



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DEL ACYCLOVIR. USO DE NUEVOS  
CATALIZADORES, CONDICIONES DE REACCIÓN Y TÉCNICAS  
DE CARACTERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN SELECTIVA  
DEL INTERMEDIARIO N<sup>2</sup>-ACETIL-N<sup>9</sup>-  
[(ACETOXIETOXI)METIL]-GUANINA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Q U Í M I C O**

**PRESENTA:**

**JOSÉ ENRIQUE HERBERT PUCHETA.**

**Asesor: Dr. Ángel Guzmán Sánchez.**

**MÉXICO, D.F.**

**2007**

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Mesa del jurado:**

Presidente: Dr. Ángel Guzmán Sánchez.

Vocal: Q. Consuelo García Manrique.

Secretaria: Q. Ernestina Cervera Flores.

Suplentes:

Ana Adela Sánchez Mendoza.

Laura Alicia Acevedo Arteaga.

El presente trabajo fue desarrollado en el Instituto de Química de la UNAM, en los laboratorios 1-1 y 1-5, sección Síntesis Orgánica bajo la asesoría del Dr. Ángel Guzmán Sánchez y con co-asesoría del Dr. Eduardo Díaz Torres.

## **Agradecimientos.**

Este trabajo esta dedicado para aquellas personas que creyeron en mí; que estuvieron en las buenas pero sobre todo en las malas.

Agradezco infinitamente al Dr. Ángel Guzmán Sánchez por haberme dado el honor de trabajar a su lado y sobre todo por brindarme la oportunidad de aprender del mejor.

A mi madre, que quizás nunca encuentre las palabras precisas que describan lo agradecido que estoy con ella. Gracias a tu amor, tu cariño, tus enseñanzas, tu comprensión, tu paciencia, tus desvelos, tu apoyo y por tu enorme fe, he podido llegar hasta aquí. Muchas gracias mama, te amo.

A mi hermano que me enseñó a no tenerle miedo a nada en esta vida. Muchas gracias poderoso Astro por ser una luz en mi camino, por ser mi mejor amigo, por siempre estar presente de manera incondicional, por enseñarme el lado divertido de la química y por darme la oportunidad de aprender a diario algo de la hermosa persona que eres. El King te amará por siempre.

A Luís Manuel Cárdenas que llegó a nuestras vidas cuando más le necesitamos y enseñarme lo que un padre es capaz de hacer por amor a un hijo. A tu lado somos una excelente familia y mi desarrollo se debe en gran parte al profundo amor y enorme admiración que te tengo.

A Paula, al amor de mi vida, la mujer de mis sueños y eterna compañera. A tu lado he conocido la felicidad plena, a aprender de mis errores, a tener con quién compartir mis triunfos y llorar mis fracasos, a nunca rendirme, a ser una mejor persona... Gracias por tu valor, tus cuidados, tus enseñanzas, tu amor; gracias por quedarte a mi lado. Te amo con toda mi alma.

Para mis hermanos que la vida me fue regalando poco a poco y que me han hecho inmensamente feliz (en orden de aparición): A Gustavo (Jimmy) que siempre éstas para darme las palabras precisas para salir adelante, a David (Gordito) que me has enseñado lo divertido que puede ser vivir y que siempre me arrancas una sonrisa, a Michel (I.C. Stewey de l'etoile Massahelapetilion) a quien con sus múltiples regaños y su increíble forma de ver la vida me has regalado un sinfín de enseñanzas (gracias por dejarme crecer a tu lado), a Oscar (Nutria) quien fue, es y será siempre un gran ejemplo para mi.

A Cuahutémoc, Gerardo, M.A.Vilchis, M.A.Martínez, Javier, Mauricio, Sra. Violeta y Flor a quienes los llevo en la mente y en el corazón. Somos un gran equipo y seremos una gran familia por siempre.

---

También dedico este trabajo para aquellas personas a las que la distancia sólo ha logrado acercarnos más y que sin importar que tan lejos estén no los olvido ni un solo instante.

A Boleto y Juliana que me demuestran a diario su amor. Gracias por no dejarnos solos ni un solo instante, por ser un ejemplo a seguir, por ser las mejores tías, hermanas y mamás del mundo.

A mi abuelo José por ser mi ejemplo a seguir en la ciencia y en muchas otras artes de la vida. A mi abuela Malena por demostrarme que a lado de un gran hombre siempre existirá una extraordinaria mujer, por enseñarme esos matices tan fantásticos que puede tener la vida y a ambos por su apoyo incondicional.

A mi papa, quien me dio la oportunidad de vivir y a quien extraño profundamente.

A mi primo Jean Louis con quien he vivido una cantidad incalculable de experiencias. Todo eso bueno y malo que hemos vivido juntos ha sido un honor compartirlo a tu lado. Bien podría escribir otra tesis sólo para decirte lo que significas en mi vida mi querido inge pero en verdad te agradezco toda tu confianza y todo tu amor (aunque se oiga medio “choto”: te amo compa).

A mi prima Ericka (ñu) quien es una extraordinaria mujer en toda la extensión de la palabra, la mejor cazamomias de toda la región, una hija ejemplar, un poco regañona, pero un gran ser humano.

A toda mi familia en verdad les agradezco en el alma lo que han hecho por mi.

Jamás olvidaría agradecer a algunos de los grandes Químicos con los que viví esta hermosa experiencia:

-Ajax: de lo mejor en Física y Química que hay en este país, un gran científico, boxeador y amigo.

-Ariel: el mejor fisicoquímico, poeta y loco que he conocido.

-Ely: Una trucha para las Ciencias Químicas en general, una gran amiga y una excelente persona que todo lo que se propone lo cumple.

-Ángel: Mi eterno compañero de laboratorio, gran Químico del Estado Sólido, un picudo en la bici y un excelente ser humano.

-Karen: Próxima mejor investigadora forense. Te agradezco todo lo que vivimos juntos.

-Rafa: Cuando a uno se le da esto de la ciencia hasta con los gises es bueno (¿verdad Rafita?)

-Mariana Esquivelzeta: Dime algo que no sepas, te admiro mucho amiga y jamás olvidaré esas charlas con todo y tabaquín afuera del Instituto.

-Paola: Excelente inorgánica, buena para los Rayos X y un completo desm...

-Sofía: Me siento muy honrado por tu amistad, veras que muy pronto alcanzarás las estrellas (de la galaxia de Andrómeda)

-José Manuel Méndez S.: Todo un mentor en mi carrera, le agradezco profundamente que ame de esa manera a la Química Orgánica y a la vida.

-Ernestina Cervera: Gracias por su paciencia al leer y corregir este trabajo y muchas gracias por enseñarme una de mis grandes pasiones, la espectroscopia de RMN.

-Consuelo García Manrique: Le agradezco la paciencia con la que leyó mi trabajo y será un honor compartir proyectos a su lado.

-Guadalupe Vélez P: Sin duda la mejor bioquímica del mundo, de las mejores experiencias en cátedra que he recibido en toda mi vida y una inigualable persona a la que quiero y respeto mucho.

-Dr. Eduardo Díaz Torres: Por ser mi ejemplo a seguir en la espectroscopia de RMN.

Es imposible agradecer a todas las personas que de alguna manera han contribuido para que haya logrado llegar hasta aquí pero estaré eternamente en deuda con todos ustedes.

---

<b>Tabla de contenido.</b>		Pag.
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
	2.1. Fármacos antivirales.	3
	2.2. Metabolismo del virus de DNA en la célula huésped.	3
	2.3. Características y generalidades de los antivirales.	4
	2.4. Acyclovir-Zovirax como fármaco contra virus herpéticos.	4
	2.5. Mecanismos de acción y de resistencia.	5
3.	ANTECEDENTES	8
	3.1. Síntesis de Schaeffer a partir de dicloropurinas. Primeros intentos para obtener acyclovir.	9
	3.2. Ruta sintética de Barrio.	11
	3.3. Reacciones catalíticas para obtener selectivamente aciclonucleósidos sustituidos en N-9.	13
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
5.	OBJETIVOS	22
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	23
	6.1. Características del esqueleto purínico utilizado como materia prima.	23
	6.2. Influencia del pH en la síntesis selectiva de aciclonucleósidos N-9 sustituidos utilizando ácidos sulfónicos como catalizadores.	24
	6.3. Reproducción de la síntesis de N <sup>2</sup> -acetil-N <sup>9</sup> -[(2-acetoxietoxi)metil]-guanina (2a) y N <sup>2</sup> -acetil-N <sup>7</sup> -[(2-acetoxietoxi)metil]-guanina (2b) por el método de Matsumoto.	26

	<b>Tabla de contenido.</b>	Pag.
	6.4. Modificación de las condiciones cromatográficas.	30
	6.5. Diferencias espectroscópicas entre (2a) y (2b) como método de caracterización por Resonancia Magnética Nuclear.	31
	6.6. Estudio del acoplamiento catalítico para la formación de aciclonucleósidos sustituidos en N-9 y selectividad mediante la utilización de catalizadores de tipo ácido sulfónico.	41
	6.7. Síntesis y caracterización del acyclovir (1a).	50
7.	<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	52
	-Métodos de preparación de intermediarios y producto final.	55
	-Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados.	71
8.	<b>CONCLUSIONES</b>	75
9.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	77

## 1. Introducción.

Resulta asombroso el aumento de enfermedades virales (virus de inmunodeficiencia humana, virus de papiloma humano etc.) que día a día quitan la vida a miles de seres humanos. A pesar de ello ya se conocen un sinnúmero de fármacos que pueden controlar el crecimiento del virus dentro de las células. Quizás de los logros más importantes de la bioquímica y la biología molecular<sup>32</sup> fue descubrir que los virus no poseen aparato metabólico propio y necesitan el de las células huésped para poder desarrollarse. A partir de ello se han logrado sintetizar varios fármacos antivirales, resultado de la comprensión de los mecanismos de acción del medicamento y los posibles mecanismos de resistencia que logra desarrollar el virus una vez hospedado en la célula animal o vegetal.

Desafortunadamente el camino por recorrer parece todavía muy extenso puesto que a reserva de que ya se conocen y comercializan una gran cantidad de antivirales éstos resultan bastante limitados para un tipo exclusivo de virus, la inmensa mayoría solo logra controlar y no erradicar la enfermedad. En otros casos el costo del fármaco es elevadísimo por varias razones, entre las cuales destaca la complejidad de sintetizar tanto los intermediarios como los propios antivirales.

El papel que ha tomado la síntesis orgánica en la batalla para erradicar las enfermedades virales ha resultado extraordinaria, sin embargo como analizaremos más adelante (Capítulo 3) existen una serie de inconsistencias en algunos trabajos publicados en los últimos 30 años que al tomarse ahora como referencias para comprender la química de los antivirales sintéticos, se han creado lagunas que hoy en día su solución podrían representar la clave para poder llegar a cumplir importantes metas como abatir los costos de manufactura.

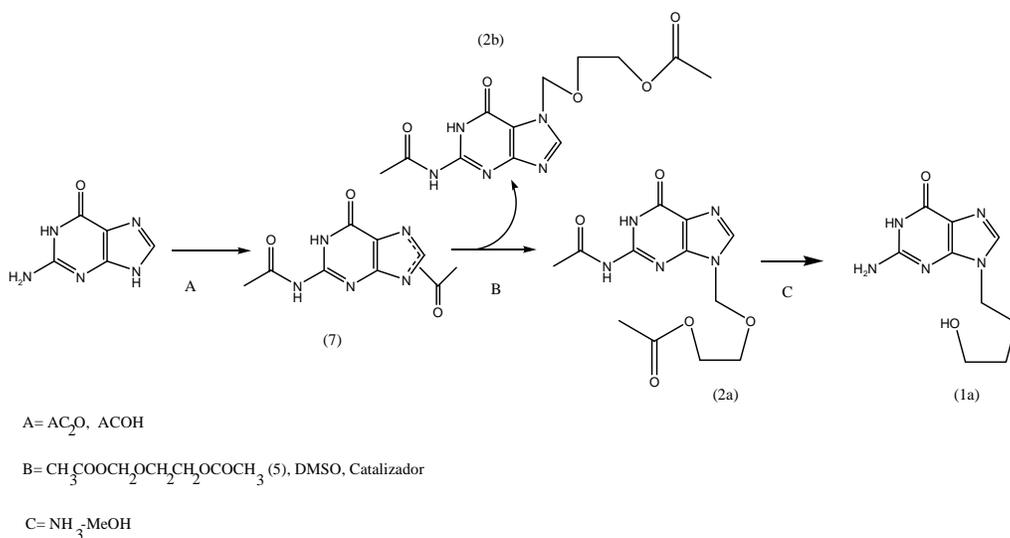
Este trabajo se limita a la química de los nucleósidos análogos sintéticos<sup>6,7</sup> para prevenir enfermedades virales herpéticas (tales como virus de herpes simple tipo 1 y 2 [HSV-1, HSV-2, respectivamente], virus de varicela-zoster [VZV], etc.) y específicamente a la síntesis económica y prácticamente total del fármaco Acyclovir-Zovirax ( $N^9$ -[(2-hidroxi)etoxi]metil] guanina) (1a).

A la fecha, el acyclovir es uno de los agentes antivirales más conocidos a nivel mundial y uno de los agentes antiherpéticos más potentes, sin embargo el desarrollo de una síntesis económica que logre rendimientos aceptables, superiores al 80% han sido escasamente

reportados y en la mayoría de los mismos resulta muy complicado reproducir los resultados.

Actualmente se puede consultar en la bibliografía más actualizada<sup>45</sup> que la síntesis más conveniente y económica del acyclovir es a partir de 7-H-guanina pero desgraciadamente se obtiene un rendimiento máximo de (1a) del 43% a partir de la materia prima inicial. Es por esto que el tema de esta tesis corresponde a la investigación necesaria para tratar de mejorar este bajo rendimiento.

El presente trabajo propone una mejora a la colección de trabajos reportados desde finales de la década de los setenta pero específicamente a la secuencia de 3 pasos propuesta por Matsumoto y Kaneko. [Matsumoto H., Kaneko C., Yamada K., Takeuchi T., Mori T., “A convenient synthesis of 9-(2-hydroxiethoxymethyl)guanine (Acyclovir) and related compounds.” *Chem.Pharm.Bull.* **36** [3], 1153 (1988)] descrita de manera general en el esquema (1.1)



**Esquema 1.1. Ruta sintética de Matsumoto y Kaneko para la obtención de acyclovir (1a) a partir de guanina. Esta síntesis incluye la preparación del intermediario N2-N9-diacetilacyclovir (2a) y la separación por cromatografía del isómero (2b).**

Una repetición de estos tres pasos demuestra que el bajo rendimiento se debe en gran parte al deficiente método para sintetizar, purificar y caracterizar el intermediario precursor del acyclovir  $N^9$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina (2a). Mejorando estos tres pasos sintéticos se podrían incrementar los rendimientos reportados para (2a) de 66% y para (1a) de 43%.

## 2. Fundamentos teóricos

### 2.1. Fármacos antivirales.<sup>6,31</sup>

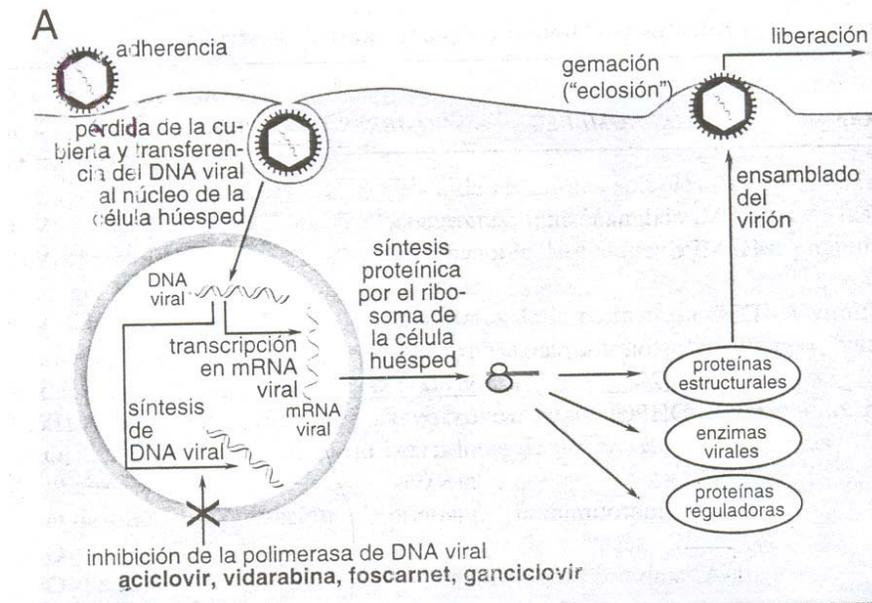
Todo virus está compuesto ya sea de DNA o RNA de una o doble hebra dentro de una cubierta llamada cápside.

Los virus no poseen un aparato metabólico propio y por ello utilizan el de la célula que invaden y según el tipo de virus, pueden ser de origen vegetal, bacteriano o animal.<sup>32</sup>

Los virus de DNA (y sus enfermedades) incluyen *poxvirus* (viruela), *virus herpético* o *herpesvirus* (varicela, herpes zoster y otros herpes), *adenovirus* (conjuntivitis o faringitis) y *papiloma virus* (papilomas o verrugas).

### 2.2. Metabolismo del virus de DNA en la célula huésped.<sup>6,30</sup>

De un modo muy característico, los virus de DNA penetran en el núcleo de la célula huésped en donde el ácido nucleico en cuestión es transcrito en el RNA mensajero (mRNA) por acción de la mRNA polimerasa de la célula huésped; el mRNA es traducido en la forma usual por las células del huésped, en proteínas específicas del virus.



**Figura 2.1. Inserción del DNA viral a la célula huésped. El mapa metabólico señala el punto en donde actúan los antivirales.**

### 2.3. Características y generalidades de los antivirales.<sup>30,31</sup>

Las experiencias al obtener compuestos antivirales han aportado datos generales útiles y trascendentes en la práctica como:

- No obstante que muchos compuestos muestran actividad antiviral *in vitro*, algunos atacan la función de la célula huésped y se acompañan por toxicidad inaceptable en seres humanos.
- En forma característica, los medicamentos eficaces tienen un espectro limitado de actividad antiviral y actúan o atacan una proteína viral específica, con mayor frecuencia una enzima (polimerasa o transcriptasa) que interviene en la síntesis del ácido nucleico del virus.
- La eficacia clínica depende de obtener concentraciones inhibidoras en el sitio de la infección casi siempre dentro de células infectadas; por ejemplo, es importante que los análogos de los nucleósidos sean captados y fosforilados en el interior de la célula para que sean activos.

### 2.4. Acyclovir-Zovirax como fármaco contra virus herpéticos.<sup>6, 19-20</sup>

La infección por el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) ocasiona enfermedades en boca, cara, piel, esófago y cerebro. El virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2) suele ocasionar infecciones en genitales, recto, piel, manos o meninges.

El primer medicamento contra el virus herpético de administración sistemática y utilidad probada fue la *Vidarabina*, cuyo uso se aprobó en Estados Unidos en el año de 1977; sin embargo su toxicidad podía ocasionar que el tratamiento para infecciones por los virus HSV y de varicela zoster (VZV) podían ser letales para seres humanos.

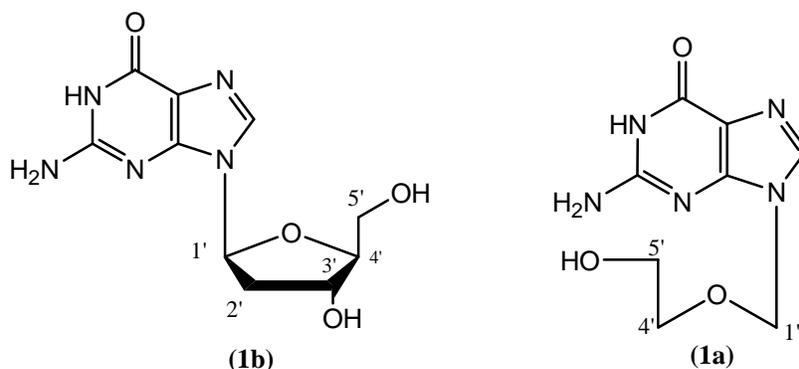
El descubrimiento y obtención del Acyclovir<sup>7</sup>, aprobado inicialmente en 1976, sentó las bases para el primer tratamiento eficaz contra infecciones por HSV y VZV.

De manera general, el Acyclovir actualmente se utiliza para disminuir el dolor y acelerar la curación de heridas o llagas en personas que presentan o padecieron varicela, herpes bucal o herpes genital. También puede ser utilizado para tratar infecciones en la piel causadas por el herpesvirus denominado *Eczema herpeticum* y previene infecciones en la piel, ojos, nariz y boca en pacientes con el virus de inmunodeficiencia adquirida.

El acyclovir se expende en cápsula, en pomada o en polvo para uso por vía intravenosa. El espectro antiviral clínicamente útil del acyclovir se limita a los virus herpéticos. In vitro, presenta la máxima actividad antiviral contra HSV-1 ( $IC_{50}$  entre 0.02-0.9 $\mu$ g/mL) y un tanto menos activo contra HSV-2 ( $IC_{50}$  entre 0.03-2.2 $\mu$ g/mL); unas 10 veces menos potente contra VZV ( $IC_{50}$  entre 0.8-4.0 $\mu$ g/mL) y mucho menos activo contra citomegalovirus (CMV) (comúnmente la concentración mínima inhibitoria  $IC_{50}$  es mayor a 20 $\mu$ g/mL).<sup>20, 31</sup>

### 2.5. Mecanismos de acción y de resistencia.<sup>6, 19-20, 31</sup>

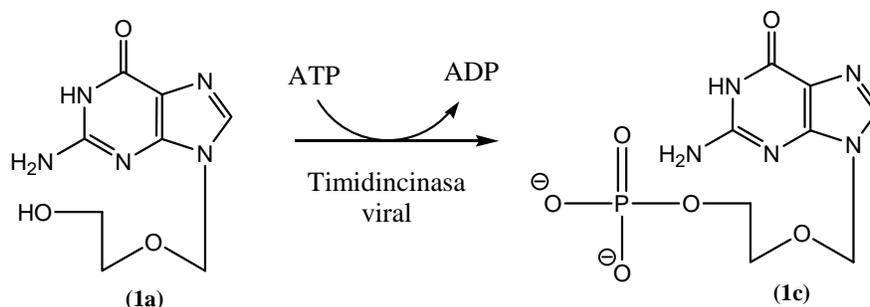
El acyclovir es el prototipo de un grupo de nucleósidos análogos antivirales que son fosforilados dentro de la célula por una cinasa viral para volverse inhibidores de la síntesis de DNA del virus. Parte de esta acción químicamente se debe a que el compuesto antiviral no posee el radical 3'-hidroxil de la cadena lateral, análoga a una pentosa.



**Figura 2.2.** Estructura de la guanosina (1b) y el acyclovir (1a). A diferencia del nucleósido, la acicloguanosina posee un análogo de pentosa de cadena abierta sin los átomos de carbono C-2' y C-3'

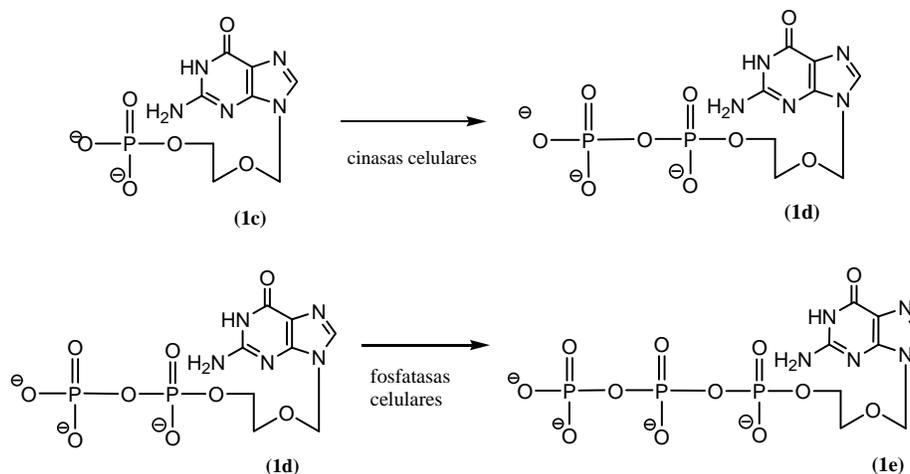
#### 2.5.1. Mecanismos de acción.

La selectividad de acción antiviral depende de la interacción con dos proteínas virales diferentes.<sup>6</sup> El acyclovir tiene una alta afinidad a ser monofosforilada por la cinasa viral timidincinasa (TK) que únicamente se hace presente en células afectadas por el virus.



**Figura 2.3.** La monofosforilación del acyclovir únicamente se lleva a cabo en células infectadas por el virus herpético debido a la alta afinidad que tiene como sustrato de la enzima viral Timidincinasa.

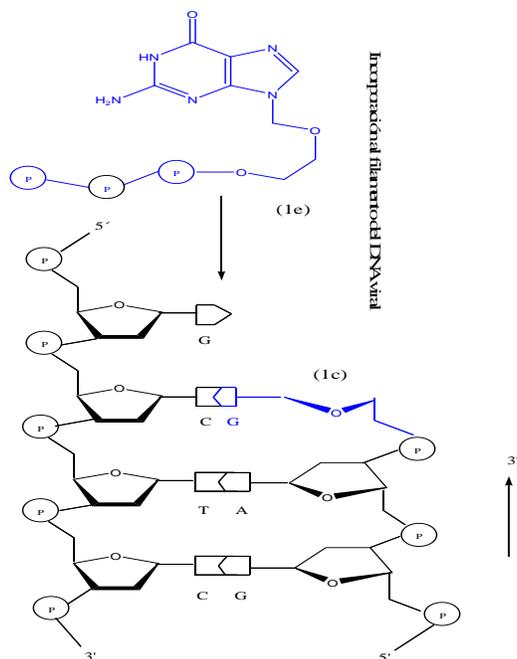
Las enzimas celulares son las responsables de sintetizar acyclovir difosfato (1d) y acyclovir trifosfato (1e) a partir del acyclovir monofosfato (1c) citado en el punto anterior.



**Figura 2.3.** Las enzimas celulares transforman el monofosfato en acyclovirtrifosfato que aparece en concentraciones de 40 a 100 veces mayores en células infectadas por HSV.

Las células sanas convierten al poco fármaco en derivados fosforilados. (1e) bloquea en forma competitiva a las DNA polimerasas virales y en mucho menor extensión a las DNA polimerasas celulares.

Quizás el tipo de acción antiviral más evidente es que el trifosfato antes mencionado se incorpora al DNA viral, sitio en el que actúa como un “terminador de cadena” ya que el fármaco carece del grupo 3'-hidroxilo en un fragmento de pentosa. En consecuencia no puede continuar la replicación del DNA viral debido a que no puede secuenciarse otro nucleótido (formación del enlace ester-fosfato) sobre el filamento del DNA que contiene como extremo 3' a (1e).



**Figura 2.5. La incorporación de acyclovir monofosfato (1c) partiendo del trifosfato del mismo fármaco (1e), en el filamento del cebador durante la replicación de DNA viral hace que se termine la elongación del filamento o cadena.**

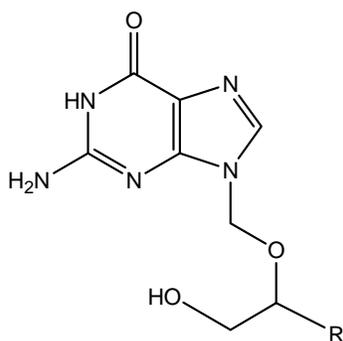
Finalmente mediante un mecanismo denominado “inactivación suicida”, la plantilla de DNA terminado que contiene al acyclovir se liga a la enzima DNA polimerasa viral y la inactiva de forma irreversible.

### 2.5.2. Mecanismos de resistencia.<sup>20</sup>

La resistencia del virus del herpes simple al acyclovir se ha vinculado con alguno de los siguientes mecanismos: producción nula o parcial de la timidincinasa viral (TK); alteración de la especificidad del sustrato de la TK (por ejemplo, fosforilación de la timidina y no del acyclovir) o alteraciones del DNA polimerasa viral. El mecanismo de resistencia más conocido en cepas de HSV clínicas, es la deficiente actividad de la timidincinasa y en cepas de VZV consiste en mutaciones de la timidincinasa o menos frecuente por mutaciones del DNA polimerasa viral, pero sin duda las alteraciones en la especificidad del sustrato del timidincinasa son más frecuentes en el caso de VZV resistentes a acyclovir que en la HSV resistente a este fármaco.

