

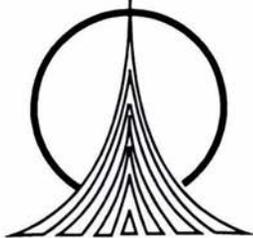


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**SÍNTESIS Y ENSAYOS ANTIRRETROVIRALES  
*IN VITRO* DE INHIBIDORES NO ANÁLOGOS DE  
NUCLEÓSIDOS CON URACILOS MODIFICADOS.**

**T E S I S**  
Q U E P R E S E N T A :  
**IKER SAID ESCALONA TORRES**  
P A R A O B T E N E R E L T Í T U L O D E :  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**



MEXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**A MIS PADRES:**

**YOLANDA Y ENRIQUE**

*Por darme la vida, a mi madre por su apoyo,  
ejemplo, consejos y por ser una gran amiga.*

**A MI ABUELITA:**

**CECILIA**

*Por sus enseñanzas.*

**A MIS HERMANOS:**

**DARINKA Y JESÚS**

*Por su cariño, y unión familiar*

*A MI MADRE:*

*Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecerte una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constante, sólo deseo que entiendas que el logro mío es el logro tuyo, que mi esfuerzo es inspirado en ti, y que mi único ideal eres tú.*

*Con amor, admiración y respeto:*

*Iker Saíd Escalona Torres*

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Bárbara Gordillo por la dirección durante el desarrollo de este trabajo, por su confianza y amistad.
- Al Dr. Adelfo Reyes por su valiosa asesoría durante el desarrollo de este trabajo.
- Al M en C Genaro Vargas por el apoyo en los ensayos antirretrovirales.
- Al QI Víctor González, QFB Magali Salas, Q Marcos Hernández y a la QFB Maribel Vásquez por la obtención de espectros de RMN.
- Al Q Geiser Cuellar y al Q Fred García por la obtención de los espectros de masas.
- A la QFB Ma. Teresa Cortez por la obtención de espectros de RMN, IR, análisis elemental y apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.
- A los miembros del jurado por sus valiosas observaciones y sugerencias.
- A mis compañeros y amigos Fernando Salgado, Ma. de Jesús Chávez, Iván Martínez, Dolores Castillo, Geisha Zacarías, Alejandro Navarro, Angélica López, Irais Huerta, Perla Zarco, Mireya García y Luis Balderas de la FES Zaragoza.
- A los compañeros del grupo de investigación Genaro Vargas, Teresa Cortez y Magali Salas del CINVESTAV por los agradables momentos en el laboratorio.
- A mis amigos de siempre Enrique Guerrero, Leonel González, Gabriel García y Marcos García por hacer todo más divertido y alegre.
- A la familia Ramírez Escalona.

- A Ma. Teresa Cortez por su gran apoyo y amistad incondicional durante el desarrollo de este trabajo.
- A mis profesores de la FES Zaragoza, al M en C Arturo Cano, a la Dra. Isabel Soto, al Dr. Adolfo Reyes, al M en C Ignacio Regla y al QFB Luis Balderas.
- En general, a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a mi formación profesional.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Bárbara Gordillo Román y con la asesoría del Dr. Adelfo Reyes Ramírez de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

---

---

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES TEÓRICOS	3
A. VIH-SIDA	3
1. Definición y estructura viral	3
a. Evolución del VIH	6
2. Ciclo replicativo y reacciones inmunológicas	7
3. Distribución geográfica mundial de la pandemia	10
4. Tratamiento antirretroviral	11
a. Compuestos análogos de nucleósidos	12
b. Compuestos inhibidores no análogos de nucleósidos	13
B. QUÍMICA FARMACÉUTICA	15
1. Conceptos básicos en química farmacéutica	15
2. Búsqueda de nuevos fármacos	16
3. Modificación molecular	17
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
III. OBJETIVOS	21
IV. HIPÓTESIS	22
V. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	23
A. MÉTODO	23
1. Esquemas de síntesis	23
2. Evaluación antiviral	24
B. MATERIAL	24
1. Material	24
2. Equipo	25
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
A. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS	26
1. Síntesis de 3,3-dietoxipropanoato de etilo y 3,3-dibenciloxipropanoato de etilo	26
2. Síntesis de metanoato de etilo y 2-metilbutanoato de etilo	35
3. Síntesis de 5-isopropil-2-tioxouracilo y 5-isopropiluracilo	38
4. Síntesis de 5-yodouracilo	48
5. Síntesis de inhibidores no análogo de nucleósidos	52
a. Serie alifática	56
b. Serie aromática	59

---

---

B. ENSAYOS ANTIRRETROVIRALES <i>IN VITRO</i>	63
VII. CONCLUSIONES	73
VIII. PARTE EXPERIMENTAL	74
A. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS	74
1. Generalidades	74
2. Métodos de síntesis	75
B. PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS ANTIRRETROVIRALES <i>IN VITRO</i>	84
IX. REFERENCIAS	89
APÉNDICE	i

---

---

## INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es la enfermedad que se desarrolla como consecuencia de la infección provocada por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Ciertamente, debido a sus características patológicas, el virus es difícil de combatir, por ello, además de ser terrible desde el punto de vista emocional y socioeconómico, representa un reto para la investigación científica.

El SIDA se caracteriza como una enfermedad sistémica y mortal, por tal motivo se considera como uno de los problemas más serios de salud en el mundo. Debido a lo anterior existe un gran interés por la investigación de fármacos o terapias génicas para combatir esta enfermedad, por lo cual varios grupos de investigación en el mundo se han dado a la tarea de buscar una salida a este problema. Al respecto se han desarrollado una serie de vacunas, de fragmentos de ácidos nucleicos (oligonucleótidos antisentido), de ácidos nucleicos con actividad catalítica (ribozimas) y de una amplia gama de compuestos químicos.

En cuanto a los compuestos químicos existen varias divisiones según el componente viral al cual están dirigidos, existen inhibidores de integrasa, proteasa y de transcriptasa inversa. Los análogos y no análogos de nucleósidos tienen, por ejemplo, un mecanismo de acción diferente frente a estas enzimas. En cuanto a los compuestos denominados inhibidores análogos de nucleósidos se han investigado ampliamente desde que se demostró que el VIH era el agente causal del SIDA; de ellos, el AZT (Zidovudina), aprobado en 1987 por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA: *Food and Drug Administration*), ha tenido gran éxito al inhibir el ciclo replicativo de este virus, desafortunadamente ha resultado ser también muy tóxico. Otros compuestos como el ddC (Zalcitabina, aprobado en 1992), 3TC (Lamivudina, aprobado en 1995), entre otros han sido obtenidos y autorizados por la FDA pero se han encontrado los mismos resultados de toxicidad.

---

---

Los compuestos denominados inhibidores no análogos de nucleósidos han despertado gran interés debido a la alta especificidad contra la enzima transcriptasa inversa (TI) del VIH, debido a esto, ellos presentan una disminución en su toxicidad. La FDA, por ejemplo, autorizó la comercialización de Nevirapina (1996); Delavirdina (1997) y Efavirenz (1998). Otros 6 compuestos no análogos de nucleósidos se encuentran en fase III de investigación clínica en humanos esperando su aprobación por la FDA.

Lo anteriormente señalado muestra la importancia de sintetizar compuestos químicos que pertenezcan a los inhibidores no análogos de nucleósidos, y la evaluación de su actividad antirretroviral que son el propósito del presente trabajo. Para su realización se contó con la infraestructura necesaria en el laboratorio de química orgánica del Departamento de Química en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la dirección de la Dra. Bárbara Gordillo Román y el asesoramiento del Dr. Adelfo Reyes Ramírez de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

---

---

## I. ANTECEDENTES TEÓRICOS

### A. VIH-SIDA

#### 1. Definición y estructura viral.

Los virus son pequeños agentes infecciosos, compuestos esencialmente por un ácido nucleico (ARN o ADN) rodeado por una pequeña cubierta o cápside. La cubierta más el ácido nucleico central se denomina nucleocápside. Algunos virus tienen además una cubierta lipoproteica que puede contener glucoproteínas víricas antigénicas; así como fosfolípidos del huésped, adquiridos cuando la nucleocápside del virus surge de la membrana nuclear o membrana plasmática de la célula huésped. Ciertos virus también contienen enzimas que inician su replicación en la célula huésped; la partícula infecciosa completa se denomina virión. En diferentes tipos de virus el genoma puede ser de doble hélice o de cadena única.<sup>1</sup>

La clasificación de los virus se basa en criterios morfológicos, fisicoquímicos y en sus relaciones genéticas. Los componentes esenciales de los sistemas de clasificación de los virus son: 1) el tipo y la estructura del ácido nucleico viral y la estrategia utilizada para la replicación 2) el tipo de simetría de la cápside viral (helicoidal vs icosaédrica) y 3) la presencia o la ausencia de una cubierta.<sup>2</sup>

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) el cual pertenece al grupo de los retrovirus. Los retrovirus pertenecen a un grupo ampliamente distribuido en vertebrados y tal vez también en invertebrados.<sup>3</sup> Se han encontrado en mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces,<sup>4</sup> y en conjunto forman la familia *Retroviridae*, se les puede definir como todo virus que presenta un genoma diploide de ARN y una enzima con la actividad de polimerasa de ADN dependiente de ARN y cuya duplicación depende de un intermediario de ADN.<sup>3-5</sup>

Las partículas del VIH son esféricas (Figura 1) con tamaño de 90 a 100 nm de diámetro,<sup>6</sup> con una cápside de nucleoproteínas de forma icosaédrica que contiene un complejo ribonucleoproteínico formado por una proteína de la cápside. Ésta presenta una

secuencia característica de cisteínas e histidinas, a lo que se une el ARN genómico del virus.<sup>7,8</sup> A su vez, la cápside se cubre por una envoltura lipídica derivada de la membrana celular, la cual es adquirida cuando el virus abandona la célula infectada; la membrana contiene dos proteínas virales asociadas: una glicoproteína externa (gp120) y una transmembranal (gp41).<sup>6</sup> Por debajo de esta envoltura se encuentra una segunda capa proteica que se forma por la polimerización de monómeros de la proteína viral p17. Dentro de la capa se encuentra la nucleocápside, constituida por la proteína p24 y dos cadenas iguales de ARN viral, con sentido positivo desde 60S hasta 70S, que son el material genético del virus. Éstas semejan un ARNm, pues presentan una cápside en el extremo 5', en tanto que en el 3' tiene una cadena poli(A).<sup>3,9,10</sup> El ARN tiene moléculas asociadas de la enzima Transcriptasa Inversa (TI).

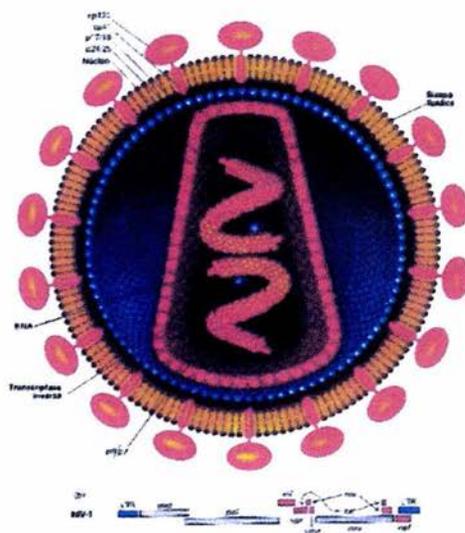


Figura 1. Estructura del VIH

El genoma del VIH presenta una estructura completa formada por tres genes en orden invariable: *gag*, *pol* y *env*.<sup>9,11,12</sup>

El gen *gag* codifica para el conjunto de tres proteínas que forman la cápside, que en orden 5' a 3' son: *a*) la matriz (MA), que es un péptido de 15 a 20 kDa que se forma sobre toda la matriz entre la nucleocápside y la envoltura viral; *b*) la cápside (CA), que es el componente estructural mayor y el antígeno dominante de la cápside viral, y que mide de 24 a 30 kDa; y *c*) la nucleocápside (NC), que es una pequeña proteína básica de 10 a 15 kDa con gran afinidad por los ácidos nucleicos, fuertemente enlazada al ARN del virión e implicada de manera genética en el empaquetamiento del ARN y en la formación del dímero. Por su parte, el gen *pol* codifica para todas las proteínas de la maquinaria catalítica viral, la cual está constituida por una proteasa (PR) que se utiliza en el procesamiento de ciertas poliproteínas virales, la polimerasa de ADN dependiente de ARN llamada transcriptasa inversa (TI); al final del gen *pol* hay una integrasa (IN) o endonucleasa, indispensable para la incorporación del ADN viral en el genoma del huésped.<sup>12</sup> En el gen *env* se codifican las proteínas de la envoltura, que en asociación a componentes de la membrana celular adquiridos por gemación rodean la cápside, y que son necesarios para la infección.<sup>13</sup> El producto de este gen es una poliproteína, que al ser procesada da como resultado dos proteínas. Una de ellas es de la superficie (SU), cuyo tamaño varía de 46 a 120 kDa, es glucosilada por la maquinaria celular e interactúa en la superficie del virión con los receptores del huésped que median la entrada del virus. Esta proteína es el antígeno reconocido por la mayor parte de los anticuerpos, y está unida por enlaces disulfuro a la proteína transmembrana (TM), que es el otro producto del gen *env*. El tamaño de la proteína TM es de 15 a 37 kDa y no siempre es glucosilada; se cree que media la fusión de la membrana viral con la del huésped durante la entrada del virus.<sup>6</sup>

La presencia de estos tres genes en el retrovirus es necesaria para que se lleve a cabo la replicación del genoma.<sup>9</sup> Cuando en un virus falta alguno de estos genes se le conoce como virus defectivo, ya que no puede realizar la replicación de su genoma,<sup>14</sup> pero si en la célula infectada hay otros virus que estén produciendo las proteínas faltantes, éstas actuarán en forma *trans* sobre el genoma del retrovirus defectivo,<sup>15</sup> lo que completa así su replicación. El virus que proporciona los componentes faltantes en otros, recibe el nombre de virus auxiliar.<sup>12-16</sup>

a. Evolución del VIH: La transcriptasa inversa.<sup>17</sup>

Desde el punto de vista evolutivo, una de las propiedades más importantes del virus del SIDA es su alta tasa de variación. Esta característica es muy importante para el desarrollo de la enfermedad, y por lo tanto para el diseño de fármacos encaminados al tratamiento de personas infectadas con el VIH.

La transcriptasa inversa (TI) del VIH se localiza en el virión, y está codificada por el gen *pol*, que codifica además una proteasa y una integrasa. La TI está constituida por dos subunidades de 51 y 66 kDa, denominadas p51 y p66, respectivamente. La subunidad p66 consta de 560 aminoácidos y la subunidad p51 de 440 aminoácidos y es resultado de la escisión proteolítica de un fragmento de 120 aminoácidos del extremo carboxilo de p66. Aunque las funciones catalíticas se localizan en la subunidad p66 (figura 2), sólo el heterodímero es enzimáticamente activo. La TI utiliza como molde al ARN viral para sintetizar una cadena de ADN, la cual sirve luego como molde para sintetizar una cadena complementaria de ADN. Así, la TI forma un ADN doble que más adelante se integra al genoma celular, lo que vuelve permanente a la infección.

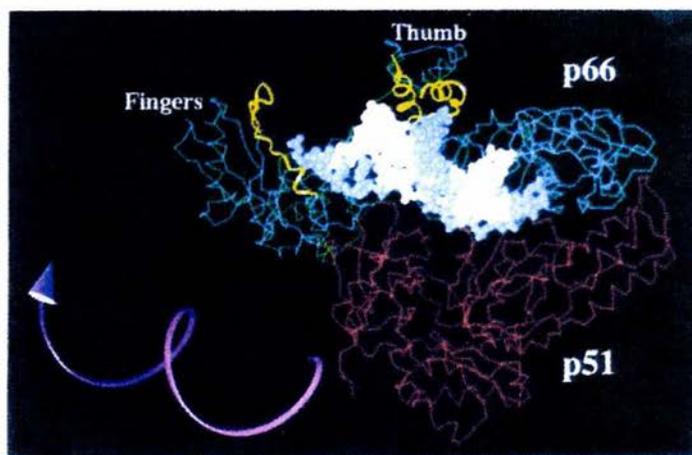


Figura 2. Transcriptasa inversa del VIH.

---

---

La TI es una polimerasa con una tasa de error elevada. Durante el ciclo de replicación interviene la polimerasa II de ARN para formar las nuevas copias de ARN que empaquetarán a la TI en el virión, ésta polimerasa también tiene una elevada tasa de error. Debido a que ambas enzimas carecen de actividad correctora, introducen gran cantidad de mutaciones en el genoma del VIH. Por lo tanto, la tasa de cambio y la de evolución en los retrovirus son muy rápidas.

Aunque la TI es la proteína más conservada dentro del genoma viral, presenta gran variabilidad. La región más conservada comprende una zona de 14 aminoácidos. Debido a la importancia de la TI, en el ciclo de replicación viral, esta enzima ha sido el blanco fundamental para el diseño de fármacos destinados al tratamiento del SIDA y otras enfermedades causadas por retrovirus.

## **2. Ciclo replicativo y reacciones inmunológicas.**

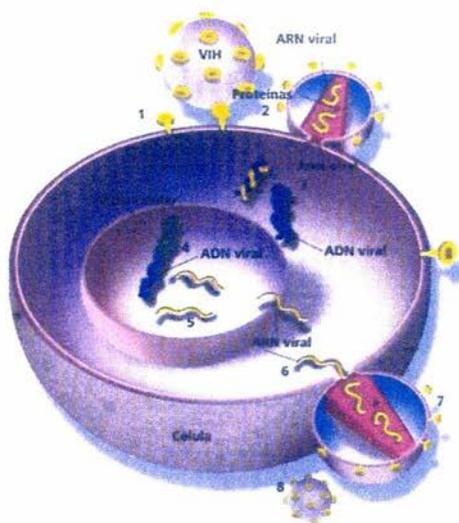
Una vez que se produjo la fijación del virus en la célula, éste debe atravesar la membrana plasmática de la célula y luego la cápside debe experimentar una serie de transformaciones que preparan al virus para su replicación ulterior. Cuando el virus ha ingresado a la célula efectora debe replicar su genoma y las proteínas estructurales y no estructurales asociadas.

Existen dos estrategias fundamentales de replicación utilizadas por los virus ARN de cadena simple. Si el ARN posee un sentido positivo puede actuar directamente como ARN mensajero y éste es traducido formando poliproteínas voluminosas. Los virus ARN de la familia *Retroviridae* poseen un ARN genómico de doble cadena. Estos virus contienen una ARN polimerasa del ARN de doble cadena y el ARN de cadena simple, que posibilita la producción de ARN con sentido positivo.

La estrategia de replicación del ARN más interesante es la utilizada por los retrovirus. El ARN genómico viral de este tipo de virus es de cadena simple con sentido positivo. Sin embargo, este ARN no actúa como mensajero, sino que es transcrito a ADN a

través de la intervención de una ADN polimerasa (Transcriptasa Inversa) dependiente del ARN.<sup>2</sup>

La Figura 3 muestra el ciclo replicativo del VIH.<sup>18</sup> En ella se pueden observar los siguientes procesos: 1. Acoplamiento del VIH con la célula; 2. Fusión de la cubierta del VIH con la membrana celular; 3. Transcripción inversa (el ARN viral se transforma en ADN viral); 4. Integración (el ADN viral se integra al ADN celular); 5. Transcripción (el ADN viral se transforma en ARN viral); 6. Se forma la estructura externa del virus al que se introducen el ARN y la cadena de proteínas del virus; 7. La cadena de proteínas se recorta para formar las proteínas del virus; 8. Nuevo virus.



*Figura 3. Ciclo replicativo del VIH*

La capacidad del organismo para defenderse en contra de los microorganismos invasores como las bacterias, las toxinas, los virus y los cuerpos extraños consiste en dos respuestas inmunes cercanas. Una respuesta consiste de la formación de linfocitos específicamente sensibilizados que tienen la capacidad de unirse a una sustancia extraña y destruirla. Ésta se denomina inmunidad celular (inmunidad mediada por células T) y es

particularmente efectiva en contra de los hongos, parásitos, infecciones virales, intracelulares, células cancerosas y transplantes de tejidos extraños.<sup>19</sup>

En otra de las respuestas, el organismo produce anticuerpos circulantes que son capaces de atacar a un microorganismo invasor, esto se denomina inmunidad humoral (mediada por anticuerpos, provenientes de células B) y es particularmente efectiva en contra de las infecciones bacterianas y virales.

La Figura 4 muestra los mecanismos de defensa del sistema inmunológico,<sup>20</sup> el primero es la secreción de anticuerpos, la necrosis por parte de las células TNK el segundo mecanismo, y por último el mecanismo por el cual las células T ayudadoras secretan linfocinas que estimulan la respuesta general del organismo.

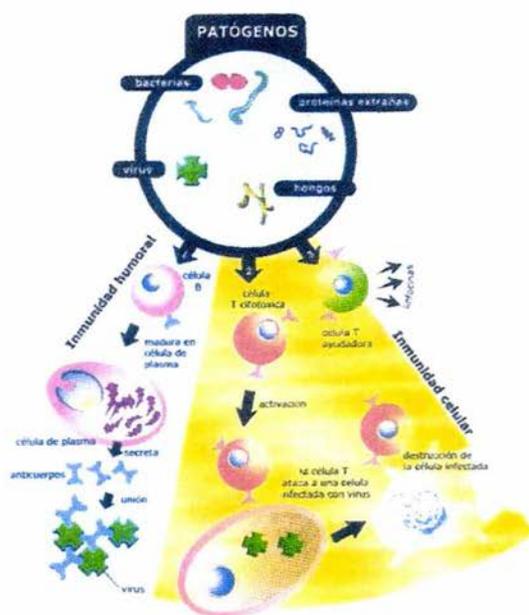


Figura 4. Mecanismos de respuesta inmune.

La interacción del VIH con el sistema inmunitario del huésped es compleja. Las células del sistema inmunitario tienen una especie de "etiquetas" que las identifican. La

superficie glucoproteica CD4 es la etiqueta particular de un grupo de linfocitos T *helper*, también existe en macrófagos y en células dendríticas. El VIH reconoce la etiqueta CD4, aborda a la célula y la infecta. La interacción entre una glucoproteína de superficie del VIH (gp120) con CD4 es necesaria pero no suficiente para la entrada; para la fusión de la cubierta del virus con la membrana plasmática de la célula se requiere la interacción adicional con un correceptor. Algunas variantes del VIH sólo infectan a macrófagos y a células dendríticas, para los cuales, el correceptor es una proteína llamada CCR5, que es el receptor natural para las quimosinas  $\beta$ , MCP-1 y RANTES. Algunas variantes tienen tropismo por las células T y, para ellas, el correceptor es la proteína CXCR4.<sup>1</sup>

### 3. Distribución geográfica mundial de la pandemia.

Según las estimaciones más recientes del programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH-SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) a mediados del año 2003 el número de personas que vivían con el VIH era de 42 millones (Figura 5) en la actualidad se dan 10 infecciones de hombres, mujeres y niños por minuto con un total de 14000 infectados por día y cercano a 6 millones de personas por año. En total, desde el inicio de la epidemia, hace tres décadas, el VIH ha infectado alrededor de 60 millones de personas y a costado la vida a casi 20 millones.<sup>18</sup>

#### Número estimado de adultos y niños viviendo con el VIH/SIDA a fines de 2002



Figura 5. Estadísticas mundiales (ONUSIDA 2003).

---

---

#### 4. Tratamiento antirretroviral.<sup>21</sup>

En el paciente con SIDA debe iniciarse el tratamiento independientemente de los niveles de CD4 o de ARN plasmático. Las combinaciones más estudiadas son las que incluyen dos inhibidores de la transcriptasa inversa más un inhibidor de proteasa o un inhibidor no análogo de nucleósido. Las combinaciones de zidovudina con ddI, ddC o 3TC más un inhibidor de proteasa, como indinavir, nelfinavir o ritonavir se acompañan de reducciones muy importantes de la viremia.

Una vez iniciado el tratamiento deberá repetirse la medición de la carga viral con el mismo método cuatro semanas después, y debe esperarse una reducción de 10 veces la carga viral; si ésta es menor, debe considerarse el cambio de tratamiento. Si se ha conseguido la supresión deberá repetirse el examen cada cuatro a seis meses. En caso de falla en la supresión viral después de cuatro a seis meses, también deberá considerarse el cambio de tratamiento, aunque en este caso es importante tomar en cuenta el grado de disminución. Como regla general, los niveles menores de 10 000 copias del virus durante el tratamiento no requieren el cambio inmediato del mismo. Sin embargo, la supresión inicial (no detectable), seguida de la detección persistente del virus, amerita seguimiento muy cuidadoso del paciente por la posibilidad de génesis de resistencia. La aparición de enfermedades oportunistas o la disminución progresiva de células T CD4 debe considerarse como falla del tratamiento.

En caso de intoxicación deberá cambiarse el medicamento por otro del mismo grupo (teniendo en cuenta las combinaciones contraindicadas). En el caso de un paciente que ha recibido tratamiento con uno o dos inhibidores de la transcriptasa inversa se recomienda cambiar a un régimen con dos nuevos inhibidores más un inhibidor de proteasa. En paciente con falla del tratamiento triple, donde se han agotado las combinaciones con inhibidores de proteasa, se puede intentar la combinación de dos inhibidores de proteasa o con un nuevo inhibidor de proteasa y un inhibidor no análogo de nucleósido de la transcriptasa inversa.

*a. Compuestos inhibidores análogos de nucleósidos.*

Los agentes quimioterapéuticos contra la enzima TI del VIH interfieren con la actividad polimerasa de esta enzima y pueden ser divididos en dos grupos: inhibidores análogos de nucleósidos e inhibidores no análogos de nucleósidos. El primer grupo incluye el AZT, ddC, 3TC, entre otros; los cuales son incorporados a la cadena de ADN en crecimiento; sin embargo, estos compuestos son muy tóxicos.

Los compuestos denominados inhibidores análogos de nucleósidos (Figura 6), a diferencia de un nucleósido normal, tienen el grupo hidroxilo de la posición 3' del azúcar desoxirribosa alterado, por ejemplo el AZT tiene un grupo azido en la posición 3', el d4T tiene un doble enlace entre los carbonos 2' y 3' y el ddC contiene sólo el enlace sencillo entre los carbonos 2' y 3'. Este tipo de compuestos son activados a su forma trifosfato (por las enzimas cinasas celulares) mediante la fosforilación en la posición 5' para dar nucleótidos. Así, estos compuestos son reconocidos como nucleótidos normales y son incorporados a la síntesis de ácidos nucleicos virales por la TI del VIH. De manera colateral, las ADN polimerasas celulares ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$ ) también incorporan estos compuestos a la síntesis de ácidos nucleicos celulares, lo cual se refleja en las severas reacciones adversas de estos fármacos (anemia, neutropenia, pancreatitis, entre otras).

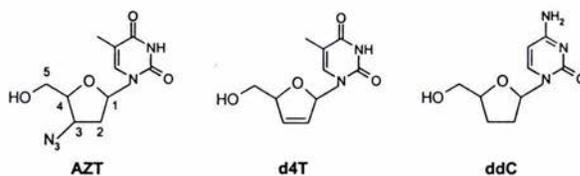


Figura 6. Estructuras químicas de algunos compuestos análogos de nucleósidos.

Una vez incorporados los análogos de nucleósidos a la cadena del ADN, no se puede continuar con la síntesis de los ácidos nucleicos virales. Esto se debe a que los grupos funcionales sustituidos en la posición 3' (del nucleósido) no son buenos nucleófilos; es decir su capacidad de polimerización se encuentra disminuida y por lo tanto se detiene la

síntesis del ADN. Dada esta característica, estos compuestos resultan ser excelentes para inhibir la síntesis de los ácidos nucleicos virales. Desafortunadamente sucede lo mismo con la síntesis de ácidos nucleicos de células normales, por lo que los análogos de nucleósidos resultan ser compuestos muy tóxicos en las terapias para combatir al VIH.

