

Investigación

Evaluación de la susceptibilidad a la oxidación microsomal de una serie de análogos de nifedipina

Alejandra De la Cerda,¹ Pedro A. Lehmann,¹ Cleve Villanueva,² Gabriel Marcelin,² Victor Pérez-Alvarez¹ y Zurisaddai Hernández-Gallegos^{1,*}

¹ Departamento de Farmacología y Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, AP 14-740, México 07000, D.F. Tel. (5) 747-7000 ext. 5426, Fax (5) 747-7095, E-mail: zhernand@mail.cinvestav.mx

² Laboratorio de Farmacología, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Cerrada de Palomas s/n, Col. Lomas Altas, México 11620, D.F.

Recibido el 10 de octubre del 2000; aceptado el 25 de octubre del 2000

Resumen. En el presente trabajo se reporta la síntesis y la velocidad de oxidación microsomal de la nifedipina y 27 de sus análogos. Se observó una importante influencia del efecto electrónico de los sustituyentes en el anillo aromático sobre la velocidad de oxidación. De las 1,4-dihidropiridinas estudiadas, el análogo 2,3-difluorofenil sustituido fue el que presentó la menor velocidad de oxidación microsomal.

Palabras clave: nifedipina, derivados, síntesis, oxidación microsomal.

Abstract. The synthesis and microsomal oxidation rate of nifedipine and 27 analogues are reported. It was found an important influence of the electronic effect of aromatic substituents on the oxidation rate. Of the 1,4-dihydropyridines studied, the 2,3-difluorophenyl analogue was the least susceptible to oxidation.

Keywords: nifedipine, derivatives, synthesis, microsomal oxidation.

Introducción

La nifedipina y otras 1,4-dihidropiridinas (DHPs) son fármacos utilizados frecuentemente en el tratamiento de la hipertensión, la angina de pecho y otros desórdenes cardiovasculares. Estos compuestos pertenecen al grupo de agentes farmacológicos conocidos como bloqueadores de la entrada de calcio (BECs; también llamados antagonistas de calcio). El mecanismo de acción de los BECs fue descrito por Fleckenstein en 1963 [1], quien determinó que estos compuestos ejercen su acción a través de suprimir la entrada de calcio a la célula. Estudios posteriores reafirmaron esta propuesta y precisaron que los BECs actuaban directamente sobre los canales de calcio operados por voltaje; en el caso particular de las DHPs, éstas actúan preferentemente sobre canales de calcio operados por voltaje de tipo L.

Las DHPs son bien absorbidas del tracto gastrointestinal pero están sujetas a un importante metabolismo de primer paso [2, 3]. Por ello, en general presentan baja biodisponibilidad y un efecto relativamente breve [4]. El metabolismo de las DHPs es realizado principalmente en el hígado por el sistema enzimático del citocromo P450 (isoformas UT-A y PCN-E en rata, y IIIA4 en humano) [5, 6]. La deshidrogenación del sis-

tema DHP (oxidación a piridina) es el primer y más importante paso en el metabolismo de las DHPs y conduce a la inactivación de estos compuestos como BECs [7]. Por ello, el encontrar DHPs con menor susceptibilidad a la oxidación es una alternativa en la búsqueda de DHPs con una mejor biodisponibilidad.

Varios estudios de relación estructura-actividad han mostrado que la sustitución en el anillo aromático de la molécula de DHP influye de manera importante en la velocidad de oxidación microsomal de estos compuestos [6, 8]. En un trabajo anterior [9], encontramos que las sustituciones 3,5-difluoro y 3-bromo-4-fluoro en el anillo aromático protegían a las DHPs de la oxidación (ésto en comparación de la sustitución 3-nitro), lográndose DHPs con prolongada actividad antihipertensiva. El presente trabajo es una continuación en la búsqueda de otros sustituyentes que pudieran disminuir la velocidad de oxidación microsomal de las DHPs.

