang II, estos experimentos no se hicieron sistemáticamente con todos los compuestos sintetizados.

3.4.11.1. Medida de la capacidad antioxidante total

Para la medida de la capacidad antioxidante total, se ha utilizado el kit "Total Antioxidant Status Assay" (Calbiochem Cat No 615700). Esta prueba analiza la capacidad de los antioxidantes para bloquear la oxidación del ABTS [2,2'-Azino-di(3-etilbenzotiazolina sulfonato)], en presencia de metmioglobina y peróxido de hidrógeno.¹¹

Se analizó la capacidad antioxidante de concentraciones equimolares (1 μM) de siete de los compuestos **27** y **11** sintetizados, en

comparación con **1** (Tabla 1). Los datos que se muestran son la media \pm EEM de 5 experimentos, y el asterisco representa diferencias estadísticamente significativas con respecto a **1**. Los resultados se expresan en mM de peróxido de hidrógeno eliminados, y demuestran que **1** tiene una capacidad antioxidante mínima, mientras que el resto de compuestos ensayados poseen capacidades antioxidantes entre 4 y 8 veces la de **1**.

3.4.11.2. Medida del desplazamiento de la angiotensina II (Ang II) de su receptor

Estos estudios se realizaron con Ang II marcada con ^{125}I evaluando la capacidad de concentraciones equimolares (10 nM) de los distintos compuestos para desplazar al ligando radioactivo de sus receptores.³³

Los resultados se recogen también en la Tabla 1, y lo que se muestra es el porcentaje de desplazamiento de la hormona marcada. Esta unión, de 890 ± 35 cpm/pocillo (media \pm EEM) en las condiciones experimentales seleccionadas en el estudio, se consideró, en cada experimento individual, como 100 %. Se muestra la media \pm EEM de 5 experimentos independientes y, en todos los casos, los compuestos sintetizados desplazaron más activamente la Ang II marcada de su receptor que **1**, si bien las diferencias detectadas no fueron estadísticamente significativas. Esto demuestra que, a pesar de las modificaciones estructurales introducidas en las moléculas, ninguna de ellas ha perdido la capacidad bloqueante de la Ang II.

3.4.11.3. Medida de la inhibición de la contracción celular en presencia de Ang II

En estos estudios se evaluó la capacidad de los compuestos sintetizados para prevenir la contracción celular en presencia de la propia Ang II, en comparación con **1**. Se trata de un ensayo funcional, que demuestra, *in vitro*, el posible potencial vasodilatador en la pared vascular. El estudio se realizó en células mesangiales humanas, muy parecidas a las células musculares lisas de la pared vascular, y la contracción celular se midió microfotografiando a las células de forma

³³ Torrecillas G., Boyano-Adanez M. C., Medina J., Parra T., Griera M., Lopez-Ongil S., Arilla E., Rodríguez-Puyol M., Rodríguez-Puyol D. "The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II". *Mol. Pharmacol.* **2000**, *59*, 104.

seriada y analizando el área de sección celular tras la preincubación durante 5 min con los distintos antagonistas y posterior tratamiento con Ang II (1 μ M, 30 min.).³⁴

Los resultados, que se muestran en la Tabla 1, son la media \pm EEM de 4 experimentos independientes, y los valores se expresan en porcentaje de inhibición de la contracción, considerando como 100 % de inhibición de la contracción la ausencia de cambios del área de sección celular. Todos los compuestos sintetizados de nuevo fueron más eficaces que **1** para inhibir la contracción celular, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tanto la medida de la capacidad antioxidante, del desplazamiento de la Ang II marcada y de la capacidad de inhibición de la contracción inducida por la propia Ang II se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Medida de la capacidad antioxidante, del desplazamiento de la Angiotensina II (Ang II) marcada y de la capacidad de inhibición de la contracción inducida por la propia Ang II.

	Capacidad Antioxidante	Desplazamiento de Ang II marcada	Inhibición de Contracción
1	0,04 \pm 0,01	53 \pm 8 %	62 \pm 4 %
27g	0,24 \pm 0,02*	77 \pm 11 %	NR
11g	0,16 \pm 0,02*	65 \pm 10 %	71 \pm 5 %
27e	0,31 \pm 0,04*	60 \pm 6 %	77 \pm 8 %
11e	0,31 \pm 0,03*	59 \pm 7 %	64 \pm 5 %
27h	0,27 \pm 0,03*	65 \pm 11 %	NR
11h	0,25 \pm 0,03*	68 \pm 7 %	71 \pm 7 %
27c	0,31 \pm 0,04*	66 \pm 9 %	NR

Notas.- En los experimentos de análisis de la capacidad antioxidante, todos los compuestos fueron utilizados a una concentración de 1 μ M, y los resultados se expresan en mM de peróxido de hidrógeno eliminados por el compuesto. En el análisis del desplazamiento de la Ang II marcada, tanto **1** como los distintos compuestos fueron utilizados a una concentración de 10 nM, y los resultados se expresan en porcentaje de desplazamiento de la Ang II marcada de su receptor. En los experimentos de inhibición de la contracción, todos los antagonistas fueron utilizados

³⁴ Duque I., García-Escribano C., Rodríguez-Puyol M., Díez-Marques M. L., López-Novoa J. M., Arribas I., Hernando L., Rodríguez-Puyol D. "Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli". *Am J. Physiol.* **1992**, *263*, F466.

a una concentración de 10 nM, y los resultados se expresan en tanto por ciento de inhibición de la contracción. En todos los casos, se hicieron 5 experimentos independientes, y los valores que se representan son la media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs **1**. En algunos casos, no se realizaron determinados ensayos (NR).

3.4.11.4. Medida de la capacidad para bloquear la contracción celular en presencia de Ang II y de peróxido de hidrógeno

En estos estudios se evaluó la capacidad de uno de los compuestos sintetizados de mayor capacidad antioxidante, el producto **27e**, para prevenir la contracción celular en presencia de 2 agonistas contráctiles, la propia Ang II y un metabolito activo derivado del oxígeno, el peróxido de hidrógeno. Se trata de un ensayo funcional, que demuestra, *in vitro*, el posible potencial vasodilatador e inhibidor de las acciones celulares de los metabolitos activos derivados del oxígeno en células de la pared vascular. El estudio se realizó en células mesangiales humanas, muy parecidas a las células musculares lisas de la pared vascular, y la contracción celular se midió microfotografiando a las células de forma seriada, y analizando el área de sección celular tras los distintos tratamientos.³⁵

Los resultados, son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes, y los valores se expresan en porcentaje del área celular en condiciones control, al que se le da un valor arbitrario de 100 %. El producto **27e** fue comparable a **1** en su capacidad para inhibir la contracción inducida por Ang II, pero fue superior en el bloqueo de los efectos celulares del peróxido de hidrógeno (Grafico 2).

La contracción celular se analizó midiendo, en microfotografías seriadas, los cambios en el área de sección celular (ASC). Las células fueron preincubadas con diferentes concentraciones **1** y **27e** durante 5 min, y tratadas posteriormente con Ang II (1 μ M, 30 min). Los resultados se expresan como porcentaje del área superficial celular (ASC) basal (% ASC), y son la media de cuatro experimentos diferentes. El análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre el efecto de **1** y **27e**.

³⁵ Duque I., García-Escribano C., Rodríguez-Puyol M., Diez-Marques M. L., Lopez-Novoa J. M., Arribas I., Hernando L., Rodríguez-Puyol D. "Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli". *Am J Physiol.* **1992**, 263, F466.

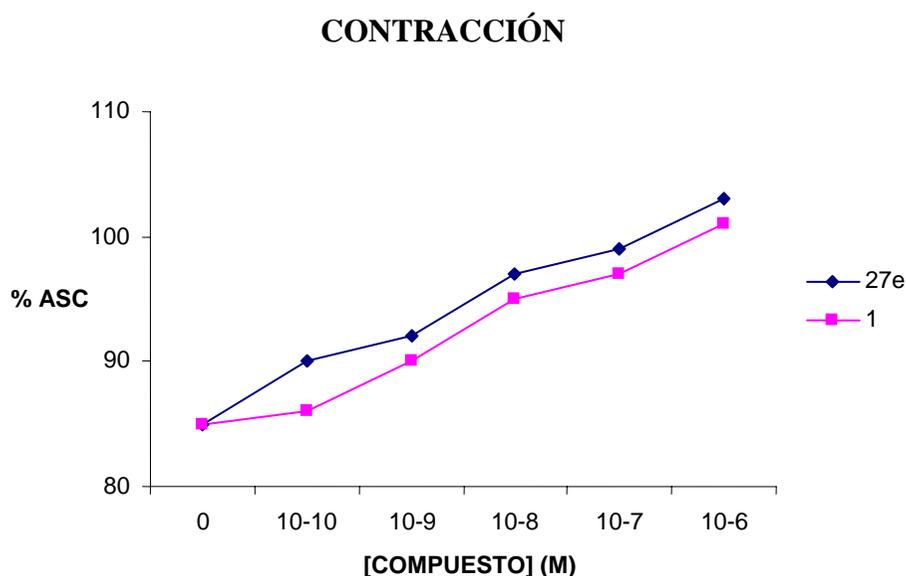


Gráfico 2. Efecto de **1** y **27e** para inhibir la contracción celular inducida por Ang II.

3.4.12. Experimentación *in vivo*

Con los ésteres **11e** y **27e** el grupo de investigación de Fisiología y Fisiopatología Renal de la Universidad de Alcalá llevó a cabo el estudio farmacológico *in vivo* en la Unidad de Experimentación Animal sobre ratas Wistar macho, de 2 meses de edad (7 ratas por grupo), con ciclos controlados de luz y oscuridad (14/10h) y con una temperatura de $22^{\circ}\text{C}\pm 2$.

Las ratas tuvieron libre acceso de agua y comida durante todo el tiempo. Los animales fueron tratados durante 4 semanas con L-NAME (éster metílico de N-nitro-L-arginina) (20 mg/kg/día), un inhibidor no selectivo de la óxido nítrico sintetasa que se utiliza experimentalmente para inducir hipertensión. Antes y después del tratamiento con L-NAME se midió la presión sanguínea mediante esfigmomanómetro de cola. A continuación se les administró también durante otras 4 semanas L-NAME más: Losartán (20 mg/kg/día), Fragmento Antioxidante (10 mg/kg/día), Losartán más F. Antioxidante, **27e** (28 mg/kg/día) y **11e** (30 mg/kg/día). Todos los tratamientos se administraron en el agua de bebida. Pasado este tiempo se volvió a medir la presión sanguínea (Gráfico 3). Losartán disminuyó la presión sanguínea sistólica en las ratas tratadas con L-NAME, pero los valores observados después de 4 semanas de tratamiento no alcanzaron el valor control. El tratamiento

con **11e** y **27e** no sólo disminuyó la presión sistólica sino que la normalizó en mayor medida que losartán. El tratamiento con sólo fragmento antioxidante o una mezcla de éste y losartán apenas tuvo efecto sobre la tensión arterial.

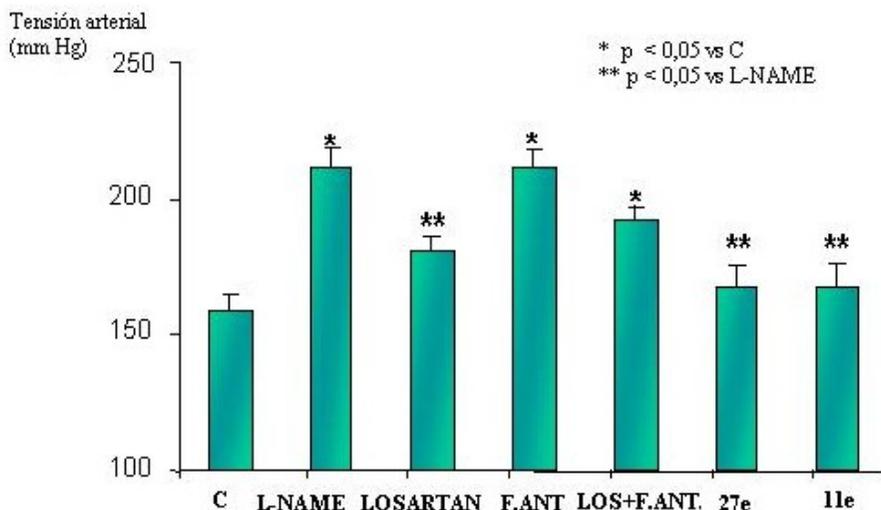


Gráfico 3. Tensión arterial (mmHg).

Los animales fueron introducidos individualmente en jaulas metabólicas, durante 24h, para la obtención de orina, que fue centrifugada 10 min a 1500xg, se recogió el sobrenadante y se guardó a -20°C para su posterior análisis. Los animales fueron anestesiados con halotano, se les extrajo sangre del corazón que fue recogida en tubos que contenían EDTA. Las muestras de sangre se centrifugaron 20 min a 1500xg y se guardaron alícuotas de plasma a -20°C hasta su análisis. En las muestras de orina y plasma se realizaron análisis bioquímicos, mediante un analizador automático, Olympus All 5400 (Olympus) (Tabla 2). Aunque la naturaleza de las moléculas bajo estudio, losartán y fragmento antioxidante, no sugirió la aparición de efectos adversos, éste análisis se realizó para controlar el posible efecto adverso de la administración de los fármacos. Se estudiaron parámetros metabólicos, hepáticos y renales. El tratamiento con L-NAME durante 8 semanas indujo un ligero incremento, pero estadísticamente importante, de la concentración de glucosa, triglicéridos y LDH en suero, lo que no fue observado en ratas tratadas con losartán, **11e** ó **27e** durante 4 semanas. Los resultados permiten excluir un efecto tóxico de los ésteres híbridos.

	C	L-NAME	Losartán	F.Antiox	Los+F.An tiox	27e	11e
Glucosa (mg/dl)	144 ± 5	165±10*	149± 8	170±14*	168±14*	149 ± 11	154±10
Colesterol (mg/dl)	49 ± 3	57 ± 6	48 ± 1	58 ± 6	54 ± 3	55 ± 2	52 ± 4
Triglicéridos (mg/dl)	52 ± 14	84± 15*	65± 13	70 ± 7	69± 11	60± 17	52± 12
Calcio (mg/dl)	8,5±0,3	8,5±0,3*	8,3±0,4	8,8 ± 0,2	8,5± 0,3	8,6± 0,3	8,6± 0,4
Proteínas (mg/dl)	4,5 ± 0,3	4,5± 0,5	5 ± 0,3	5,2 ± 0,4	4 ± 0,4	4,5± 0,47	4,5± 0,5
LDH (mg/dl)	588 ± 20	643± 4*	622± 26	591±33	610± 7	600± 12	561± 49
GOT (UI/L)	85 ± 9	93± 12	91 ± 4	77 ± 12	93± 10	85 ± 7	83 ± 4
GPT (UI/L)	28 ± 3	32 ± 5	24 ± 1	24 ± 1	22 ± 4	25 ± 2	24 ± 2
Creatinina (mg/dl)	0,42±0,02	0,44±0,01	0,42±0,02	0,47±0,02	0,44±0,01	0,43±0,01	0,42±0,01
Uréa (mg/dl)	25 ± 3	29 ± 4	24 ± 3	27 ± 1	24 ± 3	24 ± 4	24 ± 5
Na (mmol/l)	146 ± 3	151± 4	151 ± 3	148 ± 7	148± 4	151± 3	151± 4
K (mmol/l)	4,4 ± 0,1	4,5± 0,2	4,7 ± 1	4,1±1,3	4,2± 0,2	4,4± 0,2	4,6± 0,2

Tabla 2. Parámetros bioquímicos en los diferentes grupos de ratas.

Se extrajo el corazón, la aorta y los riñones, y estos tejidos se utilizaron para el estudio macro y microscópico. Para el estudio macroscópico, se eligió el peso del corazón y el espesor de la pared de aorta para evaluar las consecuencias de los cambios observados en la presión sanguínea. En el caso del peso del corazón (Gráfico 4), tanto losartán como **11e** y **27e** fueron capaces de normalizar el incremento de peso inducido por L-NAME. En el caso del espesor de la pared de aorta (Gráfico 5), estos tres compuestos sólo previenen parcialmente el efecto de L-NAME. Estos resultados, junto con los cambios en la presión arterial, sugieren que **11e** y **27e** son, al menos, tan potentes como losartán en el control de la hipertensión y en la prevención del daño cardiovascular. Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas de los efectos de estos dos híbridos en comparación con losartán respecto de la prevención del daño cardiovascular podría ser una consecuencia del propio diseño experimental, ya que cuatro semanas de tratamiento no parece ser un periodo de tiempo suficiente para demostrar claramente una prevención del daño del tejido.

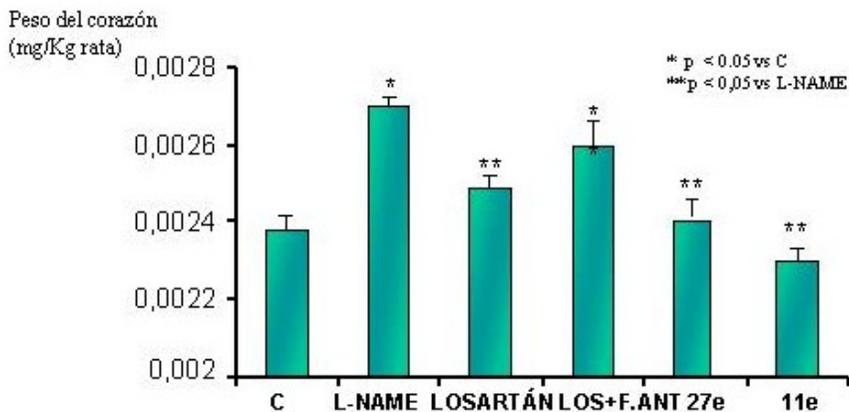


Gráfico 4. Peso de corazón (mg/Kg rata).

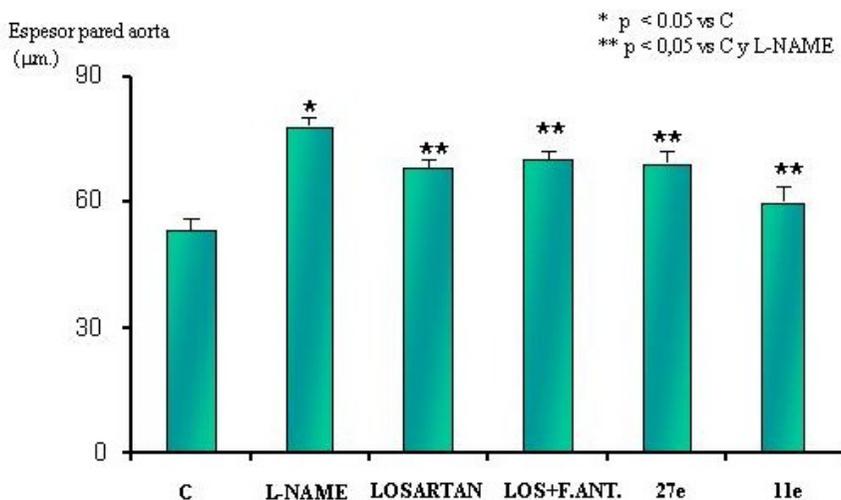


Gráfico 5. Espesor de pared de aorta (µm.)

Por este motivo, se realizó un análisis más sofisticado para evaluar mejor el daño vascular. Los órganos extraídos se guardaron parte en PAF 4% (paraformaldehído) para su posterior análisis inmunohistoquímico, así como para la determinación tisular de nitrotirosina (Figura 11) y proteínas de matriz extracelular (Fibronectina y Colágeno I) en aorta y riñón (Gráfico 6 y Gráfico 7). La nitrotirosina es un indicador importante de la interacción entre el óxido nítrico (NO), los radicales libres (RLs) y las proteínas. Cuando el radical libre anión superóxido (O_2^-) reacciona con el NO se forma el

radical anión peroxinitrilo (ONOO⁻) reduciendo la biodisponibilidad del NO, reaccionando con los residuos tirosina de las proteínas y contribuyendo a la patogénesis y el mantenimiento de la hipertensión. Por otro lado, el Colágeno I es un indicador del estado hipertenso y fibrótico, ya que la hipertensión aumenta la producción de colágeno I, el cual se acumula en la adventicia de las arterias coronarias intramiocárdicas y en el intersticio miocárdico produciendo hipertrofia ventricular izquierda.

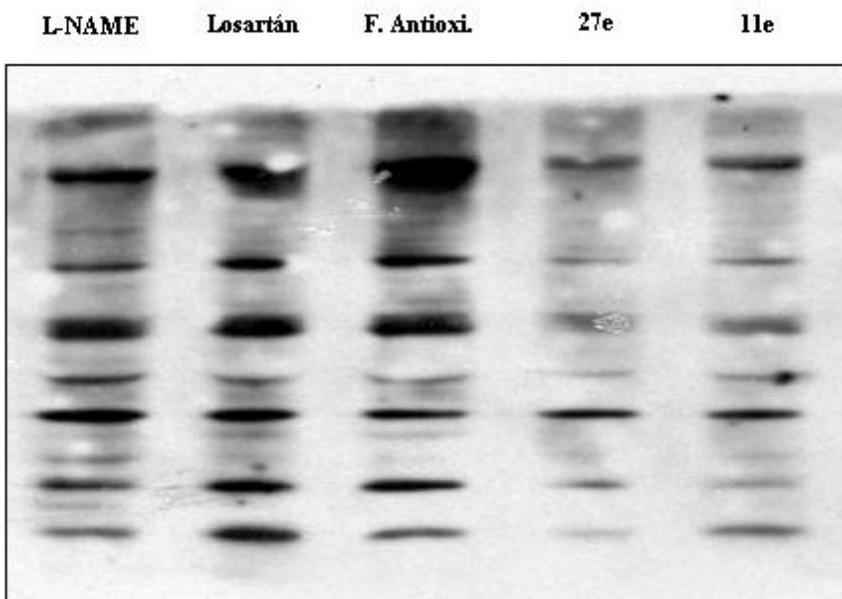


Figura 11. WB Nitrotirosina.

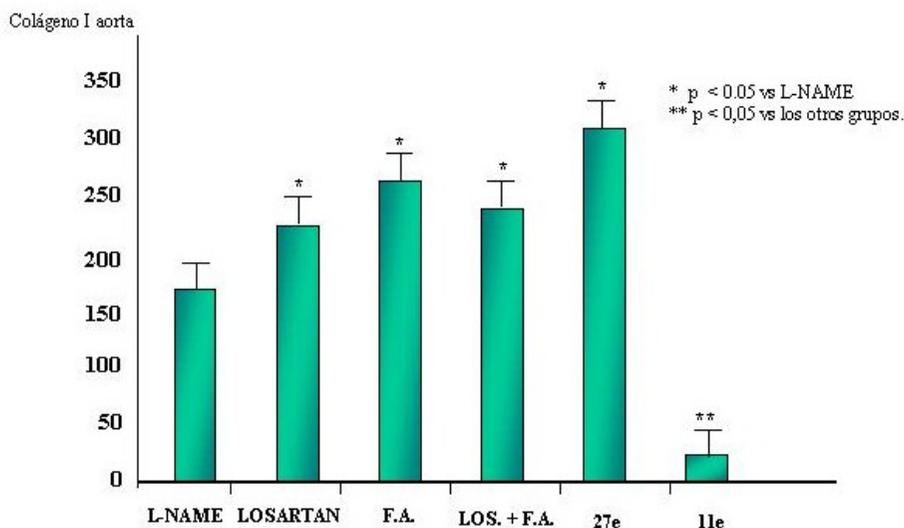


Gráfico 6. Colágeno I aorta.

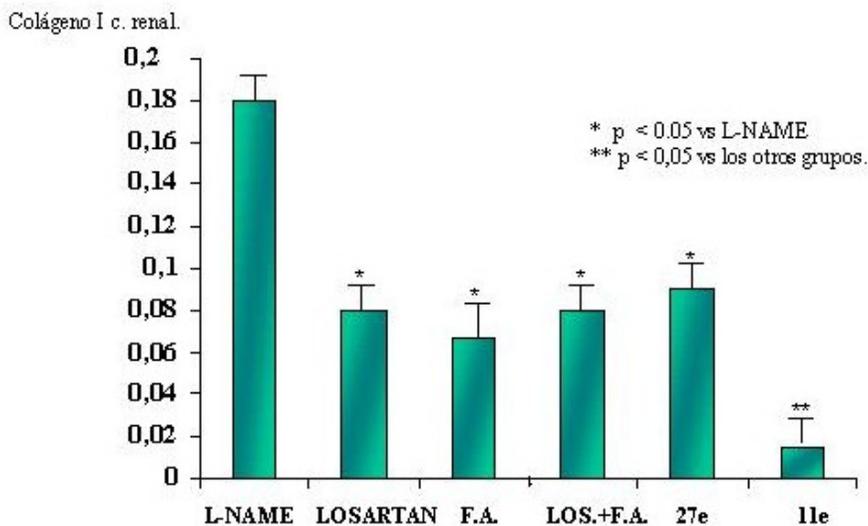
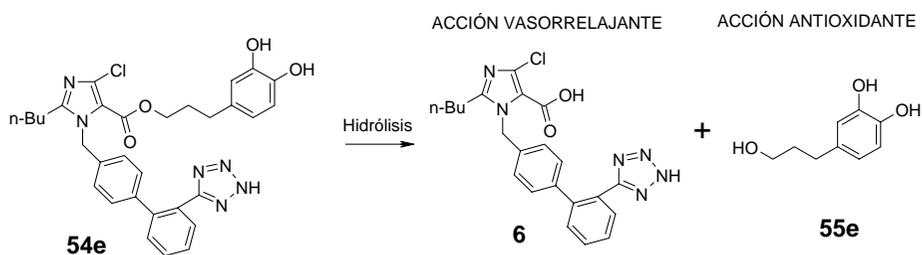


Gráfico 7. Colágeno I c. renal.

3.5. Síntesis del éster inverso 54e

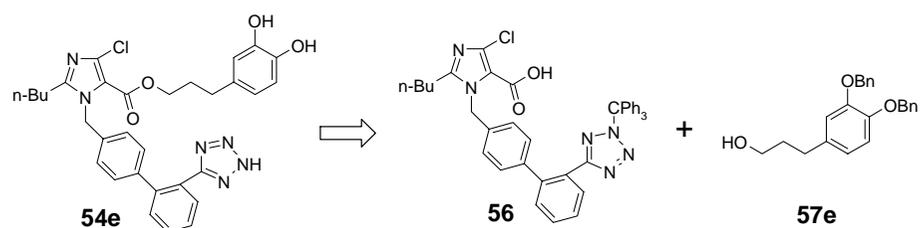
Debido a que el éster **11e** es el que tiene una mayor capacidad antioxidante y no presenta diferencias significativas con **1** respecto de la inhibición de la contracción y, presumiblemente, respecto del desplazamiento de Ang II marcada, nos planteamos preparar el éster inverso **54e** para realizar un estudio farmacológico similar. Los ésteres inversos se propusieron debido a que la eventual hidrólisis de los

mismos produciría directamente el metabolito activo **6** de **1**, y el alcohol **55e**. De esta manera, **1** no se tiene que oxidar hasta **6** *in vivo*, aumentando así la velocidad de acción (Esquema 28).



Esquema 28. Fragmentos resultantes de la hidrólisis fisiológica de **54e**.

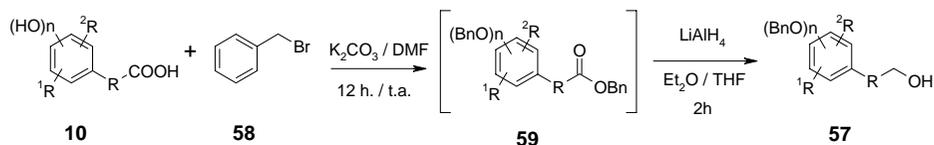
Según el esquema retrosintético propuesto para el éster inverso **54e**, los dos fragmentos que producirían la esterificación directa a través de la reacción de Mitsunobu serían el ácido **56** junto con el alcohol **57e** derivado del fragmento antioxidante de mayor capacidad **10e** (Esquema 29).



Esquema 29. Esquema retrosintético del éster inverso **54e**.

3.5.1. Preparación de alcoholes protegidos **57**

En el momento de abordar esta etapa del proyecto no se conocían aun los resultados de capacidad antioxidante de los ésteres **27** y **11**. Por ello, nos planteamos acceder a los alcoholes protegidos **57** correspondientes a los ácidos **10** de mayor capacidad antioxidante (Gráfico 1). Estos se trataron inicialmente con bromuro de bencilo **58** y los ésteres formados **59** se trataron posteriormente, sin purificar, con LiAlH₄ (Esquema 30). Los alcoholes **57** se obtuvieron con buenos rendimientos (Figura 11).



Esquema 30. Síntesis de alcoholes **57**.

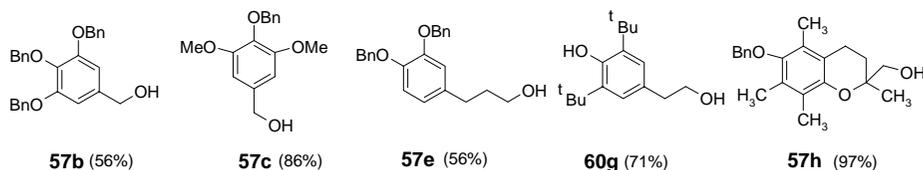
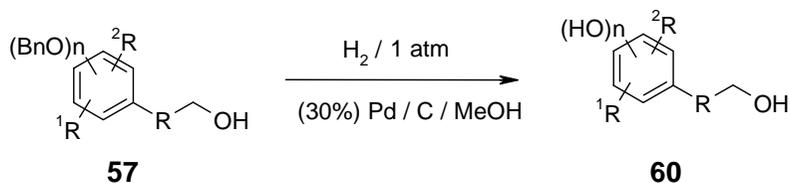


Figura 11. Alcoholes **57** preparados.

3.5.2. Desprotección de los alcoholes **57**

La desprotección de los alcoholes **57** se llevó a cabo mediante hidrogenación catalítica utilizando como catalizador Pd/C (30%) (Esquema 31), obteniéndose los alcoholes **60** con buenos rendimientos (Figura 12).



Esquema 31. Desprotección de los alcoholes **57** mediante hidrogenación catalítica.

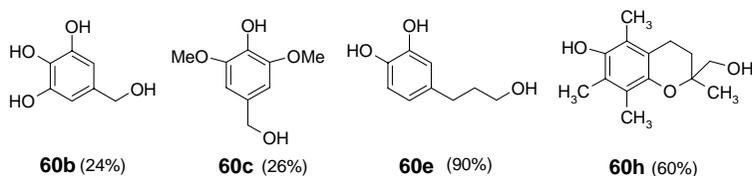


Figura 12. Alcoholes **60** preparados.

