

# Universidad Cardenal Herrera - CEU

Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología



Síntesis de derivados de uracilo y pirimidinona fluorados y no fluorados. Actividad acaricida de los compuestos obtenidos frente a *Tetranychus urticae*. Toxicidad y desarrollo de un modelo matemático predictivo de la actividad estudiada.

## TESIS DOCTORAL

Presentada por: Salvador Mérida Donoso

Dirigida por: Dr. Santos Fustero Lardiés

Dr. Vicente Villar Amigo

VALENCIA

2011



Muchas son las personas a las que querría recordar en estas líneas de agradecimiento y que me han acompañado, directa o indirectamente, en los años de realización de esta tesis. En primer lugar, agradecer a mis directores Dr. Santos Fustero Lardiés y Dr. Vicente Villar Amigo por la oportunidad que ha hecho posible la realización de este trabajo, por su confianza, paciencia, consejos y dedicación. Igualmente, agradecer a los doctores Carlos del Pozo, Juan Sanz, Antonio Simón y Jorge Gálvez por su disponibilidad y asesoramiento. A los muchos compañeros de los diversos grupos de investigación en los que este trabajo se ha realizado, por su ayuda en el laboratorio y las buenas relaciones de trabajo y de amistad vividas. Quiero recordar especialmente a mi amigo Pepe Baviera y al Dr. Javier Romero, que desde el respeto y confianza han contribuido a generar el marco profesional estable que me ha permitido llevar a buen puerto este proyecto.

Quiero dar las gracias también a amigos y familiares que me han acompañado con su afecto y apoyo moral, especialmente a mis amigos y también doctores Jaime Martínez y Fernando Cuevas. Y, en fin, a los más próximos, a mis padres por su perenne ejemplaridad, a mis hermanos y a mis queridas mujer e hija, Geles y María.

Muchas gracias a todos.



# Índice

<b>0. Introducción y Objetivos</b>	7
<b>0.1 Introducción General</b>	9
0.1.1 Compuestos orgánicos nitrogenados	9
0.1.2 Compuestos organofluorados	12
0.1.3 Productos fitosanitarios	15
<b>0.2 Objetivos</b>	26
<b>1. Derivados de uracilo y pirimidinona no fluorados</b>	29
<b>1.1 Introducción</b>	31
1.1.1 Uracilos	33
1.1.2 Pirimidinonas	36
<b>1.2 Antecedentes y Objetivos</b>	40
1.2.1 Antecedentes	40
1.2.2 Objetivos	50
<b>1.3 Discusión de resultados</b>	52
1.3.1 Síntesis de $\beta$ -enaminoxazolinas <b>3</b> y $\beta$ -enaminotiazolinas <b>4</b>	55
1.3.2 Síntesis de derivados de oxazolopirimidinonas ( <b>6</b> y <b>7</b> ) y de derivados cloroetilados de uracilo <b>8</b> a partir de $\beta$ -enaminoxazolinas	56
1.3.3 Síntesis de derivados de tiazolopirimidinonas <b>5</b>	63
1.3.4 Síntesis de derivados de uracilo N3,C6-disustituidos <b>9</b> a partir de oxazolopirimidinonas <b>6</b> y <b>7</b>	64
1.3.5 Síntesis de derivados de uracilo N3,C6-disustituidos <b>9</b> a partir de uracilos N3-cloroetilados <b>8</b>	65
1.3.6 Síntesis de derivados de oxazolopirimidinonas ( <b>6</b> y <b>7</b> ) a partir de uracilos N3-cloroetilados <b>8</b>	66
<b>1.4 Parte Experimental</b>	68



1.4.1 Síntesis de $\beta$ -enaminoxazolinas $\beta$ -enaminotiazolinas <b>3 y 4</b>	70
1.4.2 Síntesis de derivados de oxazolopirimidinonas ( <b>6 y 7</b> ) a partir de $\beta$ -enaminoxazolinas <b>3</b>	71
1.4.3 Síntesis de derivados de uracilo N3-cloroetilados <b>8</b> a partir de $\beta$ -enaminoxazolinas <b>3</b>	76
1.4.4 Síntesis de derivados de tiazolopirimidinonas <b>5</b>	79
1.4.5 Síntesis de derivados de uracilo N3,C6-disustituidos <b>9</b> a partir de oxazolopirimidinonas <b>6 y 7</b>	81
1.4.6 Síntesis de derivados de uracilo N3,C6-disustituidos <b>9</b> a partir de uracilos N3-cloroetilados <b>8</b>	82
1.4.7 Síntesis de derivados de oxazolopirimidinonas <b>6 y 7</b> a partir de uracilos N3-cloroetilados <b>8</b>	84
<b>1.5 Conclusiones</b>	86
<b>2. Derivados de uracilo y pirimidinona fluorados</b>	87
<b>2.1 Introducción</b>	89
2.1.1 El Flúor	89
2.1.2 Derivados fluorados de uracilo y pirimidinona	103
2.1.3 El Flúor en los productos fitosanitarios	106
<b>2.2 Antecedentes y Objetivos</b>	108
2.2.1 Objetivos	108
2.2.2 Antecedentes	110
<b>2.3 Resultados</b>	130
2.3.1 Obtención de derivados fluorados de uracilo a través de la vía de los $\beta$ -enaminoésteres	131
2.3.2 Obtención de derivados de uracilo fluorados a través de la vía de las $\beta$ -enaminoxazolinas	142
2.3.3 Obtención de derivados fluorados de oxazolopirimidinona <b>15</b>	



y <b>16</b> partiendo del derivado de uracilo fluorado cloroetilado <b>17k</b>	150
2.3.4 Síntesis parcial de derivados de uracilo fluorados a partir de otros uracilos	150
<b>2.4 Parte Experimental</b>	156
2.4.1 Obtención de derivados fluorados de uracilo a través de la vía de los $\beta$ -enaminoésteres	158
2.4.2 Obtención de derivados de uracilo fluorados a través de la vía de las $\beta$ -enaminoxazolinas	169
2.4.3 Obtención de derivados fluorados de oxazolopirimidinona <b>15</b> y <b>16</b> partiendo del derivado de uracilo fluorado cloroetilado <b>17k</b>	174
2.4.4 Síntesis parcial de derivados de uracilo fluorados a partir de otros uracilos	175
<b>2.5 Conclusiones</b>	178
<b>3. Actividad acaricida, toxicidad y estudio por topología molecular de derivados de uracilo y pirimidinona</b>	180
<b>3.1 Introducción</b>	182
<b>3.2 Antecedentes bibliográficos</b>	184
3.2.1 Acarología	184
3.2.2 Impacto económico	202
3.2.3 Toxicología de pesticidas y plaguicidas	204
3.2.4 Topología Molecular	208
<b>3.3 Objetivos</b>	217
<b>3.4 Materiales y Métodos</b>	218
3.4.1 Actividad acaricida	218
3.4.2 Toxicidad	224
3.4.3 Topología molecular	229
<b>3.5 Resultados</b>	235



3.5.1 Actividad acaricida	235
3.5.2 Estudios de Toxicidad	255
3.5.3 Modelo matemático	260
<b>3.6 Conclusiones</b>	<b>270</b>
<b>4. Conclusiones Generales</b>	<b>272</b>
<b>5. Apéndice</b>	<b>278</b>
5.1 Publicaciones	
5.2 RMN y Masas, derivados de uracilo y pirimidinona no fluorados	
5.3 RMN y Masas, derivados de uracilo y pirimidinona fluorados	





















## ***Introducción y Objetivos***





## 0.1. Introducción General

El estudio de los organismos vivos puede realizarse desde aspectos muy distintos, ricos y complejos. Uno de los primeros y más básicos es el orden químico que rige y relaciona átomos, moléculas y macromoléculas. Moléculas, que al cabo, son estructuras multicarbonadas acompañadas de átomos de otros elementos como hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, etc.

Como sabemos, no todos los elementos químicos son igualmente adecuados para la construcción de los seres vivos. De hecho, sólo 22 de los 100 elementos químicos hallados en la corteza terrestre son componentes esenciales de los organismos vivos. Y de éstos, carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno constituyen alrededor del 99% de la masa de muchas células. Estos cuatro elementos poseen una propiedad común: forman con facilidad enlaces covalentes mediante reparto de pares de electrones. De este modo, pueden reaccionar unos con otros para formar un gran número de compuestos covalentes diferentes.<sup>1</sup>

De la síntesis de este tipo de compuestos se ocupa la Química Orgánica entre cuyos principales objetivos podemos incluir el descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos, así como el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas dedicadas a su preparación.

### 0.1.1. Compuestos orgánicos nitrogenados

Como es sabido, las biomoléculas de los organismos se hallan ordenadas en una jerarquía de complejidad molecular creciente. Todas las biomoléculas orgánicas derivan, en último término, de precursores muy sencillos, de bajo peso molecular, obtenidos de su entorno, a saber: el dióxido de carbono, el agua y el nitrógeno atmosférico. A través de secuencias de intermediarios metabólicos, estos precursores dan lugar a las denominadas biomoléculas sillares estructurales, que se clasifican en cuatro tipos básicos: nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos

---

<sup>1</sup> Lehninger, A. L.; *Bioquímica*, Ed. Omega, S.A., 1978, p 19

<sup>2</sup> (a) Helmchen, G.; Hoffmann, R. W.; Mulzer, J.; Schaumann, E. *Stereoselective Synthesis*; Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1996, Workbench Edition E21, Vols. 1-10,

y monosacáridos. De todos ellos, nucleótidos y aminoácidos disponen siempre de nitrógeno en su estructura molecular.<sup>1</sup>

Es, por tanto, habitual, que muchas de las moléculas que forman parte de la vida contengan átomos de nitrógeno. Así, los ácido nucleicos, cuya unidad estructural son los nucleótidos, son moléculas que contienen codificada la información genética de cualquier organismo y controlan, además, la síntesis de las proteínas. Las mismas proteínas están, a su vez, formadas por compuestos nitrogenados –aminoácidos- y son fundamentales en la estructura y funcionamiento de la célula. Otro ejemplo sería el de los neurotransmisores, como adrenalina, dopamina o serotonina, que actúan como mensajeros químicos entre las distintas fibras nerviosas.

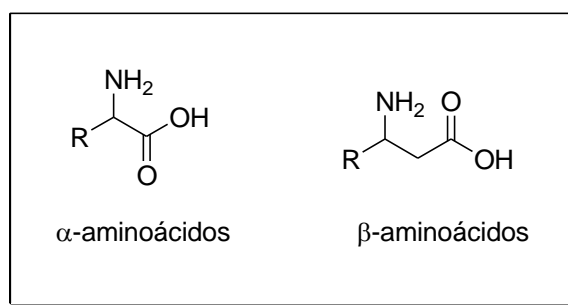
Además de todas estas moléculas, existe una gran variedad de compuestos, frecuentemente derivados de ellas, que contienen átomos de nitrógeno y que manifiestan una actividad biológica muy dispar, como antibióticos, antivíricos, antifúngicos, antitumorales, etc.

En concreto, los  $\alpha$ - y  $\beta$ -aminoácidos (figura 0.1) y sus derivados<sup>2</sup> son compuestos que han destacado como unas de las moléculas más interesantes desde el punto de vista de sus aplicaciones terapéuticas; además, dado que la mayoría de ellas son quirales, han adquirido también gran importancia en síntesis asimétrica.<sup>3</sup>

---

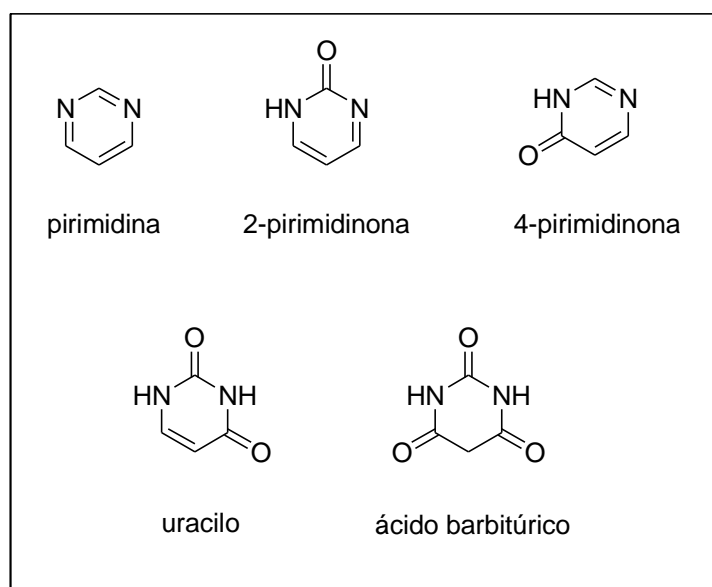
<sup>2</sup> (a) Helmchen, G.; Hoffmann, R. W.; Mulzer, J.; Schaumann, E. *Stereoselective Synthesis*; Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1996, Workbench Edition E21, Vols. 1-10. (b) Juaristi, E. *Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids*, Ed.; Wiley-VCH, Inc.; New York, 1996.

<sup>3</sup> Fustero, S.; Sánchez-Roselló, M.; Sanz-Cervera, J.F.; Aceña, J.L.; del Pozo, C.; Fernández, B; Bartolomé, A.; Asensio, A.; Ramírez de Arellano, C. "Asymmetric Synthesis of Fluorinated Cyclic  $\beta$ -Amino Acid Derivatives through Cross Metathesis" *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4633-4636.



**Figura 0.1**

Otro ejemplo son los derivados carbonilados de pirimidina, compuestos que destacan por su diversa y potente actividad farmacológica.<sup>4</sup>



**Figura 0.2**

<sup>4</sup> Undheim, K.; Benneche, T. "Pyrimidines and their benzoderivatives" en *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Boulton, A. J. Eds. Pergamon, vol 6, 1996, pág 93-233.

Por otra parte, los ácidos barbitúricos son compuestos con diversas actividades farmacológicas,<sup>5</sup> que han sido utilizados también en la fabricación de plásticos,<sup>6</sup> textiles<sup>7</sup> y polímeros,<sup>8</sup> así como *building blocks* para la formación de estructuras supramoleculares mediante interacciones de tipo no covalente.<sup>9</sup>

### 0.1.2. Compuestos organofluorados

En los últimos años el interés comercial que vienen despertando los compuestos organofluorados ha excedido cualquier expectativa. Este tipo de moléculas dispone de un enorme potencial en los campos farmacéutico<sup>10</sup> y agroquímico,<sup>11</sup> lo que se evidencia por el gran número de compuestos fluorados comercializados en los últimos años, como Ciprofloxacino,<sup>12</sup> antibiótico muy usado para infecciones de las vías respiratorias altas y del tracto urinario; Gemcitabina,<sup>13</sup> fármaco cabeza de serie en el tratamiento de tumores sólidos, especialmente de

---

<sup>5</sup> (a) Jovanovic, M. V.; Biel, E. R. *J. Org. Chem.* **1987**, *24*, 191-204. (b) Grams, F.; Brandstetter, H.; D'Alò, S.; Gepperd, D.; Krell, H-W.; Leinert, H.; Livi, V.; Menta, E.; Oliva, A.; Zimmermann, G. *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 1277-1285. (c) Maquoi, E.; Sounni, N. E.; Devy, L.; Oliver, F.; Frakenne, F.; Krell, H-W ; Grams, F. ; Foidart, J.-M.; Noël, A. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 4038-4047. (d) Volonterio, A.; Zanda, M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 841-844.

<sup>6</sup> Thetford, D.; Chorlton, A. P.; Hardman, M. *Dyes Pigm.* **2003**, *59*, 185-191.

<sup>7</sup> Barzatt, R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 909-915.

<sup>8</sup> (a) Andreu, R.; Garin, J.; Orduna, J.; Alcalá, R. ; Villacumpa, B. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3143-3146. (b) McClenaghan, N. D.; Absalon, C.; Basan, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13004-13005.

<sup>9</sup> (a) Prints, L. J.; Jolliffe, K. A.; Hulst, R.; Timmerman, P.; Reinhoudt, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3617-3627. (b) Timmerman, P.; Prins, L. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3191-3205.

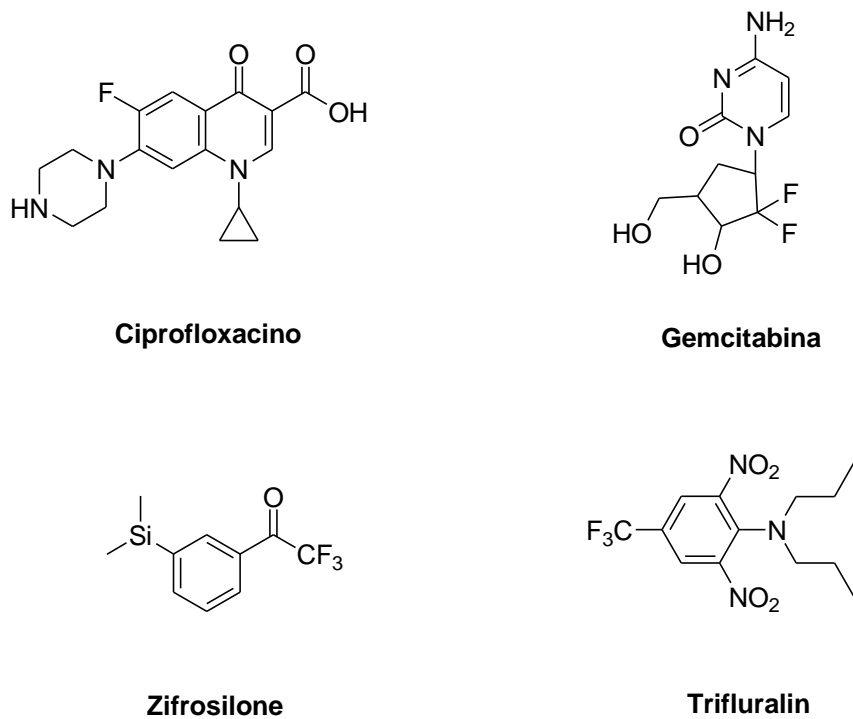
<sup>10</sup> (a) Ojima, I.; McCarthy, J.R.; Welch, J. T., en *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry*, ACS. Symp. Series, 639, American Chemical Society: Washington, D.C., 1996. (b) Filler, R.; Kobayashi, Y., *Biomedical Aspects of Fluorine Chemistry*, Eds. Elsevier Biomedical Press: New York and Kodansha Ltd: Tokyo 1982. (c) Welch, J. T.; Eswarakrishnan, S. *Fluorine in Bioorganic Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1991.

<sup>11</sup> (a) Cartwright, D. "Recent Developments in Fluorine-Containing Agrochemicals" en *Organofluorine Chemistry: Principles and Commercial Applications*, Banks, R. E.; Smart, B. E.; Tatlow, J. C. Ed., Plenum Press, New York, 1994, 237-262. (b) Hiyama, T. *Organofluorine Compounds: Chemistry and Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000, 167-182.

<sup>12</sup> (a) Filler, R.; Kobayashi, Y.; Yagupolskii, L. M., *Organofluorine Compounds in Medicinal Chemistry and Biomedical Applications*, Eds.; Elsevier, Amsterdam, 1993, p 165. (b) Hiyama, T. *Organofluorine Compounds: Chemistry and Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000, p 161-163.

<sup>13</sup> Hertel, L. W.; Kroin, J. S.; Grossmann, C. S.; Grindey, G. B.; Dorr, A. F.; Storniolo, A. M. V.; Plunkett, W.; Gandhi, V.; Huang, P. "Synthesis and Biological Activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine)" en *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry*, Ojima, I.; McCarthy, J.R.; Welch, J. T., ACS. Symp. Series, 639, American Chemical Society: Washington, D.C., 1996, p 264-278.

pulmón y páncreas; Zifrosilone,<sup>14</sup> actualmente en estudio para su empleo en el tratamiento del Alzheimer, y Trifluralin,<sup>15</sup> herbicida del cual se han llegado a vender 18.000 toneladas en Estados Unidos durante un año (Figura 0.1.3).



**Figura 0.1.3**

El flúor es el elemento más electronegativo del sistema periódico y su presencia en las moléculas orgánicas influye en la distribución electrónica, afectando a la acidez o basicidad de los grupos vecinos, a los momentos dipolares y, fundamentalmente, a su estabilidad y reactividad general.<sup>16</sup>

La presencia de flúor, o de sustituyentes fluorados, en las moléculas orgánicas les confiere especiales propiedades físicas y biológicas: desde una

<sup>14</sup> Prous, J. R. *Drugs Fut.* **1994**, *19*, 854-855.

<sup>15</sup> Cartwright, D. "Recent Developments in Fluorine-Containing Agrochemicals" en *Organofluorine Chemistry: Principles and Commercial Applications*, Banks, R. E.; Smart, B. E.; Tatlow, J. C. Ed., Plenum Press, New York, 1994, p 240.

<sup>16</sup> Banks, R.; Smart, B. E.; Tatlow, J. C. Ed., En *Organofluorine Chemistry: Principles and Commercial Applications*, Plenum Press, New York, 1994.



extrema estabilización, en compuestos altamente fluorados,<sup>17</sup> hasta una drástica modificación de la actividad farmacológica en los compuestos con bajo grado de fluoración. Estos cambios en las propiedades físicas y en la reactividad química de las moléculas se deben, básicamente, a las propiedades únicas y características del átomo de flúor, y vienen dados por los pronunciados efectos electrónicos, resultado de la fluoración, así como por el hecho de que la introducción de flúor no provoca un impedimento estérico relevante.

Las diferencias más significativas de reactividad química y actividad biológica entre los compuestos organofluorados y no fluorados tienen su origen, principalmente, en las energías de los enlaces C-F (456-486 KJ mol<sup>-1</sup>) y C-H (356-435 KJ mol<sup>-1</sup>), y en la elevada diferencia de electronegatividad entre ambos (escala de Pauling: H = 2,1; F = 4,0). En consecuencia, los sustituyentes fluorados ejercen un efecto considerable de polarización sobre los grupos funcionales adyacentes, haciendo que su reactividad pueda cambiar.

Tanto el flúor como los sustituyentes fluorados, situados estratégicamente en compuestos biológicamente activos, pueden variar de forma considerable sus propiedades físico-químicas, actividad biológica y selectividad. De hecho, la sustitución de hidrógeno o hidroxilo por un átomo de flúor en una molécula biológicamente activa puede dar un compuesto análogo con mejor selectividad y eficacia o modificar drásticamente su espectro de actividad.<sup>18</sup>

En cuanto al tamaño, el átomo de flúor es similar al de hidrógeno (radios de van der Waals 1,35Å y 1,20Å respectivamente), por lo que la sustitución de un átomo por otro (sustitución bioisómera) apenas afecta al impedimento estérico.

Por último, es importante destacar la capacidad del flúor para formar enlaces por puente de hidrógeno.

---

<sup>17</sup> Gerstenberger, M.; Haas, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1981**, *20*, 647-667.

<sup>18</sup> (a) Welch, J.T.; Eswarakrishnan, S., en *Fluorine in Bioorganic Chemistry*, John Wiley And Sons, New York, 1991; (b) Clark, J. H.; Wails, D.; Bastock, T. W., en *Aromatic Fluorination*, CRC Press: Boca Raton, FL, 1996.

### 0.1.3. Productos fitosanitarios<sup>19,20,21</sup>

Los productos fitosanitarios son sustancias orgánicas -de origen natural o sintético- empleadas como biocidas para combatir los parásitos de los cultivos, ganado y animales domésticos, y los del hombre y su ambiente. En general, estas sustancias se pueden clasificar en: insecticidas, herbicidas, fungicidas, antibióticos, rodenticidas, acaricidas, etc., en función del organismo sobre el que actúan. También se suelen considerar como tales los atrayentes, repelentes y esterilizantes de insectos. Los productos químicos utilizados en el tratamiento de plagas resultan, actualmente, indispensables para la producción a gran escala de cultivos de alta calidad y rentabilidad, así como para la mejora de las condiciones de trabajo en los campos de cultivo.

Los productos fitosanitarios pueden, también, clasificarse por familias, en función de su estructura química.<sup>22</sup> Ejemplos son los plaguicidas organofosforados, organoclorados, carbamatos, fenoxiácidos, piretroides, etc. Según esta clasificación, los compuestos de cada grupo tienen propiedades similares entre sí y básicamente distintas a las de otras familias.

El uso de los productos fitosanitarios es relativamente reciente. Las primeras sustancias empleadas para tal fin eran de origen inorgánico como azufre, arseniatos o sulfato de cobre. A principio del siglo XX se introdujeron en Holanda los aceites insecticidas, que incluían el pelitre y la rotenona. Sin embargo, el gran avance en este campo se produce en 1940 con el descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT; a partir de ese momento, la gran mayoría de los productos fitosanitarios utilizados son producidos mediante síntesis. Actualmente se siguen sintetizando y probando nuevas sustancias que presenten efectos más específicos y baja persistencia en el medio. Todo ello ha provocado que el número

---

<sup>19</sup> Edafología, Dpto. Edafología y Química Agrícola. Unidad docente e investigadora de la Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

<sup>20</sup> Ware, G.W.; Whitacre, D. M. *The Pesticide Book*, 6<sup>th</sup> ed., 2004.

<sup>21</sup> Clive, T. *The Pesticide Manual*, 14th Edition, 2006.

<sup>22</sup> Consejería de Sanidad y Consumo. Generalitat Valenciana (1993) Plaguicidas Agrícolas: Vigilancia Sanitaria. Monografías Sanitarias Serie E, nº 13.

de productos fitosanitarios, así como su utilización, se haya incrementado durante las pasadas cuatro décadas, modificando las prácticas agrícolas y aumentando los rendimientos de la producción. Los plaguicidas por sí solos son responsables de, al menos, el 30% del aumento de la producción agrícola.

A pesar de los beneficios que reportan los productos fitosanitarios –por ejemplo en los cultivos, asegurando la productividad agrícola- su uso presenta una serie de problemas, ya que, tanto los residuos de estas sustancias como sus metabolitos, presentan riesgos para la salud y el medio ambiente. La valoración del impacto medioambiental de estos productos se lleva a cabo tradicionalmente mediante tres parámetros generales: toxicidad, persistencia e impacto. Tomando en consideración estos parámetros, se elaboran las denominadas listas prioritarias, también llamadas listas “rojas” que incluyen productos permitidos con restricciones y “negras”, no permitidos o en proceso de retirada del mercado.

Estos productos presentan composiciones muy variables y, según su naturaleza química, se clasifican en orgánicos e inorgánicos.

#### *0.1.3.a Plaguicidas inorgánicos*

Entre ellos se encuentran los insecticidas fluorados, como los fluosilicatos, y los arsenicales, como los arseniatos de Pb, de Ca o de Cu. Los compuestos arsenicales inorgánicos son muy tóxicos. Cuando se utilizan indiscriminadamente y de forma prolongada, se acumulan en el suelo y pueden, incluso muchos años después de su aplicación, ser absorbidos por las plantas y originar intoxicaciones.

Al grupo de los fungicidas pertenece el Caldo Bordolés (mezcla de una suspensión de cal en agua con una disolución de sulfato cúprico), y los mercuriales, entre otros.

Por otra parte, sulfuro de carbono, ácido cianhídrico y sus sales se utilizan como fumigantes. Son los productos más tóxicos para microorganismos, insectos y mamíferos de entre los que se utilizan en agricultura. Su toxicidad se debe a que

se combinan con el Fe de la hemoglobina bloqueando su capacidad de transportar oxígeno.

#### *0.1.3.b. Plaguicidas orgánicos.*

Éstos son más abundantes; los más utilizados son los derivados halogenados y organofosforados, los carbamatos, los derivados de urea y tiourea, y los heterocíclicos.

##### *0.1.3.b.1 Derivados halogenados.*

En los últimos 30 años hemos vivido un periodo de notable expansión en la investigación y el uso de derivados halogenados en la industria agroquímica. La introducción de halógenos en compuestos activos es hoy un ejercicio habitual e importante en la búsqueda de los modernos agroquímicos que han de ser óptimamente eficaces, medioambientalmente seguros y económicamente viables.<sup>23</sup>

Son compuestos que contienen generalmente átomos de cloro en su molécula y presentan una alta toxicidad en insectos. Aunque han sido muy utilizados, su aplicación ha decrecido sensiblemente debido a su persistencia y bioacumulación, lo que ha obligado, en algunos casos, a su prohibición. Es el caso del DDT, un compuesto relativamente fácil de sintetizar y económico, muy efectivo contra los insectos.

Los componentes de este grupo se pueden clasificar en:

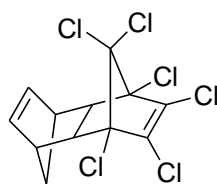
i) *Derivados halogenados de hidrocarburos alifáticos*, utilizados como fumigantes, como bromuro de metilo y 1,2-dicloropropano.

ii) *Derivados halogenados de hidrocarburos alicíclicos* con propiedades insecticidas y fungicidas, como Aldrín (figura 0.1.4). Los

---

<sup>23</sup> Jeschke, P. *Pest. Manag. Sci.* **2010**, 66, 10-27.

ciclodienos aparecieron después de la II Guerra Mundial: clordano, en 1945; aldrín y dieldrín, en 1948; heptacloro, en 1949; endrín, en 1951; mirex, en 1954; endosulfán, en 1956; y clordecona (Kepone®), en 1958. La mayoría de los ciclodienos halogenados son insecticidas persistentes y son estables en el suelo y relativamente estables en presencia de luz ultravioleta. Como resultado, las mayores cantidades fueron usadas como insecticidas del suelo (especialmente clordano, heptacloro, aldrín, y dieldrín) para control de termitas e insectos que viven en el suelo cuyos estados larvales se alimentan de las raíces de las plantas.



**Aldrín**

**Figura 0.1.4**

iii) *Derivados halogenados aromáticos.* Estos productos pueden presentar propiedades insecticidas, acaricidas, herbicidas o fungicidas en función de la naturaleza del átomo de halógeno, y de su número y posición en el anillo. El grupo más antiguo de los organoclorados es el de los difenil alifáticos, el cual incluía DDT, DDD, dicofol, etilán, clorobenzilato, y metoxicloro. Probablemente, DDT es el más conocido y más notorio producto químico del siglo XX, y continúa siendo reconocido como el insecticida más útil jamás desarrollado. Desde 1940 y hasta 1973 más de 2 mil millones de kilogramos de DDT fueron utilizados en todo el mundo. En 1973, la Agencia para la Protección Ambiental de los EEUU canceló todos sus usos. Los demás países del Primer Mundo rápidamente siguieron el



ejemplo. DDT aún es usado con efectividad para control de malaria en varios países del tercer mundo.

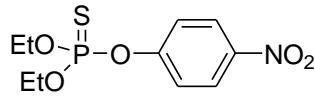
Estos compuestos actúan sobre el sistema nervioso de los insectos, aunque no se conoce bien si ejercen su acción por contacto o por ingestión.