Resultados y discusión

Síntesis de compuestos. Las DHPs (**1a-28a**) y sus correspondientes piridinas (**1b-28b**) fueron preparadas por procedimien-

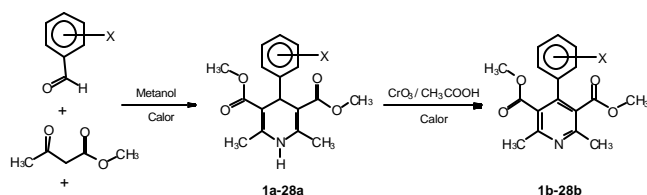


Fig. 1. Síntesis de 1,4-dihidropiridinas (**1a-28a**) y piridinas (**1b-28b**).

tos descritos en la literatura [10, 11] y que son mostrados en la Fig. 1. En la Tabla 1 se reportan la estructura y las propiedades físicas de los compuestos sintetizados. Sólo 3 de las DHPs (**22a**, **26a** y **28a**) y 20 de las piridinas (**2b-5b**, **7b-9b**, **13b**, **15b-22b**, **24b-26b** y **28b**) son nuevos (no reportados en la literatura). Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H), así como el análisis elemental (C, H, N y halógenos), confirmaron la estructura propuesta para los

compuestos nuevos sintetizados. En el caso de los compuestos conocidos, los puntos de fusión determinados fueron acordes a los reportados para cada compuesto.

Susceptibilidad de las DHPs a la oxidación. En este estudio sólo se trabajó con DHPs no quirales, ya que es bien sabido que pueden existir diferencias en la biotransformación de enantiómeros [12, 13]. Todas las DHPs estudiadas son análogos de nifedipina (**10a**), con diferentes sustituyentes en el anillo aromático.

Los resultados obtenidos en la determinación de la velocidad de oxidación microsomal, expresados como velocidad máxima aparente (V_{max}), son presentados en la Tabla 2. El análisis de los valores de V_{max} muestra algunos patrones en las diversas subseries de DHPs monosustituídas. Por ejemplo, en la comparación de los valores de V_{max} de las DHPs con sustituyente fluoro en posición *para*, *meta* u *ortho* (**12a**, **17a** y **18a**, respectivamente), puede verse un incremento en la velocidad de oxidación conforme el sustituyente se aleja del carbono aromático

Tabla 1. Estructura y propiedades físicas de las DHPs y piridinas sintetizadas.

DHP	X*	Pf (°C)		Rend. (%)	Piridina	Pf (°C)		Rend. (%)
		Obs.	Rep.**			Obs.	Rep.***	
1a	H	196-198	198-199	17	1b	130-131	135-136	65
2a	4-OH	221-223	224-226	20	2b	177-179		31
3a	3-Br	196-198	196-198	33	3b	99-101		86
4a	2-Cl	193	192-193	35	4b	64-66		35
5a	3-OCH ₃	173-175	175-176	25	5b	70-72		85
6a	3-Cl	194	190-193	52	6b	110-112	114-115	91
7a	2-OCH ₃	199-200	198-200	51	7b	81-82		86
8a	2-CH ₃	182-184	181-183	40	8b	64-65		83
9a	3-OH	228-230	227-229	65	9b	188-190		95
10a	2-NO ₂	171	169-170	41	10b	103	106	23
11a	3-NO ₂	207-209	210-211	64	11b	122-124	****	50
12a	4-F	169	171	74	12b	119-121	****	96
13a	2,4-(NO ₂) ₂	207-209	****	36	13b	144-145		89
14a	2-F,6-Cl	188	186-187	27	14b	98-100	98-99	93
15a	3,5-F ₂	184-186	185-187	22	15b	131-132		82
16a	3-Br,4-F	167-168	165-167	60	16b	102-104		85
17a	3-F	196-198	194	73	17b	109-110		77
18a	2-F	208-209	207-208	55	18b	93-95		85
19a	2-Br	166-168	163-165	22	19b	82-83		77
20a	3-CH ₃	192-193	190-191	58	20b	92-93		91
21a	2,6-F ₂	199-201	198-202	59	21b	98-99		93
22a	2,3-F ₂	225-227	25		22b	76		67
23a	2,3,5,6-F ₄	183-186	184-185	45	23b	88	87-88	80
24a	2,3-Cl ₂	187-189	185-187	56	24b	105-107		79
25a	2,5-(OCH ₃) ₂	166-168	164	34	25b	96-98		69
26a	4-CH(CH ₃) ₂	172-174		70	26b	67-69		68
27a	4-NO ₂	198-200	198-199	51	27b	150-152		92
28a	4-OC ₂ H ₅	158-160		80	28b	92-94		93