### 3. Antecedentes.

Fue en el año de 1976<sup>7</sup> cuando se reportaron los primeros trabajos sobre la síntesis, actividad y metabolismo del acyclovir (1a). Desde entonces se han preparado una gran cantidad de nucleósidos análogos en el que la pentosa polihidroxilada del nucleósido es sustituida por algún grupo acíclico como el 2-hidroxi-etoximetilo o bien el 1.3-dihidroxi-2-propoximetilo correspondiente al análogo conocido como DHPG (1f)<sup>41</sup> que presenta cierta actividad antiherpética.



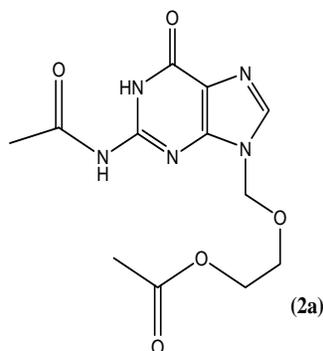
1a.      R = H  
1f.      R = CH<sub>2</sub>OH

**Figura 3.1. Estructura del Acyclovir (1a) y DHPG (1f). Se observa que estos potentes antivirales poseen el mismo esqueleto purínico y se modifica ligeramente el sustituyente acíclico.**

A la fecha, (1a) es uno de los agentes antivirales más conocidos y potentes a nivel mundial, sin embargo el desarrollo de una síntesis económica que logre rendimientos aceptables, superiores al 80% han sido escasamente reportados y en la mayoría de los mismos resulta muy complicado reproducir los resultados.

A continuación se muestra parte de la reseña histórica de la síntesis del acyclovir (1a) y se dan algunas observaciones sobre los trabajos desarrollados más importantes en el tema para poner las bases que sustenten los objetivos de este trabajo de tesis.

Es importante resaltar que parte de este trabajo enfatiza la síntesis del intermediario N<sup>2</sup>-acetil-N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi) metil] guanina (2a) que es el precursor inmediato para formar el antiviral y que como se demostrará posteriormente, su formación influye directamente en el bajo rendimiento hasta hoy reportado del fármaco.



**Figura 3.2.** Estructura de N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetilguanina (diacetilacyclovir).

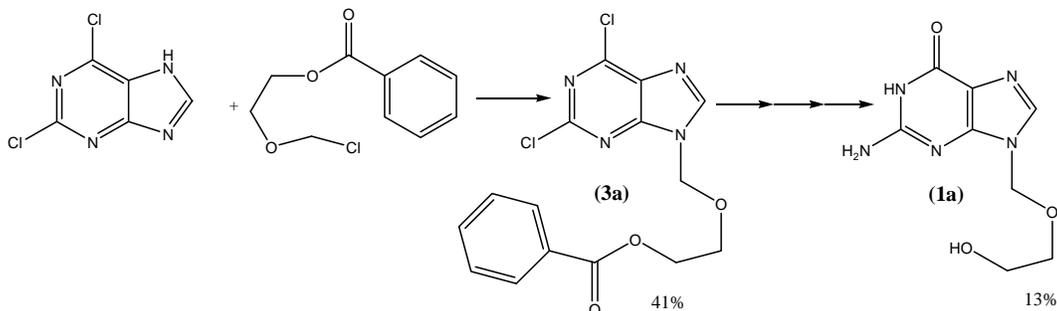
A lo largo de casi treinta años se han intentado varios métodos para introducir el grupo 2-hidroxietoximetilo sobre la posición N-9 de bases nitrogenadas de tipo purínicas para la síntesis de (1a) o en general de nucleósidos acíclicos sin éxito aparente.

*3.1. Síntesis de Schaeffer a partir de dicloropurinas. Primeros intentos para obtener acyclovir.*<sup>6,8</sup>

Schaeffer y colaboradores sintetizaron (1a) a través de la N-alkilación de la 2,6-dicloropurina con el cloruro de 2-(benzoxietoxi) metilo, reportando un rendimiento del 41% de N<sup>9</sup>-(2-benzoxietoximetil)-2,6-dicloropurina (3a).

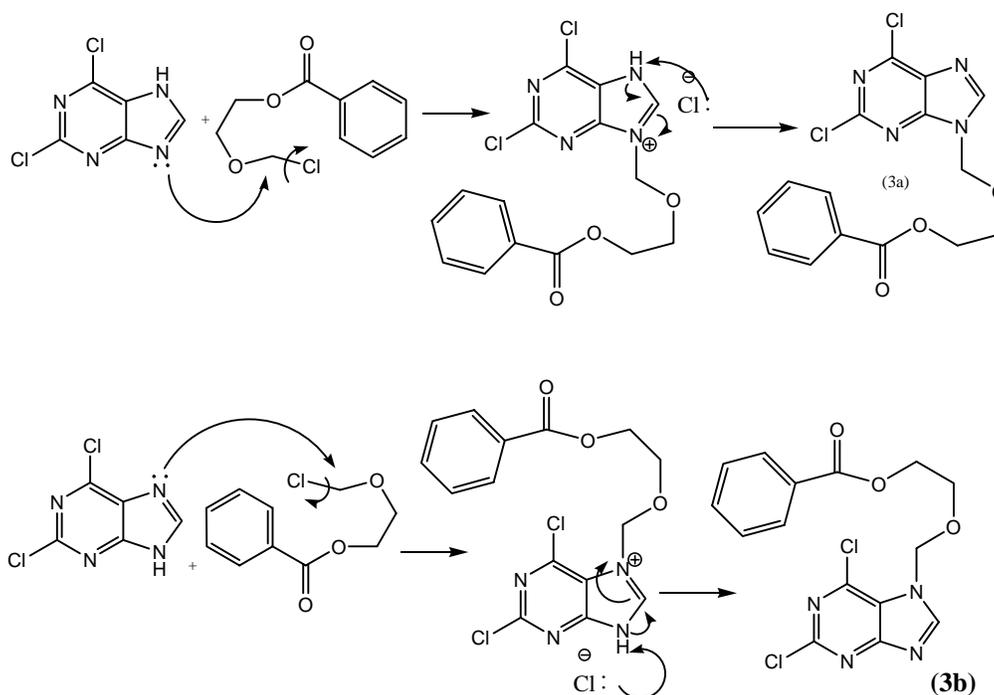
Dicho intermediario fue de los primeros sintetizados en su tipo como precursores del antiviral. Esto es, la introducción del análogo acíclico de pentosa protegido con un éster bencílico, a una base púrica.

A partir de (3a), el acyclovir se forma a través de una secuencia de 4 pasos en las que se incluye una amonólisis y la desprotección del éster para la formación del alcohol primario con un rendimiento final del 13% a partir de la base púrica.



**Esquema 3.1.** Ruta sintética de Schaeffer y colaboradores. Esta síntesis fue la primera en su tipo para obtener acyclovir (1a).

Quizás por tratarse de los primeros intentos para formar el antiviral, en estos trabajos solo se reporta una simple purificación de (3a) mediante una cromatografía en columna y no se describe la formación, aislamiento o caracterización del isómero N<sup>7</sup>-(2-benzoxietoximetil)-2,6-dicloropurina (3b). Un simple vistazo al mecanismo de reacción nos indica que si se partiera de 7-H-2,6-dicloropurina, el nucleófilo más poderoso para iniciar la N-alquilación corresponde a la amina terciara (el nitrógeno situado en la posición 9) de la base púrica, obteniendo en el mejor de los casos un buen rendimiento de (3a). Sin embargo se conoce que en disolución acuosa, la 2,6-dicloropurina puede no estar totalmente en su forma 7H y en consecuencia se puede obtener con toda facilidad, en condiciones normales, el isómero (3b).



**Esquema 3.2. Sustitución nucleofílica para el acoplamiento del radical acíclico a la base púrica. A pesar de que los trabajos de Schaeffer no mencionan la formación y caracterización de (3b) debido a que el átomo de cloro en la posición 6 de la base dificulta la adición de la cadena acíclica, no hay fundamentos para asegurar este hecho y no puede ser descartada la posibilidad de formar aciclopurinas N-7 sustituidas.**

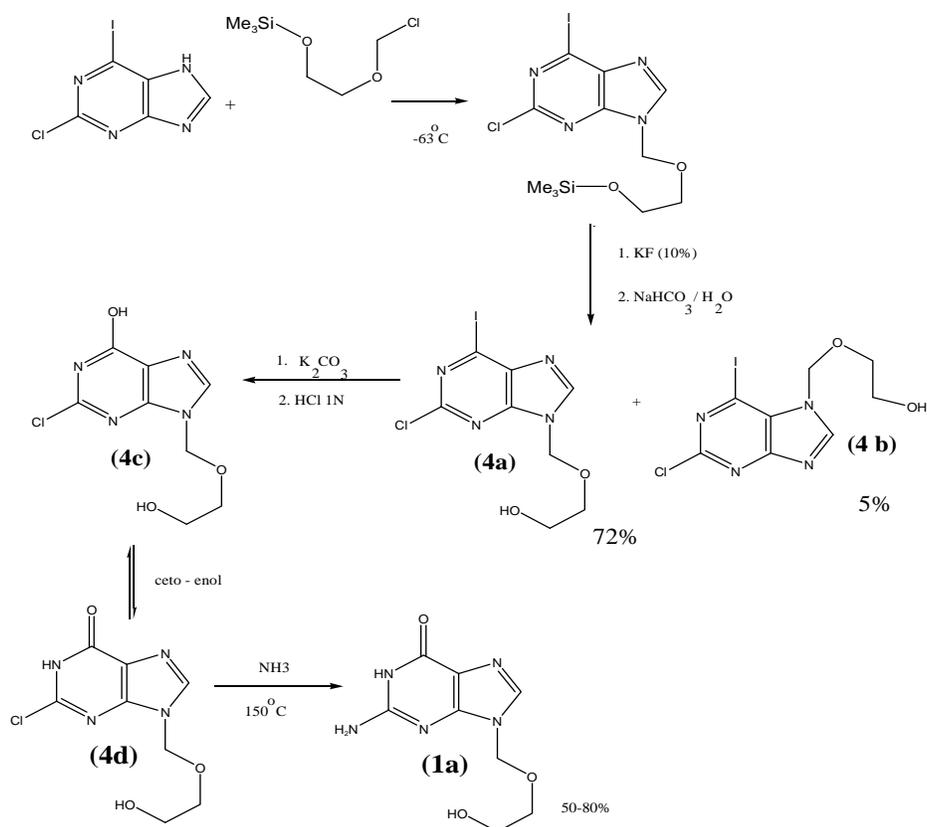
### 3.2. Ruta sintética de Barrio.<sup>9-10</sup>

El segundo intento para obtener derivados funcionales N<sup>9</sup>-(2-hidroxi-etoximetil) purinas se reportó a principios de la década de los ochentas.

Partiendo de 2-cloro-6-yodo-purina se intentó la N<sup>9</sup>-alquilación de la base utilizando como electrófilo el cloruro de [2-(trimetil)sililoxietoxi] metilo a una temperatura de -63°C, seguido de la desprotección para formar el alcohol primario a través de la eliminación del grupo trimetil-sililóxi. La purificación del intermediario formado (4a) se llevó a cabo a través de una columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria alúmina neutra. La formación de la purina N<sup>9</sup>-alquilada (4a) se reportó con un rendimiento del 72%. La forma en la que se caracterizó este primer intermediario fué mediante espectrometría de masas y RMN <sup>1</sup>H 100MHz; sin embargo no se reportaron completas las señales.

Resulta interesante analizar esta síntesis puesto que a pesar de que la 2-cloro-6-yodopurina es mucho más susceptible a sufrir la N-alquilación en la posición 9 debido al impedimento estérico en el que se encuentra la posición N-7 de la base gracias al átomo de yodo en la posición 6, los autores reportan que en las condiciones más óptimas de reacción se obtiene un 5% del isómero N-7 (4b), siendo de los primeros trabajos que admite la posibilidad de tener una mezcla de isómeros.

Cuando el intermediario (4a) se somete a una sustitución nucleofílica aromática del yodo por un grupo hidroxilo e inmediata neutralización con HCl 1N se obtiene 2-cloro- N<sup>9</sup>-[2-(hidroxi-etoxi)metil]-6-oxopurina (4c). In situ se genera un equilibrio ceto-enol, favoreciéndose la forma tautomérica ceto (4d). Finalmente se obtiene (1a) mediante la amonólisis de (4d) con rendimientos entre el 50 y el 80%. El resto de los intermediarios se caracterizaron por espectrometría de masas (10 y 70eV).



**Esquema 3.3. Síntesis de Barrio para la obtención de acyclovir (1a). Es el primer proceso que acepta la posibilidad de formar aciclopurinas N-7 sustituidas.**

A pesar de que bajo las condiciones más óptimas de síntesis se pueden obtener rendimientos medianamente aceptables del antiviral, este proceso tiene varios inconvenientes:

- Formación del acyclovir en una secuencia de cinco pasos, algunas de ellas con condiciones extremas de temperatura (específicamente la formación del agente alquilante). Como veremos más adelante se pueden obtener mejores rendimientos, en condiciones más suaves mediante secuencias de tan solo tres pasos.
- Gran parte del éxito de esta síntesis recae en la forma en la que se pueda favorecer el equilibrio tautomérico ceto-enólico ente (4c) y (4d). Si no existen condiciones de reacción que favorezcan la presencia del tautómero deseado, el rendimiento final se verá notablemente afectado.
- No se encuentra reportado que los intermediarios formados (4b, 4c y 4d) hayan sido caracterizados plenamente por Resonancia Magnética Nuclear. Esto es de vital importancia para este trabajo puesto que, como se demostrará más adelante, es de las

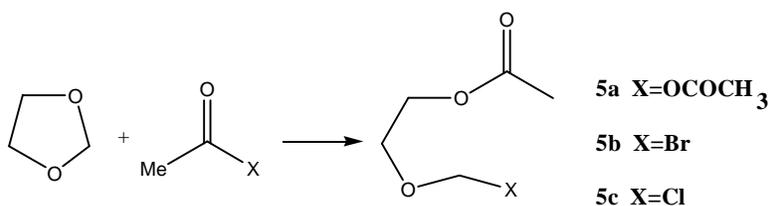
técnicas espectroscópicas más certeras para identificar a los isómeros y en consecuencia no se puede tener garantía alguna de que los rendimientos obtenidos sean los descritos.

### 3.3. Reacciones catalíticas para obtener selectivamente aciclonucleósidos sustituidos en N-9.

En 1981 se tenían suficientes fundamentos para comprender la síntesis eficiente del acyclovir. Principalmente se debía de obtener agentes alquilantes estables para hacerlos reaccionar frente a las bases púricas; se sabía que la N-alkilación podría producir una mezcla de isómeros y la forma de alquilar purinas selectivamente en la posición N-9 utilizando grupos voluminosos cercanos al nitrógeno imidazólico que no se desea alquilar ( $\beta$  al átomo de nitrógeno N-7), pero por desgracia, no existen muchos trabajos donde se haga mención en la importancia de caracterizar por algún método eficiente cada uno de los intermediarios formados. Ejemplo claro de lo anterior se refleja en los trabajos desarrollados por Robins y Hatfield.<sup>11</sup>

#### 3.3.1. Acoplamiento catalítico de radicales acíclicos de alta estabilidad a 6-cloro-purinas por el método de Robins y Hatfield

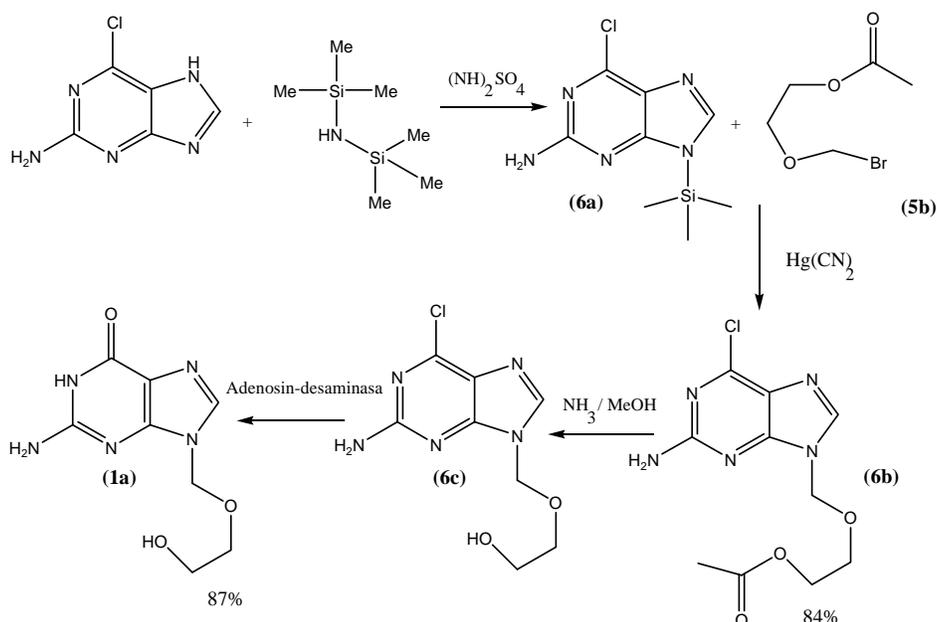
En primer lugar este trabajo describe la síntesis de agentes N-alkilantes de purinas, de estabilidad considerable, obtenidos a partir de distintas reacciones de acilación del 1,3-dioxolano (5a, 5b y 5c).



**Esquema 3.4. Fragmentos acíclicos de alta estabilidad obtenidos a partir de la sustitución nucleofílica sobre el acilo de compuestos carbonílicos reactivos con 1,3-dioxolano.**

La parte más interesante de estos trabajos muestra el acoplamiento selectivo del radical acíclico (2-acetoxietoxi) metilo en 6-cloropurinas sililadas (6a), debido al enlace lábil N<sup>9</sup><sub>purina</sub>---Si. El compuesto (6a) se obtuvo a partir de la trimetilsililación de cloropurinas con hexametildisilazano y utilizando para la alquilación Hg(CN)<sub>2</sub> como catalizador de la reacción.

La formación selectiva del intermediario N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-2-amino-6-cloro-purina (6b) se reporta con buen rendimiento (84%) al igual que la reacción enzimática de (6c), (producto de la desacetilación de (6b) con solución saturada de amoníaco en metanol) con Adenosin desaminasa para formar acyclovir (87%).



**Esquema 3.5. Ruta sintética de Robins y Hatfield.** Es la primera en su tipo en proponer un método catalítico para realizar el acoplamiento del radical acíclico selectivamente en la posición N-9 del heterociclo aromático.

Esta síntesis propuesta fue pionera en muchos aspectos entre los cuales destacan dos puntos:

- Fue la primera en proponer la formación de agentes N-alquilantes de alta estabilidad y fácil preparación (5a, 5b y 5c), para introducir el fragmento acíclico análogo de pentosa y formar el nucleósido análogo.
- *Acepta categóricamente la posibilidad de haber productos secundarios de tipo N-7-alquilados al momento de sintetizar las bases N-9-alquiladas y propone una solución para formar los intermediarios deseados de tipo N-9 sustituidos de manera selectiva mediante un método que usa de la trimetilsililación de la purina ( para incrementar la reactividad del nitrógeno N-9 de la base)-alquilación con el radical acíclico en la posición deseada (6b), utilizando cianuro de mercurio como promotor.*

Además es el primer trabajo publicado que respalda sus resultados mediante la caracterización de todos los intermediarios y producto final por RMN <sup>1</sup>H a 200MHz.

Todos los elementos anteriores nos hacen concluir que sin duda la anterior es una de las síntesis más exitosas que se han reportado sobre el tema. Sin embargo, es inevitable analizar brevemente algunos inconvenientes que puede llegar a presentar este proceso:

**Tabla 3.1. Costo y toxicidad de algunos reactivos para la reacción de Robins y Hatfield. Cálculo del costo necesario para sintetizar 1g de Acyclovir.<sup>46</sup>**

Reactivo	Cantidad disponible en venta	Precio (dólares)	Cantidad utilizada para 1g de Acyclovir	Precio estimado (dólares)	Toxicidad
Hexametildisilazano	1L	\$307.20	0.021L	\$6.45	Fácilmente inflamable. Nocivo en contacto con la piel. Provoca quemaduras.
Adenosin-desaminasa (extraído de mucosa intestinal)	1mg	\$22.70	340.9mg	\$7738.63	_____
Hg(CN) <sub>2</sub>	100g	\$67.10	1.44g	\$0.966	Muy tóxico por inhalación e ingestión. En contacto con agua y ácidos libera gases de muy alta toxicidad.

- Algunos trabajos más contemporáneos a éste <sup>1,3-5, 8, 13, 16, 23</sup> afirman que no es del todo reproducible el último paso de la síntesis de Robins y Hatfield. La crítica se fundamenta en que no es posible reproducir los rendimientos aceptables de acicloguanosina (1a) cuando la síntesis se lleva a cabo a partir de materias primas distintas a la 2-amino-6cloro-purina debido a que la aminación de la posición 2 de casi cualquier purina resulta bastante tediosa, en consecuencia cualquier traza de aciclonucleósido sin grupo amino en dicha posición, es prácticamente inerte frente a la enzima.

### *3.3.2. Acoplamiento catalítico de radicales acíclicos de alta estabilidad con guanina por el método de Matsumoto.*

Gracias a la intensa búsqueda que se dio para encontrar un catalizador más adecuado para sintetizar selectivamente aciclonucleósidos sustituidos en N-9, suavizar las condiciones de reacción y disminuir pasos de las rutas sintéticas existentes, se publicó a finales de los años ochenta los trabajos realizados por Matsumoto y cols.<sup>1</sup>

Este trabajo toma lo mejor de algunas de las investigaciones más relevantes sobre el tema y simultáneamente hace una extensión de los descubrimientos hechos por Sato<sup>12</sup> los cuales proponen un mecanismo de N-alkilación hacia bases heterocíclicas para la síntesis de nucleósidos utilizando catalizadores de tipo ácidos próticos o bien ácidos de Lewis.

El resultado de este trabajo consiste en una ruta sintética de tan solo 3 pasos (esquema 1.1); sin embargo el rendimiento de acyclovir (1a) de tan solo 43% pone en duda el éxito de la propuesta. En el capítulo seis se desarrolla una amplia discusión algunas inconsistencias encontradas en esta síntesis con la finalidad de trabajar sobre ellas y así encontrar la optimización de este proceso.

#### *3.3.2.1. Síntesis selectiva de acicloguanosina N-9 ó N-7 sustituida en función de las propiedades ácido-base del catalizador.*

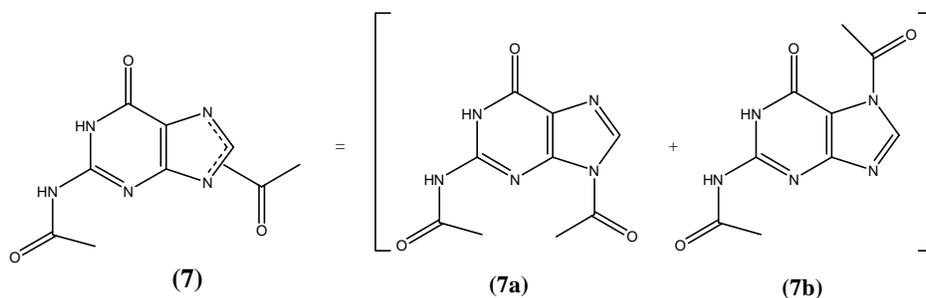
Una importante aportación hecha por Matsumoto y colaboradores fue la búsqueda de alguna propiedad química del catalizador para favorecer la formación selectiva del intermediario (2a). Trabajando con DMSO como disolvente en todos los casos, variando la temperatura de la reacción catalítica entre 80-100°C y estandarizando el tiempo de reacción a 16 horas. En todos los casos, se encontró que la acidez de los catalizadores probados, favorecían la presencia de uno u otro isómero. Sus resultados se presentan en la siguiente tabla:

**Tabla 3.2. Efecto de los catalizadores y la temperatura en el rendimiento de N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina(2a) y N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b).<sup>1,12</sup>**

Catalizador	Temperatura de reacción y rendimiento (%)			
	80°C		100°C	
	(2a)	(2b)	(2a)	(2b)
<b>Ácido p-toluensulfónico</b>	31	53	<b>66</b>	<b>26</b>
Ácido sulfanílico	51	27	66	28
Ácido p-nitrobencensulfónico	56	33	59	24
Ácido 2,4-dinitro-bencensulfónico	50	19	38	20
FeSO <sub>4</sub>	12	7	38	21
ZnCl <sub>2</sub>	—	—	—	—

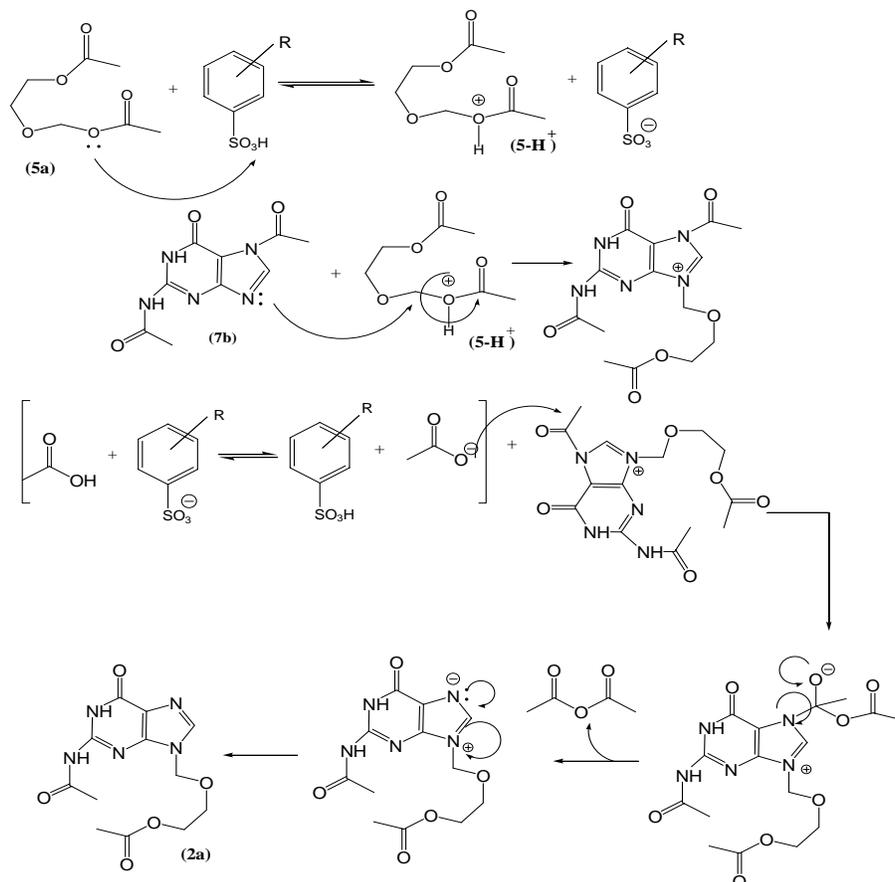
Una interesante observación de los resultados de la tabla 3.2 surge a partir de la comparación de rendimientos obtenidos para (2a) a una misma temperatura (100°C) con dos diferentes ácidos sulfónicos: un rendimiento mayor está dado cuando se utiliza como catalizador, al ácido sulfónico con un grupo electrodonador mientras que el rendimiento para (2a) bajo las mismas condiciones catalíticas disminuye considerablemente con el ácido sulfónico que posee en su estructura grupos electroattractores. No se encuentra documentado en estos trabajos las razones precisas por la que este patrón se presente, sin embargo un mecanismo de reacción ayudaría a visualizar algunos detalles de esta reacción de acoplamiento catalítico de un radical acíclico hacia la base nitrogenada (7).

A partir de la información extraída de los trabajos de Matsumoto<sup>1</sup>, se sabe que el compuesto utilizado como materia prima consiste en una mezcla de isómeros (7a) y (7b), en proporción desconocida:



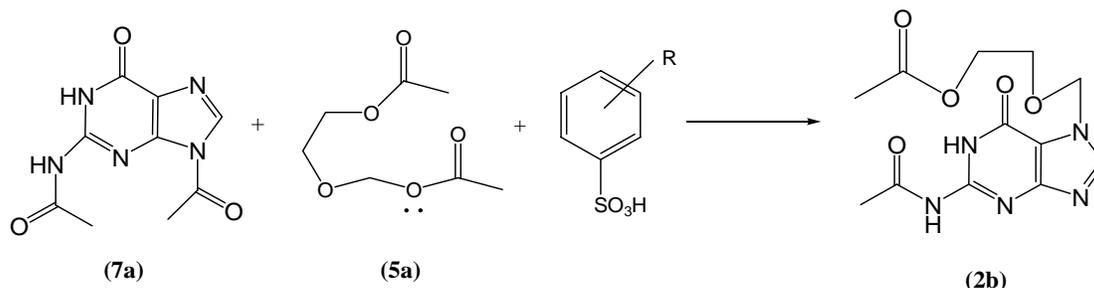
**Figura 3.3** El producto de acilación de la guanina (7) consiste en una mezcla de isómeros de composición desconocida (7a), (7b).