*b. Compuestos inhibidores no análogos de nucleósidos.*

Los compuestos denominados inhibidores no análogos de nucleósidos han demostrado especificidad hacia la TI del VIH.<sup>22</sup> Nevirapina, Delavirdina, Efavirenz, Hidroxietoximetilfeniltiotimina (HEPT), Etoximetilbencilisopropiluracilo (MKC-442) y Benciloximetilbencilisopropiluracilo (TNK-651), Figura 7, pertenecen a este grupo. Estos compuestos son altamente específicos contra esta enzima, ya que presentan una inhibición no competitiva hacia la TI. Esto es porque interaccionan con un sitio alostérico (que no es de unión al sustrato) de la enzima. Estos compuestos, a diferencia de los análogos de nucleósidos, no necesitan ser fosforilados para interaccionar con la TI y paralelamente no se incorporan al crecimiento de los ácidos nucleicos.

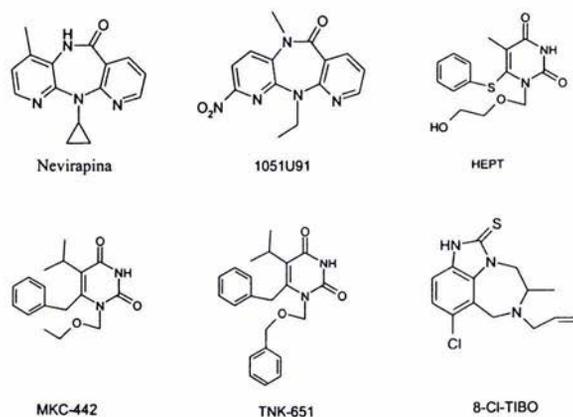


Figura 7. Estructuras químicas de algunos compuestos no análogos de nucleósidos.

---

---

Estudios recientes de cocristalización y difracción de rayos X muestran a los no análogos de nucleósidos interaccionando con los residuos de aminoácidos de la TI en un sitio que no es el sitio activo<sup>23</sup>. Este sitio, denominado alostérico, se encuentra localizado a 10 Å del sitio activo y tiene una forma de bolsa<sup>24</sup>.

Los no análogos de nucleósidos se unen a los aminoácidos por medio de puentes de hidrógeno, las interacciones no covalentes más importantes en el proceso de reconocimiento molecular proteína-inhibidor. Las estructuras cristalinas del complejo TI con dos potentes inhibidores MKC-442 y TNK-651, a una resolución de 2.55 Å, revelan cambios conformacionales de la enzima, los cuales correlacionan con cambios en la potencia inhibitoria viral de los compuestos.

---

---

## B. QUÍMICA FARMACÉUTICA

### 1. Conceptos básicos en química farmacéutica.

La química farmacéutica tiene como objetivo el estudio de los fármacos desde el punto de vista químico, así como de los principios básicos utilizados en su diseño. Su rasgo diferencial a otras áreas científicas es su metodología, que se basa en el establecimiento de la relación entre la estructura química de un fármaco y su actividad biológica.

Un fármaco, o principio activo, se define como una sustancia pura, químicamente definida, extraída de fuentes naturales o sintetizada en el laboratorio, dotada de una acción biológica, que puede o no ser aprovechada por sus efectos terapéuticos. La lengua castellana a diferencia de otras, distingue entre fármaco y droga, que, estrictamente, significa una materia prima de origen vegetal o animal que contiene uno o varios principios activos y que no ha sufrido manipulación, salvo la necesaria para su conservación.

Cuando un fármaco tiene una actividad biológica útil desde el punto de vista terapéutico se hace necesario su desarrollo hasta dar lugar a un medicamento, lo que supone las siguientes características:

- Se presenta como una forma farmacéutica (inyectables, comprimidos, etc.) constituidos por uno o varios principios activos y generalmente por uno o varios excipientes.
- Ha sido aprobado oficialmente para su comercialización tras superar una serie de controles analíticos (composición química, pureza, etc.) y farmacológico-tóxicos (actividad, efectos colaterales y secundarios, ausencia de actividad carcinogénica y teratogénica, etc.).

La síntesis y el análisis de los fármacos son aplicaciones directas de la síntesis orgánica y de la química analítica, respectivamente. Por tanto, su estudio debe realizarse desde una perspectiva estructural de los mismos. En cambio, para el estudio sistemático de

---

---

los fármacos se prefiere una clasificación de tipo farmacológico o según su mecanismo de acción a nivel molecular.

Al proponer el establecimiento de relaciones entre una estructura química y la acción biológica, la química farmacéutica se convierte en una materia interdisciplinaria en la que no se yuxtaponen, sino que convergen, varias disciplinas con múltiples interconexiones.

De todas las materias relacionadas con ella, la química orgánica y la farmacología son las que actualmente tienen mayor peso. La primera aporta la metodología de trabajo para la síntesis y estudio estructural y de reactividad, incluyendo muchos aspectos básicos para el análisis de fármacos y medicamentos. La segunda aporta los conocimientos necesarios para permitir establecer la actividad de un compuesto y decidir su posible desarrollo como medicamento.<sup>25</sup>

## **2. Búsqueda de nuevos fármacos.**

La puesta en el mercado de un nuevo medicamento precisa cubrir una serie de etapas que de forma esquemática podrían resumirse en:

- a) Búsqueda del modelo.
- b) Manipulación del modelo.
- c) Determinación de formas farmacéuticas y dosificación.

La búsqueda del modelo supone encontrar una actividad biológica nueva en un compuesto químico. Se trata, en consecuencia, de encontrar nuevas estructuras que puedan servir como punto de partida para su modificación estructural, ante el hecho de que el nuevo compuesto no tiene porque ser el mejor de los posibles que se puedan preparar (manipulación del modelo).

---

---

El descubrimiento de un nuevo modelo puede realizarse de distintas formas. Históricamente, los modelos más interesantes se han encontrado como consecuencia del estudio de los productos del metabolismo secundario en organismos vivos y la síntesis de análogos estructurales. El descubrimiento accidental de una actividad en compuestos obtenidos por síntesis, así como el descubrimiento de efectos inesperados en la aplicación terapéutica de fármacos conocidos y de estrategias basadas en planteamientos bioquímicos, ha jugado también un papel importante.<sup>26</sup>

### 3. Modificación molecular.<sup>27</sup>

Desde el punto de vista general, pueden considerarse tres tipos de estrategias a la hora de manipular la estructura de un modelo:

- a) *Simplificación del modelo*. Es un método conocido tradicionalmente como “variación estructural disyuntiva”, aplicado fundamentalmente a productos naturales de estructura compleja.
- b) *Asociación de dos moléculas*. Consiste en la unión de dos estructuras con una determinada actividad. Con la esperanza de potenciarla. Tradicionalmente, se ha distinguido entre “adición molecular”, definida como la asociación de moléculas diferentes por interacciones débiles (uniones electrostáticas), “replicación molecular”, o unión covalente de unidades idénticas e “hibridación molecular”, en la que se asocian covalentemente dos o más unidades distintas.
- c) *Replicación moduladora*. Consiste en la sustitución de determinados grupos de la estructura modelo. Esta es la metodología más frecuentemente empleada.

La aplicación de los procedimientos de modificación molecular anteriormente comentados no suelen llevarse a cabo mediante cambios elegidos al azar, sino a través de una serie de criterios que tienen posibilidades de conducir a mejoras terapéuticas. Algunos de estos criterios son:

- *Apertura o cierre de anillos.* Se trata de una modificación molecular que ha conducido con frecuencia a compuestos que retienen o superan la actividad del modelo. Existen numerosos ejemplos en los que este método se ha usado para estudiar la conformación activa de ciertos neurotransmisores o fármacos, diseñando análogos rígidos o semirrígidos de los mismos.
- *Introducción de enlaces múltiples.* La introducción de un enlace doble o triple puede alterar tanto la forma de una molécula (generalmente en el sentido de incrementar su rigidez) como sus propiedades fisicoquímicas. En relación con la introducción de enlaces múltiples, debe mencionarse un criterio utilizado con frecuencia en el diseño de análogos de una estructura activa conocido como “principio de vinilología”, según el cual dos sustituyentes *X* e *Y* unidos por una cadena vinilénica o polivinilénica (incluyendo un anillo bencénico) se comportan, desde el punto de vista de distribución electrónica, como si estuvieran unidos directamente.
- *Homología.* Un homólogo de un determinado compuesto es el análogo a éste que resulta de la adición de un carbono a una cadena o anillo. Un cambio de este tipo suele ir acompañado por un incremento de la lipofilia. La actividad crece al aumentar el número de carbonos hasta alcanzar un máximo, a partir del cual vuelve a disminuir y la acción farmacológica cambia sólo si la homologación afecta a la parte de la molécula que participa en su unión al receptor.
- *Introducción de grupos voluminosos.* Se ha comprobado en muchas ocasiones que la introducción de un grupo voluminoso en una estructura es capaz de provocar una respuesta por unión a un determinado receptor. Esto puede conducir a un antagonista de dicho receptor.
- *Bioisosterismo.* El isosterismo es un concepto químico que se ha aplicado al desarrollo de nuevas moléculas con actividad farmacológica. En el pasado el

término “isosterismo” se utilizaba para describir la semejanza en propiedades físicas y químicas que presentan una serie de iones y moléculas que contienen el mismo número de átomos y electrones de valencia. Por ejemplo el nitrógeno molecular y el monóxido de carbono, dos moléculas diatómicas con diez electrones de valencia, son casi idénticos en cuanto a viscosidad, densidad, índice de refracción, constante dieléctrica, solubilidad, etc. La llamada “ley de desplazamiento de hidruro” permitió extender el concepto de isosterismo a especies que, aún teniendo diferente número de átomos, poseen un mismo número de electrones de valencia. Según esta ley, un átomo es isostérico con la especie que resulta al añadir un hidrógeno y dos electrones (un hidruro) al átomo que le precede en el sistema periódico. En una ampliación posterior del concepto de isosterismo se introdujo la idea de “isoelectronicidad periférica” según la cual, deben considerarse isósteros aquellos átomos o grupos de átomos que son idénticos en su capa electrónica externa. Todos estos criterios de distribución electrónica se agrupan bajo el término de isosterismo clásico. Cuando además de ellos se introducen otros criterios adicionales, tales como geometría (hibridación, ángulos de enlace), solubilidad, acidez, capacidad de enlace por puentes de hidrógeno y reactividad química se llega a una serie de equivalencias llamado isosterismo no clásico que son útiles en el diseño de análogos de una estructura prototipo.

El fenómeno por el cual dos compuestos de estructuras relacionadas presentan propiedades biológicas semejantes se define como bioisosterismo. Por lo tanto, se pueden definir como bioisósteros a las moléculas o grupos que debido a que poseen propiedades físicas o químicas similares, producen una respuesta farmacológica semejante o antagónica. Esta dualidad dependerá de que el compuesto interactúe con el centro activo de una enzima o con un sitio alostérico de la misma. Una segunda posibilidad, es que interactúe con su receptor produciendo los cambios conformacionales de los que resulta una respuesta biológica.

---

---

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En el ciclo replicativo del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) el proceso fundamental que consiste en la biosíntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir del ácido ribonucleico (ARN) lo realiza la enzima transcriptasa inversa (TI). Los compuestos más utilizados para tratar de inhibir la función de esta enzima se clasifican en análogos de nucleósidos e inhibidores no análogos de nucleósidos. Entre los primeros se encuentra el 3'-azido, 2', 3'-desoxitimidina (AZT), que ha tenido gran éxito para inhibir el ciclo replicativo de este virus; desgraciadamente éste afecta también seriamente a células normales, es decir su toxicidad es muy alta. Los compuestos denominados inhibidores no análogos de nucleósidos han despertado gran interés debido a su alta especificidad hacia la TI. Por tal motivo, se consideró de suma importancia en este trabajo sintetizar compuestos químicos que pertenezcan a los inhibidores no análogos de nucleósidos para evaluar su actividad anti-VIH.

### III. OBJETIVOS.

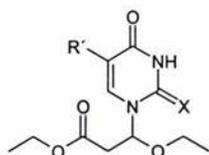
#### A. Objetivo general

Sintetizar compuestos pertenecientes a los inhibidores no análogos de nucleósidos para estudiar la inhibición enzimática viral (anti-VIH) a nivel de la biosíntesis de ácidos nucleicos.

#### B. Objetivos particulares

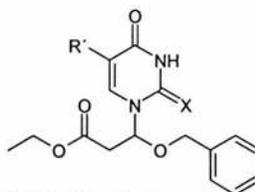
1. Sintetizar los inhibidores no análogos de nucleósidos, mostrados a continuación.

Serie alifática



9. R' = *i*-Pr, X = S
10. R' = *i*-Pr, X = O
12. R' = I, X = O

Serie aromática



11. R' = *i*-Pr, X = O
13. R' = I, X = O

2. Caracterizar los compuestos sintetizados.
3. Evaluar la actividad antirretroviral de los compuestos sintetizados, mediante la cuantificación *in vitro* de la inhibición enzimática para la transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana.

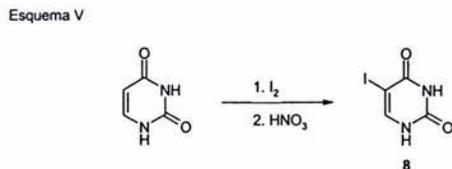
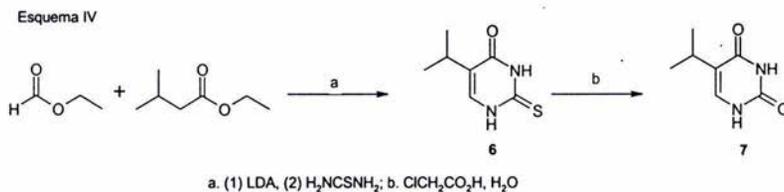
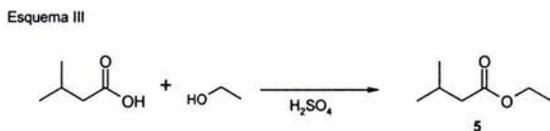
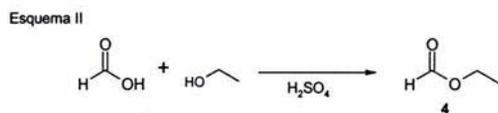
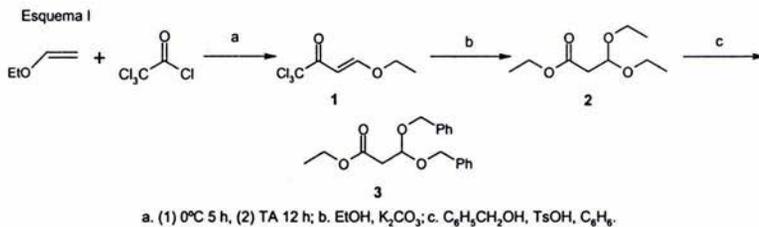
#### **IV. Hipótesis.**

Con base en la analogía de la estructura química de fármacos denominados como inhibidores no análogos de nucleósidos, aprobados por la FDA, los compuestos a sintetizar presumiblemente inhibirán con alta especificidad a la transcriptasa inversa del VIH, lo cual se verá reflejado en una inhabilitación para la biosíntesis de ácidos nucleicos virales y por lo tanto en el incremento de la eficacia del tratamiento.

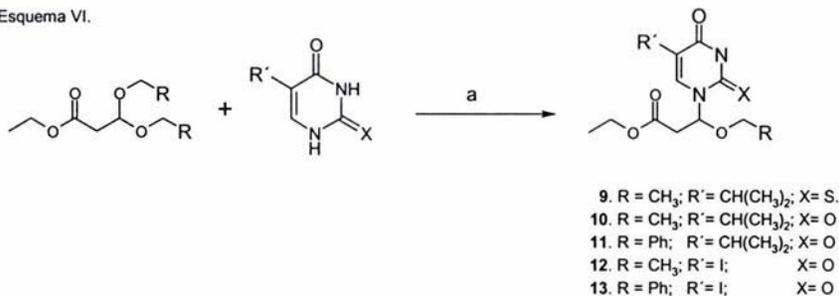
## V. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

### A. Método.

#### 1. Esquemas de síntesis.



Esquema VI.



a. (1) HMDS, TMCS; (2) CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

## 2. Evaluación antiviral.

La evaluación antirretroviral se realizó con el Kit comercial Cavidí que contiene nucleótidos y a la enzima transcriptasa inversa del VIH.

### B. Material

#### 1. Material

- a. Matraces
- b. Vasos de precipitados
- c. Equipos de destilación
- d. Placas de agitación
- e. Canastillas de calentamiento
- f. Agitadores magnéticos
- g. Embudos büchner
- h. Embudos de separación
- i. Refrigerantes
- j. Baños de hielo
- k. Termómetros
- l. Papel filtro
- m. Kit Lenti-RT Activity KIT.

---

---

## 2. Equipo

### a. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Espectrómetro Bruker 300, espectrómetro Jeol GSX 270 y espectrómetro Jeol Eclipse 400.

### b. Infrarrojo (IR).

Espectrómetro Perkin Elmer 16F PC.

### c. Espectrometría de masas.

Espectrómetro Hewlett Packard 5989 A.

### d. Espectrofotómetro.

Benchmark Microplate Reader.

### e. Rayos X.

Difractómetro Enraf-Nonius Kappa CCD.

### f. Análisis elemental.

Analizador Thermo Finnigan Flash 1112.

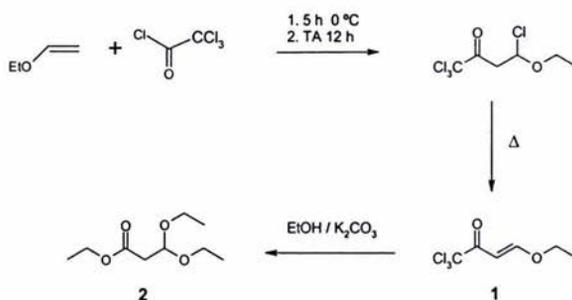
## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### A. Síntesis de los compuestos

La primera parte de este trabajo se centra en la síntesis convergente de los inhibidores no análogos de nucleósidos, 9-13 (Esquema VI).

#### 1. Síntesis de 3,3-dietoxipropanoato de etilo y 3,3-dibenciloxipropanoato de etilo (Esquema I).

Para lograr la síntesis de los compuestos, se obtuvo en primer lugar el 3,3-dietoxipropanoato de etilo (**2**), según la técnica reportada por Tietze y colaboradores,<sup>28</sup> la ruta sintética trazada se muestra en el siguiente esquema.



El primer paso de esta serie de reacciones consiste en la acilación (por parte del cloruro de tricloroacetilo) de un éter de enol (éter etilvinílico), la cual se llevó a cabo manteniendo la temperatura a 0 °C durante cinco horas dado que la reacción es exotérmica. Adicionalmente, esta reacción, se mantuvo a temperatura ambiente durante 12 horas, esto con el fin de incrementar el rendimiento. El exceso de éter etilvinílico se separó de la mezcla de reacción por medio de vacío, terminada la separación del éter, se continuó con la reacción de deshidrohalogenación (segundo paso), ésta se logró elevando la temperatura y aplicando vacío, una vez terminada esta reacción de eliminación, el producto comenzó a destilar, obteniéndose un líquido amarillo claro con punto de ebullición de 84-86 °C a 1 mm de Hg correspondiente a 1,1,1-tricloro-4-etoxi-3-buten-2-ona (**1**) que fue identificado por resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H.

Las señales observadas en  $^1\text{H}$  RMN (Figura 8) fueron: una señal triple a 1.39 ppm con una constante de acoplamiento de 7 Hz que corresponde a los tres hidrógenos metílicos, un cuarteto a 4.09 ppm con una constante de acoplamiento de 7 Hz correspondiente a los dos hidrógenos metilénicos y por último, a campo bajo, dos señales dobles que corresponden a los dos hidrógenos vinílicos; el doblete de 6.14 ppm para el hidrógeno del carbono  $\alpha$  al grupo carbonilo y otro doblete a 7.84 ppm para el hidrógeno del carbono  $\beta$ , ambas con una constante de acoplamiento de 12 Hz, lo que indica una isomería geométrica *trans*.

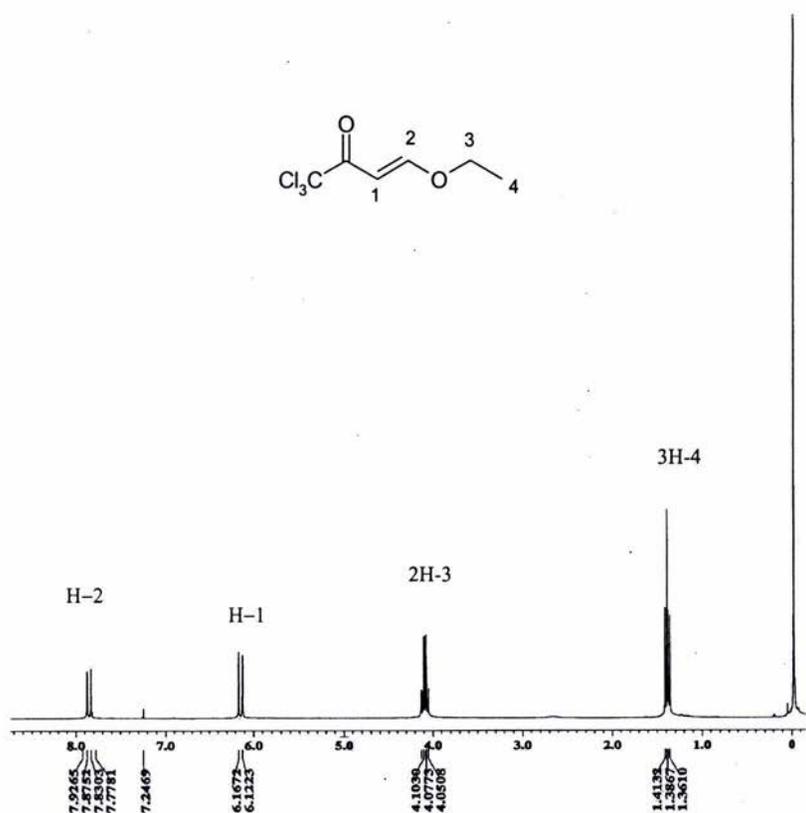


Figura 8. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para 1,1,1-tricloro-4-etoxi 3-buten-2-ona (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

El tercero y último paso para la obtención del 3,3-dietoxipropanoato de etilo (2) fue la reacción del haloformo seguida por una reacción de adición de etanol al doble enlace de la cetona conjugada obtenida del paso anterior, lo cual se llevó a cabo agregando carbonato de potasio y etanol a la 1,1,1-tricloro-4-etoxi-3-buten-2-ona a temperatura ambiente. Para aislar el producto, a la mezcla de reacción se le adicionó hexano y se filtró a vacío, el sólido se enjuagó con cloruro de metileno y el filtrado se concentró en rotavapor, finalmente el producto se purificó mediante destilación a presión reducida (1 mm de Hg), obteniéndose un líquido transparente con punto de ebullición de 58-60 °C correspondiente al 3,3-dietoxipropanoato de etilo (2).

Para este compuesto se observaron las siguientes señales de hidrógeno (Figura 9) en RMN: una señal triple en 1.15 ppm para los seis hidrógenos metílicos del grupo acetal y otra señal triple en 1.21 ppm para los tres hidrógenos metílicos del grupo funcional éster, ambos tripletes con una constante de acoplamiento de 7 Hz; una señal doble en 2.6 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz, para los dos hidrógenos del metileno ubicado entre el grupo acetal y el éster; dos dobles de cuartetos entre 3.4 y 3.7 ppm para los cuatro hidrógenos metilénicos del grupo acetal; una señal correspondiente a un cuarteto en 4.1 ppm con una constante de acoplamiento de 7 Hz, para los dos hidrógenos metilénicos del éster y una señal triple en 4.9 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz, para el hidrógeno metínico del metino que soporta al grupo acetal.

En la Figura 10 se muestra el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , en el cual se observó una señal a 14.2 ppm para el metilo del grupo éster, una señal en 15.3 ppm para los metilos del grupo acetal, una señal en 40 ppm para el metileno ubicado entre el grupo acetal y el éster, una señal en 60.5 ppm para el metileno del éster, una señal en 61.9 ppm para los dos metilenos del grupo acetal, una señal en 99.7 ppm para el metino que soporta al grupo acetal y finalmente una señal a 170 ppm para el carbonilo del éster.

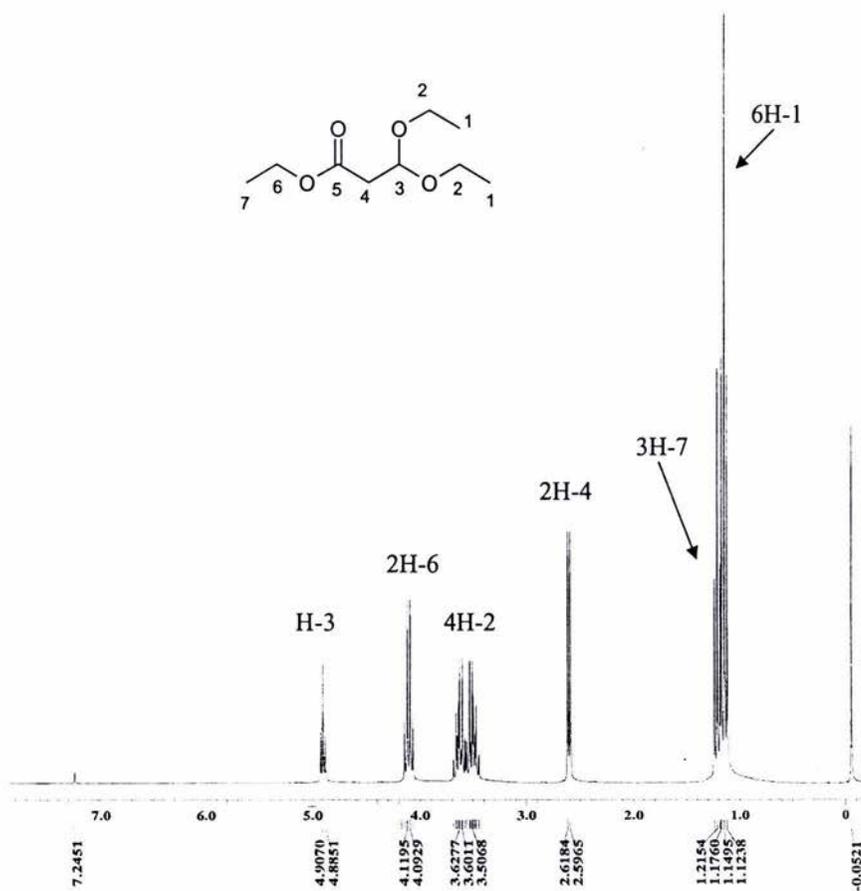


Figura 9. Espectro de <sup>1</sup>H RMN para 3,3-dietoxipropanoato de etilo (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

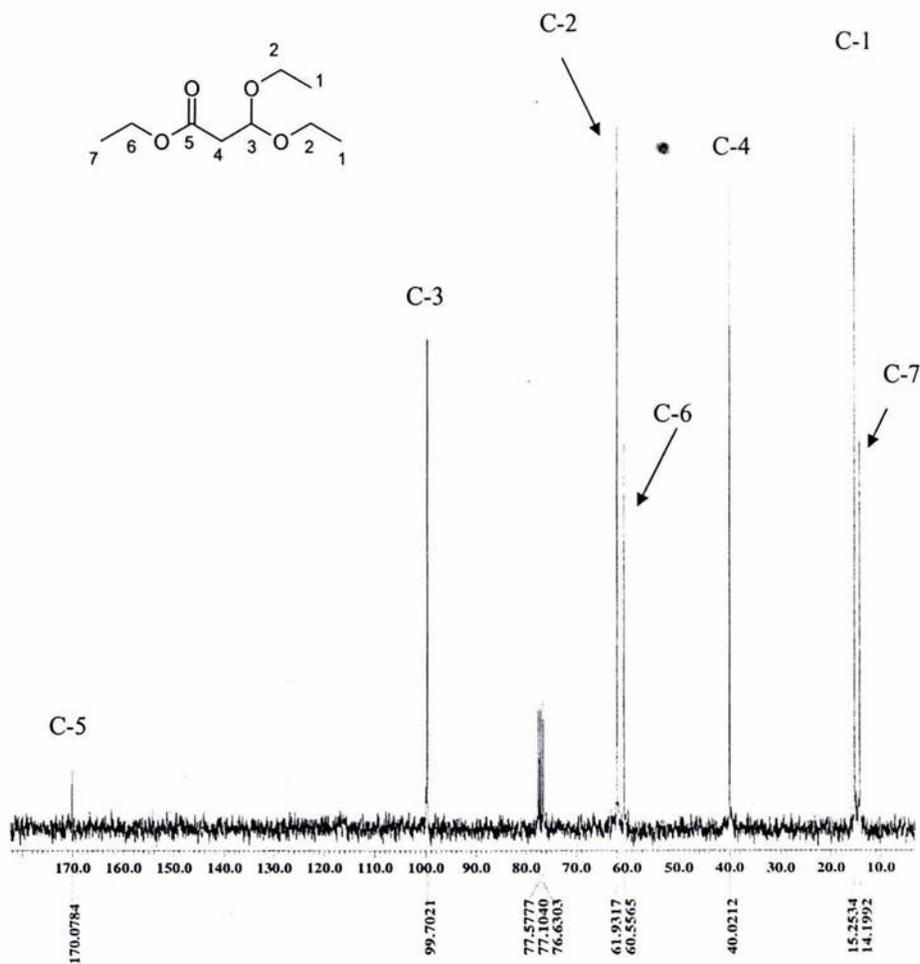


Figura 10. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para 3,3-dietoxipropanoato de etilo (67.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

La asignación inequívoca de estas señales fue realizada por la técnica espectroscópica en RMN de correlación heteronuclear, HETCOR (Heteronuclear Correlation), entre los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , figura 11.