#### *0.1.3.b.2 Compuestos organofosforados.*

Son ésteres o amidas derivadas de ácido fosfórico, tiofosfórico, ditiofosfórico, fosfónico o fosfínico. Su actividad principal es insecticida, aunque algunos también presentan actividad acaricida, fungicida o herbicida.

Los pesticidas organofosforados tienen dos propiedades características: generalmente son más tóxicos a los vertebrados que otras clases de insecticidas, y la mayoría de ellos son químicamente inestables o no persistentes. Esta última característica fue la que los trajo al uso agrícola como substitutos de los organoclorados que son mucho más persistentes. Debido a la toxicidad relativamente alta de estos compuestos, la EPA, de acuerdo con lo previsto en la Ley de Protección de la Calidad de los Alimentos (1996), realizó una extensa reevaluación de toda la clase comenzando a finales de los años 1990. Muchos fueron cancelados voluntariamente y otros perdieron usos.

En general, tienen un espectro de acción más estrecho que el de los organoclorados, pero su utilización reduce el peligro de eliminación de otros insectos beneficiosos. Por otra parte, son relativamente poco persistentes y de fácil descomposición a otros productos no tóxicos; además no son bioacumulativos, por lo que no se incorporan en la cadena trófica. Ejemplo de plaguicida organofosforado es Paratión (figura 0.1.5).



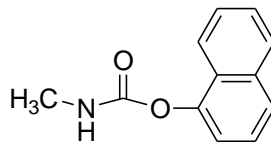
**Paratión**

**Figura 0.1.5**

La toxicidad y la acción insecticida de estos compuestos son atribuidas a la inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa, enzima que se encuentra en las células nerviosas de los insectos y cuya desactivación paraliza su sistema nervioso.

*1.3.b.3 Carbamatos: Derivados de ácido carbámico, tiocarbámico y ditiocarbámico.*

El primer insecticida introducido fue Sevin, producto de gran actividad y amplio espectro de acción, siendo, además, barato, estable y relativamente poco tóxico (figura 0.1.6).



**Sevin**

**Figura 0.1.6**

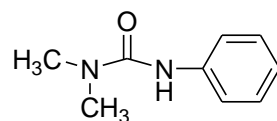
Los carbamatos tienen propiedades insecticidas y herbicidas. Los derivados tio y ditiocarbamatos tienen, en general, propiedades herbicidas, aunque algunos presentan propiedades fungicidas.

Estos plaguicidas presentan algunas ventajas frente a los organofosforados, como una mayor eficacia contra insectos resistentes a estos últimos y una mayor seguridad de manejo; sin embargo, son de producción más difícil, más caros y de mayor toxicidad frente a los insectos polinizadores.

Su modo de acción es el mismo que el de los insecticidas organofosforados, es decir, inhiben la actividad de acetilcolinesterasa.

#### 1.3.b.4 Derivados de urea y tiourea

Estos compuestos presentan, fundamentalmente, propiedades herbicidas, que aumentan notablemente con la presencia de halógenos en la molécula. Un ejemplo es Fenurón (figura 0.1.7).



**Fenurón**

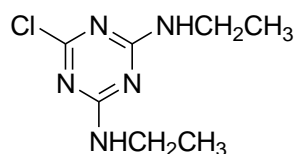
**Figura 0.1.7**

Se utilizan fundamentalmente como esterilizantes de terrenos donde se quiere evitar el crecimiento de todo tipo de plantas; también en tratamientos de preemergencia. Actúan inhibiendo el proceso normal de fotosíntesis. Presentan la ventaja de que son muy poco tóxicos para los mamíferos.

#### 1.3.b.5 Derivados de heterociclos

Aunque las triazinas herbicidas (figura 0.1.8) Simazina, Clorazina... (figura 0.1.8) constituyen uno de los grupos más importantes y activos de este tipo de

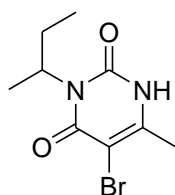
compuestos, hemos de resaltar los derivados de uracilo, ya que poseen una actividad herbicida aún más potente que la de los derivados de urea y de triazina y un mecanismo acción similar a la de estos grupos. Generalmente presentan solubilidad alta a media, si bien son adsorbidos fuertemente al suelo y no se lixivian fácilmente. Por otro lado, y debido a su mayor solubilidad y acción, son menos selectivos que los grupos anteriores.



**Simazina**

**Figura 0.1.8**

Un ejemplo de estos derivados es Bromacilo (figura 0.1.9), un herbicida total de pre- y postemergencia de la maleza, con una solubilidad en agua de 815 ppm, utilizado en cítricos y áreas no agrícolas. Actúan siguiendo un mecanismo similar al de los derivados de urea.

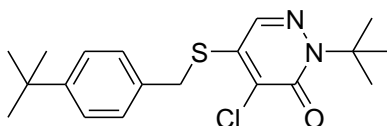


**Bromacilo**

**Figura 0.1.9**

Otro subtipo es el de las piridazinonas, del que un ejemplo es Piridabén (figura 0.1.10), un insecticida y acaricida selectivo de contacto, efectivo también contra thrips, áfidos, moscas blancas y saltahojas. Está registrado para frutales pomáceos, almendros, cítricos y ornamentales. Piridabén es un inhibidor

metabólico que interrumpe el transporte de electrones en las mitocondrias, ofreciendo así, una acción inmediata en un rango de temperaturas amplio y un control residual excepcionalmente largo también.



**Piridabén**

**Figura 0.1.10**

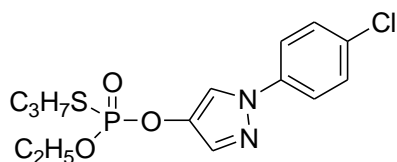
Un último subtipo de compuestos heterocíclicos son los derivados de pirazol, que presentan propiedades insecticidas y acaricidas y fueron introduciéndose en el mercado en la década de 1980. Esta nueva clase de plaguicidas surgió como respuesta a la resistencia observada en algunos insectos hacia los piretroides de síntesis<sup>24</sup> y a la elevada toxicidad de los carbamatos y de los derivados de fósforo utilizados hasta entonces.

Los sistemas pirazólicos han sido ampliamente utilizados como componentes básicos de compuestos biológicamente activos, tanto en agroquímica como en la industria farmacéutica. En el campo agroquímico, Pyraclofos (Figura 0.1.11) es un insecticida mixto fosforado-pirazólico utilizado en el control de las plagas de frutales y otros vegetales. Actúa, como los derivados organofosforados, inhibiendo la acción del enzima colinesterasa.

---

<sup>24</sup> Los piretroides son un grupo de pesticidas artificiales, desarrollados para controlar preponderantemente las poblaciones de insectos plaga. Este grupo surgió como un intento por parte del hombre de emular los efectos insecticidas de las piretrinas naturales obtenidas del crisantemo, que se venían usando desde 1850. Ej. Allethrin, primer piretriode sintetizado en 1950.

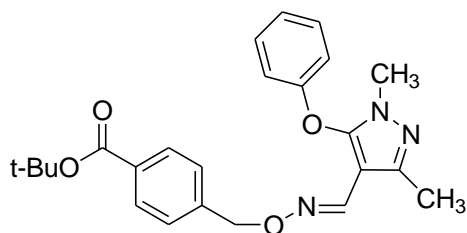




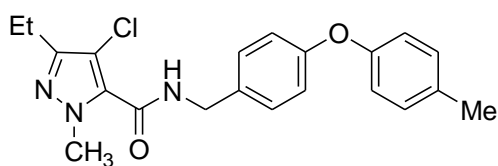
**Pyraclofos**

**Figura 0.1.11**

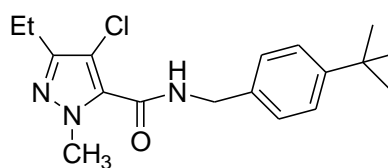
Un grupo interesante de derivados de pirazol lo constituyen Fenpyroximate (Figura 0.1.12.a), Tolfenpyrad (Figura 0.1.12.b) y Tebufenpyrad (Figura 0.1.12.c), que presentan propiedades insecticidas y acaricidas. Estos derivados actúan inhibiendo el sistema de transporte electrónico mitocondrial del insecto y, en consecuencia, su respiración.



**Fenpyroximate**



**Tolfenpyrad**



**Tebufenpyrad**

**Figura 0.1.12**

Mientras que Fenpyroximate manifiesta su actividad, fundamentalmente, sobre las larvas de los ácaros, Tebufenpyrad es un plaguicida de más amplio espectro. Presenta una actividad notable como ovicida y larvicida en una gran variedad de especies de insectos, así como en ácaros que afectan a animales y plantas, como *Tetranychus urticae* o *Tetranychus cinnabarinus*, entre otros.<sup>25</sup> Es un compuesto con baja toxicidad en mamíferos y con moderada permanencia en el medio ambiente.

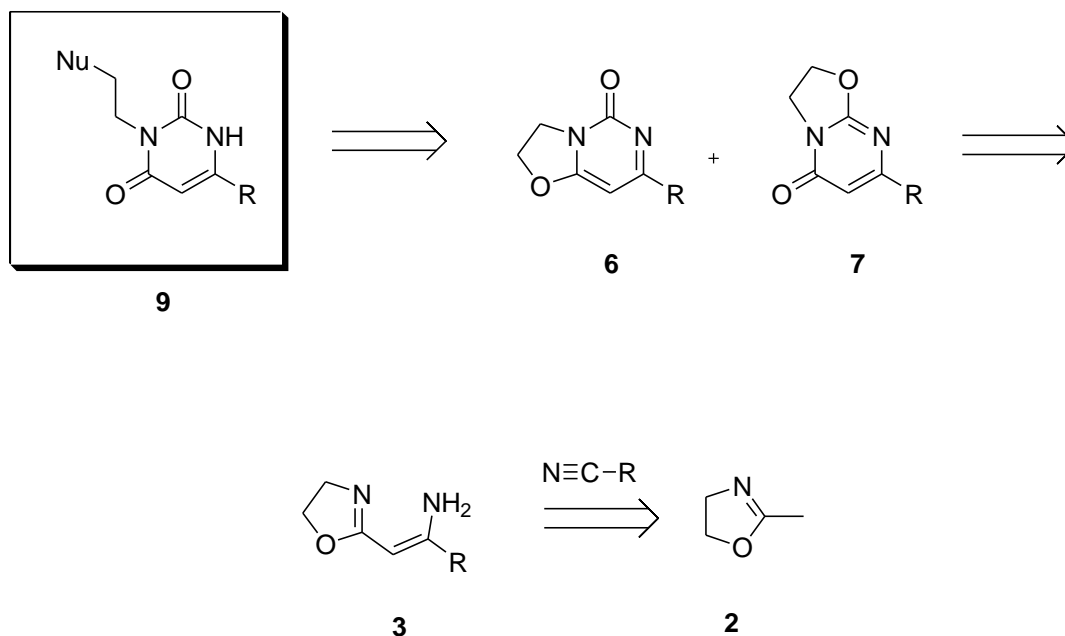
---

<sup>25</sup> Okada, I.; Okui, S. *Mitsubishi Chemical Corp.* 1994; US. Patent 4950668; EP 289879.

## 0.2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es la síntesis de nuevos derivados de uracilo y pirimidinona fluorados y no fluorados, que por ser compuestos derivados de urea, heterocíclicos y frecuentemente halogenados, pueden manifestar actividad plaguicida. Su contenido se ha dividido en tres capítulos:

**Capítulo 1:** *Síntesis de derivados de uracilo 9 y pirimidinona 6 y 7 no fluorados*, mediante una metodología desarrollada inicialmente por las doctoras Dolores Díaz<sup>26</sup> y Esther Salavert<sup>27</sup> y que denominaremos vía de la  $\beta$ -enaminoxazolinas **3**. La metodología será revisada, estudiándose en profundidad, lo que permitirá aislar productos intermedios no obtenidos anteriormente. Además se estudiará la reacción clave del proceso, para conocer, tanto el mecanismo de acción como para aumentar el control del mismo. También se incrementará la versatilidad sintética introduciendo modificaciones que permitan la obtención de nuevos compuestos.



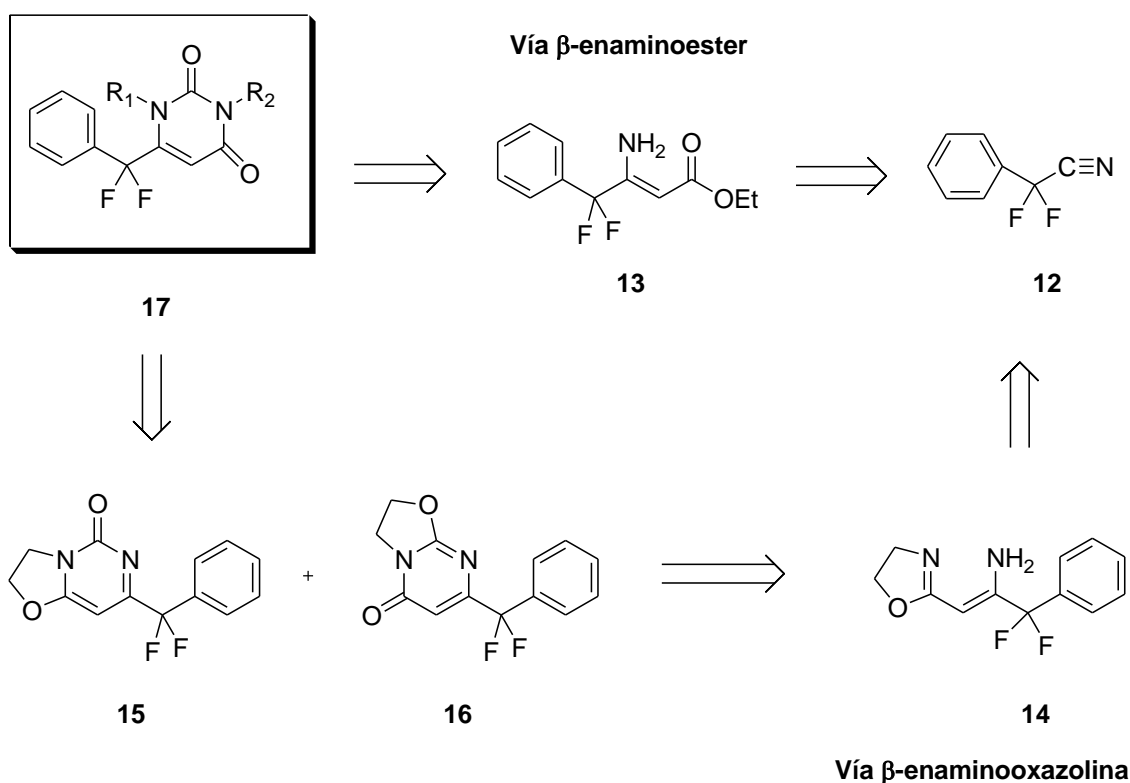
Esquema 0.1

<sup>26</sup> Díaz, D. Tesis Doctoral, Universitat de València, 1997.

<sup>27</sup> Salavert, E. Tesis Doctoral, Universitat de València, 2001.

**Capítulo 2: Síntesis de derivados de uracilo 17 y pirimidinona 15 y 16 fluorados.** Para ello nos serviremos tanto de la vía sintética de las  $\beta$ -enaminoxazolinas estudiada en el capítulo anterior y optimizada, como de una nueva vía, que denominaremos vía de los  $\beta$ -enaminoésteres 13, desarrollada originariamente por el doctor Julio Piera<sup>28</sup>. Esta última vía será también estudiada en profundidad, procediéndose a optimizarla desde escala miligramo a las de gramo y multigramo.

Como podemos ver en el siguiente esquema para estos compuestos introducimos una nueva designación aunque comparten una base estructural similar a los del primer capítulo. Con ello pretendemos distinguir nítidamente los derivados no fluorados finales obtenidos en el primer capítulo de los obtenidos en el segundo capítulo, fluorados.



<sup>28</sup> Piera, J. Tesis Doctoral, Universitat de València, 2003.

Además, desde los derivados de uracilo y de las pirimidinonas, fluorados o no, desarrollaremos nuevas reacciones que nos permitan la introducción de átomos de flúor en el sustituyente N3.

**Capítulo 3:** Se procederá a estudiar la actividad acaricida frente a la especie *Tetranychus urticae* -importante plaga de los cítricos valencianos- de todos los derivados de uracilo y pirimidinona sintetizados, tanto los fluorados como los no fluorados. Se realizará también un estudio de topología molecular de los derivados sintetizados relacionando estructura-actividad. Con aquellos derivados de uracilo y pirimidinona que hayan dado resultados de actividad acaricida relevantes, se procederá a realizar un estudio toxicológico de los mismos, a nivel tópico y de ingesta oral.



**Capítulo 1**  
***Derivados de uracilo y pirimidinona no fluorados***



## 1.1 Introducción

La mayoría de enfermedades de origen bacteriano pueden ser combatidas mediante una extensa gama de fármacos antibacterianos. Esta amplitud en la estrategia terapéutica se debe a que las bacterias son organismos independientes con importantes diferencias metabólicas. Sin embargo, las terapias para enfermedades de naturaleza cancerígena o vírica poseen una dificultad añadida importante: en el primer caso, las células del propio organismo comienzan a dividirse a una velocidad mayor; en tanto que en el segundo, los virus se introducen en células del organismo para replicarse, sirviéndose de las estructuras de las mismas y manteniendo unas pautas metabólicas estrechamente ligadas a las de la célula huésped.

Estas enfermedades –cancerígenas y víricas- están muy relacionadas con el proceso de replicación de ADN, que acontece durante la división celular y en el que los ácidos nucleicos desempeñan un importante papel. Los ácidos nucleicos son polímeros constituidos por nucleótidos, a su vez formados por tres fracciones: una base heterocíclica nitrogenada, un azúcar y un éster fosfato. Las bases heterocíclicas nitrogenadas están unidas al azúcar y reciben el nombre de nucleósidos (Figura 1.1)

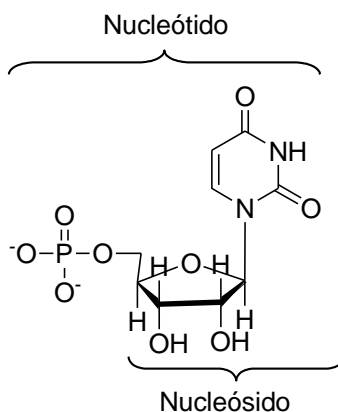
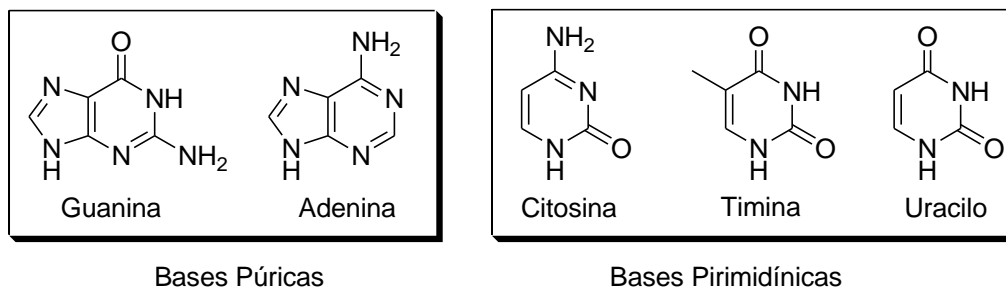


Figura 1.1

Las bases heterocíclicas nitrogenadas pueden clasificarse en bases púricas: es el caso de guanina y adenina, y pirimidínicas: citosina, timina y uracilo (Figura 1.2).



**Figura 1.2**

Uno de los métodos más empleados actualmente en la búsqueda de nuevos fármacos es el diseño de antimetabolitos,<sup>29</sup> es decir, el diseño de moléculas que poseen cierta semejanza estructural con el sustrato natural del que proceden, si bien presentan simultáneamente alguna modificación que les permite interferir en el metabolismo normal del metabolito celular.

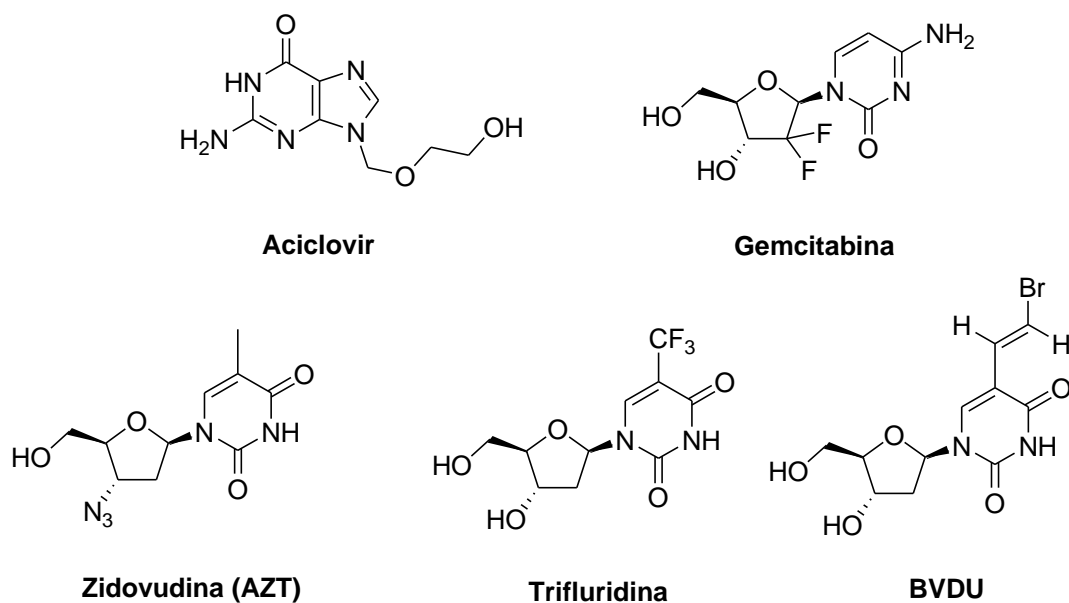
Ejemplo de análogos de nucleósidos con actividad antivírica y presentes en el mercado son fármacos de la talla de Aciclovir<sup>30</sup> y BVDU,<sup>31</sup> potentes inhibidores selectivos de la ADN polimerasa vírica, activos frente a Herpes simplex y Varicela-Zoster. Zidovudina (AZT),<sup>32</sup> fue el primer agente antivírico clínicamente eficaz en la infección por VIH en tanto que Trifluridina, derivado fluorado del anterior es activo frente a infecciones de Herpes simplex.<sup>9a</sup> Un último ejemplo es la Gemcitabina,<sup>9a</sup> análogo fluorado de la Zidovudina (AZT), con actividad anticancerígena (Figura 1.3).

<sup>29</sup> (a) *Nucleosides and Nucleotides as Antitumor and Antiviral Agents*; Chu, C. K., Baker, D. C., Eds. Plenum Press: New York, 1993. (b) *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*; Blackburn, G. M.; Gait, M. J., Oxford University Press: New York, 1990.

<sup>30</sup> Gao, H.; Mitra, A. K., *Synthesis*, **2000**, 329-351.

<sup>31</sup> De Clercq, E. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2301-2315.

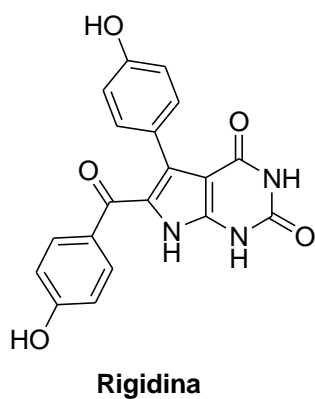
<sup>32</sup> Meadows, D. C.; Gervay-Hague, J. *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 16-29.



**Figura 1.3**

### 1.1.1 Uracilos

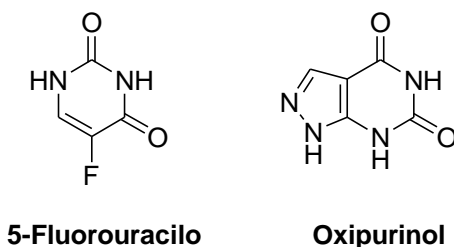
Entre los análogos de bases nitrogenadas, el estudio de los derivados de uracilo ha merecido una atención especial. Estos compuestos no sólo están presentes en los ácidos nucleicos, también forman parte de productos naturales como el alcaloide marino rigidina (Figura 1.4).<sup>33</sup>



**Figura 1.4**

<sup>33</sup> Boudet, N.; Knochel, P. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3737-3740.

El ejemplo más conocido de antimetabolito de un uracilo es el 5-fluorouracilo (5-FU). Descrito en 1957 por *Heidelberger y col.*,<sup>34</sup> el compuesto es inhibidor del enzima timidilato sintasa y ha demostrado poseer una gran actividad anticancerígena (Figura 1.6).<sup>35</sup> Otro ejemplo es el Oxipurinol,<sup>36</sup> inhibidor de la xantina oxidasa y metabolito activo del fármaco Alopurinol, utilizado en el tratamiento de gota e hiperuricemia. Este metabolito ha sido sintetizado y se comercializa como tal para casos de intolerancia frente a Alopurinol. Además, está en fase III de investigación para el tratamiento de determinadas cardiopatías (Figura 1.5).



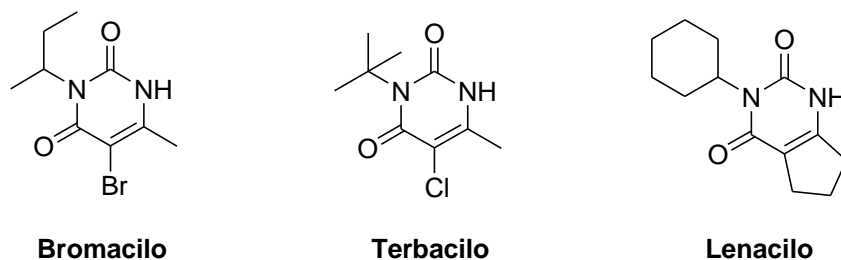
**Figura 1.5**

Como vimos en la introducción general, hay también toda una serie de derivados de uracilo con actividad fitosanitaria. Son derivados sustituidos tanto en posición 5 (habitualmente un halógeno) como en posición 6 (metilo u otros). Los ejemplos más representativos de esta serie son Bromafilo, Terbacilo y Lenacilo (Figura 1.6).

<sup>34</sup> Heidelberger, C.; Chaudhuri, N. K.; Danneberg, P.; Mooren, D.; Griesbach, L.; Duchinsky, R.; Schnitzer, R. J.; Plevin, E.; Schneider, J. *Nature*, **1957**, 179, 663.

<sup>35</sup> (a) Marlet-Martino, M.; Jolimaitre, P.; Martino R. *Curr. Med. Chem. –Anti-Cancer Agents*, **2002**, 2, 267-310. (b) Cai, T. B., Tang X., Nagorski J., Brauschweiger P. G., Wang, P. G. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 4971-4975.

<sup>36</sup> Nagamatsu, T.; Fujita, T.; Endo, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2000**, 1, 33.



**Figura 1.6**

Bromacilo es un herbicida total de pre y postemergencia de la maleza con una solubilidad en agua de 815 ppm utilizado en cítricos y áreas no agrícolas. Terbacilo, por su parte, tiene un espectro de acción más grande que incluye caña de azúcar, cítricos, menta, árboles frutales y esterilizante de zonas no agrícolas, con una solubilidad en agua algo menor: 710 ppm. Bromacilo y Terbacilo tienen una vida media aproximada de 5 a 6 meses.

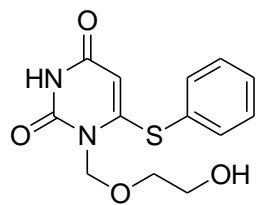
Lenacilo, al igual que Terbacilo es un herbicida de preemergencia del cultivo y la maleza, con la particular característica de ser más específico, utilizándose en cultivo de remolacha, acelga y espinaca.

Todos ellos actúan de forma similar a los herbicidas de tipo urea. Son absorbidos fácilmente por las raíces y translocados vía apoplasto hacia las hojas donde bloquean la fotosíntesis por medio de la reacción de Hill. Producen clorosis y necrosis de hojas.

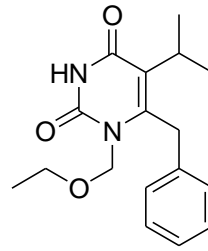
Otro grupo amplio de derivados de uracilo con actividad biológica de interés son los derivados de uracilo con sustituyentes en C6 no fluorados, como HEPT y Emivirina, pertenecen al grupo de fármacos no nucleosídicos inhibidores del retrovirus VIH (NNRTIs). Otros ejemplos muestran propiedades antivíricas frente a la familia del virus de la gripe,<sup>37</sup> entre otros (Figura 1.7).

---

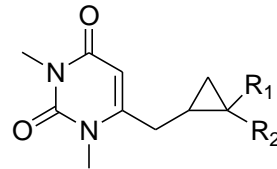
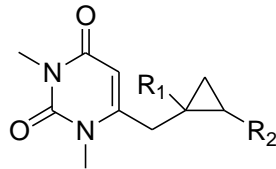
<sup>37</sup> Saladino, R.; Crestini, C.; Palamara, A. T.; Dante, M. C.; Manetti, F.; Corelli, F.; Garaci, E.; Botta, M. J. *Med. Chem.* **2001**, *44*, 4554-62



**HEPT**



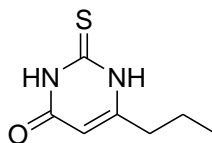
**Emivirina**



Antivíricos activos frente al virus parainfluenza

**Figura 1.7**

También encontramos derivados de tiouracilo comercializados, un ejemplo es Propiltiouracilo (Figura 1.8) un fármaco que inhibe la síntesis de las hormonas tiroideas interactuando con las peroxidasa del tiroides.



**Propiltiouracilo**

**Figura 1.8**

### 1.1.2 Pirimidinonas

Las pirimidinonas son compuestos estrechamente relacionados estructuralmente con los uracilos (Figura 1.9). El rango de actividad biológica de estos productos es también bastante amplio.