Es lógico pensar que los 2 aciclonucleósidos (2a) y (2b) se formen a partir de cada isómero presente del compuesto (7). El mecanismo de reacción nos da una idea de porqué se pueden formar 2 tipos de diacetil-acicloguanosina. A continuación se muestra que el intermediario (7b) es el precursor del diacetil-aciclonucleósido (2a):



**Esquema 3.6.** Mecanismo de reacción para la formación de N<sup>9</sup>-[(2acetoxietoxi)]metil-N<sup>2</sup>-acetil guanina. Notar que para que proceda por esta vía es necesario que el átomo de nitrógeno 7 del anillo imidazólico de la N-N diacetilguanina se encuentre protegido en su forma de amida. Sólo de esta manera la adición de la cadena acíclica se realiza sobre el otro átomo de nitrógeno del anillo imidazólico de la base.

De manera análoga, el isómero (7a), que contiene al grupo acilo protegiendo al átomo de nitrógeno 9 del anillo imidazólico, es el precursor del diacetil-aciclonucleósido (2b):



**Esquema: 3.7. El esqueleto purínico para formar N<sup>7</sup>-[(2acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil guanina, lo aporta el isómero (7a).**

La parte experimental de estos trabajos señala que el acoplamiento del radical acíclico a la base heterocíclica se realiza al mezclar un equivalente de N-N-diacetilguanina (7), aproximadamente 2 equivalentes de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol (5a) y un cincuentavo de equivalente del catalizador [con p-TsOH se obtienen los mejores rendimientos para (2a)], disolviendo todos los reactivos en DMSO. La catálisis consiste en el calentamiento de los reactivos a una temperatura de 100°C durante 16 horas, obteniendo un aceite como mezcla de reacción.

El crudo es purificado mediante cromatografía en columna utilizando las siguientes condiciones:

- Fase estacionaria polar: Sílica gel Kiesegel 60 con tamaño de malla 70-230.
- Fase móvil: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (60 : 39,2 : 0,8)% v/v.

De las primeras fracciones se obtiene N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil guanina (2b) (26% rendimiento) mientras que de las fracciones posteriores se obtiene N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil guanina (2a) (66% rendimiento).

A continuación se presentan los puntos de fusión reportados de (2a) y (2b):<sup>1,2</sup>

- Punto de fusión N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil guanina (2b) = 184-185°C.
- Punto de fusión N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil guanina (2a) = 189-190°C.

La manera en la que Matsumoto y cols. justificaron los rendimientos obtenidos fue mediante la caracterización de los intermediarios (2a) y (2b) por resonancia magnética nuclear de hidrógeno, principalmente. Sus resultados indican que dichos isómeros pueden ser diferenciados no sólo por punto de fusión o solubilidad en diferentes disolventes, sino

que también por RMN. Para cada isómero el ambiente químico se modifica ligeramente cuando el radical acíclico se adiciona en uno u otro átomo de nitrógeno del anillo imidazólico de la purina, en consecuencia algunos protones cercanos al enlace formado C-N sufren diferentes fenómenos de protección o desprotección. Experimentalmente esto se observa como ligeras variaciones en desplazamiento químico en 2 tipos de señales para cada isómero:

- Los protones de metileno ( $\text{CH}_2$ ) de la cadena acíclica que se une ya sea al N-7 o N-9 del heterociclo, dependiendo del isómero que se esté analizando.
- El protón que forma parte del anillo imidazólico ( $\text{C}^8\text{-H}$ ).

**Tabla 3.3. Datos espectroscópicos de los isómeros (2a) y (2b) reportados por Matsumoto y colaboradores. *Chem.Pharm.Bull.* "A convenient synthesis of 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine (Acyclovir) and related compounds." 36, [3], 1156 (1988). Es posible la diferenciación por RMN de ambos isómeros debido a la ligera variación de desplazamientos químicos de 2 tipos de protones.**

<p><math>\text{N}^9\text{-}[(2\text{-acetoxietoxi)metil}]\text{-N}^2\text{-acetil-guanina (2a)}</math></p>	<p>Espectro RMN <math>^1\text{H}</math> (2a) (<math>\text{DMSO-d}_6</math>): 1.96 (3H, s, <math>\text{CH}_3\text{CO}</math>), 2.19 (3H, s, <math>\text{CH}_3\text{CO}</math>), 3.68 (2H, m, <math>-\text{O-CH}_2</math>), 4.07 (2H, m, <math>-\text{CH}_2\text{-OAc}</math>), <b>5.48</b> (2H, s, <math>\text{N}^9\text{-CH}_2\text{-O}</math>), <b>8.14</b> (1H, s, H-8).</p> <p>* No se encuentran reportadas estas señales.</p>
<p><math>\text{N}^7\text{-}[(2\text{-acetoxietoxi)metil}]\text{-N}^2\text{-acetil-guanina (2b)}</math></p>	<p>Espectro RMN <math>^1\text{H}</math> (2b) (<math>\text{DMSO-d}_6</math>): 1.96 (3H, s, <math>\text{CH}_3\text{CO}</math>), 2.18 (3H, s, <math>\text{CH}_3\text{CO}</math>), 3.72 (2H, m, <math>-\text{O-CH}_2</math>), 4.08 (2H, m, <math>-\text{CH}_2\text{-OAc}</math>), <b>5.70</b> (2H, s, <math>\text{N}^7\text{-CH}_2\text{-O}</math>), <b>8.3</b> (1H, s, H-8), 11.63 (1H, s, <math>\text{N}^1\text{-H}</math>), 12.72 (1H, s, <math>\text{NH-Ac}</math>)</p>

#### 4. Planteamiento del problema.

Hemos descrito los trabajos más importantes de la síntesis del acyclovir y en resumen constan de propuestas muy costosas, en rutas sintéticas de muchos pasos o bien de procesos de muy bajo rendimiento con respecto a las materias primas.

El análisis de la reseña histórica demuestra que el problema principal consiste en la dificultad de formar el enlace C-N<sup>9</sup> al momento de acoplar el radical acíclico a la base heterocíclica, evitando en la mayor medida posible llevar a cabo la alquilación en la posición C-N<sup>7</sup> de la purina en cuestión.

Los avances desarrollados en el tema nos dejan por lo menos dos incógnitas resueltas para lograr encontrar la síntesis más óptima del antiviral: *el esqueleto purínico ideal con el que se debe de partir como materia prima es la 7-H-guanina*, de esta manera se puede obtener el acyclovir en el menor número de pasos y se eliminan reacciones tales como sustituciones nucleofílicas al heterociclo aromático o bien reacciones enzimáticas.

La segunda y más importante herencia que dejan los trabajos que hablan sobre la síntesis del acyclovir consiste en que la formación selectiva del enlace C<sub>radical acíclico</sub>-N<sup>9</sup><sub>purina</sub>, sólo se ha podido llevar a cabo por métodos catalíticos. A partir de lo anterior se sustenta el problema central a resolver: *¿Qué catalizador es el ideal para sintetizar aciclonucleósidos y que propiedades debe presentar este catalizador para favorecer la alquilación de la base hacia alguna posición específica con el sustrato acíclico?*

Debido a que las reacciones catalíticas señaladas en el punto anterior pueden favorecer la formación de un isómero en específico, dependiendo de las condiciones de la reacción y/o de las propiedades del catalizador, se debe tener por lo menos algún método para poder identificar si la cantidad de materia formada a partir de la catálisis consiste en el producto esperado, el isómero opuesto o bien la correspondiente mezcla; con esto se puede cuantificar la eficiencia de la reacción catalítica y la(s) técnica(s) de purificación.

## 5. Objetivos

Desarrollar una ruta sintética para obtener N<sup>9</sup>-[(2-hidroxietoxi)metil] guanina basándose en la secuencia de tres pasos propuesta por Matsumoto y Kaneko (sección 3.3.2.) y establecer condiciones precisas de reacción, purificación y caracterización de los diversos compuestos sintetizados para incrementar el rendimiento reportado del 43% en la obtención de Acyclovir.

### 5.1 Objetivos particulares.

5.1.1. Encontrar el catalizador más adecuado para la síntesis selectiva del intermediario N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a).

5.1.2. Determinar si la fuerza de acidez de los distintos ácidos sulfónicos probados como posibles catalizadores influye en la selectividad para formar N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a), evitando en la mayor medida posible la formación del isómero N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b).

5.1.3 Establecer las variables cinéticas (tiempo, temperatura, estequiometría de los reactivos y catalizador) más adecuadas para optimizar los rendimientos en la obtención de N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a).

5.1.4. Proponer modificaciones a las técnicas de purificación y específicamente encontrar las condiciones cromatográficas más adecuadas para poder separar los dos isómeros formados a partir de la reacción catalítica de N-alquilación entre la N<sup>2</sup>-N<sup>(7,9)</sup> diacetil guanina (7) y el diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol(5a) (paso B, esquema 1.1.).

5.1.5. Proponer técnicas de análisis químico de alta sensibilidad, como experimentos de Resonancia Magnética Nuclear en 2 dimensiones (HSQC, HMBC, NOESY) y/o Difracción de Rayos X en monocristal, para caracterizar los compuestos sintetizados, solo así podrá determinarse tanto la eficiencia de la purificación como los rendimientos correspondientes.

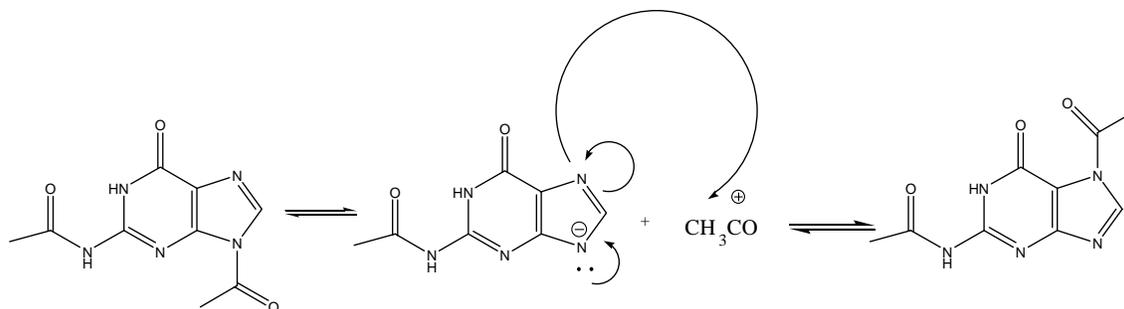
## 6. Discusión de resultados.

El presente trabajo consiste en una extensión de los resultados expuestos en la tabla 3.2. En esta investigación estudiamos la influencia de cuatro ácidos sulfónicos utilizados como catalizadores en el acoplamiento catalítico de (5a) sobre la base nitrogenada (7) bajo ciertas condiciones de reacción.

Una herramienta útil para el presente trabajo fue el mecanismo de reacción de formación de (2a) y (2b) como subproducto (esquemas 3.6 y 3.7), sin embargo se requiere de más información para poder entender en la mayor medida posible todos los factores que promuevan la selectividad a formar (2a). Por ello incluimos algunas deducciones realizadas a partir de nuestra propia comprensión de los trabajos más relevantes sobre el tema.

### 6.1 .Características del esqueleto purínico utilizado como materia prima.

Como lo muestra la figura 3.3, la materia prima utilizada como esqueleto heterocíclico para formar el derivado acicloguanílico consiste en una mezcla de isómeros (7a y 7b). Si el compuesto (7) fuese una mezcla de composición fija, los rendimientos encontrados para la obtención de los productos (2a) y (2b) serían prácticamente constantes e independientes de cualquier otro parámetro. Con esto queremos decir que si por ejemplo se partiera de una cierta cantidad de (7) que consista en 90% de (7b) y 10% de (7a), al realizar la reacción de N-alquilación con (5a) en algún momento se podría obtener una cantidad hipotética cercana al 90% de (2b) y tan sólo una cantidad menor al 10% de (2b). Como lo muestran los resultados de la tabla 3.2, lo anterior no coincide con lo que realmente sucede. *Si suponemos que todos los ensayos catalíticos se llevaron a cabo con la misma materia prima, es válido pensar que la materia prima sufre modificaciones dentro del seno de la reacción.* Por esta razón proponemos que el grupo acilo que protege a cualquiera de los dos átomos de nitrógeno del anillo imidazólico en (7) sufra migraciones de un átomo a otro mientras se lleva a cabo la reacción, de esta manera podría explicarse las variaciones en los rendimientos para un mismo catalizador a diferentes temperaturas.

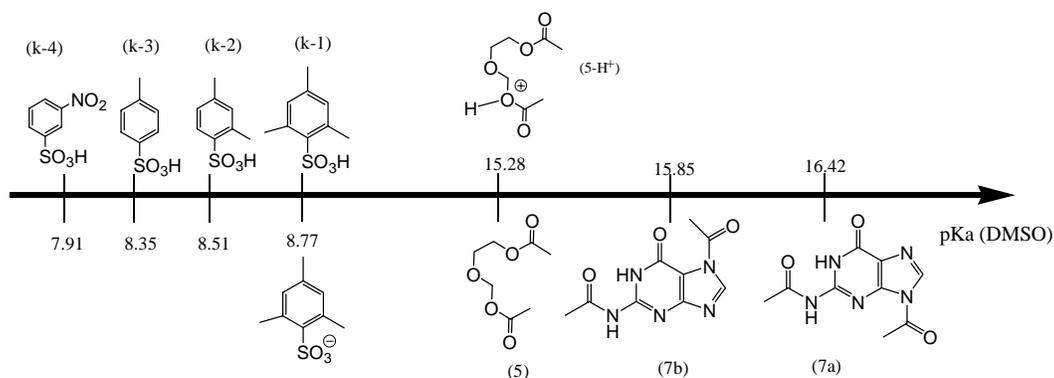


**Esquema 6.1.** Posible migración del grupo acilo sobre los dos átomos de nitrógeno del anillo imidazólico.

### 6.2. Influencia del pH en la síntesis selectiva de aciclonucleósidos N-9 sustituidos utilizando ácidos sulfónicos como catalizadores.

Si se revisa el mecanismo de reacción (esquema 3.6) del acoplamiento catalítico del radical acíclico hacia la base heterocíclica, a simple vista no se logra comprender la influencia de la acidez del catalizador en la regioselectividad para formar (2a).

A continuación mostramos un modelo sencillo que propone una explicación a este fenómeno. El esquema 6.2 muestra valores calculados con programas computacionales [Advanced Chemistry Development (ACD/pKaDB) Software V9.04 for Solaris] junto con valores extraídos de la literatura [Hee Jang, Y., Goddard, W. *J. Phys. Chem. B*, **107** (1), 344-357, (2003), Bordwell, A. et al, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 7160, (1975)] de los pKa's, en dimetilsulfóxido, de los ácidos y bases de Brønsted que intervienen en la reacción.



**Esquema 6.2** Valores de pKa en DMSO de los intermediarios en la reacción de acoplamiento catalítico de cadena acíclica a base nitrogenada que dependen del pH.

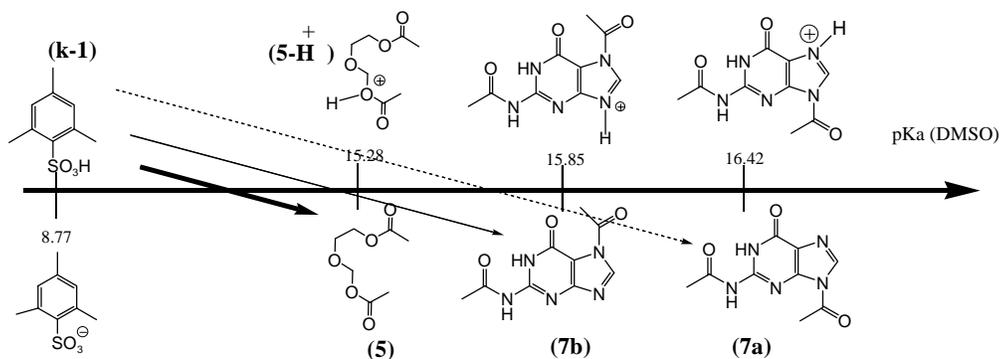
El mecanismo de reacción indica que los diacetil-aciclonucleósidos se forman vía un ataque nucleofílico del par de electrones de alguna de las dos aminas terciarias (N-7 ó N-9) presentes en el anillo heterocíclico (7), hacia el metileno más electrofílico del compuesto

(5). El mismo mecanismo propone que al haber un buen grupo saliente pegado al centro electrofílico (AcOH), se favorece la N-alquilación, por lo que previo a la formación del enlace C-N se deberá dar un equilibrio ácido-base entre (5) y el catalizador correspondiente para formar (5-H<sup>+</sup>) y así se obtenga el sustrato electrofílico en la forma deseada.

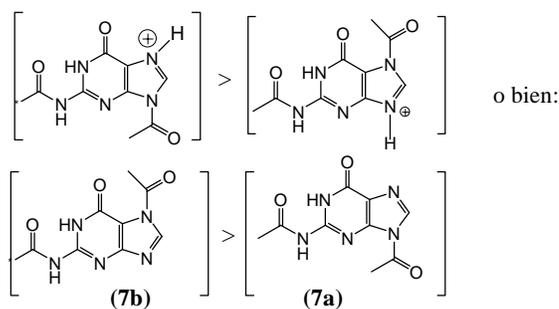
A partir de la anterior aseveración surge la siguiente pregunta: *¿Existirán sobre el mismo seno de reacción, equilibrios ácido-base secundarios (parásitos) que promuevan o inhiban la selectividad para formar (2a)?* Debido a que no se tiene pensado para esta investigación medir los cambios de pH con equipos de alta sensibilidad (como un electrodo de hidrógeno) sólo proponemos una sencilla hipótesis para poder pronosticar la influencia de cada uno de los catalizadores probados para este trabajo (k-1, k-2, k-3, k-4) (ver esquema 6.2.).

- Es posible que un bajo rendimiento para formar diacetil-aciclonucleósidos catalizando la reacción con (k-4) pueda derivarse a que –como lo sugiere la escala de pKa's- el catalizador (de mayor acidez) protone con mucha facilidad a la especie más básica en la reacción (7a). La base acíclica (5) permanecería como tal y en consecuencia cualquier N-alquilación posible entre (7) y (5) se daría con mayor dificultad al no tener la especie electrofílica necesaria (5-H<sup>+</sup>). De consumirse el catalizador completamente por (7a) (por equilibrio ácido-base), éste no podría regenerarse como lo indica el mecanismo de reacción por lo que difícilmente podría generarse el electrófilo necesario para formar acicloguanosina.

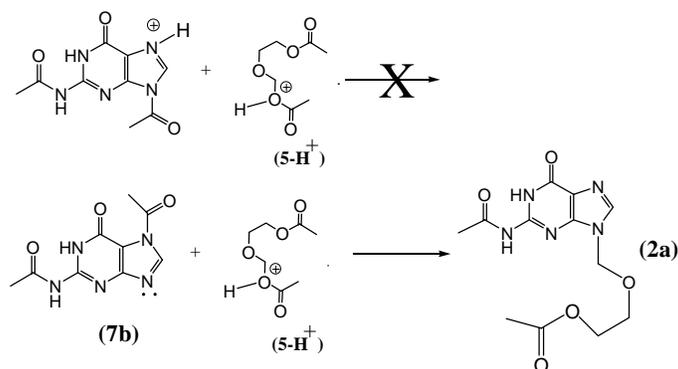
- Con la misma lógica sugerimos que la selectividad para formar (2a) catalizando con (k-1) pueda aumentarse debido a que éste al ser de menor acidez sea capaz de protonar en forma competitiva tanto a la base más fuerte (7a) como a (5). Esto provocaría una lenta acumulación de sustrato electrofílico (5-H<sup>+</sup>) que reaccionaría en mayor proporción (vía una N-alquilación) con (7b) debido a que la base más fuerte (7a) se encontraría “protegida” en su forma protonada. No descartamos la posibilidad de que (7b) también estuviese en su forma protonada pero la escala de pKa sugiere que estaría en menor proporción que el ácido conjugado de (7a). Esto ocasionaría que a medida que transcurre el tiempo de reacción, indudablemente se formaría con mucha mayor rapidez el isómero (2a). El esquema 6.3 ilustra esta hipótesis.



Si se hace la siguiente suposición:  
 $Keq(1) > Keq(2) > Keq(3)$  se tendría:



..... Keq(1)  
 — Keq(2)  
 — Keq(3)



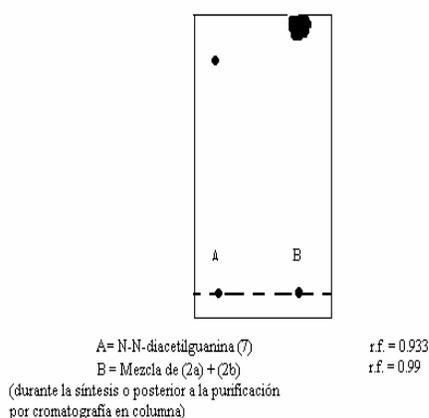
**Esquema 6.3. Hipótesis sobre la influencia de la acidez en la regioselectividad para formar (2a). Las tres bases señaladas sobre la escala, son susceptibles a aceptar el protón del catalizador pero mientras éste sea de menor acidez se incrementa la posibilidad de que existan los tres equilibrios ácido-base simultáneamente sin perder de vista que la base más fuerte siempre será la más susceptible a ser protonada (7a).**

### 6.3. Reproducción de la síntesis de (2a) y (2b) por el método Matsumoto.

Este trabajo de tesis abarcó en una primera etapa, en la reproducción de la técnica de Matsumoto, trabajando bajo las condiciones reportadas. Los resultados que obtuvimos son diferentes a los de Matsumoto.

En un intento por obtener resultados similares se hizo reaccionar 1eq. de N-N-diacetilguanina (7), 2 eq. de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol (5a) y 1/ 50eq. de ácido p-toluensulfónico monohidratado (k-2) disueltos en DMSO anhidro. Calentando a reflujo a una temperatura de 100°C y en tiempo de 16hrs de reacción se obtuvo un crudo que consiste en un aceite color amarillo de olor penetrante. Para purificar dicho aceite se eliminó el DMSO por destilación al vacío y se redisolvió en una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (60: 39.2: 0.8) %v/v. Inmediatamente se depositó la disolución en una columna cromatográfica con 20g fase estacionaria (Sílica gel Kieselgel 60, 70-230m)/g crudo y se utilizó como fase móvil la misma mezcla de disolventes. Al coleccionar las fracciones y concentrar a sequedad se obtuvo un sólido que a partir de las pruebas de caracterización, se encontró que dicho producto consistía de una mezcla de (2a) y (2b). Para el paso de purificación por cromatografía en columna se demostró que aún aumentando la cantidad de fase estacionaria con sesenta o hasta cien gramos de fase estacionaria (Sílica gel Kieselgel 60, 70-230m) por gramo de compuesto no fue posible separar a los dos diacetil-aciclonucleósidos. Tal parece que la razón principal por la que (2a) no puede ser separado de (2b) en el proceso de purificación es debido a la fase móvil utilizada.

El argumento anterior se demuestra al presentar los resultados que surgen al evaluar la mezcla de la reacción (durante o después del proceso de síntesis) por cromatografía en capa fina (CCF).



**Figura 6.1. Identificación cualitativa de la materia prima y los productos obtenidos en el proceso de reproducción de resultados por cromatografía en capa fina. El cálculo de frente de referencia (r.f.) de los compuestos citados, muestra una deficiencia total de la fase móvil seleccionada (de elevada polaridad) para identificar y purificar. Los productos no pueden ser retenidos debido a que la fase estacionaria queda inactiva.**

Los valores de frente de referencia tanto de la materia prima (7) como el de los productos obtenidos a partir de la mezcla de reacción nos indican que el eluyente utilizado se encuentra lejos de ser el adecuado. El principal problema de las condiciones cromatográficas utilizadas por los autores consiste en la utilización de una fase móvil demasiado polar para la fase estacionaria seleccionada. La anterior aseveración se complementa con los resultados expuestos en la sección 6.3, llegando a la conclusión de que los productos formados en el acoplamiento catalítico no logran separarse adecuadamente debido a que la mezcla de disolventes utilizado como eluyente, de considerable polaridad, inactiva a la sílice (de características polares) sin dar oportunidad a que los productos se retengan sobre la columna cromatográfica. En otras palabras, bajo estas condiciones, los sitios disponibles sobre la superficie de la fase estacionaria para retener selectivamente cada producto formado pueden ser simultáneamente ocupados por las moléculas polares del mismo eluyente.

Algunas propiedades que presentan los productos obtenidos de los experimentos durante el proceso de reproducción son las siguientes:

- Características visuales de los productos sintetizados: *La mezcla de (2a)+ (2b) se presenta como un sólido amorfo de color amarillo.*

- Punto de fusión de la mezcla de aciclonucleósidos (promedio): **165-168°C.**

- Rendimiento (promedio)= **52%\***

\*[Cantidad de materia formada (moles) / cantidad de materia (moles) de reactivo limitante] x 100%

La prueba más contundente de que el sólido obtenido es una mezcla de isómeros, (2a) y (2b), la ofrece la espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Apoyándose en los datos espectroscópicos mostrados en la tabla 3.3, se podrá identificar fácilmente que de los espectros de RMN<sup>1</sup>H obtenidos al caracterizar las muestras que contienen a los dos aciclonucleósidos se identifican sobre el mismo espectro las señales propias de cada isómero, observándose en total:

- 4 señales de protón de amida (2 amidas por cada isómero).
- 2 señales de protón imidazólico C<sup>8</sup>-H (compárese datos en tabla 3.3 con fig. 6.2.)
- 2 señales de protones de metileno unido a nitrógeno (compárese datos en tabla 3.3 con fig. 6.2.)



Dado que la síntesis de Matsumoto para formar acyclovir<sup>45</sup> presenta inconvenientes, específicamente en la obtención limpia y en altos rendimientos del intermediario precursor al antiviral (2a), deben encontrarse métodos tanto sintéticos como de purificación, para incrementar la eficiencia al obtenerlo. La segunda parte de este trabajo muestra los resultados obtenidos al modificar las condiciones catalíticas y cromatográficas para incrementar el rendimiento de (2a) a un 90% y de (1a) a un 87%.

Para poder proponer cualquier mejora para este paso de la ruta sintética (paso B, esquema 1.1) inicialmente fue necesario modificar las condiciones cromatográficas reportadas<sup>1-3</sup> debido a que esta técnica analítica fue nuestra mejor herramienta para poder monitorear por cromatografía en capa fina (CCF) cualquier cambio químico observado en el seno de la reacción de todos los ensayos realizados y esencialmente para poder separar los productos principales de este paso (2a, 2b) por cromatografía en columna.

Lo anterior nos llevó a uno de los objetivos más importantes de este trabajo: *encontrar una fase móvil ideal en la que los solutos logren repartirse libremente sobre ambas fases sin que el eluyente afecte a la columna de sílice.*

#### 6.4. Modificación de las condiciones cromatográficas.

Para encontrar la fase móvil ideal en primer lugar se determinó el comportamiento de cada compuesto que se obtiene al finalizar la síntesis catalítica de aciclonucleósidos sobre las condiciones cromatográficas reportadas, calculando un frente de referencia ( $R_f$ ) promedio en CCF con placas de sílice 60F<sub>254</sub> de 0.2mm de espesor (fase normal). La materia prima (7) presentó un valor promedio de  $R_f$  0.93 y como se observa en la figura 6.1, la elución de una alícuota de la mezcla de reacción (una a cuatro corridas) sobre una cromatoplaque con la fase móvil reportada, da como resultado una sola mancha con  $R_f$  cercano a la unidad. Esto es un claro indicio de la necesidad de disminuir la polaridad de la fase móvil. Una observación más cuidadosa de este resultado nos indica que la materia prima (7) logra retenerse con mayor fuerza sobre la fase estacionaria polar a diferencia de los productos de la reacción que no logran distribuirse hacia la fase estacionaria debido a la menor polaridad de éstos con respecto a (7).

A partir de estos resultados se realizaron numerosos ensayos en CCF para determinar un eluyente que no interfiriera con el gel de sílice y fuese capaz de separar cada analito presente, encontrando que la mezcla de disolventes **CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O**

**(56: 35: 7: 2)%v/v** presenta cualidades muy útiles para definirlo como el eluyente ideal:

- *tanto en CCF como en cromatografía en columna son distinguibles y separables 2a (R<sub>f</sub> 0.51) de 2b (R<sub>f</sub> 0.59).*

- la materia prima (7) que no llega a reaccionar se retiene muy poco sobre la fase móvil, en consecuencia ésta se distribuye rápidamente sobre la fase estacionaria polar (R<sub>f</sub> 0.29) por lo que su separación del resto de los analitos es muy simple.