*Sustituyente en el anillo aromático, Fig. 1.

Pf de las DHPs **1a-9a, **11a-12a**, **14a-21a**, **23a-25a** y **27a** son reportados en [15]; pf de la DHP **10a** es reportado en [21].

***Pf de las piridinas **1b**, **6b**, **14b** y **23b** son reportados [6]; pf de la piridina **10b** es reportado en [21].

****Compuestos publicados pero cuyos pf no fueron reportados.

unido al anillo 1,4-dihidropiridina. Lo mismo puede observarse para las DHPs con sustituyente cloro o bromo (**4a** vs. **6a**, y **19a** vs. **3a**). Un comportamiento inverso es presentado por las DHPs con sustituyente metilo (**8a** vs. **20a**) que, a diferencia de los halógenos, es electrodonador. Esto sugiere que para reducir la oxidación de las DHPs es mejor que éstas presenten un sustituyente electroattractor en posición *ortho*. Lo anterior está de acuerdo con el mecanismo de oxidación de DHPs que propone la formación de un radical catiónico como paso inicial (y limitante) de la reacción [5, 14, 15], ya que la presencia de un átomo (o grupo) electroattractor en una posición cercana al sitio donde se lleva a cabo la oxidación (anillo 1,4-dihidropiridina) desestabilizará la formación del radical catiónico y con ello teóricamente se reducirá la velocidad de oxidación.

Un patrón diferente al presentado por las DHPs con sustituyentes halógenos (o grupo metilo) es el presentado por aquellas DHPs con un grupo nitro en el anillo aromático (**10a**, **11a** y **27a**), en donde la secuencia de V_{\max} es *meta* > *para* > *ortho*. En este caso, es conocido que el grupo nitro, al igual que los halógenos, es electroattractor por su efecto inductivo pero, en adición a este, también presenta un importante efecto de resonancia en el mismo sentido. Una medida del efecto electrónico total (inductivo y de resonancia) de un sustituyente es la constante de Hammett (σ) [16], que en el caso del grupo nitro indica que el efecto electroattractor de este sustituyente es más fuerte cuando esta en posición *para* que en posición *meta* (σ de 0.78 vs. 0.71, respectivamente; no hay valores reportados para sustituyentes en posición *ortho*). Una consideración similar es aplicable a las DHPs sustituidas con un grupo hidroxilo (**2a** y **9a**), en las que la sustitución *para* resultó en una mayor susceptibilidad a oxidación microsomal que la sustitución *meta*, y en donde los valores aplicables de σ son -0.37 y 0.12, respectivamente. De esta manera, el comportamiento de las DHPs con grupo nitro o grupo hidroxilo está acorde con lo expuesto anteriormente para las DHPs mono-halogenadas, ya que a un efecto electroattractor mayor corresponde una menor velocidad de oxidación.

Los resultados obtenidos muestran una importante participación del efecto electrónico de los sustituyentes en el anillo aromático sobre la susceptibilidad de las DHPs a la oxidación. Sin embargo, no podemos descartar la posible participación de los efectos hidrofóbicos y/o estéricos de los sustituyentes en la oxidación, aunque no fue posible observar una clara relación de V_{\max} con estos efectos.