**Figura 1.9**

El esqueleto de 2-pirimidinona se encuentra presente en diversas moléculas biológicamente activas, incluyendo ADN y ARN.<sup>38</sup> Por tanto, también a estos compuestos podemos considerarlos antimetabolitos de las bases pirimidínicas de los ácidos nucleicos. Esta similitud estructural hace de las pirimidinonas un buen objeto de estudio ya que a) poseen interesantes propiedades biológicas, lo que las hace eficaces frente a determinadas enfermedades víricas<sup>39</sup> y a diferentes tipos de cáncer<sup>40</sup> y b) pueden ser empleadas en el estudio de mutaciones de ADN, causadas por lesiones de diferentes tipos, con el objeto de profundizar en el conocimiento de los mecanismos genéticos y de estudiar posibles soluciones a enfermedades relacionadas con la replicación de ADN.<sup>41</sup>

Ejemplos de fármacos con una estructura básica de 2-pirimidinona son el Cidofovir, un análogo nucleótido de la desoxicitosina monofosfato, que presenta una actividad diez veces superior a la de Ganciclovir y posee un espectro antivírico

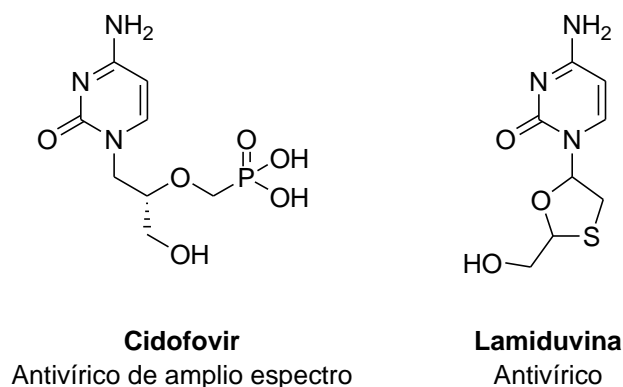
<sup>38</sup> (a) Khorana, H.G. *Chemical Biology*; World Scientific: London, 2000; Vol. 5, 31-41. (b) Seager, S. L.; Slabuh, M. R. *Chemistry for Today: General Organic and Biochemistry*, 4<sup>th</sup> ed.; Brooks/Cole: UK, 2000, 649-681. (c) Jezewski, A.; Jurczak, J.; Lidert, Z.; Tice, C. M. *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, *38*, 645. (d) Basavaiah, D.; Satyanarayana, T. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4301-4303.

<sup>39</sup> Saladino, R.; Ciambecchini, U.; Maga, G.; Mastromarino, P.; Conti, C.; Botta, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1925-1931.

<sup>40</sup> (a) Heidelberg, *Pyrimidine and Pyrimidine Antimetabolites in Cancer Medicine*; Holland, J. F.; Frei, E. Eds.; Lea and Febiger: Philadelphia, **1984**, 801. (b) Stevens, M. F. G.; Schawalbe, C. H.; Patel, N.; Gate, E. N.; Bryant, P. K. *Anti-Cancer Drug Des.* **1995**, *10*, 203. (c) Gangjee, A.; Vasudevam, A.; Queener, S.; Kisliuk, R. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1438-1446.

<sup>41</sup> (a) Veaute, X.; Mari-Giglia, G.; Lawrence, C. W.; Sarasin, A. *Mutat. Res.* **2000**, *459*, 19-28. (b) Asahina, H.; Han, Z.-B.; Kawanishi, M.; Kato, T.; Ayaki, H.; Todo, T.; Yagi, T.; Takebe, H.; Ikenaga, M.; Kimura, S. H. *Mutat. Res.* **1999**, *435*, 255-262.

bastante amplio (figura 1.10) y la Lamiduvina, un enantiómero sintético análogo de la didesoxicitidina activo frente al VIH-1, VIH-2 y al virus de la Hepatitis B.



**Figura 1.10**

La actividad farmacológica de los derivados de 2-pirimidinona incluye también la de inhibidores enzimáticos,<sup>42</sup> moduladores de canales de calcio,<sup>43</sup> agentes antihipertensivos,<sup>25</sup> antagonistas  $\alpha_{1a}$ -adrenérgicos,<sup>25</sup> moduladores de la respuesta inmunológica<sup>44</sup> y agentes para el tratamiento de la esclerosis múltiple,<sup>26</sup> entre otras.

Además, resultan también de utilidad en el campo de la agroquímica ya que son activos como herbicidas.<sup>45</sup>

<sup>42</sup> (a) Blackie, J. A.; Bloomer, J. C.; Brown, M. J. B.; Cheng, H.-Y.; Elliot, R. L.; Hammond, B.; Hickey, D. M. B.; Ife, R. J.; Leach, C. A.; Lewis, V. A.; Macphee, C. H.; Milliner, K. J.; Moores, K. E.; Pinto, I. L.; Smith, S. A.; Stansfield, I. G.; Stanway, S. J.; Taylor, M. A.; Theobald, C. J.; Whittaker, C. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2603-2606. (b) Boyd, H. F.; Fell, C. M.; Hickey, D. M. B.; Ife, R. J.; Leach, C. A.; Macphee, C. H.; Milliner, K. J.; Pinto, I. L.; Rawlings, D. A.; Smith, S. A.; Stansfield, I. G.; Stanway, S. J.; Theobald, C. J.; Whittaker, C. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 51-55.

<sup>43</sup> (a) Uray, G.; Verdino, P.; Belaj, F.; Kappe, C. O.; Fabian, W. M. F. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6685-6694 (b) Kumar, K. A.; Kasthuraiah, M.; Reddy, C. S.; Reddy, C. D. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7873-7875. (c) Kappe, C. O. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 1043-1052. (d) Kappe, C. O. *QSAR Comb. Sci.* **2003**, 22, 630-645. (e) Yadav, L. D. S.; Awasthi, Ch.; Rai, V. K.; Rai, A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 4899.

<sup>44</sup> Hannah, D. R.; Sherer, E. C.; Davies, R. V.; Titman, R. B.; Laughton, C. A.; Stevens, M. F. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 10, 2557-2561.

<sup>45</sup> Tice, C. M.; Bryman, L. M. *Tetrahedron* **2001**, 57, 2689-2700.

Los derivados de 4-pirimidinona son objeto de gran interés por la actividad biológica que presentan, especialmente por sus propiedades antivíricas. Son activos contra el VIH y han dado lugar a un gran número de patentes.<sup>46</sup>

---

<sup>46</sup> (a) Crescenzi, B.; Kinzel, O.; Muraglia, E.; Orvieto, F.; Pescatore, G.; Rowley, M.; Summa, V. (Istituto Di Ricerche Di Biología Molecolare P. Angeletti Spa, Italy) WO2004058756, 2004. (b) Mikamiyama, H.; Iwata, M.; Taoda, Y. (Shionogi&Co., Ltd., Japan) WO200561490, 2005. (c) Naidu, B. N.; Banville, J.; Beaulieu, F.; Connolly, T. P.; Krystal, M. R.; Matiskella, J. D.; Ouellet, C.; Plamondon, S.; Remillard, R.; Sorenson, M. E.; Ueda, Y.; Walter, M. A. (Bristol-Myers Squibb Company, USA) WO2005118593, 2005 (d) Naidu, B. N.; Sorenson, M. E.; Ueda, Y.; Matiskella, J. D.; Walker, M. A.; (Bristol-Myers Squibb Company, USA) Wo2007059229, 2007. (e) Belyk, K. M.; Morrison, H. G.; Jones P.; Summa, V.; (Merck&Co. Inc., USA; Eletti SPA Istituto Di Ricerche Di Biologia Molecolare P. Ang) WO2006060712, 2006.

## 1.2. Antecedentes y Objetivos

### 1.2.1. Antecedentes

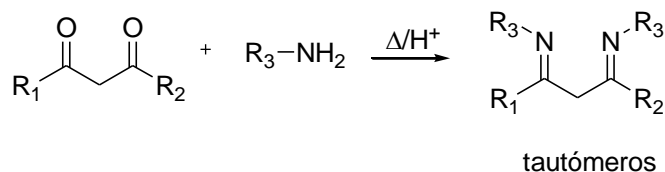
Tanto los uracilos como las pirimidonas han despertado gran interés en el campo de la síntesis química. A continuación haremos un breve resumen de los procedimientos de síntesis más habituales que han venido desarrollándose en años precedentes.

#### a. Amidinas vinílogas

Las 1,3-amidinas vinílogas son sintones de gran versatilidad para la obtención de una amplia gama de sistemas orgánicos,<sup>47</sup> incluyendo compuestos acíclicos y heterocíclicos, muchos de los cuales de potencial interés tanto farmacológico, agroquímico, etc.

En la literatura científica se recogen diversas estrategias de síntesis de estos intermedios. Los métodos más representativos son: i) condensación de aminas con compuestos 1,3-dicarbonílicos, ii) adición de enolatos de imina (azaenolatos) a haluros de imidoilo, iii) adición de enolatos de iminas (azaenolatos) a nitrilos y iv) adición de enolatos de oxa(tia)zolona a nitrilos.

i) Condensación de aminas con compuestos 1,3-dicarbonílicos<sup>48</sup> (Esquema 1.1).

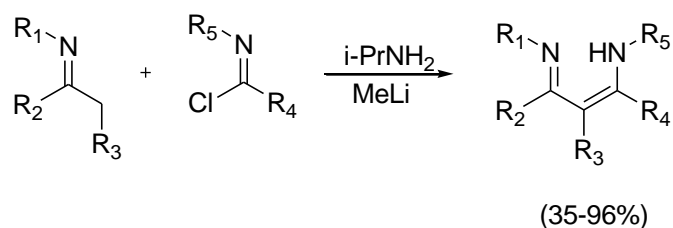


**Esquema 1.1**

<sup>47</sup> Barluenga, J.; Tomás, M. *Adv. Het. Chem.* **1993**, 57, 1.

<sup>48</sup> (a) Knorr, R.; Weiss, A. *Chem. Ver.* **1981**, 114, 2104. (b) Armesto, D.; Bosch, P.; Gallego, M. P.; Martín, J. F.; Ortíz, M. J.; Pérez Osorio, R.; Ramos, A. *Org. Prep. Proced. Int.* **1987**, 19, 181-186.

ii) Adición de enolatos de imina (azaenolatos) a haluros de imidoilo<sup>49</sup>  
(Esquema 1.2).

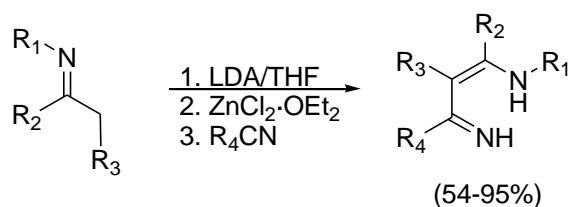


**Esquema 1.2**

El proceso transcurre con rendimientos variables (35-96%) y presenta dos inconvenientes: parece estar limitado a iminas y cloruros de imidoilo N-arilsustituídos y en muchos casos, se observan también reacciones secundarias de poliacilación.

iii) Adición de enolatos de iminas (azaenolatos) a nitrilos.<sup>50</sup>

En 1970, *Horberg y Barluenga* desarrollaron un método de síntesis de 1,3-diiminas mediante adición de nitrilos a iminas en presencia de tricloruro de aluminio, que actúa como ácido de Lewis, catalizando la reacción con rendimientos variables. El proceso fue mejorado años más tarde mediante la adición de enolatos de zinc de iminas a nitrilos (Esquema 1.3).<sup>51</sup>



**Esquema 1.3**

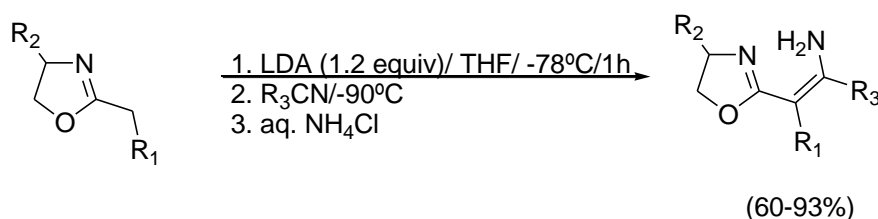
<sup>49</sup> Fustero, S.; García de la Torre, M.; Pina, B.; Simón Fuentes, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5551-5556.

<sup>50</sup> (a) Hoberg, H.; Barluenga, J. *Synthesis* **1970**, 142-144. (b) Wittig G., *Liebigh Ann. Chem.* **1973**, 1075.

<sup>51</sup> Barluenga, J.; del Pozo Losada, C.; Olano, B. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5497-5498.

iv) Adición de enolatos de oxa(tia)zolina a nitrilos (Esquema 1.4).<sup>52</sup>

Desarrollada en nuestro grupo de investigación y ampliamente estudiada, esta vía sintética guarda cierta similitud con la anterior y ha resultado ser válida tanto para compuestos fluorados como no fluorados. Transcurre con buenos rendimientos (60-93%).



**Esquema 1.4**

## b. Pirimidinonas

En general, dos son los métodos de síntesis de 2-pirimidinonas en función del sustrato de partida. El primero, (i), utiliza como precursores compuestos 1,3-dicarbonílicos que se ciclan con urea o alguno de sus derivados. El segundo, (ii), consiste en la condensación de 1,3-diiminas con un derivado del ácido carbónico.

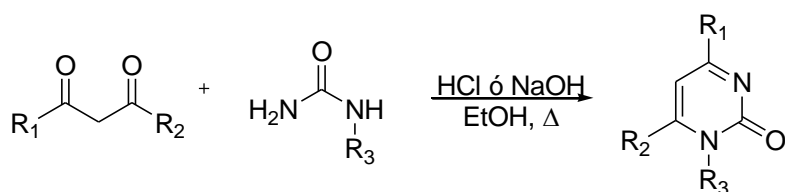
i) Condensación de derivados de urea con compuestos 1,3-dicarbonílicos.

La reacción se suele catalizar en medio ácido o básico a reflujo.<sup>53</sup> Las características más significativas son, por una parte, la simetría de la molécula

<sup>52</sup> Fustero, S.; Salavert, E.; Sanz-Cervera, J. F.; Piera, J.; Asensio, A. *Chem. Commun.* **2003**, 844-845.

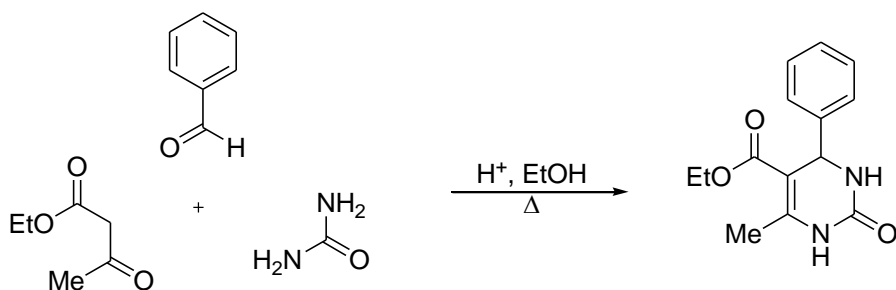
<sup>53</sup> Brown, D. J. (1970). En *The pyrimidines (The chemistry of heterocyclic compounds)* Ed. A. Weissburger and E. C. Taylor; Vol. 16, Supplements 1 and 2. Wiley Interscience, New York.

resultante cuando se utiliza urea y por otra, los problemas de regioselectividad cuando se usan sus derivados no simétricamente sustituidos (Esquema 1.5).



**Esquema 1.5**

Un ejemplo de esta vía es la reacción multicomponente de Biginelli<sup>54</sup> (Esquema 1.6). Esta reacción y sus modificaciones han recibido una atención muy especial en las últimas décadas.<sup>55</sup>



Síntesis original de Biginelli (1893)

**Esquema 1.6**

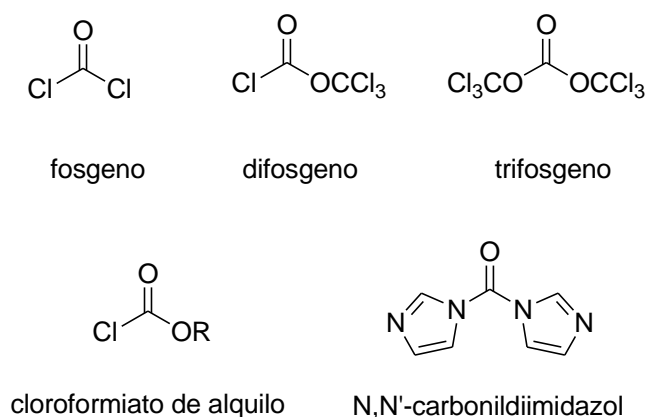
ii) Condensación de 1,3-diiminas con derivados de ácido carbónico.

Los derivados de ácido carbónico se emplean en la síntesis de un gran número de compuestos orgánicos. Entre ellos, son de especial relevancia el

<sup>54</sup> Biginelli, P. *Gazz. Chim. Ital.* **1893**, 23, 360-413.

<sup>55</sup> (a) Kappe, C. O. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 1043-1052. (b) Kumar, K. A.; Kasthuraia, M.; Reddy, C. S.; Reddy, C. D. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7873-7875. (c) Kappe, C. O. *QSAR Comb. Sci.* **2003**, 22, 630-645. (d) Singh, K.; Arora, D.; Singh, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1349-1352.

fosgeno y sus derivados: difosgeno, trifosgeno (BTC), cloroformatos de alquilo y N,N'-carbonildiimidazol (Figura 1.11).



**Figura 1.11**

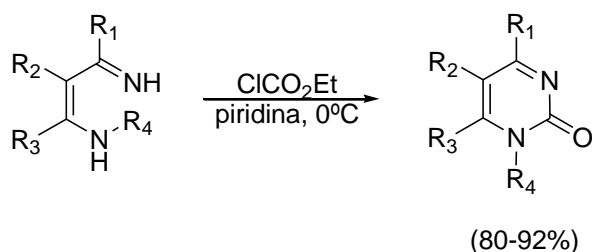
El carbono carbonílico de estos compuestos posee una elevada electrofilia, lo que le confiere una gran reactividad frente a un buen número de nucleófilos.

Hace algunos años, el reactivo relacionado con el ácido carbónico más empleado era el fosgeno, compuesto gaseoso y de elevada toxicidad, lo que dificultaba en gran medida su utilización. El difosgeno, líquido y menos peligroso que el fosgeno, seguía presentando riesgos de toxicidad, transporte y almacenaje. Hoy día, el derivado de ácido carbónico más empleado es el trifosgeno o carbonato de bistriclorometilo (BTC),<sup>56</sup> sólido blanco, estable, de aspecto cristalino, de reactividad similar a la de fosgeno y con la ventaja de poder ser manipulado sin peligro.

<sup>56</sup> (a) Paquette, L. A. *Enciclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, Wiley & Sons Ed. **1995**, Vol 1, 575. (b) Eckert, H.; Foster, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1987**, 26, 894-895. (c) Cotarca, L.; Delogu, P.; Nardelli, A.; Sunjic, V. *Synthesis*, **1996**, 553-576. (d) Álvarez, C.; Peláez, R.; Medarde, M. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 2132-2141. (e) Kapeller, D.; Barth, R.; Mereiter, K.; Hammerschmidt, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 914-923.

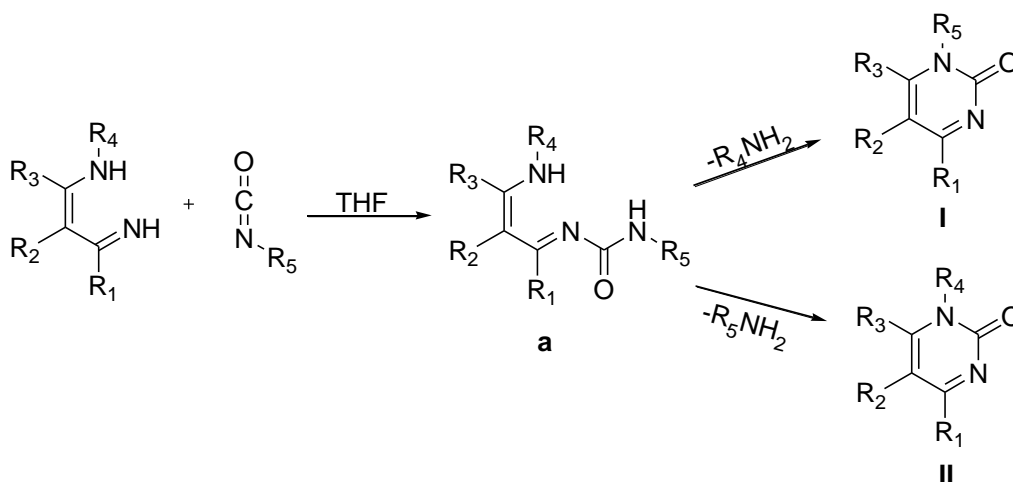


A Barluenga y col.<sup>57</sup> debemos el primer ejemplo de obtención de 2-pirimidinonas con un derivado del ácido carbónico (Esquema 1.7). Las obtenían de forma regioselectiva, con buenos rendimientos, a partir de 1,3-diiminas y cloroformiato de etilo.



**Esquema 1.7**

Estos autores<sup>58</sup> también estudiaron la reacción de 1,3-diiminas con isocianatos. El proceso transcurre a través de un intermedio acíclico **a**, que dará lugar a una mezcla de 2-pirimidonas **I** y **II**, cuya proporción variará en función de la naturaleza de los sustituyentes (Esquema 1.8).

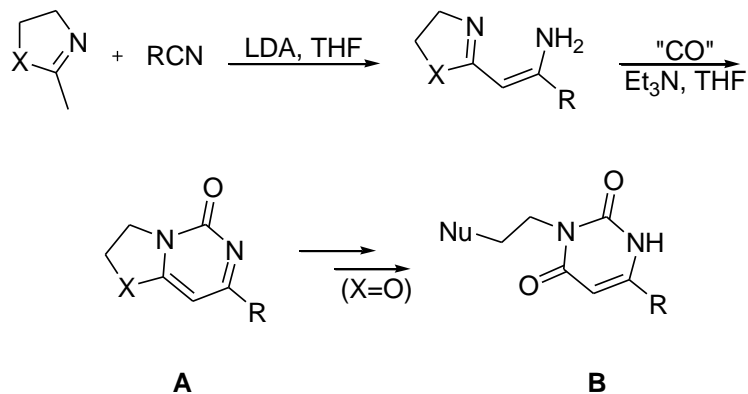


**Esquema 1.8**

<sup>57</sup> (a) Barluenga, J.; Tomás, M.; Rubio, V.; Gotor, V. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 675-676. (b) Barluenga, J.; Tomás, M.; López-Ortiz, J. F.; Gotor, V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, 2273-2276.

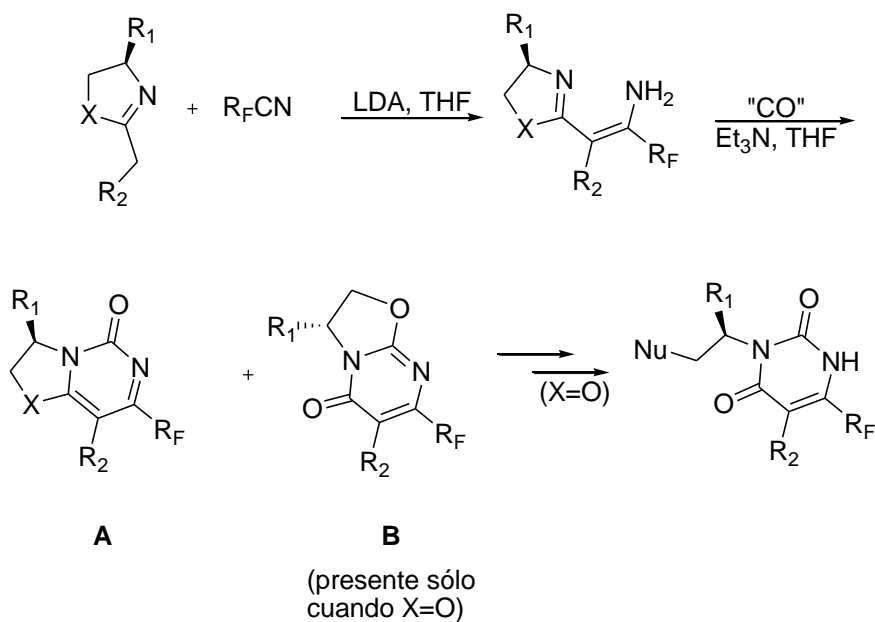
<sup>58</sup> Barluenga, J.; Rubio, V.; Gotor, V.; *J. Org. Chem.* **1980**, 2592-2596.

En nuestro grupo de investigación se han obtenido 2-pirimidinonas (2-oxa(tia)zolopirimidinonas) no fluoradas<sup>26</sup> como paso intermedio en la síntesis de derivados de uracilo no fluorados (Esquema 1.9).



**Esquema 1.9**

Una metodología similar con derivados fluorados permitió obtener 2-pirimidinonas y 4-pirimidinonas fluoradas (Esquema 1.10), concretamente oxa(tia)zolopirimidinonas fluoradas.<sup>28</sup>



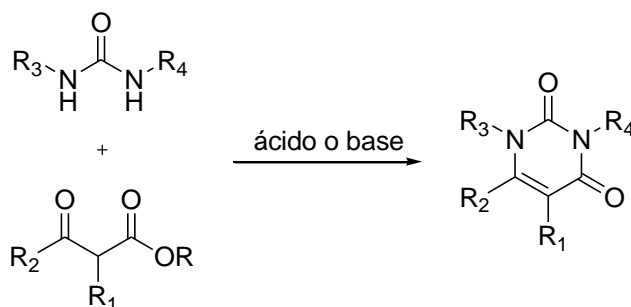
**Esquema 1.10**

El proceso consiste en la reacción entre diversas oxa(tia)zolinias y nitrilos fluorados para dar lugar a  $\beta$ -enaminooxa(tia)zolinias que, a su vez, reaccionan con diferentes derivados de ácido carbónico originando oxa(tia)zolopirimidinonas (**A** y **B**). Estos sistemas pueden transformarse en uracilos (X=O) por tratamiento con diversos nucleófilos.

### c. Uracilos

Los derivados de uracilo son sistemas de gran interés sintético debido a la actividad biológica que muchos de ellos presentan. Sin embargo, existen pocos procedimientos para su obtención, ya sea total a partir de derivados acíclicos o parcial, por modificación de otros uracilos.

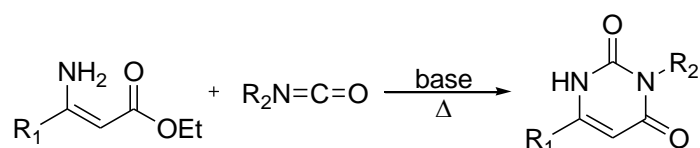
Para la síntesis total a partir de derivados acíclicos, el método clásico (Esquema 1.11) implica la síntesis directa a partir de  $\beta$ -cetoésteres y derivados de urea.<sup>59</sup> Su principal limitación está relacionada con la estructura del éster de partida, ya que da buenos resultados con acetoacetato de etilo pero no con otros ésteres.



**Esquema 1.11**

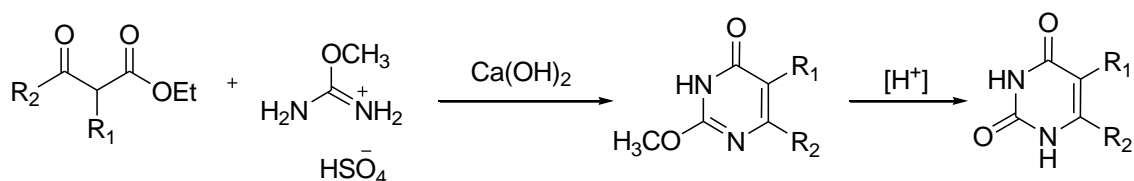
<sup>59</sup> (a) Donleavy, J and Kise, M. *Org. Synth. Coll. Vol. II*, 422, 1943. (b) Senda, S.; Suzui, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1958**, 6, 479.

En 1970 *Lutz et al.*<sup>60</sup> desarrollaron un procedimiento (Esquema 1.12) que se halla bajo patente y que guarda relación con una de las vías sintéticas puestas a punto por nuestro grupo de investigación para la síntesis de uracilos fluorados. El método proporciona los uracilos correspondientes a través de intermedios de tipo urea, que se ciclan directamente para dar las pirimidindionas finales. La ventaja del método radica en su generalidad, ya que no depende de las estructuras del  $\beta$ -enaminoéster ni del isocianato.



**Esquema 1.12**

En la siguiente década (1984), *Botta y col.*<sup>61</sup> aportan una nueva vía sintética que consiste en la reacción entre  $\beta$ -cetoésteres y O-metilisourea, generada *in situ* (Esquema 1.13). Obtenían así 2-metoxipirimidinonas que, tras hidrólisis en medio ácido, conducían a los derivados de uracilo C6 o C6,C5-alkilados con rendimientos aceptables (60-79%).

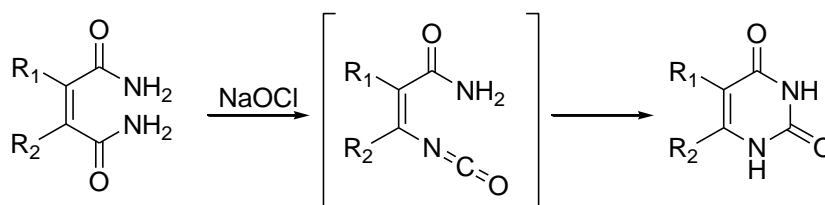


**Esquema 1.13**

<sup>60</sup> Lutz, A. W.; Walworth, B. L.; Feeny, R. W. (American Cyanamid Co.) Ger. Offen. 1970, 54.

<sup>61</sup> Botta, M.; Cavalieri, M.; Ceci, D.; De Angelis, F.; Finzia, G.; Nicoletti, R. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3313-3320.

Otra vía descrita para la obtención de uracilos 5,6-disustituidos parte de derivados 2,3-disustituidos de dimaleimida.<sup>62</sup> El proceso consiste en una degradación de Hofmann en la que el isocianato intermedio se cicla, proporcionando la pirimidindiona buscada (Esquema 1.14).



**Esquema 1.14**

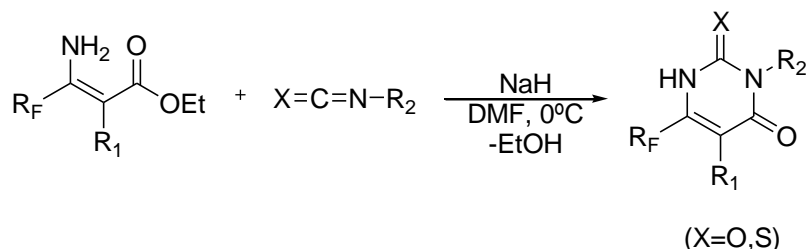
Paralelamente, sabedores de las particulares características del Flúor y de las modificaciones que este elemento es capaz de generar en moléculas biológicamente activas, asistimos en la literatura científica a una búsqueda de nuevas metodologías sintéticas con el objeto de obtener derivados de uracilo fluorados.<sup>63</sup> Desde 1997 muchos de los ejemplos descritos aparecen protegidos por patentes.<sup>31</sup>

Nuestro grupo de investigación también ha participado en esta búsqueda, contribuyendo con dos vías sintéticas diferentes y que permiten obtener una amplia gama de derivados de uracilo fluorados. La primera, descrita más arriba (ver esquema 1.10), tiene como paso clave la reacción de  $\beta$ -enamino-oxa(tia)zolininas fluoradas con diferentes derivados de ácido carbónico para dar 2 y 4-oxazolopirimidinonas. La apertura del anillo de oxazol de estos compuestos por determinados nucleófilos conduce a la obtención de derivados de uracilo fluorado N3-etilados.<sup>28</sup> La segunda de las vías diseñadas permite obtener uracilos fluorados

<sup>62</sup> Boulton, A. J. en *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*. Eds. Pergamon, vol 6, pág. 195.