- Por medio de este sistema cromatográfico se lograron identificar, separar y cuantificar subproductos de la reacción diferentes de 2a y 2b.

- El eluyente encontrado es lo suficientemente polar para disolver todos los analitos de la mezcla de reacción pero a la vez posee cualidades no polares para eluirse completamente sobre la fase estacionaria sin inactivarla.

**Tabla 6.1. Condiciones cromatográficas encontradas para la separación cuantitativa de (2a) y (2b) comparadas con las publicadas por Matsumoto y cols.**

Variable cromatográfica	Condiciones establecidas por Matsumoto y cols.	Modificaciones propuestas
Fase móvil	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O (60: 39.2: 0.8)%v/v	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (56: 35: 7: 2)%v/v</b>
Fase estacionaria	-Cromatografía en columna (no especifica la cantidad por gramo de compuesto) con gel de sílice Kiesegel 60 (Merck) con tamaño de malla ASTM 70-230	-Cromatografía en columna usando gel de sílice 60 (Merck) con tamaño de malla ASTM 70-230 en cantidades de <b>40 a 60g de sílice por gramo de compuesto.</b> -Cromatografía en placa preparativa; gel de sílice 60 F <sub>254</sub> de 20x20x0.2cm Merck.

#### 6.5. Diferencias espectroscópicas entre (2a) y (2b) como método de caracterización por Resonancia Magnética Nuclear.

Se ha revisado en el capítulo tres la importancia de tener un método infalible para identificar los productos obtenidos en este tipo de reacciones catalíticas para formar acilonucleósidos. Ya hemos visto además, al reproducir los resultados reportados por

Matsumoto y cols, que es necesario justificar cualquier rendimiento reportado con datos espectroscópicos que corroboren la autenticidad del valor numérico del rendimiento. En base a los datos descritos en la tabla 3.3 junto con los resultados expuestos en la figura 6.2 logramos determinar la presencia de mezcla de isómeros en un producto que esta reportado como puro<sup>1-4</sup>.

Al realizar nuevamente el acoplamiento catalítico de (5a) sobre (7) utilizando la misma estequiometría y condiciones de reacción descritas en la sección 6.3 pero utilizando las nuevas condiciones cromatográficas (tabla 6.1) como método de purificación se logran aislar varios compuestos de los cuales destacan dos. De las primeras fracciones eluidas de la cromatografía en columna se obtienen 10.4mmoles (61.1%) de un sólido blanco cristalino, P.f.189-190°C, R<sub>f</sub> 0.51 e inmediatamente después se colecta un segundo lote de fracciones que al concentrar se obtienen 3.45mmoles (20.3%) de un sólido blanco de forma amorfa, P.f.181-182.5°C, R<sub>f</sub> 0.59.

Para corroborar que dichos productos consisten en (2a) y (2b) puros y en consecuencia verificar la autenticidad de los rendimientos descritos, ambos sólidos se caracterizaron por resonancia magnética nuclear protónica (<sup>1</sup>H) y de carbono trece (<sup>13</sup>C). Los espectros (figuras 6.3, 6.4, 6.5 y 6.6) no sólo demuestran la pureza con la que se obtienen los isómeros (2a) y (2b) sino que cada espectro presenta alguna señal característica para cada isómero:

- a) *El metileno de la cadena acíclica que se encuentra unido al N-9 de la base aparece como un singulete desplazado a 5.46ppm (2a en RMN <sup>1</sup>H).*
- b) *El metileno de la cadena acíclica que se encuentra unido al N-7 de la base aparece como un singulete desplazado a 5.67ppm (2b en RMN <sup>1</sup>H).*
- c) *El protón del anillo imidazólico en el isómero (2a) aparece como un singulete desplazado a 8.12ppm (RMN <sup>1</sup>H).*
- d) *El protón del anillo imidazólico en el isómero (2b) aparece como un singulete desplazado a 8.35ppm (RMN <sup>1</sup>H).*
- e) *En RMN <sup>13</sup>C se observa que para el isómero (2a) el C-5 del anillo heterocíclico aparece desplazado a 120ppm mientras que para (2b) el mismo carbono aparece desplazado a 111ppm.*

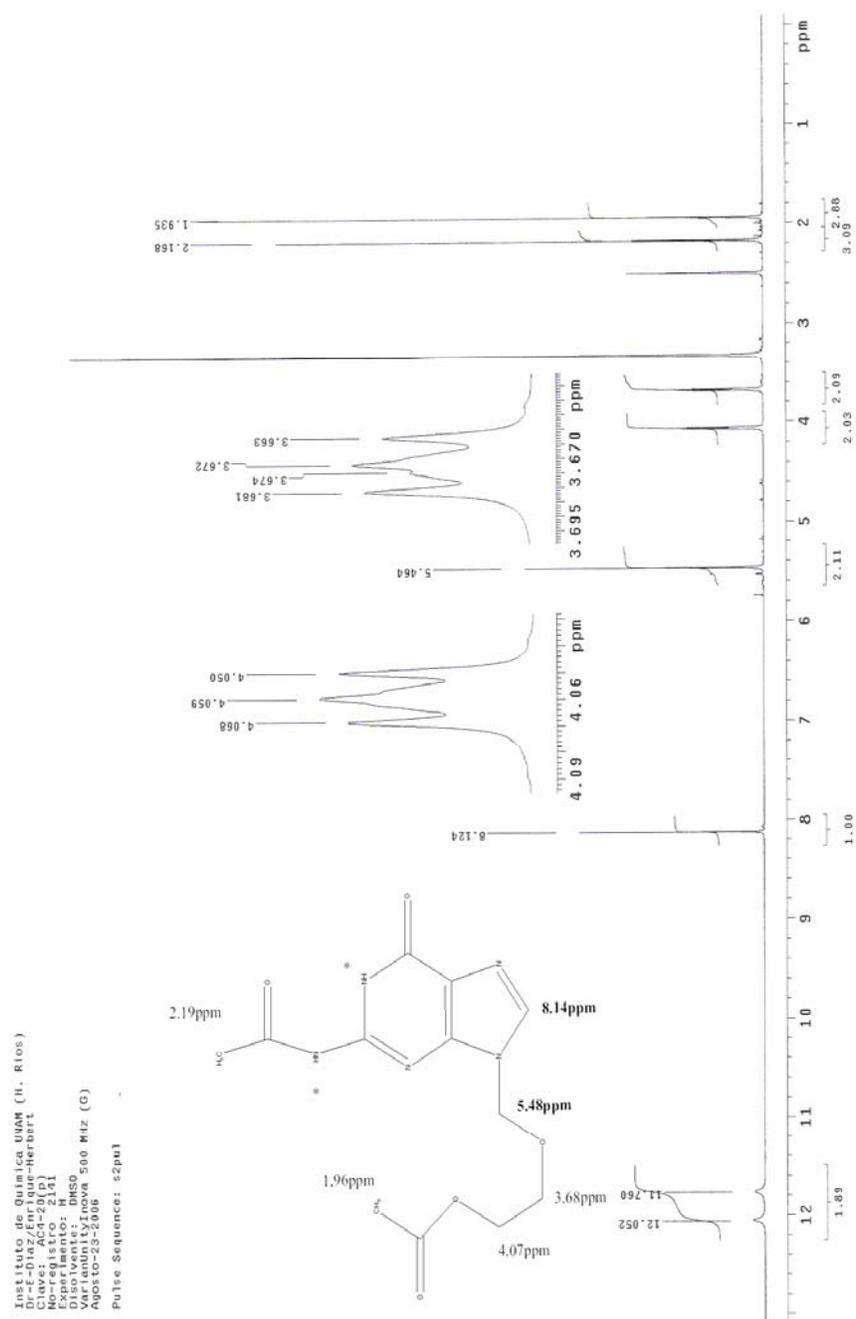


Figura 6.3. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 500 MHz de  $N^9$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil guanina (2a) obtenido mediante la ruta sintética expuesta en la sección 6.5. La molécula sobre el espectro indica los desplazamientos químicos reportados por Matsumoto y cols. (\*no se reportan los desplazamientos químicos para los protones de amida).

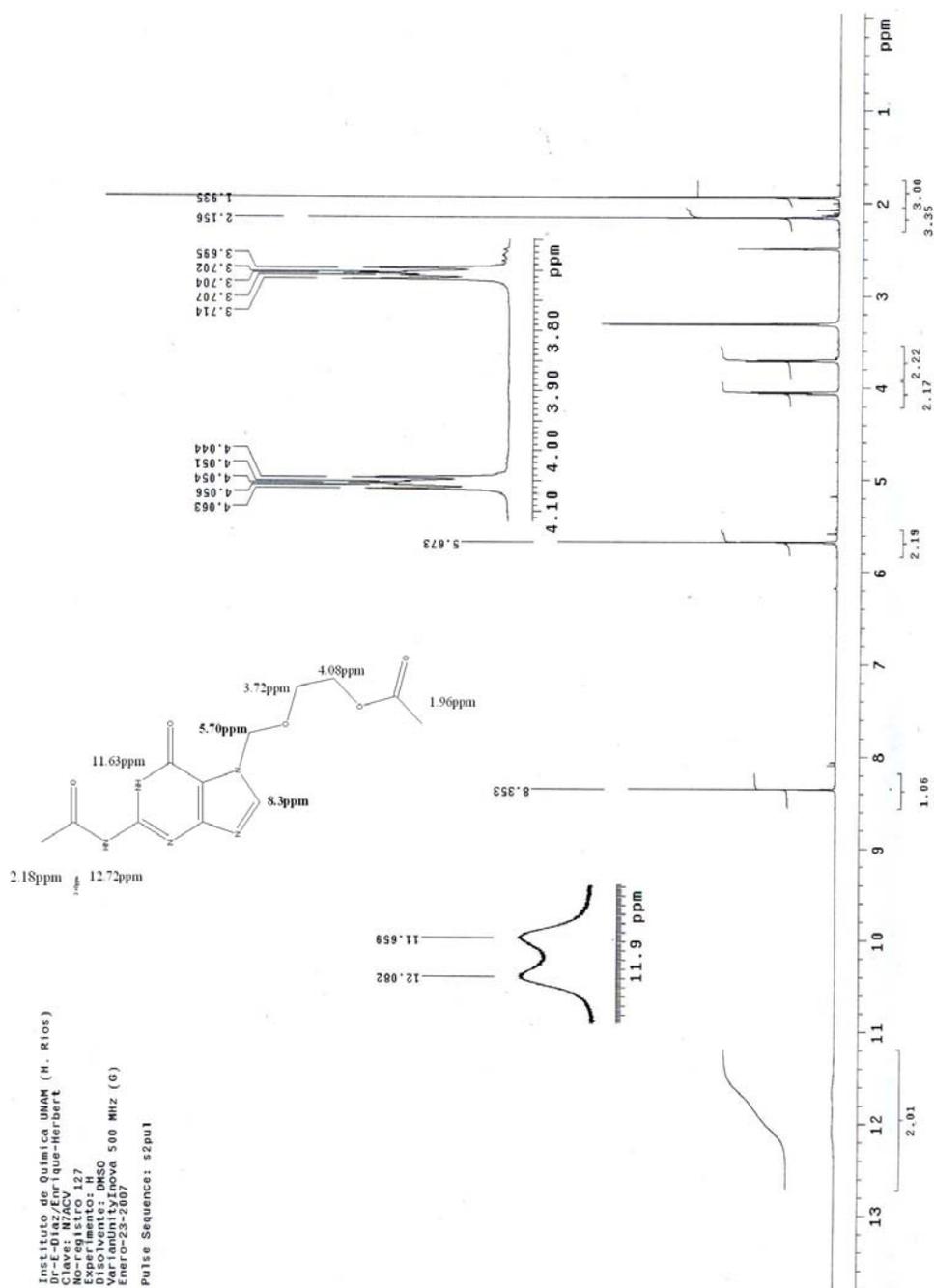


Figura 6.4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 500 MHz de  $\text{N}^7$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $\text{N}^2$ -acetil guanina (2b) obtenido mediante la ruta sintética expuesta en la sección 6.5. La molécula sobre el espectro indica los desplazamientos químicos reportados por Matsumoto y cols.

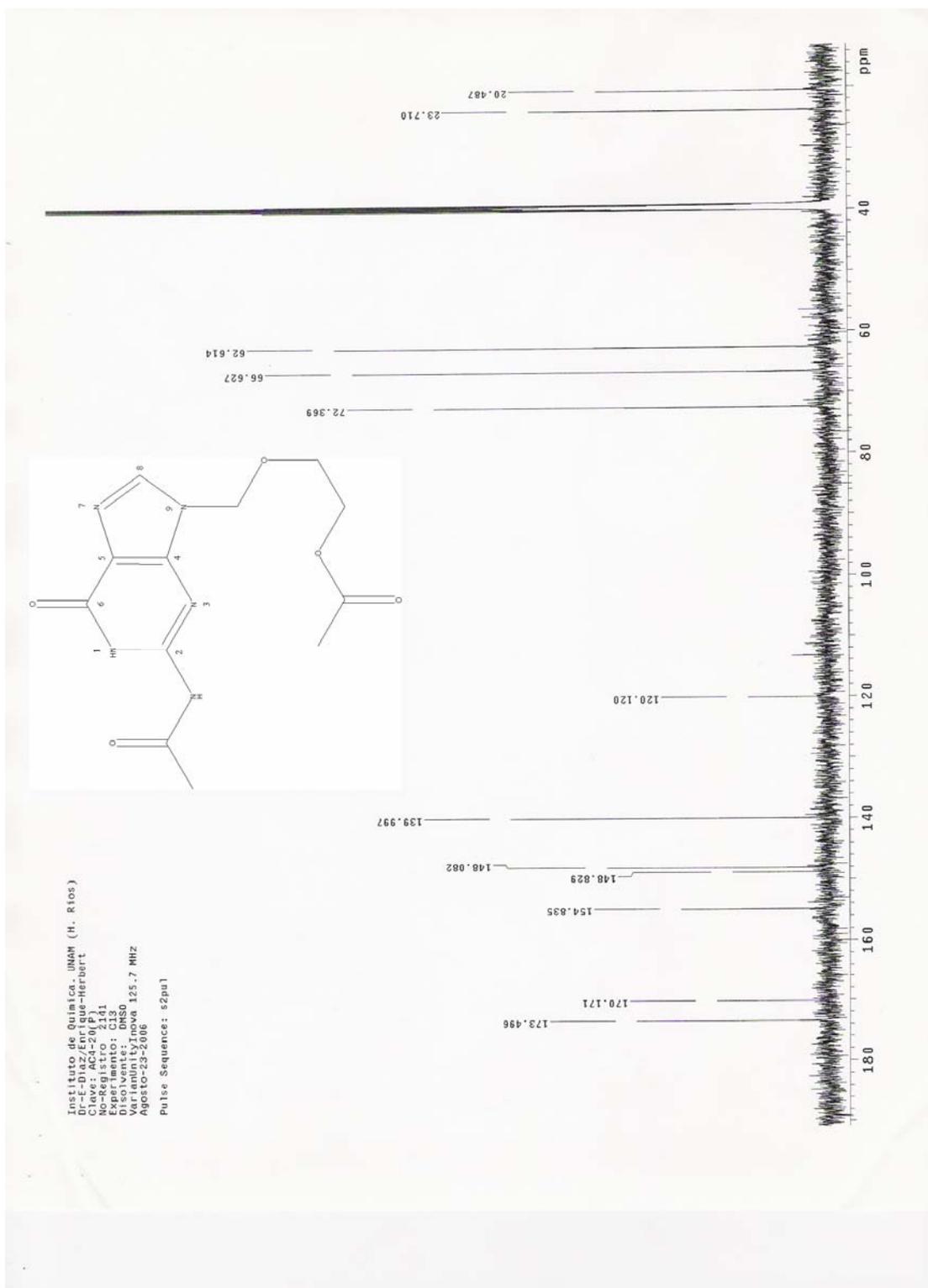


Figura 6.5. Espectro de RMN <sup>13</sup>C a 125 MHz de N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil guanina (2a) obtenido mediante la ruta sintética expuesta en la sección 6.5. La señal más representativa del isómero (2a) es aquella producida por el C-5 desplazado a 120ppm.

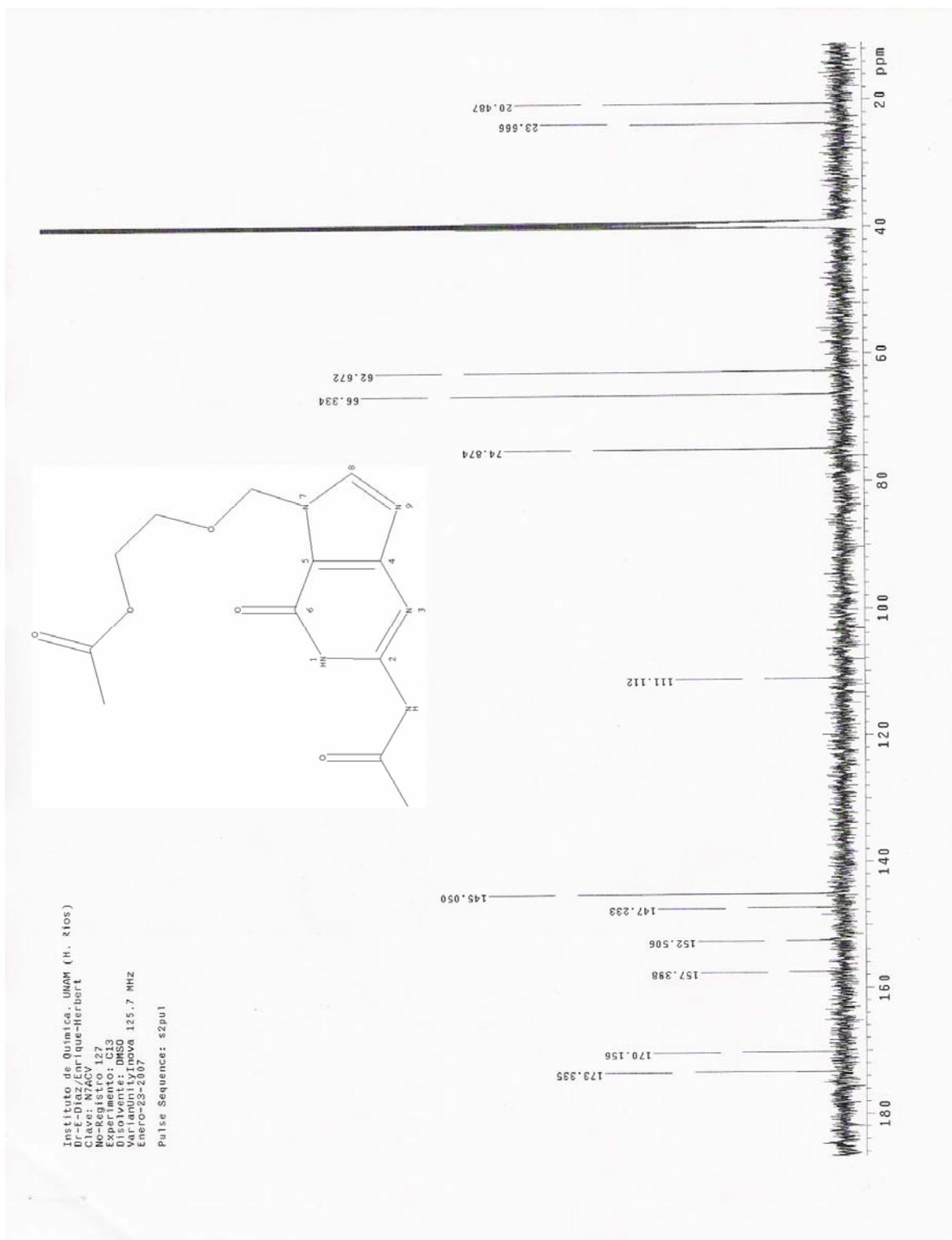
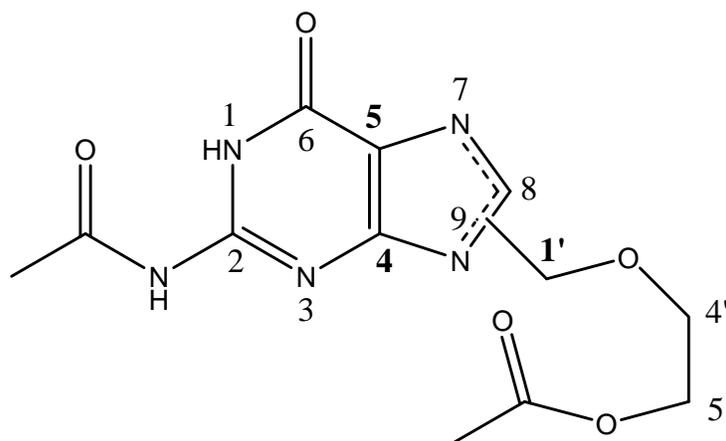


Figura 6.6. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz de  $\text{N}^7$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $\text{N}^2$ -acetil guanina (2b) obtenido mediante la ruta sintética expuesta en la sección 6.5. La señal más representativa del isómero (2b) es aquella producida por el C-5 desplazado a 111ppm.

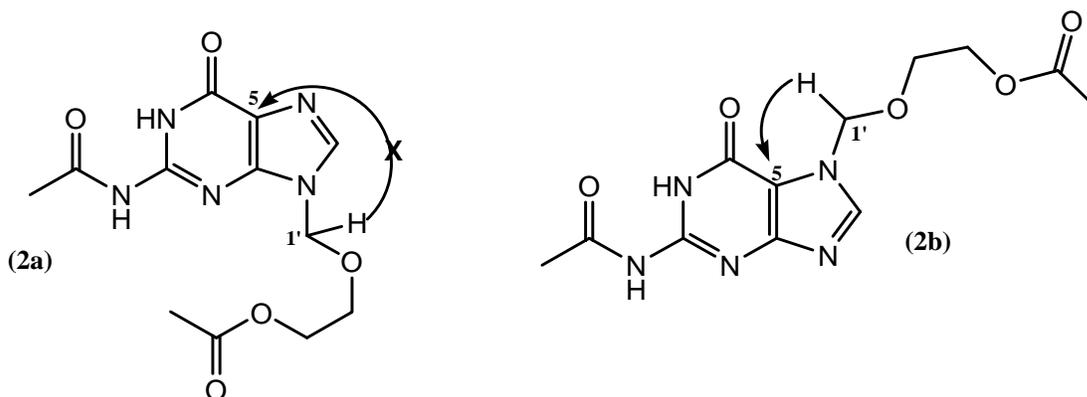
Hasta este punto sólo se ha logrado determinar los rendimientos reales para (2a) y (2b) producidos bajo las condiciones reportadas por Matsumoto, justificados por sus respectivos espectros de RMN. De acuerdo con los datos espectroscópicos descritos en la tabla 3.3, los desplazamientos químicos producidos por los hidrógenos cercanos al enlace formado C-N, coinciden con nuestros resultados, dándose así una forma para identificar a los isómeros de interés. De manera similar, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  presenta señales características que logran diferenciar *cualitativamente* a (2a) de (2b); sin embargo en este trabajo de tesis se proponen métodos más sofisticados para identificar inequívocamente estos dos compuestos. Para ello utilizamos experimentos de tipo HMBC (Correlación Heteronuclear a Múltiples Enlaces) por espectroscopía de RMN<sup>2D</sup> (bidimensional).

Las diferencias entre (2a) y (2b) con este tipo de experimentos se da gracias a la combinación de ciertas correlaciones C-H; es decir mientras que un isómero presenta una señal de cierta correlación específica, la misma señal esperada para el otro isómero no se observa. Para una interpretación más clara, a continuación se muestra la numeración asignada a cada átomo presente en la molécula de interés, sin considerar el tipo de isómero:



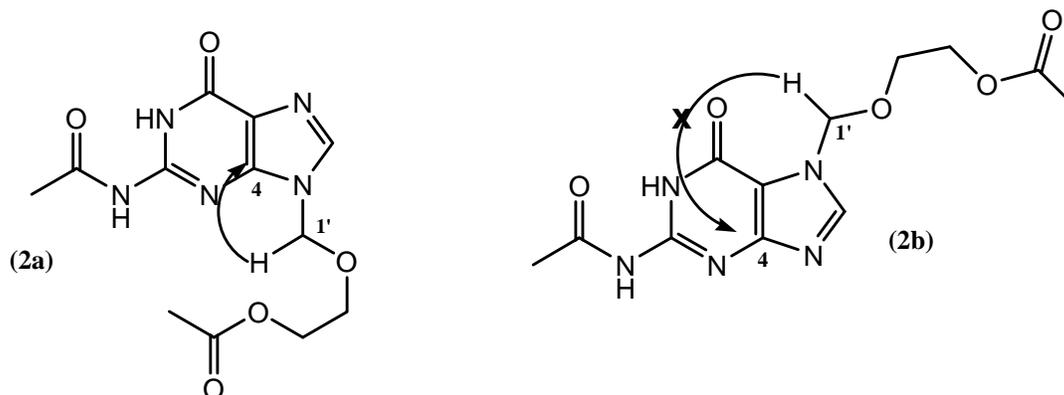
**Figura 6.7.** Numeración de los átomos (carbono y/o hidrógeno) para la molécula  $\text{N}^2$ -acetil- $\text{N}^{(7,9)}$ -[(2-acetoxietoxi)metil]-guanina (2a ó 2b) para la interpretación de los espectros de RMN<sup>2D</sup> (HMBC). Las correlaciones más relevantes se dan para aquellos átomos designados con números resaltados.

a) Correlación  $H^{1'}$ ,  $C^5$ : Dicha interacción se presenta para el isómero (2b), a tres enlaces de distancia ( ${}^3J_{C-H}$ ). Para el isómero (2a) esta correlación no se presenta en el experimento HMBC, puesto que cuando el radical acíclico se encuentra sustituido sobre la posición N-9 del anillo heterocíclico, esta distancia por enlaces es mayor.



**Figura 6.8.** La ausencia de la correlación  $J_{C(5)-H(1')}$  en (2a) y la presencia de la misma en (2b) con valor  ${}^3J_{C(5)-H(1')}$  es una forma inequívoca de diferenciar a los diacetil-aciclonucleósidos.

b) Correlación  $H^{1'}$ ,  $C^4$ : A diferencia de lo descrito en el inciso anterior, esta correlación se presenta a tres enlaces de distancia para el isómero (2a) y debido a que en el isómero (2b), la cadena acíclica se encuentra sustituida sobre la posición N-7 de la base nitrogenada, dicha correlación hipotética a cuatro enlaces de distancia no se detecta.



**Figura 6.9.** La ausencia de la correlación  $J_{C(4)-H(1')}$  en (2b) y la presencia de la misma en (2a) con valor  ${}^3J_{C(4)-H(1')}$  es otro parámetro para diferenciar a los diacetil-aciclonucleósidos.