3.5.3. Oxidación del aldehído **40**

Inicialmente nos propusimos llevar a cabo la oxidación del aldehído **40** o el alcohol **12** en condiciones no ácidas, para evitar la desprotección del grupo tritilo, con el objetivo de obtener el ácido **56**,

necesario para posteriormente aplicar la esterificación planteada en el Esquema 29. Se realizaron distintos ensayos de oxidación, pero en ningún caso pudo aislarse el ácido **56** (Esquema 31; Tabla 2).



Esquema 31. Oxidación del alcohol **12** y del aldehído **40**.

Tabla 2. Condiciones de oxidación de **12** y **40**.

N	R	Condiciones	Disolvente	Temp. (°C)	Tiempo.
1	CH ₂ OH	MnO ₂ μw	H ₂ O/EtOH	80	50 min.
2	CH ₂ OH	TEMPO/Na ₃ PO ₄ NaClO ₂ /NaOCl	CH ₃ CN	35	5 horas
3	CHO	NaCN / CH ₃ COOH / MnO ₂	EtOH	25	12 horas
4	CHO	NaCN / CH ₃ COOH / MnO ₂ / μw	EtOH	72	10 min.
5	CHO	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ PBr / NaOH	CH ₂ Cl ₂	25	1 hora
6	CHO	[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ NBr / NaOH	CH ₂ Cl ₂	25	1 hora
7	CHO	RhCl(PPh ₃) / Na ₂ CO ₃	EtOH	Reflujo	12 horas
8	CHO	KMnO ₄	Acetona/H ₂ O	55	6 horas
9	CHO	NaOH (12 M)	-	Reflujo	1 hora

Según se ha descrito previamente, la oxidación de **1** (en forma de sal potásica) al ácido **6** con MnO₂ fue realizada con éxito en un horno microondas.³⁶ Sin embargo, cuando esta oxidación se aplicó al alcohol **12** no se formó el ácido **56**, y sólo se pudo aislar **1** como consecuencia de la pérdida del grupo tritilo (entrada 1). La oxidación de **12** con TEMPO sólo permitió aislar el producto de partida (30%) junto con el aldehído **40** (17%) (entrada 2).³⁷ Por otro lado, en la oxidación del aldehído **40** mediante NaCN/AcOH/MnO₂ no se observó transformación del producto de partida (entradas 3 y 4).³⁸ Tampoco hubo transformación en la oxidación de Cannizaro de **40**, ni siquiera

³⁶ Santagada, V.; Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; Terracciano, S.; Texeira, C.E.; Caliendo, G. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1149-1152.

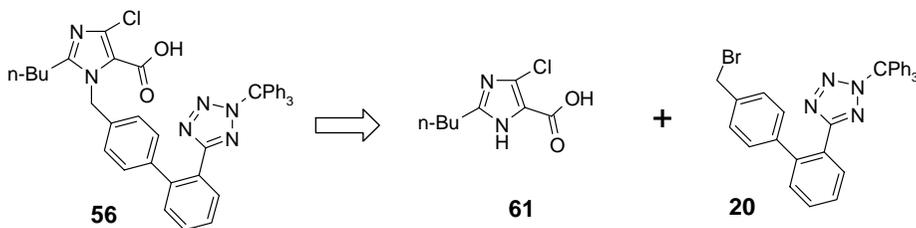
³⁷ Miller, R. A.; Hoerner, R. S. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 285-287.

³⁸ Corey, E. J.; Gilman, N. W.; Ganem, B. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5616-5617.

cuando se utilizaron catalizadores de transferencia de fase (entradas 5, 6 y 7). En la oxidación del aldehído **40** con $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)/\text{Na}_2\text{CO}_3$ se aisló el producto de partida (entrada 8).³⁹ Finalmente, el uso de KMnO_4 tampoco afectó a **40** (entrada 9).

3.5.4. Oxidación del 2-butil-5-cloro-3H-imidazol-4-carbaldehído **21**

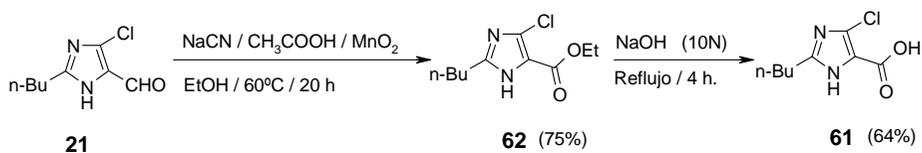
En esta etapa de desarrollo del proyecto de Tesis Doctoral ya disponíamos de los datos farmacológicos que anteriormente se han mostrado y comentado en la Tabla 1. Por ello, y dado que el compuesto **11e** era el más interesante desde el punto de vista de presentar una mayor capacidad antioxidante, a partir de este momento nos centramos sólo en la obtención de híbridos que contuvieran exclusivamente la parte antioxidante correspondiente al ácido **10e**. Por otro lado, debido a los resultados negativos obtenidos en la oxidación de **12** y **40**, se decidió cambiar el esquema de síntesis por otro que eludiera la obtención del ácido **56** por oxidación. Un camino alternativo podría implicar llevar a cabo la preparación de **56** por reacción de alquilación entre el ácido **61** y el derivado halogenado **20**, lo que supondría la preparación del ácido imidazolcarboxílico **61** (Esquema 32).



Esquema 32. Camino alternativo a la síntesis de **56**.

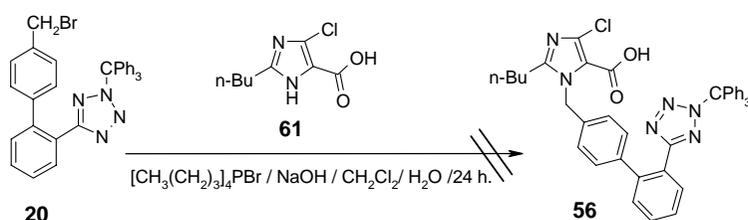
En primer lugar, a partir del aldehído comercial **21** se preparó el éster **62** en un sólo paso a través de tres reacciones en cascada que suponen, en primer lugar, la formación de una cianohidrina, luego, la oxidación de la misma a cianocetona, y finalmente, alcoholisis del nitrilo.³⁸ La posterior hidrólisis básica de **62** permitió obtener el ácido **61** con rendimiento moderado (Esquema 33).

³⁹ Weber, E.; Csöregi, I.; Stensland, B.; Czugler, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3297-3306.



Esquema 33. Síntesis del ácido imidazolcarboxílico **61**.

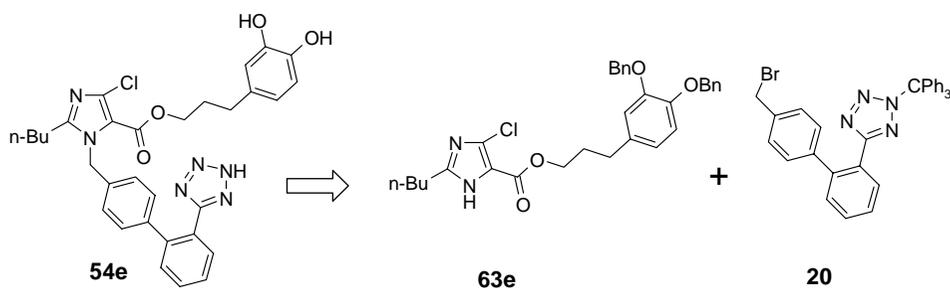
A partir del ácido **61** se intentó la alquilación con el fragmento **20** sin resultado, debido probablemente a la baja transferencia de los materiales de partida entre las fases como consecuencia de la baja lipofilia de la sal sódica del ácido **61**, recuperándose aquellos inalterados (Esquema 34).



Esquema 34. Intento de síntesis de **56** por alquilación en transferencia de fase.

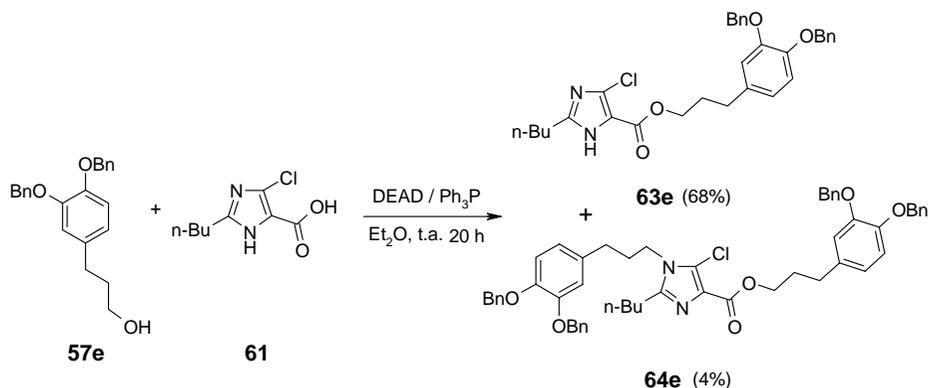
3.5.5. Síntesis de los ésteres híbridos **54e** y **67e**

Debido a la imposibilidad de preparar el ácido **56** por alquilación de los fragmentos **20** y **61**, nos planteamos desarrollar otra vía alternativa que evitara su formación e implicara la esterificación del ácido **61** previamente a la alquilación. Esto supondría preparar primero el éster **63e** para, después de alquilación con **20** y posterior desprotección, conseguir el éster **54e** (Esquema 35).



Esquema 35. Retrosíntesis del éster **54e**.

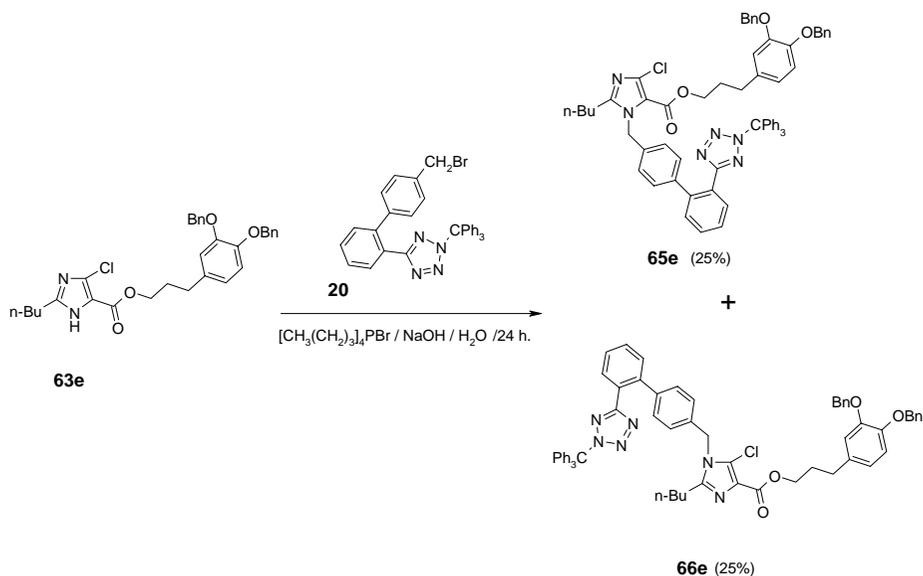
En primer lugar, se llevó a cabo la esterificación, en condiciones de Mitsunobu, del ácido **61** con el alcohol **57e**. De la mezcla de reacción se aisló el éster **63e** (68%) y, como producto secundario, su derivado *N*-alquilado **64e** (4%) (Esquema 36).



Esquema 36. Síntesis del éster **63e**.

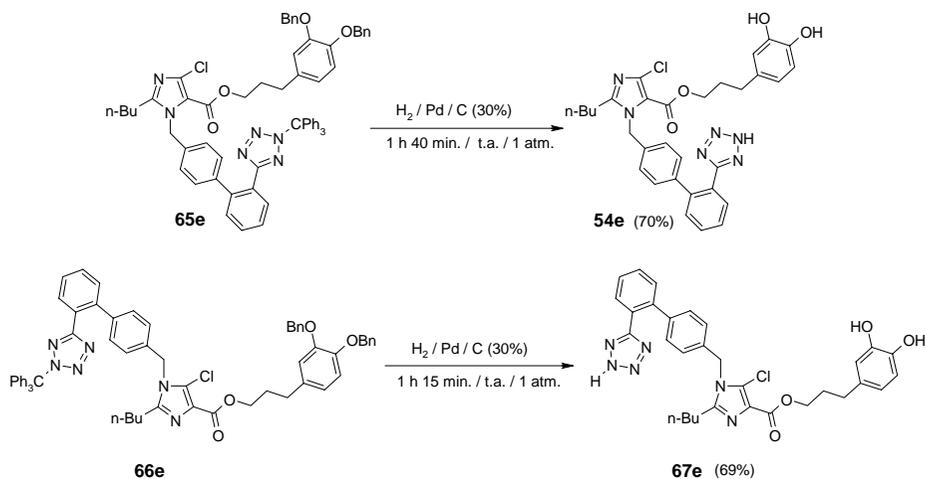
A continuación, a partir del éster **63e** se llevó a cabo la reacción de alquilación con el fragmento **20**, obteniéndose los productos isómeros **65e** y **66e** en proporción (1:1) resultantes de la alquilación en la posición 3 y 1, respectivamente, del anillo de imidazol, de forma similar a como ya se había descrito en una aproximación sintética a la síntesis de **1** (Esquema 37).⁴⁰

⁴⁰ Duncia, J. V.; Chiu, A. T.; Carini, D. J.; Gregory, G. B. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1312-1329.



Esquema 37. Síntesis de los ésteres **65e** y **66e** por alquilación de **63e**.

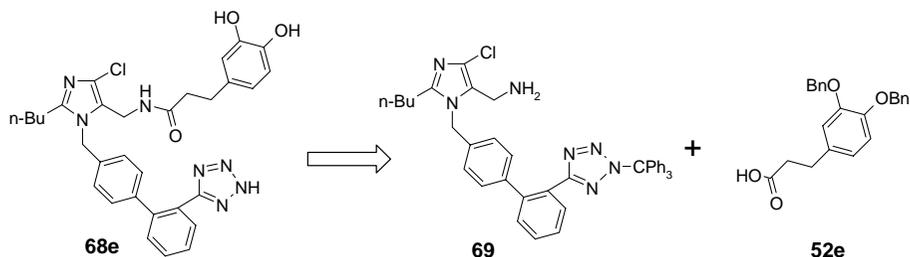
Este resultado, por un lado limitante en la síntesis del éster **54e**, fue aprovechado para acceder al nuevo éster **67e**, no considerado inicialmente dentro de nuestros objetivos. Así, finalmente, se desprotegeron los grupos bencilo y tritilo de **65e** y **66e** mediante hidrogenación a presión atmosférica, utilizando como catalizador paladio sobre carbono al 30%, para dar los ésteres **54e** y **67e** con buenos rendimientos (Esquema 38).



Esquema 38. Obtención de **54e** y **67e**.

3.6. Síntesis de la amida 68e

Otro de los objetivos de este proyecto de Tesis Doctoral era la síntesis de híbridos de **1** y antioxidantes fenólicos unidos entre sí a través de una función amida. Para abordar este objetivo nos planteamos primero la síntesis de la amida **68e**. Esta podría prepararse mediante reacción de amidación entre la amina **69** derivada de **1** y el ácido **52e** (Esquema 39).



Esquema 39. Esquema retrosintético de la amida **68e**.

Para la síntesis de la amina **69** se partió del aldehído **40**. Primero, se trató **40** con clorhidrato de hidroxilamina en distintas condiciones para obtener la correspondiente oxima. Sin embargo, en todas las condiciones ensayadas se produce, además de la transformación del grupo aldehído, la pérdida del grupo tritilo debido al HCl generado en la reacción, para dar la oxima **70** de forma cuantitativa (Esquema 40). La adición de TEA para neutralizar el HCl formado no evitó la desprotección del anillo de tetrazol (entrada 3) (Tabla 3).

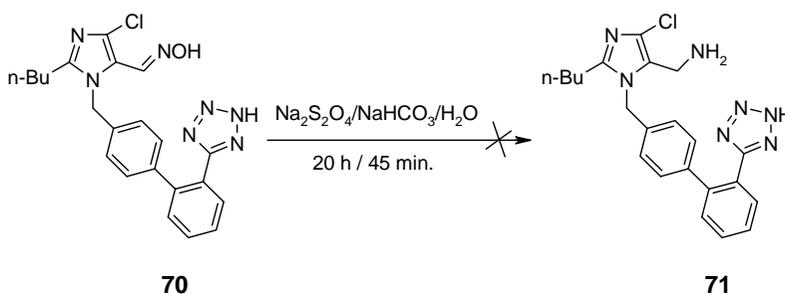


Esquema 40. Formación de la oxima **70** a partir del aldehído **40**.

Tabla 3. Condiciones de síntesis de la oxima **70**.

Entrada	NH ₂ OH.HCl (equiv)	TEA (equiv)	Tiempo (h)	Temperatura	Rend (%)
1	2,2	-	3	t.a.	84
2	2,2	-	2	Reflujo	99
3	1,1	1,1	1	Reflujo	97

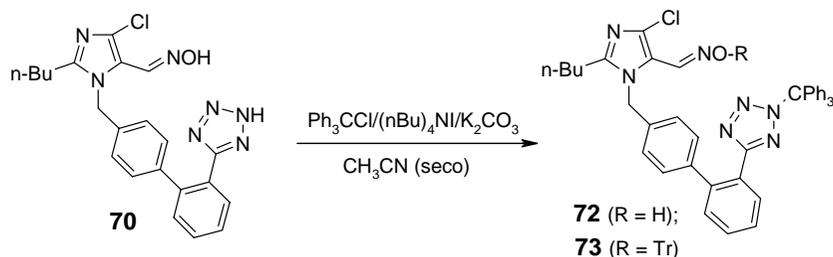
Posteriormente, se intentó llevar a cabo la reducción de la oxima **70** a la amina **71** con ditionito sódico pero se recuperó la oxima de partida inalterada (Esquema 41).⁴¹ Debido a la insolubilidad de la oxima **70** en distintos disolventes, incluso en los más polares, se decidió reprotgerla con el grupo tritilo.⁴²

**Esquema 41.** Intento de reducción de **70** con Na₂S₂O₄.

Al llevar a cabo la protección del grupo anillo de tetrazol de **70** con cloruro de tritilo, se observó que además de la oxima **72**, se aislaba también su correspondiente tritiléter de oxima **73** (Esquema 41). Por ello, se realizó una serie de ensayos para tratar de ajustar las condiciones se permitieran la protección única de grupo tetrazol manteniendo el grupo oxima libre o llevar a cabo tanto la protección del tetrazol como de la oxima (Tabla 4).

⁴¹ *Heterocyclic Chemistry*; J.A. Joule and K. Mills; Blackwell Science **2000**.

⁴² Huff, B. E., LeTourneau, M. E.; Staszak, M. A.; Ward, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3655-3658.



Esquema 41. Protección de la oxima **70** con cloruro de tritilo.

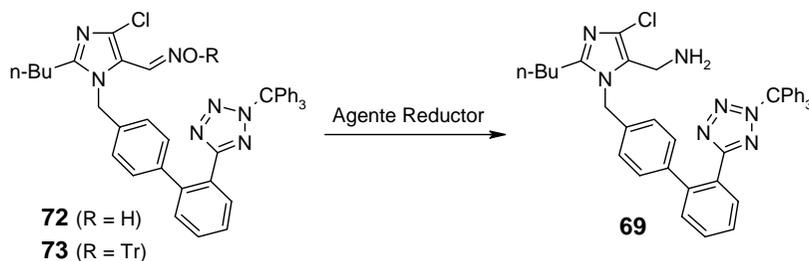
Tabla 4. Condiciones de protección de la oxima **70**.

Nº	Ph ₃ CCl (equiv)	(nBu) ₄ NI (equiv)	K ₂ CO ₃ (equiv)	NaOH (equiv)	Tiempo (h)	Temp.	72 (%)	73 (%)
1	1	0,1	0,5	-	24	t.a.	-	-
2	1	0,1	-	1,05	24	t.a.	-	-
3	1,4	0,1	2	-	3	Reflujo	27	18
4	1,8	0,1	2	-	4	Reflujo	35	14
5	1,8	0,1	2	-	5	Reflujo	11	21
6	3	0,3	2,2	-	3	Reflujo	-	48

En todos los casos se recuperó producto de partida. Fue necesario trabajar a reflujo para que se produzca reacción, obteniéndose una selectividad baja favorable al producto monoprotegido **72** a menores tiempos y con menor exceso de TrCl. Utilizando un mayor exceso de reactivo y tiempos de reacción más largos se obtuvo solamente **73** (entrada 6). Ambos productos fueron separados por cromatografía en columna.

A continuación se ensayó la reducción de **72** y **73** con distintos reductores con el fin de obtener la amina **69**.⁴³ Todas las reacciones se realizaron a temperatura ambiente, debido a que un aumento de esta produce la descomposición del producto inicial (Esquema 42; Tabla 5).

⁴³ Watanabe, S.; Fujita, T.; Sakamoto, M.; Hamano, H.; Kitazume, T.; Yamazaki, T. *J. Fluorine Chem.* **1997**, *83*, 15-19.



Esquema 42. Reducción de **72** y **73** a la amina **69**.

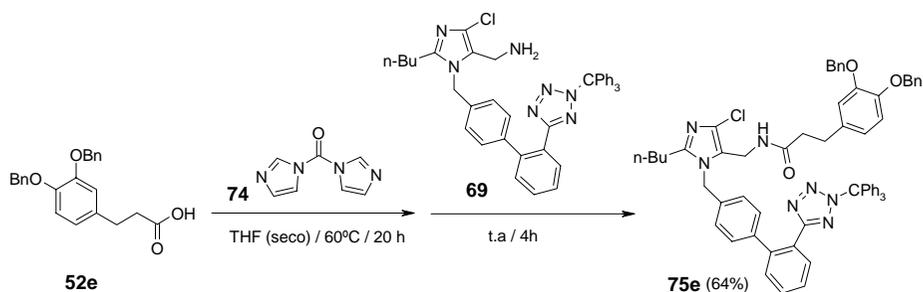
Tabla 5. Agentes reductores utilizados en la preparación de **69**.

Nº	R	Agente Reductor	Disolvente	Tiempo (h)	CH ₂ NH ₂ (%)
1	-CPh ₃	LiAlH ₄	Et ₂ O/THF	72	-
2	-H	NaBH ₄ /TiCl ₄	MeO(CH ₂) ₂ OMe	24	-
3	-CPh ₃	LiAlH ₄ /CH ₃ ONa	THF	1,25	-
4	-CPh ₃	LiAlH ₄	THF	3,5	43

Para la reducción con LiAlH₄ en Et₂O se necesitó la adición de THF para disolver **72** pero no condujo al producto **69** (entrada 1). Utilizando NaBH₄/TiCl₄ para **72** (entrada 2) o LiAlH₄/CH₃ONa para **73** (entrada 3) se observó descomposición. Solamente se obtuvo **69** (43%) con LiAlH₄/THF en la reducción de **73** (entrada 5).

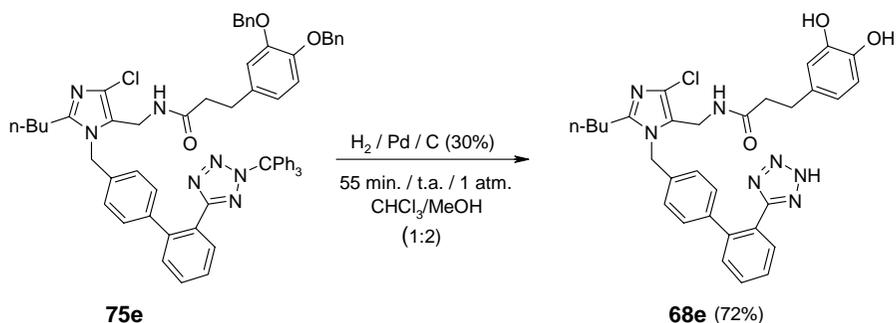
Sintetizados los productos precursores **69** y **52e**, la reacción de amidación se realizó utilizando CDI **74** como reactivo activante, obteniendo la amida **75e** con un buen rendimiento (64%) (Esquema 43).⁴⁴

⁴⁴ Leschke, C.; Storm, R.; Breitweg-Lehmann, E.; Exner, T.; Nurnberg, B.; Schunack, W. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3130-3139.



Esquema 43. Reacción de amidación usando CDI.

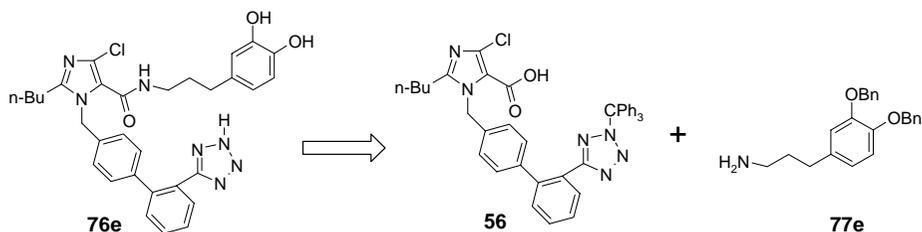
Una vez sintetizada la amida **75e**, se procedió a la desprotección de los grupos protectores de la forma habitual, realizando una hidrogenación catalítica utilizando paladio sobre carbono al 30%, obteniéndose el producto desprotegido **68e** con buen rendimiento (72%) (Esquema 44).



Esquema 44. Preparación de **68e** por hidrogenación catalítica.

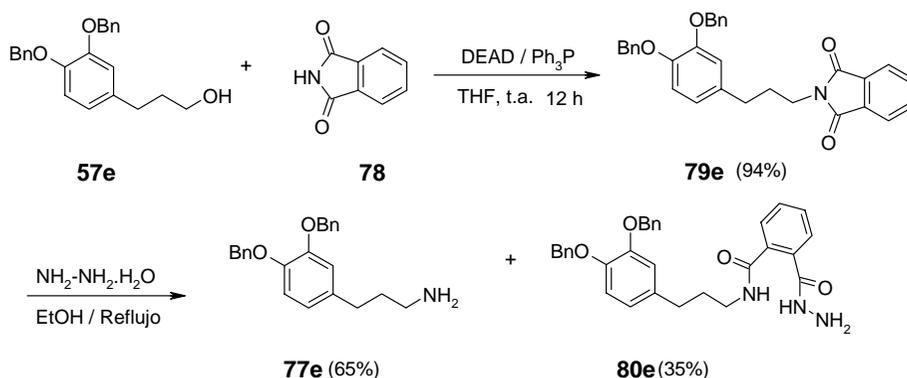
3.7. Síntesis de la amida inversa **76e**

De forma análoga a como se hizo en el caso de híbridos con un grupo éster, en el caso del grupo funcional amida se preparó también la amida **76e** donde los dos fragmentos del híbrido ocupan posiciones cambiadas respecto a la amida **68e** sintetizada previamente. Para la síntesis de la amida inversa **76e** se partió del ácido **56**, cuya síntesis fue reinvestigada, y la amina **77e** (Esquema 45).



Esquema 45. Esquema retrosintético de la amida inversa **76e**.

En primer lugar, la síntesis de la amina **76e** se llevó a cabo mediante alquilación de ftalimida **78** con el alcohol **57e** en condiciones de Mitsunobu para dar **79e** (94%) (Esquema 46).⁴⁵ Posteriormente, **79e** se trató con hidrazina a reflujo obteniéndose como producto principal la amina **77e** (65%), junto con el producto **80e** (35%) que precipita en la reacción. El compuesto **80e** se volvió a tratar con etanol a reflujo e hidrazina con el fin de obtener más cantidad de **77e**, sin que este se formara.

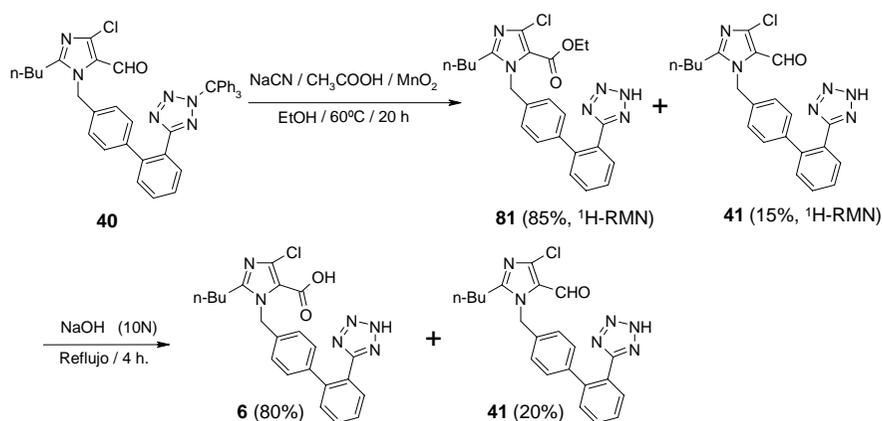


Esquema 46. Síntesis de la amina **77e**.

A continuación, se reinvestigó la preparación del ácido **56** para buscar una alternativa al problema de selectividad encontrado en la alquilación del imidazol **63e** durante la síntesis del éster inverso híbrido **54e** (Esquema 37).³⁸ Así, se volvió a investigar la reacción de oxidación de **40** (Esquema 31, Tabla 2). Cuando la oxidación con NaCN/MnO₂ en medio AcOH/EtOH fue realizada a la temperatura de 60°C, se produjo, además, la desprotección del grupo tritilo, obteniéndose una mezcla del éster **81** (85%, H-RMN) y el aldehído **41** (15%, H-RMN), no separable por cromatografía en columna. Esta

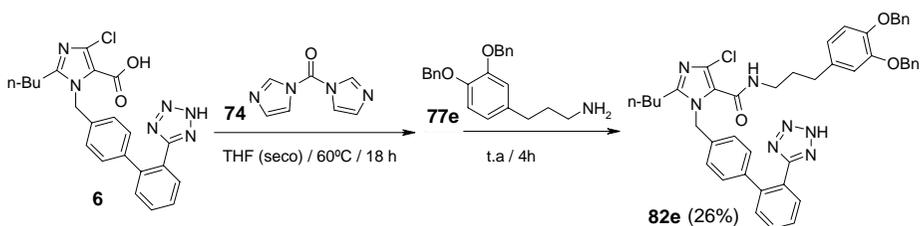
⁴⁵ Mitsunobu, O.; Wada, M.; Sano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 679-680.

mezcla se utilizó en la siguiente reacción de hidrólisis básica. De la mezcla de la reacción de hidrólisis se aisló, por cromatografía en columna, el ácido **6** (80%) resultante de la pérdida del grupo tritilo además del aldehído **41** (20%) (Esquema 47).