<sup>63</sup> (a) Lutz, A. W.; Trotto, S. H. *J. Heterocyclic Chem.* **1972**, 9, 513-522. (b) Ishihara, T. ; Yamasaki, Y; Ando, T. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2879-2880. (c) Timoshenko, V. M.; Nikolin, Y. V.; Chernega, A. N. Shermolovich, Y. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 10, 1619-1627.

a partir de derivados de  $\beta$ -enaminoéster e isocianato (esquema 1.15).<sup>64</sup> Estos estudios se han visto ampliados tanto por la síntesis de uracilos fluorados en fase sólida,<sup>45</sup> como por la síntesis fluorosa de los mismos.<sup>65</sup>



**Esquema 1.15**

### 1. 2. 2. Objetivos

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha desarrollado una metodología que permite la síntesis de derivados de uracilo y de pirimidinona. Inicialmente esta metodología fue desarrollada por la doctora Dolores Díaz y aplicada a compuestos no fluorados.<sup>21</sup> En ella, una  $\beta$ -enaminooxa(tia)zolona reaccionaba con diferentes derivados de ácido carbónico para dar 2-oxa(tia)zolopirimidinonas. A continuación, la apertura del anillo de oxazol por determinados nucleófilos permitía la obtención de derivados de uracilo N3-etilados.

Años después la doctora Esther Salavert aplicaba la metodología a compuestos fluorados.<sup>22</sup> De nuevo, una  $\beta$ -enaminooxa(tia)zolona (fluorada) reaccionaba con diferentes derivados de ácido carbónico, pero ahora el resultado era distinto: en el caso de las oxazolopirimidinonas se obtenía una mezcla de 2 y 4-oxazolopirimidinonas fluoradas.

A la luz de estos precedentes, en este primer capítulo nos proponemos:

<sup>64</sup> Fustero, S.; Piera, J.; Sanz-Cervera J. F.; Catalán S.; Ramírez de Arellano, C. *Organic Letters*, **2004**, 6, 9, 1417-1420.

<sup>65</sup> Fustero, S.; Catalán, S.; Flores, S.; Jiménez, D.; del Pozo, C.; Aceña, J. L.; Sanz-Cervera, J. F.; Mérida, S. *QSAR Comb. Sci.* **2006**, 25, 8, 753-760.

1. Revisar la metodología para compuestos no fluorados con el objeto de sintetizar, aislar y caracterizar los derivados de 4-oxazolopirimidinona no obtenidos anteriormente.

2. Esta revisión, a su vez, nos permitirá profundizar en el conocimiento de la reacción (clave) de condensación de una  $\beta$ -enaminoxazolina con un derivado del ácido carbónico. En concreto, gracias al estudio pormenorizado de esta reacción podremos obtener nuevos derivados de uracilo no fluorados N3-cloroetilados. Además, determinadas modificaciones nos permitirán controlar el resultado de la reacción, obteniendo unos u otros productos, según deseemos.

3. Aumentar la versatilidad sintética de la metodología. Para ello nos proponemos conectar sintéticamente los diversos productos obtenidos: se iniciará el estudio de la reactividad de los nuevos derivados de uracilo N3-cloroetilados. De ellos podremos obtener de nuevo, tanto los derivados de 2 y 4-oxazolopirimidinona, como nuevos derivados de uracilo N3-etilados.

4. Obtener una buena batería de derivados de uracilo no fluorados para un posterior estudio de actividad biológica (capítulo 3).

### 1.3. Discusión de resultados

Este capítulo recoge los resultados del trabajo realizado: nuevos estudios, reacciones y productos; así como las dificultades y problemas que se han encontrado, todo referido a la obtención de derivados de uracilo y pirimidinona no fluorados, compuestos que, como queda dicho, tienen gran utilidad por las diversas e interesantes actividades biológicas que manifiestan.

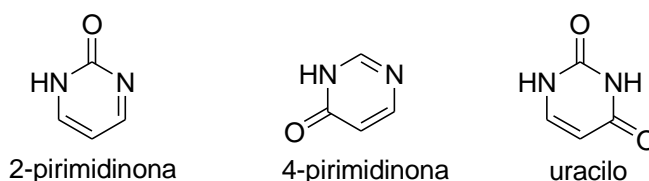
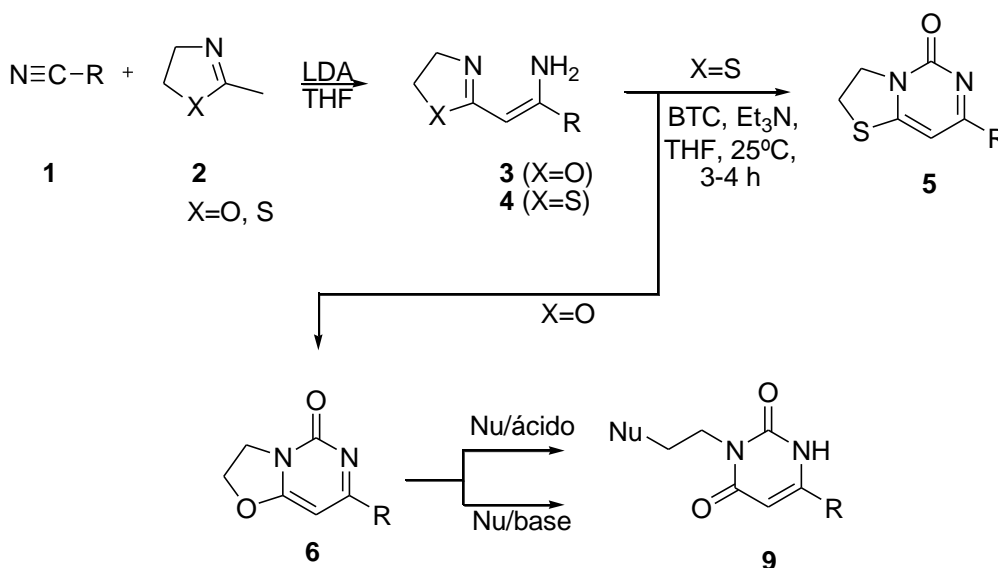


Figura 1.12

Estudios previos de nuestro grupo de investigación<sup>27</sup> permitieron el desarrollo de un nuevo método sintético para la obtención de derivados de uracilo y pirimidinona no fluorados, a través -como puede observarse en el siguiente esquema- de la condensación de las amidinas vinílogas **3** y **4** con un derivado del ácido carbónico.



Esquema 1.16

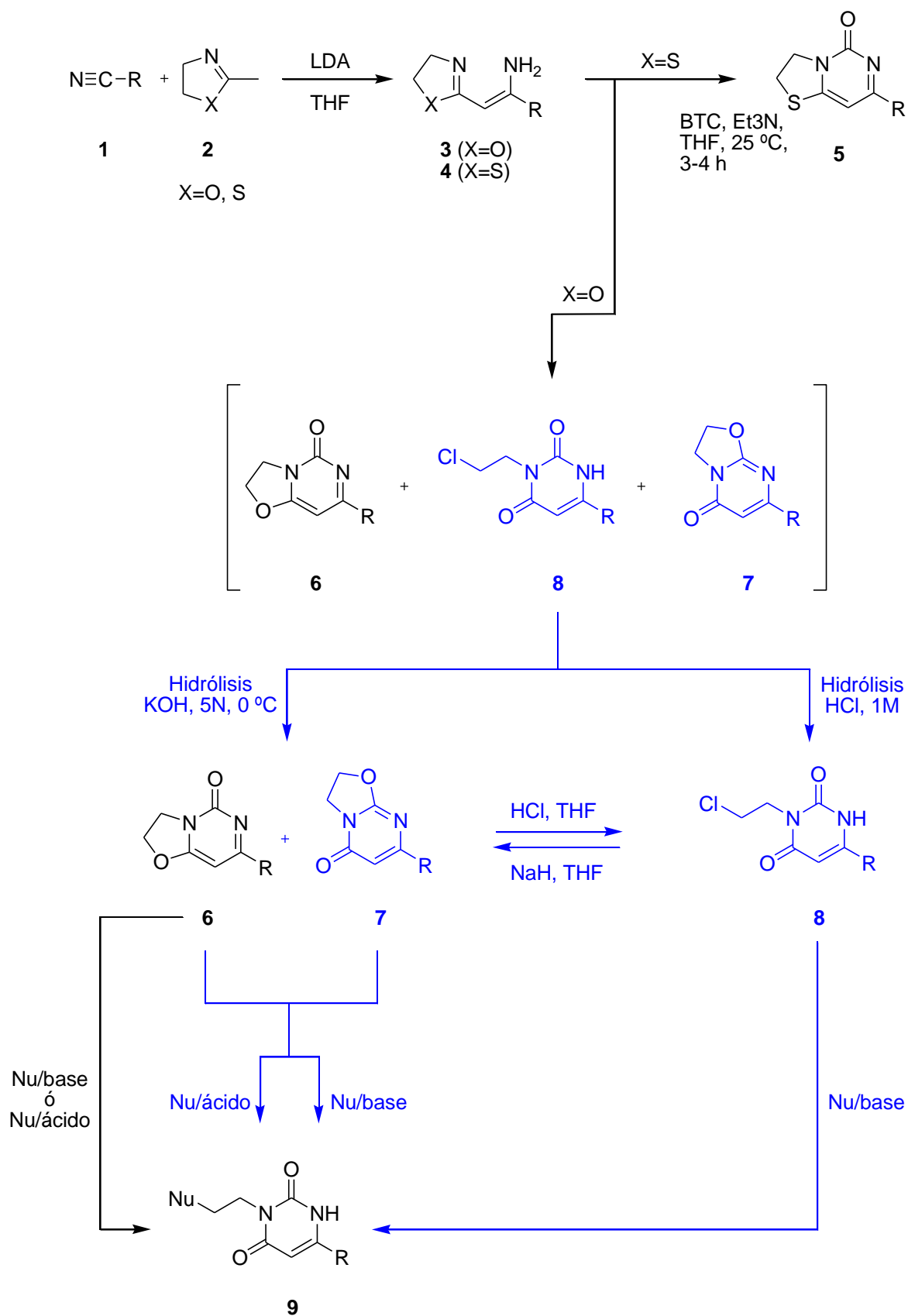


Partiendo de este precedente y debido a los resultados obtenidos cuando la metodología anterior se aplicó en la obtención de derivados fluorados de uracilo y pirimidinona,<sup>28</sup> pareció necesario revisar y ampliar el estudio realizado recogido en el esquema 3.2. En los compuestos fluorados, la reacción de  $\beta$ -enaminoxazolinas con diferentes derivados de ácido carbónico no daba tan sólo las esperadas 2 oxazolopirimidinonas sino que, además, se obtenía un nuevo derivado, isómero del anterior: 4-oxazolopirimidinonas fluoradas. Se trataba pues en primer término de averiguar si esto también sucedía en compuestos no fluorados, profundizar en la comprensión del posible mecanismo de acción y aprovechar para a continuación ampliar la versatilidad sintética de esta metodología.

El esquema 1.17 recoge de forma resumida la aportación del presente trabajo en la dilucidación y ampliación de esta vía sintética. En él, puede observarse en negro, lo que nuestro grupo de investigación había desarrollado anteriormente y en azul, los nuevos estudios realizados. Además, como se verá en el segundo capítulo de la tesis, desarrollamos una nueva reacción que nos permite introducir un átomo de flúor en cualquiera de los compuestos 6, 7 y 8, obteniendo derivados 9 N3-fluoroetilados.

El procedimiento comprende tres etapas básicas:

La primera consiste en la reacción de los nitrilos **1** con las iminas **2**, lo que conducirá a las amidinas vinílogas **3** y **4**, cuya condensación –en una segunda etapa- con un derivado clorado del ácido carbónico permitirá obtener, cuando X=S, la 2-tiazolopirimidinona **5** y cuando X=O, dos derivados de pirimidinona y un derivado de uracilo (los productos **6**, **7** y **8**). El control de esta segunda etapa será el punto clave del conjunto de la vía sintética. En una tercera etapa, introduciendo un nucleófilo en cualquiera de los productos obtenidos en la etapa anterior, obtendremos los derivados de uracilo **9**.

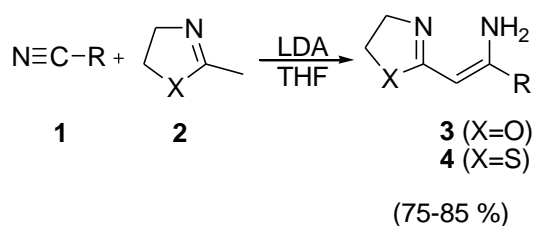


Esquema 1.17

### 1. 3.1 Síntesis de $\beta$ -enaminoxazolinas **3** y $\beta$ -enaminotiazolinas **4**

Sintetizamos estos derivados, de  $\beta$ -enaminoxazolinas **3** y  $\beta$ -enaminotiazolinas **4**, como paso previo a la obtención de las correspondientes oxazolopirimidonas y tiazolopirimidonas, siguiendo el procedimiento ya desarrollado anteriormente en nuestro laboratorio.<sup>26-28</sup> La reacción va bien, aunque hay que ser cuidadoso con la sequedad de los disolventes, atmósfera de N<sub>2</sub>, etc., ya que de no tomarse estas precauciones los rendimientos disminuyen notablemente. Los rendimientos son buenos (75-85 %) obteniéndose un único tautómero de **3** y **4**, probablemente como consecuencia de la estabilización adicional de posibles enlaces por puente de hidrógeno intramoleculares.

Los reactivos de partida, tanto las metiloxa(tia)zolinas como los diversos nitrilos no fluorados que utilizamos en este trabajo, son comerciales.



**Esquema 1.18**

La imina **2** se trató con 1.5 equiv. de LDA en THF a -50 °C. Tras una hora en agitación se bajó la temperatura a -78 °C y se adicionó lentamente 1.0 equiv. del correspondiente nitrilo **1** (**1a**, R= *p*-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; **1b**, R= C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; **1c**, R= *p*-MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; **1d**, R= tiofenilo) disuelto en THF. Una vez finalizada la reacción (CCF, 2-4 horas), se hidrolizó la mezcla con una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl. El crudo se purificó, obteniéndose 1,3-diiminas **3** y **4** con buenos rendimientos (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1:** Resultados de la síntesis de  $\beta$ -enamino(tia)oxazolinas **3** y **4**.

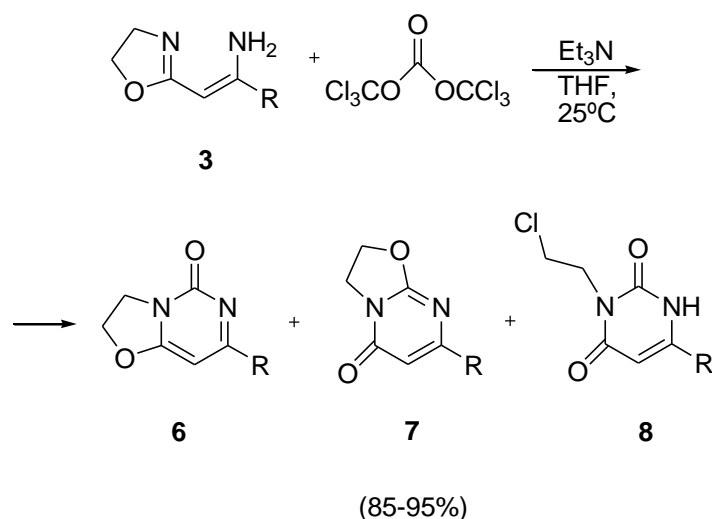
Producto	R	X	Rto (%)
<b>3a</b>	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O	81
<b>3b</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	O	78
<b>3c</b>	<i>p</i> -MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O	85
<b>3d</b>	Tiofenilo	O	80
<b>4a</b>	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S	85
<b>4b</b>	<i>p</i> -MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S	76

### 1.3.2 Síntesis de derivados de oxazolopirimidinonas (**6** y **7**) y de derivados cloroetilados de uracilo (**8**) a partir de $\beta$ -enaminooxazolinas.

El siguiente paso, que permite la obtención directa, bien de derivados N3-cloroetilados de uracilo, bien de una mezcla de 2 y 4 oxazolopirimidinonas, implica la reacción de condensación de las amidinas vinílogas **3** con algún derivado del ácido carbónico. Para ello, se ha elegido trifosgeno por las ventajas que ofrece su manejo y por su elevada reactividad frente a sistemas N,N'-binucleofílicos.

Así, a una disolución del derivado **3** (1,0 equiv.) y Et<sub>3</sub>N (2,0 equiv.) en THF a temperatura ambiente, se adicionó lentamente una disolución de trifosgeno (1,0 equiv.) en THF. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 2-3 horas hasta que se consumió el compuesto de partida (CCF). A continuación se hidroliza con agua destilada, obteniendo una mezcla de de productos (**6**, **7** y **8**).

Esta reacción es el punto clave de la metodología, así, uno de los objetivos principales del trabajo tenía por objeto profundizar en el conocimiento de esta reacción.



**Esquema 1.19**

El seguimiento directo de la reacción por CCF y por  $^1\text{H}$  RMN puso de manifiesto la presencia de una mezcla con tres productos de reacción distintos: **6**, **7** y **8**, observándose una proporción similar de derivados **6** y **8**, en tanto que el derivado **7** se hallaba en pequeña proporción. Este resultado nos animó a continuar estudiando la reacción proponiéndonos controlar la formación los tres compuestos.

#### *Hidrólisis*

Se procedió a estudiar la influencia de los agentes elegidos al hidrolizar la reacción. El seguimiento se hizo tanto por CCF como en  $^1\text{H}$  RMN. En las muestras tomadas observamos cómo desaparece el reactivo de partida a lo largo de la primera hora y media de reacción (CCF). Observamos también cómo difiere la mezcla de productos finales dependiendo de la hidrólisis llevada a cabo. La presencia y proporción de cada derivado es fácil de apreciar en  $^1\text{H}$  RMN, ya que la señal correspondiente al protón vinílico de estos compuestos -tanto la de los anillos de 2 y 4 pirimidinona (**6** y **7**), como la del anillo de uracilo (**8**)- aparece en distintos intervalos de desplazamiento químico ( $\delta$ ) para cada uno de ellos. Así, la

señal del protón vinílico aparece en el intervalo de 5,97-6,04 ppm en el caso de derivados de uracilo **8**, a campo algo más bajo (6,24-6,34 ppm) para las oxazolopirimidinonas **6** y para las oxazolopirimidinonas **7** lo hace a campo aún más bajo (6,42-6,51 ppm). Estos datos vienen avalados por los estudios de difracción de rayos-X realizados en trabajos precedentes.<sup>26-28</sup>

**Tabla 1.2:** Estudio de la hidrólisis de la reacción.

Hidrólisis	6	7	8
Sin hidrolizar*	(30-40)	(5-10)	(50-65)
HCl	---	---	(100)
NaHCO <sub>3</sub>	(10-20)	(5-10)	(70-85)
H <sub>2</sub> O	(10-20)	(5-10)	(70-85)
KOH (frío)	(50-65)	(35-50)	---**
NaOH (frío)***	(50-65)	(35-50)	(0-5)

\* La muestra tomada directamente de la reacción, se concentra hasta sequedad a presión reducida y a continuación se redisuelve en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H RMN).

\*\* En ocasiones aparece algo de producto **8**.

\*\*\* Aparece además un nuevo producto correspondiente al uracilo N3-hidroxiethylado.

Como puede observarse en la tabla, la hidrólisis resulta ser el punto clave de control de la reacción. Así, en un control directo (CCF, <sup>1</sup>H RMN) de la muestra - sin hidrólisis previa- encontramos la presencia de los productos **6** y **8** mayoritariamente en tanto que el **7** tan sólo se insinúa. Sin embargo, al variar las condiciones y agentes hidrolíticos de la reacción, la presencia y proporción de los productos en la misma también varía, así:

a) Hidrolizando la reacción con KOH (5 N) en frío, obtenemos una mezcla de productos con presencia mayoritaria de los productos **6** y **7**. El producto abierto cloroetilado **8** aparece ocasionalmente en proporción variable.

b) Hidrolizada la reacción con HCl (1M) observamos un único producto, el derivado de uracilo cloroetilado **8**.

c) La hidrólisis con H<sub>2</sub>O destilada conlleva la obtención de una mezcla de productos **6** y **8**, siendo el **8** mayoritario, en tanto que el **7** sólo se insinúa.

d) La elección de NaOH (5 N) en frío como agente hidrolítico produce una mezcla más compleja, similar a la obtenida hidrolizando con KOH en frío, en la que además aparece un derivado de uracilo N3-hidroxietilado.

e) Por último, si hidrolizamos la reacción con NaHCO<sub>3</sub> obtenemos una mezcla con los tres productos presentes (**6**, **7** y **8**) siendo mayoritario el **8**.

Por tanto, concluyendo, los resultados obtenidos en este estudio revelaron dos vías hidrolíticas de interés: a) HCl (1M) para la obtención de derivados de uracilo N3-cloroetilados **8** y b) KOH (5N), 0°C, cuando el objetivo sintético sean los isómeros oxazolopirimidínicos **6** y **7**.

#### *Tiempo de reacción*

En cuanto al tiempo de reacción, en CCF se observa cómo el reactivo de partida **3** desaparece a lo largo de la primera hora y media de reacción, obteniéndose los máximos rendimientos a partir de las 3-4 horas. Tiempos de reacción superiores a 3-4h (estudiados hasta 14-16h) no parecen suponer modificación alguna en los rendimientos obtenidos.

#### *Base*

Buscando obtener tan solo los productos **6** y **7**, sin presencia del uracilo N3 cloroetilado **8**; o bien, detener la reacción en la formación de **6**, mediante la neutralización de todo el HCl generado, se probó a aumentar la cantidad de base (3.5, 5 y 10 equiv.). Sin embargo, este incremento en la cantidad de Et<sub>3</sub>N no supuso variación alguna en los resultados. Tampoco la adición de NaH en diversos momentos a lo largo de la reacción modificó los resultados. En este mismo sentido, se adicionó también óxido de propileno en distintos momentos a lo largo de la reacción con el objeto de captar el ácido clorhídrico generado, sin conseguir el efecto deseado. Se obtuvo, por contra, una mezcla de los tres productos de la reacción.

### *Temperatura*

La disminución de la temperatura de reacción (0° C y -30 °C) conlleva que la reacción tarde más en terminar e incluso no termine, observándose reactivo de partida al cabo de 16 horas de reacción. La mezcla de productos finales es la de siempre, más el reactivo de partida.

### *Hidrólisis con HCl 1M*

Como hemos visto, la hidrólisis con HCl (1M) permite obtener un único producto de reacción: el derivado **8**, que alcanza buenos rendimientos (por encima de 80 %).

**Tabla 1.3:** Resultados síntesis de derivados de uracilo cloroetilados **8**.

<b>Producto</b>	<b>R</b>	<b>Rto (%)</b>
<b>8a</b>	p-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	88
<b>8b</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	85
<b>8c</b>	p-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	83
<b>8d</b>	Tiofenilo	91

### *Hidrólisis KOH (5N), en frío (0°C).*

En el caso de los isómeros **6** y **7** también los rendimientos son buenos, ya que rondan el 75-85 %. Sin embargo, un problema importante en esta vía ha sido, hasta el presente, la dificultad para purificar el compuesto **7**, ya que al purificar el crudo de reacción por cromatografía flash en silica-gel (normal o desactivada) parte del mismo se pierde. Debido a esta circunstancia, provisionalmente y para poder calcular el rendimiento de la reacción, lavamos el crudo con Hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5:1 y realizamos un espectro de <sup>1</sup>H RMN de esta mezcla, que muestra los dos isómeros limpios. La integración de las señales en el espectro permite determinar la proporción de cada isómero, que se contrasta a continuación con la cantidad de cada producto obtenido en la columna.



La siguiente tabla recoge los rendimientos obtenidos cuando el método elegido para hidrolizar es potasa 5N en frío, generando así los productos isoméricos **6** y **7**. Aparece el rendimiento correspondiente a cada isómero y en la última columna la suma de ambos, es decir, el rendimiento global de la reacción.

**Tabla 1.4:** Resultados de la síntesis de las oxazolopirimidinonas **6** y **7**.

R	<b>6</b>	Rto <b>6</b> (%)	<b>7</b>	Rto <b>7</b> (%)*	Rto global
<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>6a</b>	52	<b>7a</b>	33	85
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>6b</b>	40	<b>7b</b>	40	80
<i>p</i> -MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>6c</b>	50	<b>7c</b>	28	78
Tiofenilo	<b>6d</b>	62	<b>7d</b>	22	84

\*El isómero se descompone parcialmente en la columna, el dato se obtuvo del espectro de <sup>1</sup>H RMN del crudo de la reacción lavado con Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5/1)

Como puede observarse, el isómero que se halla en mayor proporción es la oxazolopirimidinona **6**. Estudios precedentes, realizados en compuestos con restos R fluorados,<sup>27</sup> obtenían una proporción distinta de los isómeros, siendo significativamente mayoritario el compuesto **7**. La siguiente tabla 1.5 recoge algunos ejemplos.

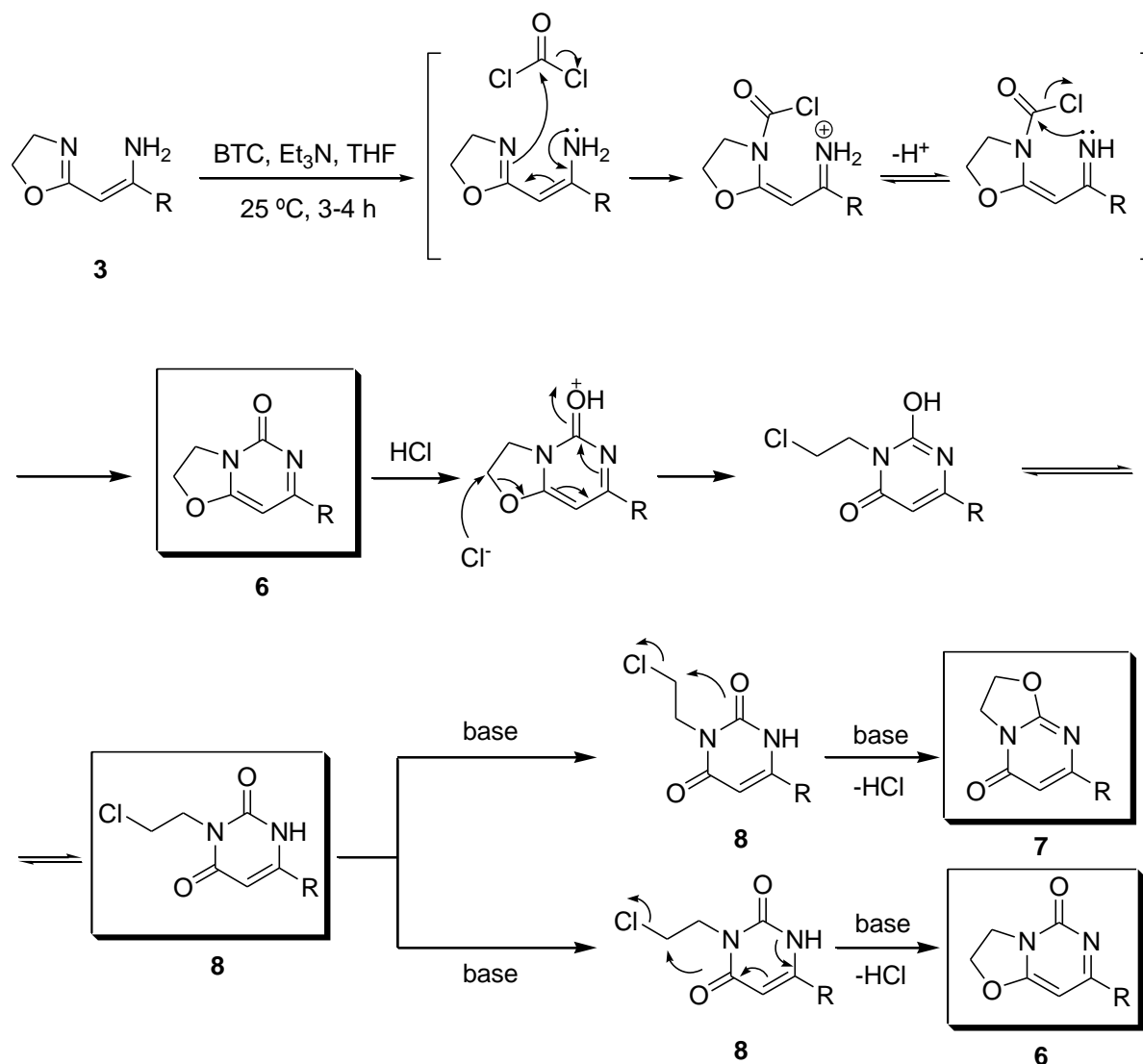
**Tabla 1.5:** Síntesis de 2 y 4 oxazolopirimidinonas isoméricas **6** y **7** fluoradas y no fluoradas, comparación de resultados

R ó R <sub>F</sub>	Rto <b>6</b> (%)	Rto <b>7</b> (%)
<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	52	33
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	40	40
<i>p</i> -MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	50	28
Tiofenilo	62	22
<i>p</i> -CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	27	61
<i>p</i> -FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	29	53

Así, en las dos últimas entradas correspondientes a productos fluorados, podemos observar que el isómero **7** se halla en proporción mayor. Es posible que en estos productos, la presencia de flúor esté influyendo de algún modo en la reacción.

### Mecanismo propuesto

La formación de los derivados **6** y **7** puede explicarse según el mecanismo que se indica en el siguiente esquema. Sobre la mezcla de reacción con presencia mayoritaria de los productos **6** y **8**, la hidrólisis básica en frío provoca la formación de la mezcla final de isómeros de oxazolopirimidinonas **6** y **7**.