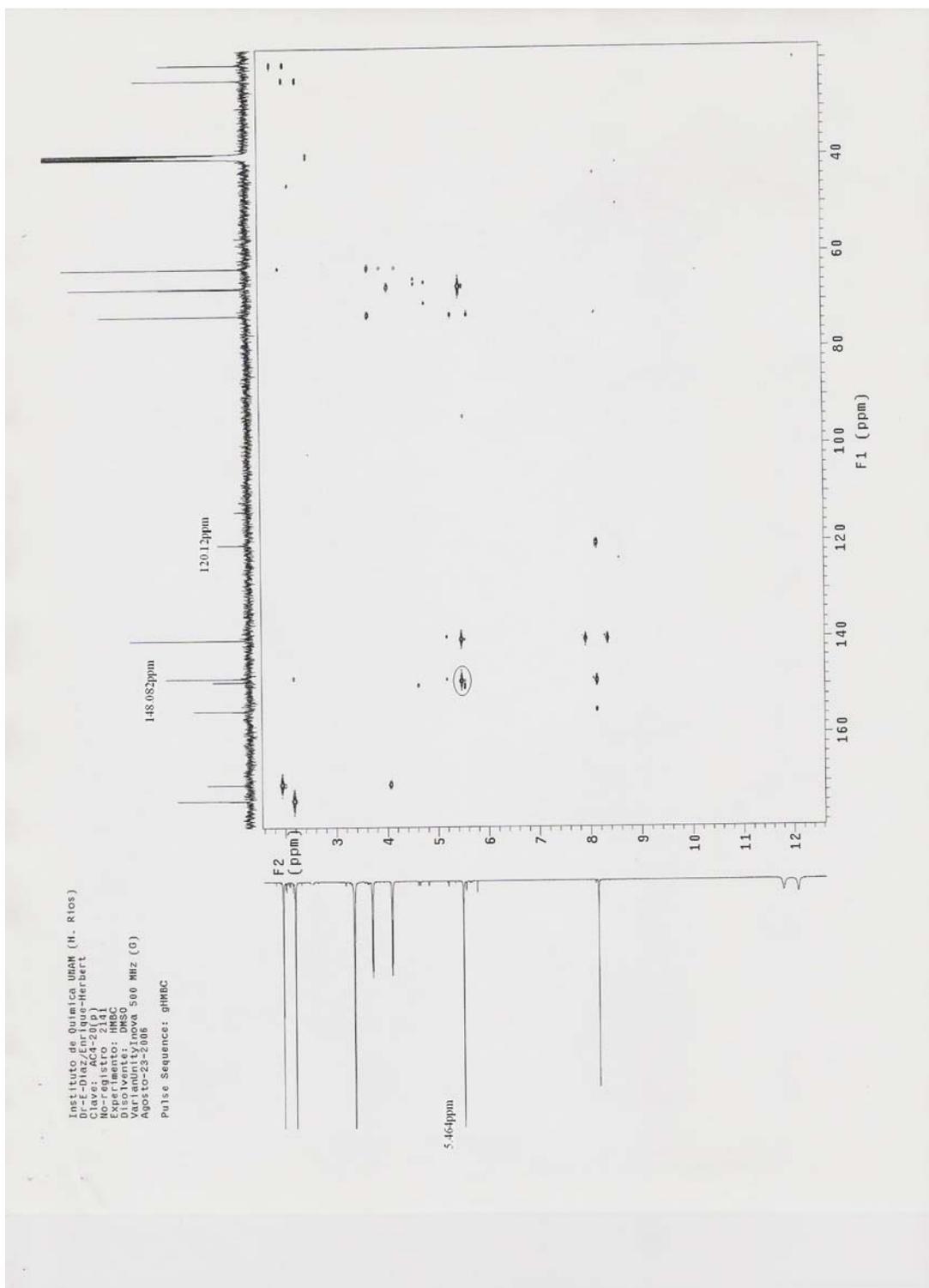


Figura 6.10. Espectro de RMN<sup>2D</sup> HMBC del isómero N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a). Al analizar el área entre las señales descritas con su desplazamiento químico se observa por una parte, que no existe correlación entre el C-5 y H-1', pero si se presenta la correlación a tres enlaces a distancia entre el C-4 y H-1'.

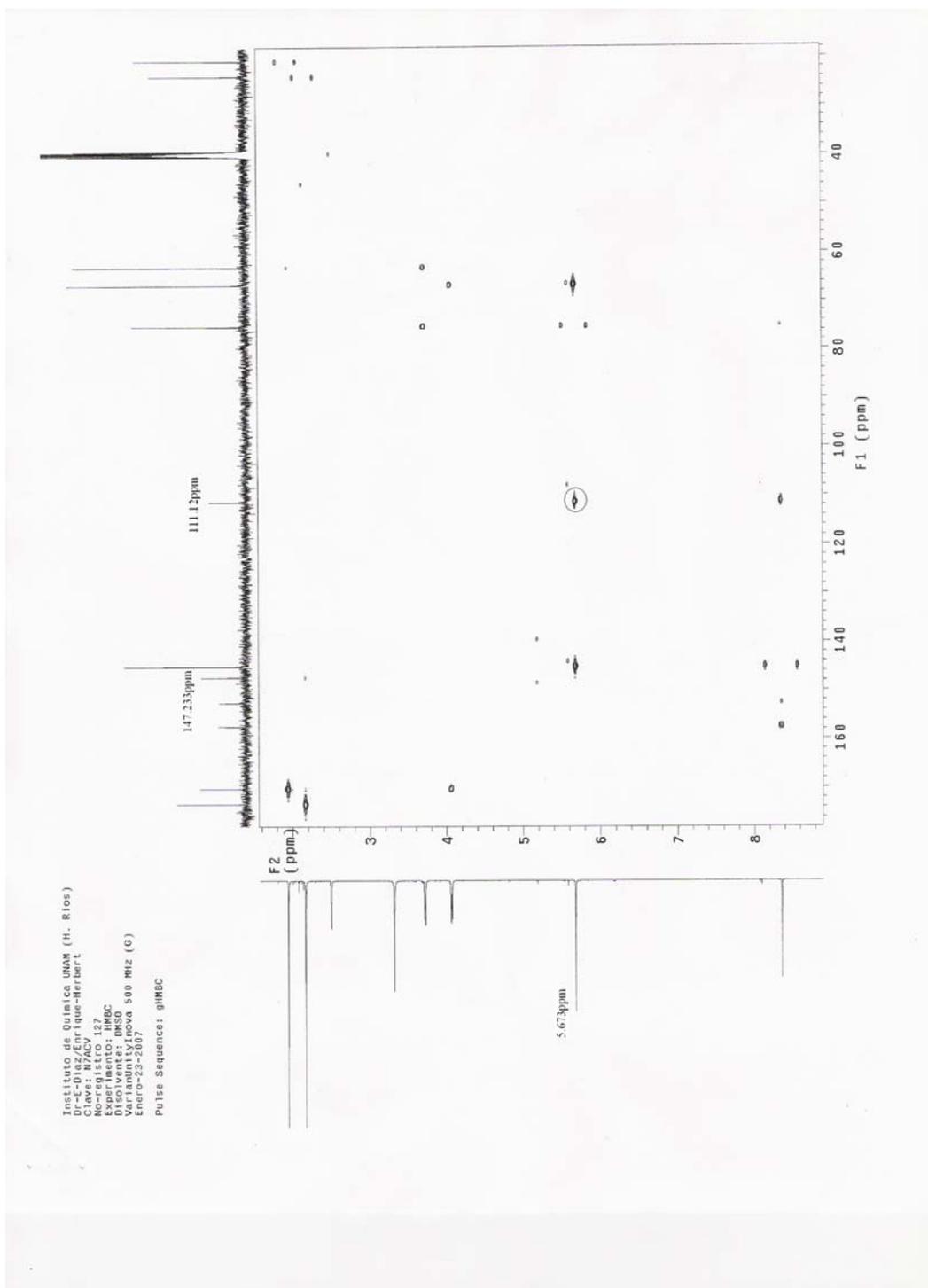
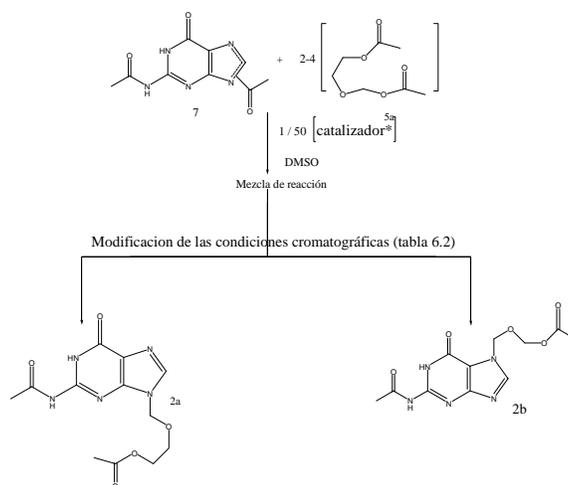


Figura 6.11. Espectro de RMN<sup>2D</sup> HMBC del isómero N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b). Al analizar el área entre las señales descritas con su desplazamiento químico se observa por una parte, que no existe correlación entre el C-4 y H-1', pero si se presenta la correlación a tres enlaces a distancia entre el C-5 y H-1'. (Nota: la señal cercana al C-4 (147.23ppm) es resultado de la correlación entre el C-8 y H-1'. El átomo de carbono imidazólico se encuentra desplazado a 145.05ppm)

6.6. Estudio del acoplamiento catalítico para formación de aciclonucleósidos sustituidos en N-9 y selectividad mediante la utilización de catalizadores de tipo ácidos sulfónicos.

Una vez que se establecen las condiciones más adecuadas para monitorear todas las reacciones por CCF, purificar cada compuesto obtenido por cromatografía en columna y caracterizar por espectroscopía de RMN, se realizaron los ensayos catalíticos para formar (2a) como producto principal tratando de mejorar su rendimiento mediante el acoplamiento catalítico de (5a) hacia la base heterocíclica (7) modificando en cada caso, el catalizador para determinar si existe un efecto en la acidez del catalizador que incremente la selectividad para formar (2a).

En la tabla 3.2 se encuentran resumidos los rendimientos de (2a) y (2b) en función de la temperatura de la reacción y de la acidez de algunos catalizadores trabajados por Sato y cols<sup>12</sup>. Por una parte estos trabajos demostraron cierta influencia de la baja acidez del catalizador para incrementar el rendimiento de (2a), sin embargo estos valores son considerablemente bajos y es por ello que en esta investigación trabajamos con catalizadores similares al ácido p-toluensulfónico (k-3) con el que se obtiene en mayor cantidad (2a) como lo demuestran los trabajos del grupo de trabajo de Matsumoto.



\* Los catalizadores utilizados a distintas condiciones cinéticas son:  
-ácido p-toluensulfónico monohidratado (k-3).  
-ácido m-nitrobencensulfónico monohidratado (k-4).  
-ácido m-xylensulfónico trihidratado (k-2).

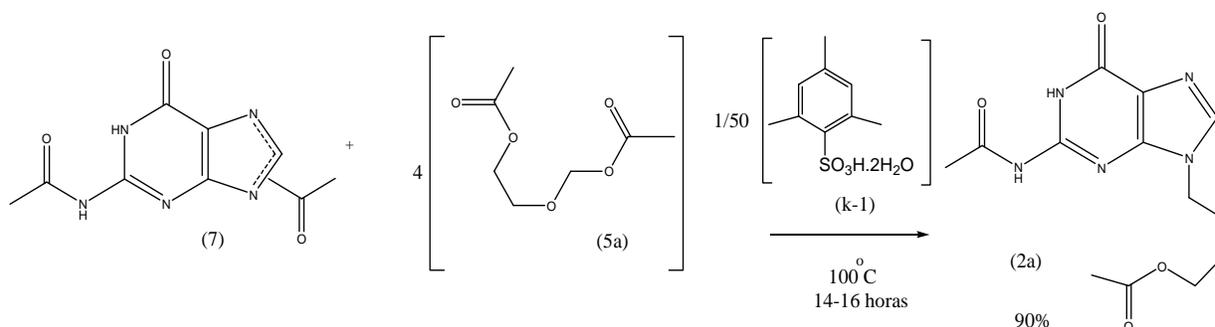
**Esquema 6.4. Ruta de síntesis general para el estudio del acoplamiento catalítico para formar diacetilaciclonucleósidos. Con los catalizadores mostrados en el esquema se obtuvo tanto (2a) como (2b), el primero en mayor proporción al segundo, a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de reacción.**

- 6.6.1. Experimentos con (k-3) como catalizador. Reproduciendo los trabajos de Matsumoto hemos visto que se obtiene un 61% de (2a) y 20% de (2b) cuando la catálisis se lleva a cabo a 100°C durante 16 horas. Por otra parte al reproducir los experimentos anteriores a Matsumoto, realizados por Beauchamp, Schaeffer y cols<sup>8</sup>, en el que bajo condiciones estequiométricas similares pero a una temperatura de 140°C durante veinte minutos de catálisis y utilizando las técnicas de detección desarrolladas por nosotros sólo se obtiene (2a) con un rendimiento de 19%. No se detectó la formación de (2b).
- 6.6.2. Experimentos con (k-4) como catalizador. Los experimentos que se describirán a continuación se realizaron bajo las condiciones estequiométricas mencionadas en el esquema 6.2 pero la principal diferencia consiste en la utilización de un catalizador ligeramente de mayor acidez que (k-4) debido al grupo electroatractor (NO<sub>2</sub>) en posición meta al grupo donador de protón (SO<sub>3</sub>-H). El primer experimento se llevó a cabo con los valores estequiométricos mencionados en el esquema a una temperatura de 100°C durante 16 horas de reacción. Bajo estas condiciones se obtuvo un 5% de (2a) y para (2b) un rendimiento de 0.6%. Posteriormente se realizó un segundo experimento modificando únicamente las condiciones de tiempo de reacción (24 horas de catálisis). Los rendimientos obtenidos fueron de 48% para (2a) y 8% para (2b). Se observan dos hechos interesantes: En el primer experimento se obtienen rendimientos de (2a) menores con respecto al experimento realizado a condiciones similares con (k-3); lo anterior representa claramente el patrón esperado: a medida que se utiliza un catalizador de mayor acidez con respecto a (k-3), se obtienen rendimientos menores del producto principal. El segundo hecho consiste en que cuando se incrementa el tiempo de reacción (24 horas) se observan cantidades mayores de (2b) y en comparación con el segundo experimento descrito en la sección 6.6.1, cuando se realiza la catálisis con tan solo veinte minutos de reacción sólo se aprecia la formación de (2a) destacando la posibilidad de que la velocidad de formación de (2a) es mayor a la de (2b).
- 6.6.3. Experimento con (k-2) como catalizador. Es evidente que a comparación de (k-3), el ácido m-xylensulfónico (k-2) presenta menor acidez debido a los dos

grupos metilo (orto-para al grupo ácido) presentes en la molécula del catalizador que al donarle densidad electrónica al anillo aromático, dificultan la extracción del protón del grupo sulfónico.

El experimento más representativo y reproducible se da cuando los reactivos y catalizador se mezclan en las cantidades estequiométricas habituales y la reacción se realiza a una temperatura de 100°C durante 16 horas. Debido a que se utilizó un catalizador de menor acidez que (k-3) y (k-4) los rendimientos para (2a) aumentaron considerablemente a 73% mientras que sólo se logró formar un 8% de (2b)

- o 6.6.4. Síntesis regioselectiva de (2a) utilizando ácido mesitilensulfónico (k-1) como catalizador. De acuerdo con la lógica de la hipótesis planteada junto con los resultados de los experimentos anteriores, se esperaba que al utilizar un ácido sulfónico de menor acidez se incrementaría en cierta medida la selectividad para acoplar la cadena acíclica sobre la posición N-9 del heterociclo. Sin embargo se determinaron ciertas condiciones de reacción (esquema 6.3) en las que al utilizar este catalizador, la selectividad para formar exclusivamente (2a) es altamente probable:



**Esquema 6.5.** Se encontró que el acoplamiento catalítico del radical acíclico a N-N-diacetilguanina más selectivo y de mejores rendimientos se lleva a cabo cuando se utiliza como catalizador un ácido sulfónico (k-1) de menor fuerza que el resto de los catalizadores probados. Esta catálisis presenta otro importante hecho: bajo las condiciones de reacción mostradas no se detecta la formación del isómero N<sup>7</sup>-[(2acetoxietoxi)metil-N<sup>2</sup>-acetil guanina (2b).

En una primera prueba se realizó el acoplamiento catalítico como se muestra en el esquema 6.3. Por CCF se detectó la lenta formación del isómero (2a) R<sub>f</sub> 0.51. Fue hasta un intervalo de tiempo de entre catorce y dieciséis horas de reacción cuando se observó el consumo total de la materia prima (7) y sobre la misma placa cromatográfica se aprecia un producto mayoritario con valor de R<sub>f</sub> 0.51. Al purificar tanto por cromatografía en columna como en

placa preparativa se obtiene con 90% de rendimiento, cristales incoloros de forma laminar. Por espectroscopía de RMN se determinó que dicho producto consistía en (2a).

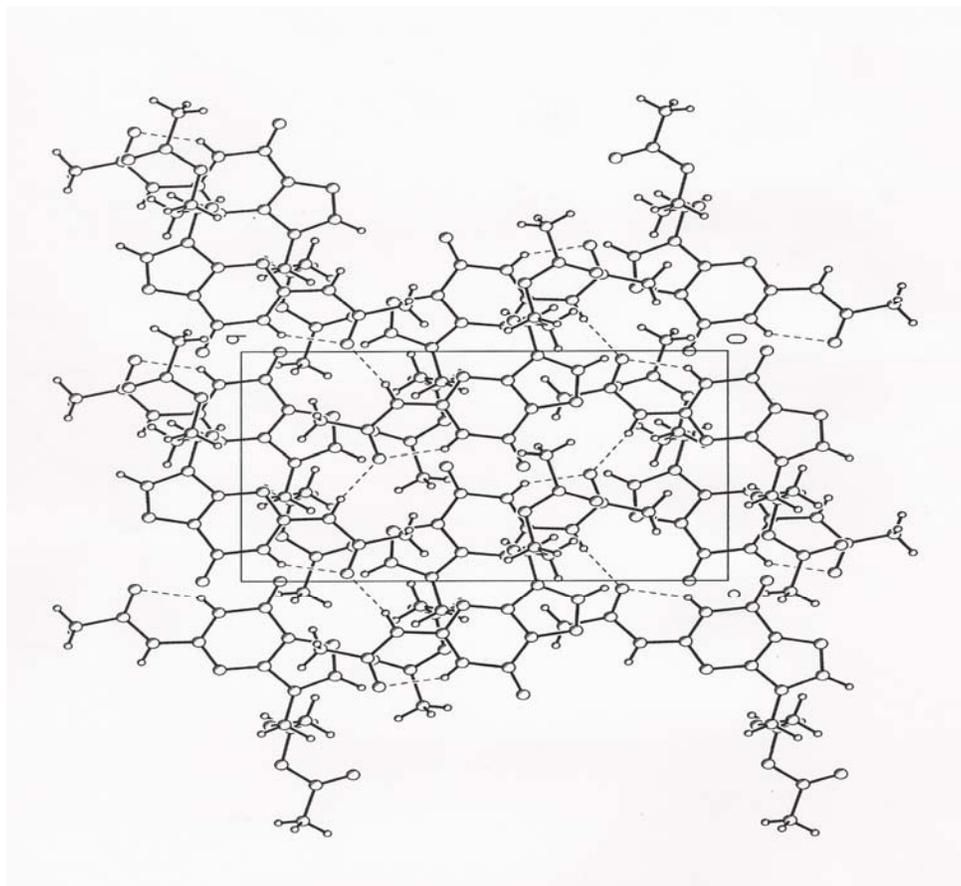
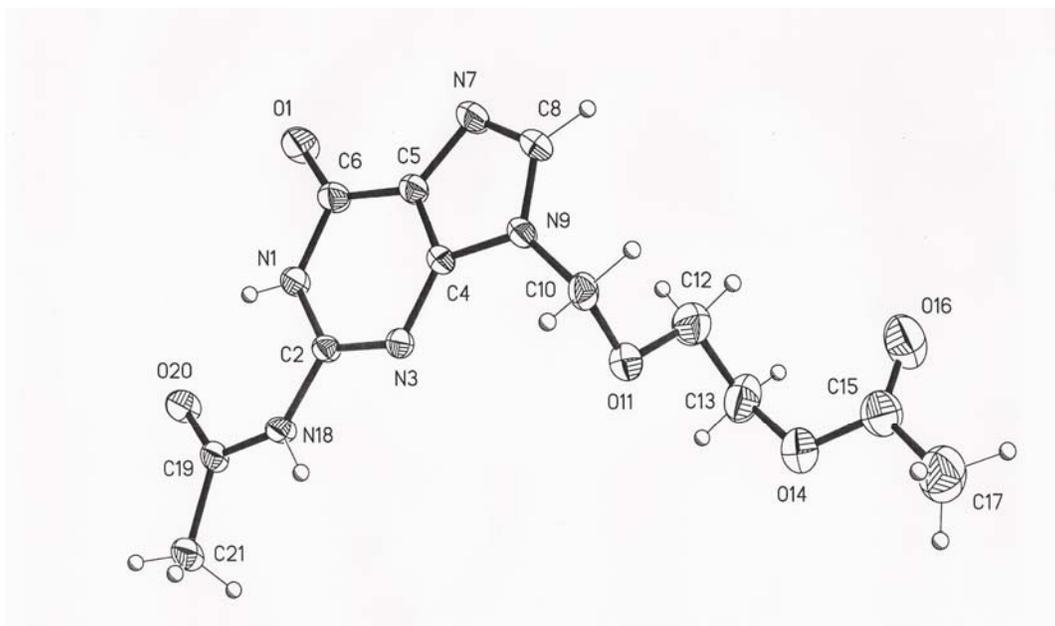
Una observación experimental interesante se da a partir de analizar las razones por las que el producto cristaliza de manera espontánea una vez purificado por cromatografía en columna. Es probable que este hecho sea debido a que (2a) se forma regioselectivamente y libre de subproductos. Este fenómeno sólo se da al sintetizar el aciclonucleósido por este método, mientras que en el resto de los experimentos se purificó a (2a) vía una recrystalización simple con una disolución MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1).

De los cristales formados bajo este procedimiento, se logró obtener un monocristal que fue caracterizado por Difracción de Rayos X. Esta técnica no sólo proporciona los datos cristalográficos tales como la geometría y tamaño del cristal, número de átomos por celda unitaria (Z), acomodamiento espacial de los átomos en la celda unitaria (figura 6.13), grupo espacial, etc. En la figura 6.12 se encuentran listados los valores de distancias y ángulos de enlace de los átomos que conforman (2a). Si se comparan las distancias de enlace entre el C<sup>8</sup>-N<sup>7</sup> y el C<sup>8</sup>-N<sup>9</sup> se observa que los valores son de **1.299Å** y **1.377 Å** respectivamente. Debido a que la cadena acíclica se encuentra sustituida sobre el átomo N9, el enlace C<sup>8</sup>-N<sup>9</sup> es de mayor distancia puesto que consiste en un enlace sencillo a diferencia de la distancia de enlace C<sup>8</sup>-N<sup>7</sup> que es menor por su carácter de enlace doble. Quizás lo anterior no sea una forma contundente de diferenciar a (2a) de (2b) pero si nos ofrece información valiosa para asegurar la presencia de (2a).

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for DzAcACV.

O(1)-C(6)	1.221(4)	N(9)-C(10)	1.464(4)
N(1)-C(2)	1.362(4)	C(10)-O(11)	1.405(4)
N(1)-C(6)	1.419(4)	O(11)-C(12)	1.412(5)
C(2)-N(3)	1.306(4)	C(12)-C(13)	1.493(6)
C(2)-N(18)	1.381(4)	C(13)-O(14)	1.448(5)
N(3)-C(4)	1.361(4)	O(14)-C(15)	1.333(5)
C(4)-N(9)	1.364(4)	C(15)-O(16)	1.203(5)
C(4)-C(5)	1.375(4)	C(15)-C(17)	1.498(7)
C(5)-N(7)	1.379(4)	N(18)-C(19)	1.371(4)
C(5)-C(6)	1.435(5)	C(19)-O(20)	1.224(4)
N(7)-C(8)	1.299(5)	C(19)-C(21)	1.486(5)
C(8)-N(9)	1.377(4)		
C(2)-N(1)-C(6)	125.3(3)	C(4)-N(9)-C(8)	105.4(3)
N(3)-C(2)-N(1)	124.7(3)	C(4)-N(9)-C(10)	126.0(3)
N(3)-C(2)-N(18)	116.3(3)	C(8)-N(9)-C(10)	128.5(3)
N(1)-C(2)-N(18)	119.0(3)	O(11)-C(10)-N(9)	112.0(3)
C(2)-N(3)-C(4)	112.1(3)	C(10)-O(11)-C(12)	112.0(3)
N(3)-C(4)-N(9)	125.3(3)	O(11)-C(12)-C(13)	109.7(4)
N(3)-C(4)-C(5)	128.6(3)	O(14)-C(13)-C(12)	112.3(4)
N(9)-C(4)-C(5)	106.1(3)	C(15)-O(14)-C(13)	116.5(4)
C(4)-C(5)-N(7)	110.6(3)	O(16)-C(15)-O(14)	123.1(5)
C(4)-C(5)-C(6)	118.9(3)	O(16)-C(15)-C(17)	124.4(5)
N(7)-C(5)-C(6)	130.4(3)	O(14)-C(15)-C(17)	112.5(5)
O(1)-C(6)-N(1)	120.0(3)	C(19)-N(18)-C(2)	128.7(3)
O(1)-C(6)-C(5)	129.6(3)	O(20)-C(19)-N(18)	121.9(3)
N(1)-C(6)-C(5)	110.4(3)	O(20)-C(19)-C(21)	122.9(3)
C(8)-N(7)-C(5)	104.1(3)	N(18)-C(19)-C(21)	115.2(3)
N(7)-C(8)-N(9)	113.7(3)		

Figura 6.12. Transparencia extraída del documento original. Espectro de difracción de Rayos X de monocristal. Valores de distancia y ángulos de enlace del intermediario N<sup>9</sup>-[(2acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a).

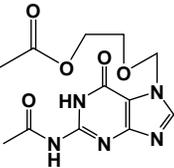
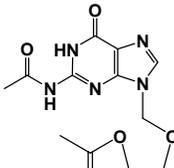
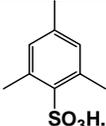
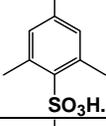
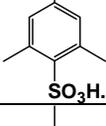
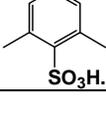


**Figura 6.13.** Transparencia extraída del documento original. Espectro de difracción de Rayos X de monocristal del intermediario  $N^9$ -[(2acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina (2a). Estructura espacial (clasificando numéricamente cada átomo de la molécula) y celda unitaria.

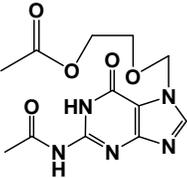
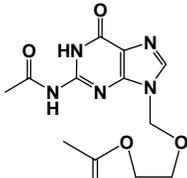
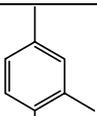
Debido a los resultados satisfactorios que se obtuvieron al sintetizar (2a) por la ruta sintética ilustrada en el esquema 6.5, investigamos a profundidad esta reacción haciendo variaciones del tiempo y temperatura de reacción utilizando (k-1) como catalizador en todos los casos. Los resultados de estos ensayos se encuentran reportados en la tabla 6.2 de la que se puede resumir lo siguiente: Se encontró que la reacción más selectiva para formar (2a) se da al catalizar la reacción con (k-1) a una temperatura de 100°C durante 16 horas. Cuando la catálisis se lleva a cabo a tiempos muy cortos (0.33 ó 5 horas) se forma más rápidamente el aciclonucleósido sustituido en N-9 en muy bajo rendimiento. Por otra parte se encontró que es posible formar (2b) como producto secundario cuando la síntesis se prolonga a 24 horas de calentamiento a 100°C.

En general es apreciable la tendencia esperada: *la regioselectividad para formar (2a) aumenta cuando el acoplamiento catalítico se lleva a cabo con ácidos sulfónicos de menor acidez.*

**Tabla 6.2. Rendimientos obtenidos para (2a) y (2b) utilizando ácido mesitilensulfónico dihidratado como catalizador a diferentes condiciones catalíticas. Cada experimento se realizó por duplicado.**

Catalizador (k-1)	Temperatura de reacción (°C)	Tiempo de reacción (hrs.)	Rendimiento promedio (%)  (2b)	Rendimiento promedio (%)  (2a)
	<b>100</b>	<b>16</b>	_____	<b>90.10</b>
	100	24	13.13	63.23
	140	0.33	_____	19.04
	110	5	_____	34.64

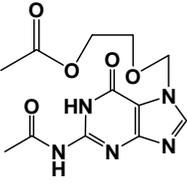
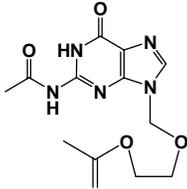
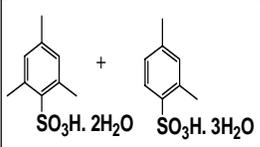
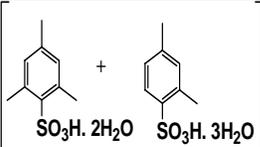
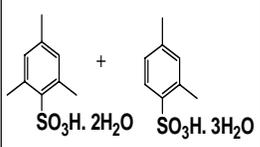
**Tabla 6.3. Rendimientos obtenidos para (2a) y (2b) utilizando catalizadores de mayor fuerza ácida que el ácidomesitilensulfónico (k-1) a diferentes condiciones catalíticas. Cada experimento se realizó por duplicado.**

Catalizador	Temperatura de reacción (°C)	Tiempo de reacción (hrs.)	Rendimiento promedio (%)  (2b)	Rendimiento promedio (%)  (2a)
 SO <sub>3</sub> H. 3H <sub>2</sub> O (k-2)	100	16	7.72	73.36
 SO <sub>3</sub> H .H <sub>2</sub> O (k-3)	100	16	20.34	61.09
 SO <sub>3</sub> H .H <sub>2</sub> O (k-3)	140	0.33	—	18.93
 SO <sub>3</sub> H. H <sub>2</sub> O (k-4)	140	24	8.42	47.98
 SO <sub>3</sub> H. H <sub>2</sub> O (k-4)	100	16	0.58	4.96

- 6.6.5. Experimentos con mezcla de catalizadores de menor acidez (k-1 + k-2). Se realizó una prueba en la que el acoplamiento catalítico de la cadena acíclica (5) hacia (7) se llevó a cabo utilizando una mezcla de los catalizadores menos ácidos (k-1 y k-2) en los que al ser utilizados individualmente se obtienen los mejores

resultados. Los rendimientos para (2a) y (2b) se reportan en la tabla 6.5 y de éstos se puede deducir lo siguiente: La selectividad que presentan los catalizadores al ser utilizados de manera individual se pierde completamente; a tiempos de reacción bajos, no se forma ninguno de los isómeros esperados. Finalmente se observa que la reacción llega a un equilibrio en la que se deja de formar tanto (2a) como (2b). Nótese que sin importar que la reacción se lleve a cabo a tiempos mayores o iguales a 16 horas, la composición de los productos principales no cambia mucho y los rendimientos de ambos son bastante bajos.