En un trabajo publicado por Bäärnhielm y Westerlund [8], los autores hacen notar que dentro de la serie de DHPs que ellos estudiaron, aquellas que presentaban baja velocidad de oxidación microsomal también presentaban bajo o nulo efecto antihipertensivo. Esto pone de manifiesto la importancia de identificar sustituyentes que retarden la oxidación de las DHPs, pero que a la vez sigan teniendo una influencia positiva sobre la actividad biológica de las DHPs. Con el propósito de conocer cuales de los sustituyentes en el presente trabajo cumplieran con estos requisitos, se procedió a analizar teóricamente su potencial influencia sobre la actividad antagonista de las DHPs. Esto fue hecho con base en el trabajo publicado

Tabla 2. Velocidad de oxidación microsomal (V_{\max}) de las DHPs.

Comp.	V_{\max}^*	Comp.	V_{\max}^*	Comp.	V_{\max}^*
1a	2.08 ± 0.27	11a	1.80 ± 0.17	21a	0.22 ± 0.03
2a	1.46 ± 0.23	12a	2.70 ± 0.30	22a	0.04 ± 0.006
3a	1.40 ± 0.22	13a	2.14 ± 0.15	23a	0.85 ± 0.09
4a	1.19 ± 0.14	14a	1.49 ± 0.19	24a	1.20 ± 0.14
5a	0.20 ± 0.03	15a	1.61 ± 0.26	25a	0.46 ± 0.06
6a	1.38 ± 0.21	16a	1.90 ± 0.24	26a	5.62 ± 0.82
7a	3.2 ± 0.37	17a	2.09 ± 0.22	27a	1.67 ± 0.12
8a	0.98 ± 0.05	18a	0.38 ± 0.07	28a	2.77 ± 0.40
9a	0.10 ± 0.02	19a	0.97 ± 0.12		
10a	0.93 ± 0.11	20a	0.28 ± 0.04		

*Velocidad máxima aparente expresada en nanomolas de piridina formada por mg de proteína y por min. Cada valor representa la media \pm desviación estándar de 6 experimentos.

por Coburn y colaboradores [17], quienes estudiaron la influencia de los sustituyentes aromáticos sobre la actividad antagonista de calcio de una gran serie de análogos de nifedipina. De acuerdo a este trabajo, se esperaba que al menos tres de los sustituyentes estudiados que inducen baja oxidación (aquellos en **21a**, **22a** y **23a**) lograrán DHPs con buena biodisponibilidad y significativa actividad como BECs.

Parte experimental

Materiales

Todos los reactivos y solventes utilizados en el presente trabajo fueron obtenidos de la compañía Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato MEL-TEMP y son no corregidos. Los espectros de RMN ^1H fueron obtenidos en un espectrómetro Varian EM360A a 60 MHz, empleando cloroformo deuterado o acetona deuterada como disolvente y tetrametilsilano como referencia interna. El análisis elemental de los compuestos nuevos fueron realizados por la compañía Galbraith Laboratories (Knoxville, TN, USA). Todos los compuestos fueron caracterizados por su espectro de RMN ^1H y su punto de fusión (en el caso de encontrarse reportado), para confirmar la identidad de las estructuras propuestas.

Procedimiento general para la preparación de las DHPs (reacción de Hantzsch)

Una solución de acetoacetato de metilo (1.5 g, 13 mmol), hidróxido de amonio (0.5 ml de una solución acuosa al 40%; equivalentes a 0.11 g, 6.5 mmol de amoniaco) y el correspondiente benzaldehído sustituido (6.5 mmol) en metanol (5 ml) fue sometida a reflujo con agitación magnética por un lapso de 8 a 12 horas. El producto obtenido fue filtrado y recristalizado en metanol.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxicarbonil-4-(2,3-difluorofenil)-1,4-dihidropiridina (22a). Sólido cristalino: pf 225-227 °C; RMN ^1H (acetona- d_6 , 60 MHz) δ 2.4 (6H, s, 2 CH_3), 3.6 (6H, s, 2