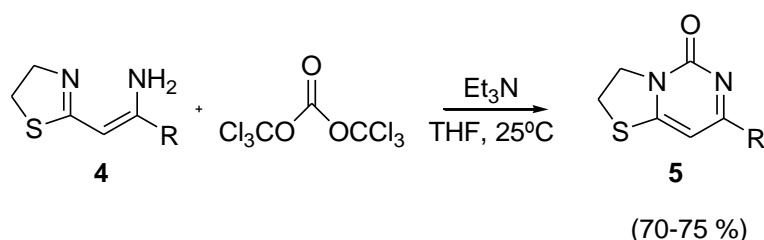
Esquema 1.20

El proceso se inicia con un ataque nucleofílico del nitrógeno imínico al trifosgeno, lo que da lugar a un intermedio carbonílico que se cicla mediante un nuevo ataque nucleofílico del segundo nitrógeno proporcionando así el derivado **6**. En las condiciones de reacción, la protonación del oxígeno carbonílico favorecería

el ataque nucleofílico del anión cloruro al carbono en  $\alpha$  respecto al oxígeno del anillo de oxazolina, lo que originaría la formación del derivado halogenado **8**. Este sistema puede evolucionar hacia la obtención tanto de la oxazolopirimidinona **7** como de nuevo hacia la **6** por heterociclación con pérdida de HCl. Como se puede observar es un mecanismo secuencial que explica la presencia en la mezcla de los tres compuestos en distintas proporciones así como la evolución de la misma dependiendo de la hidrólisis elegida.

### 1. 3.3 Síntesis de derivados de tiazolopirimidonas **5**.

Se trata de una reacción muy similar a la anterior, en la que el reactivo de partida son las amidinas vinílogas **4**, de las que se obtiene un único derivado de tiazolopirimidinona **5**. Esta reacción (Esquema 1.21) ya había sido estudiada en nuestro laboratorio anteriormente.<sup>26</sup>



**Esquema 1.21**

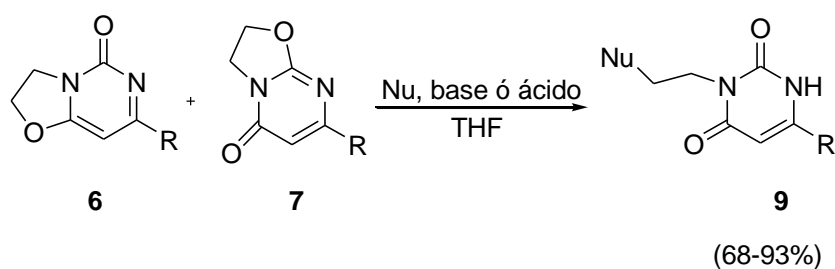
La reacción es similar a la anterior, pero difiere en que el HCl generado durante la misma no es capaz de abrir el anillo de tiazol, por lo que se obtiene un único producto de reacción con un rendimiento por encima del 70% (75% cuando R= toliilo, 72% cuando R= metoxilo).

**Tabla 1.6:** Resultados síntesis de derivados de tiazolopirimidonas.

Producto	R	Rto (%)
<b>5a</b>	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	75
<b>5b</b>	<i>p</i> -MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	72

### 1.3.4 Síntesis de derivados de uracilo N3,C6-disustituidos **9** a partir de oxazolopirimidonas **6** y **7**.

Esta reacción estaba descrita para la síntesis de derivados fluorados.<sup>27</sup> Para derivados no fluorados sólo se había descrito tomando como reactivo de partida las oxazolopirimidinonas **6**.<sup>26</sup> Ahora, la aplicamos a una mezcla isómerica de oxazolopirimidinonas **6** y **7** no fluoradas, obteniendo –efectivamente– los derivados de uracilo N3,C6-disustituidos mediante la acción de distintos nucleófilos en medio básico o ácido.



Esquema 1.22

Para que la reacción transcurra con normalidad se requiere una proporción considerable de nucleófilo (5:1 ó superior) y en ocasiones un incremento de la temperatura hasta 80 °C.

En medio básico y siguiendo este procedimiento se obtuvieron los siguientes derivados de uracilo con buenos rendimientos:

**Tabla 1.7:** Resultados de la síntesis derivados de uracilo **9** en medio básico.

Producto	Nu <sup>-</sup>	R	R'O <sup>-</sup> /R'OH	Rto (%)
<b>9a</b>	OH <sup>-</sup>	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	NaOH (5N)	79
<b>9b</b>	MeO <sup>-</sup>	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> OH/ NaOH	70
<b>9c</b>	AcO <sup>-</sup>	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	AcONa/ NaOH <sup>+</sup>	72

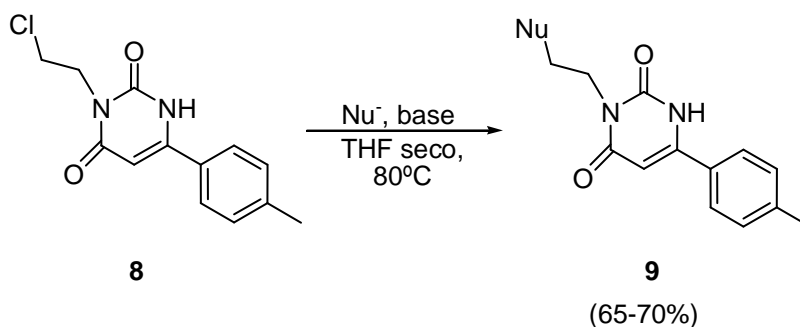
Como podemos observar en la siguiente tabla, en medio ácido los rendimientos también son buenos. Para las entradas 1 y 2, fue necesario elevar la temperatura del baño a 80 °C.

**Tabla 1.8:** Resultados de la síntesis derivados de uracilo **9** en medio ácido.

Producto	Nu	R	R'O'/R'OH	Rto (%)
<b>9b</b>	MeOH	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> OH / ácido <i>p</i> -toluensulfónico	68
<b>9c</b>	CH <sub>3</sub> COOH	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> COOH/ ácido <i>p</i> -toluensulfónico	93
<b>8a</b>	HCl	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	HCl	99
<b>8c</b>	HCl	<i>p</i> -MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	HCl	99

### 1.3.5 Síntesis de derivados de uracilo N3,C6-disustituídos **9** a partir uracilos N3-cloroetilados **8**.

El estudio de la reactividad de los uracilos N3-cloroetilados **8** frente a diversos nucleófilos en medio básico permite abrir una nueva vía sintética -paralela a la anterior- mediante la que podemos obtener de nuevo los derivados de uracilo N3,C6-disustituídos **9** (Esquema 1.23).



**Esquema 1.23**

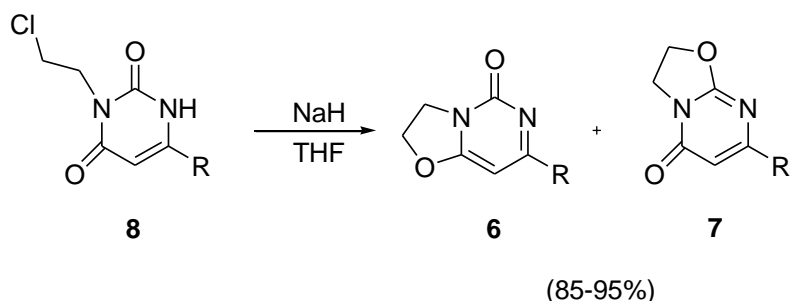
Si bien no ha habido tiempo material para realizar un estudio detallado, las pruebas realizadas (recogidas en la tabla 1.9) indican la factibilidad de la nueva vía sintética.

**Tabla 1.9:** Resultados de la síntesis de nuevos derivados de uracilo N3,C6-disustituidos **9** a partir uracilos N3-cloroetilados **8**.

Producto	Nu	R	R'O <sup>-</sup> /R'OH	Rto (%)
<b>9b</b>	MeO <sup>-</sup>	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> OH/ NaOH	65

### 1.3.6 Síntesis de derivados de oxazolopirimidonas (**6** y **7**) a partir de uracilos N3-cloroetilados **8**.

En presencia de una base fuerte como NaH los derivados de uracilo **8** se cierran intramolecularmente para generar una mezcla isomérica de oxazolopirimidinonas bicíclicas **6** y **7**. Los rendimientos de la reacción son buenos, con una proporción algo mayor del isómero **6** en la mezcla. La dificultad, como ya sucedía anteriormente (ver apartado 1.3.2) reside en la purificación de los derivados **7**, cuyo rendimiento se calculó de modo similar al explicado en dicho apartado.



**Esquema 1.24**

La tabla 1.10 recoge los resultados de la reacción. Para la entrada correspondiente a R=fenilo el espectro de <sup>1</sup>H RMN mostró señales correspondientes a cuatro productos diferentes en proporciones similares, si bien, sólo pudieron aislarse los dos isómeros ya conocidos.

**Tabla 1.10:** Resultados de la síntesis de derivados de oxazolopirimidonas **6** y **7** a partir de los uracilos N3-cloroetilados **8**.

<b>R</b>	<b>6</b>	<b>Rto 6(%)</b>	<b>7</b>	<b>Rto 7(%)</b>	<b>Rto global</b>
<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>6a</b>	50	<b>7a</b>	40	90
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>6b</b>	40	<b>7b</b>	23	63
<i>p</i> -MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>6c</b>	50	<b>7c</b>	28	78

## 1.4. Parte Experimental

### Generalidades

Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera inerte de nitrógeno.

### Técnicas analíticas

*Espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN).* Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron con un espectrofotómetro Bruker 300 MHz utilizando deuterocloroformo ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ ), acetona deuterada ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) o DMSO deuterado ( $\text{CD}_3\text{SOCD}_3$ ) como disolvente. Los valores de los desplazamientos químicos de los núcleos se expresan en valores de  $\delta$  (ppm), tomando tetrametilsilano (TMS;  $\delta = 0,00$  ppm) como referencia interna para los espectros de  $^1\text{H}$ ; triclorofluorometano ( $\delta = 0,00$  ppm) para los espectros de  $^{19}\text{F}$ , y la señal intermedia del triplete de cloroformo deuterado ( $\delta = 77,26$  ppm) o el metilo de acetona deuterada ( $\delta = 30,60$  ppm) para los de  $^{13}\text{C}$ . Las constantes de acoplamiento,  $J$ , se expresan en hercios (Hz).

*Espectrometría de masas.* Para la obtención de los espectros de masas (EMAR) se utilizó un equipo VG AUTOESPEC (micromass). Los espectros de impacto electrónico (IE) fueron realizados a 70 eV, mientras que la velocidad de aceleración del haz de iones de  $\text{Cs}^+$  en los espectros realizados por FAB fue de 30.000 V. Los valores listados para cada uno de los compuestos se expresan en unidades m/z.

Los puntos de fusión de los productos cristalizados se determinaron en un aparato "Cambridge Instruments" y no han sido corregidos.

Los análisis por cromatografía en capa fina (CCF) se llevaron a cabo en sílica gel activa al UV (Kieselgel 60 F<sub>254</sub> sobre plástico), se visualizaron utilizando



una luz UV de 254 nm de longitud de onda y se revelaron con yodo. En algunos casos se utilizó el reactivo de Vainillina para el revelado.<sup>66</sup>

Para las cromatografías de columna flash se utilizó sílica gel 60 (0,040-0,063). En algunos casos la sílice fue desactivada tratándola previamente con una disolución de Et<sub>3</sub>N en n-hexano al 2%.

### **Disolventes y reactivos**

Los disolventes se secaron y destilaron previamente a su uso.<sup>67</sup>

El tetrahidrofurano anhidro se obtuvo a partir de THF comercial, siendo sometido a un procedimiento de secado que consistió en calentarlo a reflujo sobre una aleación de sodio y potasio (K<sub>3</sub>Na) durante 12 horas, aproximadamente, hasta la ausencia total de agua, utilizando como indicador benzofenona. Una vez seco, el disolvente se destiló en atmósfera de nitrógeno y se almacenó del mismo modo.

La diisopropilamina, utilizada en la formación de diisopropil amiduro de litio (LDA), fue destilada sobre lentejas de hidróxido sódico en atmósfera de nitrógeno y se conservó bajo las mismas condiciones.

El Hexano para lavado de NaH se secó sobre sodio hilado en atmósfera de argón.

Los reactivos utilizados: *n*-BuLi, nitrilos, metiloxa(tia)zolinias, trifosgeno, trietilamina, acetato de etilo, metanol, ácido clorhídrico, hidróxido potásico, NH<sub>4</sub>Cl NaHCO<sub>3</sub>, proceden de casas comerciales (*Aldrich*) del mejor grado posible y no se sometieron a purificación previa.

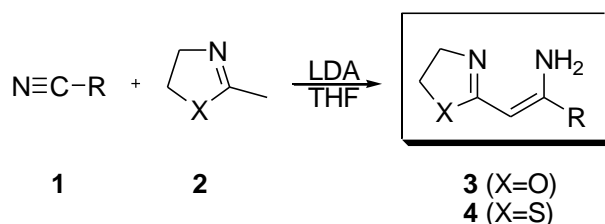
NaH comercial se lavó con hexano anhidro 5 o 6 veces en atmósfera inerte para limpiarlo de la materia grasa de la que viene impregnado, antes de su utilización.

---

<sup>66</sup> El reactivo indicado se preparó como sigue: A 250 ml de EtOH se añaden 2'5 g de Vainillina (Aldrich Co.), 10 ml de HOAc y 2'5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%). La mezcla se agita hasta la obtención de una solución amarilla clara. La placa cromatográfica se introduce en la solución y después se calienta en una placa calefactora hasta la aparición de una mancha de color intenso debido a la oxidación del producto.

<sup>67</sup> "Purification of Laboratory Chemicals" 2ª edición; Perrin, D. D.; Ed. Pergamon Press; England, 1988.

### 1.4.1 Síntesis de β-enaminoxazolinas y β-enaminotiazolinas 3 y 4.

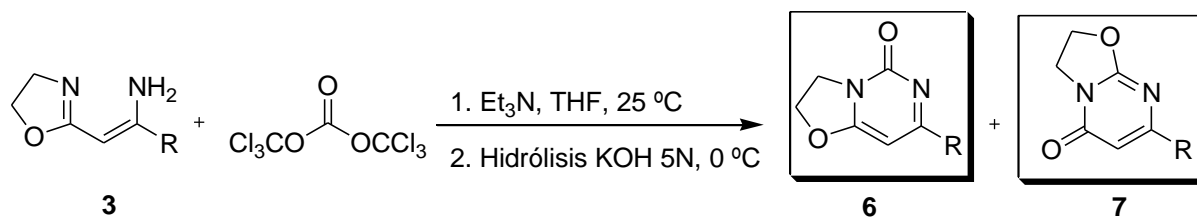


#### *Procedimiento General*

Se prepara primero una disolución de LDA en THF seco a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Para ello, sobre una disolución de diisopropilamina en THF (15 mmol, 12 ml THF) en atmósfera inerte se gotea lentamente 15 mmol de n-BuLi (2.5 M en hexano, Aldrich). Tras 30' en agitación a  $-30^{\circ}\text{C}$  -para la completa formación del LDA- se disminuye la temperatura a  $-50^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se adiciona lentamente una disolución de metiloxa(tio)zolina **2** en THF seco (12 mmol, 10 ml). Al cabo de 45 minutos en agitación a esta temperatura se ha completado la formación del azaenolato que se manifiesta en la tonalidad amarillo-naranja que toma la disolución. Bajamos la temperatura del baño hasta  $-78^{\circ}\text{C}$  y adicionamos lentamente una disolución del nitrilo **1** en THF seco (10 mmol, 8 ml). Finalizada la reacción (CCF, 2-4 horas), se hidroliza el crudo con una disolución acuosa saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y extraemos el producto con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Finalmente, se elimina el disolvente por destilación a presión reducida, lo que proporciona un aceite o un sólido **3** que se purifica mediante cromatografía *flash* en sílica gel Hex-AcOEt (2:1), desactivada previamente con una disolución de  $\text{Et}_3\text{N}$  en Hexano al 2 %.

Estos productos ya habían sido aislados y caracterizados anteriormente por nuestro grupo de investigación.<sup>26</sup>

### 1.4.2 Síntesis de derivados de oxazolopirimidinonas **6** y **7** a partir de $\beta$ -enaminoxazolinas **3**.

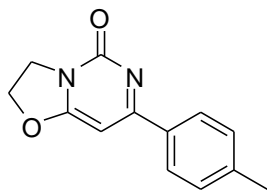


#### *Procedimiento General*

Sobre una disolución de trifosgeno en THF seco (0,6 mmol, 3 ml THF,  $25^\circ\text{C}$ , atmósfera  $\text{N}_2$ ) se adiciona lentamente una disolución de  $\beta$ -enaminoxazolina **3** en THF seco (0,6 mmol, 3 ml THF). A continuación se adiciona una nueva disolución de  $\text{Et}_3\text{N}$  en THF seco (1,2 mmol  $\text{Et}_3\text{N}$ , 3 ml THF). La reacción se sigue por CCF: el reactivo de partida desaparece a lo largo de la primera hora y media de reacción, momento en que se hidroliza con KOH 5N en frío y se extrae con AcOEt (3 x 5 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se filtran. Por último, se elimina el disolvente por destilación a presión reducida y se obtiene un sólido, mezcla en proporciones variables de **6** y **7**, que se purifica.

La purificación se realiza por cromatografía flash en sílica gel con orden creciente de polaridad: AcOEt-MeOH (7:1) para el producto **7** y AcOEt-MeOH (4:1) para obtener el producto **6**. La purificación puede constituir un punto conflictivo, ya que se pierde parte del producto **7** en la columna. La purificación por cromatografía *flash* en sílica gel con sílice desactivada no solventó el problema.

**Producto: 2,3-dihidro-7-p-toliloxazolo[3,2-f]pirimidin-5-ona (6a)**



<b>Estado físico:</b>	Sólido blanco
<b>Rendimiento (%):</b> <sup>68</sup>	v1: 85 (52), v2: 90 (50)
<b>Fórmula empírica:</b>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Masa molecular</b>	228
<b>Punto de fusión (°C):</b>	192-194

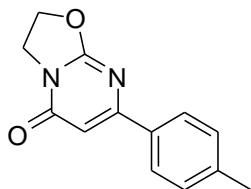
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 2,41 (s, 3H), 4,36 (t, *J*=8,8, 2H), 4,84 (t, *J*=8,8, 2H), 6,34 (s, 1H), 7,26 (d, *J*=8,2, 2H), 7,97 (d, *J*=8,2, 2H)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 173,5 (s), 165,2 (s), 155,4(s), 142,7(s), 134,2(s), 129,8(d), 128,3 (d), 82,0 (d), 69,5(t), 44,1(t), 21,9(q)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 228,0899 Experimental: 228,0887

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (4:1)] en sílica gel

**Producto: 2,3-dihidro-7-p-toliloxazolo[3,2-a]pirimidin-5-ona (7a)**



<b>Estado físico:</b>	Sólido blanco
<b>Rendimiento (%):</b> <sup>67</sup>	v1: 85 (33), v2: 90 (40)
<b>Fórmula empírica:</b>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Masa molecular</b>	228
<b>Punto de fusión (°C):</b>	212-214

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 2,39 (s, 3H), 4,32 (t, *J*=8,6, 2H), 4,76 (t, *J*=8,6, 2H), 6,50 (s, 1H), 7,23 (d, *J*=8,2, 2H), 7,81 (d, *J*=8,2, 2H)

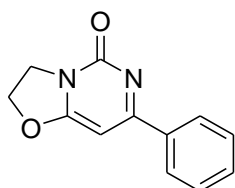
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 163,7 (s), 162,1 (s), 159,9 (s), 141,6 (s), 133,6 (s), 129,8 (d), 127,4 (d), 102,4 (d), 66,5 (t), 42,7 (t), 21,8

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 228,0899 Experimental: 228,0881

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (7:1)] en sílica gel

<sup>68</sup> Estas oxazolopirimidinonas también se sintetizaron a partir derivados de uracilo N3-cloroetilados, como se recoge en el apartado 4.7. Para expresar los rendimientos correspondientes a cada método se ha recurrido a la siguiente terminología: v1 (vía 1) es el rendimiento obtenido siguiendo el procedimiento experimental de este apartado (4.2), v2 es el rendimiento obtenido al utilizar el procedimiento experimental explicado en el apartado 4.7. En cada una de las vías, primero aparece el rendimiento global de la reacción (suma de los productos **6** y **7**) y a continuación, entre paréntesis, el rendimiento del producto en cuestión.

**Producto: 2,3-dihidro-7-feniloxazolo[3,2-f]pirimidin-5-ona (6b)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):**<sup>68</sup> v1: 80 (40), v2: 63 (40)  
**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
**Masa molecular** 214  
**Punto de fusión (°C):** 168-170

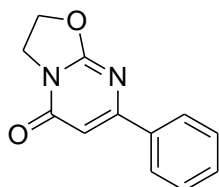
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 4,36 (t, *J*=8,6, 2H), 4,84 (t, *J*=8,6, 2H), 6,35 (s, 1H), 7,42-7,51 (m, 3H), 8,04 (m, 2H)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 173,6 (s), 165,3 (s), 155,3 (s), 137,0 (s), 132,0 (d), 129,0 (d), 128,2 (d), 82,3 (d), 69,5 (t), 44,1 (t)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 214,0742 Experimental: 214,0709

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (4:1)] en sílica gel

**Producto: 2,3-dihidro-7-feniloxazolo[3,2-f]pirimidin-5-ona (7b)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):**<sup>68</sup> v1: 80 (40), v2: 63 (23)  
**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
**Masa molecular** 214  
**Punto de fusión (°C):** 163-165

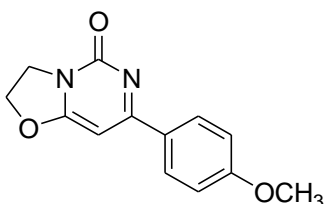
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 4,36 (t, *J*=8,8, 2H), 4,91 (t, *J*=8,8, 2H), 6,51 (s, 1H), 7,49-7,52 (m, 3H), 8,04-8,07 (m, 2H)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 162,5 (s), 161,3 (s), 160,8 (s), 137,1 (s), 130,7 (d), 128,9 (d), 127,2 (d), 102,2 (d), 67,1 (t), 42,7 (t)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 214,0742 Experimental: 214,0742

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (7:1)] en sílica gel

**Producto: 2,3-dihidro-7-(4-metoxifenil)oxazolo[3,2-f]pirimidin-5-ona (6c)**



**Estado físico:** Sólido amarillo  
**Rendimiento (%):**<sup>68</sup> v1: 78 (50), v2: 87 (62)  
**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
**Masa molecular** 244  
**Punto de fusión (°C):** 154-156

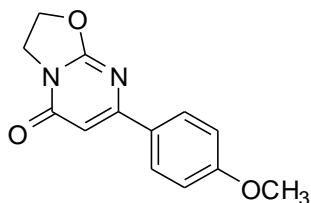
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 3,84 (s, 3H), 4,31 (t, *J*=8,7, 2H), 4,80 (t, *J*=8,7, 2H), 6,26 (s, 1H), 6,93 (d, *J*=8,8, 2H), 8,01 (d, *J*=8,8, 2H)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 171,3 (s), 163,7 (s), 161,6 (s), 154,0 (s), 128,7 (d), 127,9 (s), 112,9 (d), 80,1 (d), 68,1 (t), 54,4 (q), 42,6 (t)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 244,0848 Experimental: 244,0844

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (4:1)] en sílica gel

**Producto: 2,3-dihidro-7-(4-metoxifenil)oxazolo[3,2-a]pirimidin-5-ona (7c)**



**Estado físico:** Sólido amarillo  
**Rendimiento (%):**<sup>68</sup> v1: 80 (28), v2: 87 (25)  
**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
**Masa molecular** 244  
**Punto de fusión (°C):** 182-184

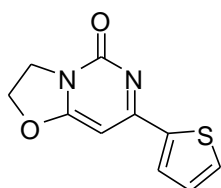
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 3,85 (s, 3H), 4,33 (t, *J*=8,7, 2H), 4,77 (t, *J*=8,7, 2H), 6,45 (s, 1H), 6,93 (d, *J*=8,8, 2H), 7,89 (d, *J*=8,8, 2H)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 163,3 (s), 162,24 (s), 162,16 (s), 159,8 (s), 129,1 (d), 128,8 (s), 114,4 (d), 101,5 (d), 66,5 (t), 55,8 (q), 42,7 (t)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 244,0848 Experimental: 244,0838

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (7:1)] en sílica gel

**Producto: 2,3-dihidro-7-(tiofen-2-il)oxazolo[3,2-f]pirimidin-5-ona (6d)**



**Estado físico:** Sólido amarillo

**Rendimiento (%):**<sup>68</sup> v1: 84 (62)

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S

**Masa molecular** 220

**Punto de fusión (°C):** 185-187

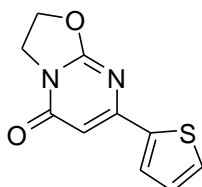
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 4,33 (t, *J*=8,7, 2H), 4,83 (t, *J*=8,7, 2H), 6,24 (s, 1H), 7,13 (dd, *J*<sub>1</sub>=5,1, *J*<sub>2</sub>=4,4, 1H), 7,56 (d, *J*=5,1, 1H), 7,71 (d, *J*=3,4, 1H)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 167,0 (s), 164,5 (s), 154,5 (s), 142,2 (s), 132,0 (d), 129,1 (d), 128,1 (d), 80,5 (d), 69,1 (t), 43,6 (t)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 220,0306 Experimental: 220,0271

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (4:1)] en sílica gel

**Producto: 2,3-dihidro-7-(tiofen-2-il)oxazolo[3,2-a]pirimidin-5-ona (7d)**



**Estado físico:** Sólido amarillo

**Rendimiento (%):**<sup>68</sup> v1: 84 (22)

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S

**Masa molecular** 220

**Punto de fusión (°C):** 189-193

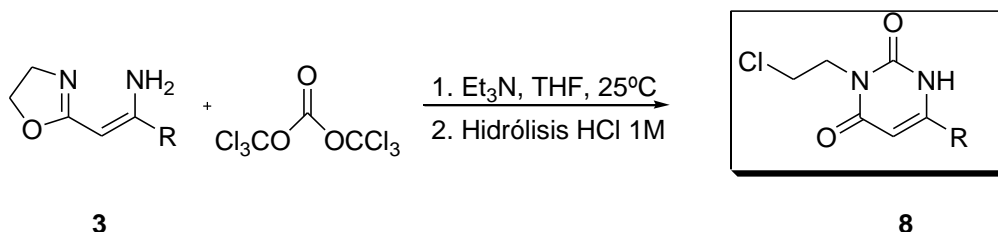
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 4,33 (t, *J*=8,7, 2H), 4,78 (t, *J*=8,7, 2H), 6,42 (s, 1H), 7,11 (dd, *J*<sub>1</sub>=5,1, *J*<sub>2</sub>=3,8, 1H), 7,48 (dd, *J*<sub>1</sub>=0,9, *J*<sub>2</sub>=4,9, 1H), 7,64 (dd, *J*<sub>1</sub>=1,1, *J*<sub>2</sub>=3,8, 1H)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 165,7 (s), 159,4 (s), 157,8 (s), 141,2 (s), 129,8 (d), 128,3 (d), 127,6 (d), 100,2 (d), 66,2 (t), 42,3 (t)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 220,0306 Experimental: 220,0303

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (7:1)] en sílica gel

### 1.4.3 Síntesis de derivados de uracilo N3-cloroetilados **8** a partir de $\beta$ -enaminoxazolinas **3**.



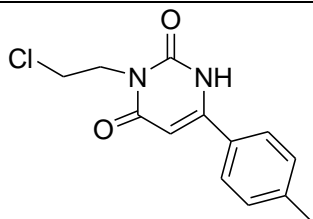
#### *Procedimiento General*

Sobre una disolución de trifosgeno en THF seco (0,6 mmol, 3 ml THF,  $25^\circ\text{C}$ , atmósfera  $\text{N}_2$ ) se adiciona lentamente una disolución de  $\beta$ -enaminoxazolina **3** en THF seco (0,6 mmol, 3 ml THF). A continuación se adiciona una nueva disolución de  $\text{Et}_3\text{N}$  en THF seco (1,2 mmol  $\text{Et}_3\text{N}$ , 3 ml THF). La reacción se sigue por CCF: el reactivo de partida desaparece a lo largo de la primera hora y media de reacción, momento en que se hidroliza con HCl 1M y se extrae con AcOEt (3 x 5 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se filtran. Por último, se elimina el disolvente por destilación a presión reducida y se obtiene un sólido correspondiente al producto **8**.

La purificación se realiza por cromatografía *flash* en sílica gel con AcOEt, tal y como se indica en cada caso.