**Tabla 6.4. Rendimientos obtenidos para (2a) y (2b) utilizando mezcla de catalizadores (k-1 + k-2) a diferentes condiciones catalíticas. Cada experimento se realizó por duplicado.**

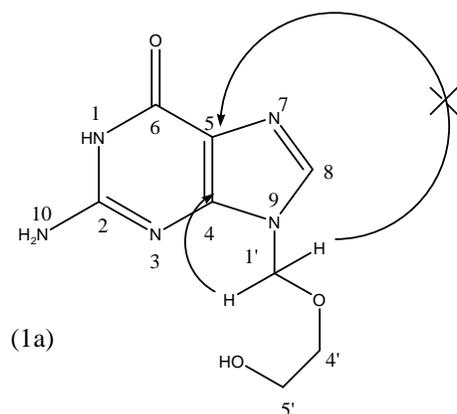
Catalizador	Temperatura de reacción (°C)	Tiempo de reacción (hrs.)	Rendimiento promedio (%)  (2b)	Rendimiento promedio (%)  (2a)
 (k-1) + (k-2) (1:1)	100	16	1.91	6.76
 (k-1) + (k-2) (1:1)	140	0.33	—	—
 (k-1) + (k-2) (1:1)	100	48	2.77	14.93

### 6.7. Síntesis y caracterización del acyclovir (1a).

Hemos visto que el paso más complicado en la ruta sintética para la formación de (1a) consiste en el acoplamiento catalítico del radical acíclico a la base nitrogenada. Una simple amonólisis de (2a) con solución saturada de amoníaco en metanol produce el antiviral sin ninguna complicación y en altos rendimientos. Para poder calcular correctamente el rendimiento se debe asegurar que todo el acyclovir formado proviene directamente de su precursor (2a) y que el producto formado no presente trazas de isómero del antiviral, N<sup>7</sup>-([2-hidroxietoxi)metil]-guanina, que podría producirse si la composición de la materia prima de este paso consistiera en una mezcla de (2a) y (2b).

Experimentalmente, la pureza del producto final se observa con la formación de cristales de punto de fusión 256-257°C. La cromatografía en capa fina de este producto pone en evidencia la pureza del producto pero en este trabajo proponemos la espectroscopía de RMN<sup>2D</sup> como el método más infalible para asegurar la pureza del antiviral.

En el inciso 6.5 se menciona que el precursor de (1a) carece de una correlación (experimento HMBC) a cuatro enlaces de distancia entre el C-5 de la base y los protones del metileno del radical acíclico enlazado al nitrógeno 9 del heterociclo. Si se observa a detalle las figuras 6.14 y 6.15, el espectro HMBC de (1a) presenta las mismas correlaciones que su precursor y de la misma forma no se observa señal de correlación carbono-hidrógeno entre el C-5 y CH<sub>2</sub><sup>1'</sup> (<sup>4</sup>J<sub>C-H</sub>). De esta forma no queda duda que el fragmento acíclico en (1a) permanece enlazado al N-9 de la base.



**Figura 6.14** Esquema de las correlaciones más importantes encontradas en el experimento HMBC de la RMN<sup>2D</sup> del producto (1a). Al igual que su precursor, en el acyclovir no se observa la correlación entre el carbono 5 de la base (116.43ppm en RMN <sup>13</sup>C) y el metileno que une a la cadena acíclica con el heterociclo (5.33ppm en RMN <sup>1</sup>H).

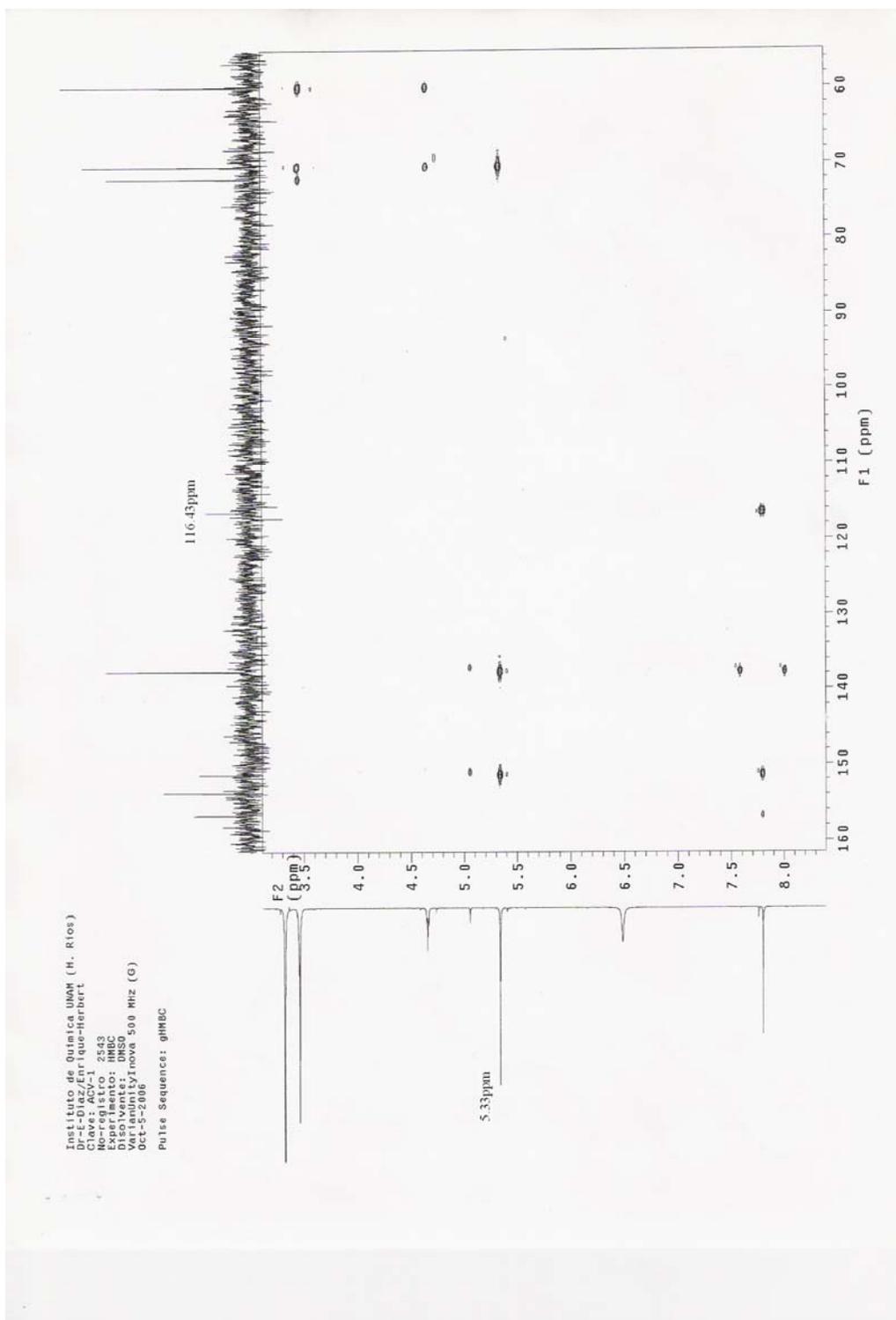
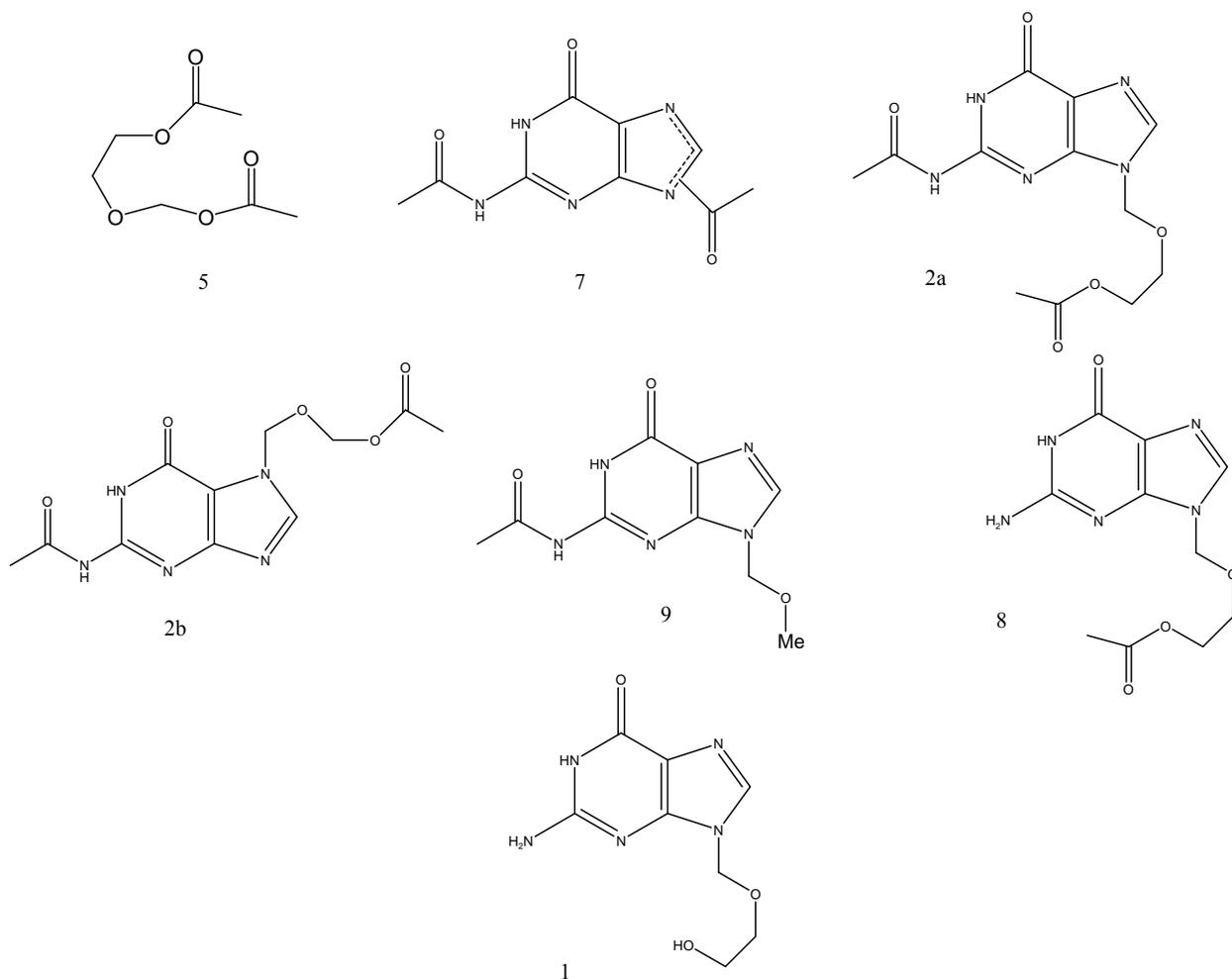
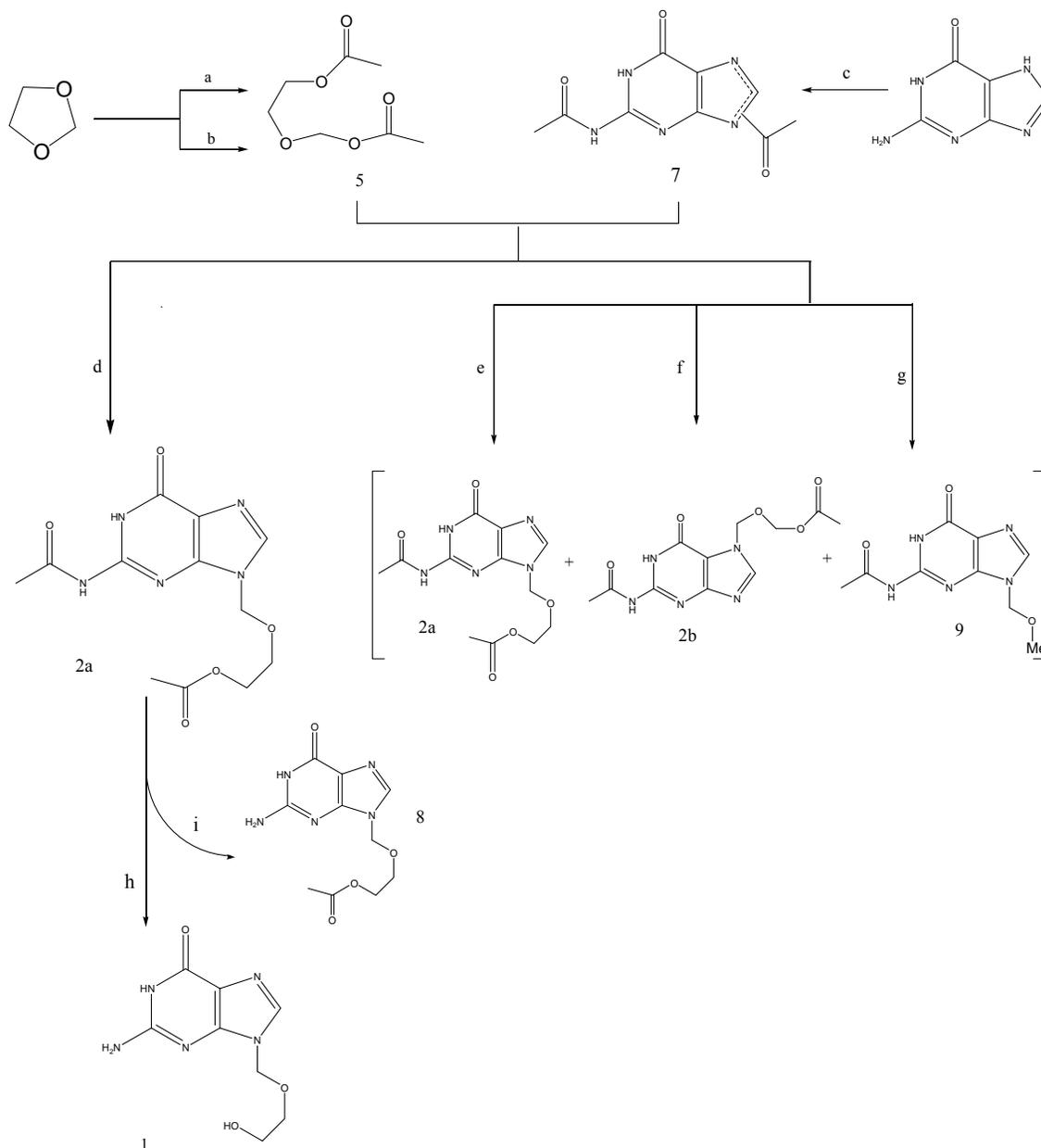


Figura 6.15. Espectro de RMN<sup>2D</sup> HMBC del isómero N<sup>9</sup>-[(2-hidroxietoxi)metil]-guanina (1a). Al analizar el área entre las señales descritas con su desplazamiento químico se observa que no existe la correlación descrita, siendo el indicador de la sustitución del radical acíclico sobre la posición N-9 de la base heterocíclica.

## 7. Desarrollo experimental.



**Figura 7.1. Estructura de los compuestos sintetizados. 1.** N<sup>9</sup>-[(2-hidroxietoxi)metil-guanina; **2a.** N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil-N<sup>2</sup>-acetil-guanina; **2b.** N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina; **5.** Diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol; **7.** N<sup>2</sup>-N<sup>7,9</sup>-diacetil-guanina; **8.** N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-guanina; **9.** N<sup>9</sup>-(metoximetil)-N<sup>2</sup>-acetil-guanina.



**Esquema 7.1. Ruta sintética para la obtención de acyclovir (1).** a)  $\text{CH}_3\text{COBr}$ ,  $\text{AcONa}/\text{AcOH}$ ; b)  $\text{CH}_3\text{CO-O-COCH}_3 / \text{H}_2\text{SO}_4$  (cat.) /  $100^\circ\text{C} / 16\text{hrs}$ ; c)  $\text{CH}_3\text{CO-O-COCH}_3 / \text{AcOH}$ ; d) ácido mesitilensulfónico dihidratado<sub>(cat.)</sub> /  $100^\circ\text{C} / 16\text{hrs}$ ; e) ácido m-xilensulfónico trihidratado<sub>(cat.)</sub> /  $100^\circ\text{C} / 16\text{hrs}$ ; f) ácido p-toluensulfónico monohidratado<sub>(cat.)</sub> /  $100^\circ\text{C} / 16\text{hrs}$ ; g) ácido-m-nitrobencensulfónico monohidratado<sub>(cat.)</sub> /  $140^\circ\text{C} / 24\text{hrs}$ ; h) solución de  $\text{NH}_3 / \text{MeOH}_{(\text{anh.})}$  (1.052 %p/p) /  $40\text{-}45^\circ\text{C} / 5\text{hrs}$ ; i) solución de  $\text{NH}_3 / \text{MeOH}_{(\text{anh.})}$  (1.052%p/p) /  $25^\circ\text{C} / 1\text{hr}$ .

## Parte experimental.

El progreso de todas las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (CCF), usando como fase estacionaria sílica gel 60F<sub>254</sub> de 0.2mm de espesor (Merck). Se utilizó como método revelador lámpara de luz ultravioleta.

En todos los casos en que se purificó por cromatografía en columna se utilizó gel de sílice 60 (Merck) con tamaño de partícula de 0.063-0.20mm y malla ASTM 70-230. y las cromatografías en placa preparativa se realizaron con placas de gel de sílice 60F<sub>254</sub> de 20x20x2mm (Merck).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN <sup>1</sup>H) se determinaron en espectrómetros Varian-Gemini (200MHz), Eclipse Jeol (300MHz) y Varian Unity Inova (300MHz, 500MHz).

Los espectros de Resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C) se determinaron en espectrómetros Varian Unity Inova a 125.7MHz y 75.4MHz

Los desplazamientos químicos están expresados en partes por millón (ppm) ó δ. Como estándar interno se utilizó tetrametilsilano (TMS) y los disolventes utilizados fueron cloroformo o dimetilsulfóxido deuterados.

Los espectros de masas por impacto electrónico (IE) se determinaron a 70 volts y se realizaron en un espectrómetro de masas JEOL, modelo IMS-AX505HA. El valor del ión molecular se da como M<sup>+</sup> (m/z).

Los espectros de infrarrojo (IR), se determinaron en un espectrofotómetro Nicolet, modelo Magna 750, en película o en pastilla de bromuro de potasio (KBr).

Los puntos de fusión se determinaron en capilares con un instrumento Büchi 510.

**7.1 Síntesis de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol (5).** En este apartado se describen 2 técnicas para acetilar cetales cíclicos.<sup>11,27</sup>

*7.1.1. Acilación de 1,3-dioxolano con bromuro de acetilo y acetato de sodio.* En un matraz bola de 3 bocas de 500mL acondicionado con termómetro, agitación magnética, baño de hielo seco en acetona y embudo de adición se colocaron 41.99g (0.5667 moles) de 1,3-dioxolano. Sobre el embudo de adición de 50mL, adaptado al matraz, se colocaron 77.55g (0.6308moles) de bromuro de acetilo. Una vez ajustada la temperatura del matraz bola a 5°C y la agitación, se adicionó gota a gota el contenido del embudo de adición, cuidando que no se rebasaran los 5°C. Al finalizar la adición se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente e inmediatamente se adicionó una disolución de 78.75g (0.89moles) de acetato de sodio en 315mL de AcOH. La mezcla de reacción se calentó a 110°C agitando a esa temperatura durante 1hr. El material insoluble se filtró (NaBr). El filtrado se evaporó a presión reducida (60mmHg, 70°C) para eliminar el ácido acético. La disolución restante se destiló fraccionadamente con presión reducida. La fracción colectada entre 108-110°C (10mmHg) corresponde al producto deseado. El rendimiento de (5) es de 65.14%

*7.1.2. Acilación de 1,3-dioxolano con anhídrido acético y ácido sulfúrico.* En un matraz bola de 100mL con tres bocas adaptadas con septo, refrigerante en posición de reflujo, trampa de humedad, termómetro y canastilla de calentamiento se colocaron 10.22g (0.1moles) de anhídrido acético y 7.41g (0.1moles) de 1,3-dioxolano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se agregaron 0.1g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se inició el calentamiento a reflujo. Cuando se alcanzó una temperatura de 75°C, la mezcla cambia de color. Se incrementó la temperatura a 100°C y se agitó durante 190 minutos. Inmediatamente después se enfrió a temperatura ambiente y se mantuvo en agitación durante 10 horas. Posteriormente se agregaron 1.968g (0.024moles) de acetato de sodio y se agitó durante 30 minutos más. Se filtró el sólido lavándolo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El filtrado se destiló fraccionadamente a presión reducida. La fracción recogida a una temperatura de 110°C (10mmHg) corresponde al producto (5). El rendimiento de la reacción fue del 73%.

**7.2. Síntesis de N<sup>2</sup>-N<sup>(7,9)</sup>-diacetilguanina (7).** En un matraz bola de 100mL con tres bocas, adaptado con agitación magnética, refrigerante en posición de reflujo, trampa de humedad, canastilla de calentamiento, termómetro y septos tanto en una de las bocas del matraz como en la parte superior del condensador, se colocaron 1.51g (0.01moles) de 7-H-guanina y 10.21g (0.1moles) de anhídrido acético junto con 10mL de ácido acético anhídrido. La mezcla se calentó bajo agitación continua a una temperatura de reflujo entre 140-160°C durante 24 horas. Al finalizar el tiempo de reflujo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se le agregaron 5mL de agua destilada, para hidrolizar el anhídrido acético que queda sin reaccionar e inmediatamente se enfrió a 5°C con ayuda de un baño de hielo-agua. El sólido formado se filtró, lavando tres veces con 100mL de agua fría.

El sólido filtrado se secó al vacío a una temperatura de 80°C durante 1 hora, obteniéndose 1.79g (75.98%) de un polvo incoloro. Éste producto no puede ser cristalizado dado que su composición consiste en una mezcla de dos isómeros (7a) y (7b). Punto de fusión 314-317.5°C, R<sub>f</sub> 0.29 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O<sub>56</sub> : 35 : 7 : 2) (sólo se observa una mancha en cromatografía en capa fina).

**7.3. Obtención de los compuestos 2a, 2b y 9 a partir del acoplamiento catalítico del radical (2-acetoxietoxi) metilo a 7.** Este apartado describe el estudio catalítico que se llevó a cabo para determinar la síntesis más adecuada y en altos rendimientos del compuesto 2a. Sin embargo como lo muestra el esquema 7.1, al realizar la N-sustitución con ciertos catalizadores, se obtuvo como producto mayoritario 2a pero en la misma mezcla de reacción, al ser purificada se logró aislar y caracterizar la presencia de (2b) y de un segundo subproducto en cantidades muy pequeñas en todos los casos (9).

En otro inciso se describe la síntesis más adecuada encontrada para obtener, en altos rendimientos, a (2a) como único producto mediante la utilización de ácido mesitilensulfónico dihidratado como catalizador.

Las condiciones de tiempo y temperatura de reacción en función de los productos formados se determinaron mediante el seguimiento de la reacción por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como fase móvil (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O<sub>56</sub> : 35 : 7 : 2)%v/v realizando valoraciones en intervalos de tiempo de 15 minutos hasta obtener

el tiempo óptimo para formar la máxima cantidad del intermediario (2a) a una temperatura dada.

En un sinnúmero de experimentos realizados para cada catalizador no sólo se tuvieron que determinar las variables cinéticas sino que se lograron obtener los valores promedio de frente de referencia ( $R_f$ ) para cada producto en (CCF). Para cada valoración se utilizaron placas de gel de sílice 60F<sub>254</sub> de 2x5cm x 0.2mm y en todos los casos las placas se corrieron sobre la fase móvil un total de 4 veces. A continuación se muestra la tabla 7.1 donde están descritos los valores promedio de frente de referencia para cada compuesto:

**Tabla 7.1. Valores promedio de frente de referencia en cromatografía en capa fina eluyendo las placas cromatográficas un total de 4 veces sobre la fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (56 : 35 : 7 : 2)%v/v**

Compuesto	Frente de referencia promedio ( $R_f$ )
N <sup>2</sup> -N <sup>(7,9)</sup> -diacetilguanina (7)	0.29
N <sup>9</sup> -[(2-acetoxietoxi)metil]-N <sup>2</sup> -acetil-guanina (2a)	0.51
N <sup>7</sup> -[(2-acetoxietoxi)metil]-N <sup>2</sup> -acetil-guanina (2b)	0.59
N <sup>9</sup> -(metoximetil)-N <sup>2</sup> -acetil-guanina	0.66

#### *Metodología general para la síntesis catalítica de diacetilacilonucleósidos*

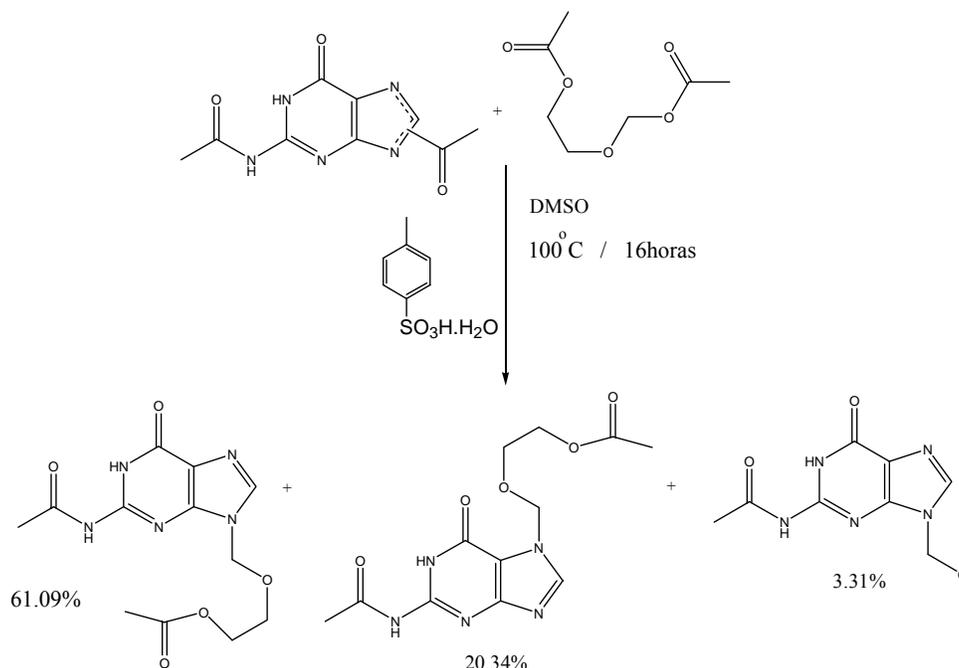
En todos los casos las reacciones se llevaron a cabo en matraces bola de tres bocas (en cada caso varía el volumen del matraz) adaptados con termómetro, refrigerante en posición de reflujo, trampa de humedad, agitación magnética y canastilla de calentamiento.

Inmediatamente finalizados los tiempos de catálisis designados para cada experimento, se adaptó al equipo donde se llevaron a cabo las reacciones un equipo de destilación a presión reducida acoplado a una bomba de vacío para eliminar el DMSO utilizado como disolvente a una temperatura entre los 40-60°C a una presión aproximada de 0.1 atm.

En todos los casos, la purificación se llevó a cabo sobre una cromatografía en columna utilizando como fase móvil [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (56 : 35 : 7 : 2) %v/v]. Las cantidades de fase estacionaria utilizada para montar la columna cromatográfica varían en cada caso.