OCH₃), 5.3 (1H, s, H-4), 6.8-7.4 (3H, m, 3 hidrógenos aromáticos), 8.1 (1H, s, NH). *Anal.* C 60.1, H 5.2, N 4.0, F 11.1, calcd para C₁₇H₁₇NO₄F₂, C 60.5, H 5.1%, N 4.2, F 11.3.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(4-isopropilfenil)-1,4-dihidropiridina (26a). Sólido cristalino: pf 172-174 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 1.3 (6H, d, CH(CH₃)₂), 2.5 (6H, s, 2 CH₃), 2.4-3.1 (1H, m, CH(CH₃)₂), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 5.1 (1H, s, H-4), 6.1 (1H, s, NH), 7.3 (4H, d, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 70.5, H 7.4, N 4.1, calcd para C₂₀H₂₅NO₄, C 70.0, H 7.3, N 4.1.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(4-etoxifenil)-1,4-dihidropiridina (28a). Sólido cristalino: pf 158-160 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 1.4 (3H, t, OCH₂CH₃), 2.4 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 4.0 (2H, q, OCH₂CH₃), 5.0 (1H, s, H-4), 5.7 (1H, s, NH), 7.1 (4H, dd, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 66.0, H 6.8, N 4.1, calcd para C₁₉H₂₃NO₅, C 66.1, H 6.7, N 4.1.