**Producto: 3-(2-cloroetil)-6-p-tolilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona (8a)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):** 87  
**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Cl  
**Masa molecular:** 264  
**Punto de fusión (°C):** 202-205

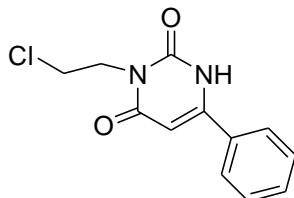
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 2,44 (s, 3H), 3,77 (t, *J*=6,8, 2H), 4,33 (t, *J*=6,8, 2H), 6,00 (d, *J*=2,1, 1H), 7,32 (d, *J*=8,2, 2H), 7,53 (d, *J*=8,2, 2H), 9,51 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 164,5 (s), 154,5 (s), 152,1 (s), 143,9 (s), 131,4 (d), 129,4 (s), 127,6 (d), 99,3 (d), 42,9 (t), 41,4 (t), 22,9 (q)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 264,0666 Experimental: 264,0655

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* (AcOEt) en sílica gel

**Producto: 3-(2-cloroetil)-6-fenilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona (8b)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):** 85  
**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Cl  
**Masa molecular:** 250  
**Punto de fusión (°C):** 205-207

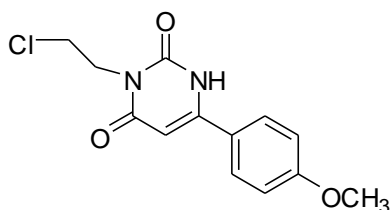
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 3,76 (t, *J*=6,8, 2H), 4,32 (t, *J*=6,8, 2H), 6,04 (d, *J*=2,3, 1H), 7,54 (m, 3H), 7,68 (dd, *J*=7,9, *J*=1,5, 2H), 10,33 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 162,0 (s), 152,1 (s), 149,6 (s), 130,9 (d), 130,0 (s), 128,4 (d), 125,3 (d), 97,6 (d), 40,6 (t), 39,0 (t)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 250,0509 Experimental: 250,0498

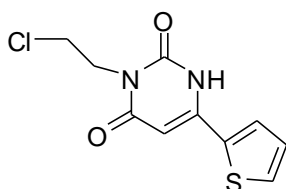
**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* (AcOEt) en sílica gel

**Producto: 3-(2-cloroetil)-6-(4-metoxifenil)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (8c)**



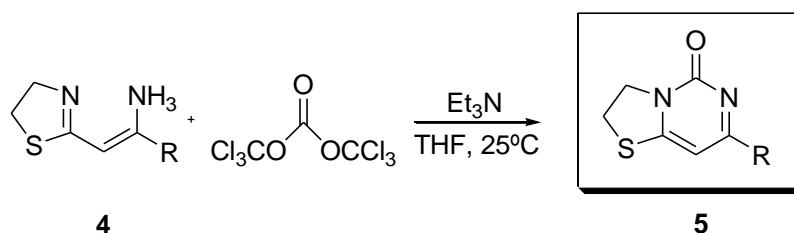
<b>Estado físico:</b>	Sólido blanco
<b>Rendimiento (%):</b>	83
<b>Fórmula empírica:</b>	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl
<b>Masa molecular</b>	280
<b>Punto de fusión (°C):</b>	190-193
<b><sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):</b>	3,77 (t, 2H, J=6,8), 3,88 (s, 3H), 4,33 (t, 2H, J=6,8), 5,98 (s,1H), 7,02 (d, 2H, J=8,8), 7,62 (d, 2H, J=8,8), 9,90 (s, 1H)
<b><sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):</b>	163,5 (s), 162,9 (s), 153,2 (s), 150,6 (s), 128,2 (d), 123,4 (s), 115,2 (d), 97,6 (d), 55,9 (q), 41,9 (t), 40,4 (t)
<b>EMAR (EI<sup>+</sup>):</b>	Calculada para (M <sup>+</sup> ): 280,0615      Experimental: 280,0609
<b>Comentarios:</b>	Purificación por cromatografía <i>flash</i> (AcOEt) en sílica gel

**Producto: 3-(2-cloroetil)-6-(tiofen-2-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (8d)**



<b>Estado físico:</b>	Sólido blanco
<b>Rendimiento (%):</b>	91
<b>Fórmula empírica:</b>	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> SCl
<b>Masa molecular</b>	256
<b>Punto de fusión (°C):</b>	216-219
<b><sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):</b>	3,80 (t, J=6,6, 2H), 4,35 (t, J=6,6, 2H), 6,04 (s, 1H), 7,20 (dd, J=5,3 J=4,17, 1H), 7,56 (dd, J=4,9 J=0,8, 1H), 7,69 (dd, J=3,8 J=1,1, 1H), 9,82 (s, 1H)
<b><sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):</b>	163,9 (s), 153,6 (s), 145,3 (s), 134,6 (s), 131,4 (d), 129,9 (d), 129,2 (d), 98,4 (d), 42,8 (t), 41,2 (t)
<b>EMAR (EI<sup>+</sup>):</b>	Calculada para (M <sup>+</sup> ): 256,0073      Experimental: 256,0082
<b>Comentarios:</b>	Purificación por cromatografía <i>flash</i> (AcOEt) en sílica gel

#### 1.4.4 Síntesis de derivados de tiazolopirimidinonas 5.

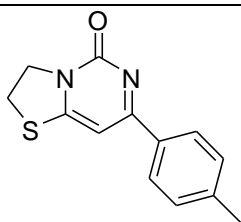


##### *Procedimiento General*

Sobre una disolución de trifosgeno en THF seco (0,6 mmol, 3 ml THF, 25°C, atmósfera N<sub>2</sub>) se adiciona lentamente una disolución de  $\beta$ -enaminotiazolina **4** en THF seco (0,6 mmol, 3 ml THF). A continuación se adiciona una nueva disolución de Et<sub>3</sub>N en THF seco (1,2 mmol Et<sub>3</sub>N, 3 ml THF). La reacción se sigue por CCF: el reactivo de partida desaparece a lo largo de la primera hora y media de reacción, momento en que se hidroliza con H<sub>2</sub>O destilada y se extrae con AcOEt (3 x 5 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtran. Por último, se elimina el disolvente por destilación a presión reducida y se obtiene un sólido correspondiente al producto **5**.

La purificación se realiza por cromatografía *flash* en sílica gel con AcOEt-MeOH (4:1)

**Producto: 2,3-dihidro-7-p-toliltiazolo[3,2-f]pirimidin-5-ona (5a)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):** 75  
**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>OS  
**Masa molecular** 244  
**Punto de fusión (°C):** 231-233

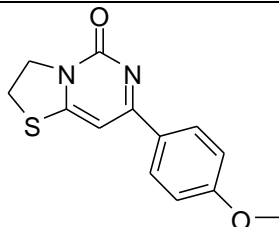
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 2,40 (s, 3H), 3,47 (t, *J*=7,9, 2H), 4,55 (t, *J*=7,9, 2H), 6,77 (s, 1H), 7,25 (d, *J*=8,1, 2H), 7,96 (d, *J*=8,1, 2H)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 170,6 (s), 161,9 (s), 156,4 (s), 142,9 (s), 133,6 (s), 129,8 (d), 128,4 (d), 96,4 (d), 51,7 (t), 28,1 (t), 21,9 (q)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 244,0670 Experimental: 244,0660

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (4:1)] en sílica gel

**Producto: 2,3-dihidro-7-(4-metoxifenil)tiazolo[3,2-f]pirimidin-5-ona (5b)**



**Estado físico:** Sólido amarillo claro  
**Rendimiento (%):** 72  
**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S  
**Masa molecular** 260  
**Punto de fusión (°C):** 236-239

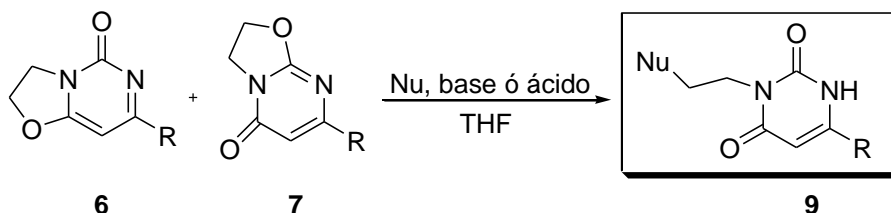
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 3,46 (t, 2H, *J*=7,9), 3,86 (s, 3H), 4,54 (t, 2H, *J*=7,9), 6,74 (s, 1H), 6,94 (d, 2H, *J*=9,1), 8,04 (d, 2H, *J*=9,1)

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 169,6 (s), 163,2 (s), 161,6 (s), 156,3 (s), 130,2 (d), 128,7 (s), 114,4 (d), 96,0 (d), 55,8 (q), 51,7 (t), 28,0 (t)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 244,0670 Experimental: 244,0660

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (4:1)] en sílica gel

### 1.4.5 Síntesis de derivados de uracilo N3,C6-disustituidos 9 a partir de oxazolopirimidonas 6 y 7.



#### Medio básico

##### *Procedimiento General*

Sobre una disolución de las oxazolopirimidonas isoméricas **6** y **7** en THF seco (0,4 mmol, 4 ml), se adicionan 2,0 mmol del correspondiente R'O/R'OH. Se deja a reflujo 5 horas. A continuación, se hidroliza con NH<sub>4</sub>Cl acuoso y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Después de secar la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se evaporan los disolventes a presión reducida, obteniéndose así un residuo bastante limpio del producto final. Se lava el sólido con Hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1).

Cuando es necesario, se purifica por cromatografía *flash* en sílica gel, según se indica en los comentarios de cada producto.

#### Medio ácido

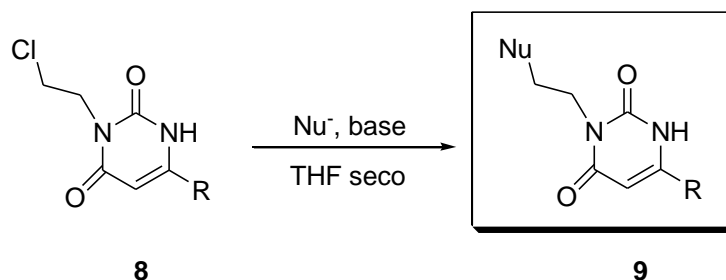
##### *Procedimiento General*

Sobre una disolución de oxazolopirimidonas isoméricas **6** y **7** en THF seco (0,4 mmol, 4 ml), se adicionan 2,0 mmol del correspondiente nucleófilo, añadiendo a continuación una punta de espátula de ácido *p*-toluensulfónico (en el caso de HCl no es necesario). Se deja a reflujo 5 horas. A continuación, se hidroliza con

NH<sub>4</sub>Cl acuoso y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Después de secar la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se evaporan los disolventes a presión reducida, obteniéndose así un residuo bastante limpio del producto final. Se lava el sólido con Hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1).

Cuando es necesario, se purifica por cromatografía *flash* en sílica gel, según se indica en los comentarios de cada producto.

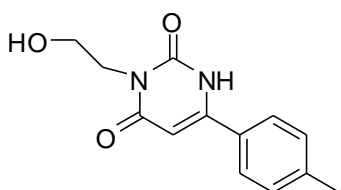
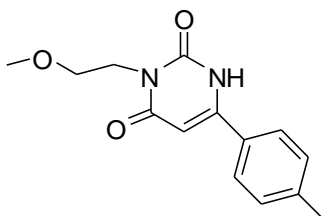
#### 1.4.6 Síntesis de derivados de uracilo N3,C6-disustituídos 9 a partir de uracilos N3-cloroetilados 8.



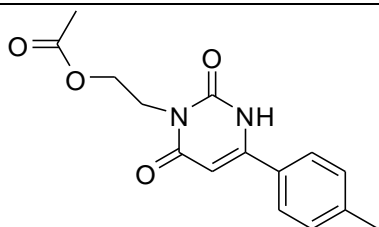
##### *Procedimiento General*

A una disolución de uracilo N3-cloroetilado **8** en THF seco (0,4 mmol, 3 ml) se adicionan 2,8 mmol del correspondiente R'O<sup>-</sup>/R'OH. Se deja a reflujo 5 horas. A continuación se hidroliza con NH<sub>4</sub>Cl acuoso y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Después de secar la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se evaporan los disolventes a presión reducida. Se lava el sólido con Hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1).

Cuando es necesario, se purifica por cromatografía *flash* en sílica gel, según se indica en los comentarios de cada producto.

**Producto: 3-(2-hidroxietil)-6-p-tolilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona (9a)****Estado físico:** Sólido blanco**Rendimiento (%):** v3: 79**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**Masa molecular** 246**Punto de fusión (°C):** 212-214**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 2,40 (s, 3H), 3,56 (c, *J*=6,2, 2H), 3,93 (t, *J*=6,6, 2H), 4,82 (t, OH), 5,96 (s, 1H), 7,34 (d, *J*=8,1, 2H), 7,68 (d, *J*=8,3, 2H), 11,34 (s, 1H)**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 163,9 (s), 152,8 (s), 151,6 (s), 142,1 (s), 130,4 (d), 129,4 (s), 127,7 (d), 97,8 (d), 58,5 (t), 42,5 (t), 21,8 (q)**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 246,1004 Experimental: 246,1012**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (5:1)] en sílica gel**Producto: 3-(2-metoxietil)-6-p-tolilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona (9b)****Estado físico:** Sólido blanco**Rendimiento (%):** v3: 70, v4: 68, v5: 65**Fórmula empírica:** C<sub>14</sub>H<sub>16</sub> N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**Masa molecular** 260**Punto de fusión (°C):** 204-206**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 2,42 (s, 3H), 3,35 (s, 3H), 3,66 (t, *J*=5,6, 2H), 4,20 (t, *J*=5,6, 2H), 5,99 (s, 1H), 7,29 (d, *J*=8,1, 2H), 7,55 (d, *J*=8,1, 2H), 9,83 (s, 1H)**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 163,5 (s), 153,0 (s), 150,1 (s), 142,2 (s), 130,0 (d), 128,4 (s), 126,1 (d), 98,2 (d), 69,2 (t), 58,6 (q), 39,5 (t), 21,4 (q)**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 260,1161 Experimental: 260,1174**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (5:1)] en sílica gel

**Producto: acetato de 2-(2,3-dihidro-2,6-dioxo-4-p-tolilpirimidin-1(6H)-il)etilo (9c)**



**Estado físico:** Sólido amarillo claro

**Rendimiento (%):** v3: 72, v4: 93

**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>16</sub> N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Masa molecular** 288

**Punto de fusión (°C):** 171-173

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):**

2,05 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 4,25 (t, *J*=5,3, 2H), 4,37 (t, *J*=5,3, 2H), 5,98 (s, 1H), 7,33 (d, *J*=8,2, 2H), 7,47 (d, *J*=8,2, 2H), 8,44 (s, 1H)

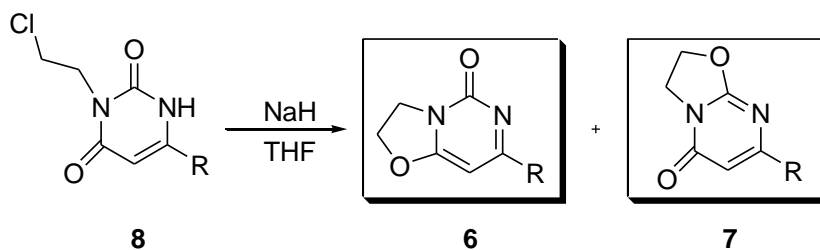
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):**

171,4 (s), 163,8 (s), 152,9 (s), 150,5 (s), 142,9 (s), 130,6 (d), 128,7 (s), 126,3 (d), 98,4 (d), 61,7 (t), 39,8 (t), 21,9 (q), 21,2 (q)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 288,1110 Experimental: 288,1119

**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* [AcOEt-MeOH (5:1)] en sílica gel

**1.4.7 Síntesis de derivados de oxazolopirimidonas 6 y 7 a partir de uracilos N3-cloroetilados 8.**





### *Procedimiento General*

Previamente lavamos el NaH comercial con hexano anhidro 5 o 6 veces en atmósfera inerte para limpiarlo de la materia grasa de la que viene impregnado.

Preparamos una disolución del derivado de uracilo N3-cloroetilado **8** en THF anhidro (0,3 mmol, 3 ml). Adicionamos con cuidado NaH en exceso (2,1 mmol) y dejamos en agitación a r.t. durante 10 horas. Seguimos la reacción por CCF. Al cabo de 10 horas hidrolizamos con H<sub>2</sub>O destilada y extraemos con AcOEt. La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y a continuación concentramos disolvente hasta sequedad a presión reducida. El espectro de <sup>1</sup>H RMN muestra la mezcla de los dos isómeros limpia. A continuación purificamos por cromatografía flash en sílica gel con orden creciente de polaridad: AcOEt-MeOH (7:1) para el producto **7** y AcOEt-MeOH (4:1) para obtener el producto **6**. La purificación es un punto potencialmente conflictivo, ya que se pierde parte del producto **7** en la columna, como ya sucedía en la síntesis de estos productos mediante el procedimiento explicado en el apartado 1.4.2. En las fichas de los productos sintetizados los rendimientos correspondientes a esta vía sintética se señalan como v2.

## 1.5. Conclusiones

Siguiendo líneas de investigación previas en nuestro laboratorio,<sup>26-28</sup> se ha estudiado y ampliado una metodología que permite la síntesis de derivados de uracilo y de pirimidinona. Las conclusiones de este capítulo son:

1. Se ha profundizado en el conocimiento de la reacción clave de la metodología, a saber, la condensación de una  $\beta$ -enaminoxazolina **3** con un derivado del ácido carbónico. El estudio nos lleva a concluir que se generan tres productos distintos en proporciones variables en el seno de la reacción, siendo la **hidrólisis** elegida (agentes hidrolíticos y condiciones) la que constituye el **paso clave** para poder controlar el resultado de la reacción.

2. Se han sintetizado los derivados de **4-oxazolopirimidinona 7 no fluorados**, no obtenidos anteriormente.

3. Se han sintetizado, además, nuevos **derivados de uracilo no fluorados N3-cloroetilados 8**.

4. Comparando los resultados obtenidos con los de trabajos precedentes se ha constatado cierta variación en la proporción de los isómeros **6 y 7**, en función de la **presencia de o ausencia de flúor** en los grupos sustituyentes C6.

4. Además, hemos podido conectar sintéticamente los diversos productos obtenidos, iniciando así, el estudio de la **reactividad de los nuevos derivados de uracilo N3-cloroetilados 8**. De ellos se han podido obtener, tanto los derivados de oxazolopirimidinona **6 y 7**, como los derivados de uracilo N3, C6-disustituidos **9**.

5. Se han obtenido **una veintena de productos finales no fluorados** que serán objeto de estudio de actividad biológica en el capítulo 3.

**Capítulo 2**  
***Derivados de uracilo y pirimidinona fluorados***



## 2.1 Introducción

### 2.1.1. El Flúor

#### a. Breve reseña histórica<sup>69</sup>

La historia del aislamiento del flúor (del latín *fluere*, flujo), pone de manifiesto la elevada reactividad y consecuente peligrosidad de este elemento.<sup>70</sup> El flúor, como parte constituyente del mineral fluorita,  $\text{CaF}_2$ , fue descrito en 1529 por Georgius Agricola manifestando su uso para conseguir la fusión de metales o minerales. En 1670, Schwandhard observó que la fluorita, previamente tratada con algún ácido, permitía grabar el vidrio. Sin embargo, hubo que esperar hasta el último tercio del siglo XVIII, para que los científicos se propusieran seriamente aislar y conocer mejor el peligroso elemento. De este modo, casi simultáneamente, dos investigadores –Margraf y Scheele- se dedicaron a estudiar el ácido fluorhídrico. Margraf comenzó en 1768, en tanto que Scheele<sup>71</sup> lo hizo tres años más tarde.

Ya iniciado el siglo XIX, Lavoisier, incluyó el ácido fluorhídrico como un cuerpo simple en su tabla de elementos, si bien pensaba que contenía oxígeno.<sup>72</sup> Ampere, por su parte, sospechaba que el ácido fluorhídrico era análogo al clorhídrico, opinión que comunicó a Davy, junto con la sugerencia de que la sustancia desconocida combinada con el hidrógeno en el ácido fluorhídrico podría aislarse vía electrolisis del ácido anhidro usando un ánodo de carbón.<sup>73</sup> Es la extrema actividad de este elemento lo que hace que su liberación sea tan difícil

---

<sup>69</sup> García Asuero, A. *Los halógenos, ¿materia mineral farmacéutica?* An. R. Acad. Nac. Farm., 2008, 74: 51-64.

<sup>70</sup> Trifonov, D. N.; Trifonov V. D. *Cómo fueron descubiertos los Elementos Químicos*, Mir, Moscou, 1990, pp. 98-110.

<sup>71</sup> Scheele, *Halogènes et composés oxygénés du chlore: memories de Scheele, Berthollet, Gay Lussac et Thenard, H. Davy, Balard, Courtois, H. Moissan, Million, Gauthier-Villars*, Paris, 1938.

<sup>72</sup> (a) Weeks, M. E. *J. Chem. Educ.* **1932**, 9, 1915-1939.

<sup>73</sup> Wisniak, J. *Ind. J. Chem. Technol.* **2002**, 9, 363-372.

y peligrosa. Muchos investigadores durante este siglo, Davy, Faraday, Gay Lussac, Thenard, los hermanos Knox, Louyet, Nicklès, sufrieron los efectos insidiosos del ácido fluorhídrico, cuestionando su salud e incluso su vida.<sup>70, 74</sup>

**Tabla 2.1:** Hitos en la historia de la Química del flúor y sus compuestos<sup>16</sup>

Año	Investigador	Observación o descubrimiento
1771	Scheele	La mezcla de espato flúor y ácido sulfúrico desprende un gas que ataca al vidrio
1780	Meyer y Wenzel	Preparan una solución acuosa de ácido fluorhídrico
1808	Gay-Lussac y Thénard	Preparan ácido fluorhídrico anhidro
1810	Ampère	El ácido fluorhídrico es análogo al ácido clorhídrico
1835	Dumas y Péligot	Fluorometano por reacción de fluoruro potásico con sulfato de metilo
1854	Frémy	Fluoroetano
1856	Frémy	Preparación de ácido fluorhídrico anhidro por descomposición térmica del fluoruro doble de hidrógeno y potasio
1860	Borodin <sup>a</sup>	Fluoruro de benzoilo por reacción de cloruro de benzoilo con el fluoruro doble de hidrógeno y potasio
1860	Moissan	Prepara flúor por electrolisis de fluoruro de hidrógeno anhidro (Frémy)
1870	Schmitt y Gehren	Primera introducción de flúor en un aromático por reacción de una sal de diazonio
1883	Paternò y Oliveri	Fluorobenceno
1886	Wallach	Fluorobenceno por diazoación de anilina en fluoruro de hidrógeno
1890 - 1930	Swarts	Fluoraciones de compuestos orgánicos
1927	Balz y Schiemann	Descomposición del tetrafluoroborato de bencenodiazonio: fluorobenceno
1936	Gottlieb	S <sub>N</sub> Ar entre 2,4-dinitroclorobenceno y fluoruro potásico
1939-1945	2ª Guerra Mundial	La reacción de Balz-Schiemann es un método industrial
1939-1945	2ª Guerra Mundial	Proyecto Manhattan. Separación de isótopos de uranio por volatilidad diferencial de los hexafluoruros.

<sup>74</sup> Moissan, H. *Ann. Chim. Phys.* **1887**, 12, 472-537.

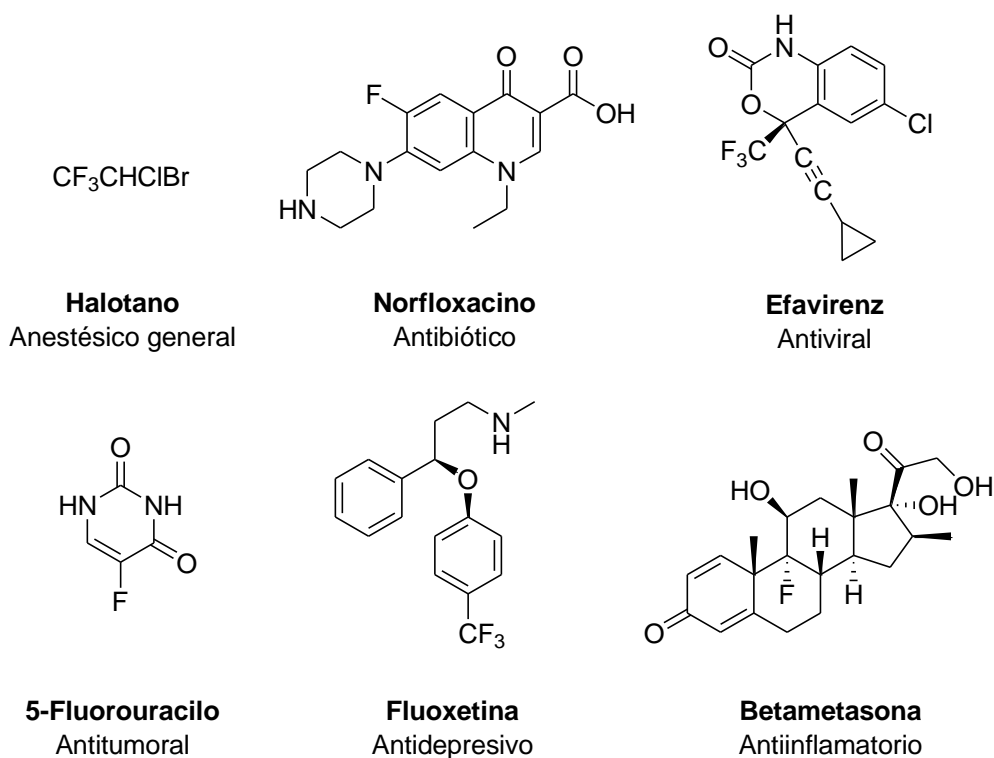
La solución al problema era compleja, aunque Fremy, llevando a cabo la electrolisis de fluoruros de calcio o potasio fundidos la tuvo cerca.<sup>71</sup> El dilema consistía en que el agua debía estar ausente, pero el ácido fluorhídrico anhidro era muy mal conductor. Moissan resolvió el enigma, en junio de 1886, incrementando la conductividad del fluoruro de hidrógeno añadiendo fluoruro de hidrógeno y potasio totalmente anhidro, trabajando a baja temperatura y construyendo el dispositivo apropiado.<sup>74, 75</sup>

Las dificultades experimentales y peligros asociados reflejan la escasa cantidad de trabajos publicados sobre la química del elemento hasta la II Guerra Mundial.<sup>73</sup> El procedimiento de difusión para enriquecer el uranio isotópico, en forma de hexafluoruro, en el marco del proyecto Manhattan, destinado a conseguir el arma nuclear, obligó a disponer de flúor y de ácido fluorhídrico a escala industrial.<sup>75d</sup> Fruto de la investigación surgen nuevos materiales con propiedades excepcionales: Teflón, Tefal, Gore-Tex, etc.<sup>75b</sup>

Ya a principios de los cincuenta (figura 2.1) emerge la química orgánica y bioinorgánica del flúor disponiendo el arsenal terapéutico de anestésicos generales (Halotano), antidepresivos (Prozac), antiinflamatorios (Betametasona), antitumorales (5-Fluoracilo, Gemcitabina), antibióticos (Norfloxacino), o antivirales (Efavirenz).<sup>75b</sup> A pesar de estos logros, los esfuerzos realizados en la actualidad están más orientados hacia la química de nuevos materiales que a la bioinorgánica. Las aplicaciones de los compuestos fluorados en variados campos parecen carecer de límites.<sup>75c</sup>

---

<sup>75</sup> (a) Kauffman, G. B. *Chem. Educator* **2007**, *12*, 37-46. (b) Número Especial (2006): Fluor et produits fluorés à l'aube du XXIe siècle. A l'occasion du centenaire du prix Nobel Henri Moissan. *L'actualité chimique* 301-302, 159 pp., 2006. (c) Tressaud, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6792-6796. (d) Banks, D. W. A.; Sharp, J.; Tatlow: *Fluorine. The First Hundred Years*, Elsevier, Lausanne, Switzerland, 397 pp., 1986.



**Figura 2.1** Ejemplos tempranos de fármacos fluorados

### *b. El Flúor y sus propiedades*

El flúor es, a temperatura ambiente, un gas de color amarillo pálido, formado por moléculas diatómicas  $F_2$ . El átomo de flúor es el más electronegativo y reactivo de todos los elementos y la molécula, en su forma pura es altamente peligrosa, causando graves quemaduras al contacto con la piel. Es además, el halógeno más abundante en la corteza terrestre, con una concentración de 950 ppm. En el agua de mar, sin embargo, la proporción es mucho menor, de aproximadamente 1,3 ppm. Los minerales más importantes en los que está presente son fluorita,  $CaF_2$ , fluorapatito,  $Ca_5(PO_4)_3F$  y criolita,  $Na_3AlF_6$ .

El flúor posee un único isótopo natural,  $^{19}F$ , con un número cuántico de espín nuclear de  $\frac{1}{2}$ , frecuentemente empleado en espectroscopía de resonancia magnética nuclear para identificar compuestos fluorados.



Como fluoruro está presente en mamíferos en pequeñas cantidades (oligoelemento). Se acumula en huesos y dientes dándoles una mayor resistencia.

El tamaño del átomo de flúor es mayor que el del átomo de hidrógeno, pero es lo suficientemente pequeño como para pensar que la posible sustitución de todos los átomos de hidrógeno por flúor puede dar lugar a una química basada en el flúor y, en teoría, tan variada como la química orgánica convencional basada en el protio.<sup>76</sup> La energía del enlace C-F es la más alta de entre todos los enlaces simples usuales en química orgánica, y también es mayor que la del enlace entre el carbono y cualquier otro halógeno. Por tanto, los compuestos fluorados son cinéticamente estables.

**Tabla 2.2** Algunas características del flúor y de los compuestos fluorados<sup>76</sup>

<b>Radios de Van der Waals</b>		<b>Longitudes de enlace</b>	
	F 1.35 Å		C-H 1.08 - 1.11 Å
	H 1.10 Å		C-F 1.26 - 1.41 Å
			C-Cl 1.78 Å
<b>Energías de Enlace</b>		<b>Flúidos perfluorocarbonados (PFC)</b>	
C-C	348 kJ/mol		<i>Pto. Fusión</i>
C-H	412 kJ/mol	C <sub>6</sub> F <sub>14</sub>	57 °C
C-I	238 kJ/mol	C <sub>8</sub> F <sub>18</sub>	105 °C
C-Br	276 kJ/mol	(C <sub>5</sub> F <sub>11</sub> ) <sub>3</sub> N	220 °C
C-Cl	338 kJ/mol		
C-F	484 kJ/mol		
<b>Volatilidad</b>			
		P. ebul. del n-perfluoroheptano (C <sub>7</sub> F <sub>16</sub> ): 82 °C	
		P. ebul. del n-heptano (C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> ): 92 °C	

Una de las sustituciones bioisósteras más desarrollada es la incorporación de átomos de flúor en lugar de átomos de hidrógeno, como ocurre en 5-fluoruracilo respecto al uracilo (figura 2.1). La sustitución H-F puede resultar tan interesante en la búsqueda de ligandos de interés biológico, que se ha acuñado el nombre de flustratos (“fluorine-containing-substrates”) para los compuestos fluorados

<sup>76</sup> Moreno Mañas, M. *Flúor, el halógeno redivivo*, An. R. Soc. Esp. Quim. Abril-Junio, 2005.

análogos al sustrato de una determinada enzima.

Como se deduce de la tabla 2.2, el enlace C-F es el más fuerte de aquéllos en los que está implicado el carbono por lo que, aunque es muy polar, es estable en la mayoría de las condiciones experimentales. Además, debido a que los electrones del flúor tienen muy baja polarizabilidad, los compuestos fluorados son más volátiles y lipófilos que los hidrogenados.

Por otra parte, la sustitución por flúor produce efectos enormes en los grupos funcionales próximos. Así, el pKa de etanol es 16, mientras que el pKa del trifluoroetanol es 12,4. Esto significa que el anión de este último es 21 kJ/mol más estable que el anión etóxido.