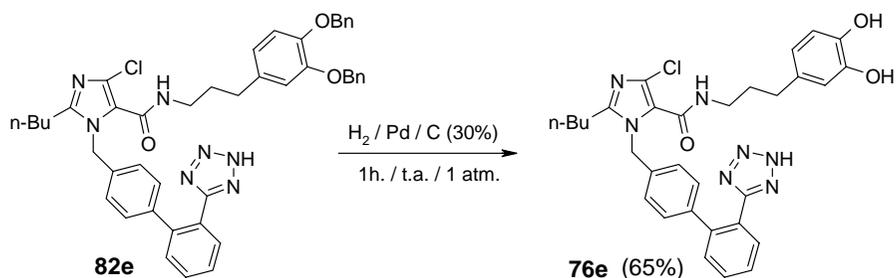
Esquema 47. Síntesis del ácido **6** a partir del aldehído **40**.

A continuación, se llevó a cabo amidación del ácido **6** con la amina **77e** y CDI **74**, obteniéndose la amida **82e** (26%) y recuperando el ácido de partida **3** (51%) (Esquema 48).⁴⁴



Esquema 48. Reacción de amidación entre el ácido **6** y la amina **77e**.

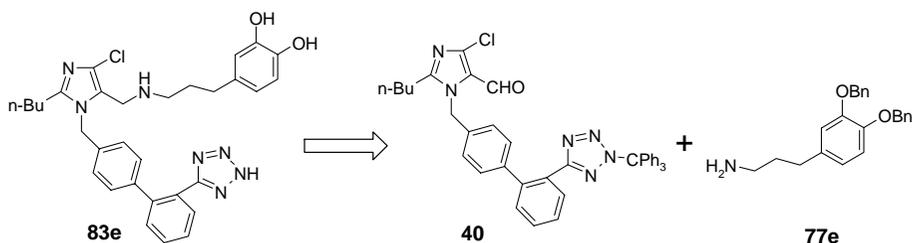
Una vez sintetizada la amida **82e**, se llevó a cabo la desprotección de los grupos protectores de la forma habitual, realizando una hidrogenación catalítica utilizando paladio sobre carbono al 30%, obteniéndose la amida inversa **76e** (65%) (Esquema 49).



Esquema 49. Hidrogenación catalítica de la amida **82e**.

3.8. Síntesis de la amina **83e**

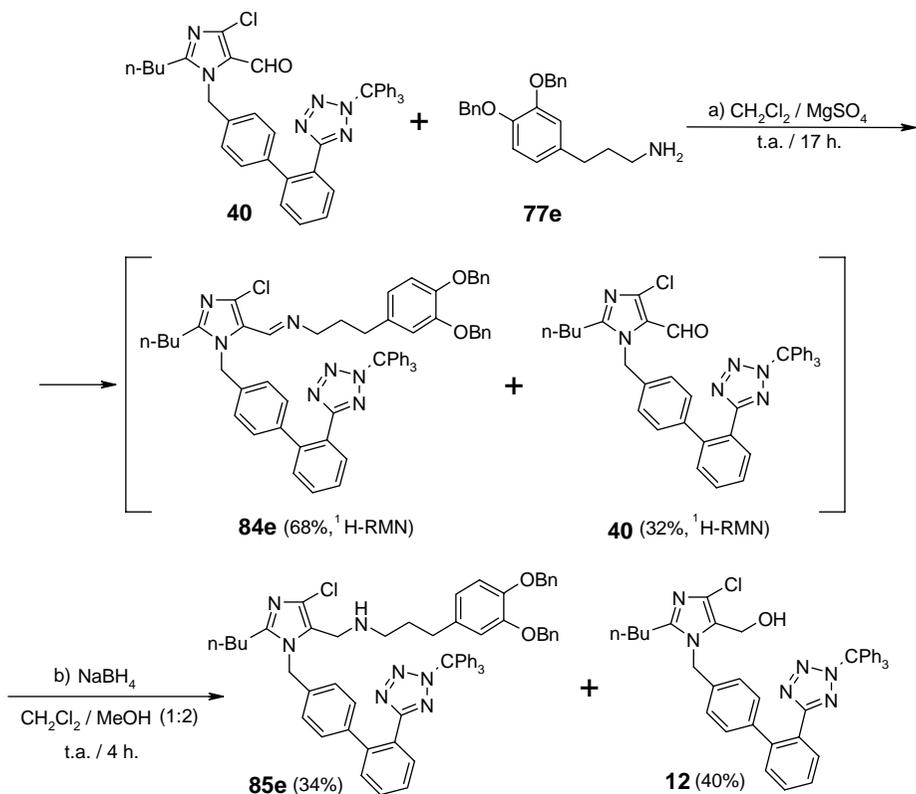
El siguiente grupo funcional investigado para la obtención de híbridos de **1** fue la función amina. Así, nos planteamos obtener la amina **83e** mediante aminación reductiva del aldehído **40** y la amina **77e** (Esquema 50).



Esquema 50. Esquema retrosintético de la amida **83e**.

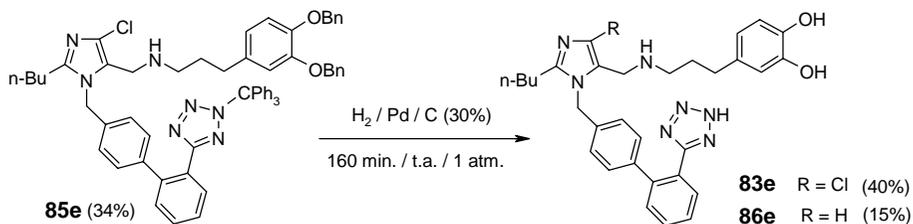
En primer lugar, se llevó a cabo la condensación entre el aldehído **40** y la amina **77e**. La reacción no se completó después de 17 h a temperatura ambiente, ni siquiera en presencia de MgSO_4 anhidro, para favorecer la reacción mediante adsorción del agua generada en la misma. Así, se obtuvo una mezcla de la imina **84e** (68%, $^1\text{H-RMN}$) y el aldehído **40** sin reaccionar (32%, $^1\text{H-RMN}$).⁴⁶ Esta mezcla aislada de la reacción se trató posteriormente con NaBH_4 , usando como disolvente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:2) a temperatura ambiente, obteniéndose la amina **85e** con un rendimiento moderado (34%) y el alcohol **12** (40%) procedente de la reducción del aldehído **40** (Esquema 51).

⁴⁶ Godleski, S. A.; Villhauer, E. B.; *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 486-491.



Esquema 51. Aminación reductiva para obtener **85e**.

Una vez sintetizada la amina **85e**, se llevó a cabo la desprotección de los grupos protectores mediante hidrogenación catalítica con Pd/C al 30% obteniéndose una mezcla de las aminas **83e** (40%) y **86e** (15%), ésta última resultante de la reducción del enlace C-Cl, que se separó por cromatografía (Esquema 52).



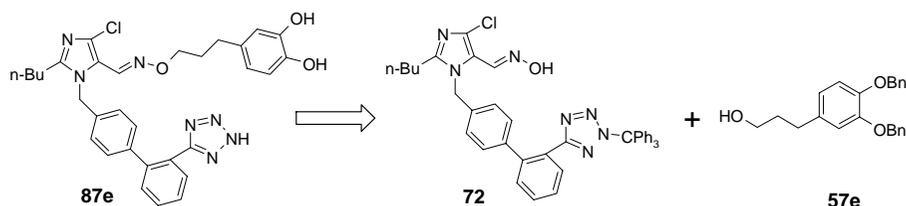
Esquema 52. Hidrogenación catalítica de la amina **85e**.

Aunque la amina **83e** se podría haber obtenido directamente desde la imina **84e** por hidrogenación catalítica no se realizó ya que para este tipo de hidrólisis es necesario un tiempo prolongado de

reacción cuya consecuencia sería la deshalogenación del anillo de imizadol.⁴⁷

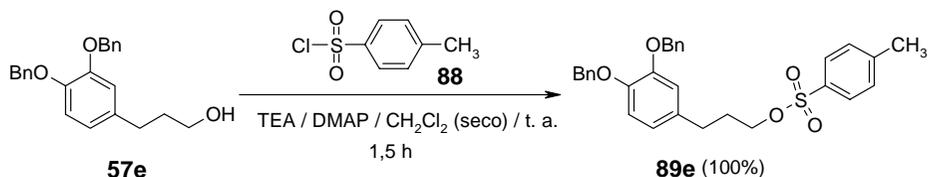
3.9. Síntesis del éter de oxima 87e

Con el objetivo de preparar otros híbridos con un grupo funcional no polar y sin posibilidad de formar puente de hidrógeno, nos planteamos la síntesis del éter de oxima **87e**, el cual podría prepararse por alquilación de la oxima **72** con un derivado del **57e** (Esquema 53).



Esquema 53. Esquema retrosintético del éter de oxima **87e**.

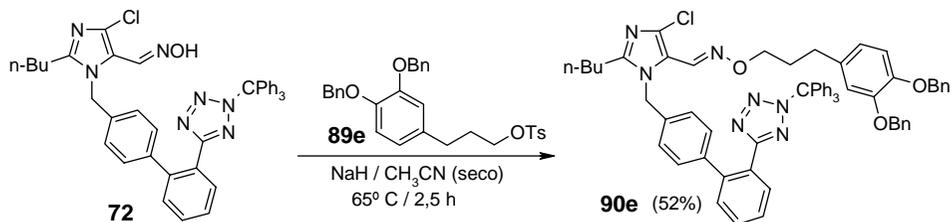
Por un lado, el alcohol **57e** preparado previamente se hizo reaccionar con cloruro de tosilo **88** para obtener cuantitativamente el tosionato **89e** (Esquema 54).



Esquema 54. Síntesis del tosionato **89e**.

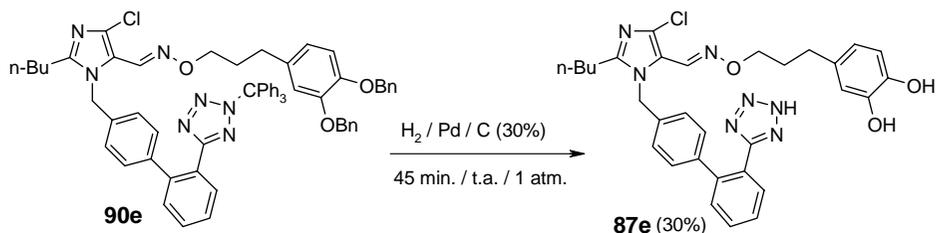
A continuación, la oxima **72** anteriormente preparada se trató con hidruro sódico (NaH) en acetonitrilo y posteriormente con el tosionato **89e**, produciéndose la formación del éter de oxima **90e** (52%) (Esquema 55).

⁴⁷ Shao, H.; Williams, D. T.; Wu, S., Zou, W. *Carbohydrate Research* **2006**, *341*, 2434-2438.



Esquema 55. Síntesis del éter de oxima **90e**.

Una vez sintetizado el éter de oxima **90e**, se realizó la desprotección de los grupos protectores de la forma habitual, mediante hidrogenación catalítica con Pd/C al 30%, obteniéndose el éter de oxima **87e** (30%) (Esquema 56).



Esquema 56. Hidrogenación catalítica de **90e** para obtener el éter de oxima **87e**.

3.10. Síntesis del éter **91e**

También nos planteamos la síntesis del éter **91e** que podría ser accesible por alquilación del alcohol **12** con el tosilato **89e** (Esquema 57).

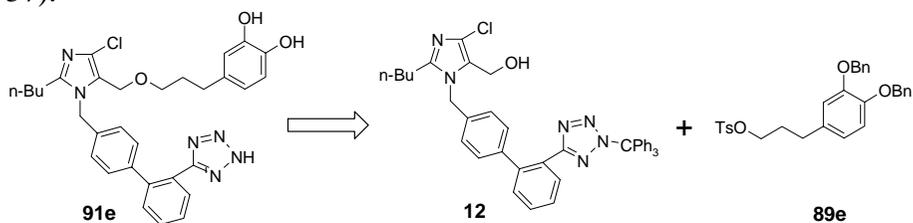
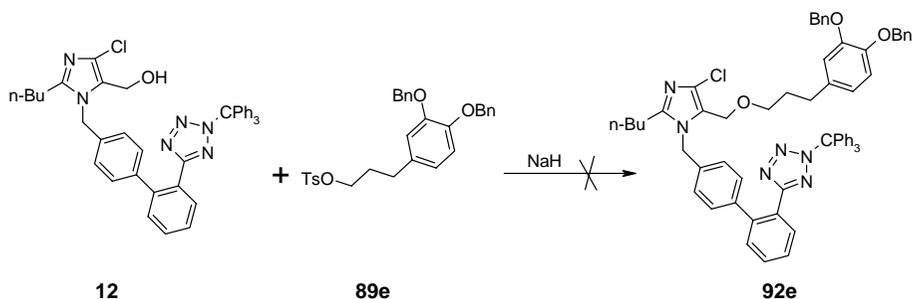


Figura 57. Retrosíntesis del éter **91e**.

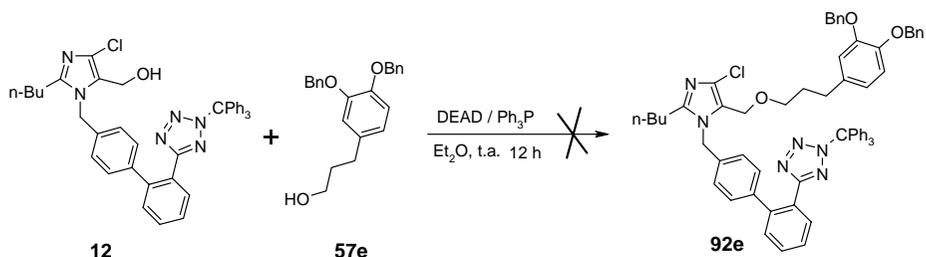
El alcohol **12** se trató primero con NaH y posteriormente con **89e** en distintos disolventes (THF, MeCN, DMF) y a diferentes tiempos (7-20 h) y temperaturas (60-75° C), pero en ningún caso se obtuvo el

éter **92e**. En todos los experimentos se aislaron los productos de partida (Esquema 58).



Esquema 58. Intento de síntesis de **92e** por alquilación de **12**.

Alternativamente se ensayó la reacción de formación del éter **92e** a partir de los alcoholes **12** y **58e** utilizando condiciones de reacción de Mitsunobu, resultando en una mezcla de reacción compleja (Esquema 59).⁴⁸



Esquema 59. Intento de síntesis de **92e** mediante la reacción de Mitsunobu.

3.11. Ensayos farmacológicos *in vitro*

Sobre los nuevos híbridos preparados se ensayó su capacidad antioxidante y la inhibición de la contracción celular en presencia de Ang II. El estudio fue llevado a cabo por el grupo de investigación de Fisiología y Fisiopatología Renal de la Universidad de Alcalá. Se utilizaron las mismas condiciones experimentales mencionadas en la sección 4.11 de esta Memoria. La capacidad antioxidante de los nuevos híbridos se comparó con **1**, **6** y **11e**. La inhibición de la contracción celular se comparó con Ang II, **1**, y **11e**. Los resultados obtenidos se

⁴⁸ Shi, Y.; Hughes, D.; McNamara, J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3609-3611.

muestran en los gráficos 8 y 9. La estructura de los compuestos ensayados se muestra en el figura 59.

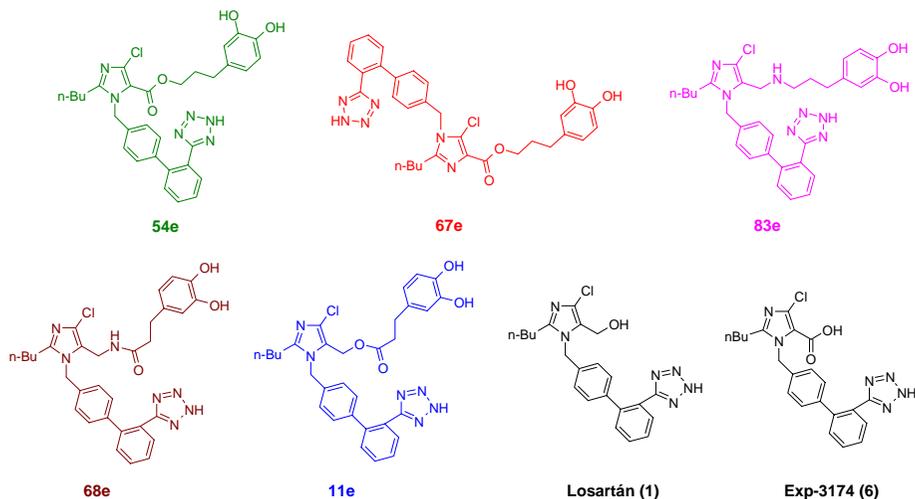


Figura 59. Estructuras de híbridos sintetizados, 1 y 6.

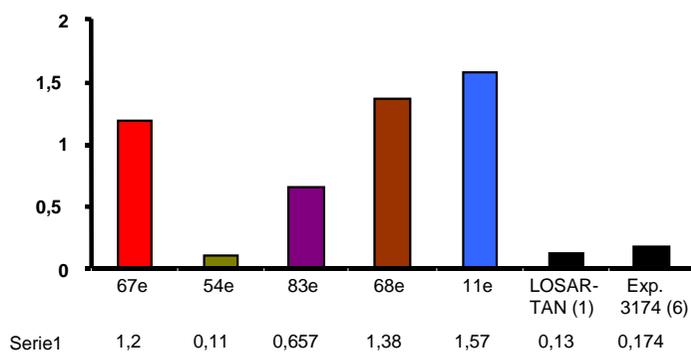


Gráfico 8. Capacidad antioxidante de híbridos sintetizados.

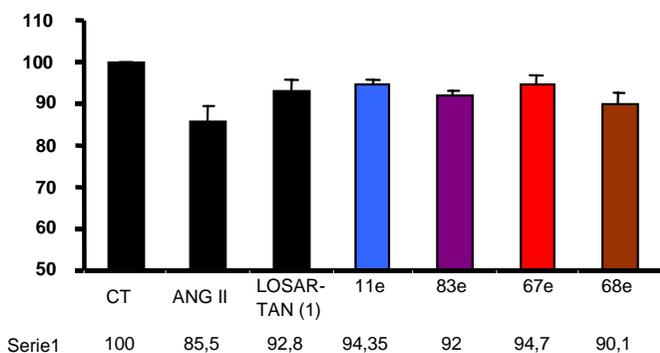


Gráfico 9. Contracción celular de híbridos sintetizados.

De la medida de capacidad antioxidante se encontró que el éster **11e** es el híbrido más activo, aunque también la amida **68e** y el éster inverso **67e** presentan capacidades muy significativas. Cabe destacar la baja capacidad antioxidante obtenida para el éster inverso **54e** en comparación con su isómero **67e** y con el éster **11e**. La medida de la contracción celular no mostró diferencias estadísticamente significativas entre Losartán y los híbridos estudiados.

4. Parte experimental.

Los reactivos y los disolventes utilizados se han adquirido en las casas comerciales *Aldrich*, *Acros*, *SDS* y se utilizaron sin ningún tratamiento posterior.

Las reacciones que exigieron condiciones anhidras se llevaron a cabo en atmósfera de argón desoxigenado y seco. Los disolventes anhidros utilizados en estas reacciones se secaron por destilación sobre un agente desecante adecuado, en atmósfera de argón, inmediatamente antes de su uso.

Las adiciones de disolventes y disoluciones en condiciones anhidras se realizaron vía jeringa o cánula.

Los puntos de fusión se determinaron en tubos capilares abiertos en un aparato *GALLENKAMP*.

Para las cromatografías analíticas de placa fina se emplearon cromatofolios de gel de sílice *Alugram Sil G/UV₂₅₄* con un espesor de 0,2 mm sobre soporte de aluminio y se revelaron con luz ultravioleta, KMnO_4 , ácido fosfomolibdico, vainillina, vapores de I_2 o ninhidrina. Para la cromatografía en columna (flash) se utilizó gel de sílice *Merck* (230-400 mesh). El eluyente empleado se indica en cada caso y las proporciones del disolvente son siempre volumen-volumen.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro *Perkim-Elmer* modelo *FTIR 1725X* en las condiciones indicadas en cada compuesto (película entre cristales de NaCl o pastilla de KBr) y las frecuencias de los máximos de absorción se expresan en cm^{-1} .

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en espectrofotómetros *Varian UNITY-300*, *Varian Mercury-VX-300* (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C) y *Varian Gemini 200* (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C). Para los espectros de RMN se emplearon disolventes deuterados CDCl_3 , CD_3OD y DMSO-d_6 de *SDS*. Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en unidades δ (ppm), utilizando como referencia la señal residual del disolvente, y las constantes de acoplamiento en Hz.

Los análisis elementales cuantitativos de C, H y N se llevaron a cabo en un analizador elemental modelo *Heraeus CHN Rapid* y se expresan en %.

Los espectros de masas de baja resolución (EM) se registraron en un espectrofotómetro *Hewlett-Packard* 5988A (70 eV) utilizando técnicas de impacto electrónico (IE), ionización química (IQ) y la técnica de electrospray (ES) en un *Hewlett-Packard* 1100MSD con analizador trampa de iones LCQ deca XP plus de *Termo*. Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa (m/z) y los valores entre paréntesis corresponden a las intensidades relativas respecto al pico base.

Los espectros de masas de alta resolución se realizaron en un espectrómetro de masas por tiempo de vuelo *Agilent* 6210 LC/MS TOF, utilizando como patrón de referencia picos a 922,009798 y 121,05873 por ES+.

Los HPLC-MS se han llevado a cabo en un cromatógrafo *Agilent* HP1100, utilizando una columna Luna C18 (100 x 2 mm x 3 μm), utilizando como fase móvil un gradiente de $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ con un 4% de ácido fórmico.

4.1. SÍNTESIS DE ÉSTERES 11

4.1.1. Síntesis de Losartán

Azida de tributilestaño¹ (14)

Se disuelve NaN_3 (1,49 g; 23,04 mmol) en agua (4,75 mL), se enfría a 0°C y se añade lentamente Bu_3SnCl (5 g; 15,36 mmol). A continuación se agita a temperatura ambiente durante una noche. Se añade éter etílico (2,5 mL). Se separan las fases y la fase acuosa se extrae con pequeñas porciones de éter etílico (5 x 10 mL). Se combinan las fases orgánicas y se lavan con 10 mL de NaCl sat. Se secan sobre Na_2SO_4 (anh) y se concentra a sequedad obteniendo 5,05 g de un aceite transparente (99%) correspondiente a la azida de tributilestaño. Se almacena en nevera bajo atmósfera de inerte.



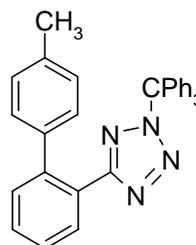
5-(4'-Metil-bifenil-2-il)-2-tritil-2H-tetrazol¹ (19)

Se añade 4'-metil-2-cianobifenilo **17** (1,47 g, 7,6 mmol) sobre la azida de tributilestaño **14** (5,05 g; 15,2 mmol) previamente preparada y se agita a 85°C durante 48 h. El crudo de reacción se disuelve en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ (5:1) (24 mL), se añade NaOH 10N (0,8 mL) y se deja agitando a temperatura ambiente durante 6 minutos. Después se añade Ph_3CCl (4 g; 7,6 mL) y se agita durante 3 horas. La mezcla se diluye con H_2O y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Se combinan las fases orgánicas y se lavan con H_2O (10mL) y NaCl sat (10 mL). Se seca con Na_2SO_4 anh y se concentra a sequedad. El residuo se tritura con hexano (50 mL), precipitando 2,26 g de un sólido blanco que se filtra y seca.

Rendimiento: 62%

P.f.: 162,5 –163,2 °C

Lit¹ (P.f): 163-166 °C



¹ Carini, D. J.; Duncia, J. V.; Aldrich, P. E.; Chiu, A. T.; Jonson, A. L.; Pierce, M. E.; Price, W. A.; Santella III, J. B.; Wells, G. J.; Wexler, R. R.; Wong, P. C.; Too, S.-E.; Timmermans, P. B. M. W. M. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2525-2547.

IR (CHCl₃): ν_{\max} 3435, 3061, 3017, 1492, 1469, 1446, 1430, 1215, 1159, 1031, 1006, 930, 881, 821, 756, 699, 668, 634 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,85-7,81 (m, 1H); 7,46-7,14 (m, 12H), 6,97-6,82 (m, 10H); 2,21 (s, 3H) ppm.

MS (API-ES+) m/e: 478 (M⁺+1, 100); (API-ES-) m/e: 476 (M⁺+1, 17)

Análisis elemental: C₃₃H₂₆N₄ (478,58 g/mol)

Calculado: C (82,81); H (5,47); N (11,70)

Encontrado: C (82,61); H (5,61); N (11,48)

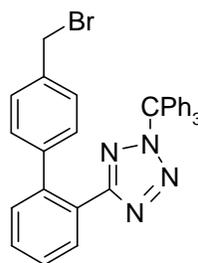
***N*-(Trifenilmetil)-5-[4'-(bromometil)bifenil-2-il]tetrazol¹ (20)**

Una disolución de **19** (15 g; 31,34 mmoles), *N*-bromosuccinimida recientemente recristalizada en agua (6,136 g; 34,47 mmoles) y peroxido de benzoilo (1,518 g; 6,26 mmoles) en tetracloruro de carbono seco (180 mL) se calienta a reflujo bajo atmósfera de argón durante 4 h. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se enfría a 40 °C. La succinimida precipitada se elimina por filtración y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo se recristaliza en éter etílico, obteniéndose 12,33 g de un sólido blanco perteneciente al producto monobromado.

Rendimiento: 70%

P.f.: 134-136 °C

Lit¹ (P.f): 135-138 °C



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 8,2-6,7 (m, 23H); 4,33 (s, 2H) ppm.

MS (API-ES+) m/e: 557 (M⁺+1, 100); (API-ES-) m/e: 555 (M⁺+1, 29)

Análisis elemental: C₃₃H₂₅N₄Br (557,48 g/mol)

Calculado: C (71,09); H (4,52); N (10,05)

Encontrado: C (71,21); H (4,48); N: (10,32)

2-Butil-4-cloro-5-(hidroximetil)-1-[[2'-[(trifenil-metil)tetrazol-5-il]bifenil-4-il]metil]imidazol¹ (12)

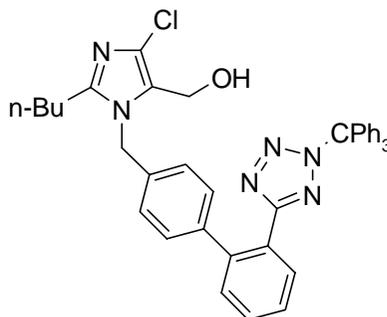
A una disolución de **20** (12,33 g; 22,13 mmoles) en CH₂Cl₂ (106 mL) se añade una mezcla formada por 2-Butil-5-cloro-3H-imidazol-4-carbaldehído **21** (4,13 g; 22,13 mmoles), bromuro de tetrabutilfosfonio (0,751 g; 2,213 mmoles), NaOH 10 N (4,91 mL), H₂O (17,4 mL) y CH₂Cl₂ (70 mL). La mezcla se deja agitando durante 24 h. Pasado el tiempo se añade NaBH₄ en una porción (0,837 g; 22,13 mmoles) y se mantiene la agitación durante otras 24 h. A continuación se añade H₂O (200 mL) y las fases se separan. La fase orgánica se lava con H₂O (2 x 200 mL), se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y concentra a sequedad. El residuo se cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (1/1) obteniéndose 9,5 g (65%) de un sólido blanco. Alternativamente, el residuo se puede recrystalizar en 49 mL de hexano/AcOEt (1:2) obteniendo un rendimiento del 32%.

Rendimiento: 65%

P.f.: 165-167 °C

Lit¹ (P.f): 167-169 °C

Rf: (Hx/ACOEt 1/2) 0,42



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3015, 2959, 2872, 1577, 1491, 1466, 1445, 1358, 1255, 1255, 1216, 1028, 1005, 931, 881, 823, 756, 698, 667, 640 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,94-7,91 (m, 1H); 7,50-7,47 (m, 2H); 7,46-7,21 (m, 10H); 7,09 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H); 6,91-6,88 (m, 6H); 6,73 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H); 5,07 (s, 2H); 4,28 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); 2,47 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H); 1,66 (quint, *J* = 8,0 Hz, 2H); 1,34 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H); 1,27 (sext, *J* = 7,3 Hz, 2H), 0,84 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H) ppm.

MS (API-ES+) m/e: 665 ($M^+ + 1$, 100); (API-ES-) m/e: 663 ($M^+ + 1$, 31)

Análisis elemental: $C_{41}H_{37}N_6OCl$ (665,22 g/mol):

Calculado: C (74,02); H (5,60); N (12,63)

Encontrado: C (74,12); H (5,63); N (12,54)

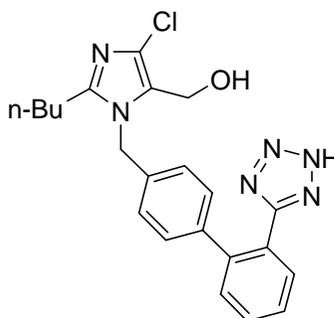
2-Butil-4-cloro-5-(hidroximetil)-1-[[2'-[1H-tetrazol-5-il]bifenil-4-il]metil]imidazol¹ (1)

Una disolución de **12** (2,8 g; 4,21 mmol), HCl (10%) (30,5 mL) y tetrahidrofurano (61 mL) se agita a 25 °C durante 4 h. Pasado este tiempo se añade un exceso de una solución acuosa de hidróxido sódico (10 %) (\approx 31 mL) y se eliminan los disolventes a presión reducida. El residuo resultante se disuelve en agua y la mezcla se filtra para eliminar el trifenilmetanol. El filtrado se ajusta a pH 3 con ácido clorhídrico (10%) formando un precipitado que se filtra, seca y recristaliza en acetonitrilo para dar 1,23 g de un sólido blanco.

Rendimiento: 70%

P.f.: 184-186 °C

Lit¹ (P.f): 183,5-184,5 °C



IR (KBr): ν_{\max} 3375, 3031, 2927, 2868, 2445, 1973, 1579, 1469, 1436, 1411, 1263, 1191, 1034, 1008, 996, 836, 788, 763, 715, 690 cm^{-1} .