Procedimiento general para la preparación de las piridinas

A una solución caliente de la DHP (5 mmol) en ácido acético se le adicionó trióxido de cromo (0.76 g, 5 mmol) en pequeñas porciones. Esta solución fue mantenida a reflujo y con agitación magnética por 30 min para posteriormente ser vertida sobre una solución acuosa fría de hidróxido de amonio (pH 10). La solución resultante fue extraída con cloruro de metileno para posteriormente separar la fase orgánica, misma que fue concentrada. El producto resultante (piridina) fue precipitado de la fase orgánica por adición de agua. El precipitado fue filtrado y recristalizado en etanol.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(4-hidroxifenil)-piridina (2b). Sólido cristalino: pf 177-179 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 6.7-7.4 (5H, m, 4 hidrógenos aromáticos + OH). *Anal.* C 64.5, H 5.5, N 4.1, calcd para C₁₇H₁₇NO₅, C 64.8, H 5.4, N 4.4.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(3-bromofenil)-piridina (3b). Sólido cristalino: pf 99-101 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.7 (6H, s, 2 CH₃), 3.7 (6H, s, 2 OCH₃), 7.2-7.8 (4H, m, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 53.6, H 4.2, N 3.3, Br 21.2, calcd para C₁₇H₁₆NO₄Br, C 53.9, H 4.3, N 3.7, Br 21.1.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(2-clorofenil)-piridina (4b). Sólido cristalino: pf 64-66 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.7 (6H, s, 2 CH₃), 3.5 (6H, s, 2 OCH₃), 7.1-7.7 (4H, m, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 61.5, H 5.2, N 4.1, Cl 10.2, calcd para C₁₇H₁₆NO₄Cl, C 61.2, H 4.8, N 4.2, Cl 10.6.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(3-metoxifenil)-piridina (5b). Sólido cristalino: pf 70-72 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 3.8 (3H, s, OCH₃), 6.7-7.5 (4H, m, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 66.0, H 6.0, N 4.2, calcd para C₁₈H₁₉NO₅, C 65.6, H 5.8, N 4.3.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(2-metoxifenil)-piridina (7b). Sólido cristalino: pf 81-82 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 3.8 (3H, s, OCH₃), 6.9-7.4 (4H, m, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 65.2, H 5.8, N 4.2, calcd para C₁₈H₁₉NO₅, C 65.6, H 5.8, N 4.3.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(2-metilfenil)-piridina (8b). Sólido cristalino: pf 64-65 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.1 (3H, s, CH₃), 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 3.5 (6H, s, 2 OCH₃), 7.1-7.3 (4H, m, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 68.8, H 6.1, N 4.4, calcd para C₁₈H₁₉NO₄, C 69.0, H 6.1, N 4.5.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(3-hidroxifenil)-piridina (9b). Sólido cristalino: pf 188-190 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 6.8-7.4 (5H, m, 4 hidrógenos aromáticos + OH). *Anal.* C 64.3, H 5.5, N 4.3, calcd para C₁₇H₁₇NO₅, C 64.8, H 5.4, N 4.4.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(2,4-dinitrofenil)-piridina (13b). Sólido cristalino: pf 122-124 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.7 (6H, s, 2 CH₃), 3.7 (6H, s, 2 OCH₃), 7.4-9.2 (3H, m, 3 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 52.4, H 3.9, N 10.8, calcd para C₁₇H₁₇N₃O₈, C 52.5, H 3.9, N 10.7.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(3,5-difluorofenil)-piridina (15b). Sólido cristalino: pf 131-132 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.7 (6H, s, 2 CH₃), 3.7 (6H, s, 2 OCH₃), 6.7-7.1 (3H, m, 3 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 61.0, H 4.5, N 4.1, F 11.1, calcd para C₁₇H₁₅NO₄F₂, C 60.9%, H 4.5, N 4.2, F 11.3.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(3-bromo-4-fluorofenil)-piridina (16b). Sólido cristalino: pf 102-104 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.7 (6H, s, 2 CH₃), 3.7 (6H, s, 2 OCH₃), 7.2-7.7 (3H, m, 3 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 51.6, H 4.0, N 3.7, Br 19.9, F 5.1, calcd para C₁₇H₁₅NO₄BrF, C 51.5, H 3.8, N 3.5, Br 20.2, F 4.8.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(3-fluorofenil)-piridina (17b). Sólido cristalino: pf 109-110 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 6.8-7.4 (4H, m, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 64.2, H 5.2, N 4.3, F 6.0, calcd para C₁₇H₁₆NO₄F, C 64.3, H 5.1, N 4.4, F 6.0.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(2-fluorofenil)-piridina (18b). Sólido cristalino: pf 93-95 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 6.9-7.6 (4H, m, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 64.5, H 5.2, N 4.3, F 5.8, calcd para C₁₇H₁₆NO₄F, C 64.3, H 5.1, N 4.4, F 6.0.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxycarbonil-4-(2-bromofenil)-piridina (19b). Sólido cristalino: pf 82-83 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.7 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 7.1-7.8 (4H, m, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 54.1, H 4.4, N 3.7, Br 20.8, calcd para C₁₇H₁₆NO₄Br, C 53.9, H 4.3, N 3.7, Br 21.1.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxicarbonil-4-(3-metilfenil)-piridina (20b). Sólido cristalino: pf 92-93 °C; RMN ¹H (acetona-d₆, 60 MHz) δ 2.3 (3H, s, CH₃), 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 6.8-7.4 (4H, m, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 69.0, H 6.2, N 4.4, calcd para C₁₈H₁₉NO₄, C 69.0, H 6.1, N 4.5.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxicarbonil-4-(2,6-difluorofenil)-piridina (21b). Sólido cristalino: pf 98-99 °C; RMN ¹H (acetona-d₆, 60 MHz) δ 2.7 (6H, s, 2 CH₃), 3.7 (6H, s, 2 OCH₃), 6.9-7.9 (3H, m, 3 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 60.5, H 4.5, N 4.0, F 11.1, calcd para C₁₇H₁₅NO₄F₂, C 60.9, H 4.5, N 4.2, F 11.3.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxicarbonil-4-(2,3-difluorofenil)-piridina (22b). Sólido cristalino: pf 76 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.7 (6H, s, 2 CH₃), 3.7 (6H, s, 2 OCH₃), 6.7-7.1 (3H, m, 3 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 60.5, H 4.4, N 4.0, F 11.0, calcd para C₁₇H₁₅NO₄F₂, C 60.9, H 4.5, N 4.2, F 11.3.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxicarbonil-4-(2,3-diclorofenil)-piridina (24b). Sólido cristalino: pf 105-107 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 7.1-7.7 (3H, m, 3 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 55.1, H 4.3, N 3.7, Cl 18.7, calcd para C₁₇H₁₅NO₄Cl₂, C 55.5, H 4.1, N 3.8, Cl 19.3.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxicarbonil-4-(2,5-dimetoxifenil)-piridina (25b). Sólido cristalino: pf 96-98 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 3.7 (3H, s, OCH₃), 3.8 (3H, s, OCH₃), 6.6-6.9 (3H, m, 3 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 63.4, H 5.7, N 3.7, calcd para C₁₉H₂₁NO₆, C 63.5, H 5.9, N 3.9.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxicarbonil-4-(4-isopropilfenil)-piridina (26b). Sólido cristalino: pf 67-69 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 1.3 (6H, d, CH(CH₃)₂), 2.6 (6H, s, 2 CH₃), 2.4-3.1 (1H, m, CH(CH₃)₂), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 7.2 (4H, s, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 70.2, H 6.9, N 4.0, calcd para C₂₀H₂₃NO₄, C 70.4, H 6.8, N 4.1.