La introducción de F como sustituyente en un anillo aromático produce, en general, cambios pequeños en sus propiedades pero, en este caso, el metabolismo oxidativo está inhibido por el carácter electrón-atrayente del flúor, por lo que estos fármacos pueden administrarse en menores dosis. Algunas de las propiedades de los enlaces C-H y C-F se comparan a continuación:

Es curioso comprobar que el punto de ebullición de heptano (92 °C, tabla 2.2) es mayor que el del perfluoroheptano (82 °C), a pesar del peso molecular mucho mayor de este último. Eso es un indicio más de la fobia que tienen las cadenas fluoradas incluso hacia sí mismas. Una consecuencia de este fenómeno es la existencia de sartenes antiadherentes, que contienen una capa de poliperfluoroetileno  $-(CF_2-CF_2)_n-$  en su superficie. Empieza a ser no tan extraño que el flúor goce del privilegio de una revista entera dedicada a su química, *Journal of Fluorine Chemistry*, hecho que no ocurre con ningún otro halógeno. También influye el hecho de que el flúor es, como se ha dicho, el halógeno más abundante en la corteza terrestre,<sup>75</sup> ocupa la posición 13 en mg/kilogramo, sin contar los mares y la atmósfera. El siguiente halógeno, el cloro, ocupa el lugar 20. Es decir, el flúor es un elemento relativamente abundante en la corteza terrestre, y el único de origen fundamentalmente terrestre.

Finalmente, las propiedades magnéticas del flúor, en especial su sensibilidad relativa, facilitan la investigación de los procesos en los que intervienen moléculas fluoradas por RMN:

$^1\text{H}$  (espín 1/2): 1.00       $^{19}\text{F}$  (espín 1/2): 0,83       $^{13}\text{C}$  (espín 1/2): 0,016

### *c. Algunas aplicaciones prácticas*

Los efectos del flúor en la actividad biológica de los compuestos orgánicos son muy variados. En general, podemos introducir el flúor en una molécula con actividad biológica con diversos fines:

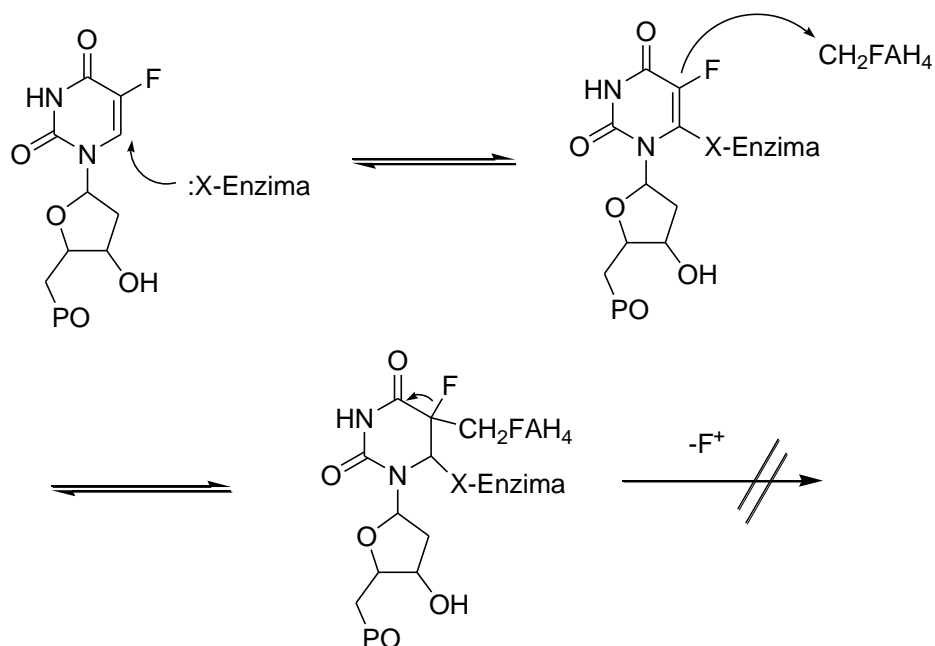
a) Para bloquear un mecanismo determinado mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno. La similitud de tamaños entre el hidrógeno y el flúor y la capacidad de este último para formar enlaces por puente de hidrógeno intensifican la unión del sustrato con el enzima respecto al mismo producto no fluorado. Así, por ejemplo, se han sintetizado diversos análogos fluorados de aminoácidos,<sup>77</sup> que han resultado ser potentes antagonistas y agonistas de aminoácidos naturales.

Un ejemplo de sustrato capaz de bloquear la acción de un enzima es 5-fluorouracilo (5-FU) que, en el organismo, es transformado en 5-fluoro-2'-deoxiuridilato, que inhibe la timidilato sintetasa irreversiblemente mediante la formación de un complejo ternario con ésta y ácido tetrahidrofólico, impidiendo así la formación de ácido timidílico, componente esencial de ADN; así, 5-FU se ha empleado con éxito en el tratamiento de diferentes cánceres (Esquema 2.1).<sup>78</sup>

---

<sup>77</sup> (a) Kukhar, V. P.; Soloshonok, V. A. *Fluorine-containing Amino Acids, Synthesis and Properties*, Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1994. (b) Tolman, V. *Amino Acids* **1996**, *11*, 15-36.

<sup>78</sup> (a) Heidelberger, C.; Chaudhuri, N. K.; Danneberg, P.; Mooren, D.; Griesbach, L.; Duschinsky, R.; Schnitzer, R. J.; Plevin, E.; Schneider, J. *Nature*, **1957**, *179*, 663-666. (b) Kirk, K. L. *Biochemistry of Halogenated Organic Compounds, Biochemistry of the Elements*, Vol 9B; Plenum, New York, NY, 1991, p 127-150.



Enzima: Timidilato sintetasa  
 $\text{CH}_2\text{FAH}_4$ : Ácido Tetrahidrofólico

### Esquema 2.1

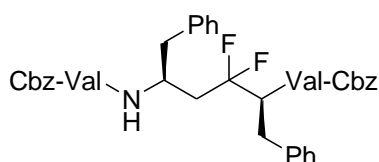
b) Estudio del mecanismo de determinados enzimas. La capacidad del flúor para actuar como grupo saliente, en unos casos, y para impedir su eliminación, en otros, ha sido empleada con efectividad para determinar los detalles mecanísticos de reacciones enzimáticas como la biosíntesis de terpenos<sup>79</sup> y peptidoglicanos.<sup>80</sup>

c) Para estabilizar enlaces peptídicos, debido a que modifican la reactividad de grupos funcionales adyacentes, pudiendo así retrasar la degradación enzimática. Esto es muy útil cuando se trata de péptidos que se utilizan con fines terapéuticos ya que, mediante la introducción del flúor, se intensifican las interacciones con el receptor y se incrementa la actividad, permitiendo así, por ejemplo, el uso en dosis menores, contribuyendo a la disminución de su

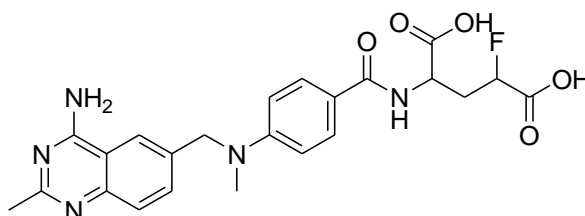
<sup>79</sup> Poulter, C. D.; Rilling, H. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *11*, 307-313.

<sup>80</sup> a) Kim, D. H.; Lees, W. J.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6478-6479. b) Kim, D. H.; Lees, W. J.; Haley, T. M.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1494-1502. c) Kim, D. H.; Lees, W. J.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6380-6381.

toxicidad.<sup>81</sup> Otro ejemplo, son los peptidomiméticos inhibidores de la aspartil proteasa del virus HIV, que contienen dos átomos de flúor contiguos al enlace peptídico; como consecuencia, el enzima se une al substrato pero es incapaz de hidrolizar el enlace peptídico (Figura 2.2).<sup>82</sup>



**Inhibidor de la proteasa del HIV**



**Metotrexato fluorado**

**Figura 2.2**

d) Aumento de la lipofilia y, en consecuencia, de su biodisponibilidad, lo cual es de gran importancia en fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central, ya que la incorporación de flúor a las moléculas permite el acceso de éstas al cerebro (aunque esto depende en gran medida de su posición en la molécula),<sup>83</sup> lo que aumenta su biodisponibilidad. Esto resulta interesante en fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central, ya que facilita su acceso al cerebro, como ocurre con antidepresivos como Fluoxetina<sup>84</sup> y Paroxetina.<sup>85</sup>

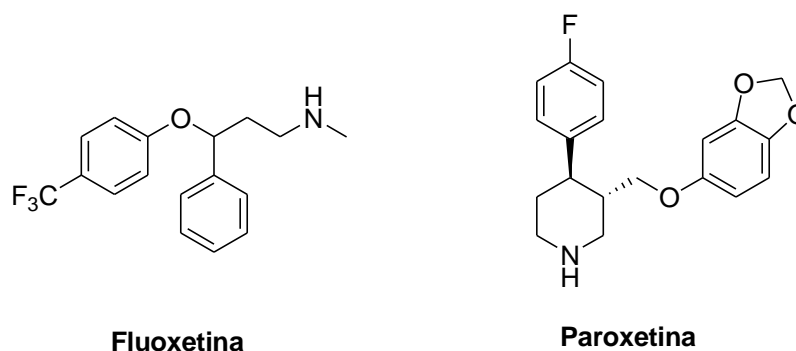
<sup>81</sup> (a) Coward, J. K.; McGuire, J. J.; Galivan, J. en *Selective Fluorination in Organic and Bioorganic Chemistry*; Welch, J. T., Eds.; American Chemical Society: Washington, D. C., 1991; p 196-204. (b) Tsushima, T.; Kawada, K.; Ishihara, S.; Uchida, N.; Shiratori, O.; Higaki, J.; Hirata, M. *Tetrahedron* **1988**, *444*, 5375-5387.

<sup>82</sup> Sham, L. S. "Fluorine-Containing Peptidomimetics as Inhibitors of Aspartyl Proteases" en en *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry*, Ojima, I.; McCarthy, J.R.; Welch, J. T., ACS. Symp. Series, 639, American Chemical Society: Washington, D.C., 1996, p 184-195.

<sup>83</sup> Smart, B. E. En *Organofluorine Chemistry: Principles and Commercial Applications*; Banks, R. E.; Smart, B. E.; Tatlow, J. C., Eds.; Plenum Press, New York, 1994, p. 57.

<sup>84</sup> Molloy, B.; Schmiegel, K. K. *German Patent* 2,500,110 (1975).

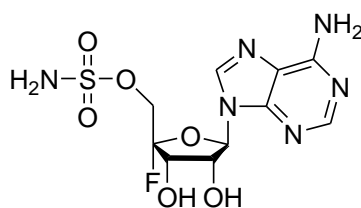
<sup>85</sup> Christensen, J. A.; Squires, R. F. *German Patent* 2,404,113 (1974).



**Figura 2.3**

*d. Estrategias sintéticas*

En la naturaleza existen muy pocos compuestos organofluorados. Entre los escasos ejemplos, podemos citar la sal potásica de fluoroacetato ( $\text{CH}_2\text{FCO}_2\text{H}$ ), primer metabolito fluorado que se aisló de la especie *Dichapetalum cymosum*,<sup>86</sup> y nucleocidina (Figura 2.4), que es un antibiótico producido por el microorganismo *Streptomyces calvus*. Es, por ello, que todos estos derivados fluorados hayan de prepararse mediante síntesis química.



**Nucleocidina**

**Figura 2.4**

La introducción de flúor en los compuestos orgánicos ha sido ampliamente estudiada debido a los efectos que este átomo provoca en su estructura, estabilidad, reactividad y actividad biológica. Ello ha permitido diseñar y preparar nuevos derivados biológicamente más selectivos y más potentes, por lo que el

<sup>86</sup> (a) Marais, J. S. C. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim.* **1943**, 18, 203. (b) Marais, J. S. C. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim.* **1944**, 20, 67.

número de compuestos organofluorados ha crecido considerablemente en los últimos años.

Los ejemplos siguientes<sup>87</sup> pueden servir para ilustrar estos hechos (Figura 2.5). Los compuestos no fluorados estructuralmente similares son menos activos o muestran un patrón diferente de actividad. Fluazinam es un fungicida que actúa sobre las mitocondrias de los hongos, lo que se traduce en una acción fungicida de múltiples niveles. Fluometuron es derivado fluorado de urea con actividad herbicida, ya que impide la fotosíntesis en las plantas sensibles, inhibiendo, además, la síntesis de carotenos. Por último, Lufenuron, es un insecticida multifluorado que interfiere en el metabolismo de quitina.

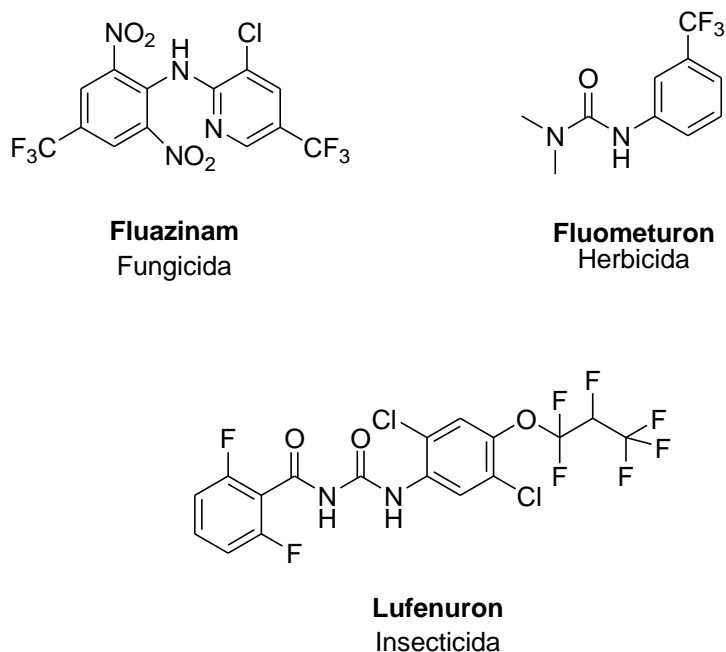


Figura 2.5

Desde que, en 1882 Moissan aisló por primera vez flúor gas, uno de los principales problemas con el que se han encontrado los químicos ha sido el de controlar la violencia con la que éste reacciona con compuestos hidrocarbonados.

<sup>87</sup> Liñán, C. *Vademecum 2009 de productos fitosanitarios y nutricionales*, Ed. Aerotécnicas, S.L., 2009.

En términos generales, podemos distinguir tres estrategias para la síntesis de derivados fluorados de compuestos orgánicos:

1.- Introducción directa de flúor en una molécula mediante la utilización de reactivos capaces de sustituir ciertos grupos funcionales por flúor. Este método presenta algunos problemas, como son la dificultad para controlar la regio- y estereoquímica, la incompatibilidad con otros grupos funcionales de la molécula, y la peligrosidad y elevado coste de la mayoría de los agentes de fluoración. En general, existen dos tipos de reactivos para llevar a cabo este procedimiento:

1.a Los agentes de fluoración electrofílicos, que proporcionan iones fluoronio ( $F^+$ ), si bien estos iones no han sido aislados como tales en forma libre o solvatados. Entre ellos destacan N-Fluorobencenosulfinimida (NFSI)<sup>88</sup> y Selectflúor<sup>TM</sup> (F-TEDA- $BF_4$ )<sup>89</sup> (Figura 1.8). Este último es una sal de N-fluoroamonio y constituye uno de los agentes de fluoración electrofílica más generales y fáciles de utilizar, ya que es sólido, poco agresivo, no explosivo y poco tóxico.

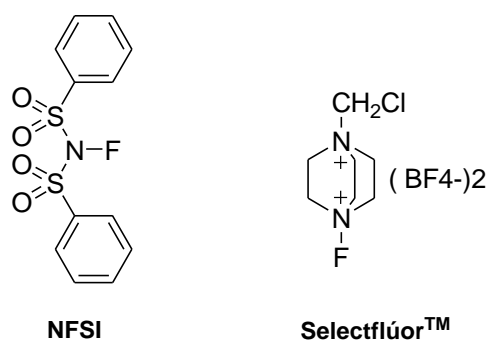


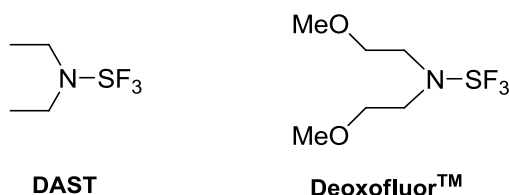
Figura 2.5

<sup>88</sup> Konas, D. W.; Coward, J. K. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2105-2107.

<sup>89</sup> (a) Revisión: Banks, R. E. *J. Fluorine Chem.* **1998**, *87*, 1-17. (b) Banks, R. E.; Lawrence, N. J.; Besheesh, M. K.; Popplewell, A. L. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 343-344. (c) Revisión: Taylor, S. D.; Kotoris, C. C.; Hum, G. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 12431-12477.



1.b. Los agentes de fluoración nucleofílicos son aquéllos que proporcionan iones fluoruro ( $F^-$ ), como los dialquilaminotrifluorosulfuranos tipo DAST (dietilaminotrifluorosulfurano)<sup>90</sup> y, el más actual, Deoxofluor<sup>TM</sup> (dimetoxietilaminotrifluorosulfurano)<sup>91</sup> (Figura 2.6), mucho más estable que DAST (debido a la rigidez conformacional impuesta por la coordinación de los grupos alcoxi con el átomo de azufre electrón-deficiente del grupo trifluoruro)<sup>91b</sup> y efectivo, tanto en la conversión de alcoholes en fluoruros de alquilo, como de aldehídos o cetonas en sus correspondientes gem-difluoruros, y de ácidos carboxílicos en derivados trifluorometilados.



**Figura 2.6**

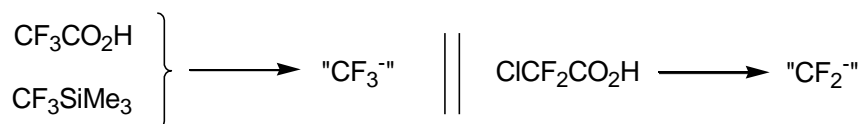
2.- Introducción directa de agrupaciones fluoradas, difíciles de introducir mediante el uso de agentes de fluoración, como, por ejemplo, los grupos trifluorometilo ( $CF_3$ ) y difluorometilo ( $CF_2$ ). La mayoría de procesos desarrollados en este sentido se basan en la reacción de compuestos perfluorados (ver figura 2.7), como los ácidos trifluoro o difluoroacético ( $XCF_2COOH$ ) y derivados organosilícicos  $R_FSiMe_3$  (un ejemplo es el reactivo de Ruppert<sup>92</sup> o (trifluorometil)trimetilsilano) con compuestos carbonílicos o alílicos en presencia de algunos metales específicos.<sup>93, 94</sup>

<sup>90</sup> (a) German, L.; Zemskov, S. En *New Fluorinating Agents in Organic Synthesis*, Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, New York, London, París, Tokyo, Hong Kong, 1989. (b) Middleton, W. J.; Bingham, E. M. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2883-2887.

<sup>91</sup> (a) Lal, G. S.; Pez, G. P.; Pesariesi, R. J.; Prozonic, F. M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1999**, 215-216. (b) Lal, G. S.; Pez, G. P.; Pesariesi, R. J.; Prozonic, F. M.; Cheng, H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7048-7054. (c) Singh, R.; Twamley, B.; Shreeve, J. M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1918-1924.

<sup>92</sup> Ruppert, I.; Schlich, K.; Volbach, W. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2195-2198.

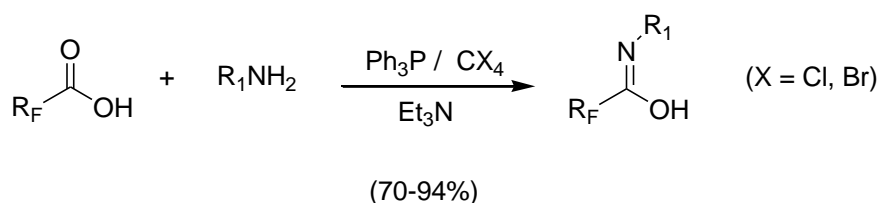
<sup>93</sup> (a) Kurishnamurti, R.; Bellew, F. R.; Prakash, G. K. S. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 984-989. (b) Yudin, A.



**Figura 2.7**

3.- Utilización de "building blocks", es decir, moléculas convenientemente funcionalizadas que contienen átomos de flúor, como materiales de partida para la obtención de los compuestos organofluorados objeto de síntesis. Este método está bastante más extendido y permite, a menudo, la introducción regio y estereoselectiva de flúor o sustituyentes fluorados.<sup>95</sup>

Entre ellos cabe destacar los derivados organosilícicos  $\text{R}_F\text{SiMe}_3$ , que transfieren grupos alquilo perfluorados,<sup>96</sup> y, fundamentalmente, los haluros de imidoílo perfluoroalquilados, obtenidos por Uneyama<sup>97</sup> por reacción "one pot" entre ácidos carboxílicos fluorados y aminas en presencia de  $\text{Ph}_3\text{P}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$  y  $\text{CX}_4$  ( $\text{X} = \text{Cl}$ ,  $\text{Br}$ ) (Esquema 2.2).



**Esquema 2.2**

En nuestro grupo de investigación, estos haluros de imidoílo fluorados han sido utilizados como material de partida en la preparación de diferentes

K.; Prakash, G. K. S.; Deffieux, D.; Bradley, M.; Bau, R.; Olah, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1572-1581. (c) Prakash, G. K. S.; Yudin, A. K. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 757-786.

<sup>94</sup> Prakash, G. K. S.; Mandal, M.; Olah, G. A. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2847-2850.

<sup>95</sup> Welch, J. T.; Eswarakrishnan, S. *Fluorine in Bioorganic Chemistry*, Wiley, New York, **1991**, pp.7, y referencias citadas.

<sup>96</sup> Prakash, G. K.; Yudin, A. K. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 757.

<sup>97</sup> Uneyama, K.; Tamura, K.; Mizukami, H.; Maeda, K.; Watanabe, H. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 32.

compuestos 1,3-difuncionalizados. De este modo, podemos obtener  $\beta$ -iminosulfóxidos fluorados,  $\beta$ -enaminoésteres fluorados,  $\beta$ -enaminoácidos N-sustituidos fluorados,  $\beta$ -iminosulfonas fluoradas,  $\beta$ -enaminocetonas fluoradas y  $\beta$ -diiminas fluoradas.<sup>98</sup>

### 2.1.2. Derivados fluorados de uracilo y pirimidinona

Los compuestos heterocíclicos fluorados juegan un papel importante en los campos de la medicina y de la agroquímica. Dentro de este tipo de sistemas, algunos derivados de uracilo y pirimidinona han demostrado poseer una elevada actividad biológica, tanto farmacológica como agroquímica.

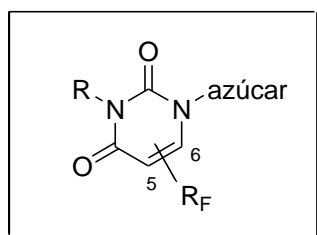
En lo que a los derivados fluorados de uracilo se refiere y en general, se puede decir que la actividad biológica de la molécula viene definida por la posición del sustituyente fluorado en el anillo de uracilo: en C5 o C6 (figura 2.8). Los derivados fluorados en C5 presentan actividad como antitumorales,<sup>99</sup> en tanto que los segundos, los derivados fluorados en C6, manifiestan actividad herbicida, insecticida y acaricida.<sup>100</sup>

---

<sup>98</sup> (a) Fustero, S.; García, M.; Pina, B.; Simón, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5551. (b) Fustero, S.; Pina, B.; García, M.; Navarro, A.; Ramírez, C.; Simón, A. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 977. (c) Fustero, S.; Navarro, A.; Pina, B.; García Soler, J.; Bartolomé, A.; Asensio, A.; Bravo, P.; Fronza, G.; Volonterio, A.; Zanda, M. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2621. (d) Fustero, S.; Salavert, E.; Pina, B.; Ramírez, C.; Asensio, A. *Tetrahedron Symposia-in-print* **88**. Ed. Hruby. (e) V.J. and Soloshonok, V.A. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6475.

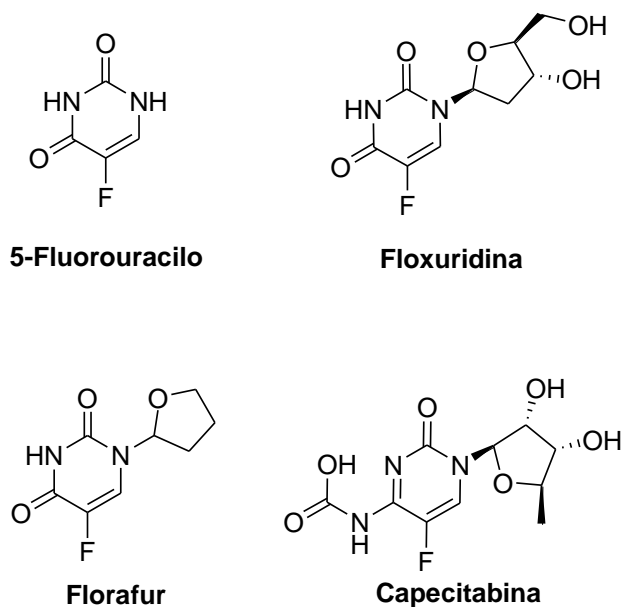
<sup>99</sup> Davis, M. E. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 111

<sup>100</sup> (a) Meazza, G.; Paravidino, P.; Bettarini, F.; Fornara, L. (Isagro Ricerca S.r.l., Italy) WO2004056785, 2004. (b) Zagar, C.; Burnhams, A.; Dombo, P.; Landes, A.; Sievernich, B.; Vantieghem, H. (BASF Aktiengesellschaft, Germany) WO2004081129, 2004. (c) Schwarz, H.; Andree, R.; Hoischen, D.; Kluth, J.; Linker, K-H; Vidal-Ferran, A.; Drewes, M. W.; Dahmen, P.; Feudht, D.; Pontzen, R. (Bayer CropScience AG, Germany) WO2003093244, 2003. (d) Toyama, Y. (Sumimoto Chemical Co., Ltd., Japan) JP 2003286285, 2003. (e) Schallner, O; Hoischen, D.; Drewes, M. W.; Dahmen, P; Feucht, D.; Pontzen, R. (Bayer Aktiengesellschaft, Germany) WO 2003006461, 2003 (f) Theodoridis, G.; Crawford, S. D. (FMC Corporation, USA) US 6277847 B1, 2001. (g) Yagi, K.; Akimoto, K. Mimori, N.; Miyake, T. Kudo, M.; Arai, K.; Ishii, S. *Pest Manag. Sci.* **2000**, *56*, 65-73. (h) (i) Grossmann, K.; Christiansen, N.; Looser, R.; Ehrhardt, T.; *Weed Sci.* **2010**, *58*, 1-9.



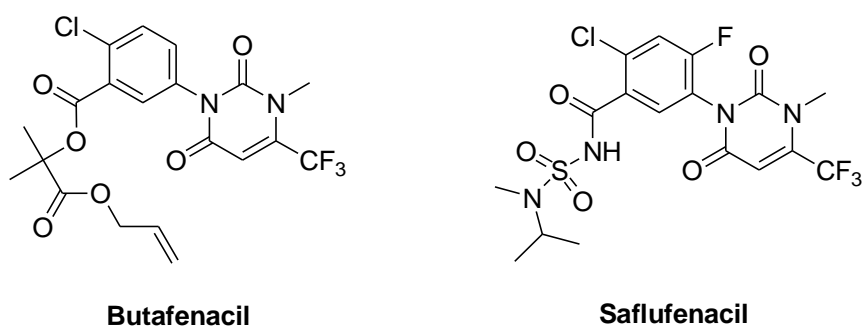
**Figura 2.8**

Como ya apuntábamos en el primer capítulo, 5-fluorouracilo es un antineoplásico que lesiona las células por dos mecanismos: a) inhibición de la timidilato sintetasa, y b) incorporación al ARN. De él derivan toda una familia (figura 2.9) de compuestos: su desoxirribonucleósido Floxuridina y Florafur (tegafur) que sustituye a desoxirribosa por un grupo tetrahidrofurano. Además, Capecitabina, un análogo de histidina que, se convierte en 5-Fluorouracilo a través de una secuencia de reacciones intracelulares.



**Figura 2.9**

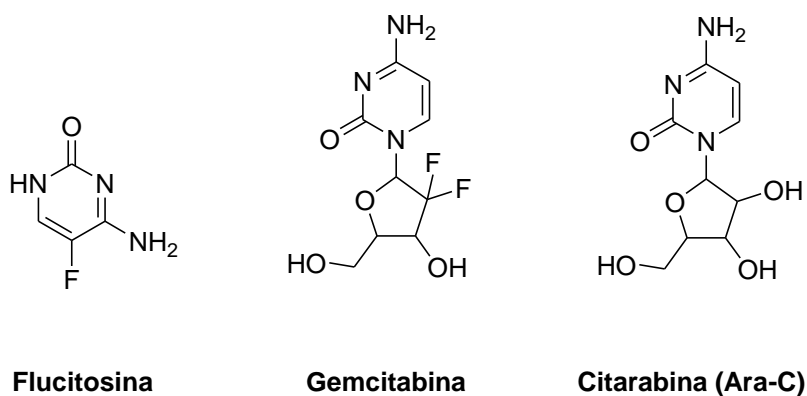
Entre los derivados fluorados de uracilo en C6 con actividad plaguicida, la mayoría están protegidos por patentes; un ejemplo comercializado recientemente (registrado en EPA en 2003) es Butafenacil<sup>101</sup> (figura 2.10), un herbicida activo para el control de malezas en uvas, cultivos de nueces, frutos pomáceos y de hueso y también como defoliante en algodón. Su acción es la de inhibidor Protoporfirinogeno oxidasa, no-selectivo, siendo absorbido por contacto con las hojas. Otro ejemplo, de aún más reciente comercialización (2010) es Saflufenacil<sup>100h</sup> (Kixor<sup>TM</sup>), un herbicida eficaz y rápido contra especies de dicotiledóneas.



**Figura 2.10**

Otra pirimidina fluorada que guarda relación con 5-fluorouracilo es Flucitosina, un análogo de citosina de la misma familia que gemcitabina, con actividad antimicótica contra *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata* y los agentes causantes de cromomycosis. Todos estos hongos sensibles son capaces de desaminar flucitosina hasta 5-fluorouracilo, que inhibe la enzima timidilato sintetasa. De la misma familia estructural es el arabinoso de citosina, Citarabina o Ara-C, un nucleósido de citosina en el que el azúcar arabinosa sustituye a ribosa. Es un antineoplásico muy eficaz en el tratamiento de las leucemias. Todos estos compuestos tienen como unidad estructural básica una 2-pirimidinona (figura 2.11).

<sup>101</sup> Maienfisch, P.; Hall, R. G. *Chimia* **2004**, 58, 93-99.