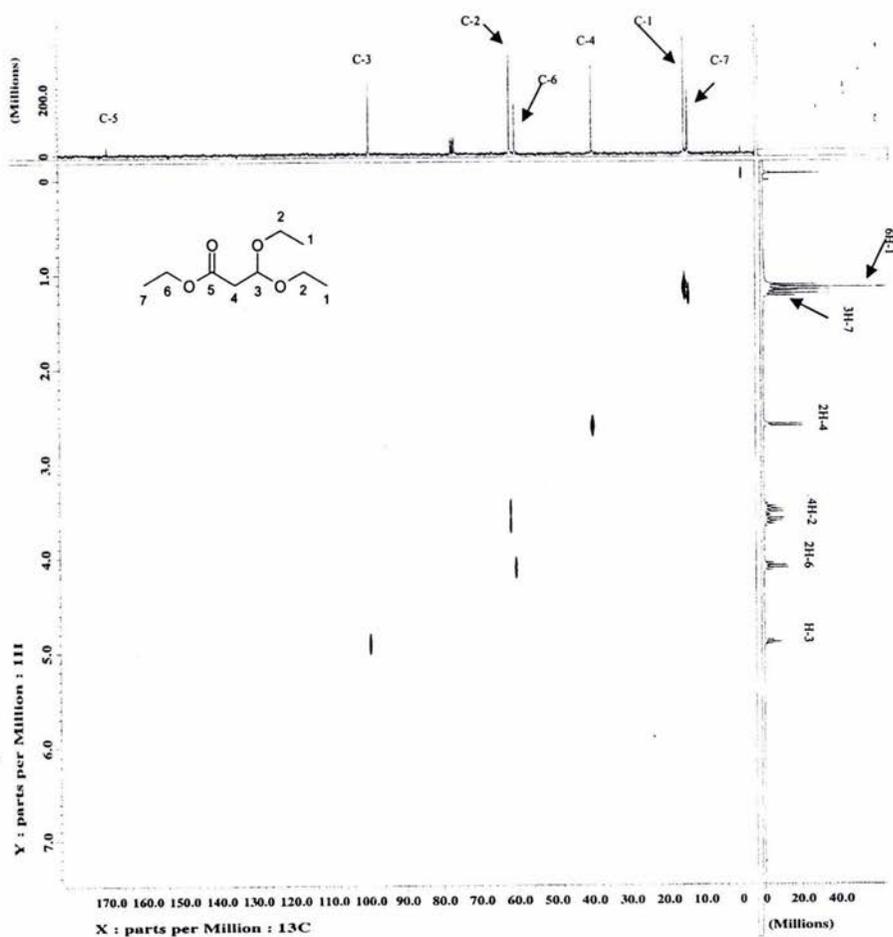
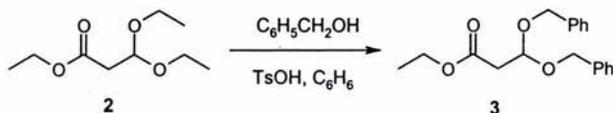


Figura 11. Espectro HETCOR  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN para 3,3-dietoxipropanoato de etilo (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Para la síntesis del compuesto **3** se llevó a cabo la reacción de transacetalación del compuesto **2**, esto se logró agregando alcohol bencílico al 3,3-dietoxipropanoato de etilo en presencia de ácido *p*-toluensulfónico y como disolvente benceno, obteniéndose el 3,3-dibenciloxipropanoato de etilo (**3**).



En este punto es importante señalar que el calentamiento de la mezcla es un punto crítico en la reacción ya que, si el calentamiento es excesivo, la materia prima se descompone dando lugar al compuesto de eliminación (compuesto  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado), esto se debe a que el grupo benciloxi es mejor grupo saliente que el grupo etoxi del acetal. Debido a este problema con el calentamiento, y ya que la reacción es casi completa, el compuesto **3** se utilizó sin purificación posterior a la extracción en medio ligeramente básico (pH 8), para la eliminación del alcohol bencílico que no reaccionó.

El compuesto obtenido muestra en RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 12) una señal triple en 1.24 ppm, con una constante de acoplamiento de 7 Hz, correspondiente a los hidrógenos metílicos; una señal ABM entre 2.7 y 2.9 ppm, con constantes de acoplamiento  $J_{\text{gem}}$  de 16 Hz y una  $^3J_{\text{AM}}$  de 6 Hz, para los dos hidrógenos metilénicos del metileno ubicado entre el grupo acetal y el éster; un cuarteto en 4.15 ppm para los dos hidrógenos metilénicos del éster; dos señales dobles, una en 4.62 ppm y otra en 4.72 ppm, ambas con una constante de acoplamiento de 12 Hz, para los cuatro hidrógenos metilénicos del acetal; una señal triple en 5.26 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz, para el hidrógeno metínico del metino que soporta al grupo acetal y una señal múltiple en 7.35 ppm correspondiente a los 10 hidrógenos aromáticos.

En la Figura 13 se muestra el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del cual se observa una señal en 14.3 ppm para el metilo, una señal en 40.0 ppm para el metileno situado entre el éster y el acetal, una señal en 60.8 ppm para el metileno del éster, una señal en 68.2 ppm para los

metilenos del acetal, una señal en 99.4 ppm para el metino que soporta al grupo acetal, los carbonos aromáticos se encuentran entre 127 y 129 ppm y en 137.8 ppm, finalmente a campo más bajo se encuentra una señal a 169.9 ppm para el carbonilo.

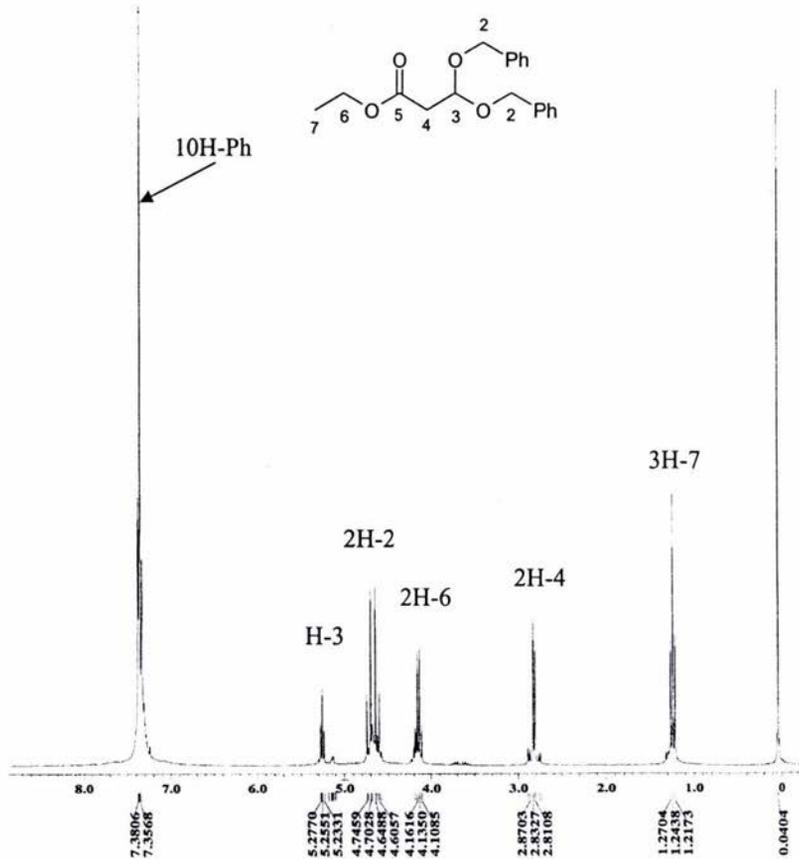


Figura 12. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN para 3,3-dibenciloxipropanoato de etilo (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

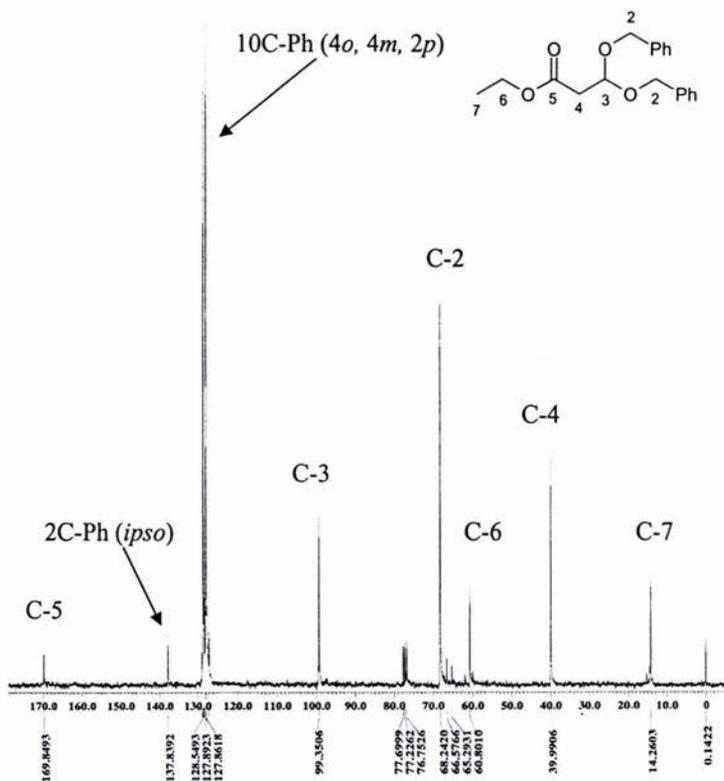
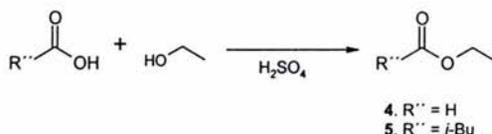


Figura 13. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para 3,3-dibenciloxipropanoato de etilo (67.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

## 2. Síntesis de metanoato de etilo y 3-metilbutanoato de etilo (esquemas II y III).

Por otro lado, para la obtención de las bases pirimidínicas fue necesario sintetizar los compuestos **4** y **5**.



El metanoato de etilo (**4**) se obtuvo mediante la esterificación de Fischer del ácido metanoico (ácido fórmico), con alcohol etílico en presencia de ácido sulfúrico como catalizador a reflujo. El tiempo óptimo de reacción se determinó monitoreando la reacción, mediante cromatografía en capa fina aplicando la reacción contra la materia prima en un sistema de elusión hexano-acetato de etilo 80:20 y con luz ultravioleta como revelador, cada 30 minutos la primera hora y cada 15 minutos la siguiente hora.

Los datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 14) para el metanoato de etilo son: una señal triple en 1.25 ppm, con una constante de acoplamiento de 7 Hz, para los hidrógenos metílicos, un cuarteto en 4.17 ppm, con una constante de acoplamiento de 7 Hz, para los hidrógenos metilénicos y una señal simple en 7.99 ppm para el hidrógeno del carbonilo.

De la misma manera, el 3-metilbutanoato de etilo (**5**) se obtuvo mediante la esterificación de Fischer del ácido 3-metilbutanoico con alcohol etílico a reflujo en presencia de ácido sulfúrico como catalizador. El tiempo óptimo de reacción se obtuvo de la misma manera que para el compuesto **4**.

El análisis espectroscópico por RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 15), para el compuesto **5** es: una señal doble en 0.9 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz, para los seis hidrógenos metílicos del grupo isobutilo; una señal triple en 1.2 ppm, con una constante de acoplamiento de 7 Hz para los tres hidrógenos metílicos del éster; una señal múltiple en 2.07 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz, para el hidrógeno metínico del

grupo isobutilo; una señal doble en 2.12 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz, para los hidrógenos metilénicos del metilo del grupo isobutilo y un cuarteto en 4.07 ppm, con una constante de acoplamiento de 7 Hz, para los hidrógenos metilénicos del éster.

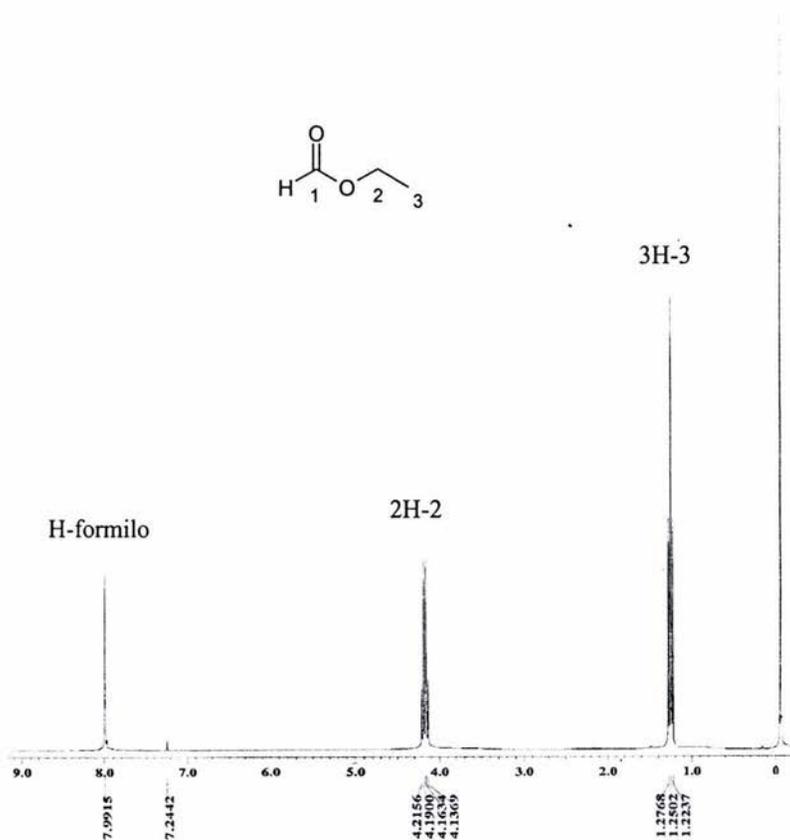


Figura 14. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN para metanoato de etilo (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

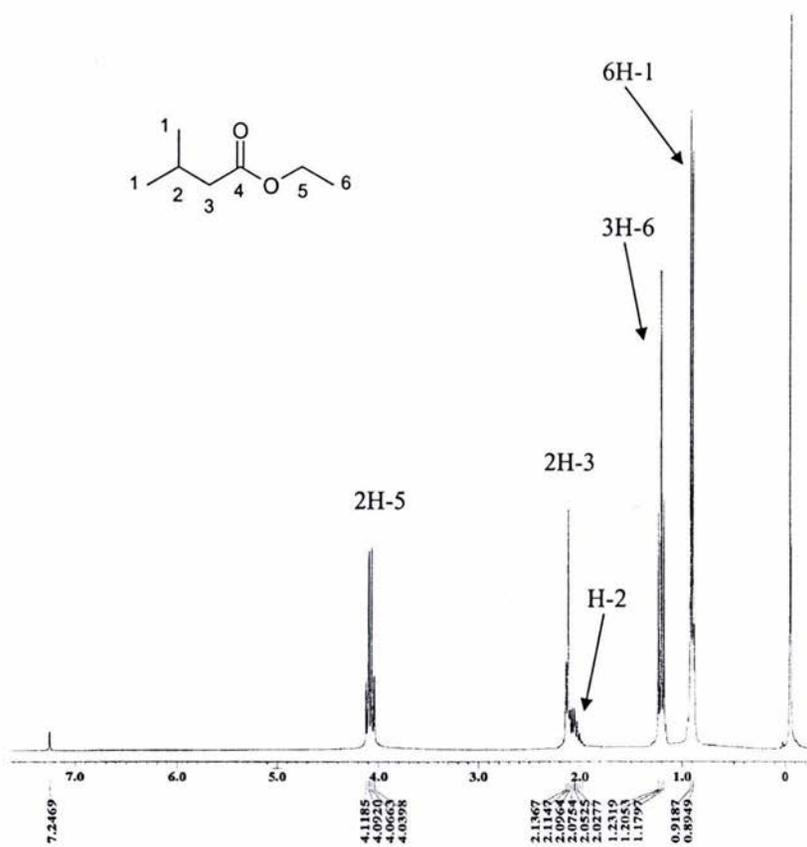
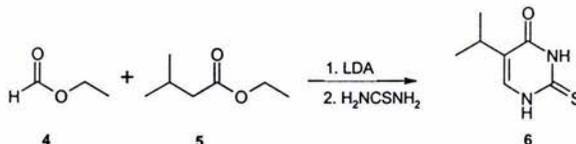


Figura 15. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN para 3-metilbutanoato de etilo (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

### 3. Síntesis de 5-isopropil-2-tioxouracilo y 5-isopropiluracilo (esquema IV).

Para la obtención de la base pirimidínica, 5-Isopropil-2-tioxouracilo, **6** se llevó a cabo inicialmente una condensación de Claisen cruzada entre los ésteres **4** y **5**.



Para lograr ésta condensación, se utilizó como base para sustraer el hidrógeno alfa al grupo carbonilo del 3-metilbutanoato de etilo, diisopropilamido de litio (LDA) a baja temperatura y en condiciones anhidras. Una vez formado el carbanión del 3-metilbutanoato de etilo, se le adicionó lentamente una solución de metanoato de etilo en éter etílico seco, esto permitió obtener el 2-formil-3-metilbutanoato de etilo, el cual se encuentra en equilibrio con su forma enólica, (Figura 16). Cabe mencionar que este compuesto no fue aislado, dada su baja estabilidad, sino que el producto crudo de la reacción anterior se trabajó inmediatamente (*in situ*) haciéndolo reaccionar con tiourea a reflujo para formar el anillo de pirimidina por adición 1,4 del grupo amino de la tiourea a la forma enólica del 2-formil-3-metilbutanoato de etilo (esto es porque teóricamente en este compuesto el equilibrio esta desplazado hacia la forma enólica), seguida de la sustitución nucleofílica del grupo etoxi en el éster por el segundo átomo de nitrógeno de la tiourea. Adicionalmente, dado el medio básico y el disolvente prótico, el alcohol intermediario, se deshidrata para dar el compuesto **6** como una sal de litio. Finalmente la acidificación del medio de reacción con ácido sulfúrico permitió la obtención de **6**.



Figura 16. Equilibrio formil-enol para el 2-formil-3-metilbutanoato de etilo.

La Figura 17 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el compuesto **6** del cual la asignación de las señales se da a continuación. Una señal doble en 1.06 ppm, con una constante de acoplamiento de 7 Hz para los dos metilos del sustituyente isopropilo en la

posición cinco del anillo de la base pirimidínica, una señal séptuple en 2.71 ppm, con una constante de acoplamiento de 7 Hz para el hidrógeno del metino del isopropilo, una señal doble en 7.09, con una constante de acoplamiento de 6 Hz para el hidrógeno en posición seis y dos señales anchas, una en 12.20 y la otra en 12.38 ppm para los hidrógenos amidico e imídico, respectivamente.

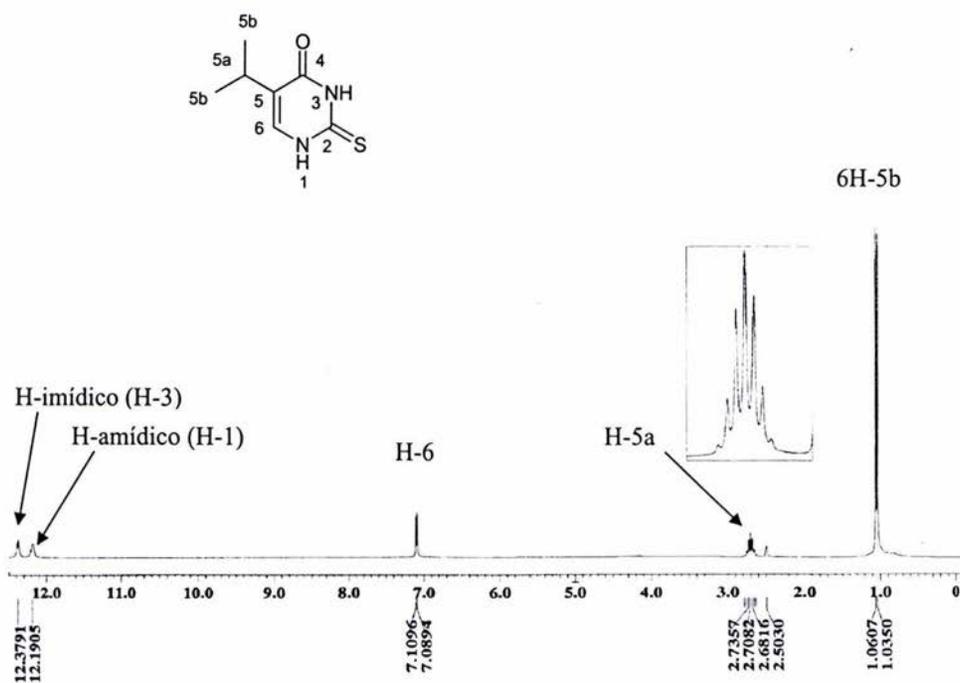


Figura 17. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN para 5-isopropil-2-tioxouracilo (270 MHz, DMSO).

El espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 18) muestra una señal en 21.4 ppm para los carbonos metílicos del sustituyente isopropilo, una señal en 25.9 ppm para el metino del grupo isopropilo, una señal en 124.1 ppm para el carbono cuaternario del anillo de pirimidina, una señal en 136.6 ppm para el metino del anillo, una señal para el carbonilo en 161.6 ppm y finalmente la señal de 174.9 ppm para el carbono que soporta al azufre.

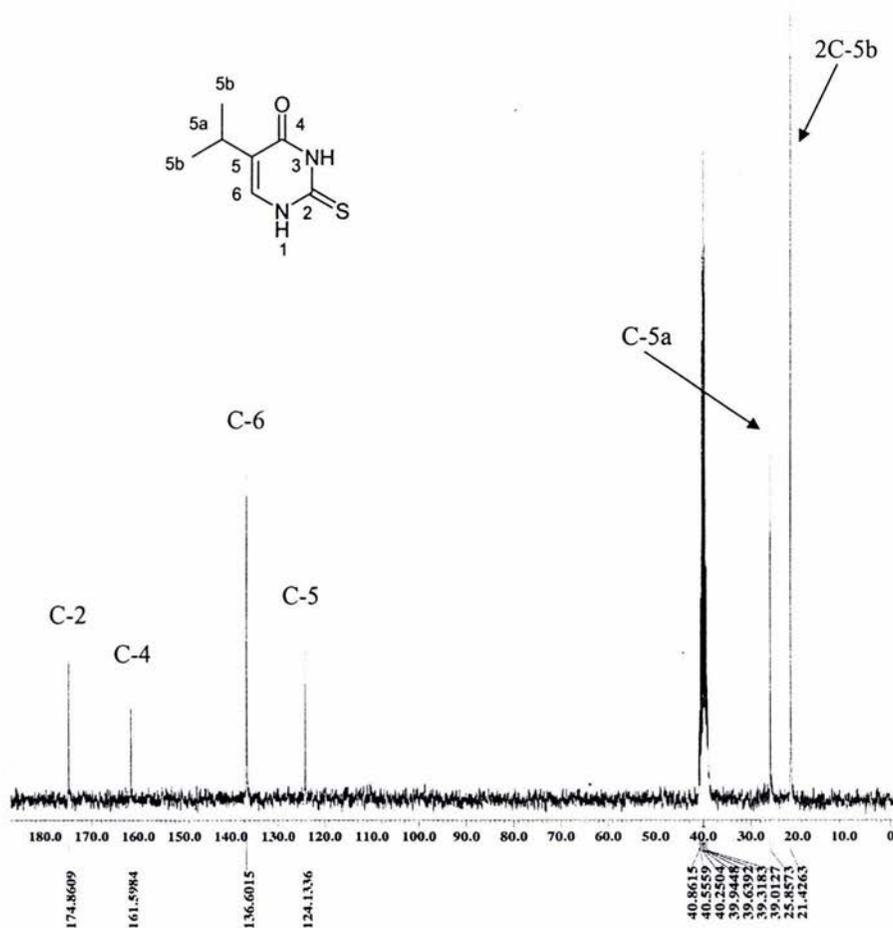


Figura 18. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para 5-isopropil-2-tioxouracilo (67.5 MHz, DMSO).

La obtención del espectro HETCOR (Figura 19) permitió la asignación inequívoca de las señales de carbono-13.

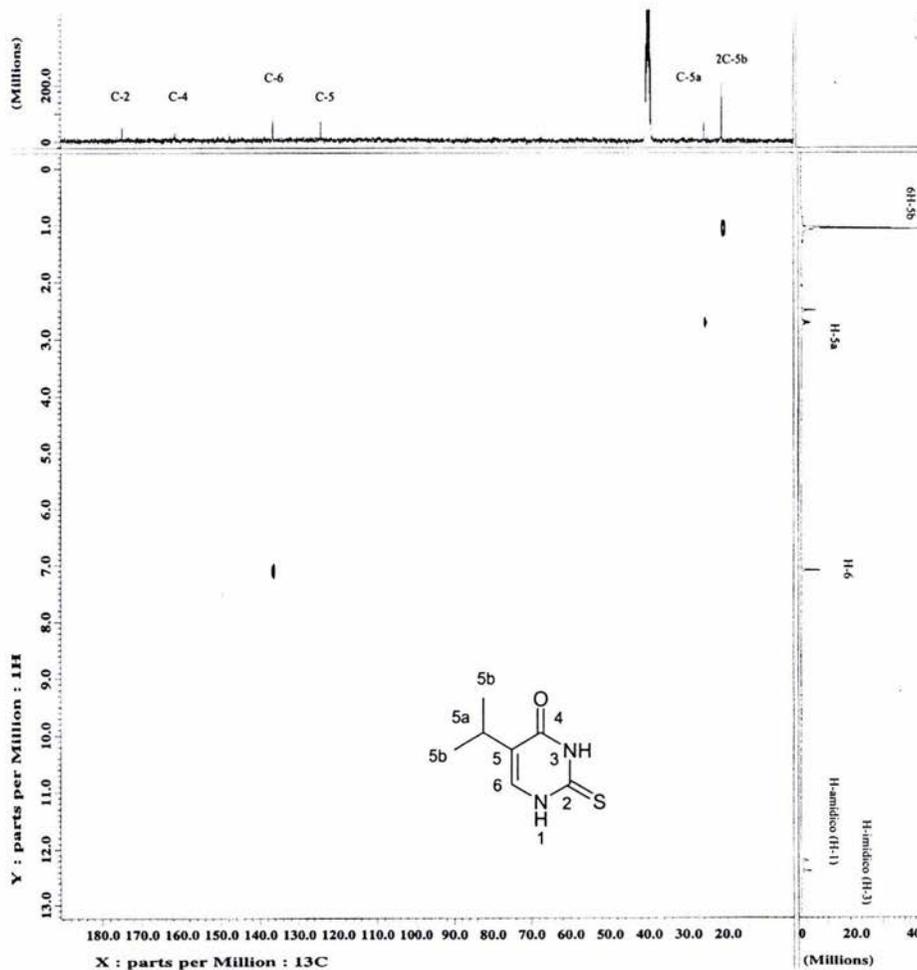


Figura 19. Espectro HETCOR  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN para 5-isopropil-2-tioxouracilo (270 MHz, DMSO).