2,6-Dimetil-3,5-dimetoxicarbonil-4-(4-etoxifenil)-piridina (28b). Sólido cristalino: pf 92-94 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ 1.4 (3H, t, OCH₂CH₃), 2.4 (6H, s, 2 CH₃), 3.6 (6H, s, 2 OCH₃), 4.0 (2H, q, OCH₂CH₃), 7.7 (4H, dd, 4 hidrógenos aromáticos). *Anal.* C 66.6, H 6.2, N 3.6, calcd para C₁₉H₂₁NO₅, C 66.5, H 6.2, N 4.1.

Oxidación enzimática de DHPs

La oxidación microsomal de las DHPs fue medida siguiendo el procedimiento descrito por Niwa y colaboradores [3]. Para esto fueron usados microsomas hepáticos de ratas Wistar macho obtenidos por el método de Kamath y colaboradores [18]. Los microsomas (contenidos en 0.150-0.175 mg de proteína) fueron puestos en tubos que contenían solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.85) y un sistema generador de NADPH (NADP⁺ 0.5 mM, glucosa-6-fosfato 10 mM, glu-

cosa-6-fosfato deshidrogenasa 0.33 UI/ml, concentraciones finales). Los tubos fueron equilibrados a 37 °C por 3 min y la reacción fue iniciada por la adición de la DHP (5, 10, 20, 35 y 55 μM, concentraciones finales). La reacción fue continuada durante 1 a 10 min a 37 °C y entonces fue detenida por la adición de 1 ml de cloruro de metileno.

Métodos analíticos

Nitrendipina (110 nM, concentración final; estándar interno) y 100 μl de buffer de carbonatos (1M, pH 10.5, conteniendo 2M de NaCl) se adicionaron a los tubos de reacción. El contenido de cada vial fue mezclado (usando un vortex) y las dos fases fueron separadas por centrifugación (3000 × g por 5 min). La fase orgánica fue transferida a otro tubo y el contenido del tubo de reacción fue extraído una vez mas con cloruro de metileno (1 ml). Las fases orgánicas fueron combinadas y evaporadas a sequedad con corriente de nitrógeno. El residuo fue disuelto en 50 μl de metanol y alícuotas de 20 μl fueron tomadas para la cuantificación por HPLC de la piridina formada. Las corridas cromatográficas fueron realizada en un cromatógrafo Beckman System Gold, acoplado a una columna Hypersil (ODS C18, 3 μm, 0.46 × 10 cm) y un detector de arreglo de diodos (Beckman, module 168). La fase móvil utilizada fue metanol/agua 64:36 (v/v) con una velocidad de flujo de 1.1 ml/min para las DHPs **2a**, **3a**, **10a**, **12a**, **15a-17a**, **27a** y **28a**, y de 1.3 ml/min para el resto de DHPs. La detección fue hecha a 254 nm. La relación de altura de picos (piridina/estándar interno) fue interpolada en una curva de calibración, previamente obtenida con las piridinas sintetizadas, para calcular la cantidad de piridina formada. La velocidad de oxidación fue corregida por la concentración de proteína, determinada por el método de Lowry [19], y fue expresada como nanomolas de piridina formada por mg de proteína y por minuto. Finalmente, se calculó V_{max} de acuerdo a Hanes [20].