¹H-RMN (300MHz, MeOD): δ 7,7-7,5 (m, 4H); 7,15 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 7,06 (d, $J = 8,05$ Hz, 2H); 5,3 (s, 2H); 4,5(s, 2H); 2,59 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,56 (quint, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,33 (sext, $J = 7,5$ Hz, 2H); 0,89 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

MS (API-ES+) m/e: 423 ($M^+ + 1$, 100); (API-ES-) m/e: 421 ($M^+ + 1$, 8)

Análisis elemental: C₂₂H₂₃N₆OCl (422,91 g/mol):

Calculado: C (62,48); H (5,48); N (19,87)

Encontrado: C (62,52); H (5,65); N (20,00)

4.1.2. Síntesis de ácidos protegidos con cloruro de *terc*-butil-dimetil-silano (13)

Procedimiento General

A una solución del ácido comercial **10** y TBDMSCl en cloruro de metileno se añade DBU bajo atmósfera de argón y se agita a temperatura ambiente durante 5 horas. Pasado el tiempo se añaden 5 g de hielo a la mezcla de reacción y se extrae con éter (3 x 10 mL). Las fases etéreas se lavan con agua fría (3 x 10 mL), con una solución de NaHCO₃ (10%) y agua. Por último se secan con Na₂SO₄ (anh), se filtra y se concentra a sequedad obteniendo un aceite marrón. El aceite se disuelve en MeOH/THF (4:3) (16 mL) y se trata durante 5 horas a temperatura ambiente con K₂CO₃ (10%) (4 mL). Se concentra a vacío hasta ¼ de su volumen y se diluye con 15 mL de NaCl sat. Se enfría a 0 °C y se ajusta el pH = 4-5 con KHSO₄ (1M). Se extrae con éter (2 x 7,5 mL) y los extractos etéreos se combinan y se lavan con NaCl sat. Se seca con Na₂SO₄ (anh), se filtra y se concentra a sequedad para obtener los ácidos protegidos.

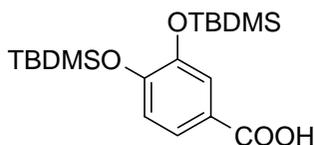
Ácido 3,4-bis-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-benzoico (13a)

Siguiendo el procedimiento general a partir del ácido 3,4-dihidroxi-benzoico **10a** (0,5 g; 3,24 mmol), TBDMSCl (1,54g; 10,22 mmol) y DBU (1,63 g; 10,70 mmol) en cloruro de metileno (12,5 ml) se obtiene 1,00 g (80%) de un sólido blanco correspondiente al ácido protegido **13a**.

Rendimiento: 80%

P.f.: 137,9 -139,1 °C

Rf: (Hx/AcOEt 1/1) 0,62



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3019, 2931, 2859, 1686, 1597, 1573, 1514, 1434, 1298, 1256, 1215, 1127, 1102, 974, 900, 841, 767 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 7,61-7,60 (m, 2H); 6,84 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 0,98 (d, $J = 1,0$ Hz, 18H); 0,21 (d, $J = 2,0$ Hz, 12H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): 171,7; 152,3; 146,6; 124,3; 122,6; 120,4; 25,9; 25,8; 18,4; - 3,9; - 4,0 ppm.

MS (DIP/ IE) m/e : 383 (M⁺+1), 382 (M⁺)

Análisis elemental: C₁₉H₃₄O₄Si₂ (382,64 g/mol)

Calculado C(59,63); H(8,95)

Encontrado C(60,02); H(8,99)

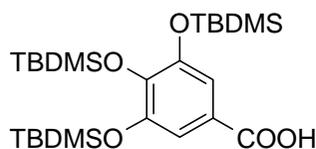
Ácido 3,4,5-tris-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-benzoico (**13b**)

Siguiendo el procedimiento general a partir del ácido 3,4,5-trihidroxi-benzoico **10b** (0,5 g; 2,94 mmol), TBDMSCl (1,81g; 12,05 mmol) y DBU (1,97 g; 12,93 mmol) en cloruro de metileno (12,5 mL) se obtiene 1,11 g (74%) de un sólido blanco correspondiente al ácido protegido **13b**.

Rendimiento: 74%

P.f.: 239,8 - 241,5 °C

Rf: (Hx/AcOEt 1/1) 0,75



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3019, 2931, 2859, 1686, 1574, 1493, 1472, 1427, 1342, 1258, 1215, 1093, 888, 841, 756, 669 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 7,23-7,22 (m, 2H); 0,96 (s, 9H); 0,91 (s, 18H); 0,21 (s, 12H); 0,11 (s, 6H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): 171,8; 148,3; 143,9; 121,0; 116,0; 26,2; 26,1; 18,8; 18,5; - 3,5; - 3,7 ppm.

MS (DIP/ IE) m/e: 513 ($M^+ + 1$), 512 (M^+)

Análisis elemental: $C_{19}H_{34}O_5Si_3$ (426,72 g/mol)

Calculado C(53,47); H(8,03)

Encontrado C(53,53); H(8,01)

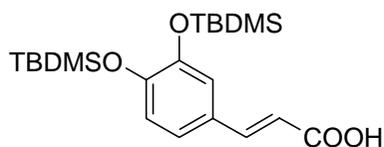
Ácido 3-[3,4-bis-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-fenil]-2-propenónico (13d)

Seguendo el procedimiento general a partir del ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenónico **10d** (0,5 g; 2,77 mmol), TBDMSCl (1,31 g; 8,74 mmol) y DBU (1,39 g; 9,16 mmol) en cloruro de metileno (12,5 mL) se obtiene 0,61 g (54%) de un sólido blanco correspondiente al ácido protegido **13d**.

Rendimiento: 54%

P.f.: 167,5 -168,3 °C

Rf: (Hx/AcOEt 1/1) 0,5



IR ($CHCl_3$): ν_{max} 3019, 2931, 2859, 1685, 163, 1595, 1509, 1472, 1425, 1286, 1215, 984, 907, 841, 757, 668 cm^{-1} .

1H -RMN (200 MHz, $CDCl_3$): 7,59 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H); 6,99-6,96 (m, 2H); 6,77 (d, $J = 8,71$ Hz, 1H); 6,23 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H); 3,20 (S_{ancho} , 1H); 0,96 (s, 18H); 0,19 (s, 12H) ppm.

^{13}C -RMN (50 MHz, $CDCl_3$): 172,4; 149,5; 147,0; 146,1; 127,7; 122,5; 121,0; 120,4; 115,6; 25,9; 18,5; - 3,9 ppm.

MS (DIP/ IE) m/e: 409 ($M^+ + 1$), 408 (M^+)

Análisis elemental: $C_{21}H_{36}O_4Si_2$ (408,67 g/mol)

Calculado C(61,71); H(8,87)

Encontrado C(61,52); H(8,90)

Ácido 3-[3,4-bis-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-fenil]-propionico² (13e)

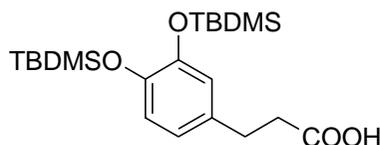
Siguiendo el procedimiento general a partir del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-2-propanoico **10e** (0,5 g; 2,74 mmol), TBDMSCl (1,30g; 8,64 mmol) y DBU (1,38 g; 9,05 mmol) en cloruro de metileno (12,5 mL) se obtiene 0,81 g (72%) de un sólido blanco correspondiente al ácido protegido **13e**.

Rendimiento: 72%

P.f.: 87,5 - 88,4 °C

Lit²: (P.f): 87 - 88 °C

Rf: (Hx/AcOEt 1/2) 0,75



IR (CHCl₃): ν_{\max} 2930, 2858, 1711, 1605, 1576, 1511, 1472, 1255, 1216, 906, 840, 758, 668 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 6,73-6,59 (m, 3H); 2,81 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 0,96 (s, 18H); 0,16 (s, 12H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): 178,2; 154,1; 145,8; 144,5; 132,5; 120,4; 120,31; 35,3; 29,3; 25,3; 17,8; - 4,6 ppm.

MS (DIP/ IE) m/e: 411 (M⁺+1), 410 (M⁺)

Análisis elemental: C₂₁H₃₈O₄Si₂ (410,69 g/mol)

Calculado C(61,41); H(9,32)

Encontrado C(61,94); H(9,61)

² Yadav, J. S.; Kumar, N. N.; Reddy, M. S.; Prasad, A. R. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2689-2694.

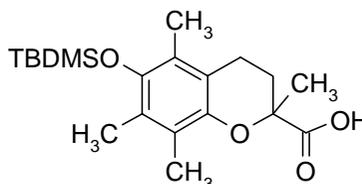
Ácido 6-(*terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (13h)

Seguindo el procedimiento general a partir del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico **10h** (0,5 g; 1,99 mmol), TBDMSCl (0,63g; 4,19 mmol), DBU (0,67g; 4,39 mmol) en cloruro de metileno (12,5 mL) se obtiene 0,14 g (20%) de un sólido blanco correspondiente al ácido protegido **13h**.

Rendimiento: 20%

P.f.: 61,7 – 63,1 °C

Rf: (Hx/AcOEt 1/1) 0,53



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3430, 2955, 2930, 2858, 1715, 1575, 1462, 1411, 1255, 1215, 1146, 1106, 1091, 948, 877, 838, 759, 668 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 2,66-2,52 (m, 2H); 2,42-2,28 (m, 1H); 2,11 (s, 3H); 2,09 (s, 3H); 2,01 (s, 3H); 2,00-1,82 (m, 1H); 1,59 (s, 3H); 1,03 (s, 9H); 0,10 (s, 6H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): 194,8; 177,8; 144,8; 126,3; 123,7; 122,5; 117,10; 65,7; 29,9; 26,1; 24,5; 20,7; 18,6; 14,3; 13,4; 12,0 ppm.

MS (DIP/ IE) m/e: 364 (M⁺)

Análisis elemental: C₂₀H₃₂O₄Si (364,55 g/mol)

Calculado C(65,89); H(8,84)

Encontrado C(66,91); H(9,01)

4.1.3. Síntesis de ésteres 25 y 27: Procedimiento General

Una disolución del precursor de losartán {2-butyl-5-cloro-3-[2'-(2-tritil-2*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3*H*-imidazol-4-il}-metanol **12** y trifenilfosfina en éter anhidro preparada bajo atmósfera de argón, se añade gota a gota sobre una disolución del ácido protegido correspondiente y azodicarboxilato de dimetilo (DEAD) en éter anhidro bajo argón. La mezcla resultante se deja agitando 12 h a temperatura

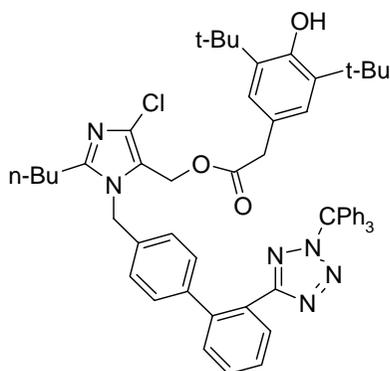
ambiente. La reacción se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose un residuo que se cromatografía sobre gel de sílice. eluyendo con hexano:AcOEt (1:1).

(3,5-Di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)acetato de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(1-tritil-1*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil-3*H*-imidazol-4-ilmetilo] (25g)

A partir de una disolución de **12** (0.335 g, 0,5 mmoles) y trifenilfosfina (0,131 g, 0,5 mmoles) en éter anhidro (20 mL) y otra de ácido 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenilacético (0,132 g, 0.5 mmoles) **10g** y DEAD (0,073 g, 0,5 mmoles) en éter anhidro (20 mL). Eluyente: hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 287 mg (aceite amarillo).

Rendimiento: 63%

Rf: (Hx/ACOEt 5/1) 0,55



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3636, 3427, 3061, 3012, 2960, 2873, 2400, 1734, 1602, 1434, 1254, 1216, 1154, 1121, 1028, 930, 698, 667, 633 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7.95-7.90 (m, 1H); 7.43 (q, 2H); 7.38-7.16 (m, 10H); 7.07 (d, $J = 6,4$ Hz, 2 H); 6.99 (s, 2H); 6.88 (d, $J = 6,9$ Hz, 6 H); 6.62 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H); 5.14 (s, 1H); 4.93 (s, 2H); 4.78 (s, 2H); 3.35 (s, 2H); 2.47 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1.63 (q, 2H); 1.39 (s, 18H); 1.30 (sext, 2H); 0.85 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

MS (APCI POS) m/e: 911 (M⁺+1, 100)

Análisis elemental: C₅₇H₅₉N₆O₃Cl (911.56)

Calculado: C (75,10); H (6,52); N (9,21)

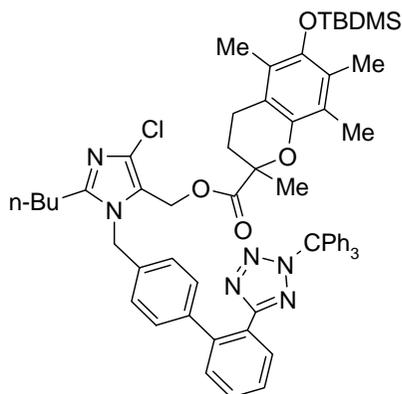
Encontrado: C (75,30); H (6,43); N (8,97)

6-(*Terc*-butil-dimetil-silaniloxi)-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxilato de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(1-tritil-1*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3*H*-imidazol-4-ilmetilo (26h)

A partir de una disolución de **12** (0,335 g; 0,5 mmoles) y trifenilfosfina (0,131 g; 0,5 mmoles) en éter anhidro (20 mL) y otra de ácido 6-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (0,182 g; 0,5 mmoles) **13h** y DEAD (0,073 g; 0,5 mmoles) en éter anhidro (20 mL). Eluyente: hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 0,212 g (aceite amarillo).

Rendimiento: 42%

Rf: (Hx/ACOEt 1/1) 0,81



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 7,93-7,91 (m, 1H); 7,45 (q, 2H); 7,33-7,18 (m, 10H); 6,78 (d, *J* = 8,1 Hz, 4H); 6,88 (d, *J* = 7,5 Hz, 6H); 4,63 (d, *J* = 13,5 Hz, 2H); 4,40 (d, *J* = 17,3 Hz, 2H); 2,53-2,23 (m, 5H); 2,13 (s, 3H); 2,12 (s, 3H); 1,94 (s, 3H); 1,84-1,74 (m, 1H); 1,59 (q, 2H); 1,54 (s, 3H); 1,24 (sext, 2H); 1,02 (s, 9H); 0,83 (t, 3H); 0,09 (s, 6H) ppm.

MS (APCI POS) *m/e*: 1012 (*M*⁺+1, 100)

Análisis elemental: C₆₁H₆₇N₆O₄ClSi (1011,76 g/mol)

Calculado: C (72,41); H (6,67); N (8,30)

Encontrado: C (72,12); H (6,40); N (8,17)

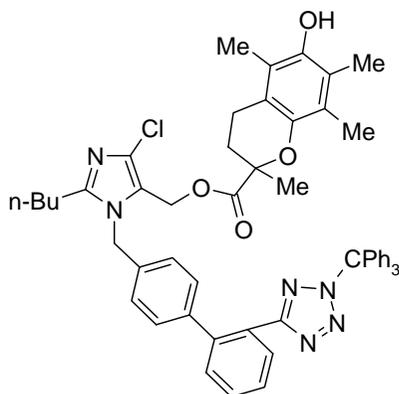
4.1.4. Desprotección del sililéter 26h

6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxilato de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(1-tritil-1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-ilmetilo (25h)

El éster **26h** (0,140 g; 0,138 mmoles) se disuelve en diclorometano (2 mL), se añade una disolución 1M de fluoruro de tetrabutilamonio (0,152 mL; 0,152 mmoles) a temperatura ambiente y se agita durante 16 h. La mezcla de reacción se evapora a presión reducida y el residuo se cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con Hex:AcOEt (1:1) obteniéndose 0,057 g (aceite incoloro).

Rendimiento: 50%

Rf: (Hex/ACOEt 1/1) 0,56



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,93-7,88 (m, 1H); 7,45 (q, 2H); 7,35-7,16 (m, 10H); 7,04 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H); 6,88 (d, *J* = 6,9 Hz, 6H); 6,49 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H); 4,73 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H); 4,55 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H); 4,45 (c, *J* = 17,3 Hz, 2H); 4,30 (s, 1H), 2,58-2,28 (m, 5H): 2,17 (s, 3H); 2,14 (s, 3H); 1,98 (s, 3H); 1,86-1,73 (m, 1H); 1,60 (q, 2H); 1,54 (s, 3H); 1,24 (sext, 2H); 0,85 (t, 3H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 187,3; 173,6; 163,7; 148,7; 145,6; 145,3; 141,0; 141,0; 140,8; 133,9; 130,6; 130,1; 130,0; 129,8; 128,8; 128,2; 127,6; 127,5; 125,9; 124,8; 122,3; 121,1; 120,0; 118,5; 116,9; 82,7; 77,2; 55,0; 46,3; 30,7; 29,6; 26,6; 25,5; 22,4; 21,0; 13,8; 12,4; 11,9; 11,3 ppm.

MS (ESI+, *m/e*): 898 (M⁺+1, 20); 920 (M⁺+Na, 56)

Análisis elemental: C₅₅H₅₃N₆O₄Cl (897,5 g/mol)

Calculado C (73,60); H (5,95) N (9,36)

Encontrado: C (73,52); H (5,64) N (9,27)

4.1.5. Desprotección mediante hidrogenación catalítica: Procedimiento General

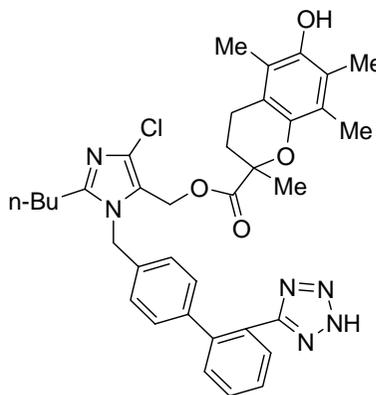
A una disolución del producto a hidrogenar en el disolvente adecuado se añade el catalizador bajo atmósfera de argón. Se pasa una corriente de argón durante 10 minutos y se mantiene la agitación bajo atmósfera de hidrógeno (1 atm) durante el tiempo indicado. Pasado este tiempo, la mezcla se filtra sobre Celita y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose un residuo que se cromatografía sobre gel de sílice.

6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxilato de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-ilmetilo (11h)

A partir de **25h** (0,060 g; 0,06 mmoles) disuelto en MeOH/AcOEt (4:1) (4,5 mL) y Pt/C (5%) (31 mg; 0,008 mmoles) durante 24 horas. Eluyente: MeOH/AcOEt (4:1). Se obtienen 0,016 g (aceite incoloro).

Rendimiento: 36%

Rf: (AcOEt/MeOH 11/1) 0,31



IR (KBr): ν_{\max} 3447, 2957, 2928, 2871, 1942, 1736, 1559, 1458, 1374, 1346, 1259, 1192, 1138, 1105, 1061, 939, 820, 758, 621 cm⁻¹.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, MeOD): δ 7,71-7,49 (m, 4H); 7,09 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,74 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 4,66 (d, $J = 17,2$ Hz, 1H); 4,41 (d, $J = 17,4$ Hz, 1H); 2,62-2,52 (m, 3H); 2,44-2,35 (m, 2H); 2,18 (s, 3H); 2,06 (s, 3H); 2,03 (s, 3H); 1,86-1,77 (m, 1H); 1,65-1,43 (m, 5H); 1,32 (sext, 2H); 0,92 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, MeOD): δ 187,3; 173,6; 163,7; 148,7; 145,6; 145,3; 141,0; 141,0; 140,8; 133,9; 130,6; 130,1; 130,0; 129,8; 128,8; 128,2; 127,6; 127,5; 125,9; 124,8; 122,3; 121,1; 120,0; 118,5; 116,9; 82,7; 77,2; 55,0; 46,3; 30,7; 29,6; 26,6; 25,5; 22,4; 21,0; 13,8; 12,4; 11,9; 11,3 ppm.

MS (API-ES+) m/e: 655 ($\text{M}^+ + 1$, 100); (API-ES-) m/e: 653 ($\text{M}^+ + 1$, 16)

Análisis elemental: $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_4\text{Cl}$ (655,1 g/mol):

Calculado: C (65,99); H (5,99); N (12,82)

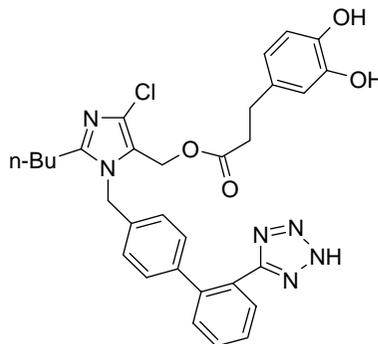
Encontrado: C(66,21); H (6,08); N (13,01)

3-(3,4-Dihidroxi-fenil)propanoato de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-ilmetilo (11e)

A partir de **53e** (4,402 g; 4,36 mmoles) disuelto en MeOH/ CHCl_3 (2:1) (100/50 mL) y Pd/C (30%) (0,76 eq / grupo a hidrogenar) durante 45 minutos. Eluyente: AcOEt/MeOH/ CH_3COOH (3:1:0,025). Se obtienen 1,687 g (aceite incoloro).

Rendimiento: 66%

Rf: (AcOEt/MeOH/Ac. Acético 2/1/0,05) 0,63



IR (KBr): ν_{max} 2957, 2361, 1732, 1604, 1528, 1460, 1352, 1259, 1146, 1115, 956, 816, 759, 667, 634 cm^{-1} .

¹H-RMN (200 MHz, MeOD): δ 7,72-7,36 (m, 4H); 7,11 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,87 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H); 6,71-6,53 (m, 3H); 5,08 (s, 2H); 5,00 (s, 2H); 2,78 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H); 2,47 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H); 2,34 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,58 (q, 2H); 1,39 (sext, 2H); 0,90 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, MeOD): δ 175,1; 157,0; 150,7; 147,1; 147,0; 142,6; 140,5; 136,5; 132,2; 131,6; 131,5; 130,7; 129,9; 128,9; 126,9; 124,8; 124,4; 123,1; 122,1; 121,9; 118,0; 78,4; 73,4; 62,2; 55,7; 32,0; 30,9; 27,3; 26,0; 23,3; 22,0; 14,0; 12,9; 12,1; 11,9 ppm.

MS (API-ES+) m/e: 587 ($M^+ + 1$, 100); (API-ES-) m/e: 585 ($M^+ + 1$, 31)

Análisis elemental: C₃₁H₃₁N₆O₄Cl (587,06 g/mol):

Calculado: C (63,42); H (5,32); N (10,90)

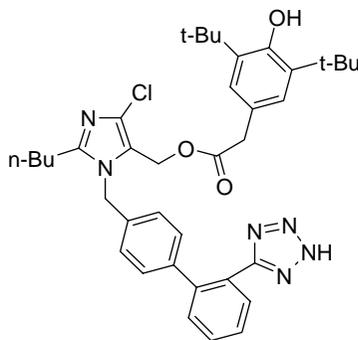
Encontrado: C (63,53); H (5,21); N (11,04)

(3,5-Di-*terc*-butil-4-hidroxi-fenil)acetato de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(1*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil-3*H*-imidazol-4-ilmetilo] (11g)

A partir de **25g** (164 mg; 0,18 mmoles) disuelto en metanol (4 mL) y Pt/C (5%) (852 mg, 0,011 mmoles) durante 24 horas. Eluyente MeOH. Se obtienen 0,036 g (aceite incoloro).

Rendimiento: 31%

Rf: (ACOEt/MeOH 11/1) 0,31



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 7,86 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H); 7,52 (q, 2H); 7,33 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H); 7,01 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H); 6,91 (s, 2H); 6,64 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H); 5,13 (*S*_{ancho}, 1H); 4,99 (s, 2H); 4,78 (s, 2H); 3,30 (s, 2H); 2,37 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,55 (q, 2H); 1,34 (s, 18H); 1,23 (sext, 2H); 0,85 (t, $J = 7,17$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (50 MHz, MeOD): 173,1; 156,7; 154,2; 150,7; 142,6; 140,4; 139,3; 136,9; 132,3; 131,7; 131,5; 131,1; 130,6; 129,7; 129,0; 128,7; 127,2; 126,5; 125,9; 124,4; 122,5; 55,3; 48,3; 41,5; 35,5; 30,9; 30,8; 27,4; 23,3; 14,0 ppm.

MS (ESI+, m/e): 669 (M^+ , 20); 670 (M^++1 , 100); 692 (M^++Na , 11)

Análisis elemental: $\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_3\text{Cl}$ (669.25g/mol)

Calculado: C (68,19); H (6,77); N (12,55)

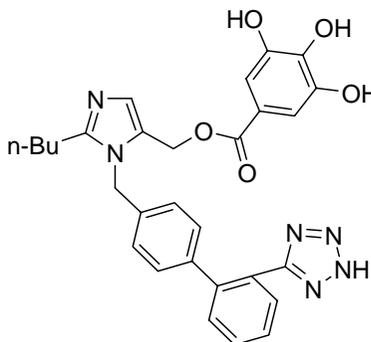
Encontrado: C (67,98); H (6,63); N (12,77)

3,4,5-Tris-hidroxi-benzoato de 2-butil-3-[2'-(2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-ilmetilo (27b)

A partir de **53b** (0,120 g; 0,11 mmoles) disuelto en MeOH/AcOEt (3:1) (8 mL) y Pd/C (30%) (30 mg; 0,28 mmoles) durante 2,5 horas. Eluyente: MeOH/AcOEt (2:1). Se obtienen 0,042 g (aceite incoloro).

Rendimiento: 72%

Rf: (ACOEt/MeOH 2/1) 0,26



^1H -RMN (200 MHz, MeOD): δ 7,55-7,30 (m, 4H); 7,13 (s, 1H); 7,02 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H); 6,90-6,81 (m, 4H); 5,29 (s, 2H); 5,24 (s, 2H); 2,65 (t, 2H); 1,62 (q, 2H); 1,32 (sext, 2H); 0,89 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

MS (APCI POS) m/e: 541 (M^++1 , 100); 563 (M^++Na , 4)

Análisis elemental: $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_5$ (540,57 g/mol)

Calculado: C (64,43); H (5,22); N (14,54)

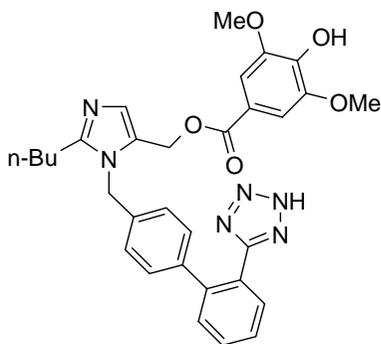
Encontrado: C (64,78); H (5,13); N (14,28)

4-Hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoato de 2-butil-3-[2'-(2*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3*H*-imidazol-4-ilmetilo (27c)

A partir de **53c** (0,063 g; 0,067 mmoles) disuelto en MeOH/AcOEt (3:1) (4 mL) y Pd/C (30%) (30 mg; 0,28 mmoles) durante 5 horas. Eluyente: MeOH/AcOEt (1:3). Se obtienen 0,020 g (42%) (aceite incoloro).

Rendimiento: 42%

Rf: (ACOEt/MeOH 3/1) 0,26



IR (Acetona): ν_{\max} 3412, 3004, 2440, 2348, 2262, 1713, 1422, 1360, 1221, 1092, 902, 786, 758 cm^{-1} .

^1H -RMN (200 MHz, MeOD): 7,53-7,39 (m, 4H); 7,37 (s, 1H); 7,17-7,11 (m, 2H); 7,00 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,83 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,83 (s, 2H); 5,30 (s, 2H); 3,37 (s, 6H); 2,65 (t, 2H); 1,63 (q, 2H); 1,32 (sext, 2H); 0,91 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (50 MHz, MeOD): 162,3; 152,1; 142,3; 141,8; 131,8; 131,2; 130,6; 130,1; 128,6; 128,0; 108,1; 56,8; 56,5; 30,8; 29,6; 27,7; 25,7; 23,3; 18,3; 14,1 ppm.

MS (APCI POS) m/e : 569 ($\text{M}^+ + 1$, 36); 570 ($\text{M}^+ + 2$, 100)

Análisis elemental: $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_5$ (568,62 g/mol):

Calculado: C (65,48); H (5,67); N (14,77)

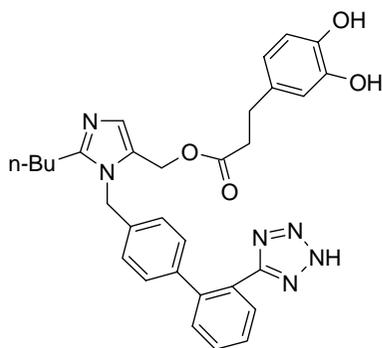
Encontrado: C (65,92); H (5,83); N (14,96)

3-(3,4-Dihidroxi-fenil)propanoato de 2-butil-3-[2'-(2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H- imidazol-4-ilmetilo (27e)

A partir de **53e** (1,183 g; 1,17 mmoles) disuelto en MeOH/CHCl₃ (2:1) (24/12 mL) y Pd/C (30%) (0,76 eq / grupo a hidrogenar) durante 4 horas. Eluyente: AcOEt:MeOH (2:1). Se obtienen 0,300 g (aceite incoloro).

Rendimiento: 46%

Rf: (AcOEt/MeOH 2/1) 0,3



IR (KBr): ν_{\max} 3441, 3137, 3058, 2958, 2931, 2871, 2505, 1941, 1736, 1603, 1519, 1458, 1354, 1283, 1143, 1114, 1005, 966, 819, 784, 759, 635 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, MeOD): δ 7,58-7,31 (m, 4H); 7,10 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H); 6,80 (d, $J = 8,2$ Hz, 3H); 6,71-6,59 (m, 2H); 6,40 (dd, $J = 2,0$ Hz, $J = 8,2$ Hz, 1H); 5,08 (s, 2H); 5,00 (s, 2H); 2,66 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 2,64 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 2,34 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 1,58 (q, 2H); 1,31 (sext, 2H); 0,89 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, MeOD): δ 173,9; 162,0; 151,8; 146,0; 144,4; 142,4; 141,8; 135,9; 133,0; 131,6; 131,1; 130,6; 130,2; 130,1; 128,4; 128,1; 127,8; 126,5; 120,3; 116,3; 116,2; 56,1; 36,7; 31,2; 30,7; 27,2; 23,3; 14,0 ppm.

MS (ESI+, m/e): 553 (M⁺+1, 100); 575 (M⁺+Na, 9)

Análisis elemental: C₃₁H₃₂N₆O₄ (552,62 g/mol):

Calculado: C (67,37); H (5,83); N (15,20)

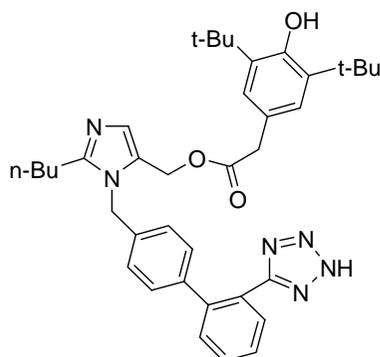
Encontrado: C (67,42) H (5,61); N (15,06)

3,5-Di-*tert*-butil-4-hidroxi-fenil)acetato de 2-butil-3-[2'-(2*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3*H*-imidazol-4-ilmetilo (27g)

A partir de **25g** (98,5 mg; 0,10 mmoles) disuelto en metanol (3 mL) y negro de paladio (29 mg; 0,27 mmoles) durante 17 horas. Eluyente: AcOEt:MeOH (11:1). Se obtienen 0,031 g (aceite incoloro).