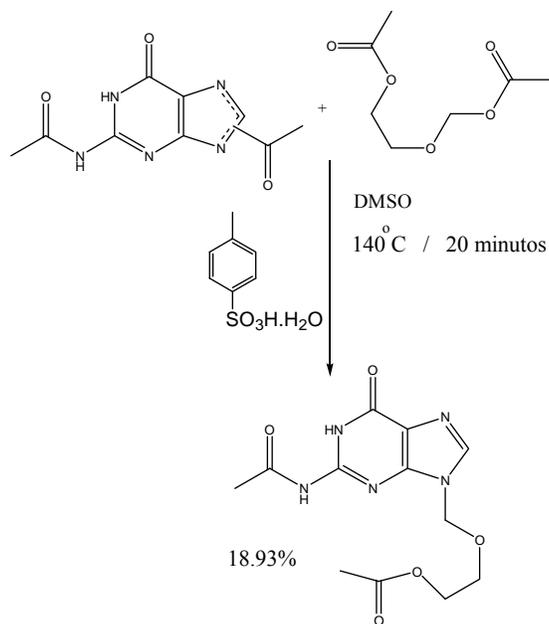
A excepción de los experimentos descritos en la sección 7.4, en donde no hay necesidad de purificar el producto principal por recristalización simple, en todos los ensayos (2a) y (2b) se purificaron en un paso final por recristalización simple disolviendo el producto sobre la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) a una temperatura cercana a 40°C. Al enfriar la disolución sobre un baño de hielo se obtienen los productos purificados.

7.3.1. Obtención de  $N^2$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina (2a),  $N^7$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina (2b) y  $N^9$ -(metoximetil)- $N^2$ -acetil-guanina (9) utilizando ácido *p*-toluensulfónico monohidratado(k-3) como catalizador.



**Esquema 7.3.1.1.**

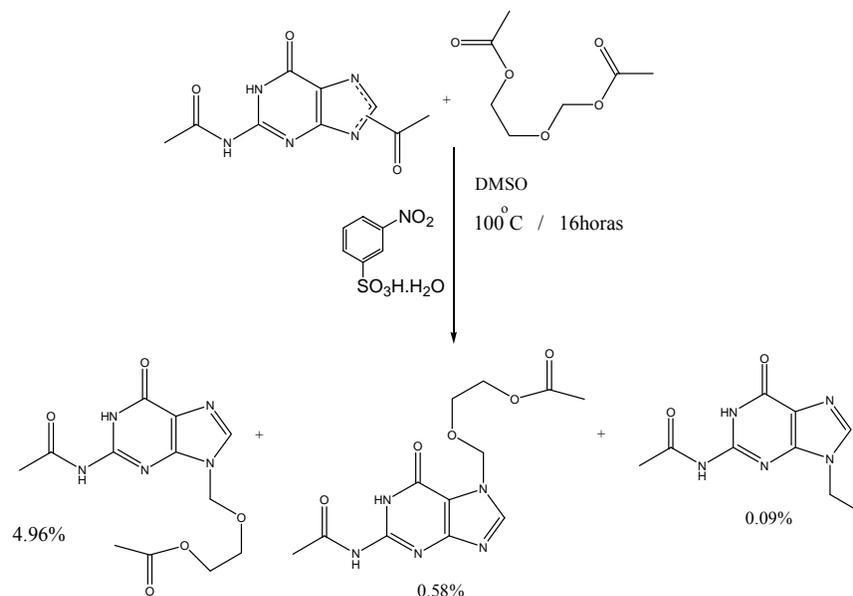
**7.3.1.1.** En un matraz bola de 50mL con tres bocas se colocaron 2.0g (8.51mmoles) de  $N^2$ - $N^{(7,9)}$ -diacetilguanina, 5.995g (34mmoles) de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol, 0.032g (0.172mmoles) de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado (k-3) y 5mL de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción se calentó, con agitación constante, durante **16 horas a 100°C** hasta observar en cromatografía en capa fina el consumo total de la materia prima. El aceite amarillo resultante se eluyó sobre una columna cromatográfica utilizando 163.26g (60g fase estacionaria / g compuesto) de gel de sílice como fase estacionaria. En las primeras fracciones se obtuvieron 1.607g (61.09%) de un sólido blanco cristalino que corresponde a  $N^9$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina (2a). Punto de fusión 187-188°C,  $R_f$  0.51. En la segunda fracción colectada se obtuvieron 0.535g (20.34%) de un sólido blanco amorfo que corresponde a  $N^7$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina (2b). Punto de fusión 182-183°C,  $R_f$ : 0.59. Las fracciones finales contienen 0.087g (3.31%) de un polvo amarillo amorfo que no pudo ser cristalizado por métodos ordinarios y corresponde a  $N^9$ -(metoximetil)- $N^2$ -acetil-guanina (9). Punto de fusión 217-221°C,  $R_f$  0.66.



**Esquema 7.3.1.2.**

**7.3.1.2.** En un matraz bola de 50mL con tres bocas se colocaron 1.0g (4.25mmoles) de N<sup>2</sup>-N<sup>(7,9)</sup>-diacetilguanina, 2.99g (17mmoles) de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol, 0.02g (0.85mmoles) de ácido p-toluensulfónico monohidratado (k-3) y 5mL de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción se calentó, con agitación constante, durante **20 minutos a 140°C** hasta observar en cromatografía en capa fina una cierta cantidad de productos formados. El aceite naranja resultante se eluyó sobre una columna cromatográfica utilizando 78.79g (60g *fase estacionaria / g compuesto*) de gel de sílice como *fase estacionaria*. En la única fase colectada se obtuvieron 0.248g (18.93%) de un sólido cristalino, blanco y con forma de agujas finas que corresponde a N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a). Punto de fusión 184.5-186°C, R<sub>f</sub> 0.51.

7.3.2. Obtención de N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a), N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b) y N<sup>9</sup>-(metoximetil)-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (9) utilizando ácido m-nitrobencensulfónico monohidratado (k-4) como catalizador.



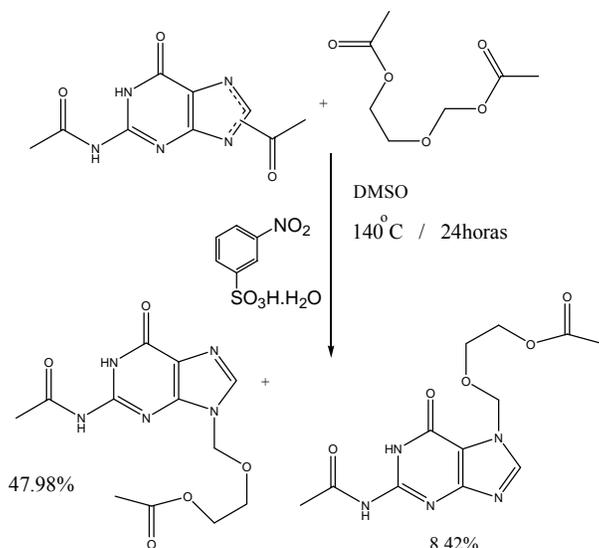
**Esquema 7.3.2.1**

**7.3.2.1.** En un matraz bola de 50mL con tres bocas se colocaron 1.0g (4.25mmoles) de N<sup>2</sup>-N<sup>(7,9)</sup>-diacetilguanina, 2.99g (17mmoles) de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol, 0.022g (0.85mmoles) de ácido m-nitrobencensulfónico monohidratado (k-4) y 5mL de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción se calentó, con agitación constante, durante **16 horas a 100°C**. El aceite amarillo resultante se eluyó sobre una columna cromatográfica utilizando 78.79g (60g fase estacionaria / g compuesto) de gel de sílice como fase estacionaria.

En las primeras fracciones se obtuvieron 0.0652g (4.96%) de un sólido blanco cristalino que corresponde a N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a). Punto de fusión 191-192°C, R<sub>f</sub> 0.51.

En un segundo lote de fracciones aisladas se lograron recuperar 7.7mg (0.58%) de un sólido blanco de forma amorfa. Punto de fusión 177-180°C, R<sub>f</sub> 0.55. A partir del espectro de RMN <sup>1</sup>H se pudo deducir que dicho producto obtenido consiste en una mezcla en el que el isómero mayoritario es N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b).

Con el método de purificación ya descrito pudo ser extraído de la columna una cantidad muy pequeña, 0.0012g, de un polvo amarillo que no pudo ser cristalizado. Una vez caracterizado por sus propiedades físicas, cromatográficas y espectroscópicas se observó que esta última fracción corresponde a N<sup>9</sup>-(metoximetil)-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (9). Punto de fusión 222-227°C, R<sub>f</sub>:0.65

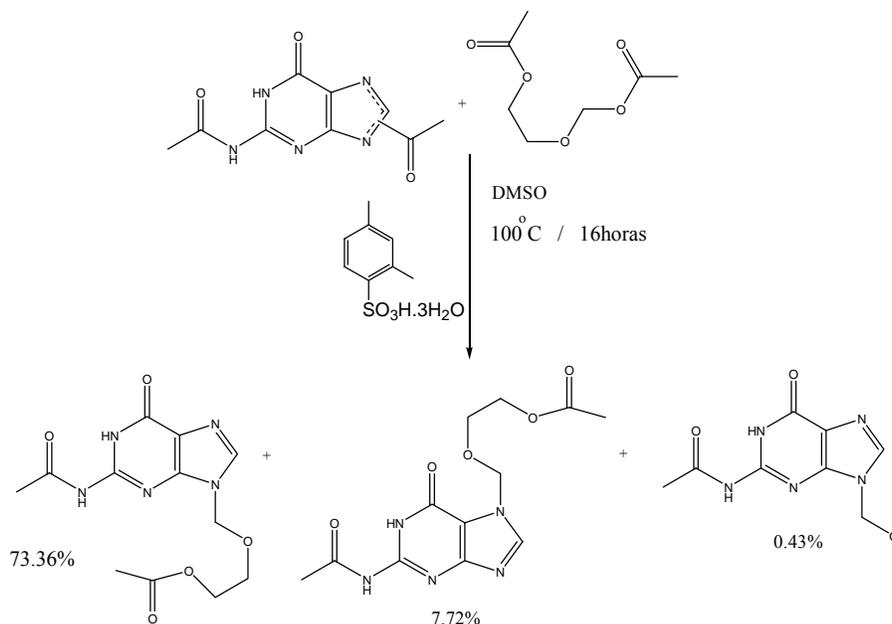


**Esquema 7.3.2.2**

**7.3.2.2.** En un matraz bola de 50mL con tres bocas se colocaron 1.0g (4.25mmoles) de  $N^2-N^{(7,9)}$ -diacetilguanina, 2.99g (17mmoles) de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol, 0.02g (0.85mmoles) de ácido  $m$ -nitrobencensulfónico monohidratado (k-4) y 5mL de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción se calentó, con agitación constante, durante **24 horas a  $140^\circ\text{C}$**  hasta observar en cromatografía en capa el consumo total de la materia prima. El aceite naranja resultante se eluyó sobre una columna cromatográfica utilizando 78.79g (60g fase estacionaria / g compuesto) de gel de sílice como fase estacionaria. En las primeras fracciones colectada se obtuvieron 0.63g (47.98%) de un sólido con forma de agujas cristalinas que corresponde a  $N^7$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina (2a). Punto de fusión  $189-190^\circ\text{C}$ ,  $R_f$ : 0.51.

De las siguientes fracciones extraídas de la columna se obtuvieron 0.1105g (8.42%) de un sólido con una ligera tonalidad amarillenta que al juzgar por sus propiedades, principalmente las espectroscópicas, consistió en una forma del isómero  $N^7$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina (2b), reconocido principalmente por los desplazamientos químicos característicos de dicho compuesto. Punto de fusión  $161-165^\circ\text{C}$ ,  $R_f$ : 0.53.

7.3.3. Obtención de  $N^2$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina (2a),  $N^7$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina (2b) y  $N^2$ -(metoximetil)- $N^2$ -acetil-guanina (9) utilizando ácido  $m$ -xylensulfónico trihidratado (k-2) como catalizador.



**Esquema 7.3.3.1**

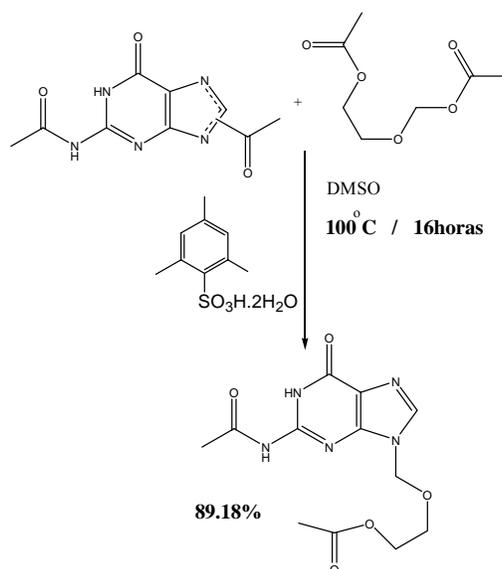
**7.3.3.1.** En un matraz bola de 50mL con tres bocas se colocaron 0.5g (2.12mmoles) de N<sup>2</sup>-N<sup>(7,9)</sup>-diacetilguanina, 1.493g (8.48mmoles) de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol, 0.01g (0.424moles) de ácido m-xilensulfónico trihidratado (k-3) y 2.5mL de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción se calentó, con agitación constante, durante **16 horas a 100°C**. Los análisis cualitativos por cromatografía en capa fina revelaron que bajo estas condiciones de reacción se obtuvo una mayor proporción del compuesto con R<sub>f</sub> de 0.51. El aceite color durazno resultante se eluyó sobre una columna cromatográfica utilizando 39.3g (60g fase estacionaria / g compuesto) de gel de sílice como fase estacionaria. En las primeras fracciones se obtuvieron 0.4805g (73.36%) de un sólido cristalino en forma de láminas que corresponde a N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a). Punto de fusión 184-185°C, R<sub>f</sub>: 0.51.

Al aislar el compuesto eluido en un segundo lote de fracciones se logró obtener 0.0505g (7.72%) de un sólido amorfo incoloro que corresponde a N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b). Punto de fusión 174-177°C, R<sub>f</sub>: 0.56.

Bajo estas condiciones pudo aislarse una pequeña cantidad del isómero N<sup>9</sup>-(metoximetil)-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (9) a través de las fracciones finales. 0.0028g (0.43%), Punto de fusión 213-217°C, R<sub>f</sub>: 0.65.

#### 7.4. Síntesis selectiva del aciclonucleósido $N^9$ -[(2-acetoxietoxi)metil]- $N^2$ -acetil-guanina

(2a). A continuación se muestra el desarrollo experimental de todos los ensayos llevados a cabo utilizando *ácido-mesitilensulfónico dihidratado (k-1)* como catalizador. Se puede observar que la particularidad de este ensayo consiste en que el acoplamiento catalítico del radical (2-acetoxietoxi)-metilo se lleva a cabo con el *catalizador menos ácido* de todos los probados. Como se mostrarán en los resultados, este método fue donde se obtuvieron mejores resultados.



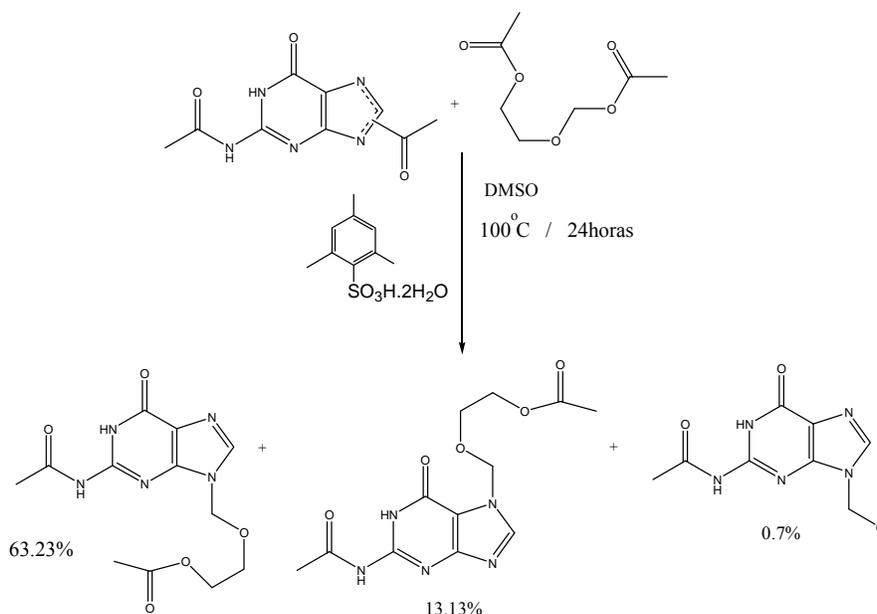
**Esquema 6.5.**

**7.4.1. Experimento No. 1** En un matraz bola de 50mL con tres bocas se colocaron 1.0g (4.25mmoles) de  $N^2$ - $N^{(7,9)}$ -diacetilguanina, 2.99g (17mmoles) de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol, 0.04g (0.17mmoles) de ácido mesitilensulfónico dihidratado (k-1) y 5mL de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción se calentó con agitación constante, durante **16 horas a  $100^\circ\text{C}$** . Se pudo observar que entre las 14 y las 16 horas de calentamiento a reflujo, se aprecia el consumo máximo de la materia prima. El aceite color durazno claro resultante se eluyó sobre una columna cromatográfica utilizando 80g (40g fase estacionaria / g compuesto) de gel de sílice como fase estacionaria.

De las primeras fracciones eluidas se observó por cromatografía en capa fina la presencia de un producto mayoritario,  $R_f$  0.51 y dos subproductos de polaridad muy cercana, [ $R_f$ 1: 0.487], [ $R_f$ 2: 0.476]. Dichas fracciones que contienen el producto mayoritario se juntan para concentrar a sequedad. El producto obtenido consiste en un polvo amarillo muy fino.

El sólido amarillo se cristalizó en 2mL de una disolución MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) a una temperatura cercana a la de vaporización del diclorometano, obteniéndose 1.17g (89.18%) de un producto incoloro en forma de láminas cristalinas. Punto de fusión 191.5-192°C. Al producto se le practicó una espectroscopia de RMN 1H a 500MHz, experimentos en RMN 2D de tipo HMBC, HSQC y NOESY y una difracción de Rayos X de monocristal, confirmando en cada técnica analítica la formación del aciclonucleósido N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a).

*Cuando la mezcla de la reacción se eluyó sobre una columna cromatográfica utilizando 120g (60g fase estacionaria / g compuesto) de gel de sílice como fase estacionaria, es posible separar aquellas impurezas de polaridad cercana en un solo paso y al dejar evaporar lentamente el eluyente de las fracciones colectadas, se obtuvieron cristales incoloros, de buen tamaño y de forma laminar en rendimiento similar al reportado.*



**Esquema 7.4.2.**

**7.4.2 Experimento No. 2** En un matraz bola de 50mL con tres bocas se colocaron 2.0g (8.51mmoles) de N<sup>2</sup>-N<sup>(7,9)</sup>-diacetilguanina, 5.995g (34mmoles) de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol, 0.04g (0.17mmoles) de ácido mesitilensulfónico dihidratado (k-1) y 25mL de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción se calentó con agitación constante, durante **24 horas a 100°C**. Bajo estas condiciones se observó por CCF que a pesar de que no se detectó materia prima dentro del seno de la reacción y que el producto mayoritario

corresponde a aquel con  $R_f$  de 0.51, aparecieron dos subproductos no detectados cuando la catálisis se llevó a cabo a 16 horas de calentamiento (Sección.7.4.1.).

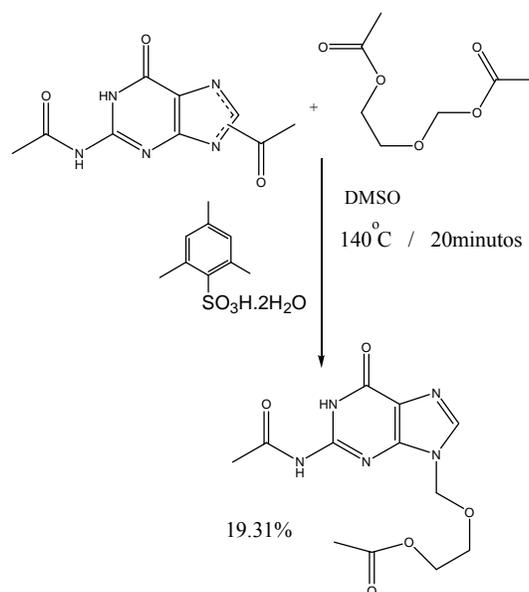
Para determinar con precisión la composición de cada producto formado por esta vía catalítica se tomó una cantidad de 0.1447g del crudo formado. El extracto se disolvió en 1mL de una disolución de MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) a una temperatura de 35°C y la mezcla se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa utilizando como fase móvil la mezcla de disolventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (56 : 35 : 7 : 2) %v/v. Después de correr la placa 4 veces se identificaron tres productos.

El compuesto con  $R_f$  de 0.483 se cortó de la placa preparativa y se extrajo con 50mL de una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (60: 39.2: 0.8) %v/v, a una temperatura de 40° C durante 60 minutos.

De esta extracción se obtuvieron 0.0915g (63.23%) de un sólido cristalino en forma de agujas que corresponde a N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a). Punto de fusión 188.5-189°C.

Del compuesto eluído con un  $R_f$  de 0.55 y extraído de la sílica gel mediante el mismo procedimiento se obtuvieron 0.019g (13.13%) de un sólido incoloro de forma amorfa que a juzgar por el punto de fusión de 179-180°C y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica corresponde al isómero N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b).

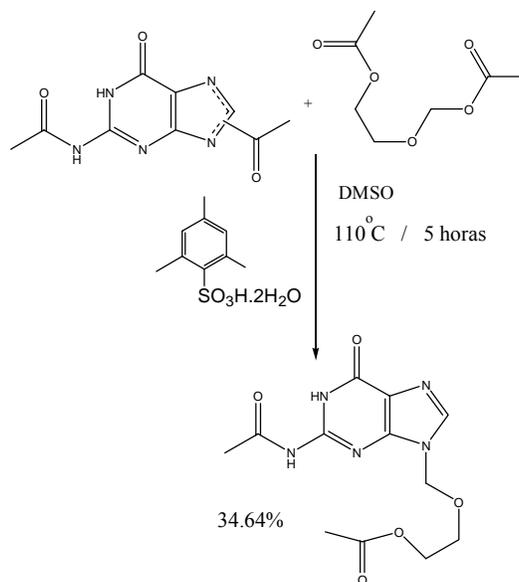
Finalmente se extrajo de la placa un compuesto con  $R_f$  de 0.63 obteniendo una cantidad menor a 1mg (~0.7%) de un polvo blanco amorfo con punto de fusión de 210-216°C que consiste en N<sup>9</sup>-(metoximetil)-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (9).



**Esquema 7.4.3.**

**7.4.3. Experimento No. 3.** En un matraz bola de 50mL con tres bocas se colocaron 1.0g (8.51mmoles) de N<sup>2</sup>-N<sup>(7,9)</sup>-diacetilguanina, 2.99g (17mmoles) de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol, 0.04g (17x10<sup>-2</sup>mmoles) de ácido mesitilensulfónico dihidratado (k-1) y 25mL de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción se calentó con agitación constante, durante **20 minutos a 140°C**. Bajo estas condiciones catalíticas, se observó en CCF una cantidad importante de producto formado con R<sub>f</sub> 0.52 pero se logró apreciar en mucha mayor cantidad a la materia prima (R<sub>f</sub>: 0.3). El aceite color ámbar resultante se eluyó sobre una columna cromatográfica utilizando 63.88g (15g fase estacionaria / g compuesto) de gel de sílice como fase estacionaria.

Al eluir las fracciones con producto y dejar evaporar lentamente el disolvente se obtuvieron 0.2539g (19.309%) de un polvo cristalino incoloro que consiste en N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a). Punto de fusión 189-190°C, R<sub>f</sub>: 0.51. En este experimento no se obtuvieron los subproductos (2b) y (9).

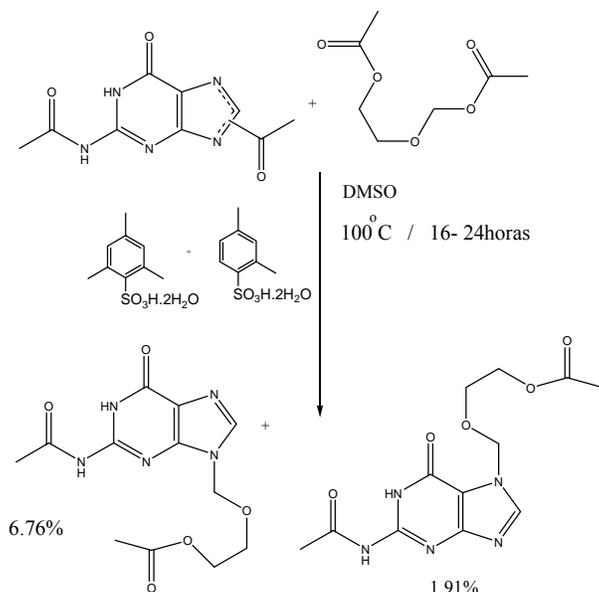


**Esquema 7.4.4**

**7.4.4. Experimento No. 4.** En un matraz bola de 250mL con tres bocas se colocaron 5.0g (21.1mmoles) de *N*<sup>2</sup>-*N*<sup>(7,9)</sup>-diacetilguanina, 14.94g (84.8mmoles) de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol, 0.1g (4.24x10<sup>-1</sup>mmoles) de ácido mesitilensulfónico dihidratado (k-1) y 100mL de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción se calentó con agitación constante, durante **5 horas a 110°C**; se suspendió el calentamiento dado que en cromatografía en capa fina se detectó un consumo total de la materia prima. El aceite color beige resultante se eluyó sobre una columna cromatográfica utilizando 398g (40g fase estacionaria / g compuesto) de gel de sílice como fase estacionaria. Sólo se pudo extraer de la columna un lote de fracciones que consistió en el producto en mayor cantidad (R<sub>f</sub>: 0.52), y otros 2 subproductos en mucho menor cantidad y de menor polaridad.

El lote de fracciones se juntó en un solo recipiente y se concentraron a sequedad, obteniendo un polvo fino con una ligera tonalidad beige. Este sólido fue cristalizado disolviendo en caliente con 10mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) y al enfriar sobre un baño de hielo se obtuvieron 2.269g (34.64%) de un sólido cristalino en forma de agujas que consiste en *N*<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-*N*<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a). Punto de fusión 186-187°C, R<sub>f</sub>: 0.49.

7.5 .Obtención de *N*<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-*N*<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a) y *N*<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-*N*<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b) utilizando una mezcla de ácido *m*-xylensulfónico trihidratado (k-2) y ácido mesitilensulfónico dihidratado (k-1) en proporción (1:1) como catalizadores.



**Esquema 7.5.1**

**7.5.1.** En un matraz bola de 250mL con tres bocas se colocaron 5.0g (21.2mmoles) de N<sup>2</sup>-N<sup>(7,9)</sup>-diacetilguanina, 14.94g (8.48mmoles) de diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol, 0.0473g ( $2 \times 10^{-1}$ mmoles) de ácido mesitilensulfónico dihidratado (k-1), 0.0480g ( $2 \times 10^{-1}$ moles) de ácido m-xylensulfónico trihidratado (k-2) y 100mL de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción se calentó con agitación constante, durante **16 horas a 100°C**. Al monitorear el avance de la reacción por cromatografía en capa fina se detectó que el consumo total de la materia prima se da desde las primeras 11 horas de reacción, sin embargo se observaron varias manchas con frente de referencia cercano a 0.5 que no pueden ser separadas por dicho método. El aceite color ámbar resultante se eluyó sobre una columna cromatográfica utilizando 398g (40g fase estacionaria / g compuesto) de gel de sílice como fase estacionaria.

De las primeras fracciones colectadas se obtuvieron 0.44g (6.76%) de un polvo cristalino incoloro, el cual corresponde a N<sup>2</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a). Punto de fusión 190-192°C, R<sub>f</sub>: 0.52. Un segundo lote de fracciones eluidas consistió en un polvo amarillo de apariencia fina. Se realizó sobre dicho compuesto una recristalización disolviendo en 5mL de una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) a una temperatura de 35°C. Al enfriar el recipiente que contiene al soluto sobre un baño de hielo, se obtuvieron 0.125g

(1.91%) de un sólido blanco amorfo que consiste en N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b). Punto de fusión 177-178°C, R<sub>f</sub>: 0.57.

Algunas observaciones interesantes son las siguientes:

- Por CCF se determinó que a temperaturas iguales o ligeramente mayores a 100°C no se detectó formación alguna de producto cuando el tiempo de reacción oscilaba entre las 5 horas. Es aproximadamente hasta las 11 horas de calentamiento cuando se empezaron a detectar los productos con R<sub>f</sub> de 0.51 y R<sub>f</sub> de 0.58.