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Carlos M. Cerda del Departamento de Química del Cinvestav-IPN por los espectros de RMN ¹H. Este trabajo fue financiado parcialmente por el CONACyT, donativos 3142P-N y 28082M.

Bibliografía

1. Fleckenstein, A. *Circ. Res.* **1983**, 52 (suplemento I), 3-16.
2. Foster, T. S.; Hamann, S. R.; Richards, V. R.; Bryant, P. J.; Graves, D. A.; McAllister, R. J., Jr. *J. Clin. Pharmacol.* **1983**, 23, 161-170.
3. Niwa, T.; Tokuma, Y.; Noguchi, H. *Xenobiotica* **1988**, 18, 217-224.
4. Regårdh, C. G.; Bäärnhielm, C.; Edgar, B.; Hoffmann, K.-J. *Progr. Drug Metab.* **1990**, 12, 41-86.
5. Augusto, O.; Beilan, H. S.; Ortíz de Montellano, P. R. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 11288-11295.
6. Böcker, R. H.; Guengerich, F. P. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1596-1603.
7. Triggle, D. J. In *Second SCI-RSC Medicinal Chemistry Symposium*; Emmett, J. C., Ed.; The Royal Society of Chemistry: London, 1984; pp. 1-17.
8. Bäärnhielm, C.; Westerlund, C. *Chem.-Biol. Interactions* **1986**, 58, 277-288.
9. Hernández-Gallegos, Z.; Lehmann F., P. A.; Hong, E.; Posadas, F.; Hernández-Gallegos, E. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, 30, 355-364.
10. Loev, B.; Goodman, M. M.; Snader, K. M.; Tedeschi, R.; Macko, E. *J. Med. Chem.* **1974**, 17, 956-965.
11. Meyer, H.; Wehinger, E.; Bossert, F.; Scherling, D. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1983**, 33, 106-112.
12. Eriksson, U. G.; Lundahl, J.; Bäärnhielm, C.; Regårdh, C. G. *Drug Metab. Disp.* **1991**, 19, 889-893.
13. Mast, V.; Fischer, C.; Mikus, G.; Eichelbaum, M. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1992**, 33, 51-59.
14. Bäärnhielm, C.; Hansson, G. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, 35, 1419-1425.
15. Guengerich, F. P.; Macdonald, T. L. *FASEB J.* **1990**, 4, 2453-2459.
16. Van de Waterbeemd, H.; Testa, B. *Adv. Drug Res.* **1987**, 16, 85-225.
17. Coburn, R. A.; Wierzb, M.; Suto, M. J.; Solo, A. J.; Triggle, A. M.; Triggle, D. J. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 2103-2107.
18. Kamath, S. A.; Kummerow, F. A.; Narayan, K. *FEBS Lett.* **1971**, 17, 90-92.
19. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275.
20. Henderson, P. J. In *Enzyme assays: a practical approach*; Eisenthal, R.; Danson, M. J. Ed.; Oxford University Press: Oxford, 1993; pp. 277-316.
21. Ebel, V.S.; Schutz, H.; Hornitschek, A. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1978**, 28, 2188-2193.