Rendimiento: 44%

Rf: (ACOEt/MeOH 2/1) 0,6



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3791, 3412, 2961, 2922, 2851, 2434, 2285, 1934, 1666, 1461, 1260, 1215, 1091, 799, 758, 665 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 11,0-9,5 (s_{ancho}, 1H); 8,07 (d, *J*= 6,6 Hz, 1H); 7,86 (q, 2H); 7,65 (d, *J*= 6,9 Hz, 1H); 7,58 (s, 1H); 7,19 (d, *J*= 8,2 Hz, 2H); 6,84 (s, 1H); 6,82 (d, *J*= 7,9 Hz, 2H); 5,27 (s, 2H); 4,97 (s, 2H); 3,59 (s, 2H); 2,66 (t, *J*= 7,4 Hz, 2H); 2,37 (s, 1H); 1,86 (q, 2H); 1,68 (s, 18H); 1,58 (sext, 2H); 1,17 (t, *J*= 7,1 Hz, 3H) ppm.

MS (ESI+, *m/e*): 635 (M⁺+1, 83); 636 (M⁺+2, 100); 657 (M⁺+Na, 8)

Análisis elemental: C₃₈H₄₆N₆O₃ (634,81 g/mol):

Calculado: C (71,89); H (7,30); N (13,23)

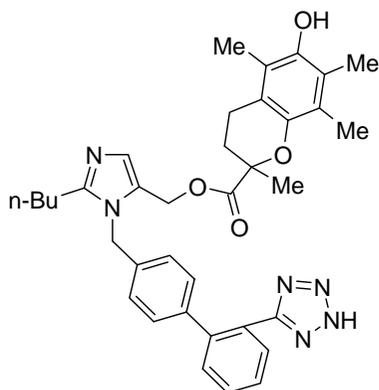
Encontrado: C (72,01); H (7,35); N (13,62)

6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxilato de 2-butil-3-[2'-(2*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3*H*-imidazol-4-ilmetilo (27h)

A partir de **25h** (0,050 g; 0,056 mmoles) disuelto en metanol (2 mL) y Pd /C (30%) (15 mg; 0,14 mmoles) durante 6 horas. Eluyente: MeOH/AcOEt (1:5). Se obtienen 0,014 g (aceite incoloro).

Rendimiento: 39%

Rf: (ACOEt/MeOH 5/1) 0,12



¹H-RMN (200 MHz, MeOD): 7,61-7,44 (m, 4H); 7,11 (s, 1H); 7,09 (d, $J= 8,2$ Hz, 2H); 6,69 (d, $J= 8,2$ Hz, 2H); 5,00 (d, $J= 13,5$ Hz, 1H); 4,79 (d, $J= 13,5$ Hz, 1H); 4,66 (d, $J= 17,2$ Hz, 1H); 4,47 (d, $J= 17,2$ Hz, 1H); 2,68-2,53 (m, 3H); 2,40-2,30 (m, 2H); 2,20 (s, 3H); 2,10 (s, 3H); 2,02 (s, 3H); 1,83-1,75 (m, 1H); 1,58 (q, 2H); 1,55 (s, 3H); 1,32 (sext, 2H); 0,93 (t, $J= 7,3$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, MeOD): 175,2; 160,1; 151,8; 147,2; 147,1; 142,5; 141,6; 135,7; 131,7; 131,3; 131,0; 130,8; 129,8; 128,6; 128,3; 127,9; 127,3; 126,6; 124,4; 123,1; 121,9; 118,1; 79,4; 78,4; 56,8; 47,4; 32,0; 30,6; 27,0; 25,9; 23,2; 22,0; 13,9; 12,9; 12,0; 11,8 ppm.

MS (ESI+, m/e): 622 ($M^+ + 2$, 100)

Análisis elemental: C₃₆H₄₀N₆O₄ (620,74 g/mol)

Calculado C (69,65); H (6,49); N (13,53)

Encontrado: C (69,83); H (6,52); N (13,37)

4.1.6. Variación de los grupos protectores en la síntesis del éster 11e

4.1.6.1. Protección del anillo de tetrazol con bromuro de terc-butilo

5-(4'-Metil-bifenil-2-il)-2H-tetrazol³ (28)

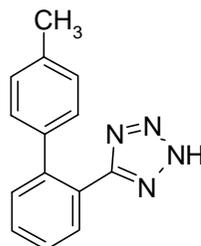
Una disolución de **19** (3,0 g; 6,26 mmol), HCl (10%) (45,2 mL) y tetrahidrofurano (91 mL) se agita a 25 °C durante 4 h. Pasado este tiempo se añade un exceso de una solución acuosa de hidróxido sódico

(10 %) y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se disuelve en agua y la mezcla se filtra para eliminar el trifenilmetanol. El filtrado se ajusta a pH 2 con ácido clorhídrico (10%). El precipitado formado se filtra, seca y recristaliza en acetonitrilo para dar 1,24 g de un sólido blanco.

Rendimiento: 84%

P.f.: 150 – 152 °C

Lit³: P.f: 144 –148 °C



IR (CHCl₃): ν_{\max} 2718; 1601; 1568; 1483; 1447; 1396; 1245; 1186; 1159; 1078; 1049; 1008; 985; 909; 842; 824; 774; 756 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 11,37 (s, 1H); 8,18 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,53 (q, 2H); 7,37 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H); 7,23 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H); 7,10 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 2,38 (s, 3H) ppm.

MS (API-ES POS): 237 (M⁺+1).

Análisis elemental: C₁₄H₁₂N₄ (236,27 g/mol)

Calculado C(71,16); H(5,12); N(23,71)

Encontrado C(70,46); H (5,22); N(23,26)

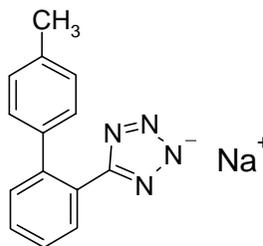
5-(4'-Metil-bifenil-2-il)-2-tetrazolato sódico (29)

A una disolución de **28** (2,13 g; 9,01 mmol) en CH₂Cl₂ (42 mL) se añade NaOH (10N) (0,946 mL) y se agita a 25 °C durante 20 h. Pasado el tiempo precipita la sal que se filtra y seca a presión reducida durante 5 h, obteniéndose 2,305 g de un sólido blanco.

³ Russell, R.K.; Murray, W.V. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5023-5024.

Rendimiento: 99%

P.f.: 174 – 176 °C



IR (KBr): ν_{\max} 3624; 3318; 2360; 1644; 1605; 1503; 1458; 1423; 1366; 1182; 1145; 1127; 1108; 1014; 825; 767; 743; 661 cm^{-1} .

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, MeOD): δ 7,55-7,39 (m, 4H); 7,02 (s, 4H); 2,29 (s, 3H) ppm.

MS (API-ES POS): 259 ($\text{M}^+ + 1$); 237 (M-Na).

Análisis elemental: $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{Na}$ (258,25 g/mol)

Calculado C(65,11); H(4,29); N(21,69)

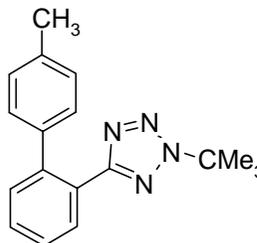
Encontrado C(57,15); H (5,54); N(18,95)

2-Terc-butyl-5-(4'-metil-bifenil-2-il)-2H-tetrazol (30)

A una solución de la sal sódica **29** (1,5g; 5,8 mmol) en CH_3CN (60 mL) bajo atmósfera de argón, se añade bromuro de *tert*-butilo (3,58 g; 26,13 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (0,214 g; 0,58 mmol) y se calienta a reflujo durante 24 h. Pasado el tiempo la solución se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con hexano:AcOEt (2:1), obteniéndose 2,11 g del producto en forma de aceite blanco.

Rendimiento: 62%

Rf: (Hx/ACOEt 2/1) 0,63



IR (CHCl₃): ν_{\max} 2977; 1941; 1914; 1706; 1666; 1604; 1513; 1467; 1428; 1311; 1262; 1234; 1189; 1159; 1099; 1033; 1006; 822; 785; 762; 732; 667 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,86-7,82 (m, 1H); 7,53-7,38 (m, 3H); 7,04 (s, 4H); 2,31 (s, 3H); 1,51 (s, 9H) ppm.

MS (API-ES POS): 293 (M⁺+1).

Análisis elemental: C₁₈H₂₀N₄ (292,37 g/mol)

Calculado: C(73,94); H(6,89); N(19,16)

Encontrado: C(73,63); H (6,99); N(18,90)

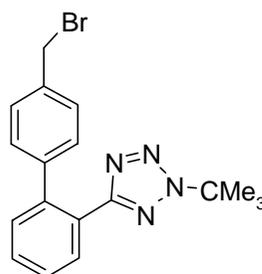
5-(4'-Bromometil-bifenil-2-il)-2-terc-butil-2H-tetrazol⁴ (31)

Una disolución de **30** (1,89 g; 6,47 mmoles), N-bromosuccinimida (NBS) recientemente recristalizada en agua (1,15 g; 6,47 mmoles) y peroxido de benzoilo (0,313 g; 1,29 mmoles) en tetracloruro de carbono seco (22 mL) se calienta a reflujo bajo atmósfera de argón durante 4 h. La reacción se monitoriza por ¹H-RMN. La mezcla de reacción se enfría a 40 °C. La succinimida precipita y se elimina por filtración, y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo se recristaliza en éter etílico, obteniéndose 1,88 g de un sólido blanco perteneciente al producto monobromado.

Rendimiento: 78%

P.f.: 118 -120 °C

Lit⁴: P.f: 117,5 -118,5 °C



⁴ Suenaga, Syuji; Kawaguchi, Hitoshi; Kato, Takeshi. **1993**, EP 553879, CA:2088431

IR (CHCl₃): ν_{\max} 2985; 2360; 1922; 1602; 1526; 1510; 1467; 1426; 1407; 1360; 1313; 1272; 1231; 1192; 1034; 1006; 842; 825; 786; 766; 751; 734; 667 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,93-7,89 (m, 1H); 7,50-7,38 (m, 3H); 7,28 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,12 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 4,48 (s, 2H); 1,54 (s, 9H) ppm.

MS (+TOF): 371,08692 (M⁺+1)

Análisis elemental: C₁₈H₁₉N₄Br (371,27 g/mol)

Calculado: C(58,22); H(5,15); N(15,09)

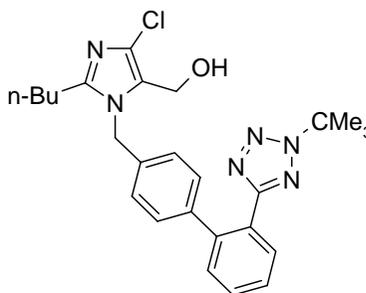
Encontrado: C(58,34); H(5,33); N(14,93)

{2-Butil-3-[2'-(2-*terc*-butil-2*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-5-cloro-3*H*-imidazol-4-il}-metanol (32)

A una disolución de **31** (1,65 g; 4,45 mmoles) en CH₂Cl₂ (20 mL) se añade una mezcla formada por **21** (0,83 g; 4,45 mmoles), bromuro de tetrabutilfosfonio (0,151 g; 0,44 mmoles), NaOH (10 N) (0,89 mL), H₂O (3,5 mL) y CH₂Cl₂ (15 mL). La mezcla se deja agitando durante 24 h. Pasado el tiempo se añade NaBH₄ (0,168 g; 4,45 mmoles) y se mantiene la agitación durante otras 24 h. A continuación se añade H₂O (20 mL) y las fases se separan. La fase orgánica se lava con H₂O (2 x 20 mL), se seca sobre MgSO₄ (anh), se filtra y concentra a sequedad. El residuo se cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (1/2) obteniéndose 1,2 g de un aceite blanco.

Rendimiento: 57%

Rf: (Hx/ACOEt 1/1) 0,22



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3246; 2957; 2362; 1577; 1468; 1360; 1311; 1253; 1193; 1006; 822; 759 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,88-7,85 (m, 1H); 7,51-7,41 (m, 2H); 7,37-7,34 (m, 1H); 7,11 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,89 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 5,19 (s, 2H); 4,43 (s, 2H); 3,07 (s_{ancho}, 1H); 2,53 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H); 1,63 (q, 2H); 1,53 (s, 9H); 1,31 (sext, 2H); 0,85 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

MS (API-ES POS) 479 (M⁺+1); 501 (M+Na).

Análisis elemental: C₂₆H₃₁N₆OCl (479,01 g/mol)

Calculado C(65,19); H(6,52); N(17,54)

Encontrado C(63,47); H (6,37); N(16,82)

4.1.6.2. Protección de 10e utilizando PMBCl

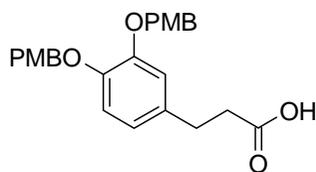
Ácido 3-[3,4-bis-(4-metoxi-benciloxi)-fenil]-propionico (34e)

Una solución de ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propanoico **10e** (1,0 g; 5,49 mmol), yoduro de n-tetrabutilamoneo (0,608 g; 1,64 mmol) y bromuro de p-metoxibencilo (3,86 g, 24,7 mmol) en acetona (10 mL) se trata con K₂CO₃ (4,55 g, 32,9 mmol) bajo argón a 55°C durante 18 horas. Pasado el tiempo se enfría a temperatura ambiente, se filtra y se elimina el disolvente a sequedad. El residuo se disuelve en AcOEt (10 mL), se lava con HCl (1M) (3 x 5 mL) y NaCl sat (5 x 5 mL) y se seca con MgSO₄ (anh). Se filtra y elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en MeOH (20 mL) y se pone a reflujo con una solución acuosa de NaOH (2,3M) (6 mL) durante 1 hora. Pasado el tiempo se elimina el disolvente a sequedad, el residuo se disuelve en la mínima cantidad de agua y se extrae con éter con el fin de eliminar los posibles restos orgánicos insolubles en agua. La fase acuosa se enfría a 0 °C y se acidula con HCl (1N) hasta pH 6-7, se extrae con AcOEt (3 x 8 mL), se reúnen los extractos orgánicos y se secan con MgSO₄ (anh). Se filtra y concentra a sequedad para obtener 1,1 g de un sólido blanco.

Rendimiento: 70%

P.f.: 119 - 120 °C

Rf: (Hx/AcOEt 1/1) 0,23



IR (CHCl₃): ν_{\max} 2933; 1707; 1614; 1585; 1518; 1439; 1379; 1339; 1303; 1249; 1174; 1139; 1032; 927; 854; 818; 670 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 10,13 (s_{ancho}, 1H); 7,32 (dd, $J = 1,8$ Hz, $J = 7,3$ Hz, 4H); 6,88-6,67 (m, 7H); 5,02 (s, 4H); 3,78 (s, 6H); 2,84 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 2,59 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H) ppm.

MS (API-ES POS) 445 (M + Na); (API-ES NEG) 421(M⁺-1).

Análisis elemental: C₂₅H₂₆O₆ (422,47 g/mol)

Calculado C(71,07); H(6,20)

Encontrado C(71,13); H (6,15)

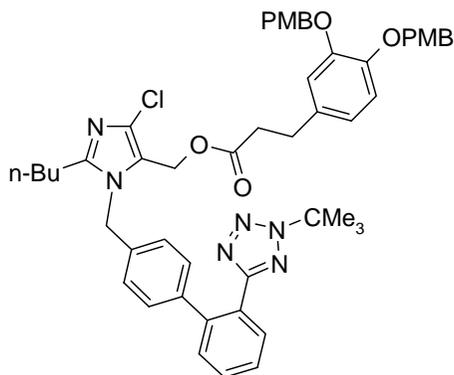
4.1.6.3. Síntesis del éster protegido 35e

3-[3,4-Bis-(4-metoxi-benciloxi)-fenil]-propionato de 2-butil-3-[-2'-(2-terc-butil-2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-5-cloro-3H-imidazol-4-ilmetilo (35e)

Siguiendo el Procedimiento General **4.1.3**, a partir de una disolución del alcohol **32** (1,0 g; 2,08 mmoles) y trifenilfosfina (0,547 g; 2,08 mmoles) en éter anhidro (50 mL) y otra del ácido **34e** (0,878 g; 2,08 mmoles) y DEAD (0,362 g; 2,08 mmoles) en éter anhidro (50 mL). Eluyente: hexano:AcOEt (1:2). Se obtienen 1,23 g (aceite amarillo).

Rendimiento: 67%

Rf: (Hx/ACOEt 1/2) 0,62



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3439, 2957, 2871, 2836, 1736, 1612, 1586, 1515, 1464, 1424, 1374, 1303, 1250, 1174, 1135, 1033, 1006, 934, 823, 756, 666 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,89-7,86 (m, 1H); 7,46-7,40 (m, 2H); 7,32-7,25 (m, 5H); 7,10 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 6,85-6,71 (m, 8H); 6,58 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 4,99 (s, 2H); 4,96 (s, 4H); 4,93 (s, 2H); 3,77 (s, 6H); 2,72 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 2,53 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 2,39 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,67 (q, 2H); 1,54 (s, 9H); 1,32 (sext, 2H); 0,87 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

MS (API-ES POS): 883 (M⁺+1)

Análisis elemental: C₅₁H₅₅N₆O₆Cl (883,47 g/mol)

Calculado C(69,33); H(6,27); N(9,51)

Encontrado C(69,25); H (6,84); N(9,67)

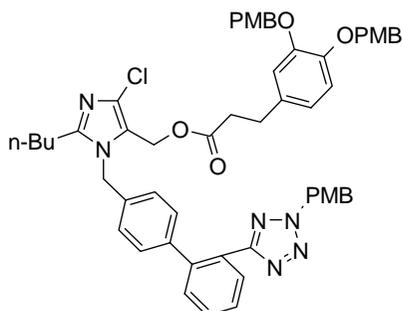
4.1.6.4. Síntesis del éster protegido 44e

3-[3,4-Bis-(4-metoxi-benciloxi)-fenil]-propionato de 2-butil-5-cloro-3-{2'-[2-(4-metoxi-bencil)-2H-tetrazol-5-il]-bifenil-4ilmetil}-3H-imidazol-4ilmetilo (44e)

Siguiendo el Procedimiento General **4.1.3**, a partir de una disolución de **43** (0,342 g; 0,63mmoles) y trifenilfosfina (0,165 g; 0,63 mmoles) en éter etílico/THF (anh) (6:1) (18 mL) y otra del ácido **34e** (0,266 mg; 0,63 mmoles) y DEAD (0,109 g; 0,63 mmoles) en éter etílico/ THF (anh) (6:1) (18 mL). Eluyente: hexano:AcOEt (1:2). Se obtienen 0,447 g (aceite amarillo).

Rendimiento: 75%

Rf: (Hx/ACOEt 1/2) 0,62



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,81-7,78 (m, 1H); 7,43-7,40 (m, 2H); 7,32-7,25 (m, 5H); 7,19-7,15 (m, 2H); 7,08-7,05 (m, 2H); 6,86-6,70 (m, 10H); 6,58-6,55 (m, 1H); 5,52 (s, 2H); 4,98 (s, 2H); 4,97 (s, 2H); 4,94 (s, 4H); 3,76 (s, 9H); 2,71 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 2,54 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H); 2,36 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 1,65 (q, 2H); 1,31 (sext, 2H); 0,85 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H) ppm.

MS(API-ES+) *m/e*: 947 ($M^+ + 1$, 100); (API-ES-) *m/e*: 945 ($M^+ + 1$, 11)

Análisis elemental C₅₅H₅₅N₆O₇Cl (947,51 g/mol):

Calculado: C (69,71); H (5,85); N (8,87)

Encontrado: C (69,85); H (5,53); N (8,96)

4.1.7. Síntesis de ácidos protegidos con cloruro de bencilo: Procedimiento general

Una solución del ácido comercial **10** (0,5g) y bromuro de bencilo en DMF se trata con K₂CO₃ a 60°C durante 20 horas bajo argón. Pasado el tiempo se enfría a temperatura ambiente, se filtra y se elimina el disolvente a sequedad. El residuo se disuelve en AcOEt (10 mL), se lava con HCl (1M) (3 x 5 mL), NaCl (sat) (5 x 5 mL) y se seca con MgSO₄ (anh). Se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en MeOH (8 mL) y se pone a reflujo con una solución acuosa de NaOH 2,3M (3,06 mL) durante 1 hora. Pasado el tiempo se elimina el disolvente a sequedad, el residuo se disuelve en la mínima cantidad de agua y se extrae con éter etílico con el fin de eliminar los posibles restos orgánicos insolubles en agua. La fase acuosa se acidula con HCl (1M) hasta pH 1-2, se extrae con AcOEt (3 x 8 mL), se reúnen los extractos orgánicos y se secan con MgSO₄ (anh). Se filtra y se concentra a sequedad para obtener los ácidos protegidos.

Ácido 3,4,5-tris-benciloxi-benzoico (52b)

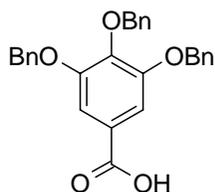
A partir de ácido 3,4,5-trihidroxy benzoico **10b** (0,5 g; 2,93 mmol) y bromuro de bencilo (3,01g; 17,6 mmol) en DMF (5 mL), y K₂CO₃ (3,25 g; 23,51 mmol) se obtienen 2,23 g (sólido blanco).

Rendimiento: 86%

P.f.: 196 - 197 °C

Lit⁵: P.f: 191 - 194 °C

Rf: (Hx/AcOEt 1/1) 0,33



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3019, 1687, 1595, 1453, 1431, 1337, 1215, 1130, 859, 756, 693, 669 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,40-7,36 (m, 14H); 7,42 (s, 3H); 5,12 (s, 6H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 170,5; 152,5; 143,1; 137,3; 136,5; 128,5; 128,5; 128,2; 128,1; 128,0; 127,5; 124,0; 109,5; 77,2; 75,1; 71,2 ppm.

MS : 441 (M⁺+1).

Análisis elemental: C₂₈H₂₄O₅ (440,48 g/mol)

Calculado: C (76,34); H (5,49)

Encontrado: C(76,8); H (5,51)

Ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxi-benzoico (52c)

A partir de ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoico **10c** (0,5 g, 2,52 mmol) y bromuro de bencilo (1,29 g, 7,57 mmol) en DMF (5 mL), y K₂CO₃ (1,39 g, 10,1 mmol) se obtienen 0,59 g (sólido blanco).

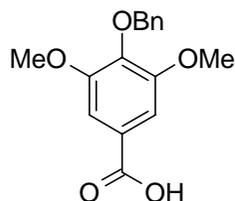
⁵Yulin, R.; Klaus, H.; Xiaozhuo, C. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2829-2837.

Rendimiento: 82%

P.f.: 160 - 161 °C

Lit⁶: P.f: 153 -158 °C

Rf: (Hx/AcOEt 1/1) 0,18



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3402, 2359, 2341, 1813, 1683, 1588, 1501, 1455, 1417, 1326, 1215, 1129, 755, 696, 668 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 12,05 (s_{ancho}, 1H); 7,37-7,33 (m, 2H); 7,21-7,20 (m, 3H); 7,14 (m, 2H); 5,00 (s, 2H); 3,78 (s, 6H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 171,5; 153,3; 141,8; 137,3; 128,4; 128,1; 128,0; 124,2; 107,4; 74,9; 56,2 ppm.

MS : 311 (M⁺+Na)

Análisis elemental: C₁₆H₁₆O₅ (288,29g/mol)

Calculado C(66,65); H(5,59)

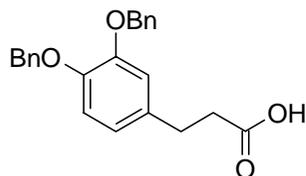
Encontrado C(66,23); H(5,42)

Acido 3-(3,4-bis-benciloxi-fenil)-propanoico (52e)

A partir de ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propanoico **10e** (0,5 g; 2,74 mmol) y bromuro de bencilo (2,11 g; 12,34 mmol) en DMF (5 mL), y K₂CO₃ (2,27 g; 16,46 mmol) se obtienen 0,68 g (sólido blanco).

Rendimiento: 69%

P.f.: 121 - 122 °C



⁶ Jogia, M. K.; Vakamoce, V.; Weavers, R. T. *Australian J. Chem.* **1985**, 38, 1009-16.

Rf: (Hx/AcOEt 1/1) 0,53

IR (CHCl₃): ν_{\max} 3034, 2912, 1704, 1588, 1519, 1453, 1431, 1309, 1268, 1215, 1141, 1039, 1017, 945, 914, 840, 800, 756, 697, 669, 608 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 7,37-7,16 (m, 10H); 6,80-6,0 (m, 3H); 5,05 (s, 4H); 2,77 (t, $J=7,5$ Hz, 2H); 2,52 (t, $J=7,8$ Hz, 2H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): 178,5; 148,8; 147,4; 137,3; 137,1; 133,4; 128,3; 127,6; 127,6; 127,2; 127,2; 120,9; 115,3; 115,2; 71,4; 71,3; 35,6; 30,1 ppm.

MS : 385 (M⁺+Na)

Análisis elemental: C₂₃H₂₂O₄ (362,41g/mol)

Calculado C(76,2); H(6,11)

Encontrado C(75,9); H(6,02)

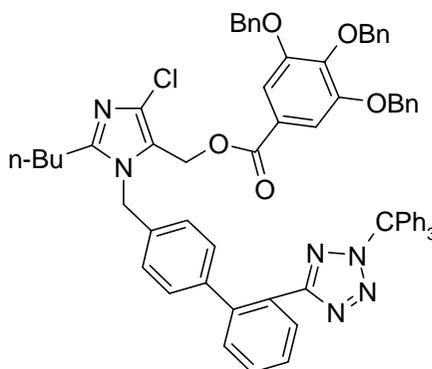
4.1.8. Esterificación de Mitsunobu de los ácidos protegidos 52 con el precursor de losartán 12

3,4,5-Tris-benziloxi-benzoato de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(1-tritil-1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-ilmetilo (53b)

Siguiendo Procedimiento General 4.1.3, a partir de una disolución de **12** (0,335 g; 0,5 mmoles) y trifenilfosfina (0,131 g; 0,5 mmoles) en éter anhidro (20 mL) y otra del ácido 3,4,5-tris-benciloxibenzoico **52b** (0,220 mg; 0,5 mmoles) y DEAD (0,073 g; 0,5 mmoles) en éter anhidro (20 mL). Se obtienen 0,343 g (aceite amarillo).

Rendimiento: 63%

Rf: (Hx/ACOEt 1/1) 0,62



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,94-7,89 (m, 1H); 7,45-7,23 (m, 29H); 7,02 (d, *J*= 7,9 Hz, 2H); 6,90 (d, *J*= 7,2 Hz, 6H); 6,69 (d, *J*= 7,9 Hz, 2H); 5,12 (s, 2H); 5,07 (s, 6H); 5,01 (s, 2H); 2,50 (t, 2H); 1,68 (q, *J*= 7,2 Hz, 2H); 1,30 (sext, *J*= 7,4Hz, 2H); 0,87 (t, *J*= 7,3 Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 206,7; 165,3; 163,7; 152,3; 148,8; 142,5; 141,1; 140,9; 137,2; 136,4; 133,9; 130,6; 130,3; 130,0; 129,9; 129,7; 128,4; 128,3; 128,1; 128,0; 127,9; 127,6; 127,5; 127,3; 125,9; 125,0; 124,3; 120,5; 109,1; 82,7; 77,1; 75,0; 71,2; 54,8; 47,2; 30,9; 29,7; 26,9; 22,4; 13,8 ppm.

MS (ESI+, *m/e*): 1087 (M⁺, 1)

Análisis elemental: C₆₉H₅₉N₆O₅Cl (1087,69 g/mol)

Calculado: C (76,19); H (5,46); N (7,72)

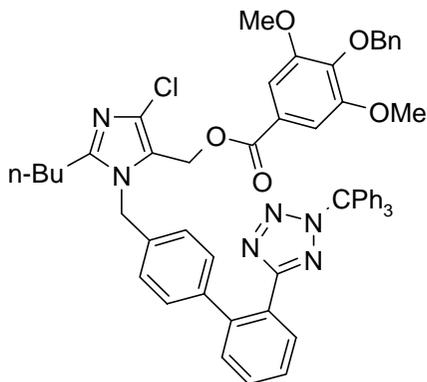
Encontrado: C(76,10); H (5,52); N (7,53)

4-benciloxi-3,5-dimetoxi-benzoato de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(1-trifil-1*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3*H*-imidazol-4-ilmetilo (53c)

Seguendo Procedimiento General **4.1.3**, a partir de una disolución de **12** (0,335 g; 0,5 mmoles) y trifenilfosfina (0,131 g; 0,5 mmoles) en éter anhidro (20 mL) y otra del ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico **52c** (151 mg; 0,52 mmoles) y DEAD (0,073 g; 0,5 mmoles) en éter anhidro (20 mL). Se obtienen 0,307 g (aceite incoloro).

Rendimiento: 62%

Rf: (Hx/ACOEt 1/1) 0,5



¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 8,01-7,95 (m, 1H); 7,54-7,50 (m, 4H); 7,43-7,23 (m, 15H); 7,14 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H); 6,99 (d, *J* = 7,2 Hz, 6H); 6,81 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H); 5,17 (s, 2H); 5,13 (s, 4H); 3,88 (s, 6H); 2,58 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H); 1,74 (q, *J* = 7,9 Hz, 2H); 1,34 (sext, *J* = 7,9 Hz, 2H); 0,93 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): 165,6; 163,7; 153,0; 148,8; 141,1; 141,0; 140,9; 137,1; 134,0; 130,5; 130,3; 130,0; 129,9; 129,7; 128,2; 128,1; 128,0; 127,8; 127,6; 127,5; 125,9; 125,0; 124,4; 120,5; 106,8; 82,7; 74,8; 56,2; 54,8; 47,2; 29,6; 26,8; 22,4; 13,7 ppm.