La obtención del espectro de masas (Figura 20) por impacto electrónico confirmó la estructura asignada al compuesto 6,  $m/z$  170 ( $M^+$ ).

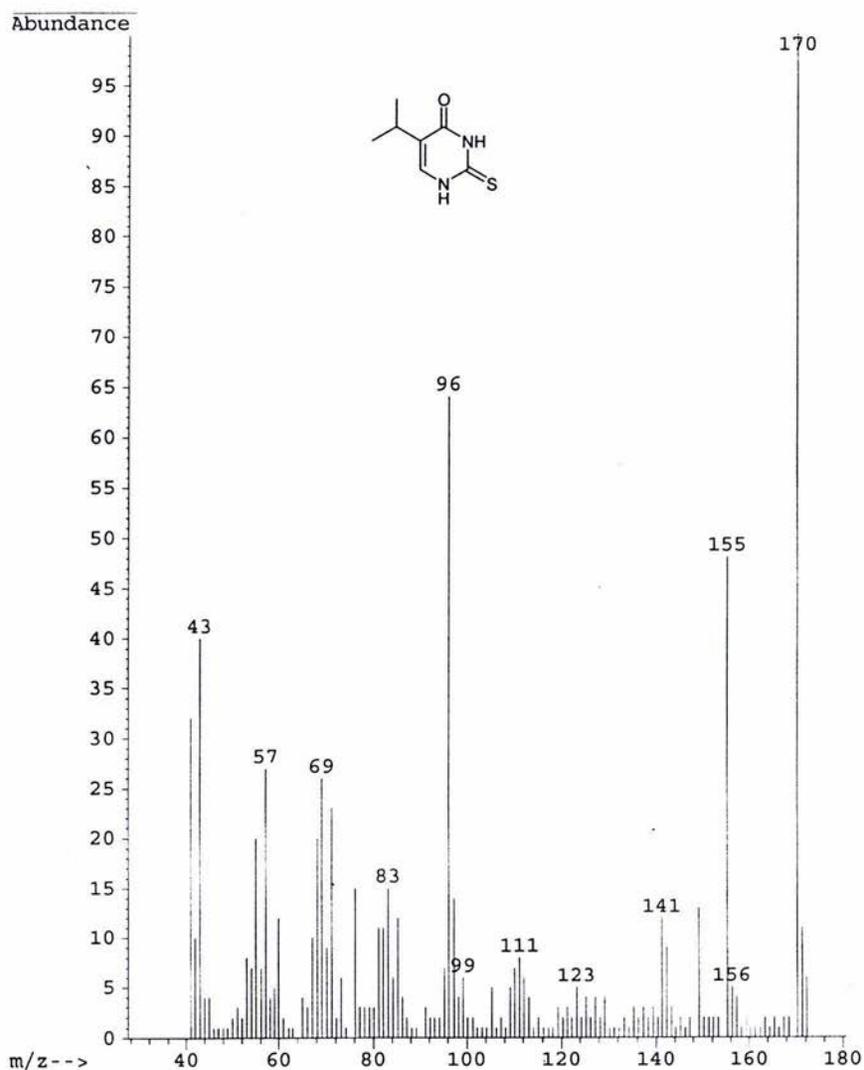
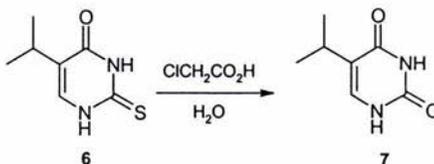


Figura 20. Espectro de masas para 5-isopropil-2-tioxouracilo.

La obtención del compuesto 7, 5-Isopropiluracilo, se logró mediante el intercambio del átomo de azufre por oxígeno por hidrólisis de 6 con ácido cloroacético en agua a reflujo.



El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se muestra en la figura 21 del cual se puede apreciar que no existe gran diferencia entre los espectros de hidrógeno para los compuestos 6 y 7. Se observa una señal doble en 1.04 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz para los seis hidrógenos metílicos del sustituyente isopropilo, una señal séptuple en 2.68 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz, para el hidrógeno del metino del mismo isopropilo, una señal doble en 7.05 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz, para el hidrógeno en posición seis de anillo de pirimidina y dos señales anchas en 10.62 y 10.97 ppm para los hidrógenos sobre los átomos de nitrógeno.

Al observar la señal alrededor de 7 ppm se observa que presenta una multiplicidad de doblete para los compuestos 6 y 7, lo cual no es muy claro porque ese hidrógeno se ubica en la posición seis del anillo de pirimidina y en posición cinco se tiene un carbono vinílico cuaternario, es decir, no existe algún hidrógeno a tres enlace con el cual pueda acoplarse. Lo anterior se demuestra si se comparan los espectros de hidrógeno del uracilo con el de la base pirimidínica llamada timina (5-metiluracilo); el primero muestra para el hidrógeno en cuestión una señal doble en 7.4 ppm, con una constante de acoplamiento de 8.4 Hz y la timina muestra, para ese hidrógeno, un desplazamiento químico de 7.1 ppm pero la señal es un singlete.

Para aclarar la razón por la cual ese hidrógeno da un acoplamiento se recurrió a la técnica espectroscópica en RMN de correlación homonuclear, COSY (Correlation Spectroscopy), entre  $^1\text{H}$  y  $^1\text{H}$ , ver Figura 22, con lo cual se encontró que la multiplicidad de la señal se debe al acoplamiento del hidrógeno seis con el hidrógeno amídico de la base.

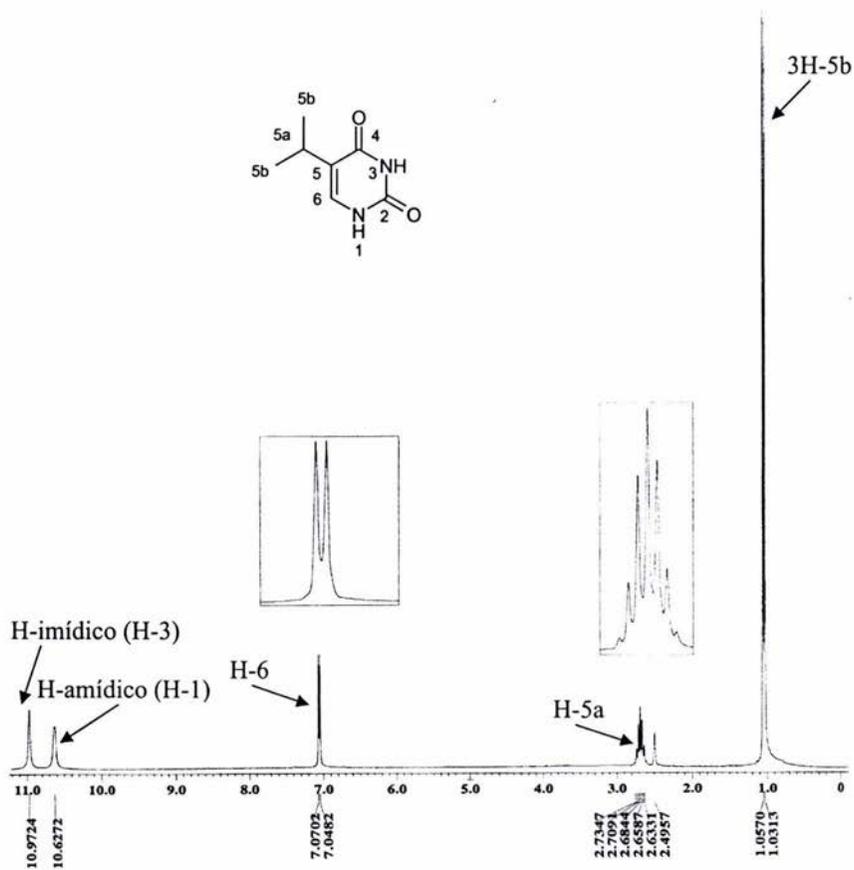


Figura 21. Espectro de <sup>1</sup>H RMN para 5-isopropiluracilo (270 MHz, DMSO).

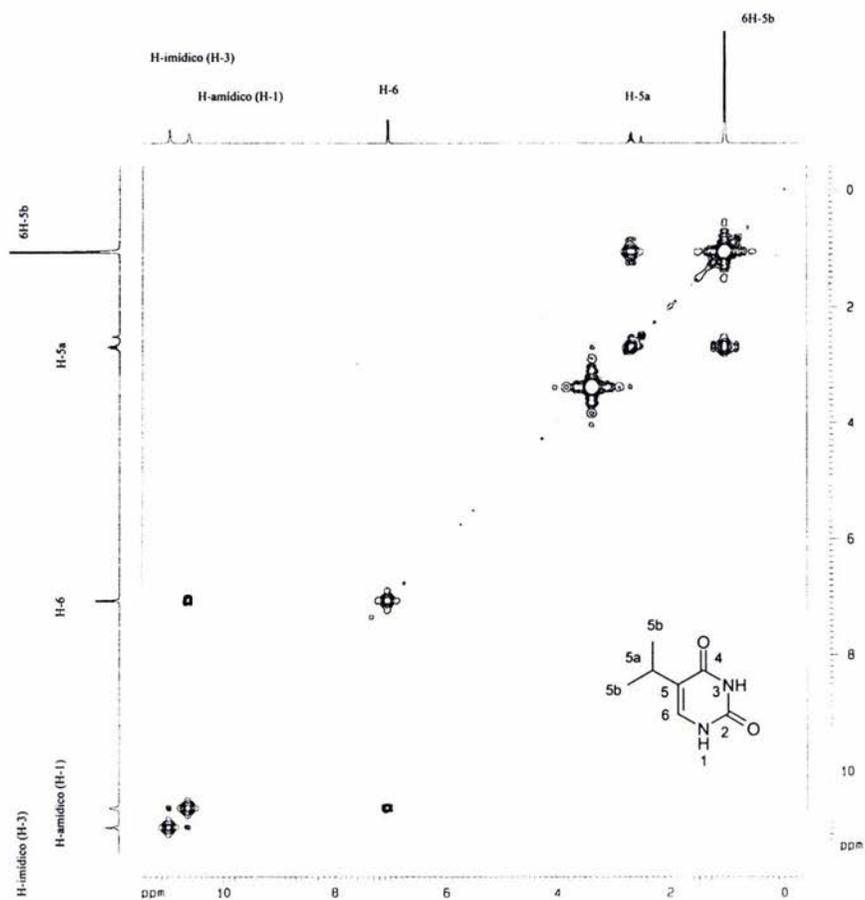


Figura 22. Espectro COSY para 5-isopropiluracilo (300 MHz, DMSO).

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 23) se percibe diferencia entre los desplazamientos químicos del carbonilo de la tiocetona **6** y este compuesto. La asignación de las señales son: una señal en 21.9 ppm para los carbonos metílicos del sustituyente isopropilo, una señal en 25.6 ppm para el metino del grupo isopropilo, una señal en 118.4 ppm para el carbono cuaternario del anillo de pirimidina, una señal a 136.4 ppm para el metino del anillo, una señal para el carbonilo, que en **6** soportaba al azufre, en 151.7 ppm y finalmente el otro carbonilo en 164.6 ppm.

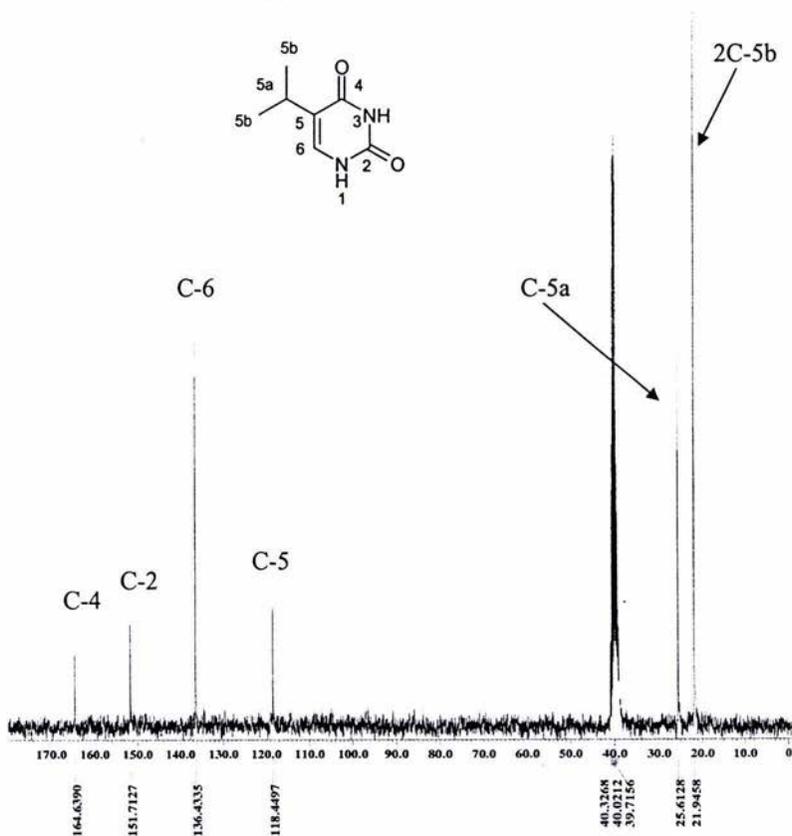


Figura 23. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para 5-isopropiluracilo (67.5 MHz, DMSO).

De la misma forma que para el compuesto 6 la obtención del espectro de masas (Figura 24) confirmó la obtención de 7,  $m/z$  154 ( $M^+$ ).

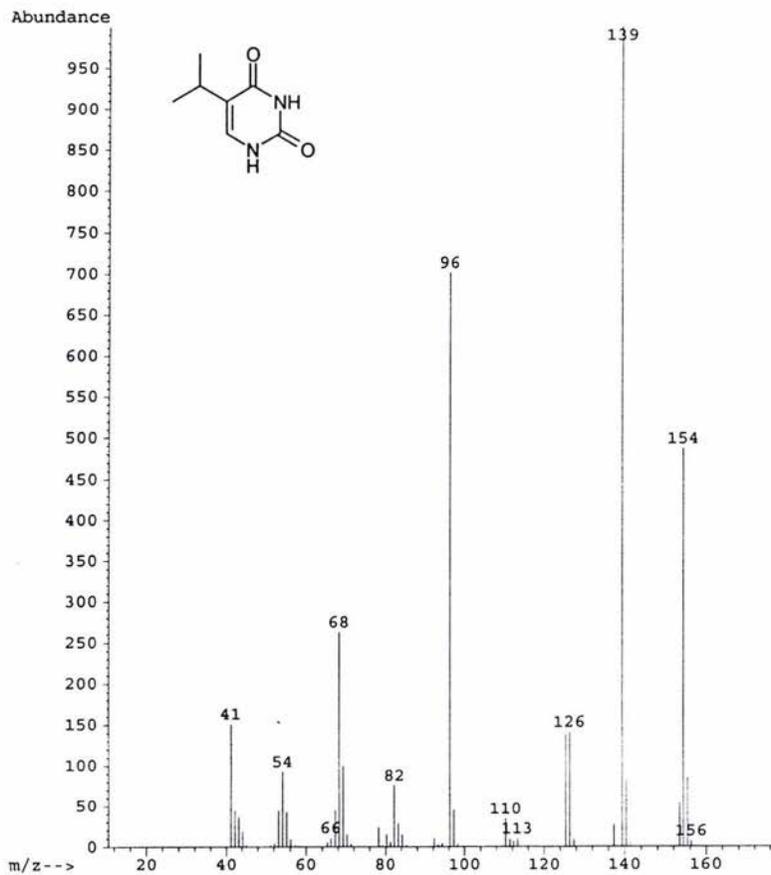


Figura 24. Espectro de masas para 5-isopropiluracilo.

#### 4. Síntesis de 5-yodouracilo (esquema V).

La síntesis del compuesto **8** (5-Yodouracilo) se llevó a cabo por yodación del uracilo con yodo molecular en presencia de ácido nítrico.

En este caso, el ácido nítrico funciona como un agente oxidante dada la reacción de la Figura 25.



Figura 25. Reacción de oxidación del yodo con ácido nítrico.

Una vez formado el ión yodonio, éste funge como electrófilo y dado que el doble enlace de la base pirimidínica es nucleofílico se forma el intermediario que contiene al ión yodonio cíclico (carbocación no clásico) mostrado en la Figura 26.

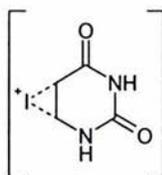


Figura 26. Intermediario cíclico para la yodación del uracilo.

El ataque nucleofílico del par electrónico del nitrógeno amidico en el intermediario que se muestra en la Figura 26, seguido por una reacción de eliminación permite la obtención de **8**.

En la figura 27 se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para 5-yodouracilo el cual presenta una señal en 7.88 ppm para el hidrógeno de la posición seis del anillo de pirimidina y las dos señales para los hidrógenos sobre átomos de nitrógeno, en 11.16 y 11.40 ppm.

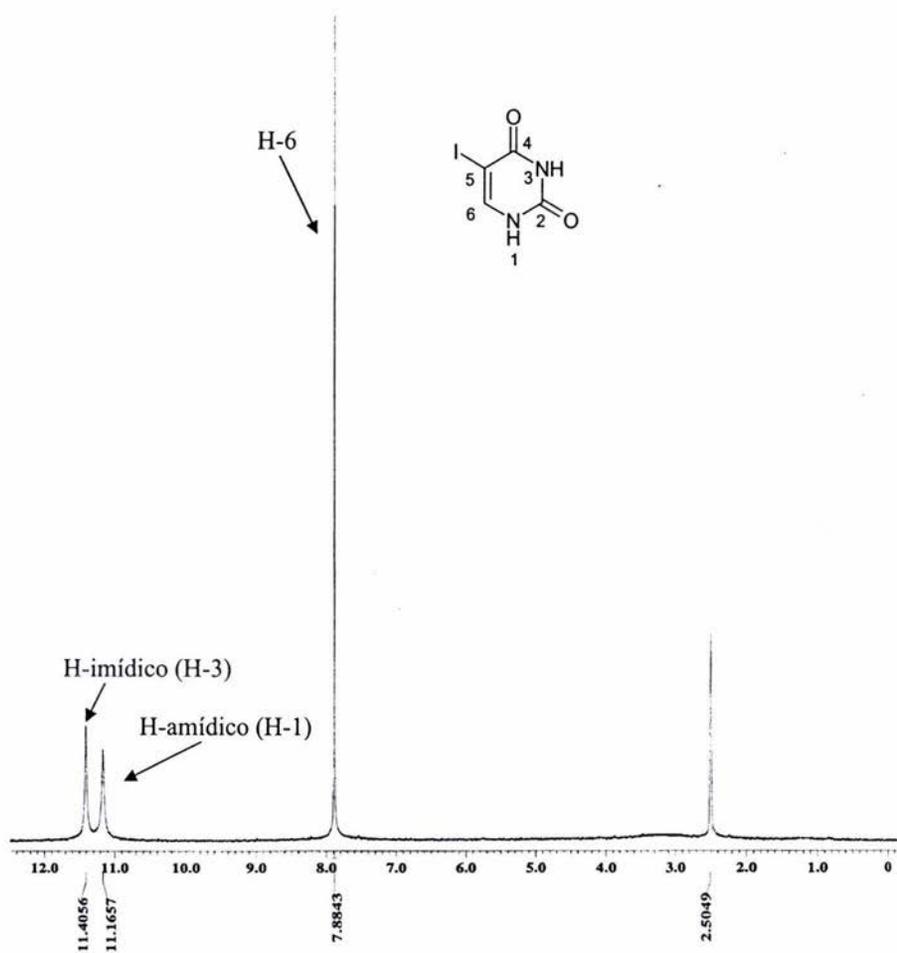


Figura 27. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN para 5-yodouracilo (270 MHz, DMSO).

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 28) se observan las señales para tres carbonos de la molécula: una señal en 147.5 ppm para el carbono seis del anillo de pirimidina y las dos señales para los dos grupos carbonilos de la molécula, uno en 151.8 ppm y el otro en 162.0 ppm. El carbono vinílico cuaternario no se observó.

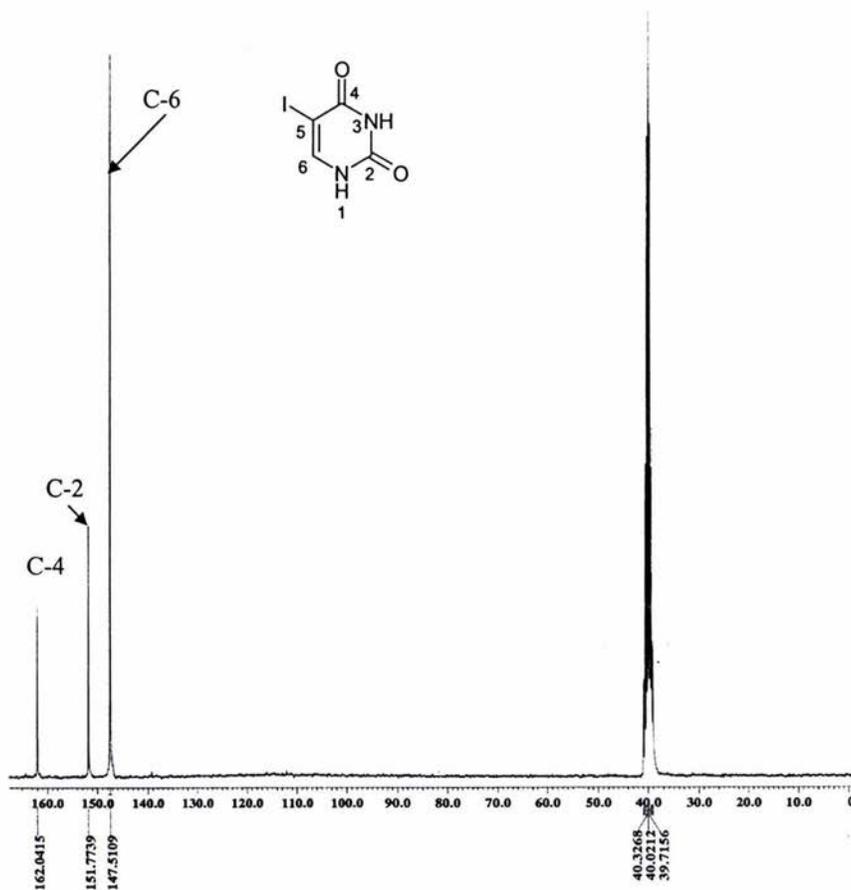


Figura 28. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para 5-yodouracilo (67.5 MHz, DMSO).

La obtención de este compuesto se corroboró con la obtención del espectro de masas por impacto electrónico (Figura 29) ya que se observa un ión molecular de 238 ( $M^+$ ) y se observa una pérdida en el ión molecular de 127 que corresponde a la fragmentación y liberación de yodo.

Una vez obtenidas las tres bases nitrogenadas (6-8) se procedió a su acoplamiento con los compuesto 2 y 3 para obtener las series alifática y aromática, respectivamente, de los no análogos de nucleósidos.

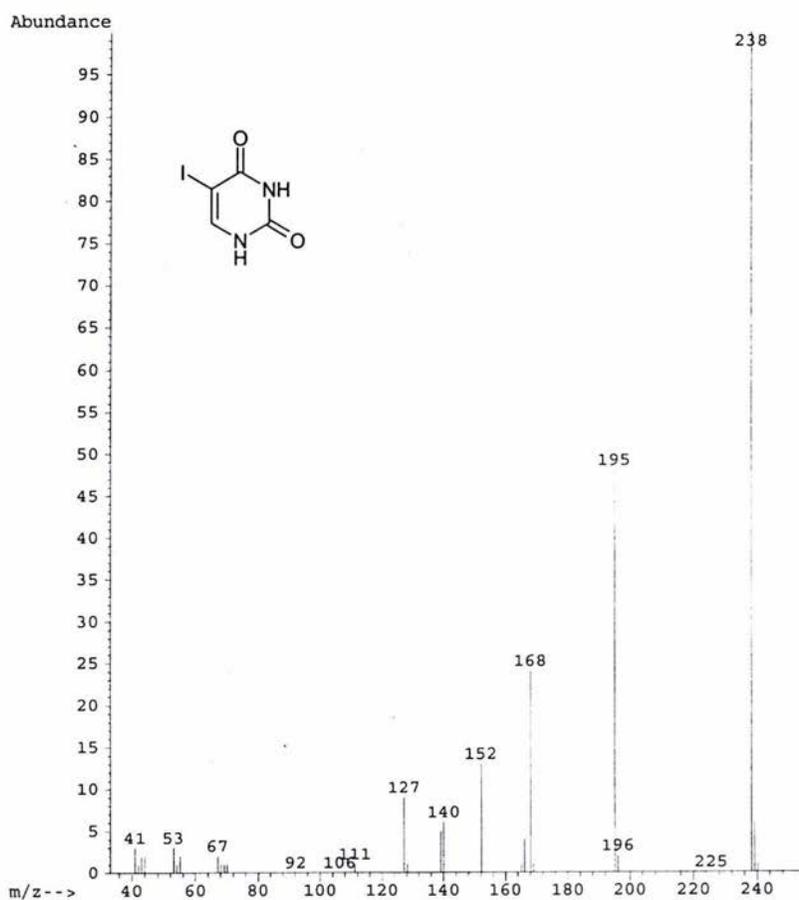


Figura 29. Espectro de masas para 5-yodouracilo.

## 5. Síntesis de inhibidores no análogos de nucleósidos (esquema VI).

La obtención de los compuestos finales (9-13) se logró a través del acoplamiento de 2 ó 3 con la base nitrogenada correspondiente (6, 7 ó 8).

El acoplamiento entre el 3,3-dietoxipropanoato de etilo o el 3,3-dibenciloxipropanoato de etilo con las bases nitrogenadas se llevó a cabo bajo condiciones de Vorbrüggen<sup>29, 30</sup>. Previo a esta reacción es necesario sililar la base nitrogenada para funcionalizarla y así lograr que ésta sea más nucleofílica y además que sea soluble en el disolvente utilizado en esta reacción (1,2-dicloroetano).

La reacción de funcionalización de la base nitrogenada se llevó a cabo calentando a reflujo por 5 horas la base con un exceso de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS), en presencia de cloruro de trimetilsilano. El mecanismo general de reacción propuesto se muestra en la Figura 30.