- En otro experimento similar al descrito en la sección 7.5.1 se incrementó el tiempo de reacción a 24 horas de calentamiento. Durante el transcurso de las últimas 12 horas no se logró detectar por CCF un avance considerable en la formación de los compuestos de interés. Al completarse 24 horas de reacción, se suspendió el calentamiento, se purificó por cromatografía en columna utilizando 796g (80g fase estacionaria / g compuesto) de gel de sílice como fase estacionaria y se obtuvieron 0.97g (14.93%) de un polvo cristalino que corresponde a N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a). Punto de fusión 190-192°C, R<sub>f</sub>: 0.52. Del isómero N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b) sólo se lograron obtener 0.18g (2.77%). Punto de fusión 177-178°C, R<sub>f</sub>: 0.57. Como puede observarse no se incrementó considerablemente el rendimiento de los aciclonucleósidos al catalizar la reacción 12 horas adicionales hasta completar 24 horas.

### **7.6. Síntesis de N<sup>9</sup>-[(2-hidroxietoxi)metil]-guanina, Acyclovir (1).**

Se preparó una disolución de amoníaco en metanol 0.4718M colocando 1L de MeOH anhidro sobre un matraz bola de 2000mL con tres bocas adaptado con agitación magnética, refrigerante en posición de reflujo, trampa de humedad, canastilla de calentamiento, termómetro y septo sobre una de las bocas del matraz. Una cánula adaptada a un tanque de amoníaco gaseoso se insertó sobre el septo que cubre una de las bocas del matraz y el reactivo se bombeó hacia el metanol con agitación continua. Para incrementar la solubilidad del amoníaco se calentó el matraz bola a una temperatura de 40°C y simultáneamente se programó un retrocirculador ECO 30 para que el flujo de agua sobre el refrigerante fuera de 2°C. La adición de amoníaco se suspendió cuando se detectó la saturación de amoníaco sobre la parte superior de la trampa de humedad, adaptada al condensador. Posteriormente se realiza una titulación por retroceso para determinar la

concentración del amoníaco en la solución; para esto se agregó un exceso de 30mL de HCl 0.765M sobre una alícuota de 10mL de la disolución preparada. Añadiendo con una bureta calibrada volúmenes conocidos de NaOH 2M y utilizando como indicador azul de bromotimol se tituló la cantidad de ácido clorhídrico que no reaccionó con el amoníaco y por cálculos estequiométricos se determinó la concentración de la solución de amoníaco (0.4718M) además del por ciento en peso del mismo (1.052% p/p).

En un matraz bola de 100mL con tres bocas, adaptado con canastilla de calentamiento, agitación magnética, refrigerante en posición de reflujo, trampa de humedad, termómetro y septo se colocaron 0.51g (0.00163moles) de N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a), 30mL de disolución de NH<sub>3</sub> / MeOH al 1.052% p/p que equivale a 8.0206g (0.0141moles) de amoníaco y 22.048g (0.689moles) de metanol. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua y a una temperatura entre 40-45°C durante 5 horas.

Al finalizar el calentamiento a reflujo, se evaporó la fase líquida de la mezcla de reacción obteniendo un sólido amarillo de forma amorfa. El producto se disolvió en 18.4mL de metanol anhidro a una temperatura de 55°C y finalmente se indujo a la cristalización enfriando en un baño de hielo-agua durante 24 horas obteniendo 0.32g (87.36%) de un polvo cristalino que consiste en N<sup>9</sup>-[(2-hidroxietoxi)metil]-guanina (1). Punto de fusión 256-257°C, R<sub>f</sub>: 0.21 [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (51: 30: 15: 4)% v/v].

En ensayos previos de esta reacción se demostró que cuando se realiza con cantidades estequiométricas similares pero a temperaturas cercanas a 25°C, o bien cuando se utilizan cantidades equimolares de disolución de amoníaco con respecto a (2a) se forma mayoritariamente un sólido blanco amorfo de punto de fusión 210-213°C. La espectroscopía de RMN revela que dicho compuesto consiste en N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-guanina (8), R<sub>f</sub>: 0.38 [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (51: 30: 15: 4)% v/v].

## 7.7. Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados.

Tabla 7.2. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos sintetizados.

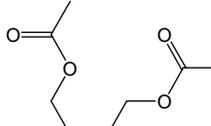
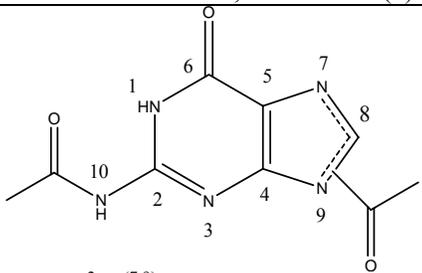
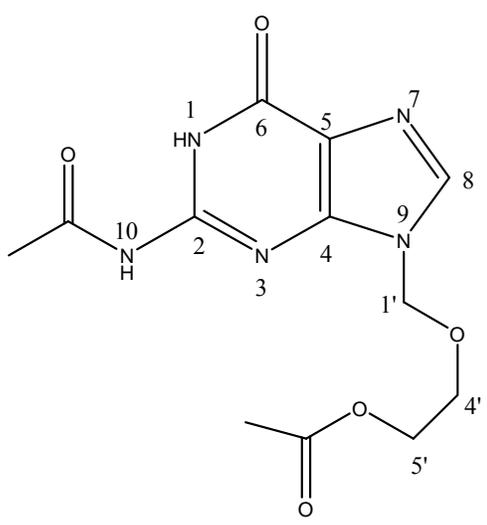
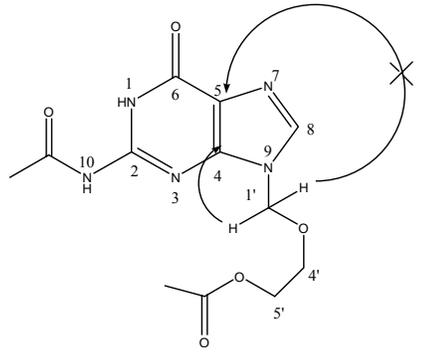
Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos
 <p>Diacetato de 2-oxa-1,4-butanodiol (5)</p>	<p><b>RMN <sup>1</sup>H</b> (CDCl<sub>3</sub>): δ 2.084 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO) 2.112 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO) 3.86 (2H, t, J=4.8Hz, AcO -CH<sub>2</sub>-*CH<sub>2</sub>-O) 4.26 (2H, t, J=4.7Hz, AcO -*CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-) 5.30 (2H, s, O-CH<sub>2</sub>-N).</p>
 <p>N<sup>2</sup>-N<sup>(7,9)</sup>diacetilguanina (7)</p>	<p>- <b>IR</b> en KBr (cm<sup>-1</sup>): 3159 (N<sup>1</sup>-H), 3045 (N<sup>10</sup>-H), 1692 (C<sup>6</sup>=O), 1659 (N<sup>10</sup>-C=O), 1495-1470 (N<sup>(7,9)</sup>-C=O, 2 bandas de igual intensidad).</p> <p>- <b>EM</b> (IE) m/z: 235 M<sup>+</sup> (18%), M<sup>+</sup>-84 (100%) (pérdida de N<sup>(7,9)</sup>-acetil-imidazol).</p> <p>- <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.20, 2.49 (3H, s, CH<sub>3</sub>CON<sup>(7,9)</sup>), 8.44 (1H, s, C<sup>8</sup>-H), 11.79 (1H, s, N<sup>1</sup>-H), 12.13 (1H, s, N<sup>10</sup>-H).</p>
 <p>N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]- N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a)</p>	<p>- <b>IR</b> en KBr (cm<sup>-1</sup>): 3167 (N<sup>1</sup>-H), 3083 (N<sup>10</sup>-H), 1693 (C<sup>6</sup>=O), 1667 (N<sup>10</sup>-C=O), 1734 (C=O éster)</p> <p>- <b>EM</b> (IE) m/z: 309 M<sup>+</sup> (85%), [M<sup>+</sup>-222] (100%)</p> <p>- <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (Fig. 6.5) (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.93 (3H, s, CH<sub>3</sub>COO), 2.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>CON<sup>10</sup>), 3.67 (2H, t, J=4.62, C<sup>4'</sup>-H), 4.059 (2H, t, J=4.6, C<sup>5'</sup>-H), <b>5.46</b> (2H, s, C<sup>1'</sup>-H), <b>8.124</b> (1H, s, C<sup>8</sup>-H), 11.76 (1H, s, N<sup>1</sup>-H), 12.05 (1H, s, N<sup>10</sup>-H).</p> <p>- <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 20.49 (CH<sub>3</sub>COO), 23.71 (CH<sub>3</sub>CON<sup>10</sup>), 62.61 (C<sup>5'</sup>), 66.63 (C<sup>4'</sup>), <b>72.37</b> (C<sup>1'</sup>) <b>120.12</b> (C5), 139.99 (C8), 148.08 (C2), 148.83 (C4), 154.83 (C<sup>6</sup>=O), 170.17 (C=O, éster), 173.5 (C=O, amida).</p> <p>- <b>RMN<sup>2D</sup>, HMBC</b>: Correlación de protón de metileno C<sup>1'</sup> con C4 (<sup>3</sup>J<sub>C-H</sub>). <b>No se detecta correlación de protón de metileno C<sup>1'</sup> con C5 (<sup>4</sup>J<sub>C-H</sub>).</b></p> 

Tabla 7.2 (continuación)

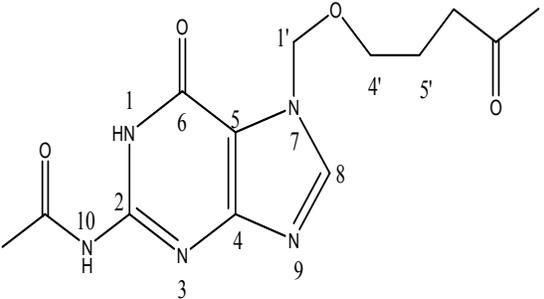
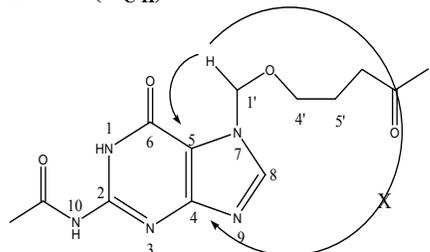
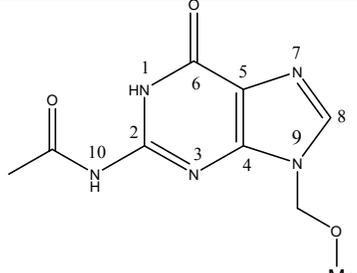
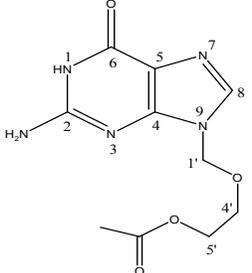
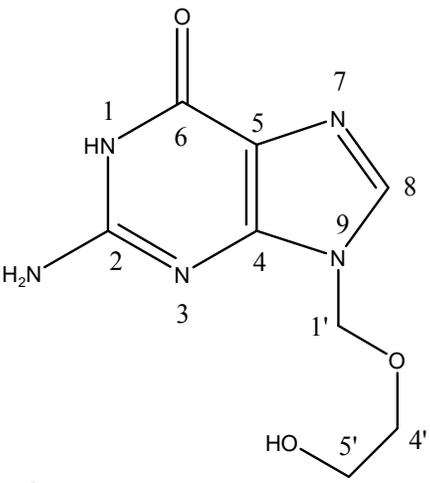
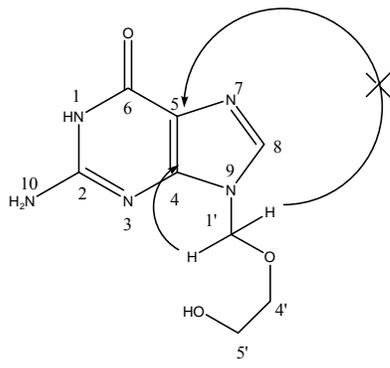
Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos
 <p data-bbox="227 745 771 787">N<sup>7</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2b)</p>	<p data-bbox="795 294 1347 357">- <b>IR</b> en KBr (cm<sup>-1</sup>): 3239 (N<sup>1</sup>-H), 3082 (N<sup>10</sup>-H), 1706 (C<sup>6</sup>=O), 1667 (N<sup>10</sup>-C=O), 1732 (C=Oéster)</p> <p data-bbox="795 357 1347 388">- <b>EM</b> (IE) m/z: 309 M<sup>+</sup> (100%).</p> <p data-bbox="795 388 1347 535">- <b>RMN</b> <sup>1</sup>H (fig 6.6) (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.93 (3H, s, CH<sub>3</sub>COO), 2.16 (3H, s, CH<sub>3</sub>CON<sup>10</sup>), 3.7 (2H, t, J=6.0, C<sup>4'</sup>-H), 4.054 (2H, t, J=4.5, C<sup>5'</sup>-H), <b>5.67</b> (2H, s, C<sup>1'</sup>-H), <b>8.35</b> (1H, s, C<sup>8</sup>-H), 11.65 (1H, s, N<sup>1</sup>-H), 12.08 (1H, s, N<sup>10</sup>-H).</p> <p data-bbox="795 535 1347 682">- <b>RMN</b> <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 20.49 (CH<sub>3</sub>COO), 23.07 (CH<sub>3</sub>CON<sup>10</sup>), 62.67 (C<sup>5'</sup>), 66.33 (C<sup>4'</sup>), <b>74.87</b> (C<sup>1'</sup>) <b>111.11</b> (C5), 145.05 (C8), 147.23 (C2), 152.51 (C4), 157.4 (C<sup>6</sup>=O), 170.16 (C=O, éster), 173.33 (C=O, amida).</p> <p data-bbox="795 682 1347 808">- <b>RMN</b><sup>2D</sup>, <b>HMBC</b>: Se detecta correlación de protón de metileno C<sup>1'</sup> con C5 (<sup>3</sup>J<sub>C-H</sub>). No se detecta correlación de protón de metileno C<sup>1'</sup> con C4 (<sup>4</sup>J<sub>C-H</sub>).</p> 
 <p data-bbox="284 1354 706 1396">N<sup>9</sup>-(metoximetil)-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (9)</p>	<p data-bbox="795 1071 1347 1134">- <b>EM</b> (IE) m/z: 238 [M<sup>+</sup>+1] (25%), 253 [M<sup>+</sup>+16] (100%).</p> <p data-bbox="795 1134 1347 1249">- <b>RMN</b> <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.12 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 2.16 (3H, s, CH<sub>3</sub>CON<sup>10</sup>), 5.17 (2H, s, N<sup>9</sup>-CH<sub>2</sub>-O), 8.06 (1H, s, C<sup>8</sup>-H), 11.71 (1H, s, N<sup>1</sup>-H), 12.04 (1H, s, N<sup>10</sup>-H).</p> <p data-bbox="795 1249 1347 1375">- <b>RMN</b> <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 14.26 (CH<sub>3</sub>O), 23.60 (CH<sub>3</sub>CON<sup>10</sup>), <b>45.52</b> (N<sup>9</sup>-CH<sub>2</sub>-O) <b>120.11</b> (C5), 139.28 (C8), 147.73 (C2), 148.35 (C4), 154.68 (C<sup>6</sup>=O), 173.33 (C=O, amida).</p>
 <p data-bbox="284 1743 706 1785">N<sup>9</sup>-[(2-acetoxietoxi)metil]-guanina (8)</p>	<p data-bbox="795 1501 1347 1627"><b>RMN</b> <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.94 (3H, s, CH<sub>3</sub>COO), 3.64 (2H, t, J=4.6, C<sup>4'</sup>-H), 4.056 (2H, t, J=4.8, C<sup>5'</sup>-H), <b>5.34</b> (2H, s, C<sup>1'</sup>-H), 6.52 (2H, s, NH<sub>2</sub>), <b>7.81</b> (1H, s, C<sup>8</sup>-H), 10.63 (1H, s, N<sup>1</sup>-H).</p>

Tabla 7.2. (continuación).

Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos
 <p data-bbox="284 903 714 934">N<sup>9</sup>-[(2-hidroxi)etoxi]metil]-guanina (1)</p>	<p data-bbox="787 336 1339 388">- <b>IR</b> en KBr (cm<sup>-1</sup>): 3371 (O-H<sub>primario</sub>), 3334 (N-H<sub>amina primaria</sub>), 3155 (N<sup>1</sup>-H), 1693 (C<sup>6</sup>=O)</p> <p data-bbox="787 388 1339 451">- <b>EM</b> (IE) m/z: 225 M<sup>+</sup> (20%), [M<sup>+</sup>- 74] (100%) [pérdida del radical (2-hidroxi)etoxi]metilo]</p> <p data-bbox="787 451 1339 546">- <b>RMN</b> <sup>1</sup>H(DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.45 (4H, s, C<sup>4</sup>-H, C<sup>5</sup>-H), 4.65 (1H, s, OH), <b>5.33</b> (2H, s, C<sup>1'</sup>-H), 6.48 (2H, s, NH<sub>2</sub>), <b>7.8</b> (1H, s, C<sup>8</sup>-H), 10.59 (1H, s, N<sup>1</sup>-H)</p> <p data-bbox="787 546 1339 640">- <b>RMN</b> <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 59.48 (C<sup>5'</sup>), 70.30 (C<sup>4'</sup>) <b>71.97</b> (C<sup>1'</sup>), <b>116.43</b> (C5), 137.63 (C8), 151.35 (C2), 153.78 (C4), 156.71 (C<sup>6</sup>=O).</p> <p data-bbox="787 640 1339 766">- <b>RMN</b><sup>2D</sup>, <b>HMBC</b>: Correlación de protón de metileno C<sup>1'</sup> con C4 (<sup>3</sup>J<sub>C-H</sub>). <b>No se detecta correlación de protón de metileno C<sup>1'</sup> con C5 (<sup>4</sup>J<sub>C-H</sub>).</b></p> 

IE: impacto electrónico; m/z: relación masa / carga; DMSO-d<sub>6</sub>: Dimetilsulfóxido hexadeuterado; s: singulete; t: triplete; J: constante de acoplamiento; M<sup>+</sup>: ión molecular.

Identification code	350DTE06 (Solved by: R. A. Toscano)	
Project Title	DzAcACV	
Empirical formula	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	
Formula weight	309.29	
Temperature	298(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 2 <sub>1</sub> /c	
Unit cell dimensions	$a = 10.462(3) \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 14.762(4) \text{ \AA}$	$\beta = 100.715(4)^\circ$
	$c = 9.282(2) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
Volume	1408.5(6) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.459 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.116 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	648	
Crystal size / color / shape	0.232 x 0.186 x 0.038 mm / colorless / plates	
Theta range for data collection	1.98 to 25.41°	
Index ranges	-12 ≤ h ≤ 12, -17 ≤ k ≤ 17, -11 ≤ l ≤ 11	
Reflections collected	11306	
Independent reflections	2588 [R(int) = 0.0720]	
Completeness to theta = 25.41°	99.8 %	
Measurement device	Bruker Smart Apex CCD diffractometer	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.9953 and 0.9723	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	2588 / 0 / 207	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.030	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0704, wR2 = 0.1606	
R indices (all data)	R1 = 0.1184, wR2 = 0.1853	
Largest diff. peak and hole	0.261 and -0.236 e.Å <sup>-3</sup>	

**Figura 7.2.** Transparencia extraída del documento original. Espectro de difracción de Rayos X de monocristal. Datos cristalográficos del intermediario N<sup>9</sup>-[(2acetoxietoxi)metil]-N<sup>2</sup>-acetil-guanina (2a).



## 8. Conclusiones.

- Se logró incrementar el rendimiento de (1a) a un 87% mejorando varias condiciones de reacción sobre la ruta sintética de 3 pasos planteada para el acyclovir en el esquema 1.1. Se hizo especial énfasis en el acoplamiento catalítico de un radical acíclico sobre una base nitrogenada de guanina con el objeto de obtener selectivamente (2a) que es el precursor directo del acyclovir.
- En base a los resultados obtenidos, se encontró que para la síntesis selectiva de aciclonucleósidos N-9 sustituidos existen por lo menos tres variables a controlar para acoplar cuantitativamente la cadena acíclica sobre la base heterocíclica en la posición deseada:
  - *La composición de la materia prima.* En prácticamente todos los trabajos que fueron referencia para esta investigación, el esqueleto purínico al que se le acopla una cadena acíclica es susceptible tanto a la N-7 sustitución como a la N-9 sustitución. Para este trabajo, la materia prima para esta síntesis (7) consiste en una mezcla de isómeros de composición no definida. Parte de los resultados hacen suponer que el grupo acilo sobre alguno de los átomos de nitrógeno del anillo imidazólico migra de un átomo a otro estando la materia prima en disolución.
  - *Velocidades de reacción de formación entre (2a) y (2b).* Para todos los ensayos en los que al acoplar la cadena acíclica (5) sobre la mezcla de bases púricas (7) se observó que el aciclonucleósido (2a) se forma con mayor rapidez que el isómero (2b). Este resultado fue relevante para este estudio puesto que la búsqueda de todas las condiciones precisas para obtener la selectividad deseada se redujo a la determinación del catalizador más óptimo sobre un intervalo de tiempo y temperaturas ( $0.33\text{h} \leq t \leq 24\text{h}$ ), ( $100^\circ\text{C} \leq T \leq 140^\circ\text{C}$ ).
  - *Influencia del pH en la selectividad para formar aciclonucleósidos N-9 sustituidos.* A partir de las bases teóricas establecidas en los esquemas 6.2 y 6.3 junto con los resultados experimentales, se encontró una alta selectividad para formar catalíticamente (2a) utilizando como catalizador el ácido (k-1) siendo este último el ácido sulfónico de menor acidez con respecto al resto de los catalizadores probados. La hipótesis planteada para explicar este hecho nos dice que la lenta reacción de protonación (dados los valores de pKa) de (5) vía una reacción ácido-base con el catalizador, junto con el

aumento de la proporción de (7b) [esqueleto purínico para formar (2a)] con respecto al sustrato (7a) que se esperaría que se encontrase en mayor proporción como el ácido conjugado, se tendrá en un tiempo dado, condiciones para que (5-H<sup>+</sup>) y (7b) se acoplen vía una reacción de N-alkilación disminuyendo así las probabilidades de tener reacciones ácido-base secundarias [por ejemplo la extracción del protón de (5-H<sup>+</sup>) por alguna de las bases nitrogenadas (7) o bien equilibrios ácido-base entre el catalizador y (7)] que disminuyan las concentraciones de los dos sustratos que se acoplan catalíticamente.

- Se determinaron las condiciones más apropiadas para el proceso de cromatografía (capa fina, columna y placa preparativa) utilizado para separar y caracterizar cualitativamente tanto a (2a) como a (2b), modificando específicamente las condiciones de fase móvil propuesta en los trabajos de Matsumoto y cols.
- El presente trabajo propone a la espectroscopía de resonancia magnética nuclear como un método infalible para diferenciar a (2a) de su isómero (2b) teniendo señales y correlaciones particulares; además se utilizó esta misma técnica para cuantificar correctamente los rendimientos obtenidos para cada ensayo y finalmente los experimentos en RMN son de gran utilidad para cuantificar al producto principal (1a) y asegurar que todos los lotes obtenidos de antiviral posean el radical (2-hidroxietoxi)-metilo en la posición N-9 de la base heterocíclica.
- Al juntar todos los resultados obtenidos para la síntesis de (2a) fue posible obtener uno de los resultados más relevantes de esta investigación: cuando (2a) se sintetizó selectivamente bajo las condiciones cinéticas establecidas. Posteriormente fue posible obtener un monocristal de manera sencilla y éste último se caracterizó por difracción de Rayos X de monocristal. Los datos cristalográficos y la estructura tridimensional de la molécula obtenidos en este estudio, corroboran la alta pureza con la que se obtiene el precursor del acyclovir.

## 9. Bibliografía.

1. Matsumoto H., Kaneko C., Yamada K., Takeuchi T., Mori T., *Chem.Pharm.Bull.* **36** [3], 1153 (1988).
2. Singh D., Wani M., Kumar A., *J.Org.Chem.* **64**, 4665 (1999).
3. Qian M., Rainer G., *J.Am.Chem.Soc.* **126**[8], 2274 (2004).
4. Matsumoto H., *J.Heterocycl.Chem.* **27**, 1307 (1990).
5. Luo X., *Huaxue Shiji (Peop.Rep.China.)* **23**[3], 184 (2001).
6. Schaeffer H., Beauchamp L., *Nature (London)*. **272**, 583 (1978).
7. Schaeffer H. **DE2539963** (1976); *idem*, **US4199574** (1980).
8. Beauchamp L., Schaeffer H., Collins P., Bauer D., *J.Med.Chem.* **28**, 982 (1985).
9. Barrio J., *J.Med.Chem.* **23**, 572 (1980).
10. Barrio J., *Tetrahedron Lett.* **35**, 3263 (1979).
11. Robins M., Hatfield P., *Can.J.Chem.* **23**, 572 (1982).
12. Sato T., Shimadate T., *Nippon Kagaku Zasshi.* **81**, 1440 (1960).
13. Gao H., Ashim K. *Synthetic Commun.* **31**[9], 1399 (2001).
14. Shiragami H., Koguchi Y., Takamatsu S., *Nucleosides & Nucleotides.* **14**[3-5], 337 (1995).
15. Stimac A., Muhic D., Kobe J., *Nucleosides & Nucleotides.* **13**[1-3], 625 (1994).
16. Raju N., Robins R., Vaghefi M., *J.Chem.Soc.* **22**, 1769 (1989).
17. Hakimelahi G., Khalafi-Nezhad A., *Helv.Chim.Acta.* **72**[7], 1495 (1989).
18. Kelley J., Schaeffer H., J., *J.Heterocycl.Chem.* **23**[1], 271 (1986).
19. Elion G. *et al.*, *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* **74**, 5716 (1977).
20. Collins P., Bauer D., *J.Antimicrob.Chemother.* **5**, 431 (1979).
21. Oglivie K., Hanna H., *Nucleosides & Nucleotides.* **4**, 507 (1978).
22. Bryant J., Keyser G., *J.Org.Chem.* **44**, 3733 (1979).
23. Harnden M., Jarvest R., *Tetrahedron Lett.* **26**, 4265 (1985).
24. Liu M., Kouzmch S., *Tetrahedron Lett.* **25**, 611 (1984).
25. MacCoss M., Chen A., *Tetrahedron Lett.* **25**, 4287 (1985).
26. Hua M., Korkowski M., *J.Med.Chem.* **30**, 198 (1987).
27. Senkus M., *J.Am.Chem.Soc.* **68**, 734 (1946).

28. Wang J., Xiuzhen J., Zhu Q., Yang H., *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi (Kunshan Pharm. Fact. Peop. Rep. China)*. **23**(7), 289 (1992).
29. Yun Hee J., Goddard W., Noyes K., *J. Phys. Chem. B*, **107** (1), 344 (2003).
30. Bloomfield V., Crothers D., Tinocco I., (2000). *Nucleic acids - structures, properties, and functions*. University Science Book, Sausalito, California, USA (2000).
31. Goodman A., *Las bases farmacológicas de la terapéutica; Cap.50, Fármacos antivirales*. 9<sup>a</sup>.Ed., Vol II. Mc. Graw Hill Interamericana. (1996).
32. Nelson D. Cox M., *Lehninger's Principles of Biochemistry*. 3th Ed. Worth Publishers (2000).
33. Meyer H., *Ann.Chem.* **433**, 327 (1928).
34. Drews H., Meyerson S., *J.Am.Chem.Soc.* **83**, 3871 (1961).
35. Drews H., Meyerson S., *Angew.Chem.* **72**, 493 (1960).
36. Smith K., Hou D., *J.Org.Chem.* **61**, 1530 (1996).
37. Kütt A., Leito I., Kaljurand I., *J.Org.Chem.* **71**, 2829 (2006).
38. Hajipour A., BiBi F., Zarei A., *Tetrahedron Lett.* **45**, 6607 (2004).
39. Bordwell, A. et al, *J.Am.Chem.Soc.* **97**, 7160, (1975)
40. Advanced Chemistry Development (ACD/pKaDB) Software V9.04 for Solaris.
41. Ashton W., *Biochem.Biophys.Res.Comm.***108**, 1716, (1982).
42. Han Y., Paquette L., *J.Org.Chem.* **44**, 221 (1979).
43. Alhede B., *J.Org.Chem.* **56**, 2139 (1991).
44. Yamazaki A., *J.Org.Chem.* **32**, 1825 (1967).
45. Merck-Index. **30**, 28 (2000).
46. Fluka, Riedel-deHaën, *Laboratory Chemicals and Analytical Reagents*. Sigma-Aldrich (2005 / 2006).