MS (APCI POS) *m/e*: 935 (*M*⁺+1, 21); 957 (*M*⁺+Na, 100)

Análisis elemental C₅₇H₅₁N₆O₅Cl (935,50 g/mol)

Calculado: C (73,18); H (5,49); N (8,98)

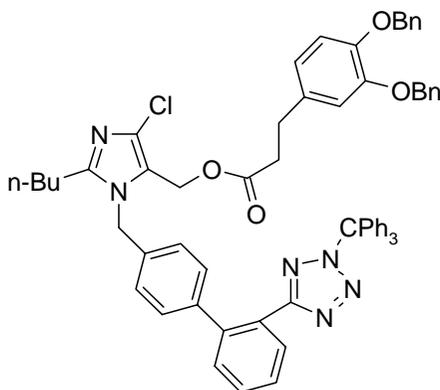
Encontrado: C (73,32); H (5,57); N (8,67)

3-(3,4-bis-benciloxi-fenil)-propionato de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(1-tritil-1*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3*H*-imidazol-4-ilmetilo (53e)

Siguiendo Procedimiento General 4.1.3, a partir de una disolución de **12** (0,335 g; 0,5 mmoles) y trifenilfosfina (0,131 g; 0,5 mmoles) en éter anhidro (20 mL) y otra del ácido 3-(3,4-bis-benciloxi)fenilpropanoico **52e** (0,181 g; 0,5 mmoles) y DEAD (0,073 g; 0,5 mmoles) en éter anhidro (20 mL). Se obtienen 0,318 g (aceite amarillo).

Rendimiento: 63%

Rf: (Hx/AcOEt 1/1) 0,56



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3428, 3063, 2958, 2248, 1734, 1604, 1512, 1451, 1425, 1377, 1257, 1137, 1026, 908, 732, 698, 647 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,95-7,90 (m, 1H); 7,49-7,20 (m, 21H); 7,09 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,96 (d, $J = 1,0$ Hz, 6H); 6,69 (m, 6H); 5,12 (s, 2H); 5,08 (s, 2H); 4,93 (s, 2H); 4,85 (s, 2H); 2,72 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 2,47 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H); 2,34 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,64 (q, 2H); 1,29 (sext, 2H); 0,86 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 172,1; 163,7; 148,8; 147,7; 147,2; 141,0; 140,9; 140,8; 137,2; 137,0; 134,0; 133,4; 130,5; 130,1; 130,0; 129,8; 129,6; 128,2; 128,1; 127,6; 127,5; 127,17; 127,12; 126,0; 124,8; 120,8; 120,3; 115,1; 115,0; 82,7; 71,3; 71,1; 54,1; 47,0; 35,4; 30,1; 29,5; 26,7; 22,3; 13,7 ppm.

MS (ESI+, m/e): 1010 (M⁺+2, 10); 1011 (M⁺+3, 13); (M⁺+Na, 17)

Análisis elemental: C₆₄H₅₇N₆O₄Cl (1009,62 g/mol):

Calculado: C (76,14); H (5,69); N (8,32)

Encontrado: C (76,02); H (5,72); N (8,57)

4.2. SÍNTESIS DEL ÉSTER INVERSO 54e

4.2.1. Síntesis de alcoholes 57 y 60g: Procedimiento General

Una solución del ácido comercial **10** y bromuro de bencilo (1,5 eq por grupo a proteger) en DMF anhidra (5 mL) se trata con K₂CO₃ seco (2 eq por grupo a proteger) a 60 °C durante 20 horas bajo atmósfera de argón. Pasado el tiempo se enfría a temperatura ambiente, se filtra y se elimina el disolvente a sequedad. El residuo se disuelve en AcOEt (10 mL), se lava con HCl (1M) (3 x 5 mL), NaCl (sat) (5 x 5 mL) y se seca con MgSO₄ (anh). Se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en THF (seco) y se añade gota a gota sobre una suspensión de LiAlH₄ (1,1 eq) en éter etílico (seco) a 0°C bajo atmósfera de argón. Terminada la adición la reacción se mantiene a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso. Se añade HCl (20%) hasta pH 1 y se extrae con AcOEt/éter etílico (1:1) (4 x 10 mL). La fase orgánicas se lava con NaCl (sat), se seca sobre Na₂SO₄ (anh), se filtra y se concentra a vacío. El residuo se

purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando el eluyente necesario en cada caso.

(3,4,5,-Trifenoxi-fenil)-metanol⁷ (57b)

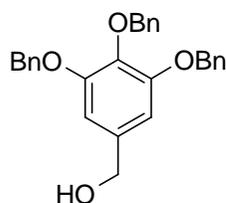
A partir del ácido comercial **10b** (0,5 g; 2,94 mmol), bromuro de bencilo (3,01 g; 17,64 mmol), K₂CO₃ (3,25 g; 23,52 mmol) y DMF (5 mL) durante 20 h. Posterior tratamiento con LiAlH₄ (0,123 g; 3,24 mmol) en Et₂O/THF (1:1) (20 mL) durante 3 h. Eluyente hexano/AcOEt (2:1). Se obtienen 0,701 g (sólido blanco).

Rendimiento: 56%

P.f.: 109 - 110 °C

Lit⁷: P.f: 106 – 108 °C

Rf: (Hexano/AcOEt 2/1) 0,22



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3337, 3066, 3015, 2868, 2401, 1593, 1503, 1454, 1436, 1373, 1330, 1216, 1117, 1077, 1028, 974, 906, 859, 835, 811, 754, 697, 667 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,31-7,14 (m, 15H); 6,55 (s, 2H); 4,98 (s, 4H); 4,96 (s, 2H); 4,42 (s, 2H); 1,90 (s, 1H) ppm.

MS (DIP/IE) m/e (intensidad relativa) 426 (M⁺, 11)

Análisis elemental: C₂₈H₂₆O₄ (426,50 g/mol)

Calculado: C (78,85); H (6,14)

Encontrado: C (78,92); H (6,02)

⁷ Percec, V.; Peterca, M.; Sienkowska, M. J.; Ilies, M. A.; Aqad, E.; Smidrkal, J.; Heiney, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3324-3334.

(4-Benciloxi-3,5-dimetoxi-fenil)-metanol⁸ (57c)

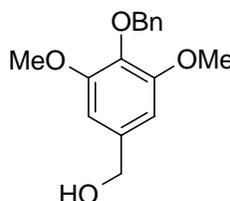
A partir del ácido comercial **10c** (0,5 g; 2,52 mmol), bromuro de bencilo (1,294 g; 7,57 mmol), K₂CO₃ (1,394 g; 10,1 mmol) y DMF (5 mL) durante 20 h. Posterior tratamiento con LiAlH₄ (0,105 g; 2,78 mmol) en Et₂O/THF (1:1) (15,25 mL) durante 45 minutos. Eluyente hexano/AcOEt (1:1). Se obtienen 0,597 g (sólido blanco).

Rendimiento: 86%

P.f.: 48 - 50 °C

Lit⁸: P.f: 47 - 49 °C

Rf: (Hexano/AcOEt 1/1) 0,2



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3427, 3008, 2938, 2877, 2839, 1593, 1503, 1459, 1421, 1330, 1235, 1127, 1012, 983, 961, 828, 755, 697, 666 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,40-7,37 (m, 2H); 7,27-7,15 (m, 3H); 6,47 (s, 2H); 4,89 (s, 2H); 4,50 (s, 2H); 3,72 (s, 6H); 1,76 (s_{ancho}, 1H) ppm.

MS (DIP/IE) m/e (intensidad relativa) 275 (M+1, 60); 274 (M⁺, 324); 183 (M-C₇H₇, 779).

Análisis elemental: C₁₆H₁₈O₃ (274,31 g/mol)

Calculado: C (74,39); H (7,02)

Encontrado: C (74,41); H (7,03)

3-(3,4-Bis-benciloxi-fenil)-propan-1-ol (57e)

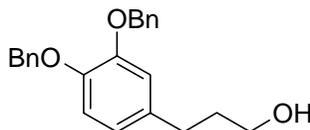
A partir del ácido comercial **10e** (0,5 g; 2,74 mmol), bromuro de bencilo (2,11 g; 12,34 mmol), K₂CO₃ (2,27 g; 16,46 mmol) y DMF (5 mL) durante 20 h. Posterior tratamiento con LiAlH₄ (0,103 g; 2,71

⁸ Brown, E.; Daugan, A. *Heterocycles*, **1987**, 26, 1169-72.

mmol) en Et₂O/THF (1:1) (18 mL) durante 2,5 h. Eluyente hexano/AcOEt (1:1). Se obtienen 0,675 g (aceite incoloro).

Rendimiento: 56%

Rf: (Hexano/AcOEt 1/1) 0,31



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3390, 3031, 2937, 1588, 1511, 1453, 1424, 1380, 1262, 1217, 1135, 1023, 909, 849, 808, 755, 696, 666 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,38-7,21 (m, 10H); 6,78 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 6,72 (s, 1H); 6,61 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 5,06 (s, 2H); 5,04 (s, 2H); 3,48 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H); 2,51 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,70 (q, 2H) ppm.

MS (DIP/IE) m/e (intensidad relativa) 348 (M⁺, 55)

Análisis elemental: C₂₃H₂₄O₃ (348,43 g/mol)

Calculado: C (79,28); H (6,94)

Encontrado: C (79,00); H (6,99)

2,6-Di-ter-butil-4-(2-hidroxi-etil)-fenol (60g)

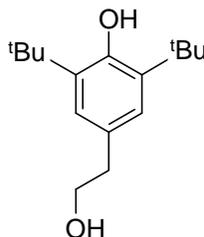
A partir del ácido comercial **10g** (0,5 g; 1,89 mmol), bromuro de bencilo (0,485 g; 2,83 mmol), K₂CO₃ (0,522 g; 3,78 mmol) y DMF (5 mL) durante 20 h. Posterior tratamiento con LiAlH₄ (0,064 g; 1,68 mmol) en Et₂O/THF (1:1) (16 mL) durante 3 h. Eluyente hexano/AcOEt (2:1). Se obtienen 0,274 g (sólido blanco).

Rendimiento: 71%

P.f.: 100,7 –101,4 °C

Lit⁹: P.f: 99,5 –101,0 °C

Rf: (Hexano/AcOEt 2/1) 0,56



⁹ Ershov, V. V.; Belostotskaya, I. S. Inst. Phys. Chem., Moscow, Izvestiya Akademii Nauk SSSR, *Seriya Khimicheskaya* **1965**, 7, 1301-3.

IR (CHCl₃): ν_{\max} 3641, 3400, 3073, 3002, 2958, 2360, 2341, 1599, 1434, 1391, 1360, 1317, 1216, 1118, 1074, 1045, 845, 757, 667 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 6,99 (s, 2H); 5,085 (s, 1H); 3,81 (c, $J = 5,6$ Hz, 2H); 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H); 1,42 (s, 9H); 1,41 (s, 9H) ppm.

MS (DIP/IE) m/e (intensidad relativa) 250 (M⁺, 399)

Análisis elemental: C₁₆H₂₆O₂ (250,37 g/mol)

Calculado: C (76,75); H (10,46)

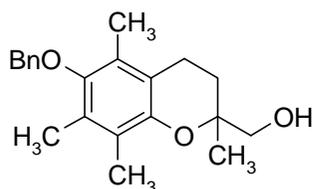
Encontrado: C (76,48); H (10,32)

(6-Benciloxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-il)-metanol (57h)

A partir del ácido comercial **10h** (0,5 g; 2 mmol), bromuro de bencilo (1,025 g; 6 mmol), K₂CO₃ (1,104 g; 8 mmol) en DMF (5 mL) durante 20 h. Posterior tratamiento con LiAlH₄ (0,083 g; 2,19 mmol) en Et₂O/THF (1:1) (18 mL) durante 2,5 h. Eluyente hexano/AcOEt (1:1). Se obtienen 0,63 g (aceite amarillo).

Rendimiento: 97%

Rf: (Hexano/AcOEt 1/1) 0,53



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3368, 2872, 1496, 1454, 1413, 1372, 1255, 1216, 1157, 1087, 1046, 1016, 913, 898, 759, 698, 667 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,40-7,02 (m, 5H); 4,58 (s, 2H); 3,49 (q, 2H); 2,57 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H); 2,33 (s_{ancho}, 1H); 2,17 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 2,01 (s, 3H); 1,95-1,80 (dt_{aparente}, $J = 8,2$ Hz, 1H); 1,66-1,54 (dt_{aparente}, $J = 5,6$ Hz, 1H); 1,12 (s, 3H) ppm.

MS (DIP/IE) m/e (intensidad relativa) 326 (M⁺, 47)

Análisis elemental: C₂₁H₂₆O₃ (326,42 g/mol)

Calculado: C (77,26); H (8,02)

Encontrado: C (77,20); H (8,15)

4.2.2. Síntesis de alcoholes antioxidantes 60. Procedimiento General

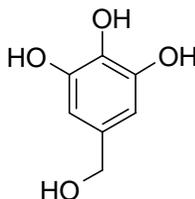
A una disolución del alcohol **57** en MeOH se añade Pd/C (30%) (0,2-0,5 eq/grupo a hidrogenar) bajo atmósfera de argón. Se pasa una corriente de argón durante 10 minutos y se mantiene la agitación bajo atmósfera de hidrógeno (1 atm) durante el tiempo necesario. Se filtra sobre Celita y se elimina el disolvente a vacío obteniéndose un residuo que se cromatografía en columna de gel de sílice utilizando el eluyente necesario en cada caso o se cristaliza.

5-Hidroximetil-benceno-1,2,3-triol (**60b**)

A partir de (3,4,5,-Trifenoxi-fenil)-metanol **57b** (0,1 g; 0,23 mmol) y Pd/C (30%) (0,015 g; 0,14 mmol) en MeOH (6 mL) durante 4,5 h. Eluyente AcOEt. Se obtienen 0,009 g (aceite marrón claro).

Rendimiento: 24%

Rf: (AcOEt) 0,45



IR (Acetona): ν_{\max} 3411, 3004, 1712, 1513, 1422, 1362, 1222, 1092, 1033, 903 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, MeOD): δ 6,38 (s, 2H); 4,40 (s, 2H) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, MeOD): δ 146,7; 133,4; 108,0; 107,2; 65,3 ppm.

MS (DIP/IE) m/e (intensidad relativa) 156 (M⁺, 133)

Análisis elemental: C₇H₈O₄ (156,13 g/mol)

Calculado: C (53,84); H (5,16)

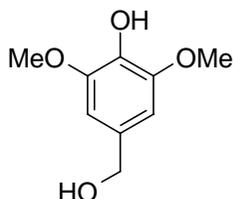
Encontrado: C (53,92); H (5,20)

4-Hidroximetil-2,6-dimetoxi-fenol (60c)

A partir de (4-Benciloxi-3,5-dimetoxi-fenil)-metanol **57c** (0,12 g; 0,43 mmol) y Pd/C (30%) (0,023 g; 0,22 mmol) en MeOH (4 mL) durante 3 h. Eluyente AcOEt. Se obtienen 0,021 g (aceite marrón oscuro).

Rendimiento: 26%

Rf: (AcOEt) 0,57



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3501, 2939, 2840, 1614, 1517, 1465, 1421, 1361, 1330, 1239, 1216, 1151, 1113, 1038, 965, 905, 814, 798, 643 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, MeOD): δ 6,44 (s, 2H); 4,89 (s, 2H); 3,81 (s, 6H); 2,27 (s, 2H) ppm.

MS (DIP/IE) m/e (intensidad relativa) 199 (M+Na, 55); 184 (M⁺, 43); 168 (M-16, 1000).

Análisis elemental: C₉H₁₂O₄ (184,18 g/mol)

Calculado: C(58,68); H(6,56)

Encontrado: C(58,62); H(6,42)

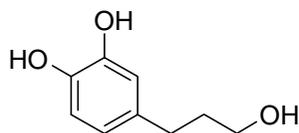
4-(3-hidroxi-propil)-benceno-1,2-diol (60e)

A partir de 3-(3,4-Bis-benciloxi-fenil)-propan-1-ol **57e** (0,12 g; 0,34 mmol) y Pd /C (30%) (0,014 g; 0,13 mmol) en MeOH (4 mL)

durante 2 h. Eluyente hexano/AcOEt (1/2). Se obtienen 0,052 g (aceite marrón).

Rendimiento: 90%

Rf: (Hexano/AcOEt 1/2) 0,18



IR (CHCl_3): ν_{max} 3329, 2929, 1605, 1526, 1446, 1360, 1282, 1196, 1147, 1114, 1044, 959, 814, 789 cm^{-1} .

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, MeOD): δ 6,68 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 6,65 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 6,52 (dd, $J = 2,0$ Hz, $J = 7,9$ Hz, 1H); 3,57 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H); 2,54 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,79 (q, 2H) ppm.

MS (DIP/IE) m/e (intensidad relativa) 168 (M^+ , 379); 123 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_5\text{O}$, 1000).

Análisis elemental: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3$ (168,18 g/mol)

Calculado: C (64,27); H (7,19)

Encontrado: C (64,03); H (7,05)

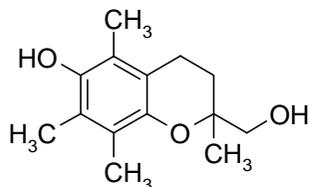
2-Hidroximetil-2,5,7,8-tetrametil-croman-6-ol (60h)

A partir de (6-Benciloxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-il)-metanol **57h** (0,12 g; 0,36 mmol) y Pd/C (30%) (0,008 g; 0,073 mmol) en MeOH (4 mL) durante 3 h. Cristalización: hexano/AcOEt. Se obtienen 0,052 g (sólido blanco).

Rendimiento: 60%

P.f.: 114,0 – 114,2 °C

Rf: (Hexano/AcOEt 1/2) 0,6



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3450, 3015, 2930, 2883, 1682, 1636, 1451, 1378, 1311, 1264, 1216, 1144, 1110, 1054, 941, 889, 755, 667 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, MeOD): δ 3,54 (c, $J = 11,2$ Hz, $J = 19,2$ Hz, 2H); 2,64 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H); 2,15 (s, 3H); 2,11 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 2,03-1,89 (m, 1H); 1,81-1,43 (m, 1H); 1,22 (s, 3H) ppm.

MS (DIP/IE) m/e (intensidad relativa) 236 (M⁺, 58); 235 (M-1, 354).

Análisis elemental: C₁₄H₂₀O₃ (236,30 g/mol)

Calculado: C (71,15); H (8,53)

Encontrado: C (71,20); H (8,45)

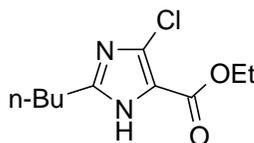
4.2.3. Síntesis del éster inverso 54e

2-Butil-5-cloro-3H-imizadol-4-carboxilato de etilo (62)

A una solución del aldehído **21** (3,0 g; 16,07 mmol) en EtOH absoluto (120 mL) se añade NaCN (4,17 g; 85,2 mmol), CH₃COOH (1,54 g; 25,71 mmol) y MnO₂ (29,34 g; 337,47 mmol). Se agita durante 20h a 60°C. Pasado el tiempo se filtra y se elimina el disolvente. El residuo se disuelve en éter etílico (60 mL) y se lava con H₂O (30 mL). La fase etérea se seca con MgSO₄ anh, se filtra y se concentra a sequedad para obtener un aceite marrón oscuro.

Rendimiento: 86%

Rf: (Hx/ACOEt/MeOH 4/1/0,05) 0,21



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3617, 3270, 3019, 2965, 2400, 1682, 1508, 1423, 1215, 1073, 757, 668 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 10,71 (s_{ancho}, 1H); 4,34 (c, $J = 7,1$ Hz, 2H); 2,70 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,70 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,43-1,22 (m, 5H); 0,89 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 160,3; 152,5; 134,9; 118,3; 61,8; 31,4; 28,8; 23,1; 14,6; 13,9 ppm.

MS (DIP-IE) m/e: 230 (M^+ , 8), 188 (M-42, 91); 142 (M-88, 100)

Análisis elemental: $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}_2\text{Cl}$ (230,69 g/mol)

Calculado: C(52,06); H(6,55); N(12,14)

Encontrado: C(51,99); H(6,59); N(12,23)

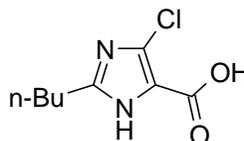
Ácido 2-butil-5-cloro-3H-imidazol-4-carboxílico (61)

A una solución del éster **62** (0,57 g; 2,49 mmol) en EtOH (20 mL) se añade NaOH 10N (1 mL) y se calienta a reflujo durante 2,5 horas. Se concentra a sequedad y se disuelve en H_2O (10 mL). Se extrae con éter etílico (10 mL) y la fase acuosa se acidifica con HCl 1M hasta pH 3-4. Se extrae con AcOEt (3 x 10 mL), se seca sobre MgSO_4 (anh), se filtra y se elimina el disolvente a vacío. Se obtienen 0,393 g de un sólido marrón oscuro.

Rendimiento: 78%

P.f.: 192,2 –193,0 °C

Rf: (ACOEt/MeOH 2/1) 0,37



IR (KBr): ν_{max} 3202, 2959, 2874, 2439, 1942, 1670, 1569, 1518, 1326, 1279, 1238, 1087, 824, 776, 760, 686 cm^{-1} .

^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 2,69 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,71 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,38 (Sext, $J = 7,4$ Hz, 2H); 0,97 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 161,5; 152,0; 134,7; 118,6; 31,5; 28,7; 23,1; 14,0 ppm.

MS (DIP-IE) m/e: 202 (M^+ , 8), 160 (M-42, 76); 142 (M-60, 100)

Análisis elemental: C₈H₁₁O₂N₂Cl (202,63 g/mol)

Calculado: C(47,41); H(5,47); N(13,82)

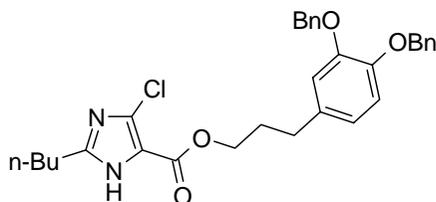
Encontrado: C(47,22); H(5,48); N(13,95)

2-Butil-5-cloro-3*H*-imidazol-4-carboxilato de 3-(3,4-bis-benciloxifenil)-propilo (63e)

Siguendo el Procedimiento General 4.1.3, a partir de una disolución del alcohol **57e** (2,0 g; 5,74 mmoles) y trifetilfosfina (1,50 g; 5,74 mmoles) en éter anhidro (75 mL) y otra del ácido **61** (1,16 g; 5,74 mmoles) y DEAD (0,99 g; 5,74 mmoles) en éter anhidro (75 mL) y THF anhidro (25 mL). Eluyente: hexano:AcOEt (1:1). Se obtienen 2,08 g (aceite amarillo).

Rendimiento: 68%

Rf: (Hx/ACOEt 1/1) 0,52



IR (KBr): ν_{\max} 3261, 3018, 2961, 2874, 1680, 1558, 1510, 1454, 1424, 1405, 1327, 1215, 1136, 1073, 1024, 755, 696, 696 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 9,46 (s_{ancho}, 1H); 7,43-7,24 (m, 10H); 6,86-6,67 (m, 3H); 5,11 (s, 2H); 5,10 (s, 2H); 4,23 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H); 2,67 (t, *J* = 7,7 Hz, 4H); 1,97 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H); 1,69 (q, *J* = 7,5 Hz, 2H); 1,34 (sext, *J* = 7,5 Hz, 2H); 0,90 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 159,9; 151,1; 148,7; 147,2; 137,2; 137,1; 134,3; 128,3; 127,7; 127,2; 121,2; 116,7; 115,6; 115,2; 71,4; 71,3; 64,2; 31,4; 30,1; 29,9; 28,3; 22,2; 13,6 ppm.

MS (DIP-IE) m/e: 555 (M⁺+Na, 100)

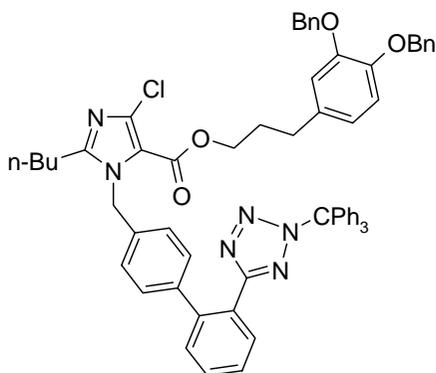
Análisis elemental: C₃₁H₃₃O₄N₂Cl (533,05 g/mol)

Calculado: C(69,84); H(6,24); N(15,25)

Encontrado: C(70,00); H(6,36); N(15,42)

Síntesis de 65e y 66e por alquilación de 63e

Una mezcla de **63e** (1,88 g; 3,53 mmol), bromuro de tetrabutilfosfonio (0,120 g; 0,353 mmol), NaOH (10N) (0,80 mL), H₂O (2,77 mL) y cloruro de metileno (11,3 mL) se añade sobre una disolución del compuesto **20** (1,96 g; 3,53 mmol) disuelto en cloruro de metileno (16,88 mL). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. Se añade H₂O (15 mL) y la fase orgánica se lava con H₂O (2 x 15 mL), se seca con MgSO₄. Se filtran y se elimina el disolvente a presión reducida para obtener un aceite amarillo que se purifica por columna cromatográfica en hexano/AcOEt (2:1) obteniéndose los dos isómeros puros.

2-Butil-5-cloro-3-[2'-(2-tritil-2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-carboxilato de 3-(3,4-bis-benciloxi-fenil)-propilo (65e)**Rendimiento:** 25%**Rf:** (Hx/ACOEt 2/1) 0,4**Aceite incoloro****Masa obtenida** 0,88 g

IR (CHCl₃): ν_{\max} 3423, 3059, 3030, 2955, 2929, 2869, 1701, 1603, 1511, 1491, 1451, 1424, 1392, 1374, 1264, 1224, 1138, 1103, 1025, 1005, 903, 880, 747, 696 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,91-7,88 (m, 1H); 7,48-7,21 (m, 22H); 7,08 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H); 6,93-6,65 (m, 11H); 5,44 (s, 2H); 5,11 (s, 2H); 5,10 (s, 2H); 4,12 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H); 2,63 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 2,50 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,90 (q, $J = 6,8$ Hz, 2H); 1,64 (q, $J = 7,9$ Hz, 2H); 1,27 (sext, $J = 7,3$ Hz, 2H); 0,85 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 163,9; 159,4; 152,3; 148,8; 147,1; 141,3; 141,1; 140,6; 137,4; 137,2; 136,6; 134,6; 134,5; 130,7; 130,2; 130,1; 129,9; 129,7; 128,3; 128,1; 127,6; 127,5; 127,3; 127,2; 126,1; 125,3; 121,2; 117,1; 115,7; 115,3; 82,8; 71,5; 71,3; 63,8; 48,2; 31,5; 30,2; 29,4; 26,8; 22,3; 13,7 ppm.

MS (APCI POS) m/e: 1008 ($\text{M}^+ + 1$, 100)

Análisis elemental: $\text{C}_{64}\text{H}_{57}\text{O}_4\text{N}_6\text{Cl}$ (1009,64 g/mol)

Calculado: C(76,13); H(5,69); N(8,32)

Encontrado: C(76,02); H(5,72); N(8,45)

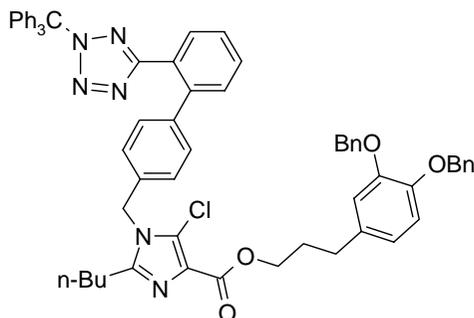
2-Butil-5-cloro-1-[2'-(2-tritil-2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-1H-imidazol-4-carboxilato de 3-(3,4-bis-benciloxi-fenil)-propilo (66e)

Rendimiento: 24%

Rf: (H_x/ACOEt 2/1) 0,16

Aceite amarillo

Masa obtenida 0,85 g



IR (CHCl_3): ν_{max} 3422, 3059, 3030, 2954, 2868, 1715, 1603, 1534, 1511, 1449, 1427, 1324, 1262, 1190, 1155, 1136, 1081, 1037, 1005, 903, 880, 847, 817, 783, 747, 697, 677 cm^{-1} .

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,96-7,93 (m, 1H); 7,52-7,21 (m, 22H); 7,11 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,92-6,69 (m, 11H); 5,12 (s, 2H); 5,11 (s, 2H); 5,03 (s, 2H); 4,33 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H); 2,66 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 2,55 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H); 2,04 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H); 1,61 (q, $J = 7,9$ Hz, 2H); 1,27 (sext, $J = 7,3$ Hz, 2H); 0,83 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 163,8; 161,9; 149,0; 148,8; 147,2; 141,2; 141,15; 141,1; 137,4; 137,3; 134,8; 133,1; 130,6; 130,1; 129,9; 129,8; 128,3; 128,2; 127,7; 127,68; 127,64; 127,5; 127,3; 127,2; 126,8; 126,1; 125,4; 123,4; 121,2; 115,5; 115,3; 82,8; 71,5; 71,3; 63,9; 46,9; 31,6; 30,3; 29,7; 27,6; 22,3; 13,6 ppm.

MS (APCI POS): 1009 ($\text{M}^+ + 1$)

Análisis elemental: $\text{C}_{64}\text{H}_{57}\text{O}_4\text{N}_6\text{Cl}$ (1009,64 g/mol)

Calculado: C(76,13); H(5,69); N(8,32)

Encontrado: C(76,23); H(5,87); N(8,45)

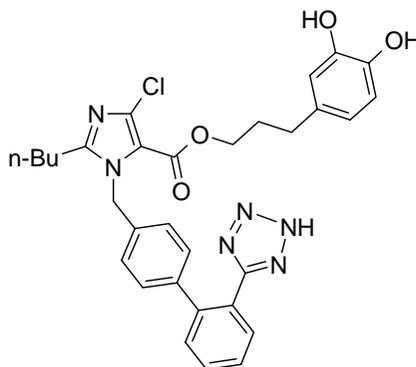
2-Butil-5-cloro-3-[2'-(2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-carboxilato de 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propilo (54e)

Seguendo el Procedimiento General 4.1.4, a partir de una disolución de **65e** (0,55g; 0,54 mmol) en MeOH/ CHCl_3 (10/4 mL) y Pd/C (30%) (0,6 eq / grupo a hidrogenar) durante 1 hora y 40 minutos. Se obtiene un residuo que se tritura en éter etílico y el precipitado se cromatografía. Eluyente: AcOEt/MeOH (2:1). Se obtienen 0,223 g (sólido blanco).

Rendimiento: 70%

P.f.: 150 - 151 °C

Rf: (AcOEt/MeOH 2/1) 0,55



IR (KBr): ν_{max} 3179, 2957, 2870, 1701, 1604, 1527, 1486, 1459, 1425, 1397, 1361, 1267, 1208, 1148, 1119, 813, 760, 702, 669 cm^{-1} .