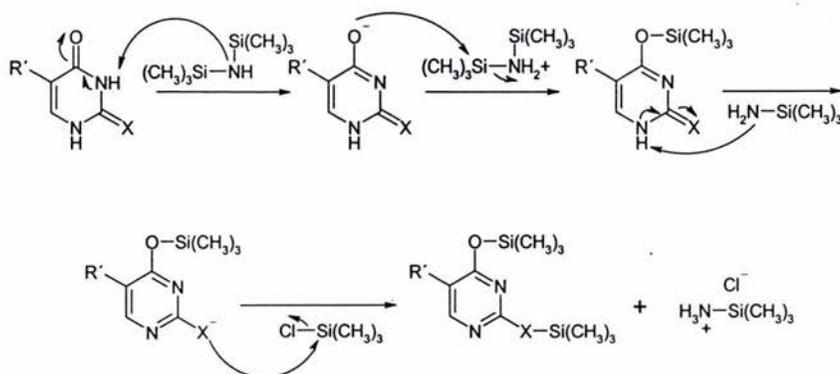


Figura 30. Mecanismo de reacción propuesto para la sililación de las bases nitrogenadas.

El exceso de HMDS se adiciona para que éste mismo funcione como disolvente, cabe señalar aquí que la base nitrogenada es insoluble en HMDS y cuando ésta se silila se solubiliza en HMDS. Además es importante mencionar que la base sililada es muy sensible a la humedad por lo que hay que mantener la reacción bajo condiciones anhidras, sellando

muy bien todas las posibles entradas de humedad. El exceso de HMDS se eliminó aplicando vacío y un ligero calentamiento (40 °C).

Para la obtención de los compuestos **9-13** se llevó a cabo la reacción de sustitución nucleofílica de uno de los grupos alcoxi de los compuestos **2** ó **3** por la base pirimidínica correspondiente, utilizando trifluorometansulfonato de trimetilsililo como catalizador (condiciones de Vorbrüggen), a temperatura ambiente. El mecanismo general de reacción propuesto se muestra en la Figura 31. Cabe señalar que las bases sililadas fueron utilizadas *in situ* en esta reacción.

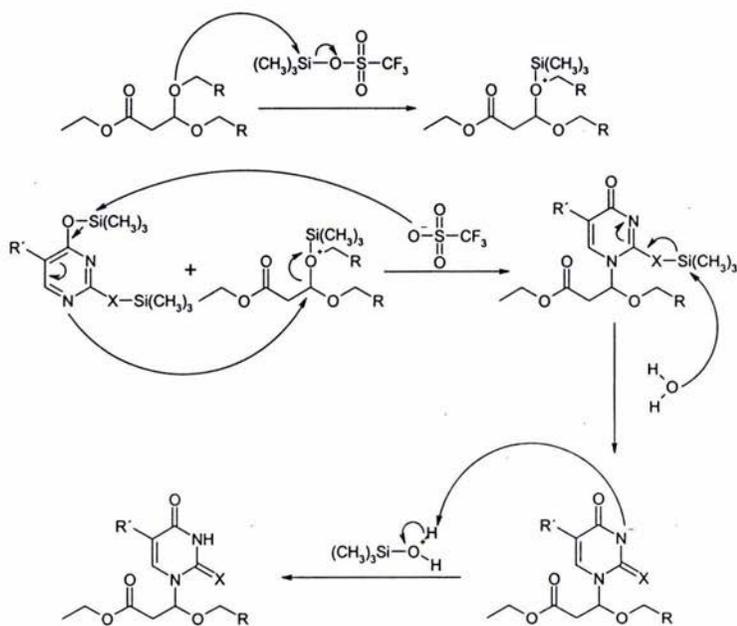
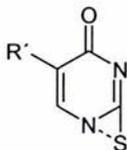


Figura 31. Mecanismo de reacción propuesto para la sustitución nucleofílica del grupo alcoxi por la base nitrogenada.

El tipo de sustitución propuesto para esta reacción es bimolecular dado que las condiciones de reacción establecidas (no polares) no permiten la formación de un carbocatión que pueda ser estable. Otro argumento para sostener esta propuesta es que la obtención del compuesto en el cual estaría acoplado el 3,3-dibenciloxipropanoato de etilo con el 5-isopropil-2-tioxouracilo no se logró. Esto probablemente se deba a que el átomo de

azufre es más polarizable que el átomo de oxígeno y eso disminuya la nucleofiliidad del nitrógeno que actúa como nucleófilo, formándose un episulfuro como el que se muestra a continuación.



Por otro lado, el átomo de azufre es considerablemente más grande que el átomo de oxígeno, aunado a que el sustrato tiene dos anillos aromáticos, lo que hace que exista una interacción estérica que no favorece al estado de transición bimolecular ya que el nitrógeno de la base no puede acercarse lo suficiente para reaccionar con el sustrato. Estos hechos sustentan la propuesta del mecanismo bimolecular.

En la Tabla 1 se muestran los rendimientos, el tiempo de reacción y el estado de agregación de los compuestos 9-13.

Tabla 1. Tiempo de reacción, rendimiento y estado físico de los compuestos 9-13.

Compuesto	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)	Estado físico
9	72	85.4	Sólido
10	70	93.2	Aceite
11	55	90.6	Aceite
12	46	96.3	Sólido
13	36	83.8	Sólido

Como se observa en la Tabla 1 los rendimientos en general son buenos, aunque el tiempo de reacción es muy largo. Tratando de reducir el tiempo, se hicieron estudios de la reacción variando la temperatura. Se encontró que a una temperatura de  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  la reacción no procede, de hecho ésta comienza cuando se alcanza la temperatura ambiente. Cuando se calienta la reacción a una temperatura mayor  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  predomina el producto de eliminación (compuesto  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado) sobre el producto de sustitución nucleofílica. Estos dos productos coexisten en la reacción ya que el producto colateral de eliminación se ve favorecido al incrementar la temperatura. Debido a este problema, se decidió llevar a cabo

---

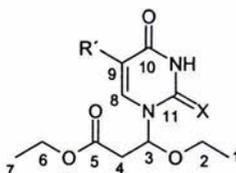
---

las reacciones a temperatura ambiente aunque los tiempos de reacción fueran largos. Para determinar el tiempo óptimo de reacción cada una de ellas fueron monitoreadas por RMN de  $^1\text{H}$  dado que los  $R_f$  de los compuestos (9-13) son muy similares a los de la materia prima y no se alcanza a diferenciar por medio de cromatografía en capa fina.

La purificación de los compuestos se realizó, para el caso de los compuestos sólidos, por cristalización con cloruro de metileno-hexano. Para el caso de los compuestos aceitosos se intentó recrystalizarlos sin éxito, por lo que después de la evaporación de los disolventes, los compuestos quedaron en forma de aceite.

a. Serie alifática.

Los datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  (los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y HETCOR  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  se exponen en el apéndice de esta tesis) se enlistan en la Tabla 2. Se muestran los desplazamientos químicos ( $\delta$ ), en ppm, la multiplicidad de las señales entre paréntesis -simple (s), doble (d), doble de dobles (dd), triple (t), cuádruple (q), séptuple (st), múltiple (m)- y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz.



9.  $\text{R}' = i\text{-Pr}$ ,  $\text{X} = \text{S}$   
 10.  $\text{R}' = i\text{-Pr}$ ,  $\text{X} = \text{O}$   
 12.  $\text{R}' = \text{I}$ ,  $\text{X} = \text{O}$

Tabla 2. Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN para los compuestos de la serie alifática en  $\text{CDCl}_3$  y con TMS como estándar interno.

Compuesto	H1	H2	H3	H4a	H4b	H6	H7	H8	R'	NH
9	$\delta$ 1.22 (t)	$\delta$ 3.61 (q)	$\delta$ 6.74 (dd)	$\delta$ 2.71 (dd)		$\delta$ 4.21	$\delta$ 1.28 (t)	$\delta$ 7.31		9.42
	$^2\text{J} = 7$	$^3\text{J} = 7$	$^3\text{J}_{3-4b} = 3.66$ $^3\text{J}_{3-4a} = 8.78$	$^3\text{J}_{4a-3} = 8.78$ $^3\text{J}_{gem} = 15.37$	*	(q)	$^3\text{J} = 7$	(s)	**	(s)
10	$\delta$ 1.20 (t)	$\delta$ 3.52 (q)	$\delta$ 6.05 (dd)	$\delta$ 2.70 (dd)	$\delta$ 2.75 (dd)	$\delta$ 4.14	$\delta$ 1.24 (t)	$\delta$ 7.10		8.82
	$^2\text{J} = 7$	$^3\text{J} = 7$	$^3\text{J}_{3-4a} = 5.44$ $^3\text{J}_{3-4b} = 7.67$	$^3\text{J}_{4a-3} = 5.44$ $^3\text{J}_{gem} = 15.34$	$^3\text{J}_{4b-3} = 7.67$ $^3\text{J}_{gem} = 15.34$	(q)	$^3\text{J} = 7$	(s)	***	(s)
12	$\delta$ 1.21 (t)	$\delta$ 3.58 (q)	$\delta$ 6.01 (dd)	$\delta$ 2.72 (dd)	$\delta$ 2.77 (dd)	$\delta$ 4.17	$\delta$ 1.25 (t)	$\delta$ 7.79		9.46
	$^2\text{J} = 7$	$^3\text{J} = 7$	$^3\text{J}_{3-4a} = 5.12$ $^3\text{J}_{3-4b} = 7.32$	$^3\text{J}_{4a-3} = 5.12$ $^3\text{J}_{gem} = 15.37$	$^3\text{J}_{4b-3} = 7.32$ $^3\text{J}_{gem} = 15.37$	(q)	$^3\text{J} = 7$	(s)	—	(s)

\* La señal a  $\delta$  2.98 (m) para este hidrógeno diastereotópico se encuentra traslapada con el CH del isopropilo.

\*\* Los datos para el sustituyente isopropilo en este compuesto se presentan a continuación:  $\delta$  2.98 (m) para CH,  $\delta$  1.18 (d) para los  $2\text{CH}_3$  con  $^3\text{J} = 6$  Hz.

\*\*\* Los datos para el sustituyente isopropilo en este compuesto se presentan a continuación:  $\delta$  2.90 (st) para CH con  $^3\text{J} = 6$  Hz;  $\delta$  1.15 (d) para los  $2\text{CH}_3$  con  $^3\text{J} = 6$  Hz.

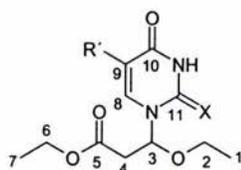
Analizando los datos de la Tabla 2 se pueden apreciar las diferencias entre el espectro del compuesto **2**, que es la materia prima (ver Figura 9), con los compuestos **9**, **10** y **12**, con los cuales el sustrato es el mismo, ahora ya con la base pirimidínica acoplada. En general las diferencias más significativas son: la señal que antes aparecía en 4.9 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz, la cual pertenece al hidrógeno metínico que soportaba al grupo acetal y que presentaba una multiplicidad triple, por estar acoplado al metileno adyacente (ubicado entre el grupo acetal y el éster); ahora se presenta en un desplazamiento químico a campo más bajo, en 6.01, 6.05 y 6.74 ppm para **12**, **10** y **9**, respectivamente, esto se debe al efecto de desprotección electrónica que ejerce la base pirimidínica en ese hidrógeno. También se observa cambio en la multiplicidad de esta señal, ya que para **9**, **10** y **12** se presenta como un doble de dobles, a causa de la pérdida de la simetría que existe en **2**. La otra diferencia significativa es que el metileno adyacente al metino da claramente una señal doble de dobles para cada hidrógeno del metileno, esto es porque el metino ahora es un centro de quiralidad y por lo tanto los hidrógenos del metileno contiguo son diasterotópicos. La señal ABM aparece como doble de dobles por el acoplamiento con el hidrógeno del metino y con el geminal. Cabe señalar que el desplazamiento químico de esos hidrógenos diasterotópicos no cambia significativamente con respecto al de la materia prima.

La existencia de las bases pirimidínicas en estos compuestos se puede garantizar por la presencia de las señales propias de la base las cuales son: la señal simple que aparece entre 7.1 y 7.8 ppm que es el hidrógeno de la posición seis del anillo de pirimidina, la señal ancha entre 8.8 y 9.5 ppm para el hidrógeno imídico. Además para los compuestos **9** y **10** están presentes las señales características para el grupo isopropilo.

Por otro lado, las señales para los metilos y metilenos del grupo funcional éster se conservan, tanto en desplazamiento químico como en multiplicidad (con constantes de acoplamiento iguales), en tanto que para las señales del ahora éter (antes acetal) la multiplicidad de los metilenos ahora se simplifica, ya que en la materia prima son dobles de cuartetos y ahora al existir sólo la mitad del grupo acetal, aparece sólo un cuarteto para los metilenos, sin embargo el desplazamiento químico se conserva. Por lo que respecta al

metilo de esta porción de la molécula, no presenta cambio alguno en desplazamiento químico, multiplicidad, ni en constante de acoplamiento.

Los datos espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  para estos compuestos (**9**, **10** y **12**) se enlistan en la Tabla 3. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ), se dan en ppm.



- 9.** R' = *i*-Pr, X = S  
**10.** R' = *i*-Pr, X = O  
**12.** R' = I, X = O

Tabla 3. Desplazamientos químicos ( $\delta$ ), en ppm, de RMN de  $^{13}\text{C}$  para los compuestos de la serie alifática en  $\text{CDCl}_3$  y con TMS como estándar interno.

Compuesto	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	R'
<b>9</b>	14.3	66.1	87.4	39.7	168.3	61.3	14.8	133.5	127.0	159.4	174.3	*
<b>10</b>	14.2	65.3	81.6	40.4	168.3	61.2	14.8	132.6	122.0	150.4	162.9	**
<b>12</b>	14.2	65.9	82.5	40.4	168.2	61.4	14.8	143.8	***	150.4	160.1	—

\*El desplazamiento químico para el sustituyente isopropilo en este compuesto se da a continuación: 26.3 para el CH, 21.30 para los  $2\text{CH}_3$ .

\*\* El desplazamiento químico para el sustituyente isopropilo en este compuesto se da a continuación: 25.9 para el CH, 21.7 para los  $2\text{CH}_3$ .

\*\*\*El desplazamiento químico para este carbono no se reporta porque la señal no aparece en el espectro de  $^{13}\text{C}$ , para explicación ver el texto

En la Tabla 3 se puede observar, con respecto a la materia prima (ver Figura 10), que la parte del éster aun está presente ya que, en todos los casos, aparece la señal del carbonilo del éster, en alrededor de 168 ppm, además del metilo, en alrededor de 14.7 ppm, y el metileno en 61 ppm. También se observa que la parte del éter (antes acetal) se conserva ya que aparecen las señales asignadas al metilo y metileno, en alrededor de 14.2 y 66 ppm, respectivamente. La señal más característica para manifestar que la base pirimidínica está acoplada a la materia prima es la del metino (C3), la cual cuando es soporte del acetal, en la materia prima, muestra un desplazamiento químico de aproximadamente 100 ppm y una vez que la base se ha unido la señal se desplaza hacia campo más alto, entre 81 y 87 ppm.

De la misma manera, la existencia de las bases pirimidínicas en estos compuestos se puede garantizar por la presencia de las señales propias de la base: las señales extras en la zona de carbonos con hibridación  $sp^2$  debidas a los grupos carbonilos de la molécula, las cuales no están presentes en la materia prima. Cabe mencionar que la señal esperada para el carbono cuaternario vinílico (C9) en **12** no aparece en el espectro, esto tal vez se debe a que el tiempo de relajación de este carbono es muy lento dado que es un carbono cuaternario y además soporta a un átomo muy grande y pesado, el yodo. Sin embargo, la estructura de **12** se confirmó por difracción de rayos X (ver apéndice). Adicionalmente los compuestos **9** y **10** presentan dos señales extras en la zona de carbonos con hibridación  $sp^3$  asignadas al grupo isopropilo.

### b. Serie aromática.

El análisis espectroscópico se llevó a cabo de la misma manera que para los compuestos alifáticos. Los datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  (los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y HETCOR  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  se exponen en el apéndice de esta tesis) se enlistan en la Tabla 4. Se muestran los desplazamientos químicos ( $\delta$ ), en ppm, la multiplicidad de las señales entre paréntesis -simple (s), doble (d), doble de dobles (dd), triple (t), cuarteto (q), séptuple (st), múltiple (m)- y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz.

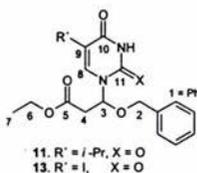


Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  para los compuestos de la serie aromática en  $\text{CDCl}_3$  y con TMS como estándar interno.

Compuesto	H1	H2a	H2b	H3	H4a	H4b	H6	H7	H8	R	NH
11	5 7.32 (m)	5 4.52 (d)	5 4.63 (d)	5 6.22 (dd)	5 2.74 (dd)		5 4.15 (q)	5 1.31 (t)	5 7.07		8.32 (s)
		$^3J = 12$	$^3J = 12$	$^3J_{2a,3} = 5.12$ $^3J_{2b,3} = 8.05$	$^3J_{4a,5} = 5.12$ $^3J_{4b,5} = 15.37$	*	$^3J = 7$	$^3J = 7$	(s)	**	
13	5 7.32 (m)	5 4.55 (d)	5 4.68 (d)	5 6.15 (dd)	5 2.73 (dd)	5 2.83 (dd)	5 4.18 (q)	5 1.24 (t)	5 7.70		8.74
		$^3J = 12$	$^3J = 12$	$^3J_{2a,3} = 5.12$ $^3J_{2b,3} = 7.32$	$^3J_{4a,5} = 5.12$ $^3J_{4b,5} = 15.37$	$^3J_{4b,5} = 7.32$	$^3J = 7$	$^3J = 7$	(s)	—	(s)

\* La señal  $\delta$  2.98 (m) para este hidrógeno diastereotópico aparece traslapada con el CH del isopropilo.

\*\* Los datos para el sustituyente isopropilo en este compuesto se presentan a continuación:  $\delta$  2.86 (st) para  $\text{CH}_3$ ,  $\delta$  1.23 (d) para los  $2\text{CH}_2$ .

Analizando los datos de la Tabla 4 de la misma manera que para los compuestos alifáticos de la Tabla 2, se pueden apreciar las diferencias entre el espectro del compuesto **3**, que es la materia prima (ver Figura 12), y para ese mismo compuesto pero ahora ya con la base pirimidínica acoplada. En general las diferencias más significativas son: la señal que antes aparecía en 5.26 ppm, con una constante de acoplamiento de 6 Hz, la cual estaba asignada al hidrógeno metínico que soportaba al grupo acetal, presentaba una multiplicidad triple, por estar acoplado al metileno adyacente (ubicado entre el grupo acetal y el éster); ahora esa señal muestra un desplazamiento químico a campo más bajo, aproximadamente en 6.2 ppm, para ambos compuestos, esto es debido al efecto de desprotección electrónica que ejerce la base pirimidínica a ese hidrógeno. También se observa cambio en la multiplicidad de esta señal, ahora se presenta como un doble de dobles, a causa de la pérdida de la simetría en los compuestos finales. La otra diferencia significativa es que el metileno adyacente al metino arriba citado da una señal doble de dobles, esto es porque el metino ahora es un centro de quiralidad y por lo tanto los hidrógenos del metileno contiguo ahora son diasterotópicos. El acoplamiento es con el hidrógeno del metino y con el geminal. Cabe señalar que el desplazamiento químico de esos hidrógenos diasterotópicos no cambia significativamente con respecto al de la materia prima.

La existencia de las bases pirimidínicas en estos compuestos se puede garantizar por la presencia de las señales propias de la base las cuales son: la señal simple que aparece entre 7.0 y 7.7 ppm que es el hidrógeno de la posición seis del anillo de pirimidina, la señal ancha entre 8.3 y 8.8 ppm para el hidrógeno imídico. Además para el compuesto **11** están presentes las señales características para un grupo isopropilo.

Por otro lado, las señales para los metilos y metilenos del grupo funcional éster se conservan, tanto en desplazamiento químico, como en constantes de acoplamiento (multiplicidad). Lo mismo sucede para las señales del ahora éter (antes acetal), se conservan tanto en desplazamiento como en constantes de acoplamiento. Estas señales como las de los hidrógenos aromáticos, únicamente cambian en las integrales que son del doble para la materia prima en comparación con **11** y **13**.

Los datos espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  para estos compuestos aromáticos se enlistan en la Tabla 5. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ), se dan en ppm.

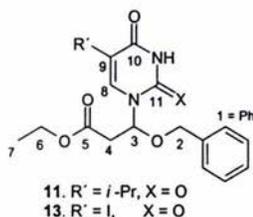


Tabla 5. Desplazamientos químicos ( $\delta$ ), en ppm, de  $^{13}\text{C}$  RMN para los compuestos de la serie aromática en  $\text{CDCl}_3$  y con TMS como estándar interno.

Compuesto	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	Ph	R'
11	72.4	81.8	40.4	168.2	61.3	14.2	132.9	121.9	150.1	162.6	<i>i</i> = 136.0	*
											<i>o</i> = 127.9	
											<i>m</i> = 128.7	
											<i>p</i> = 128.6	
											<i>i</i> = 135.6	
13	73.0	82.5	40.4	168.0	61.4	14.2	143.9	**	150.0	159.6	<i>o</i> = 128.4	—
											<i>m</i> = 128.8	
											<i>p</i> = 128.8	

\*El desplazamiento químico para el sustituyente isopropilo en este compuesto se da a continuación: 26.0 para el CH, 21.6 para los  $2\text{CH}_3$ .

\*\* El desplazamiento químico para este carbono no se reporta porque la señal no aparece en el espectro de  $^{13}\text{C}$ , para explicación ver el texto.

En la Tabla 5 se puede observar que la parte del éster está presente ya que, en todos los casos, aparece la señal del carbonilo del éster, en alrededor de 168 ppm, además del metilo, en alrededor de 14.2 ppm, y el metileno en 61.4 ppm. También se observa que la parte del éter (antes acetal) se conserva ya que aparecen las señales asignadas al metileno, 73 ppm, y también se observan los carbonos aromáticos (*ipso*, *orto*, *meta* y *para*). La señal más característica para manifestar que la base pirimidínica está acoplada a la materia prima es la del metino (C2), la cual cuando es soporte del acetal, en la materia prima, muestra un

desplazamiento químico de aproximadamente 100 ppm y una vez que la base se ha unido a la señal se desplaza hacia campo más alto, aproximadamente a 82 ppm.

De igual forma, la existencia de las bases pirimidínicas en estos compuestos se puede garantizar por la presencia de las señales propias de la base: las señales extras en la zona de carbonos  $sp^2$  debidas a los grupos carbonilos de la molécula, las cuales no están presentes en la materia prima, cabe mencionar que la señal esperada para el carbono cuaternario vinílico (C8) en **13** no aparece en el espectro, esto tal vez se debe, como en el compuesto alifático correspondiente, a que el tiempo de relajación de este carbono es muy lento dado que es un carbono cuaternario y además soporta a un átomo muy grande y pesado, el yodo. Adicionalmente el compuesto **11** presenta dos señales extras en la zona de carbonos  $sp^3$  asignadas para el grupo isopropilo.

Para ratificar la obtención de los compuestos **9-13** se obtuvieron los espectros de masas correspondientes (Tabla 6). En todos ellos se observó el ión molecular esperado.

Tabla 6. Datos de espectrometría de masas para los compuestos **9-13**.

Compuesto		m/z			
<b>9</b>	314 [M <sup>+</sup> ]	170	145	71	43
<b>10</b>	298 [M <sup>+</sup> ]	154	145	71	43
<b>11</b>	361 [M <sup>+</sup> + H]	153	91	—	—
<b>12</b>	382 [M <sup>+</sup> ]	238	154	71	43
<b>13</b>	444 [M <sup>+</sup> ]	238	91	—	—

## B. Ensayos antirretrovirales *in vitro*.

La segunda parte de este trabajo se encauzó a la evaluación de la actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados, denominados inhibidores no análogos de nucleósidos, compuestos 9-13, con respecto a la TI del VIH.

Este ensayo, *in vitro*, sobre la cuantificación de la actividad inhibitoria, se efectuó haciendo uso del kit denominado *Lenti-RT<sup>TM</sup> activity assay*. Este kit tiene la ventaja de que es un método no radiactivo y con alta sensibilidad para medir la actividad de la TI.

El procedimiento para la cuantificación de la actividad de la TI se ilustra en la Figura 32, éste consiste en dos pasos: la reacción de la TI y la cuantificación del producto.

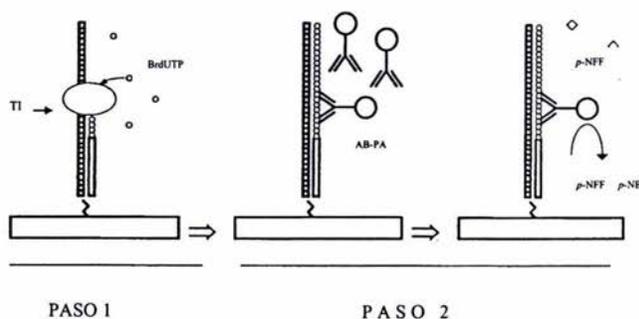


Figura 32. Representación esquemática del procedimiento para la cuantificación de la actividad de la TI del VIH

La TI en la muestra sintetiza una cadena de ADN a partir de una cadena molde y de un “primer” inmovilizado. Entonces se adiciona Bromodesoxiuridinatrifosfato (BrdUTP) a la mezcla de reacción, por lo cual la cadena sintetizada lleva incorporados nucleótidos de Bromodesoxiuridinamonofosfato (BrdUMP).

El nucleótido BrdUMP incorporado se puede cuantificar con un producto trazador para la TI (el nucleósido Bromodesoxiuridina –BrdU– unido a un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina), AB-PA en la Figura 32.

La actividad de la fosfatasa (el trazador) se mide al adicionar un sustrato para esa enzima, el *p*-nitrofenil fosfato (*p*-NFF), a la mezcla de reacción. Al ser hidrolizado el *p*-NFF, se desarrolla color por lo cual, es posible realizar la cuantificación espectrofotométricamente en la región visible del espectro electromagnético, a 405 nm. La actividad de la fosfatasa es entonces proporcional a la actividad de la TI.

Lo anteriormente descrito se utiliza para la cuantificación de la actividad de la TI. En este caso, para determinar el efecto de los compuestos sintetizados, éstos fueron adicionados a la mezcla de reacción en el primer paso de la reacción con la TI. Con esto se determina la inhibición de la función enzimática (al inhibir la incorporación de BrdUTP). Como referencia se utilizó el fármaco denominado nevirapina (un inhibidor no análogo de nucleósido), el cual es utilizado en la terapia combinada para el tratamiento del SIDA.

En la Tabla 7 se muestra los resultados de las absorbancias de tres determinaciones, obtenidas para el fármaco nevirapina. Estos datos están corregidos con respecto a un blanco de reactivos el cual dio una lectura de 0.0062 unidades de absorbancia.

Tabla 7. Lectura de absorbancia para la actividad enzimática de la TI a diferentes concentraciones de nevirapina.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Absorbancias		
1000.00	0.0165	0.0161	0.0163
100.00	0.0539	0.0530	0.0530
10.00	0.2049	0.2047	0.2048
1.00	0.6212	0.6214	0.6213
0.10	1.1620	1.1616	1.1618
0.01	1.2925	1.2930	1.2929

La lectura de absorbancia para el caso en el cual la actividad enzimática es 100 %, es decir la reacción de la TI en la cual no se adicionó ningún tipo de inhibidor es en promedio de 1.456 unidades, así, tomando este valor como 100 % de actividad se calculó el porcentaje de actividad de la enzima a cada concentración de nevirapina (Tabla 8). La gráfica de la actividad enzimática vs concentración se muestra en la Figura 32.

Tabla 8. Datos de actividad enzimática de la TI a diferentes concentraciones de nevirapina.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Actividad enzimática (%)		
1000.00	1.1381	1.1105	1.1243
100.00	3.7177	3.6557	3.6557
10.00	14.1330	14.1192	14.1261
1.00	42.8473	42.8611	42.8542
0.10	80.1490	80.1214	80.1352
0.01	89.1502	89.1847	89.1778

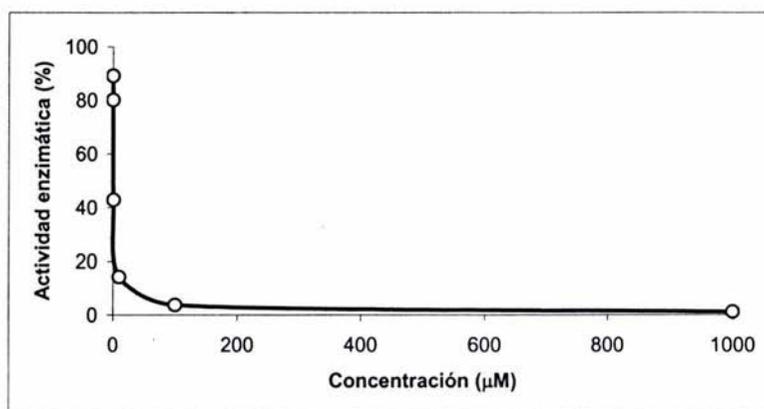


Figura 32. Gráfica de actividad enzimática de la TI a diferentes concentraciones de nevirapina.

Para obtener los resultados del porcentaje de inhibición, los resultados del porcentaje de actividad fueron restados de 100 %, ya que la suma del porcentaje de actividad enzimática más el porcentaje de inhibición son iguales al 100 %. Así, se obtuvieron los datos de la Tabla 9 y con esos resultados se obtuvo la gráfica de inhibición enzimática vs concentración (Figura 33).

Tabla 9. Datos de inhibición enzimática de la TI a diferentes concentraciones de nevirapina.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Inhibición enzimática (%)		
1000.00	98.8619	98.8895	98.8757
100.00	96.2823	96.3443	96.3443
10.00	85.8670	85.8808	85.8739
1.00	57.1527	57.1389	57.1458
0.10	19.8510	19.8786	19.8648
0.01	10.8498	10.8153	10.8222

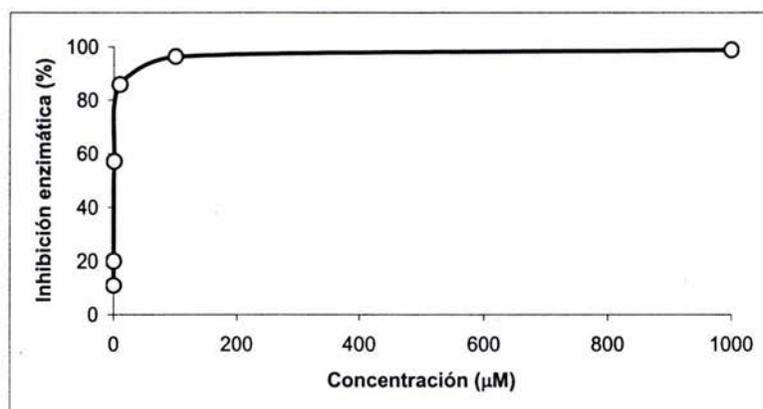


Figura 33. Gráfica de inhibición enzimática de la TI a diferentes concentraciones de nevirapina.

En la Figura 33 se puede apreciar la tendencia que este fármaco da a la inhibición de la actividad de la TI, dicha tendencia es de comportamiento logarítmico, por lo cual, para el cálculo de la concentración inhibitoria media,  $CI_{50}$ , (concentración de nevirapina a la cual se inhibe el 50 % de la actividad enzimática de la TI) se procedió a hacer una transformación logarítmica de la concecntración.

Para llevar a cabo este análisis, primero se obtuvieron los logaritmos naturales de la concentración, los cuales se muestran en la Tabla 10, con su respectivo valor de porcentaje

de inhibición enzimática. Con estos resultados se trazó la curva que se muestra en la Figura 34.

Tabla 10. Inhibición enzimática y logaritmos naturales para cada concentración de nevirapina.

Ln concentración ( $\mu\text{M}$ )	Inhibición enzimática (%)		
6.9078	98.8619	98.8895	98.8757
4.6052	96.2823	96.3443	96.3443
2.3026	85.8670	85.8808	85.8739
0.0000	57.1527	57.1389	57.1458
-2.3626	19.8510	19.8786	19.8648
-4.6052	10.8498	10.8153	10.8222

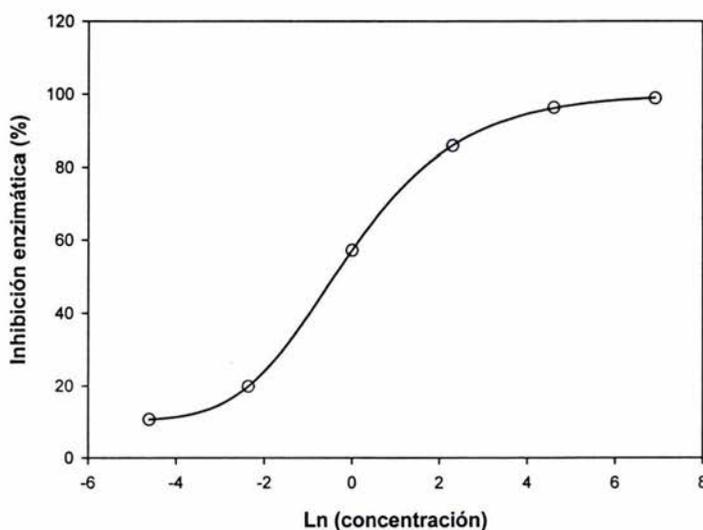


Figura 34. Gráfica sigmoide de la inhibición de la TI por nevirapina.

En la Figura 34 se observa la tendencia que tienen los datos, ésta es de tipo sigmoide, por lo cual se optó, para linealizarla, trabajar con unidades de probabilidad (unidades probit<sup>31</sup>) los datos se enlistan en la Tabla 11 y ahora se graficó el logaritmo natural de la concentración contra unidades probit, ver Figura 35.

Tabla 11. Unidades probit para la inhibición enzimática y logaritmos naturales para cada concentración de nevirapina.

Ln concentración ( $\mu\text{M}$ )	Unidades probit para la Inhibición enzimática		
6.9078	7.2774	7.2868	7.2821
4.6052	6.7844	6.7921	6.7921
2.3026	6.0744	6.0750	6.0747
0.0000	5.1803	5.1799	5.1801
-2.3626	4.1530	4.1540	4.1535
-4.6052	3.7654	3.7636	3.7640

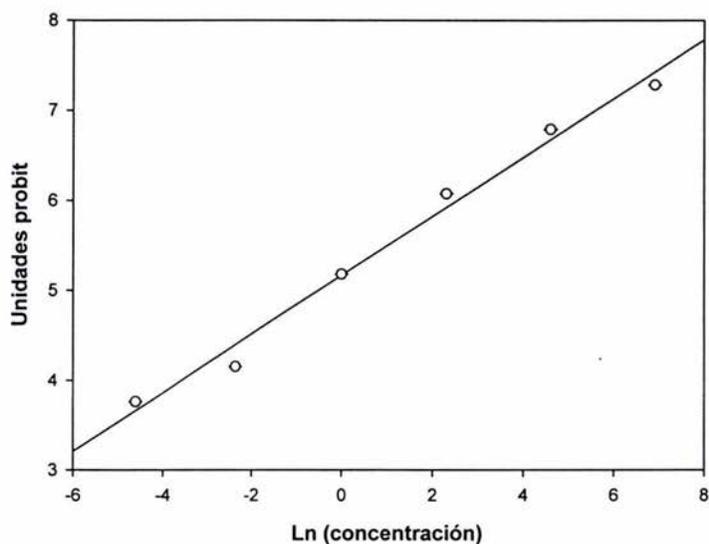


Figura 35. Gráfica para la regresión logarítmica con unidades probit.

En la Figura 35 ya se observa una tendencia lineal de los datos. Con los datos de la Tabla 10 se calculó la ecuación que describe esa recta, resultando  $y = 0.3269w + 5.1676$ , en donde  $w = \ln x$ , con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9874.

Para la determinación de la  $CI_{50}$  se llevó a cabo el análisis probit de los datos de la Tabla 11, dando un resultado de  $0.6205 \mu\text{M}$ , con un límite superior confiable de  $0.9284 \mu\text{M}$  y un límite inferior confiable de  $0.4111 \mu\text{M}$ . Cabe señalar que se han reportado valores de  $CI_{50}$  para nevirapina desde  $1.35 \pm 0.43 \mu\text{M}^{32}$  hasta  $0.088 \pm 0.032 \mu\text{M}^{33}$ , con esto se comprueba que el valor encontrado de  $CI_{50}$  para nevirapina es correcto; además, se comprueba que el método es confiable.

De la misma forma que se llevó a cabo el tratamiento de datos para el fármaco nevirapina, se efectuó para los nuevos compuestos sintetizados (compuestos 9-13).

En la Tabla 12 se muestran los valores de las absorbancias para tres determinaciones en cada concentración de cada compuesto. El compuesto marcado como DEPE-U es el 3,3-dietoxipropanoato de etilo acoplado al uracilo y el compuesto marcado como DBPE-U es el 3,3-dibenciloxipropanoato de etilo, también con uracilo; ambos compuestos se usaron para efecto de comparación con los compuestos 9-13 y poder dar cuenta del efecto del sustituyente en la posición cinco del anillo de pirimidina en la inhibición de la TI.

Tabla 12. Lectura de absorbancia para la actividad enzimática de la TI a diferentes concentraciones de los compuestos 9-13.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Compuesto						
	9	10	11	12	13	DEPE-U	DBPE-U
1000.00	1.5091	1.2488	1.1557	1.0965	1.1725	1.3923	1.2888
	1.5116	1.2510	1.1601	1.1540	1.1958	1.4256	1.2709
	1.5184	1.2515	1.1684	1.1216	1.1668	1.4220	1.3130
100.00	1.8047	1.6538	1.6713	1.1061	1.2441	1.3781	1.3235
	1.8213	1.6950	1.6882	1.1994	1.2176	1.3516	1.3460
	1.8990	1.6994	1.6304	1.1877	1.2152	1.3884	1.3968
10.00	1.0653	1.6261	1.6360	1.1345	1.2135	1.4255	1.2015
	1.0283	1.6046	1.6378	1.1024	1.2154	1.4694	1.2304
	1.0531	1.6059	1.6696	1.1571	1.2551	1.4969	1.2184
1.00	1.2320	1.4285	1.5450	1.4791	1.3035	1.4748	1.4261
	1.2241	1.4801	1.5069	1.4162	1.3740	1.4610	1.4102
	1.2556	1.4437	1.5609	1.4727	1.3002	1.4134	1.4349
0.10	1.7043	1.4821	1.5257	1.5088	1.6995	1.4445	1.3938
	1.6931	1.4884	1.5401	1.5317	1.6865	1.4658	1.3445
	1.7121	1.4339	1.5231	1.5211	1.6370	1.4149	1.3242
0.01	1.6410	1.2175	1.6307	1.3051	1.3735	1.4431	1.4201
	1.6983	1.2359	1.6912	1.3249	1.3298	1.4091	1.4940
	1.6624	1.2570	1.6515	1.3534	1.3873	1.4108	1.4365

En las Tablas 13 y 14 se muestran los promedios (se promedia ya que las desviaciones estándar son muy pequeñas) de la actividad enzimática y la inhibición de esa actividad, respectivamente para cada concentración de los compuestos 9-13 y adicionalmente, para efectos de comparación, DEPE-U y DBPE-U.

*Tabla 13.* Datos de actividad enzimática (en porcentaje) de la TI a diferentes concentraciones de los compuestos 9-13.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Compuesto						
	9	10	11	12	13	DEPE-U	DBPE-U
1000.00	88.8530	73.3588	68.1373	76.4389	69.3851	96.1102	87.7865
100.00	108.0493*	98.7210	97.5829	79.1840	72.1682	93.3492	92.1750
10.00	61.5371	94.5849	96.6735	76.9353	72.3076	99.5534	82.7451
1.00	72.5843	85.1159	90.2083	99.0139	78.0722	98.5878	96.8197
0.10	99.9179	86.1308	89.7389	103.4025*	98.5888	98.0437	92.0889
0.01	97.8117	72.5433	97.2602	90.2958	80.2881	96.6338	98.6195

\* Estos valores se deben tomar como el 100 % de actividad enzimática.

*Tabla 14.* Datos de inhibición enzimática (en porcentaje) de la TI a diferentes concentraciones de los compuestos 9-13.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Compuesto						
	9	10	11	12	13	DEPE-U	DBPE-U
1000.00	11.1470	26.6412	31.8627	23.5611	30.6149	3.8898	12.2135
100.00	-8.0493*	1.2790	2.4171	20.8160	27.8318	6.6508	7.8250
10.00	38.4629	5.4151	3.3265	23.0647	27.6924	0.4466	17.2549
1.00	27.4157	14.8841	9.7917	0.9861	21.9278	1.4122	3.1803
0.10	0.0821	13.8692	10.2611	-3.4025*	1.4112	1.9563	7.9111
0.01	2.1883	27.4567	2.7398	9.7042	19.7119	3.3662	1.3805

\* Estos valores se deben tomar como el 0 % de inhibición enzimática.

Al observar los datos de las Tablas 12, 13 y 14 se puede afirmar que, en general, estos compuestos no siguen una tendencia clara como es el caso de nevirapina por lo cual

---

---

no se puede presentar una correlación del porcentaje de inhibición con respecto a la concentración. Evidentemente tampoco se puede obtener un valor de  $CI_{50}$  debido a la dispersión de los datos. Si bien sólo se puede analizar el efecto en la inhibición enzimática para cada concentración, que es lo que se presenta a continuación.

La inhibición enzimática para estos compuestos se debe, presumiblemente, a la capacidad de los compuestos para formar puentes de hidrógeno (tanto en la parte del éster como de la base pirimidínica), a la sustitución de la posición cinco del anillo de pirimidina y a la presencia del grupo aromático, en los compuestos que lo poseen.

Al analizar los datos presentados en la Tabla 14 se observa que efectivamente, existe efecto al adicionar un sustituyente en la posición cinco del anillo de pirimidina, ya que si se comparan los porcentajes de inhibición para los compuestos que carecen de ese sustituyente (DEPE-U y DBPE-U) con los compuestos 9-13, en general, a cualquier concentración los compuestos que carecen de ese sustituyente presentan un menor porcentaje de inhibición de la TI que los que si lo presentan.

La concentración a la cual se puede hacer una comparación con respecto al tipo de sustituyente es con la 1 mM, (1000  $\mu$ M) donde se observa que los compuestos 10 y 12 (que contienen 5-isopropiluracilo y 5-yodouracilo, respectivamente) poseen un valor muy semejante (alrededor del 25 %) en cuanto al porcentaje de inhibición, lo que no sucede para 9 (5-isopropil-2-tioxouracilo, 11.15 %) o para DEPE-U (3.89 %) que carece del grupo sustituyente. Cabe mencionar que los compuestos con el sustituyente isopropilo se esperaba que fueran activos ya que el grupo isopropilo juega un papel muy importante en la actividad antirretroviral de los no análogos de nucleósidos dado que interacciona con diversos restos de aminoácidos de la enzima TI del VIH en el sitio alostérico. Esto se puede apreciar en nevirapina, la cual tiene como sustituyente a un grupo ciclopropilo (isómero al isopropilo). Por otro lado, una situación semejante se presentó en la inhibición enzimática de los compuestos 11 y 13 (alrededor de 30 %) que resultó ser mayor que la del análogo sin sustituyente (DBPE-U, 12.21 %).

Con respecto al compuesto que tiene como sustituyente al yodo se ha observado que por sí sólo el 5-yodouracilo es activo contra varios tipos de cáncer, esto necesariamente indica que interviene en la síntesis de ácidos nucleicos. Por otro lado, el compuesto que además tiene sustituido la posición dos del anillo de pirimidina con azufre (en lugar de oxígeno) también mostró actividad inhibitoria, aunque en menor grado, esto tal vez sea debido a que el átomo de azufre carece de la habilidad de formar puentes de hidrógeno, lo que es esencial para que los compuestos tengan actividad inhibitoria, sin embargo presentan actividad debido a la presencia del sustituyente isopropilo.

Por otra parte se observa una peculiar diferencia en cuanto a los compuestos alifáticos y los aromáticos. El efecto inhibitorio de los dos compuestos aromáticos **11** y **13** es mayor que para los compuestos alifáticos **10** y **12** (alrededor de 30 % vs 25 %).

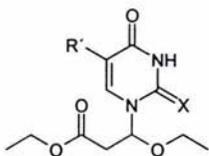
La explicación de esta diferencia puede estar en el hecho de que la enzima TI, como muchas proteínas contienen restos de aminoácidos llamados aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano) los cuales podrían establecer una interacción por momentos cuadrupolares o por apilamiento con el fenilo del grupo benciloxi presente en los compuestos aromáticos sintetizados. Lo anterior, sumado al efecto del sustituyente en la posición cinco del anillo de pirimidina y la habilidad de la formación de puentes de hidrógeno es lo que presumiblemente hace que los compuestos aromáticos sean más activos que los compuestos alifáticos.

Finalmente, al observar los datos de la Tabla 14 se aprecia que los compuestos **10**, 3-(5-isopropiluracil)-3-etoxipropanoato de etilo, y **13**, 3-(5-yodouracil)-3-benciloxipropanoato de etilo, presentan una inhibición enzimática del 27.46 % y 19.71 %, respectivamente a una concentración baja (0.01  $\mu\text{M}$ ) comparado con nevirapina (Tabla 9) a esa misma concentración, la cual presenta una inhibición enzimática de 10.83 %.

## VII. CONCLUSIONES

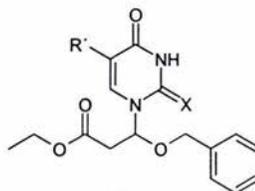
Se sintetizaron y se caracterizaron cinco nuevos compuestos de los denominados inhibidores no análogos de nucleósidos.

Serie alifática



9. R' = *i*-Pr, X = S  
 10. R' = *i*-Pr, X = O  
 12. R' = I, X = O

Serie aromática



11. R' = *i*-Pr, X = O  
 13. R' = I, X = O

3-(5-isopropil-2-tioxouracil)-3-etoxipropanoato de etilo (9).

3-(5-isopropiluracil)-3-etoxipropanoato de etilo (10).

3-(5-isopropiluracil)-3-benciloxipropanoato de etilo (11).

3-(5-yodouracil)-3-etoxipropanoato de etilo (12).

3-(5-yodouracil)-3-benciloxipropanoato de etilo (13).

Se evaluó la actividad antirretroviral, *in vitro*, de los compuestos 9-13 por medio de la cuantificación de la inhibición en la actividad enzimática de la TI del VIH, encontrándose mayor actividad para los compuestos aromáticos 11 y 13 (31.86 y 30.61 % de inhibición enzimática, respectivamente) que para sus análogos alifáticos 10 y 12 (26.64 y 23.56 %) a una concentración de 1 mM. Adicionalmente se observó que a baja concentración (0.01  $\mu$ M), los compuestos 10 y 13 presentan mayor actividad (27.45 y 19.71 % de inhibición enzimática, respectivamente) que nevirapina (10.83 %).

---

---

## VIII. PARTE EXPERIMENTAL

### A. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS.

#### 1. Generalidades.

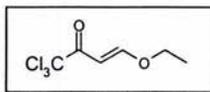
Los puntos de fusión se obtuvieron en un aparato Melt Temp, utilizando un tubo capilar abierto.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , HETCOR y COSY utilizados para la caracterización de los compuestos, se registraron en los siguientes espectrómetros: Espectrómetro Bruker 300 a 300 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$  con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno, espectrómetro Jeol GSX 270 a 270 MHz para  $^1\text{H}$  y 67.5 MHz para  $^{13}\text{C}$  con TMS como estándar interno y espectrómetro Jeol Eclipse 400 a 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100.5 MHz para  $^{13}\text{C}$  con TMS como estándar interno. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están reportados en partes por millón (ppm), las constantes de acoplamiento (J) están reportadas en Hertz (Hz) y la multiplicidad de las señales se indican con las abreviaciones: s, señal simple; d, señal doble; t, señal triple; q, señal de cuarteto; st, señal séptuple y; m, señal múltiple. Los disolventes empleado fueron cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO}-d_6$ ).

Los espectros infrarrojo (IR) se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer 16F PC en pastilla de KBr o solución en  $\text{CHCl}_3$ . La intensidad de las señales se describe siguiendo la convención d = débil, m = media, f = fuerte y a = ancha. Los espectros de masas (EM) se obtuvieron en un espectrómetro Hewlett Packard 5989 A, se utilizó la técnica de impacto electrónico (IE) por inserción directa (DIP) a 70 eV. El análisis elemental se obtuvo en un analizador Thermo Finnigan Flash 1112.

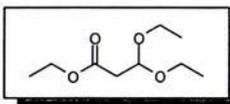
Los disolventes, benceno y éter etílico, empleados en las reacciones descritas en este trabajo se secaron con sodio metálico, utilizando benzofenona como indicador. El 1,2-dicloroetano se secó con hidruro de calcio, todos ellos fueron destilados previo a cada reacción.

## 2. Métodos de síntesis.



*1,1,1-Tricloro-4-etoxi-3-buten-2-ona* (1). En un matraz balón de 250 mL de capacidad, provisto de agitación magnética y embudo de adición, en un baño de hielo de agua, se colocaron 68.5 g (0.95 mol) de éter etilvinílico. Una vez iniciada la agitación se adicionaron gota a gota, 86.5 g (0.48 mol) de cloruro de tricloroacetilo. La mezcla se dejó durante 5 horas a 0 °C, se llevó a temperatura de laboratorio y se mantuvo durante 12 h con agitación magnética constante. Al término de este tiempo el embudo de adición se reemplazó por un equipo de destilación y la mezcla se destiló a presión reducida, obteniendo un líquido transparente con un punto de ebullición de 84-86 °C a 1 mm de Hg con un rendimiento de 94% (78 g).

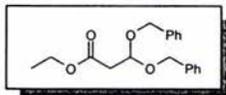
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 1.39 (t, J = 7 Hz, 3 H), 4.09 (q, J = 7 Hz, 2 H), 6.14 (d, J = 12 Hz, 1 H), 7.84 (d, J = 12 Hz, 1 H).



*3,3-Dietoxipropanoato de etilo* (2). A un matraz balón de 250 mL de capacidad, provisto de agitación magnética conteniendo 100 g (0.46 mol) de 1 en 100 mL (1.72 mol) de alcohol etílico, se adicionaron 6 g de carbonato de potasio. La suspensión se dejó a temperatura ambiente durante 15 horas. Transcurrido este tiempo se acondicionó un equipo de destilación y se llevó a cabo la destilación de la suspensión café resultante a presión reducida, obteniéndose un líquido transparente con un punto de ebullición de 58-60 °C a 1 mm de Hg, con un rendimiento de 98% (31.83 g).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz) δ 1.15 (t, J = 7 Hz, 6 H), 1.21 (t, J = 7 Hz, 3 H), 2.60 (d, J = 6 Hz, 2 H), 3.40 (q, J = 7 Hz, 2 H), 3.70 (q, J = 7 Hz, 2 H), 4.10 (q, J = 7 Hz, 2 H), 4.90 (t, J = 6 Hz, 1 H).

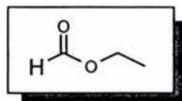
RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 67.5 MHz) δ 14.19 (CH<sub>3</sub>), 15.25 (2 x CH<sub>3</sub>), 40.02 (CH<sub>2</sub>CH), 60.50 (CH<sub>2</sub>O), 61.90 (2 x CH<sub>2</sub>O), 99.70 (CH), 170.07 (CO).



**3,3-Dibenciloxipropanoato de etilo (3).** En un matraz balón de 250 mL de capacidad, provisto de agitación magnética, trampa de Dean Stark invertida y un condensador, conteniendo 10 g (52.6 mmol) del compuesto **2**, se adicionaron 100 mL de benceno. La agitación de la solución se inició y enseguida se le adicionaron 10.9 mL (11.39 g, 105.5 mmol) de alcohol bencilico en presencia de 90 mg (0.526 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado. Esta solución se calentó hasta la temperatura de ebullición de una mezcla azeotrópica de etanol-benceno-agua, una vez que se obtuvieron cerca de 100 mL de la mezcla azeotrópica destilada, la reacción se enfrió y enseguida se le adicionaron 60 mL de una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 20 %. La mezcla formada se extrajo con diclorometano (3 x 20 mL), el extracto orgánico se secó con sulfato de sodio y finalmente se concentró en rotavapor. El líquido remanente se caracterizó como el producto, con un rendimiento del 98 % (16.44 g).

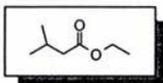
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz)  $\delta$  1.24 (t,  $J = 7$  Hz, 3 H), 2.75 (sistema ABM, dd,  $J = 6$  y 16 Hz, 1 H), 2.85 (sistema ABM, dd,  $J = 6$  y 16 Hz, 1 H), 4.15 (q,  $J = 7$  Hz, 2 H), 4.62 (d,  $J = 12$  Hz, 2 H), 4.72 (d,  $J = 12$  Hz, 2 H), 5.26 (t,  $J = 6$  Hz, 1 H), 7.35 (m, 10 H).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 67.5 MHz)  $\delta$  14.26 ( $\text{CH}_3$ ), 39.99 ( $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 60.80 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 68.2 (2 x  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 99.35 (CH), 127-129 (C-arom), 137.8 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ -arom), 169.85 (CO).



**Metanoato de etilo (4).** En un matraz balón con capacidad para 150 mL, provisto de agitación magnética y condensador, se adicionaron 20 mL (24.4 g, 0.53 moles) de ácido metanoico seguidos de 70 mL de alcohol etílico y 0.5 mL de ácido sulfúrico como catalizador. La mezcla se dejó en agitación por 2 horas a reflujo. La solución clara se enfrió a temperatura ambiente, adicionándole enseguida 20 mL de una solución de bicarbonato de sodio al 20% p/v para neutralizar al ácido. El matraz con la mezcla ya neutralizada fue equipado con un sistema de destilación; la destilación de la mezcla de reacción se llevó a cabo, obteniéndose un líquido transparente puro con punto de ebullición de 45 °C con un rendimiento de 94 % (36.9 g).

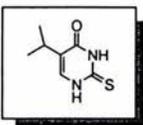
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.25 (t,  $J = 7$  Hz, 3 H), 4.17 (q,  $J = 7$  Hz, 2 H), 7.99 (s, 1 H).



*3-Metilbutanoato de etilo* (5). En un matraz balón con capacidad para 150 mL, provisto de agitación magnética y condensador, se colocaron 30 mL (28.11 g, 0.28 moles) de ácido 3-metilbutanoico, 65 mL de alcohol etílico

y 1 mL de ácido sulfúrico como catalizador. La mezcla se dejó en agitación por 3 horas a reflujo. La solución clara se enfrió a temperatura ambiente y enseguida se le adicionaron 50 mL de una solución de bicarbonato de sodio al 50% p/v para neutralizar al ácido. Al producto se le hizo extracción con diclorometano (4 x 25 mL), el extracto orgánico se secó con sulfato de sodio y finalmente se concentró a presión reducida en rotavapor. Se obtuvo un líquido transparente puro con punto de ebullición de 120-122 °C, con un rendimiento de 97% (37.1 g).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz)  $\delta$  0.90 (d,  $J = 6$  Hz, 6 H), 1.20 (t,  $J = 7$  Hz, 3 H), 2.07 (m,  $J = 6$  Hz, 1 H), 2.12 (d,  $J = 6$  Hz, 2 H), 4.07 (q,  $J = 7$  Hz, 2 H).