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,57-7,40 (m, 4H); 7,1 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H); 6,9 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H); 6,68-6,64 (m, 2H); 6,51-6,48 (m, 1H); 5,59 (s, 2H); 4,22 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H); 2,68 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 2,59 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H); 1,93 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 1,61 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 1,35 (sext, *J* = 7,3 Hz, 2H); 0,91 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 162,0; 160,6; 154,0; 146,2; 144,4; 142,7; 141,8; 136,4; 134,1; 131,8; 131,3; 130,7; 130,3; 128,2; 126,7; 120,7; 116,5; 116,3; 65,3; 49,4; 32,4; 31,5; 30,5; 27,5; 23,2; 14,0 ppm.

MS (APCI POS): 587 (M⁺+1)

Análisis elemental: C₃₁H₃₁O₄N₆Cl (587,06 g/mol)

Calculado C(63,42); H(5,32); N(14,31)

Encontrado C(63,25); H(5,45); N(14,54)

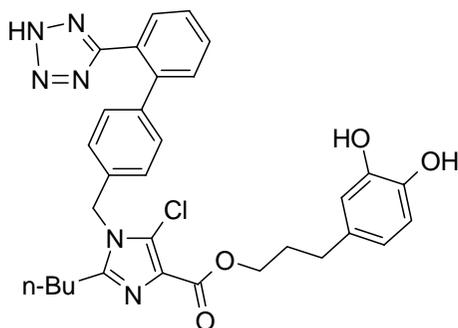
2-Butil-5-cloro-1-[2'-(2*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-1*H*-imidazol-4-carboxilato de 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propilo (67e)

Seguendo el Procedimiento General 4.1.4, a partir de una disolución de **66e** (0,711g; 0,70 mmol) en MeOH/CHCl₃ (13/5 mL) y Pd/C (30%) (0,6 eq / grupo a hidrogenar) durante 1 hora y 15 minutos. Se obtiene un residuo que se tritura en éter etílico y el precipitado se cromatografía. Eluyente: AcOEt/MeOH (2:1). Se obtienen 0,286 g (sólido blanco).

Rendimiento: 69%

P.f.: 177,5 –177,7 °C

Rf: (AcOEt/MeOH 2/1) 0,47



IR (KBr): ν_{\max} 3137, 3057, 2957, 2870, 2712, 1699, 1651, 1603, 1531, 1456, 1406, 1360, 1284, 1257, 1210, 1155, 1117, 1088, 1044, 1013, 1006, 865, 842, 816, 783, 758 cm⁻¹.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CD_3OD): δ 7,61-7,49 (m, 4H); 7,16 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 6,99 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H); 6,69 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 6,55 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 5,3 (s, 2H); 4,30 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H); 2,72-2,60 (m, 4H); 2,03 (q, $J = 6,7$ Hz, 2H); 1,59 (q, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,35 (sext, $J = 7,5$ Hz, 2H); 0,90 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 163,3; 160,9; 151,3; 146,1; 144,3; 142,5; 141,9; 135,2; 134,2; 131,7; 131,3; 130,9; 130,7; 128,5; 127,8; 127,0; 120,7; 125,0; 120,7; 116,5; 116,3; 65,1; 48,0; 32,4; 31,7; 30,6; 28,1; 23,2; 14,0 ppm.

MS (APCI POS): 587 ($\text{M}^+ + 1$)

Análisis elemental: $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}_6\text{Cl}$ (587,06 g/mol)

Calculado: C(63,42); H(5,32); N(14,31)

Encontrado: C(63,21); H(5,32); N(14,02)

4.3. SÍNTESIS DE LA AMIDA 68e

2-Butil-5-cloro-3-[2'-(2-tritil-2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-carbaldehido (40)

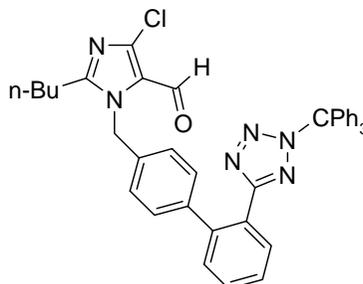
A una disolución de **20** (3,86 g; 6,93 mmoles) en CH_2Cl_2 (40 mL) se añade una mezcla formada por **21** (1,29 g; 6,93 mmoles), bromuro de tetrabutilfosfonio (0,235 g; 0,69 mmoles), NaOH 10 N (1,54 mL), H_2O (5,45 mL) y CH_2Cl_2 (27 mL). La mezcla se deja agitando durante 24 h. A continuación se añade H_2O (35 mL) y las fases se separan. La fase orgánica se lava con H_2O (2 x 35 mL), se seca sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y concentra a sequedad. El residuo se cromatografía en gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (2/1) obteniéndose 3,43 g de un sólido blanco.

Rendimiento: 75%

P.f.: 72 - 73 °C

Lit¹: aceite

Rf: (Hx/ACOEt 2/1) 0,5



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3400, 3059, 3026, 2958, 2931, 2871, 2731, 2359, 1810, 1666, 1601, 1514, 1490, 1462, 1447, 1429, 1410, 1381, 1357, 1326, 1276, 1217, 1188, 1157, 1103, 1085, 1029, 1005, 973, 929, 903, 879, 846, 820, 783, 755, 698, 677, 666, 640, 633 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 9,72 (s, 1H); 7,94-7,89 (m, 1H); 7,47-7,20 (m, 12H); 7,09 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 6,90 (d, $J = 7,3$ Hz, 6H); 6,82 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 5,43 (s, 2H); 2,51 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,63 (q, 2H); 1,27 (sext, 2H); 0,84 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

MS (API-ES+) m/e: 663 (M⁺+1, 100); (API-ES-) m/e: 661 (M⁺+1, 19)

Análisis elemental: C₄₁H₃₅N₆OCl (663,20 g/mol)

Calculado C(74,25); H(5,31); N(12,67)

Encontrado C(74,36); H (5,42); N(12,85)

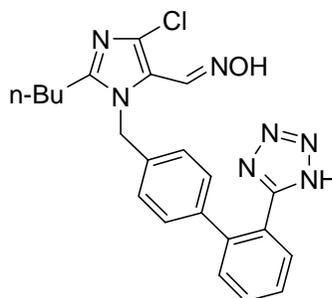
Oxima de 2-Butil-5-cloro-3-[2'-(2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-carbaldehído (70)

A una solución de **40** (11,83 g; 17,84 mmol) en EtOH absoluto (280 mL) se añade NH₂OH.HCl (2,72 g; 39,25 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 3 h. Pasado el tiempo se elimina el disolvente a sequedad, el residuo se tritura con AcOEt (100 mL) durante 30 minutos obteniendo 7,69 g de un sólido blanco que se filtra y seca.

Rendimiento: 99 %

P.f.: 215 - 217 °C

RF:(Hx / AcOEt 2/1) 0,06



IR (KBr): ν_{\max} 2999, 1800, 1568, 1476, 1418, 1189, 1152, 1058, 994, 874, 778, 763, 703, 610 cm⁻¹.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CD_3OD): δ 8,11 (s, 1H); 7,75-7,43 (m, 4H); 7,18 (s, 4H); 5,82(s, 2H); 2,95 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,61 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,38 (sext, $J = 7,6$ Hz, 2H); 0,92 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (200 MHz, CD_3OD): δ 156,5; 151,6; 142,6; 140,7; 136,9; 135,4; 132,5; 131,7; 131,5; 130,7; 129,1; 127,7; 124,2; 123,9; 122,6; 50,8; 29,8; 26,2; 13,1; 13,8 ppm.

MS (APCI POS): 436 ($\text{M}^+ + 1$)

Análisis elemental: $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ON}_7\text{Cl}$ (435,90 g/mol)

Calculado: C (60,61); H (5,08); N (22,49)

Encontrado: C (60,78); H (5,15); N (22,58)

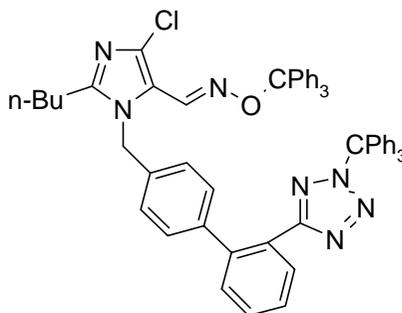
O-tritil-oxima de 2-Butil-5-cloro-3-[2'-(2-tritil-2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-carbaldehído (73)

Una mezcla de la oxima **70** (4,00 g; 9,17 mmol), $(\text{nBu})_4\text{NI}$ (1,016 g; 2,75 mmol), K_2CO_3 (2,78 g; 20,17 mmol) y Ph_3CCl (7,67 g; 20,17 mmol) en MeCN seco (220 mL) se calienta a reflujo durante 2h 15 minutos. Pasado el tiempo se filtra y se elimina el disolvente a sequedad. Se disuelve en CHCl_3 (100 mL), se lava con NaCl (sat) (2 x 100 mL) y con H_2O (2 x 100 mL), se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y concentra para dar una aceite amarillo oscuro que se cromatografía sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (3:1). El producto obtenido se tritura en éter etílico precipitando 2,985 g de un sólido blanco que se filtra y seca.

Rendimiento: 48%

P.f.: 208 - 210 °C

Rf: (Hex/ACOEt 3/1) 0,43



IR (KBr): ν_{\max} 3059, 3010, 2960, 2872, 1613, 1520, 1491, 1448, 1410, 1264, 1216, 1187, 1156, 1033, 1003, 979, 962, 925, 879, 755, 699, 667, 633 cm^{-1} .

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 8,38 (s, 1H); 7,97 (dd, $J = 1,4$ Hz, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,65-7,53 (m, 2H); 7,46-7,21 (m, 25H); 7,05-7,00 (m, 8H); 6,49 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 4,99 (s, 2H); 2,32 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,61 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H); 1,23 (sext, $J = 7,6$ Hz, 2H); 0,86 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 166,0; 153,3; 146,0; 143,5; 143,2; 141,9; 140,3; 136,5; 134,9; 132,8; 132,5; 132,1; 131,9; 131,4; 131,2; 130,9; 130,2; 129,8; 129,6; 129,4; 129,2; 129,0; 128,4; 128,2; 127,2; 121,3; 93,3; 84,8; 50,2; 31,3; 28,4; 24,2; 15,7 ppm.

MS (APCI POS): 921 ($\text{M}^+ + 1$, 3); 865 ($\text{M}^+ - 55$, 14)

Análisis elemental: $\text{C}_{60}\text{H}_{50}\text{ON}_7\text{Cl}$ (920,53 g/mol)

Calculado: C(78,28); H(5,47); N(10,65)

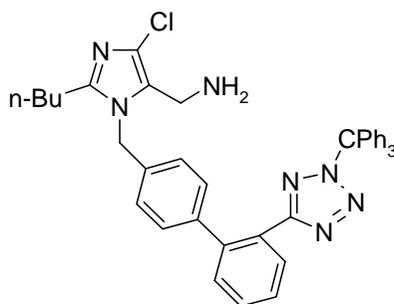
Encontrado: C(78,54); H(5,57); N(10,85)

{2-Butil-5-cloro-3-[2'-(2-tritil-2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-il}-metilamina (69)

Se prepara una suspensión de LiAlH_4 (1,19 g; 31,5 mmol) en THF (seco) (40 mL) bajo atmósfera de argón, se enfría a 0°C y se añade lentamente una solución del éter de oxima **73** (1,93 g; 2,1 mmol) en THF (seco) (40 mL). Se agita a temperatura ambiente durante 3,5 h. Pasado el tiempo se añade una solución saturada de NH_4Cl , se extrae con AcOEt (2 x 40 mL), se seca con Na_2SO_4 (anh), se filtra y concentra a sequedad obteniendo un aceite amarillo que se cromatografía inicialmente con hexano/ AcOEt (1:1) y a continuación con AcOEt/MeOH (5:1) obteniendo 0,6 g una espuma blanca.

Rendimiento: 43%

Rf: (ACOEt/ MeOH 5/1) 0,43



IR (CHCl_3): ν_{max} 3060, 3010, 2958, 2932, 2871, 1600, 1577, 1493, 1447, 1425, 1410, 1356, 1250, 1216, 1157, 1029, 1005, 932, 880, 754, 698 cm^{-1} .

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 7,93-7,89 (m, 1H); 7,51-7,38 (m, 2H); 7,36-7,20 (m, 10H); 7,09 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H); 6,92-6,87 (m, 6H); 6,72 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H); 5,12 (s, 2H); 3,49 (s, 2H); 2,47 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,63 (q, $J = 7,9$ Hz, 2H); 1,43 (s_{ancho} , 2H); 1,26 (sext, $J = 7,6$ Hz, 2H); 0,83 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 163,8; 147,5; 141,2; 140,8; 134,8; 130,6; 130,2; 130,1; 129,9; 129,8; 128,2; 127,67; 127,6; 126,2; 126,1; 125,7; 125,0; 82,8; 46,9; 34,6; 29,8; 22,4; 13,8 ppm.

MS (API-ES+) m/e: 664 ($\text{M}^+ + 1$, 22)

Análisis elemental: $\text{C}_{41}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{Cl}$ (664,24 g/mol)

Calculado C (74,13); H (5,76); N (14,76)

Encontrado C (74,02); H (5,24); N (14,59)

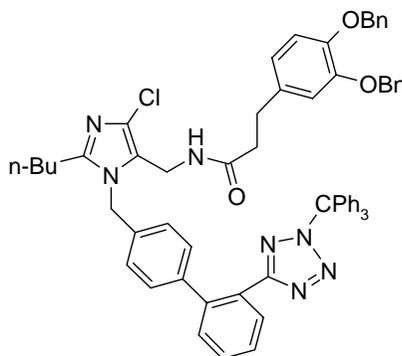
N-{2-butil-5-cloro-3-[2'-(2-tritil-2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-ilmetil}-3-(3,4-Bis-benciloxi-fenil)-propionamida (75e)

Una solución de CDI (0,118 g; 0,72 mmol) en THF (anh) (3 mL) se añade sobre una suspensión de ácido **52e** (0,12 g; 0,33 mmol) en THF (anh) (3 mL) bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se calienta a 60 °C durante 20 h. A continuación se añade la amina **69** (0,22 g; 0,33 mmol) disuelta en THF (anh) (3 mL) manteniendo la

agitación a 60 °C durante otras 4 horas. La mezcla se concentra a sequedad y el residuo se disuelve en CHCl₃ (5 mL). La disolución orgánica se lava con NaCl (sat) (5 mL) y la fase acuosa se extrae con CHCl₃ (3x5 mL). Se reúnen los extractos orgánicos y se secan con MgSO₄ anhidro, se filtra, se concentra a vacío y se cromatografía sobre gel de sílice en hexano/ACOEt (1:2), obteniendo 0,193 g una aceite amarillo.

Rendimiento: 58%

Rf: (Hx/ACOEt 1/2) 0,47



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3293, 3062, 3010, 2958, 2931, 2871, 1662, 1511, 1450, 1424, 1257, 1216, 1016, 1005, 755, 697 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,87-7,83 (m, 1H); 7,39-7,14 (m, 22H); 7,03 (d, J = 8,2 Hz, 2H); 6,91-6,87 (m, 6H); 6,74-6,61 (m, 4H); 6,54-6,49 (m, 1H); 5,23 (t, J = 5,7 Hz, 1H); 5,06 (s, 2H); 5,01 (s, 2H); 5,00 (s, 2H); 4,1 (d, J = 5,7 Hz, 2H); 2,63 (t, J = 7,6 Hz, 2H); 2,40 (t, J = 7,7 Hz, 2H); 2,02 (t, J = 7,6 Hz, 2H); 1,60 (q, J = 7,6 Hz, 2H); 1,20 (sext, J = 7,3 Hz, 2H); 0,79 (t, J = 7,3 Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 171,6; 163,8; 148,7; 148,0; 147,3; 141,2; 141,1; 140,7; 137,3; 137,2; 134,8; 133,8; 130,6; 130,2; 130,1; 129,9; 129,7; 128,3; 128,2; 127,6; 127,25; 127,22; 126,1; 124,8; 122,4; 120,9; 115,3; 115,2; 82,8; 71,3; 71,2; 46,8; 37,8; 31,5; 30,7; 29,7; 26,7; 22,3; 13,7 ppm.

MS (APCI POS): 1008 (M⁺+1)

Análisis elemental: C₆₄H₅₈O₃N₇Cl (1008,64 g/mol)

Calculado: C (76,21); H (5,79); N (9,72)

Encontrado: C (76,05); H (5,70); N (9,65)

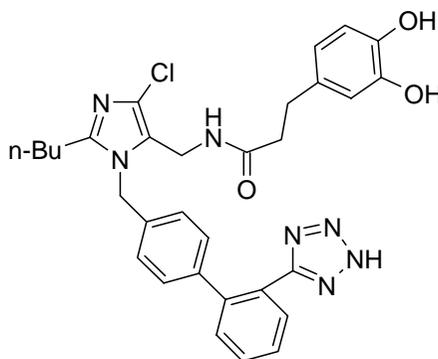
N-{2-Butil-5-cloro-3-[2'-(2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-ilmetil}-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propionamida (68e)

Seguendo el Procedimiento General 4.1.4, a partir de una disolución de **75e** (0,443g; 0,44 mmol) en MeOH/CHCl₃ (6:3 mL) y Pd/C (30%) (0,7 eq/grupo a hidrogenar) durante 45 minutos. Eluyente: AcOEt/MeOH (5:1). Se obtienen 0,175 g (sólido blanco).

Rendimiento: 68%

P.f.: 178,4 –178,6 °C

Rf: (AcOEt/MeOH 5/1) 0,31



IR (KBr): ν_{\max} 3252, 3059, 2957, 2870, 2715, 1650, 1604, 1527, 1459, 1424, 1360, 1258, 1209, 1152, 1116, 1075, 1005, 819, 778, 759 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,58 (dd, $J = 1,5$ Hz, $J = 7,1$ Hz 1H); 7,54-7,44 (m, 2H); (dd, $J = 1,4$ Hz, $J = 7,7$ Hz 1H); 7,1 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,8 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 6,64-6,60 (m, 2H); 6,44 (dd, $J = 2,1$ Hz, $J = 7,8$ Hz 1H); 5,02 (s, 2H); 4,28 (s, 2H); 2,62 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 2,55 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1); 2,16 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,56 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,32 (sext, $J = 7,5$ Hz, 2H); 0,89 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 174,9; 160,7; 149,9; 146,1; 144,5; 142,6; 141,4; 136,5; 133,4; 131,7; 131,4; 130,8; 130,7; 128,7; 128,4; 127,8; 126,5; 124,2; 120,5; 116,5; 116,2; 47,9; 38,4; 32,3; 31,8; 30,8; 27,3; 23,2; 14,0 ppm.

MS (APCI POS): 586 (M⁺+1); (API-ES, Pos) 586; (API-ES, Neg) 584

Análisis elemental: C₃₁H₃₂O₃N₇Cl (586,08 g/mol)

Calculado: C (63,52); H (5,50); N (16,72)

Encontrado: C (63,25); H (5,48); N (16,62)

4.4. SÍNTESIS DE LA AMIDA INVERSA 76e

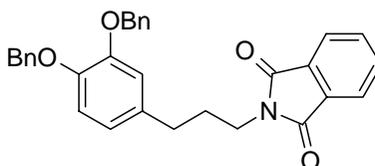
2-[3-(3,4-Bis-benciloxi-fenil)-propil]-isoindol-1,3-diona (79e)

A una solución del alcohol **57e** (2,58 g; 7,41 mmol), trifrenilfosfina (1,94 g; 7,41 mmol) y ftalimida (1,09g; 7,41 mmol) en THF (anh) (60 mL) se añade gota a gota dietilazodicarboxilato (DEAD) (0,174 g; 7,41 mmol) bajo atmósfera de argón. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 20 h. Se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se cromatografía sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (1:1). Se obtiene un aceite que se tritura en éter etílico precipitando 0,215 g de un sólido blanco.

Rendimiento: 94%

P.f.: 91 - 93 °C

Rf: (AcOEt/MeOH 1/1) 0,72



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3461, 3061, 3030, 2934, 2863, 1779, 1769, 1713, 1607, 1587, 1517, 1465, 1454, 1436, 1427, 1398, 1380, 1365, 1331, 1266, 1245, 1224, 1188, 1136, 1106, 1083, 1027, 1006, 969, 944, 914, 886, 855, 791, 766, 733, 708, 698, 605 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,81-7,70 (m, 2H); 7,69-7,66 (m, 2H); 7,45-7,26 (m, 10H); 6,81-6,78 (m, 2H); 6,69-6,66 (m, 1H); 5,12 (s, 2H); 5,05 (s, 2H); 3,68 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H); 2,57 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,95 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 168,3; 148,8; 147,1; 137,4; 137,3; 134,5; 133,8; 132,0; 128,3; 127,6; 127,3; 127,2; 123,0; 121,0; 115,3; 71,4; 71,1; 37,6; 32,6; 29,7 ppm.

MS (APCI POS): 500 (M⁺+Na)

Análisis elemental: C₃₁H₂₇O₄N (477,51 g/mol)

Calculado C(77,96); H(5,69); N(2,93)

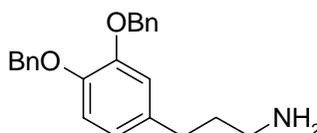
Encontrado C(78,00); H(5,71); N(3,00)

3-(3,4-Bis-benciloxi-fenil)-propilamina (77e)

A una solución de la ftalimida **79e** (3,12g; 6,54 mmol) en EtOH (30 mL) se le añade hidrazina monohidratada (NH₂-NH₂·H₂O) (0,32 g; 6,54 mmol) y se calienta a reflujo durante 10 h. Se elimina el disolvente a presión reducida y se tritura con CHCl₃ durante 30 minutos. Se filtra, y el filtrado se evapora a presión reducida y se realiza cromatografía sobre gel de sílice en MeOH para obtener 1,471 g de un aceite amarillo.

Rendimiento: 65%

Rf: (MeOH) 0,17



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3031, 2929, 2858, 1587, 1511, 1453, 1424, 1380, 1263, 1223, 1137, 1079, 1023, 852, 806, 735, 696 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,48-7,25 (m, 10H); 6,89-6,80 (m, 2H); 6,70 (dd, $J = 1,8$ Hz, $J = 8,0$ Hz, 1H); 5,15 (s, 2H); 5,12 (s, 2H); 2,65 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 2,55 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,69 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H); 1,34 (s_{ancho}, 2H) ppm.

¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 148,7; 147,1; 137,5; 137,3; 135,6; 128,3; 127,64; 127,62; 127,29; 127,25; 121,1; 115,6; 115,3; 71,5; 71,3; 41,6; 35,3; 32,6 ppm.

MS (APCI POS): 348 (M⁺ + 1)

Análisis elemental: C₂₃H₂₅O₂N (347,45 g/mol)

Calculado: C(79,50); H(7,25); N(4,03)

Encontrado: C(79,25); H(7,52); N(4,08)

Ácido 2-Butil-5-cloro-3-[2'-(2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-carboxílico (6)

A una solución del aldehído **40** (2,0 g; 3,01 mmol) en EtOH absoluto (22,5 mL) se añade NaCN (0,781 g; 16 mmol), CH₃COOH (0,289 g; 4,81 mmol) y MnO₂ (5,50 g; 63,21 mmol) y se agita durante

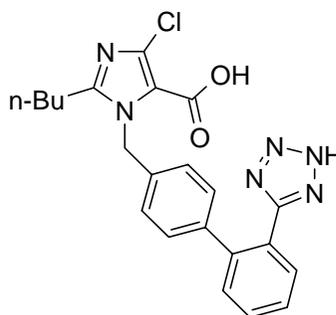
21 h a reflujo. Pasado el tiempo se filtra y se elimina el disolvente. El residuo se disuelve en éter etílico (12 mL), se extrae con H₂O (12 mL), y se seca con MgSO₄ (anh). Se filtra y concentra a sequedad para obtener un aceite marrón oscuro. El residuo se disuelve en etanol absoluto (45 mL), se le añade NaOH (10N) (1 mL) y se calienta a reflujo durante 3 horas. Se concentra a sequedad y se disuelve en H₂O (10 mL), se acidifica con HCl (1M) hasta pH 3-4. Se extrae con AcOEt (3 x 10 mL), se seca sobre MgSO₄ (anh), se filtra y se elimina el disolvente para obtener un sólido marrón oscuro, que se cromatografía sobre gel de sílice en AcOEt/MeOH (2/1) para obtener 1,02 g de un sólido ligeramente amarillo.

Rendimiento: 78%

P.f.: 177-179 °C

Lit¹⁰ (P.f): 176-178 °C

Rf: (ACOEt/MeOH 2/1) 0,28



IR (KBr): ν_{\max} 3365, 2957, 1599, 1458, 1407, 1359, 1261, 1173, 1108, 1054, 1006, 976, 894, 816, 760, 668 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, MeOD): δ 7,60-7,40 (m, 4H); 7,07 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 6,89 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 5,72 (s, 2H); 2,62 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,56 (q, 2H); 1,32 (sext, 2H); 0,88 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

MS (API-ES+) m/e: 437 (M⁺+1, 100); (API-ES-) m/e: 435 (M⁺+1, 12)

Análisis elemental: C₂₂H₂₁N₆O₂Cl (436,89 g/mol)

Calculado: C (60,48); H (4,84); N (19,23)

Encontrado: C (60,52); H (4,95); N (19,25)

¹⁰ Santagada, V.; Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; Terracciano, S.; Texeira, C.E.; Caliendo, G. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1149-1152.

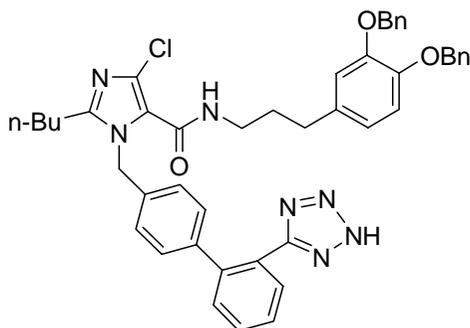
N-[3-(3,4-bis-benciloxi-fenil)-propil]-2-Butil-5-cloro-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-carboxamida (82e)

Una solución de CDI (0,406 g; 2,5 mmol) en THF (anh) (15 mL) se añade bajo atmósfera de argón sobre una suspensión del ácido **6** (0,5 g; 1,14 mmol) en THF (anh) (40 mL). La mezcla resultante se calentó a 60°C durante 20 h. A continuación se añade la amina **77e** (0,87 g; 2,50 mmol) disuelta en THF anh (15 mL) manteniendo la agitación a 60°C durante 4 horas. La mezcla se concentra a sequedad y el residuo se disuelve en CHCl₃ (40 mL) y se lava con NaCl (sat) (40 mL). La fase acuosa se extrae con CHCl₃ (3 x 40 mL), se reúnen los extractos orgánicos y se secan con MgSO₄ (anh). Se filtra, se elimina el disolvente y el residuo se cromatografía sobre gel de sílice con AcOEt/MeOH (2:1). A continuación se recrystaliza en hexano/AcOEt (1:1) obteniendo 0,227 g de un sólido amarillo.

Rendimiento: 26%

P.f.: 134 - 136 °C

Rf: (AcOEt/MeOH 1/1) 0,73



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3123, 3032, 2931, 2860, 2609, 1958, 1648, 1511, 1258, 1135, 1063, 1013, 930, 852, 751, 696, 663 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,58-7,26 (m, 14H); 7,08 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,95 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,93-6,88 (m, 2H); 6,72-6,69 (m, 1H); 5,47 (s, 2H); 5,10 (s, 2H); 5,08 (s, 2H); 3,27 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 2,68 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 2,55 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,77 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H); 1,61 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,37 (sext, $J = 7,3$ Hz, 2H); 0,92 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

MS (API-ES+) m/e: 766 (M⁺+1, 100); (API-ES-) m/e: 764 (M⁺+1, 30)

Análisis elemental: C₄₅H₄₄O₃N₇Cl (766,32 g/mol)

Calculado C(70,52); H(5,78); N(12,79)

Encontrado C(69,72); H(5,74); N(12,25)

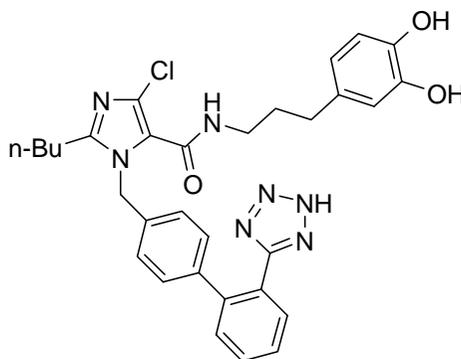
N-[3-(3,4-dihidroxy-fenil)-propil]-2-Butil-5-cloro-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-carboxamida (76e)

Seguendo el Procedimiento General 4.1.4, a partir de una disolución de **82e** (0,2 g; 0,26 mmol) en MeOH (5 mL) y Pd/C (30%) (0,51 eq/grupo a hidrogenar) durante 1 hora. Eluyente: AcOEt/MeOH (2:1). Se obtienen 0,100 g de un sólido ligeramente amarillo.

Rendimiento: 65%

P.f.: 180,2 –181,6 °C

Rf: (AcOEt/MeOH 2/1) 0,49



IR (KBr): ν_{\max} 3061, 2957, 2870, 1646, 1515, 1455, 1361, 1263, 1197, 1114, 1006, 814, 777, 760 cm^{-1} .

^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7,56-7,32 (m, 4H); 7,09 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,95 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,68-6,64 (m, 2H); 6,51-6,48 (m, 1H); 5,46 (s, 2H); 3,29 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 2,69 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 2,49 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,76 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H); 1,61 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,36 (sext, $J = 7,5$ Hz, 2H); 0,92 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 162,2; 161,3; 152,0; 146,1; 144,3; 142,6; 142,1; 136,2; 134,5; 131,8; 131,2; 130,7; 130,5; 130,2; 129,8; 128,2; 127,2; 123,0; 120,6; 116,5; 116,2; 40,1; 33,5; 32,3; 30,7; 27,3; 23,2; 14,0 ppm.