*5-Isopropil-2-tioxouracilo* (6). En un matraz balón de 150 mL de capacidad, provisto de agitación magnética y embudo de adición, en un baño de hielo seco y bajo atmósfera de nitrógeno seco, se colocaron 21 mL

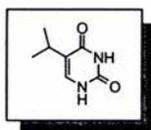
de diisopropilamido de litio (LDA) 2 M (38.5 mmol) en éter etílico, la agitación se inició adicionando gota a gota una solución de 5 g (38.5 mmol) de 3-metilbutanoato de etilo (4) en 25 mL de éter etílico seco. Después de la adición, la mezcla se dejó 50 minutos a la temperatura del baño de hielo seco, terminado este tiempo a la mezcla contenida en el matraz se le adicionó una solución de 4.5 g (60 mmol) de metanoato de etilo (5) en 15 mL de éter etílico. La mezcla de reacción se dejó durante cuatro horas a temperatura del baño de hielo seco y se llevó a temperatura ambiente gradualmente con la sublimación del hielo seco. La solución etérea del producto de condensación formado se concentró al vacío (aproximadamente 2 mm de Hg) y el residuo fue refluído con una solución de tiourea 3 g (39 mmol) en 70 mL de metanol por cuatro horas. Terminado el tiempo de reflujo la agitación se continuó a temperatura ambiente y el matraz se transfirió a un baño de hielo de

agua. La solución resultante se llevó a pH 3 con una solución 50% v/v de ácido sulfúrico en agua, entonces se formó un precipitado el cual se filtro a vacío dando un sólido blanco puro con punto de fusión de 211-213 °C y un rendimiento de 81% (5.3 g), con respecto al 3-metilbutanoato de etilo.

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 1.06 (d, J = 7 Hz, 6 H), 2.71 (st, J = 7 Hz, 1 H), 7.09 (d, J = 6 Hz, 1 H), 12.20 (s, NH), 12.38 (s, NH).

RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.5 MHz) δ 21.43 (2 x CH<sub>3</sub>), 25.86 (CH), 124.13 (C-cuaternario), 136.6 (CH=C), 161.59 (CO), 174.86 (CS).

EM (m/z) 170 [M<sup>+</sup>], 155 [M<sup>+</sup>-15], 96 [M<sup>+</sup>-74], 69 [M<sup>+</sup>-101], 43 [M<sup>+</sup>-127].

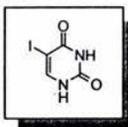


*5-Isopropiluracilo* (7). En un matraz balón de 150 mL de capacidad, provisto de agitación magnética se adicionaron 3 g (17.7 mmol) de 5-isopropil-2-tioxouracilo (6), seguidos de una solución de 5 g (53 mmol) de ácido monocloroacético en 60 mL de agua. La suspensión resultante se puso a reflujo durante tres horas hasta que la suspensión desapareció, la solución que resulta se llevó a temperatura ambiente observándose la aparición de un sólido, la suspensión resultante se filtró al vacío, y el sólido blanco se lavó con agua hasta pH neutro, obteniéndose puro, con un punto de fusión de 290-292 °C, en un rendimiento del 99.3 % (2.7 g).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 270 MHz) δ 1.04 (d, J = 7 Hz, 6 H), 2.68 (st, J = 7 Hz, 1 H), 7.05 (d, J = 6 Hz, 1 H), 10.62 (s, NH), 10.97 (s, NH).

RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.5 MHz) δ 21.94 (2 x CH<sub>3</sub>), 25.61 (CH), 118.44 (C cuaternario), 136.43 (CH=C), 151.71 (CO), 164.63 (CO).

EM (m/z) 154 [M<sup>+</sup>], 139 [M<sup>+</sup>-15], 96 [M<sup>+</sup>-58], 68 [M<sup>+</sup>-86], 41 [M<sup>+</sup>-113].



5-Yodouracilo (8). En un matraz balón de 250 mL de capacidad, provisto de agitación magnética y condensador, se adicionaron 3 g (26.7 mmol) de uracilo y 13.54 g (53.5 mmol) de yodo. Enseguida se adicionaron 60 mL de dioxano y 89.2 mL (26.7 mmol) de ácido nítrico 0.3 N y la mezcla de reacción se puso a reflujo durante cinco horas. Al término de ese tiempo la mezcla resultante se concentró al vacío (1 mm de Hg) hasta sequedad, el matraz se lavó con acetona, resultando una suspensión violácea la cual se filtró al vacío y el sólido se lavó con acetona hasta que se obtuvo un sólido blanco puro con un punto de fusión de 277-279 °C y un rendimiento de 90 % (5.74 g).

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 270 MHz)  $\delta$  7.88 (s, 1H) 11.16 (s, NH), 11.40 (s, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 67.5 MHz)  $\delta$  147.49 (CH=C), 151.77 (CO), 162.04 (CO).

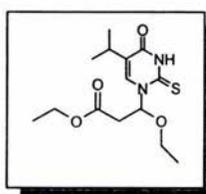
EM (m/z) 238 [ $\text{M}^+$ ], 195 [ $\text{M}^+-43$ ], 168 [ $\text{M}^+-70$ ], 127 [ $\text{M}^+-111$ ], 41 [ $\text{M}^+-217$ ].

El procedimiento general para la funcionalización (sililación) de las bases pirimidínicas sintetizadas y la sustitución por la base en 3,3-dietoxipropanoato de etilo (2) y 3,3-dibenciloxipropanoato de etilo (3) se presenta a continuación.

Las bases pirimidínicas; 5-isopropil-2-tioxouracilo, 5-isopropiluracilo y 5-yodouracilo fueron sililadas según el procedimiento siguiente. Por ejemplo, 200 mg (1.3 mmol) de 5-isopropiluracilo se colocaron en un matraz bola de 50 mL de capacidad, con salida lateral y totalmente seco. En seguida se agregaron 5 mL de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS) y 0.1 mL (0.085 g, 0.8 mmol) de cloruro de trimetilsilano, y la suspensión resultante fue refluida durante cinco horas, tiempo en el cual la suspensión se tornó en una solución transparente. Terminado este tiempo, la mezcla se enfrió y el exceso de (HMDS) se eliminó al vacío (1 mm Hg) y a una temperatura de 40 °C.

La base, ya sililada (líquido transparente), se disolvió en 20 mL de 1,2-dicloroetano seco. A esta solución se le adicionaron 0.25 g (1.3 mmol) de 3,3-dietoxipropanoato de etilo

por la salida lateral vía jeringa, enseguida se adicionaron 0.024 mL (28.86 mg, 0.13 mmol) de trifluorometansulfonato de trimetilsililo en 1 mL de 1,2-dicloroetano seco. La mezcla de reacción se agitó por 70 horas a temperatura ambiente. A la solución resultante se le adicionaron 50 mL de agua y se realizó una extracción (3 x 10 mL) con diclorometano. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y evaporó al vacío en un rotavapor. La purificación de estos compuesto se realizó por adición de una mezcla de hexano-cloruro de metileno, dejando evaporar la mezcla a temperatura ambiente con lo cual en algunos casos se observó la cristalización de los compuestos, y en otros se obtuvieron en forma de aceite.



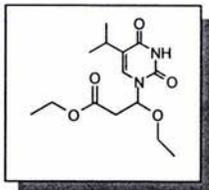
*3-(5-Isopropil-2-tioxouracil)-3-etoxipropanoato de etilo (9)*. Este compuesto se preparó de acuerdo al procedimiento general. Para la sililación se utilizaron 200 mg (1.18 mmol) de **6**, 5 mL de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS) y 0.1 mL (0.085 g, 0.8 mmol) de cloruro de trimetilsilano. Para la reacción de sustitución se utilizaron 225 mg (1.18 mmol) de **2** y 0.02 mL (24.56 mg, 0.11 mmol) de trifluorometansulfonato de trimetilsililo en 1 mL de 1,2-dicloroetano seco. La reacción se dejó durante 72 horas, después de la purificación se obtuvo un sólido blanco con punto de fusión de 77-79 °C y un rendimiento de 85.4 % (283 mg).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 1.18 (d, J = 6 Hz, 6 H), 1.22 (t, J = 7 Hz, 3 H), 1.28 (t, J = 7 Hz, 3 H), 2.71 (dd, J = 8.78 y 15.37 Hz, 1 H), 2.98 (m, 2 H), 3.61 (q, J = 7 Hz, 2 H), 4.21 (q, J = 7 Hz, 2 H), 6.74 (dd, J = 3.66 y 8.78 Hz, 1 H), 9.42 (s, NH).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100.5 MHz) δ 14.25 (CH<sub>3</sub> éter), 14.77 (CH<sub>3</sub> éster), 21.30 (2 x CH<sub>3</sub> isopropilo), 26.30 (CH isopropilo), 39.66 (CH<sub>2</sub>CH), 61.26 (CH<sub>2</sub> éster), 66.09 (CH<sub>2</sub> éter), 87.42 (CHCH<sub>2</sub>), 126.96 (C cuaternario base), 133.53 (CH base), 159.41 (CO base), 174.33 (CS).

IR (KBr) ν cm<sup>-1</sup> 3489 (m, a), 2927 (m), 2857 (m) 1715 (f), 1690 (f), 1199 (m). 833 (d).

EM (m/z) 314 [M<sup>+</sup>], 170 [M<sup>+</sup>-144], 145 [M<sup>+</sup>-169], 71 [M<sup>+</sup>-243], 43 [M<sup>+</sup>-271].



*3-(5-isopropiluracil)-3-etoxipropanoato de etilo (10)*. Este compuesto se preparó de acuerdo al procedimiento general. Para la sililación se utilizaron 200 mg (1.3 mmol) de **7**, 5 mL de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS) y 0.1 mL (0.085 g, 0.8 mmol) de cloruro de trimetilsilano. Para la reacción de sustitución se utilizaron 250 mg (1.3 mmol) de **2** y 0.03 mL (36.84 mg, 0.166 mmol) de trifluorometansulfonato de trimetilsililo en 1 mL de 1,2-dicloroetano seco. La reacción se dejó durante 70 horas, después de la purificación se obtuvo un líquido aceitoso con un rendimiento de 93.2 % (292 mg).

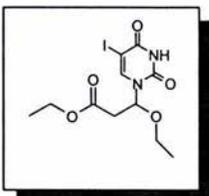
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 1.15 (d, J = 6 Hz, 6 H), 1.2 (t, J = 7 Hz, 3 H), 1.24 (t, J = 7 Hz, 3 H), 2.70 (dd, J = 5.44 y 15.34 Hz, 1 H), 2.75 (dd, J = 7.67 y 15.34, 1 H), 3.52 (q, J = 7 Hz, 2 H), 4.14 (q, J = 7 Hz, 2 H), 6.05 (dd, J = 5.44 y 7.67 Hz, 1 H), 8.82 (s, NH).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100.5 MHz) δ 14.19 (CH<sub>3</sub> éter), 14.76 (CH<sub>3</sub> éster), 21.70 (2 x CH<sub>3</sub> isopropilo), 25.94 (CH isopropilo), 40.38 (CH<sub>2</sub>CH), 61.18 (CH<sub>2</sub> éster), 65.27 (CH<sub>2</sub> éter), 81.61 (CHCH<sub>2</sub>), 122.00 (C cuaternario base), 132.64 (CH base), 150.44 (CO base), 162.94 (CO base), 168.33 (CO éster).

IR (CHCl<sub>3</sub>) ν cm<sup>-1</sup> 3456 (m, a), 2981 (d), 1741 (f), 1711 (f), 1656 (f), 1606 (m), 572 (m).

EM (m/z) 298 [M<sup>+</sup>], 154 [M<sup>+</sup>-144], 145 [M<sup>+</sup>-153], 71 [M<sup>+</sup>-227], 43 [M<sup>+</sup>-255].

Análisis elemental. Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 56.36 %; H, 7.43 %; N, 9.39 %.  
Encontrado: C, 56.52 %; H, 7.45 %; N, 9.02 %.



*3-(5-yodouracil)-3-etoxipropanoato de etilo (12)*. Este compuesto se preparó de acuerdo al procedimiento general. Para la sililación se utilizaron 200 mg (0.84 mmol) de **8**, 5 mL de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS) y 0.1 mL (0.085 g, 0.8 mmol) de cloruro de trimetilsilano. Para la reacción de sustitución se utilizaron

160 mg (0.84 mmol) de **2** y 0.02 mL (24.56 mg, 0.11 mmol) de trifluorometansulfonato de trimetilsililo en 1 mL de 1,2-dicloroetano seco. La reacción se dejó durante 46 horas, después de la purificación se obtuvo un sólido blanco con punto de fusión 113-115 °C y un rendimiento de 96.3 % (302 mg). La recrystalización del sólido en hexano-diclorometano (9:1) proporcionó monocristales para su análisis por difracción de rayos X.

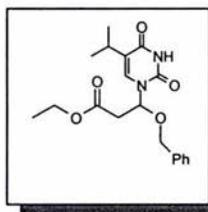
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.21 (t,  $J = 7$  Hz, 3 H), 1.25 (t,  $J = 7$  Hz, 3 H), 2.72 (dd,  $J = 5.12$  y 15.37 Hz, 1 H), 2.77 (dd,  $J = 7.32$  y 15.37, 1 H), 3.58 (q,  $J = 7$  Hz, 2 H), 4.17 (q,  $J = 7$  Hz, 2 H), 6.01 (dd,  $J = 5.12$  y 7.32 Hz, 1 H), 9.46 (s, NH).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100.5 MHz)  $\delta$  14.22 ( $\text{CH}_3$  éter), 14.76 ( $\text{CH}_3$  éster), 40.43 ( $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 61.35 ( $\text{CH}_2$  éster), 65.85 ( $\text{CH}_2$  éter), 82.50 ( $\text{CHCH}_2$ ), 143.77 (CH base), 150.43 (CO base), 160.13 (CO base), 168.15 (CO éster).

IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  3165 (m, a), 2978 (m), 1736 (f), 1684 (f), 1459 (m). 873 (d).

EM (m/z) 382 [ $\text{M}^+$ ], 238 [ $\text{M}^+ - 144$ ], 145 [ $\text{M}^+ - 237$ ], 71 [ $\text{M}^+ - 311$ ], 43 [ $\text{M}^+ - 339$ ].

Análisis elemental. Calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{IN}_2\text{O}_5$ : C, 34.55 %; H, 3.93 %; N, 7.33 %.  
Encontrado: C, 34.68 %; H, 3.94 %; N, 7.18 %.



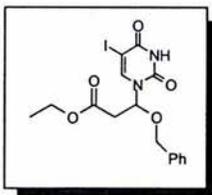
*3-(5-isopropiluracil)-3-benciloxipropanoato de etilo (11)*. Este compuesto se preparó de acuerdo al procedimiento general. Para la sililación se utilizaron 200 mg (1.3 mmol) de **7**, 5 mL de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS) y 0.1 mL (0.085 g, 0.8 mmol) de cloruro de trimetilsilano. Para la reacción de sustitución se utilizaron 408 mg (1.3 mmol) de **3** y 0.03 mL (36.84 mg, 0.166 mmol) de trifluorometansulfonato de trimetilsililo en 1 mL de 1,2-dicloroetano seco. La reacción se dejó durante 55 horas, después de la purificación se obtuvo un líquido aceitoso con un rendimiento de 90.6 % (208 mg).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.23 (d,  $J = 6$  Hz, 6 H), 1.31 (t,  $J = 7$  Hz, 3 H), 2.74 (dd,  $J = 5.12$  y  $15.37$  Hz, 1 H), 2.98 (m, 2 H), 4.15 (q,  $J = 7$  Hz, 2 H), 4.52 (d,  $J = 12$ , 1 H), 4.63 (d,  $J = 12$  Hz, 1 H), 6.22 (dd,  $J = 5.12$  y  $8.05$  Hz, 1 H), 7.32 (m, 5 H), 7.07 (s, 1 H), 8.32 (s, NH).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100.5 MHz)  $\delta$  14.19 ( $\text{CH}_3$  éster), 21.62 (2 x  $\text{CH}_3$  isopropilo), 25.97 ( $\text{CH}$  isopropilo), 40.40 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}$ ), 61.29 ( $\text{CH}_2$  éster), 72.42 ( $\text{CH}_2$  éter), 81.75 ( $\underline{\text{C}}\text{HCH}_2$ ), 121.93 (C cuaternario base), 132.88 (CH base), 136.01 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$  aromático), 127.86 (2 x  $\text{C}_{\text{orto}}$  aromático), 128.58 ( $\text{C}_{\text{para}}$  aromático), 128.7 (2 x  $\text{C}_{\text{meta}}$  aromático), 150.13 (CO base), 162.56 (CO base), 168.21 (CO éster).

IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  3713 (m), 2989 (d), 1683 (f), 1555 (m), 1459 (f), 1069 (m), 890 (m).

EM (m/z) 361 [ $\text{M}^+\text{H}$ ], 153 [ $\text{M}^+-207$ ], 91 [ $\text{M}^+-269$ ].



3-(5-iodouracil)-3-benciloxipropionato de etilo (**13**). Este compuesto se preparó de acuerdo al procedimiento general. Para la sililación se utilizaron 200 mg (0.84 mmol) de **8**, 5 mL de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS) y 0.1 mL (0.085 g, 0.8 mmol) de cloruro de trimetilsilano. Para la reacción de sustitución se utilizaron 264 mg (0.84 mmol) de **3** y 0.02 mL (24.56 mg, 0.11 mmol) de trifluorometansulfonato de trimetilsililo en 1 mL de 1,2-dicloroetano seco. La reacción se dejó durante 36 horas, después de la purificación se obtuvo un sólido blanco con punto de fusión 84-86 °C y un rendimiento de 83.8 % (237 mg).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.24 (t,  $J = 7$  Hz, 3 H), 2.73 (dd,  $J = 5.12$  y  $15.37$  Hz, 1 H), 2.83 (dd,  $J = 7.32$  y  $15.37$ , 1 H), 4.18 (q,  $J = 7$  Hz, 2 H), 4.55 (d,  $J = 12$ , 1 H), 4.68 (d,  $J = 12$  Hz, 1 H), 6.15 (dd,  $J = 5.12$  y  $7.32$  Hz, 1 H), 7.32 (m, 5 H), 7.70 (s, 1 H) 8.74 (s, NH).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100.5 MHz)  $\delta$  14.19 ( $\text{CH}_3$  éster), 40.44 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}$ ), 61.42 ( $\text{CH}_2$  éster), 73.03 ( $\text{CH}_2$  éter), 82.54 ( $\underline{\text{C}}\text{HCH}_2$ ), 143.89 (CH base), 135.62 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$  aromático), 128.41 (2 x

$C_{orto}$  aromático), 128.83 ( $C_{para}$  aromático), 128.83 (2 x  $C_{meta}$  aromático), 150.00 (CO base), 159.63 (CO base), 167.97 (CO éster).

IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  3470 (m, a), 3034 (m), 1698 (f), 1606 (m), 1454 (m), 1055 (m). 846 (m).

EM (m/z) 444 [ $\text{M}^+$ ], 238 [ $\text{M}^+ - 206$ ], 91 [ $\text{M}^+ - 353$ ].

## B. PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS ANTIRRETROVIRALES *IN VITRO*.

Los ensayos se realizaron con el kit Lenti-RT<sup>TM</sup> Activity Assay adquirido de la empresa sueca Cavid Tech.

El kit contiene todos los reactivos necesarios para realizar la transcripción inversa con la TI del VIH *in vitro*, con este ensayo se obtuvo el valor de  $\text{IC}_{50}$  para la nevirapina y el porcentaje de inhibición de los inhibidores no análogos de nucleósidos sintetizados.

### a. Componentes del kit.

- 2 placas poli A de 96 pozos
- 1 frasco con buffer de dilución de muestras
- 2 frascos con componentes para la reacción de la TI
- 1 frasco con buffer de reconstitución
- 1 frasco con TI estándar
- 1 frasco con buffer de lavado concentrado
- 4 piezas de cubiertas de plástico adhesivas

Estos reactivos se almacenaron a  $-20$  °C y se llevaron a temperatura ambiente mezclándolos homogéneamente al momento de la reacción.

---

---

*b. Preparación del buffer de dilución para las muestras.*

Se mezclaron 30 mL del buffer de dilución de muestras y 30 mL de agua destilada en un matraz (matraz 1) con capacidad para 100 mL.

*c. Dilución de los compuestos a analizar.*

Se colocaron 135  $\mu\text{L}$  del buffer de dilución de muestras (matraz 1) a cada uno de los 96 pozos de dos placas de microtitulo estándares. Posteriormente se agregaron 15  $\mu\text{L}$  de una solución 40 mM, en dimetilsulfóxido (DMSO), de cada compuesto analizado a los pozos de la fila A desde la columna A-1 hasta la A-12 (8 filas x 12 columnas por placa). En total fueron siete compuestos analizados más nevirapina como estándar. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

Posteriormente se transfirieron 15  $\mu\text{L}$  de la solución anterior, de los pozos de la fila A (A1-12) a los correspondientes pozos de la fila B (B1-B12), después se transfirieron 15  $\mu\text{L}$  de la solución de los pozos B a sus correspondientes pozos C (C1-C12), 15  $\mu\text{L}$  de la solución de los pozos C a sus respectivos pozos D (D1-D12) y así sucesivamente hasta llegar a los pozos G (G1-G12) de ambas placas. La serie de pozos H se usó como referencia y controles de fondo.

*d. Preparación de la mezcla de reacción.*

Se agregaron 2 mL del buffer de reconstitución al frasco que contenía los componentes para la reacción de la TI y el bromodesoxiuridinatrifosfato (BrdUTP), se mezclaron hasta que el material liofilizado se disolvió totalmente. Posteriormente se regresaron sólo 200  $\mu\text{L}$  del material disuelto al buffer de reconstitución.

---

---

*e. Preparación de las placas de poli A con las diluciones de los compuestos a analizar.*

Se tomaron las placas de poli A las cuales contenían el iniciador/molde inmovilizado y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción (punto *d*) a cada uno de los pozos de ambas placas. Posteriormente se transfirieron 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones de los diferentes compuestos de las placas de microtítulo estándares a sus correspondientes pozos de las dos placas poli A. Estas últimas se sellaron con las cubiertas adhesivas y se incubaron por 30 minutos a 33 °C.

*f. Dilución de la TI del VIH estándar.*

Se agregaron 1.25 mL del buffer de dilución de muestras, preparado (matraz 1) al frasco con la enzima TI estándar. Se mezcló totalmente hasta que el material liofilizado quedó disuelto homogéneamente. Posteriormente se agregó 1 mL de la solución resultante a un matraz (matraz 2) con capacidad para 50 mL, el cual contenía 12 mL del buffer de dilución de muestras (del matraz 1).

*g. Inicio de la reacción de la TI.*

Se tomaron las placas de poli A de la incubadora se les retiró la cubierta adhesiva y se les adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución de la enzima estándar (matraz 2) a cada uno de los pozos de las placas de poli A a excepción de los pozos H8-H12. A estos pozos (H8-12) se les adicionaron 50  $\mu\text{L}$  del buffer de dilución de muestras (del matraz 1) a ambas placas. Estas se sellaron con la cubierta adhesiva y se incubaron durante 3 horas a 33 °C con suave agitación.

*h. Componentes del Kit (segunda parte).*

- 1 frasco con buffer de lavado concentrado
- 2 frascos con producto trazador de la TI
- 1 frasco con buffer para el sustrato

- 1 frasco con tabletas de sustrato para fosfatasa alcalina
- 2 piezas de cubiertas de plástico adhesivas
- 2 tapas de plástico.

Todos estos reactivos se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

*i. Preparación de la solución de lavado.*

Se colocaron lentamente 150 mL de tritón X-100 en 1 L de agua destilada y se agitó hasta tener una mezcla homogénea. Después se agregaron 50 mL del buffer de lavado concentrado y el tritón X-100 preparado a un contenedor de 20 litros.

*j. Preparación del producto trazador.*

Se reconstituyó cada frasco de producto trazador de la TI con la adición de 12 mL de una solución al 1 % de tritón X-100 en agua destilada. Cada frasco se mezcló vigorosamente con la ayuda de un vortex hasta que el sólido se disolvió totalmente. El contenido de ambos frascos se dejó reposar antes de usar, durante 20 minutos.

*k. Finalización de la reacción de la TI en las placas.*

La reacción de la TI se detuvo, tres horas después de la incubación, mediante el lavado de las placas con solución de lavado. Se lavaron dos veces cada uno de los pozos de ambas placas poli A con 3 mL de buffer de lavado por pozo. Las placas se colocaron invertidas (a  $180^{\circ}$ ) y se secaron con papel absorbente.

*l. Inicio de la unión de la TI al producto trazador.*

Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del producto trazador a cada pozo de ambas placas poli A, teniendo cuidado de que la punta de la pipeta no tocara el pozo. Las placas se sellaron con

---

---

la cubierta adhesiva y se incubaron por 90 minutos a 33 °C en una incubadora con agitador orbital (agitación suave).

*m. Preparación de la solución del sustrato.*

Se adicionaron las tabletas del sustrato de la fosfatasa alcalina al buffer para el sustrato, el frasco se agitó hasta que las tabletas se disolvieron totalmente. La solución resultante de dejó reposar a temperatura ambiente y cubierta de la luz.

*n. Eliminación del exceso de producto trazador.*

Después de 90 minutos de incubación, el exceso de producto trazador se eliminó mediante cuatro lavados con solución de lavado a cada uno de los pozos de las placas poli A (3 mL por pozo), posteriormente las placas se invirtieron (se colocaron a 180°) y se secaron con la ayuda de papel absorbente.

*o. Inicio de la reacción con fosfatasa alcalina.*

La solución de sustrato de fosfatasa alcalina fue homogenizada y llevada a temperatura ambiente, se agregaron 125 µL de dicha solución a cada pozo de ambas placas poli A. Las placas se cubrieron con plástico y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave.

*p. Lectura de las absorbancias.*

Después de 30 minutos de incubación, las placas poli A se colocaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm y se leyó la absorbancia de cada pozo de ambas placas. La lectura de absorbancia se repitió a diferentes intervalos hasta que la lectura fue constante.

---

---

## IX. REFERENCIAS

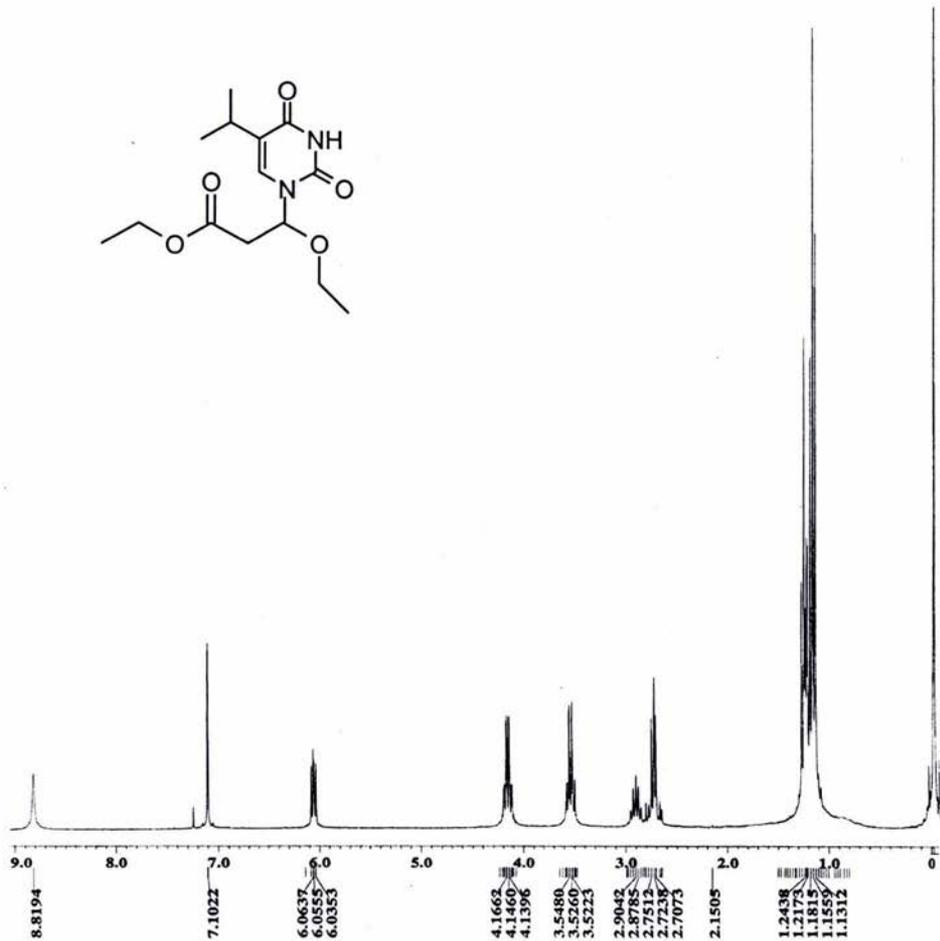
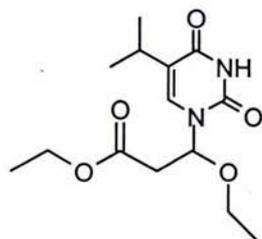
1. Rang H, Dale M, and Ritter J. *Farmacología*. 4ª ed. Barcelona: Harcourt, 2000: 762-770.
2. Tyler K, and Fields B. Introducción a los virus y las enfermedades virales. En: Mandell G., Benneth J., Dolin R. *Enfermedades infecciosas principios y práctica*. 4ª ed. Argentina: Medica panamericana, 1997: 1470-1799.
3. Teich N. Taxonomy of retroviruses. En: Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J. *RNA tumor viruses*. New York: Spring harbor. 1982: 25-207.
4. Wain H. Is antigenic variation of HIV important for AIDS and what might be expected in the future? En: Stephen S. *The evolutionary biology of viruses*. New York: Raven Press. 1994: 185-209.
5. Bishop M. Retroviruses. *Ann Rev Biochem* 1978; 47: 35-88.
6. Varmus H, and Brown P. Retroviruses. En: Howe M, Berg D. *Mobile DNA elements*. Washington, DC: American Society of Microbiology. 1989: 53-108.
7. McClure M. Evolution of retroposons by acquisition or deletion of retrovirus-like genes. *Mol Biol Evol* 1991; 8: 835-856.
8. Eickbush T. Origin and evolutionary relationship of retroelements. En: Morse S. *The evolutionary biology of viruses*. New York: Raven Press. 1994: 121-157.
9. Varmus H. Retroviruses. En Shapiro J. *Mobile genetic elements*. New York: Academic Press. 1983: 411-503.

- 
- 
10. Whitcomb J, and Hughes S. Retroviral reverse transcription and integration: Progress and problems. *Ann Rev Cell Biol* 1992; 8: 275-306.
  11. Varmus H. Retroviruses. *Science* 1988; 240: 1427-1435.
  12. Doolittle R, Feng D, Johnson M., and McClure M. Origins and evolutionary relationship of retroviruses. *Quarter Rev Biol* 1989; 64: 1-30.
  13. Fuetterer J, and Hohn T. Involvement of nucleocapsids in reverse transcription: a general phenomenon? *TIBS* 1987; 12: 92-95.
  14. Doolittle R, Feng D, and McClure M, Johnson M. Retroviruses phylogeny and evolution. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 157: 1-17.
  15. Weiner A, Deininger P, and Efstratiadis A. Non viral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by reverse flow of genetic information. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 631-661.
  16. Temin H. Reverse transcription in the eukaryotic genome: retrovirus, pararetrovirus, retrotransposons, and retrotranscripts. *Mol Biol Evol* 1985; 2: 455-468.
  17. Velasco A, Valverde V y Lazcano A. Taxonomía y evolución de los retrovirus. En: Ponce de León S., Rangel-Frausto S. *SIDA Aspectos clínicos y terapéuticos*. México: McGraw-Hill Interamericana. 2000: 21-24.
  18. Duhne M. El SIDA en el nuevo milenio. *¿Cómo ves?* 2000; 25: 10-14.
  19. Tortora G y Reynolds S. *Principios de anatomía y fisiología*. 7ª ed. Madrid: Harcourt. 2000: 435-563.
  20. Vargas L. Las guerras del cuerpo. *¿Cómo ves?* 2000; 24: 30-33.

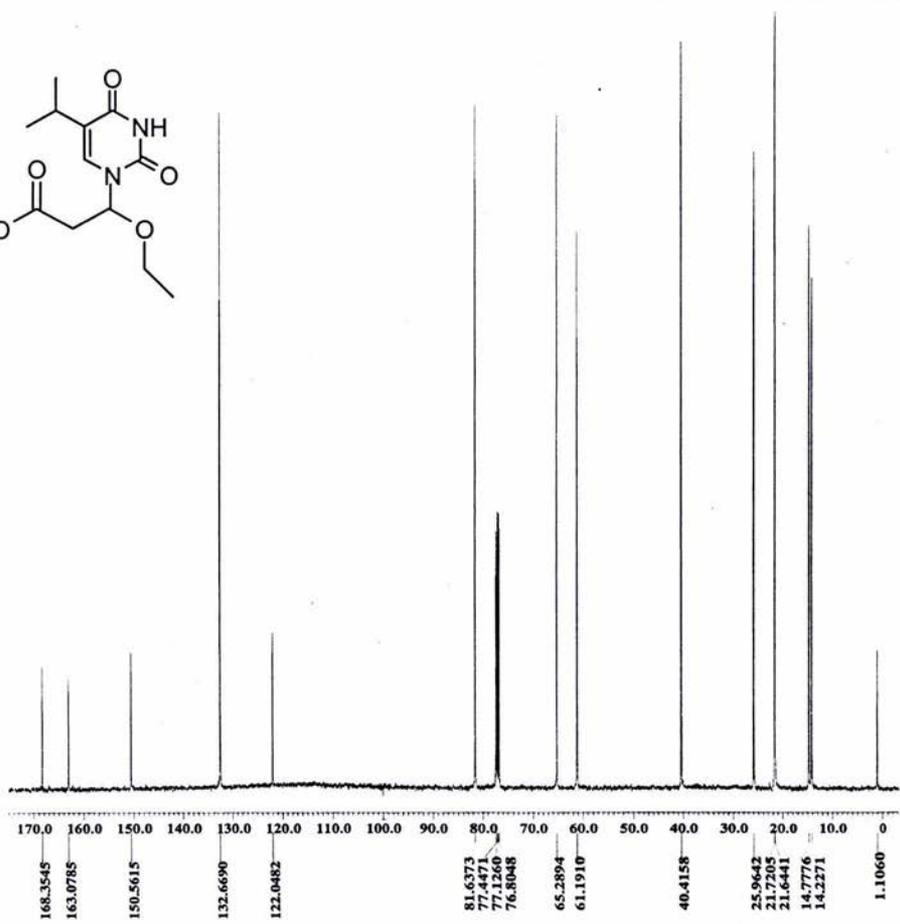
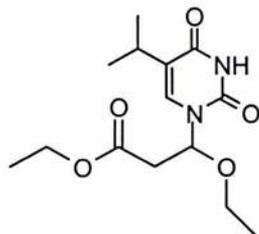
- 
- 
21. Rangel-Frausto S. Tratamiento antirretroviral. En: Ponce de León S., Rangel-Frausto S. SIDA Aspectos clínicos y terapéuticos. México: McGraw-Hill Interamericana. 2000: 441-452.
  22. De Clerq E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral Res* 1998; 38: 153-179.
  23. Hopkins A. Complex of HIV-1 reverse transcriptase with inhibitors of the HEPT series reveals conformational changes relevant to the design of potent non-nucleoside inhibitors. *J Med Chem* 1996; 39:1589-1600.
  24. Garg R, Gupta S, Gao H, Babu M, Debnath A, and Hansch C. Comparative quantitative structure-activity relationship studies on anti-HIV drugs. *Chem Rev* 1999; 99: 3525-3601.
  25. Avendaño C y Menéndez J. Conceptos básicos en química farmacéutica. En: Avendaño C. Introducción a la química farmacéutica. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1993: 1-5.
  26. Monge A. Evolución de los métodos de búsqueda y descubrimiento de fármacos. En: Avendaño C. Introducción a la química farmacéutica. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1993: 31-46.
  27. Menéndez J y Avendaño C. La modificación molecular como método de búsqueda de nuevos fármacos. En: Avendaño C. Introducción a la química farmacéutica. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1993: 47-72.
  28. Tietze L F, Voss E, and Hartfiel U. Synthesis of alkyl propanoates by a haloform reaction of a trichloro ketone: preparation of ethyl 3,3-diethoxy-, ethyl ester. *Org Synth* 1988: 238-244.

- 
- 
29. Vorbrüggen H, Krolikiewics K, and Bennua B. Nucleoside synthesis with trimethylsilyl triflate and perchlorate as catalysts. *Chem Ber* 1981; 114: 1234-1255.
  30. Vorbrüggen H, and Bennua B. A new simplified nucleoside synthesis. *Chem Ber* 1981; 114: 1279-1286.
  31. Finney D. *Statistical method in biological assay*. 3<sup>rd</sup> ed. USA: MacMillan Publishing. 1978: 469.
  32. Shao X, Rytting A, Ekstrand D, Vrang L, Källander C, and Gronowitz J. Colorimetric assays for evaluation of the mode of action of human immunodeficiency virus type 1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Ant Chem Chemother* 1998; 9: 167-176.
  33. Yuasa S, Sadakata Y, Takashima H, Sekiya K, Inouye N, Ubasawa M, and Baba M. Selective and synergistic inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by a non-nucleoside inhibitor, MKC-442. *Mol Pharm* 1993; 44: 895-900.

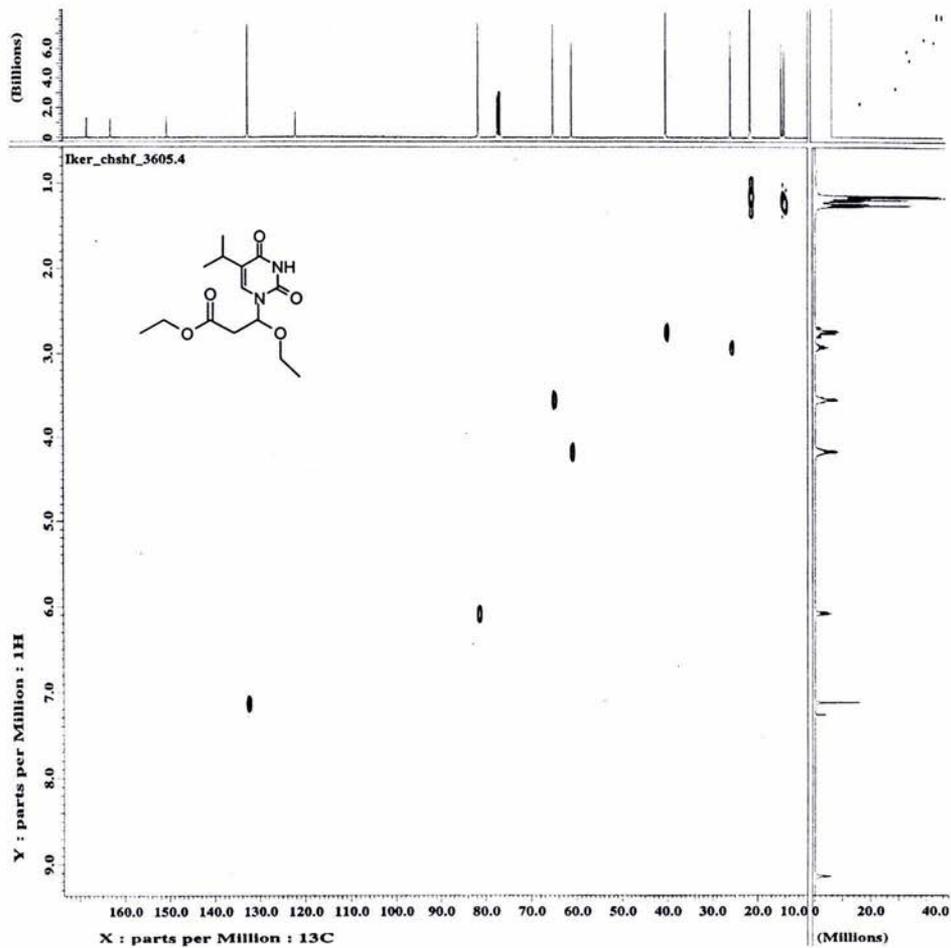
# APÉNDICE



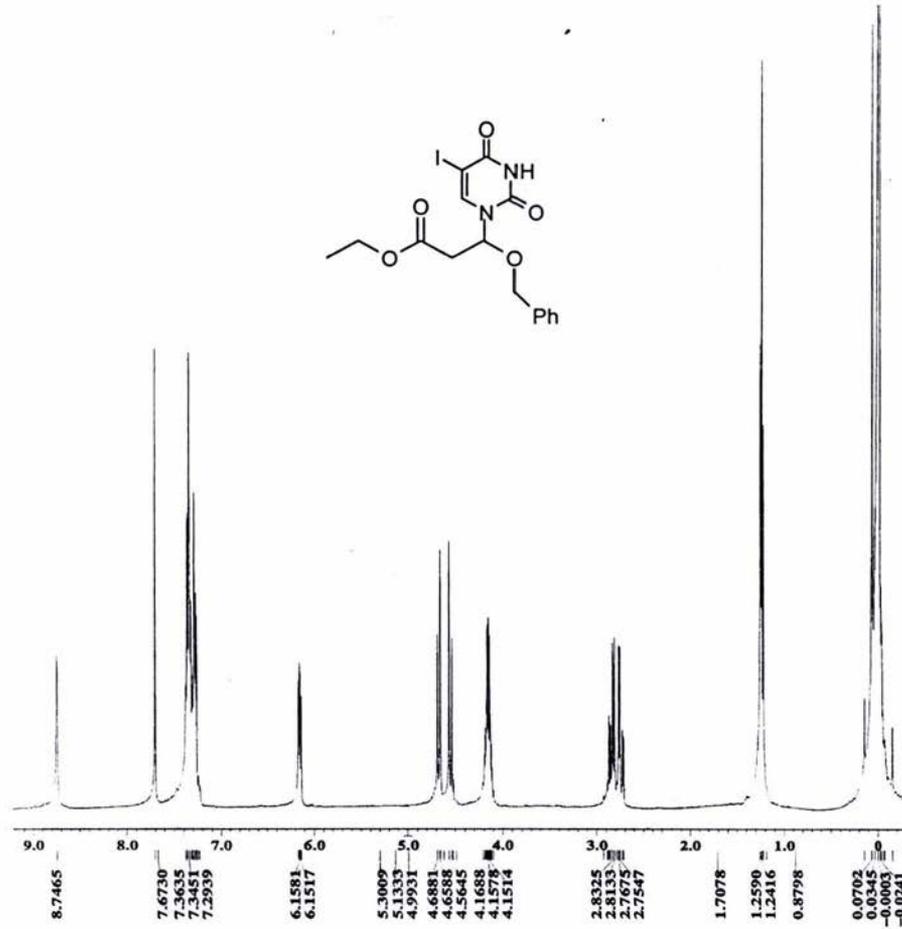
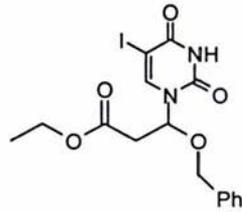
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para 3-(5-isopropiluracil)-3-etoxipropanoato de etilo (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



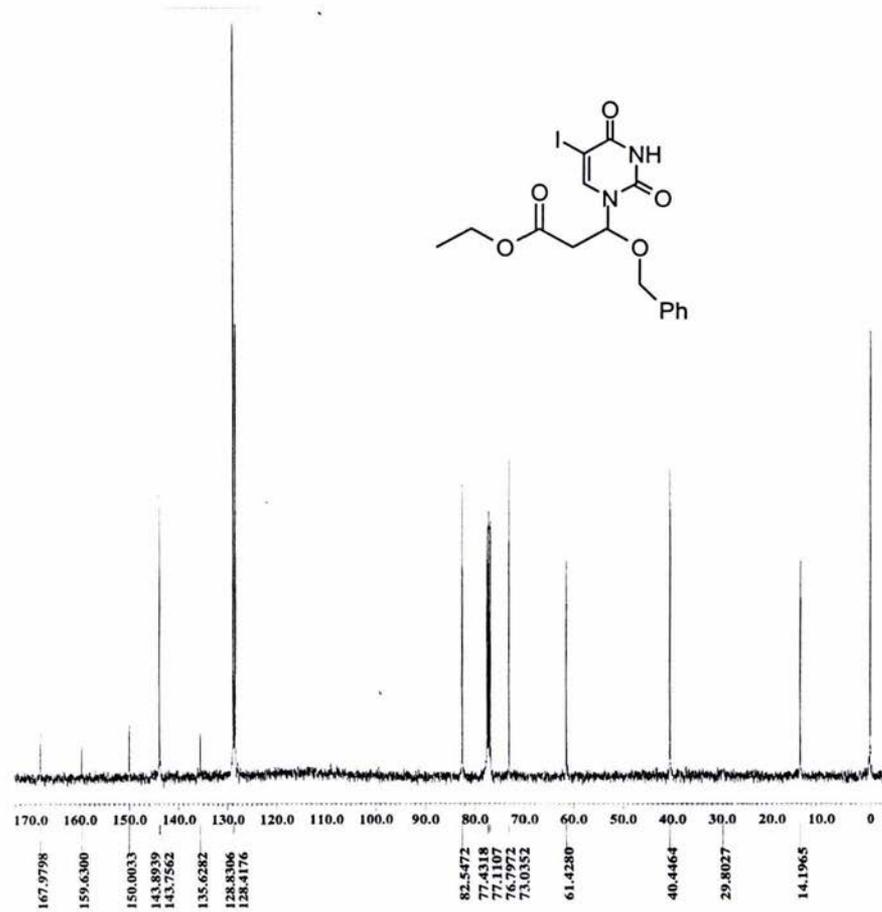
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para 3-(5-isopropiluracil)-3-etoxipropanoato de etilo (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



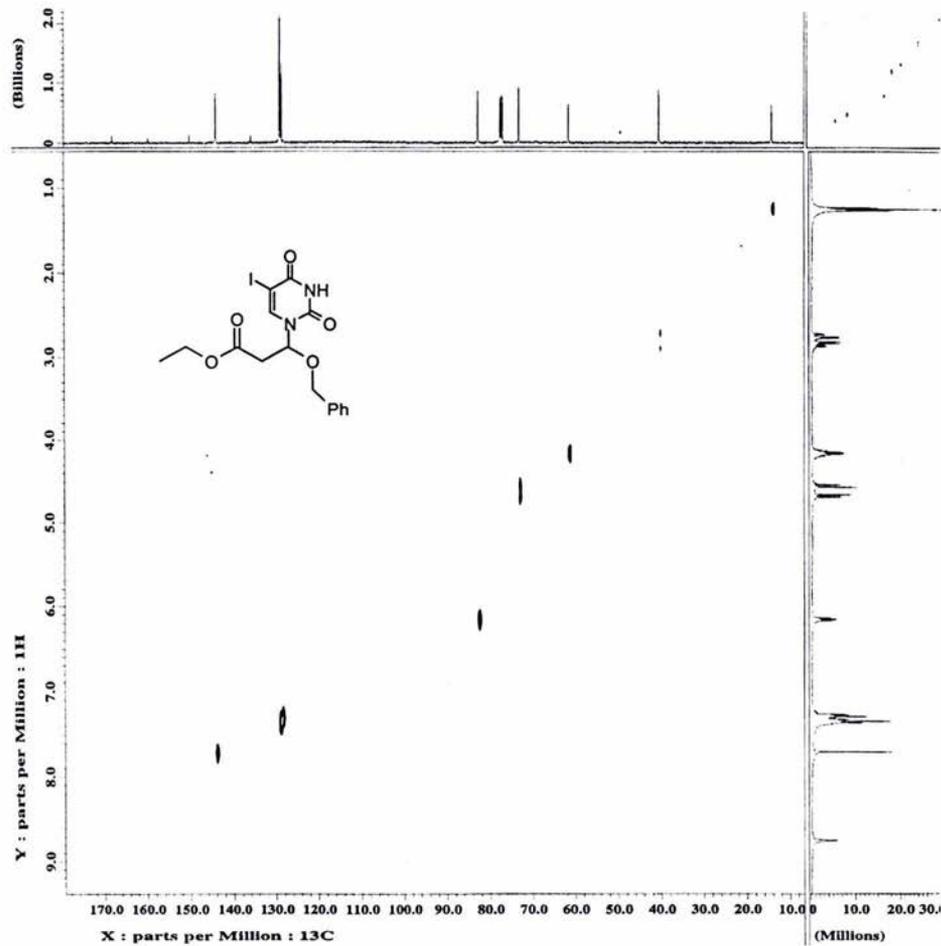
Espectro HETCOR  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN para 3-(5-isopropiluracil)-3-etoxipropanoato de etilo (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para 3-(5-yodouracil)-3-benciloxipropoato de etilo (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para 3-(5-yodouracil)-3-benciloxipropanoato de etilo (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Espectro HETCOR  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN para 3-(5-yodouracil)-3-benciloxipropanoato de etilo (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

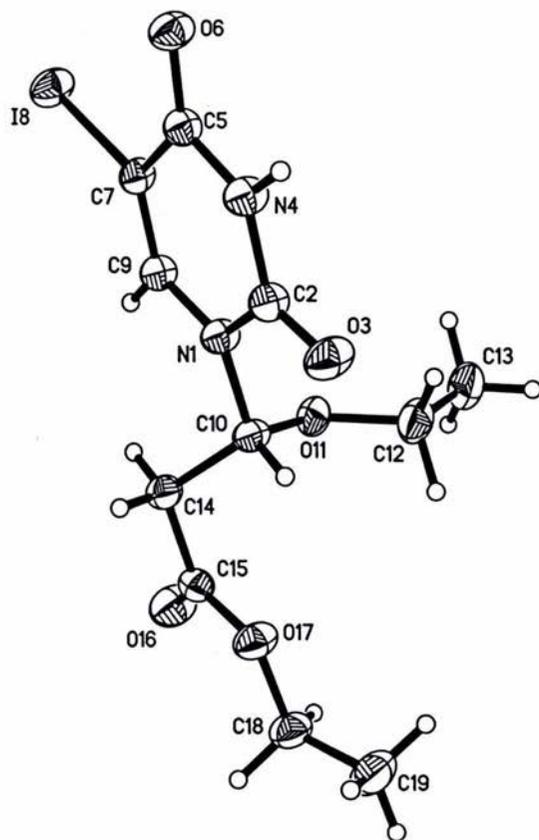


Diagrama ORTEP para 3-(5-yodouracil)-3-etoxipropanoato de etilo (12).

Datos cristalográficos para 3-(5-yodouracil)-3-etoxipropanoato de etilo:

Fórmula	$C_{11} H_{15} I N_2 O_5$
Peso molecular	382.15
Tamaño del cristal (mm)	0.3 x 0.3 x 0.75
Color	Incoloro
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo especial	P -1
a, (Å)	8.2004(3)
b, (Å)	8.3320(3)
c, (Å)	11.1459(4)
$\alpha$ , (°)	108.840(2)
$\beta$ , (°)	90.561(2)
$\gamma$ , (°)	103.427(2)
V, (Å <sup>3</sup> )	698.07(4)
Z	2
Densidad calculada, (Mg/m <sup>3</sup> )	1.818
Coefficiente de absorción (mm <sup>-1</sup> )	0.033(4)
$\mu$ [mm <sup>-1</sup> ]	2.311
F(000)	376
2 $\theta$ (°) Rango para colección de datos	54.90
Temperatura (K)	293(2)
Reflexiones colectadas	5152
Reflexiones independientes	3093
Reflexiones observadas (4 $\sigma$ )	2735
Programa utilizado	SHELXL (Sheldrick 1997)
Relación datos-parámetros	3093:0:187
Indices R finales [F>4 $\sigma$ (F)]	R1 = 0.0287, wR2 = 0.0696
Indices R (todos los datos)	R1 = 0.0348, wR2 = 0.0733

**Longitudes de enlace (Å)**

C(19)-C(18)	1.491(5)	C(19)-H(19A)	0.9600
C(19)-H(19B)	0.9600	C(19)-H(19C)	0.9600
C(2)-O(3)	1.208(3)	C(2)-N(4)	1.383(3)
C(2)-N(1)	1.393(3)	C(5)-O(6)	1.229(3)
C(5)-N(4)	1.374(4)	C(5)-C(7)	1.444(3)
C(7)-C(9)	1.346(4)	C(7)-I(8)	2.071(3)
C(9)-N(1)	1.374(3)	C(9)-H(9)	0.94(3)
C(10)-O(11)	1.405(3)	C(10)-N(1)	1.485(3)
C(10)-C(14)	1.517(4)	C(10)-H(10)	0.9421
C(12)-O(11)	1.434(4)	C(12)-C(13)	1.485(5)
C(12)-H(12A)	1.0103	C(12)-H(12B)	1.0103
C(13)-H(13A)	0.9600	C(13)-H(13B)	0.9600
C(13)-H(13C)	0.9600	C(14)-C(15)	1.513(4)
C(14)-H(14A)	0.9356	C(14)-H(14B)	0.9356
C(15)-O(16)	1.193(4)	C(15)-O(17)	1.333(4)
C(18)-O(17)	1.460(3)	C(18)-H(18A)	0.9935
C(18)-H(18B)	0.9935	N(4)-H(4)	0.81(4)

**Ángulos de enlace (°)**

C(18)-C(19)-H(19A)	109.5	C(18)-C(19)-H(19B)	109.5
H(19A)-C(19)-H(19B)	109.5	C(18)-C(19)-H(19C)	109.5
H(19A)-C(19)-H(19C)	109.5	H(19B)-C(19)-H(19C)	109.5
O(3)-C(2)-N(4)	122.0(2)	O(3)-C(2)-N(1)	123.7(2)
N(4)-C(2)-N(1)	114.3(2)	O(6)-C(5)-N(4)	121.0(2)
O(6)-C(5)-C(7)	125.2(2)	N(4)-C(5)-C(7)	113.9(2)
C(9)-C(7)-C(5)	119.7(2)	C(9)-C(7)-I(8)	121.65(18)
C(5)-C(7)-I(8)	118.47(18)	C(7)-C(9)-N(1)	123.0(2)
C(7)-C(9)-H(9)	121(2)	N(1)-C(9)-H(9)	116(2)
O(11)-C(10)-N(1)	109.7(2)	O(11)-C(10)-C(14)	108.1(2)
I(1)-C(10)-C(14)	111.2(2)	O(11)-C(10)-H(10)	109.2
N(1)-C(10)-H(10)	109.2	C(14)-C(10)-H(10)	109.2
O(11)-C(12)-C(13)	109.2(3)	O(11)-C(12)-H(12A)	109.8
C(13)-C(12)-H(12A)	109.8	O(11)-C(12)-H(12B)	109.8
C(13)-C(12)-H(12B)	109.8	H(12A)-C(12)-H(12B)	108.3
C(12)-C(13)-H(13A)	109.5	C(12)-C(13)-H(13B)	109.5
H(13A)-C(13)-H(13B)	109.5	C(12)-C(13)-H(13C)	109.5
H(13A)-C(13)-H(13C)	109.5	H(13B)-C(13)-H(13C)	109.5
C(15)-C(14)-C(10)	110.8(2)	C(15)-C(14)-H(14A)	109.5
C(10)-C(14)-H(14A)	109.5	C(15)-C(14)-H(14B)	109.5
C(10)-C(14)-H(14B)	109.5	H(14A)-C(14)-H(14B)	108.1
O(16)-C(15)-O(17)	124.2(3)	O(16)-C(15)-C(14)	124.4(3)

O(17)-C(15)-C(14)	111.4(2)	O(17)-C(18)-C(19)	106.9(3)
O(17)-C(18)-H(18A)	110.3	C(19)-C(18)-H(18A)	110.3
O(17)-C(18)-H(18B)	110.3	C(19)-C(18)-H(18B)	110.3
H(18A)-C(18)-H(18B)	108.6	C(9)-N(1)-C(2)	120.9(2)
C(9)-N(1)-C(10)	120.5(2)	C(2)-N(1)-C(10)	118.1(2)
C(5)-N(4)-C(2)	128.2(2)	C(5)-N(4)-H(4)	118(3)
C(2)-N(4)-H(4)	114(3)	C(10)-O(11)-C(12)	114.9(2)
C(15)-O(17)-C(18)	116.1(2)		