MS (API-ES+) m/e: 586 ($\text{M}^+ + 1$, 100); (API-ES-) m/e: 584 ($\text{M}^+ + 1$, 21)

Análisis elemental: $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{N}_7\text{Cl}$ (586,08 g/mol)

Calculado C(63,52); H(5,50); N(16,72)

Encontrado C(63,75); H(5,74); N(16,45)

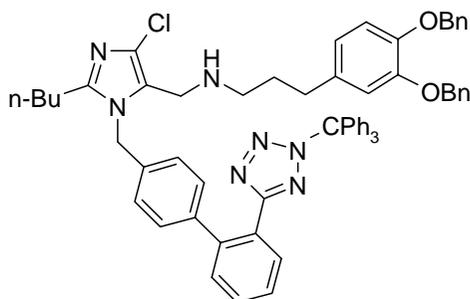
4.5. SÍNTESIS DE LA AMINA 83e

[3-(3,4-Bis-bencioxi-fenil)-propil]-{2-butil-5-cloro-3-[2'-(1-tritil-1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-ilmetil}-amina (85e)

A una solución del aldehído **40** (0,90 g; 1,35 mmol) y de la amina **77e** (0,471 g; 1,35 mmol) disueltos en la mínima cantidad de CH₂Cl₂, se le añade una punta de espátula de MgSO₄ anhidro y se agita a temperatura ambiente durante 17 h bajo atmósfera de argón. Pasado el tiempo se filtra y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo se disuelve en MeOH/CH₂Cl₂ (anh) (24:12 mL) bajo atmósfera de argón, se añade NaBH₄ (0,102 g, 2,71 mmol) en pequeñas porciones y se agita a temperatura ambiente durante 4 h. Se elimina el disolvente a sequedad y el residuo se disuelve en CH₂Cl₂ (18 mL), se lava con NaCl (sat) (2 x 10 mL) y se seca sobre MgSO₄ anhidro. Se filtra, se concentra a sequedad y el residuo se cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (1:2), obteniéndose un aceite incoloro.

Rendimiento: 34%

Rf: (Hx/AcOEt 1/2) 0,25



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3029, 2930, 1586, 1510, 1450, 1379, 1248, 1157, 1136, 1026, 930, 904, 880, 747, 696 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,95-7,92 (m, 1H); 7,47-7,22 (m, 22H); 7,09 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,94-6,91 (m, 6H); 6,83 (d, $J = 8,0$ Hz 2H); 6,73 (d, $J = 7,8$ Hz 2H); 6,62 (dd, $J = 1,9$ Hz $J = 8,2$ Hz 1H); 5,14 (s, 2H); 5,11 (s, 4H); 3,44 (s, 2H); 2,46 (t, $J = 7,7$ Hz, 6H); 1,63 (sext, $J = 7,7$ Hz, 4H); 1,28 (sext, $J = 7,4$ Hz, 2H); 1,06 (s_{anch} , 1H); 0,85 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 163,9; 148,8; 147,6; 147,1; 141,28; 141,23; 140,7; 137,4; 137,3; 135,5; 134,9; 130,6; 130,2; 130,1; 129,9; 129,7; 128,3; 128,2; 127,67; 127,6; 127,3; 127,2; 127,1; 126,1; 125,0; 123,6; 121,1; 115,6; 115,2; 82,8; 71,5; 71,3; 48,3; 46,8; 41,8; 32,9; 31,5; 29,7; 26,7; 22,4; 13,7 ppm.

MS (APCI POS): 995 ($M^{+}+1$)

Análisis elemental: $C_{64}H_{60}O_2N_7Cl$ (889,17 g/mol)

Calculado: C(77,28); H(6,08); N(9,85)

Encontrado: C(77,12); H(6,14); N(9,99)

Hidrogenación catalítica de la amina 85e

Siguiendo el Procedimiento General **4.1.4**, a partir de una disolución de **85e** (0,19 g; 0,19 mmol) en MeOH/ $CHCl_3$ (10:3 mL), y Pd/C (30%) (0,7 eq/grupo a hidrogenar) durante 2 horas 40 minutos. Eluyente: AcOEt/MeOH/TEA (2:1:0,2). Se obtienen dos productos puros.

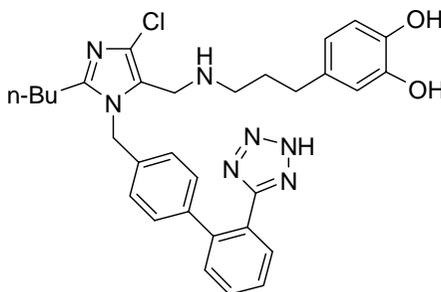
4-[3-(2-Butil-5-cloro-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-il-metil)amino)-propil]-benceno-1,2-diol (83e)

Rendimiento: 40%

P.f.: 97 – 99 °C

Rf: (AcOEt/MeOH/TEA 2/1/0,2) 0,36

Sólido anaranjado



IR (KBr): ν_{\max} 3381, 2925, 2139, 1636, 1457, 1357, 1257, 1207, 1150, 1119, 1013, 897, 812, 785, 759 cm^{-1} .

1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7,59-7,41 (m, 4H); 7,13 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,86 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H); 6,68-6,62 (m, 2H); 6,48-6,45 (m, 1H); 5,27 (s, 2H); 3,73 (s, 2H); 2,68-2,63 (m, 4H); 2,47 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 1,71 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H); 1,62 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H); 1,35 (sext, $J = 7,0$ Hz, 2H); 0,91 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 162,6; 150,3; 146,1; 144,3; 142,4; 135,9; 134,3; 131,7; 131,1; 131,0; 130,0; 128,9; 128,2; 126,4; 123,3; 120,6; 116,4; 116,2; 48,8; 48,2; 41,3; 33,6; 31,4; 30,9; 27,4; 23,2; 14,0 ppm.

MS (API-ES POS): 572 ($\text{M}^+ + 1$), (API-ES NEG): 570 ($\text{M}^+ - 1$)

Análisis elemental: $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_7\text{Cl}$ (572,10 g/mol)

Calculado: C(65,08); H(5,99); N(17,13)

Encontrado: C(65,12); H(6,02); N(17,25)

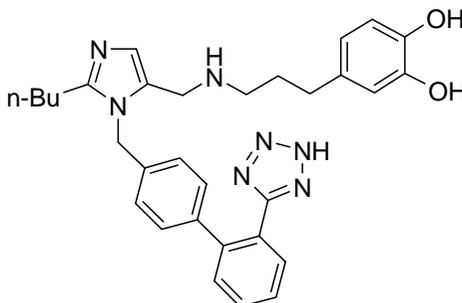
4-[3-({2-Butil-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-il-metil}amino)-propil]-benceno-1,2-diol (86e)

Rendimiento: 15%

P.f.: 100 - 101 °C

Rf: (ACOEt/MeOH/TEA 2/1/0,2) 0,12

Sólido amarillo claro



IR (KBr): ν_{max} 3418, 2957, 2869, 2349, 2297, 1603, 1519, 1459, 1407, 1358, 1282, 1151, 1118, 1011, 955, 889, 820, 786, 760 cm^{-1} .

^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7,63-7,43 (m, 4H); 7,14-7,11 (m, 3H); 6,82 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 6,71-6,65 (m, 2H); 6,53-6,50 (m, 1H); 5,27 (s, 2H); 3,99 (s, 2H); 2,94 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 2,74 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 2,57 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 1,90 (q, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,64 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H); 1,37 (sext, $J = 7,4$ Hz, 2H); 0,92 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 162,6; 152,5; 146,4; 144,8; 142,6; 142,4; 135,7; 133,1; 131,7; 131,1; 130,9; 130,1; 129,3; 128,4; 126,4; 120,5; 116,5; 116,4; 47,7; 41,8; 32,9; 31,0; 29,4; 27,5; 23,3; 14,0 ppm.

MS (API-ES POS): 538 ($\text{M}^+ + 1$), (API-ES NEG): 536 ($\text{M}^+ - 1$)

Análisis elemental: C₃₁H₃₅O₂N₇ (537,65 g/mol)

Calculado: C(69,25); H(6,56); N(17,13)

Encontrado: C(69,42); H(6,75); N(17,21)

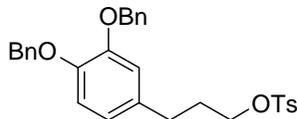
4.6. SÍNTESIS DEL ÉTER DE OXIMA 87e

Tosilato de 3-(3,4-bis-benciloxi-fenil)-propilo (89e)

A una solución del alcohol **57e** (4,0 g; 11,48 mmol) en CH₂Cl₂ (seco) (100 mL), se añade TEA (2,90 g; 28,7 mmol) y DMAP (0,35 g; 2,87 mmol) bajo atmósfera de argón. A continuación se añade en pequeñas porciones TsCl (5,47 g; 28,7 mmol) y se deja agitando a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se diluye con CH₂Cl₂ (50 mL) y se lava con NaHCO₃ (10%) (2x50 mL) y agua (50 mL). Se seca con MgSO₄ (anh), se filtra y se elimina el disolvente. El residuo se cromatografía sobre gel de sílice con hexano/AcOEt, 5:1 obteniéndose 5,19 g de un aceite incoloro.

Rendimiento: 90%

Rf: (Hx/ACOEt 5/1) 0,12



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3064, 3031, 2927, 2865, 1598, 1512, 1454, 1425, 1360, 1263, 1217, 1188, 1175, 1137, 1097, 1018, 969, 927, 833, 813, 754, 696, 664 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7,68 (d, J = 8,2 Hz, 2H); 7,36-7,15 (m, 11H); 6,73-6,46 (m, 3H); 5,02 (s, 4H); 3,89 (t, J = 6,2 Hz, 2H); 2,45 (t, J = 7,5 Hz, 2H); 2,33 (s, 3H); 1,78 (q, J = 7,5 Hz, 2H) ppm.

¹³C-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 148,7; 147,2; 144,5; 137,2; 137,1; 133,6; 132,9; 129,6; 128,2; 127,67; 127,60; 127,2; 127,1; 121,1; 115,4; 115,1; 71,3; 71,1; 69,4; 30,8; 30,3; 21,5 ppm.

MS (APCI POS): 503 (M⁺+1)

Análisis elemental: C₃₀H₃₀O₅S (502,62 g/mol)

Calculado: C (71,68); H (6,01); S (6,38)

Encontrado: C(71,54); H(5,98); S(6,81)

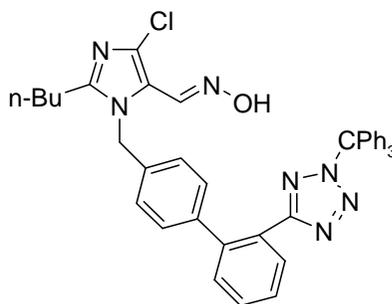
Oxima de 2-Butil-5-cloro-3-[2'-(2tritol-2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3H-imidazol-4-carbaldehído (72)

Una mezcla de la oxima **70** (2,5 g; 5,73 mmol), (nBu)₄NI (0,211 g; 0,57 mmol), K₂CO₃ (1,58 g; 11,46 mmol) y Ph₃CCl (2,875 g; 10,31 mmol) en MeCN (seco) (200 mL) se calienta a reflujo durante 3h bajo atmósfera de argón. Pasado el tiempo se filtra y se elimina el disolvente a sequedad. El residuo se disuelve en AcOEt (100 mL), se lava con NaCl (sat) (2 x 100 mL) y H₂O (2 x 100 mL) y se seca sobre Na₂SO₄ (anh). Se filtra y se concentra a sequedad para dar una aceite amarillo oscuro que se cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (3:1), obteniéndose 1,35 g de un sólido blanco.

Rendimiento: 35%

P.f.: 179,4 – 180,6 °C

Rf: (Hx/AcOEt 3/1) 0,25



IR (CHCl₃): ν_{\max} 3061, 3012, 2960, 2932, 2872, 1627, 1601, 1529, 1492, 1462, 1447, 1410, 1390, 1357, 1265, 1216, 1002, 956, 938, 875, 755, 698 cm⁻¹.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 8,05 (s, 1H); 7,90 (dd, $J = 1,7$ Hz, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,46 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,35-7,21 (m, 10H); 7,11 (s, 1H); 7,07 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 6,91 (d, $J = 7,8$ Hz, 6H); 6,75 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 5,38 (s, 2H); 2,44 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,58 (q, $J = 7,7$ Hz, 2H); 1,24 (sext, $J = 7,5$ Hz, 2H); 0,81 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 163,8; 151,4; 141,4; 140,5; 140,0; 134,7; 132,8; 130,6; 130,1; 129,9; 129,6; 128,1; 127,6; 126,2; 125,2; 118,9; 82,8; 48,5; 29,4; 26,6; 22,3; 13,7 ppm.

MS (APCI POS): 678 ($\text{M}^+ + 1$); 623 ($\text{M}^+ - 54$)

Análisis elemental: $\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{ON}_7\text{Cl}$ (678,22 g/mol)

Calculado: C (72,60); H (5,35); N (14,45)

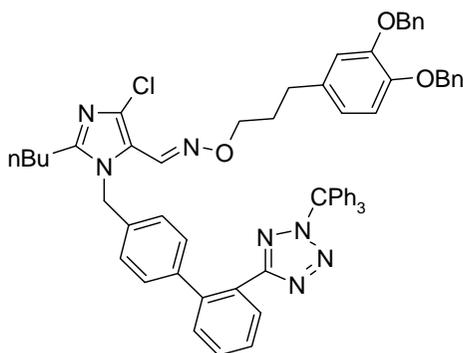
Encontrado: C (72,68); H (5,39); N (14,54)

O-[3-(3,4-bis-benciloxi-fenil)-propil]-oxima de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(2-tritil-2H-tetrazol-5-il)-bifenil-4ilmetil]-3H-imidazol-4-carbaldehído (90e)

A una solución bajo atmósfera de argón de la oxima **72** (0,3g; 0,44 mmol) en CH_3CN (seco) (9 mL) se le añade NaH (0,023g; 0,97mmol), a continuación se adiciona el tosilato **89e** (0,265g; 0,528 mmol) disuelto en CH_3CN (seco) (3 mL); se deja agitando a 65 °C durante 1h, pasado el tiempo se adiciona NaH (0,021 g; 0,88 mmol) y se deja agitando a 65 °C durante 1,5 h. Se elimina el disolvente a vacío, se añade AcOEt (6 mL) y se extrae con H_2O (2 x 6 mL), se reúnen las fases orgánicas y se secan con Na_2SO_4 (anh), se filtra y se concentra a sequedad. El residuo se purifica por columna cromatografica en hexano/AcOEt (2:1) obteniendo 0,229 g de un aceite trasparente.

Rendimiento: 52%

Rf: (Hx/AcOEt 2/1) 0,31



IR (CHCl_3): ν_{max} 3061, 2957, 2931, 2870, 1610, 1512, 1451, 1424, 1379, 1357, 1262, 1217, 1189, 1157, 1026, 960, 931, 880, 846, 749, 697 cm^{-1} .

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,04 (s, 1H); 7,88-7,74 (m, 1H); 7,46-7,13 (m, 22H); 7,05 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H); 6,92-6,89 (m, 6H); 6,80-6,72 (m, 4H); 6,59-6,56 (m, 1H); 5,37 (s, 2H); 5,07 (s, 2H); 5,05 (s, 2H); 3,86 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); 2,48-2,42 (m, 4H); 1,73 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H); 1,60 (q, *J* = 7,6 Hz, 2H); 1,24 (sext, *J* = 7,4 Hz, 2H); 0,82 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 163,9; 151,3; 148,8; 147,2; 141,4; 141,2; 140,4; 138,0; 137,5; 137,3; 135,1; 134,8; 132,8; 130,7; 130,3; 130,1; 129,9; 129,7; 129,6; 128,3; 128,2; 127,8; 127,7; 127,65; 127,6; 127,3; 127,2; 126,2; 125,6; 121,2; 119,0; 115,7; 115,2; 82,8; 73,3; 71,4; 71,3; 48,6; 31,4; 30,5; 29,4; 26,6; 22,3; 13,7 ppm.

MS (APCI POS): 1010 (M⁺+3, 4); 953 (M⁻- 54, 18)

Análisis elemental: C₆₄H₅₈O₃N₇Cl (1008,64 g/mol)

Calculado: C (76,21); H (5,79); N (9,72)

Encontrado: C (76,02); H (5,87); N (9,88)

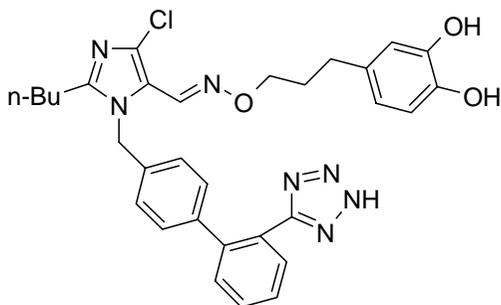
O-[3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propil]-oxima de 2-butil-5-cloro-3-[2'-(2*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]-3*H*-imidazol-4-carbaldehído (87e)

Siguiendo el Procedimiento General 4.1.4, a partir de una disolución de **90e** (0,14 g; 0,138 mmol) en MeOH/CHCl₃ (2:1 mL) y Pd/C (30%) (0,7 eq / grupo a hidrogenar) durante 45 minutos. Eluyente: AcOEt/MeOH (5:1). Se obtienen 0,023 g de un sólido blanco.

Rendimiento: 29%

P.f.: 141 - 142 °C

Rf: (ACOEt/MeOH 5/1) 0,5



IR (KBr): ν_{\max} 3058, 2957, 2931, 2870, 2362, 1605, 1567, 1525, 1459, 1423, 1395, 1361, 1264, 1152, 1117, 1038, 1006, 815, 759 cm^{-1} .

^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD): δ 8,04 (s, 1H); 7,62-7,36 (m, 4H); 7,09 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,92 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,67-6,61 (m, 2H); 6,46 (dd, $J = 1,9$ Hz, $J = 7,9$ Hz 1H); 5,57 (s, 2H); 3,97 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H); 2,66 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 2,47 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 1,78 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H); 1,59 (q, $J = 7,9$ Hz, 2H); 1,35 (sext, $J = 7,6$ Hz, 2H); 0,91 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 159,2; 153,0; 146,0, 144,2; 140,8; 138,2; 136,8; 134,6; 132,4; 131,5; 131,4; 130,5; 128,5; 127,1; 126,9; 120,7; 120,6; 116,5; 116,2; 112,4; 74,7; 49,7; 32,2; 32,1; 30,7; 27,3; 23,2; 14,0 ppm.

MS (API-ES POS): 586 ($\text{M}^+ + 1$); (API-ES NEG): 584 ($\text{M}^+ - 1$)

Análisis elemental: $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{N}_7\text{Cl}$ (586,08 g/mol)

Calculado: C (63,52); H (5,50); N (16,72)

Encontrado: C (63,74); H (5,52); N (16,85)

5. Conclusiones.

CONCLUSIONES

1. Se ha llevado a cabo el estudio de capacidad antioxidante de una serie de ácidos fenolcarboxílicos comerciales y se han seleccionado los cuatro de mayor capacidad **10c**, **10e**, **10g** y **10h**.
 2. Se han estudiado distintos grupos protectores para los fragmentos antioxidantes seleccionados y para el resto tetrazólico de losartán, encontrando los grupos bencilo y tritilo como los más adecuados, respectivamente.
 3. Con los fragmentos antioxidantes seleccionados se ha llevado a cabo la síntesis de híbridos de losartán a través de un grupo éster, obteniéndose, además de los compuestos esperados, otros resultantes de la reducción del átomo de cloro unido al imidazol.
 4. Se ha estudiado la actividad *in vitro* de los ésteres híbridos de losartán sintetizados, los cuales mantienen su potencial vasodilatador con respecto a **1** con un aumento significativo de la capacidad antioxidante, en especial en **11e**, que es del orden de 40 veces mayor. Para el fragmento antioxidante de mayor capacidad, se ha llevado a cabo la experimentación *in vivo* del correspondiente híbrido de losartán **11e** y **27e**, obteniendo una disminución de la presión sistólica en ambos casos, normalizándola en mayor medida que losartán, además, **11e** disminuye en gran medida el Colágeno I, indicador del estado hipertenso y fibrótico.
 5. Para el fragmento antioxidante de mayor capacidad se ha llevado a cabo la síntesis de nuevos híbridos de losartán variando el grupo funcional. Así, se han sintetizado el correspondiente éster inverso, amida, amida inversa, amina y oxima de losartán.
 6. Se ha estudiado la actividad *in vitro* de los nuevos híbridos de losartán, sintetizados por variación del grupo funcional de unión, obteniendo una alta capacidad antioxidante en **67e**, **68e** y **11e**, manteniendo la medida de la contracción celular en todos los casos en valores similares a losartán.
-

6. Summary.

SYNTHESIS AND ACTIVITY OF LOSARTAN-ANTIOXIDANT HYBRIDS

Cardiovascular diseases are now the leading cause of death in developed countries. Current knowledge suggest that both angiotensin II (Ang II) and oxygen-derived free radicals play a key role in the development of tissue damage of cardiovascular disease, are the final common route of a series of processes such as hypertension, diabetes, dyslipidaemias or smoking, and are characterized by the appearance of lesions in important organs such as the central nervous system, heart or kidney. The anatomic substrate of these diseases is characterized by the appearance of various degrees of disruption of the arterial wall, diminishing of vascular section, and tissue ischemia, with the subsequent damage to the various parenchyma.¹

The mechanisms responsible for these disorders are very complex, but both Ang II and oxygen-derived free radicals seem to play a central role in the genesis of vascular damage. This has been demonstrated repeatedly *in vitro* studies and experimental models of cardiovascular disease.² Specifically, losartan (Figure 1),³ first orally active of Ang II receptor antagonist to be synthesized, has demonstrated its ability to protect tissue in hypertensive patients.⁴ Moreover, there is evidence that antioxidants may be beneficial in these patients.⁵

¹Kaplan N.M. "Clinical hypertension", 8th ed. chp. 4, pp 144-154. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. USA, 2002.

²Berry C., Brosnan M. J., Fenell J., Hamilton C. A., Dominiczak A. F. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2001**,10, 247;. Luft F.C. *Hypertension* **2001**, 37, 594.

³Carini, D. J.; Duncia, J. V.; Aldrich, P. E.; Chiu, A. T.; Johnson, A. L.; Pierce, M. E.; Price, W. A.; Santella III, J. B.; Wells, G. J.; Wexler, R. R.; Wong, P. C.; Yoo, S.E.; Timmermans, P. B. M.W. M. *J. Med Chem.* **1991**, 34, 2525; Carini, D. J.; Duncia, J. J.Wang, P. C. B. **1988**, US 5138069, CA:1338238; Campbell, Jr., G. C.; Dwivedi, A. M.; Levorse, D. A.; McCauley, J. A.; Raghavan, K. S. **1995**, US 5608075, CA:2179067

⁴Dahlof B., Devereux R., de Faire U., Fyhrquist F., Hedner T., Ibsen H., Julius S., Kjeldsen S., Kristianson K., Lederballe-Pedersen O., Lindholm L.H., Nieminen M.S., Omvik P., Oparil S., Wedel H. *Am J Hypertens.* **1997**, 10, 705.

⁵Beswick R. A., Zhang H., Marable D., Catravas J. D., Hill W. D., Webb R. C. *Hypertension* **2001**, 37, 781.

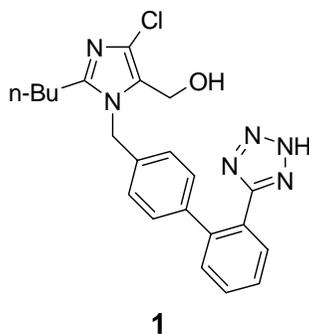
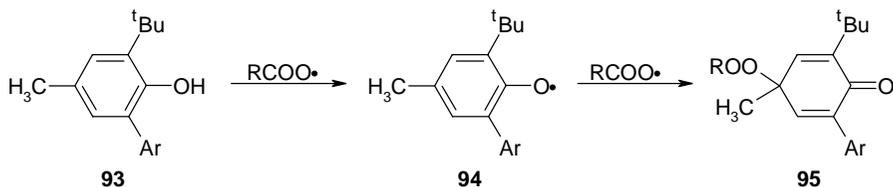


Figure 1. Losartan first receptor antagonist Ang II.

Ang II AT₁ receptor antagonists are a group of drugs that bind with higher affinity to these receptors than the Ang II, and reverse, at least partially, the actions that this hormone performs, such as the increasing of blood pressure through vasoconstriction. On the other hand, *tert*-butylphenols are able to neutralize free radicals by formation of a quinone, thus avoiding or lowering cell degeneration (Scheme 1).⁶



Scheme 1. *tert*-Butylphenols as antioxidants.

Recently, hybrid antihypertensive drugs have been developed. These hybrids maintain antihypertensive activity and add another activity to the therapeutic potential of the drug to improve his profile or decreasing their adverse effects in the treatment of cardiovascular diseases. Thus, compounds having calcium antagonist activity (antihypertensives) and antioxidant activity (protective against oxidative stress) have been developed, which has been also claimed as cytoprotective agents.⁷ More recently, a new class of hybrids, called NO-sartans, has been described which combine losartan (AT₁ antagonist) with a slow NO donor (vasorelaxing).⁸

⁶ Amorati, R.; Lucarini, M.; Mugnaini, V.; Pedulli, G.F. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5198-5204.

⁷ Hellberg, M. R.; Barnes, G.; Collier, R. J.; *US Patent* n° 5.424.321, **1995**.

⁸ Breschi, Maria, C.; Calderone, V.; Digiaco, M.; Martelli, A.; Martinotti, E.; Minutolo, F.; Rapposelli, S.; Balsano, A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5597-5600.

In this Doctoral Thesis the synthesis of losartan hybrids with antioxidant phenolic fragments has been conducted with the aim of finding antihypertensive drugs capable of simultaneously blocking Ang II and oxygen-derived free radicals, whose beneficial effects in hypertensive patients would be superior to those exercised by drugs that only block one of these two systems (Figure 2).⁹

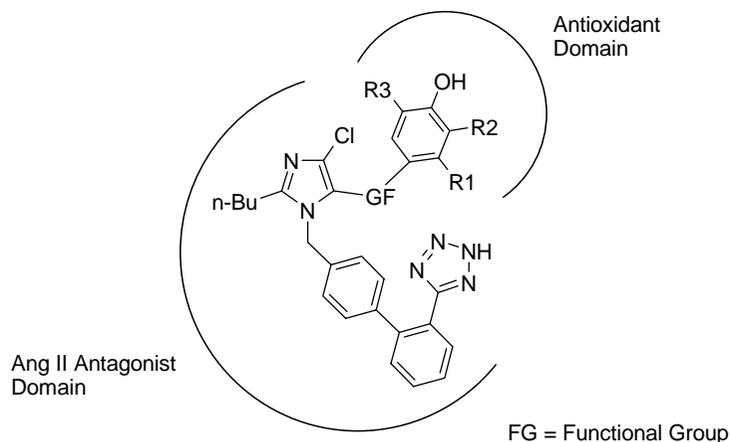
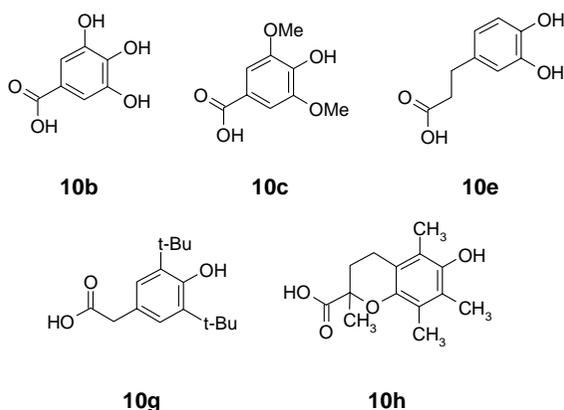


Figure 2. Losartan hybrids with antioxidant phenolic fragments.

The antioxidant capacity of a number of commercially available phenols, previously used in calcium antagonist hybrids, has been studied.¹⁰ Phenols with higher antioxidant capacity were selected for the preparation of losartan hybrids (Figure 3).

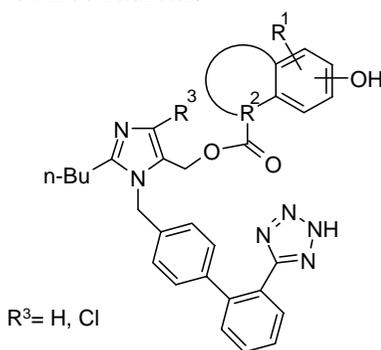


⁹ Sowers J. R. *New Eng. J. Med.* **2002**, 346, 1999-2001.

¹⁰ Hellberg, M. R.; Barnes, G.; Collier, R. J.; *PTC Patent*, WO95/15958, **1995**.

Figure 3. Phenols with higher antioxidant capacity.

A series of losartan-antioxidant ester hybrids has been synthesized through Mitsunobu's reaction (Figure 4). Inhibition of contraction and Ang II displacement *in vitro* assays were conducted, finding that all of them were as active as losartan. Moreover, they proved to be up to 8 times more powerful than losartan regarding to its antioxidant capacity. For hybrids with higher antioxidant activity, **11e** and **27e**, *in vivo* experiments on hypertensive rats were carried out, noting a decrease in systolic blood pressure in both cases, and normalizing it in greater extent than losartan. It was noted that **11e** significantly reduces Collagen I, an indicator of hypertensive and fibrotic status. Moreover, both **11e** and **27e** reduce nitrotyrosine, an indicator of the presence of free radicals.



96

Figure 4. Losartan-antioxidant ester hybrids.

For phenol **10e** with higher antioxidant capacity new losartan hybrids were prepared by modifying the functional group. Thus, esters, amides, amine and oxime ether were synthesized (Figure 5).

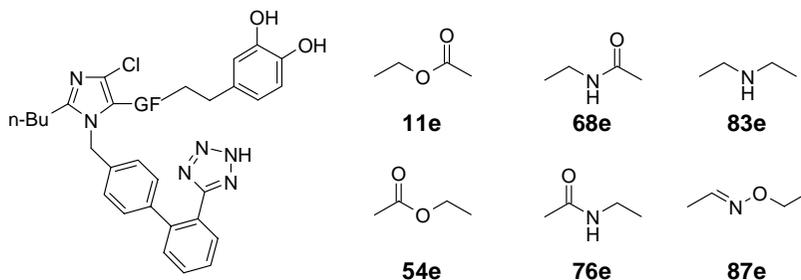


Figure 5. Losartan-antioxidant hybrids prepared.

During the synthesis of reverse ester hybrid **54e** was isolated isomer **67e** as a by-product (Figure 6).

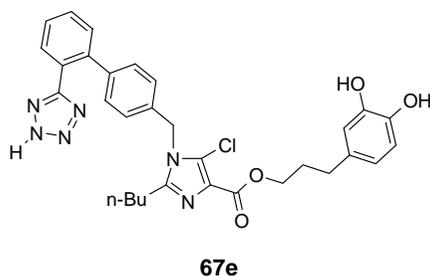


Figure 6. Reverse ester hybrid isomer.

Inhibition of contraction *in vitro* assays and antioxidant capacity tests were performed for the synthesized hybrids (Figures 5 and 6), resulting all of them as active as losartan. On the other hand, ester **11e** showed the higher antioxidant capacity. Amide **68e** and reverse ester **67e** showed also significant antioxidant capacities.