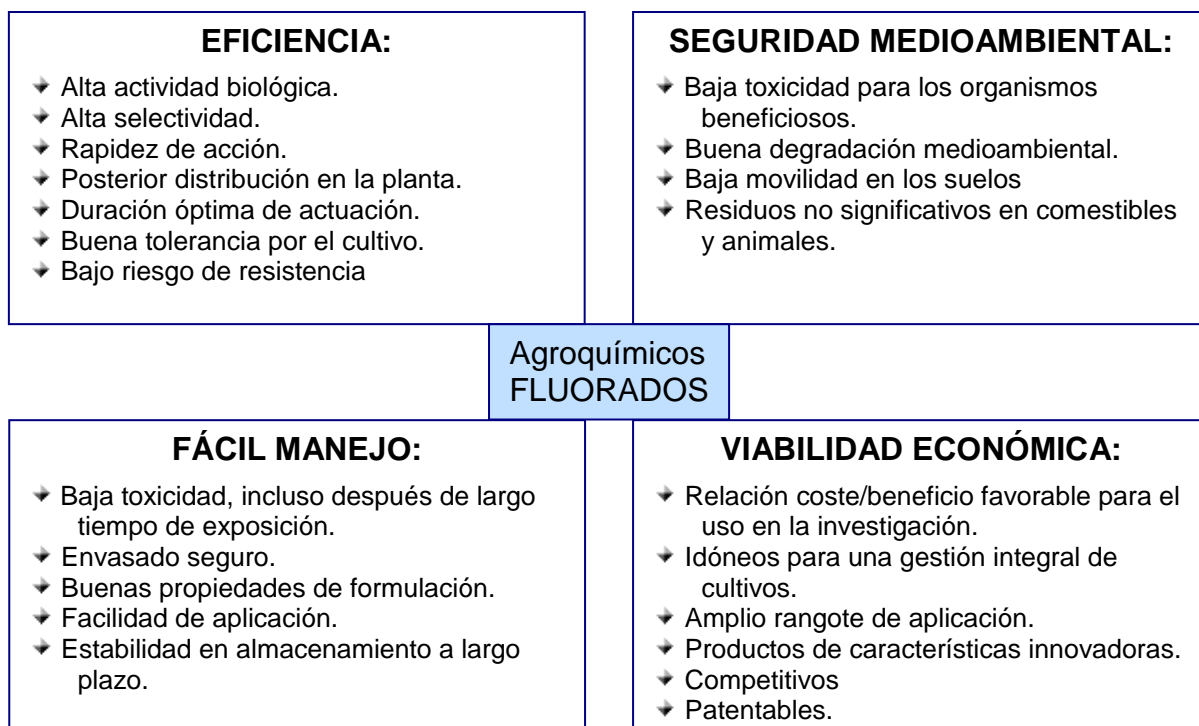
**Figura 2.11**

### 2.1.3 El Flúor en los productos fitosanitarios

Las propiedades pesticidas de los derivados fluorados han centrado el interés de la comunidad bioquímica en los últimos años. En 1978 se conocían aproximadamente unos 600 compuestos con propiedades pesticidas, de los que sólo el 4% contenía átomos de flúor en su estructura. Hoy, más del 17% de los compuestos del mercado destinados a la protección de cultivos son compuestos fluorados, y muchos otros se encuentran actualmente en desarrollo.<sup>101</sup>

En la siguiente figura, se muestran las características generales -y algunas de las ventajas- de los productos agroquímicos fluorados comerciales frente a otros plaguicidas convencionales. Ventajas, tanto a nivel de eficiencia, como de seguridad medioambiental, viabilidad económica o facilidad de manejo de estos compuestos (Figura 2.12).<sup>102</sup>

<sup>102</sup> Peter Jeschke, *Chem. Bio. Chem.* **2004**, 5, 570-589.

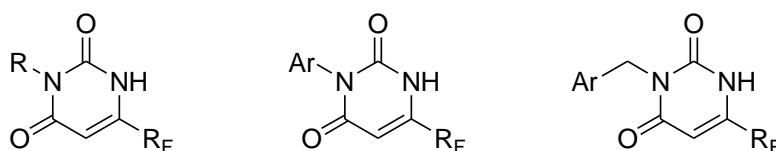


**Figura 2.12**

## 2.2 Antecedentes y Objetivos

### 2.2.1 Objetivos

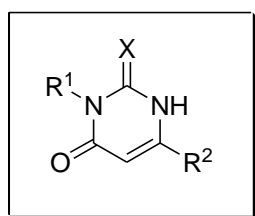
Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, los derivados de uracilo N-3-sustituidos y fluorados en C-6 son de gran importancia biológica (Figura 2.13); sin embargo, no son muchos los métodos que permiten su preparación, en particular aquéllos que poseen una agrupación difluorometilo ( $\text{RCF}_2$ ) en C-6. En nuestro grupo de investigación se desarrollaron dos vías sintéticas diferentes –vía de los  $\beta$ -enaminoésteres y vía de las  $\beta$ -enaminoxazolin- que permiten la obtención de estos derivados fluorados.



*Uracilos fluorados en C6 de importancia biológica*

**Figura 2.13**

El objetivo principal de este capítulo será la síntesis de una batería de derivados de uracilo fluorados susceptibles de poseer actividad biológica.

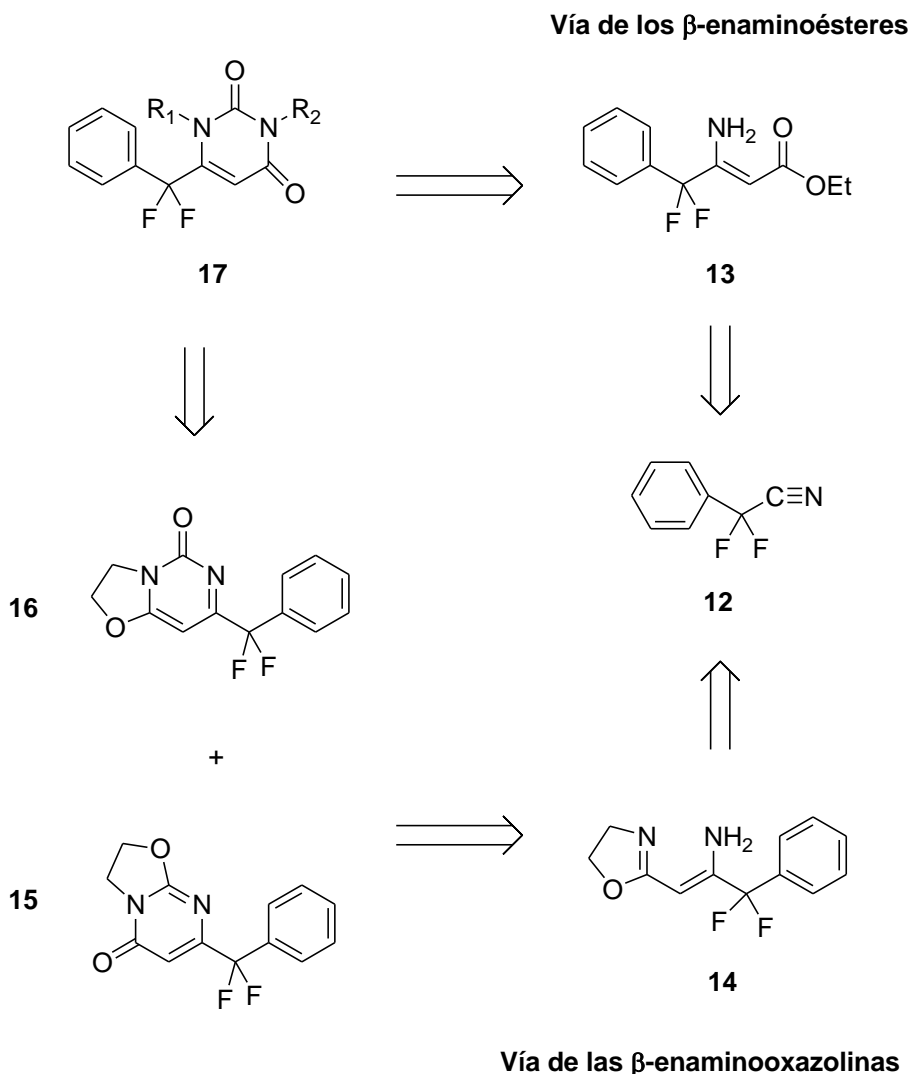


R<sup>1</sup>= Alquilo, alilo, bencilo  
R<sup>2</sup>= ArCF<sub>2</sub>, *p*-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>  
X= O, S

**Figura 2.14**



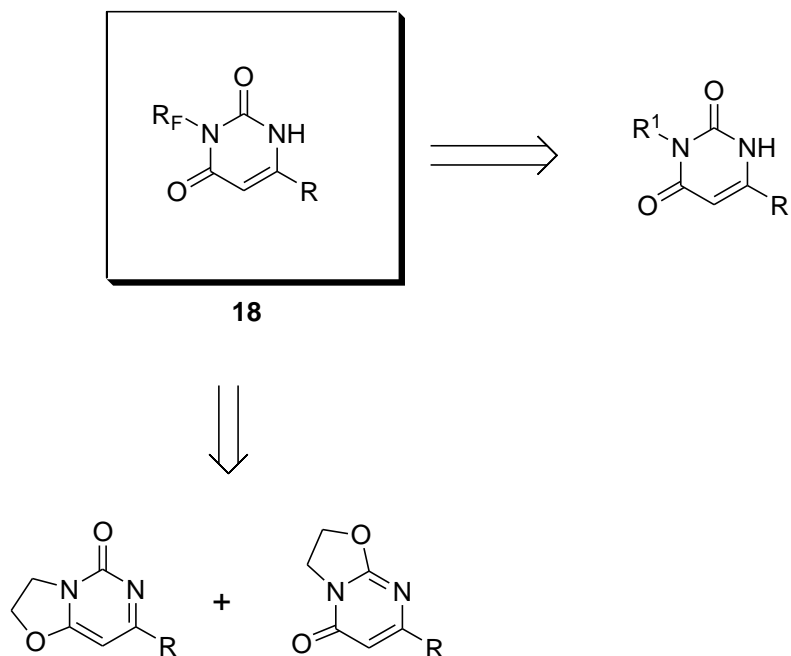
Estudiada la vía de la  $\beta$ -enaminoxazolinas para la obtención de derivados de uracilo y pirimidinona no fluorados (Capítulo 1), se plantea ahora la obtención de derivados fluorados de estos compuestos. Para ello, se utilizará tanto la vía sintética optimizada de las  $\beta$ -enaminoxazolinas, como una nueva vía, denominada vía de los  $\beta$ -enaminoésteres (Esquema 2.1), desarrollada originalmente por el doctor Julio Piera.<sup>28</sup>



**Esquema 2.1**

La vía de los  $\beta$ -enaminoésteres será estudiada en profundidad, procediéndose a su optimización desde escala miligramo hasta multigramo.

Además, y como se indica en el Esquema 2.2, desde diversos derivados de uracilo y oxazolopirimidinona obtenidos previamente, se desarrollarán nuevas reacciones que permitan la introducción de flúor en el sustituyente N3.



**Esquema 2.2**

Todas estas estrategias sintéticas permitirán la obtención de una colección de derivados de uracilo y pirimidinona fluorados cuya actividad biológica será estudiada en el Capítulo 3 de esta Tesis.

### **2.2.2 Antecedentes**

En el primer capítulo se expusieron los antecedentes sintéticos referentes a los derivados de uracilo y pirimidinona; en éste se recogen los relacionados con los compuestos fluorados, así como los referentes a la nueva vía sintética de los  $\beta$ -enaminoésteres.

### 2.2.2.1 Síntesis de $\beta$ -enaminoésteres

Los  $\beta$ -enaminoésteres son sustratos interesantes como *building blocks* para la preparación de un gran número de moléculas debido a su carácter polifuncional.

Su enorme versatilidad se pone de manifiesto en el campo de la síntesis heterocíclica, donde han sido empleados en la preparación de multitud de compuestos como tiazoles y tiazolinonas,<sup>103</sup> pirroles y tiazinas,<sup>104</sup> piperidinas y quinolizidinas,<sup>105</sup> 1,4-dihidropiridinas<sup>106</sup> y pirimidindionas,<sup>107</sup> entre otros. También han sido usados como intermedios en la síntesis de compuestos tan importantes como  $\alpha$ - y  $\beta$ -aminoácidos<sup>108</sup> y  $\gamma$ -aminoalcoholes.<sup>109</sup>

Esta versatilidad sintética se debe a que poseen, por un lado, la función amina conjugada con un doble enlace, que puede ser reducido para obtener los correspondientes  $\beta$ -aminoácidos, originando, de este modo, uno o dos estereocentros. Por otro lado, los  $\beta$ -enaminoésteres contienen la función éster, lo que permite extender la cadena e incorporar otras funciones.

Existe una gran cantidad de estrategias de síntesis de  $\beta$ -enaminoésteres descritas en la bibliografía. De entre todas ellas, la más interesante, por estar estrechamente relacionada con nuestra metodología, es la adición de enolatos de ésteres a nitrilos (Esquema 2.3).

---

<sup>103</sup> (a) Chang, Y. G.; Kim, K.; Park, Y. S. *J. Heterocyclic Chem.* **2002**, *39*, 29-35. (b) Park, Y. S.; Kim, K. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6439-6442.

<sup>104</sup> (a) Lee, L. F.; Schleppek, F. M.; Howe, R. K. *J. Heterocyclic Chem.* **1985**, *22*, 1621-1630. (b) Lee, L. F.; Howe, R. K. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4780-4783.

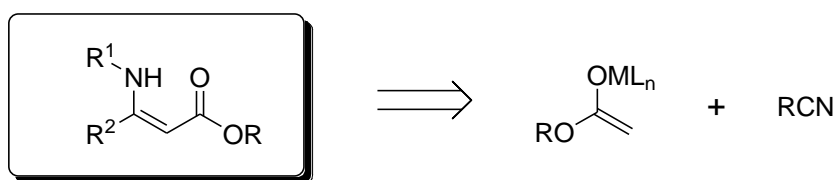
<sup>105</sup> (a) Paulvannan, K.; Schwarz, J. B.; Stille, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 215-218. (b) Paulvannan, K.; Stille, J. R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1613-1620. (c) Barta, N. S.; Brode, A.; Stille, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6201-6206. (d) Cook, G. R.; Beholz, L. G.; Stille, J. R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3575-3584.

<sup>106</sup> (a) Baidur, N.; Rutledge, A.; Triggler, D. J. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3743-3745. (b) Poindexter, G. S.; Licause, J. F.; Dolan, P. L.; Foey, M. A.; Combs, C. M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3811-3820.

<sup>107</sup> Lutz, A. W.; Trotto, S. H. *J. Heterocyclic Chem.* **1972**, *9*, 513-522.

<sup>108</sup> (a) Melillo, P.; Cvetovich, R.; Ryan, R.; Slettinger, M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1498-1504. (b) Chiba, T.; Nagatsuma, M.; Nakai, T. *Chem. Lett.* **1985**, 1343-1346. (c) Jolindon, S.; Meul, T. Eur. Pat. Nr. 0144980 A2; *Chem Abstr.*: 1987, 105, 43325p. (d) Lubell, W. D.; Lombart, H. G. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6147-6149. (e) Cimarelli, C.; Palmieri, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1455-1458. (f) Palmieri, G.; Cimarelli, C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5557-5563. (g) Potin, D.; Dumas, F.; d'Angelo, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3483-3486.

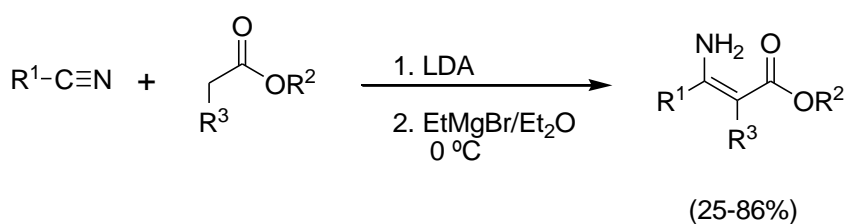
<sup>109</sup> Palmieri, M.; Bartoli, G.; Cimarelli, C.; Marcantoni, E.; Petrini, G. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5328-5335.



**Esquema 2.3**

Esta reacción fue descrita, originalmente, por *Blaise*<sup>110</sup> en 1901, quien llevó a cabo la obtención de  $\beta$ -enaminoésteres *N*-no sustituidos mediante la reacción entre nitrilos y enolatos de zinc. El procedimiento es aparentemente sencillo; sin embargo, está limitado por sus bajos rendimientos debido a reacciones colaterales.

En 1982, *Kobayashi* y *Hiyama*<sup>111</sup> estudiaron la reacción intentando mejorar las condiciones con el fin de generalizar su aplicación. Centraron su investigación en el efecto del metal en la formación del enolato del éster y observaron que la reacción funcionaba relativamente bien cuando los enolatos eran de Mg; sin embargo, el rendimiento caía radicalmente, o la reacción apenas se producía, con enolatos de Li, Zn, Sn (IV) o de Ti (IV) (Esquema 2.4).



**Esquema 2.4**

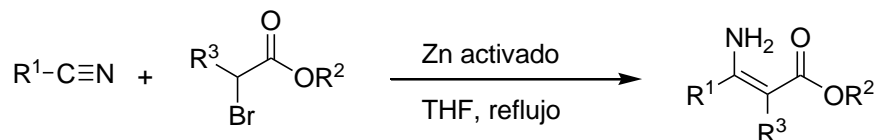
Un año después, *Hannick* y *Kishi*<sup>112</sup> modificaron el procedimiento de *Blaise* y describieron la adición lenta de  $\alpha$ -bromoésteres (reactivos de Reformatsky) sobre

<sup>110</sup> Blaise, E. E. C. R.. Hebd. Seances Acad. Sci. **1901**, 132, 478.

<sup>111</sup> Hiyama, T.; Kobayashi, K. T. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 1597-1600.

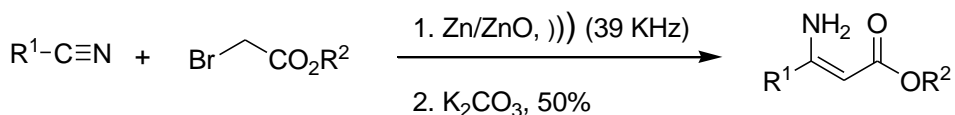
<sup>112</sup> Hannick, S. M.; Kishi, Y. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3833-3835.

nitrilos. Tras calentar la mezcla a reflujo, obtuvieron, con buenos rendimientos,  $\beta$ -enaminoésteres *N*-no sustituidos a los que no se podía acceder en las condiciones anteriores (Esquema 2.5).



**Esquema 2.5**

En 1997, *Lee y Cheng*,<sup>113</sup> actualizaron la reacción activando Zinc mediante ultrasonidos. El procedimiento consistía en la irradiación sonoquímica (39 KHz) de una mezcla del nitrilo, Zn, ZnO y bromoacetato de etilo, lo que daba lugar, en pocas horas, a distintos  $\beta$ -enaminoésteres *N*-no sustituidos, si bien los rendimientos eran moderados (Esquema 2.6).

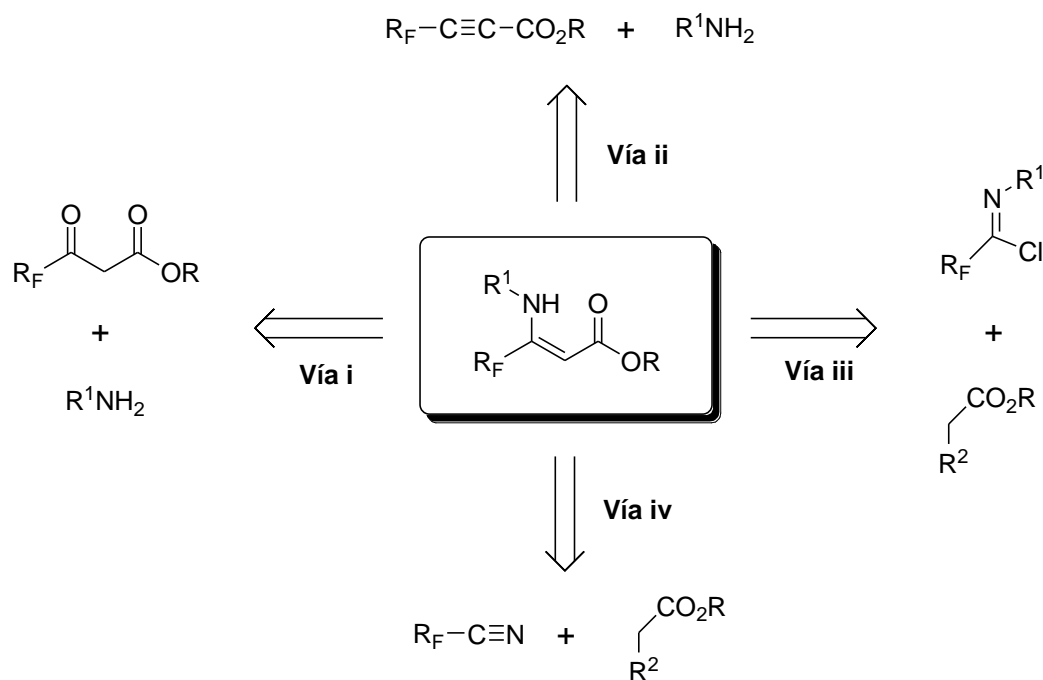


**Esquema 2.6**

### 2.2.2.2 $\beta$ -enaminoésteres fluorados

Respecto a los métodos más representativos para la obtención de  $\beta$ -enaminoésteres fluorados, se pueden clasificar en 4 vías sintéticas básicas (Esquema 2.7):

<sup>113</sup> Lee, A. S.-Y.; Cheng, R.-Y. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 443-446.



**Esquema 2.7**

*i. Condensación de β-cetoésteres con aminas primarias.*

*ii. Adición de aminas a ésteres perfluoroalquínicos.*

*iii. Adición de enolatos de ésteres a cloruros de imidoílo.*

*iv. Adición de compuestos con metilenos activos a nitrilos.*

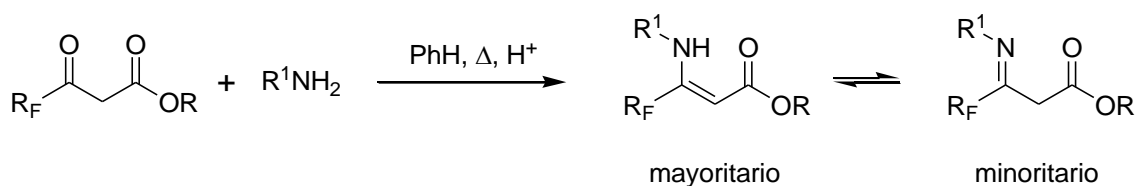
Entre las distintas opciones referidas, en nuestro caso se seguirá la *vía iv*, siguiendo la metodología desarrollada por el *Dr. Piera*.<sup>28</sup>

*Vía i. Condensación de β-cetoésteres con aminas primarias.*

Es un método empleado frecuentemente en la síntesis de β-enaminoésteres, tanto fluorados como no fluorados. Consiste en la condensación de aminas primarias con β-cetoésteres.<sup>114</sup>

<sup>114</sup> (a) Dieckman, W. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1901**, 27, 317. (b) Prelog, V.; Szpilfogel, S. *Helv. Chim. Acta*, **1945**, 28, 1684-1692. (c) Kloek, J. A.; Leschinsky, K. L. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 1460-1462. (d) Ferraz, H. M.; Oliveira, E. O.; Payret-Arrua, M. E.; Brandt, C. A. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7357-7359.

Soloshonok *et al.*<sup>115</sup> han empleado con éxito este método para la obtención de análogos fluorados; concretamente por condensación de β-cetoésteres fluorados con bencilamina y aminas quirales, como (S)-etilfenilamina, obteniendo los correspondientes β-enaminoésteres (Esquema 2.8). Éstos fueron aislados como mezclas de los tautómeros imino y enamino, con predominio de los segundos, y con rendimientos que oscilaban entre moderados y buenos (50-80%).



**Esquema 2.8**

Vía ii. Adición de aminas a ésteres perfluoroalquínicos.

En 1995, Shen *et al.*<sup>116</sup> estudiaron la reacción de adición de aminas con diferentes derivados fluoroalquínílicos tales como nitrilos, amidas y ésteres. De este modo, pudieron sintetizar derivados de β-enaminoésteres fluorados con rendimientos generalmente moderados (42-76%). La reacción resulta válida sólo para aminas alifáticas y amoniaco, obteniéndose exclusivamente el tautómero enamínico con configuración Z (Esquema 2.9).



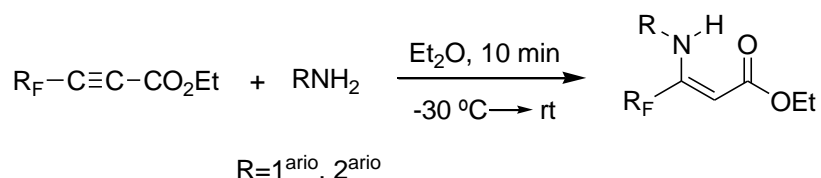
**Esquema 2.9**

<sup>115</sup> (a) Soloshonok, V.A.; Kukhar, V.P. *Tetrahedron* **1996**, 52, 6953-6964. (b) Soloshonok, V.A.; Soloshonok, I. V.; Kukhar, V. P.; Svedas, V. K. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 1878-1884.

<sup>116</sup> Shen, Y.; Ni, Y.; Cen, W. *J. Fluorine Chem.* **1995**, 73, 161-164.

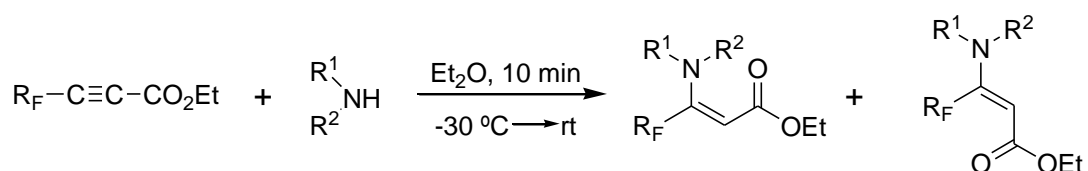
Entrado ya el nuevo siglo, en 2002, *Duchêne et al.*<sup>117</sup> desarrollaron la síntesis de β-enaminoésteres fluorados mediante la adición tipo Michael de aminas primarias y secundarias a ésteres perfluoroalquínílicos, una variante mejorada del procedimiento anterior. En todos los casos la reacción acababa en pocos minutos con rendimientos cuantitativos.

Con aminas primarias se obtenía siempre la enamina con configuración Z, posiblemente por formación de un enlace por puente de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno de la amina y el oxígeno carbonílico de la función éster (Esquema 2.10).



**Esquema 2.10**

Con las secundarias se obtenía, por el contrario, una mezcla de enaminoésteres E/Z, con gran predominio del segundo en todos los casos (Esquema 2.11).



**Esquema 2.11**

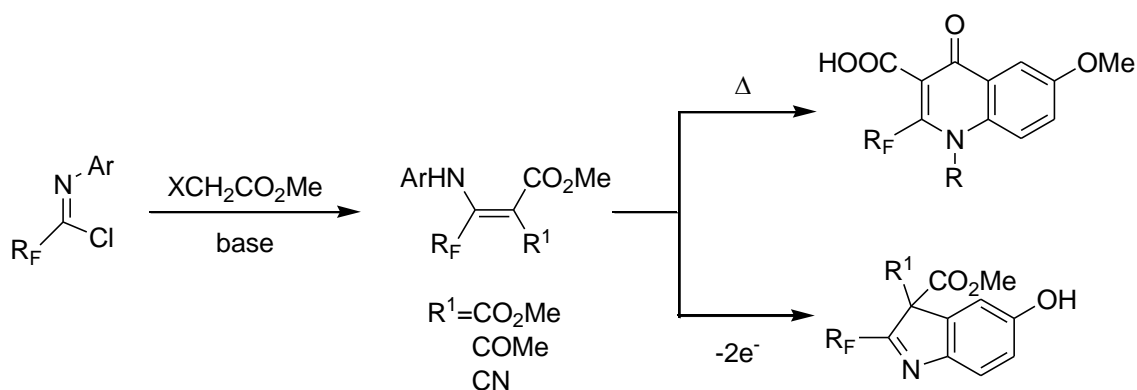
<sup>117</sup> Prié, G.; Richard, S.; Parrain, J. L.; Duchêne, A.; Abarbi, M. *J. Fluorine. Chem.* **2002**, *117*, 35-41.



Vía iii. Adición de enolatos de ésteres a cloruros de imidoílo.

Esta estrategia sintética fue desarrollada por Uneyama et al.<sup>118</sup> en 1989. Se trataba de obtener compuestos heterocíclicos fluorados. Para ello, se sirvieron de cloruros de imidoílo fluorados utilizados como *building blocks*.

De este modo y, en una primera etapa, la adición de compuestos con metilenos activos les permitió obtener los deseados  $\beta$ -enaminoésteres fluorados con rendimientos que variaban entre 65 y 92%, dependiendo de la naturaleza del sustituyente amínico. Posteriormente, a través de una ciclación de tipo térmico o electrofórico, podían generar anillos de tipo quinolona o indol (Esquema 2.12).

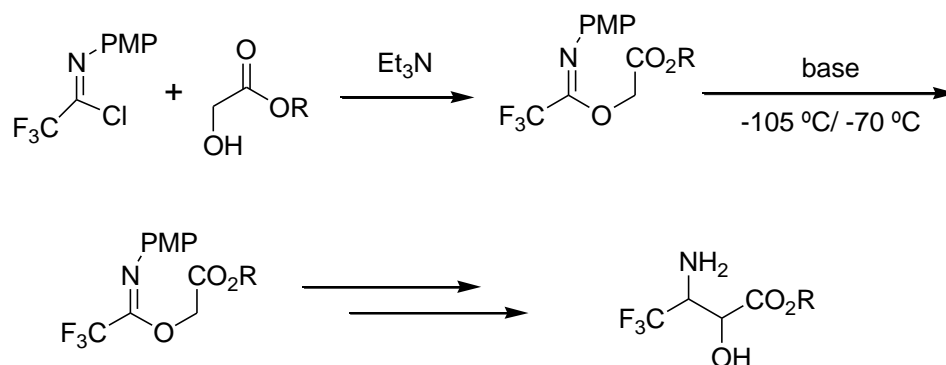


Esquema 2.12

En 1998, los mismos autores,<sup>119</sup> describieron la síntesis de  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -enaminoésteres mediante un reordenamiento intramolecular de iminoéteres, como paso intermedio para la síntesis de  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminoácidos fluorados (Esquema 2.13).

<sup>118</sup> (a) Uneyama, K.; Morimoto, O.; Yamashita, F. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4821-4824. (b) Kobayashi, M.; Sadamune, K.; Mizukami, H.; Uneyama, K. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1909-1911.

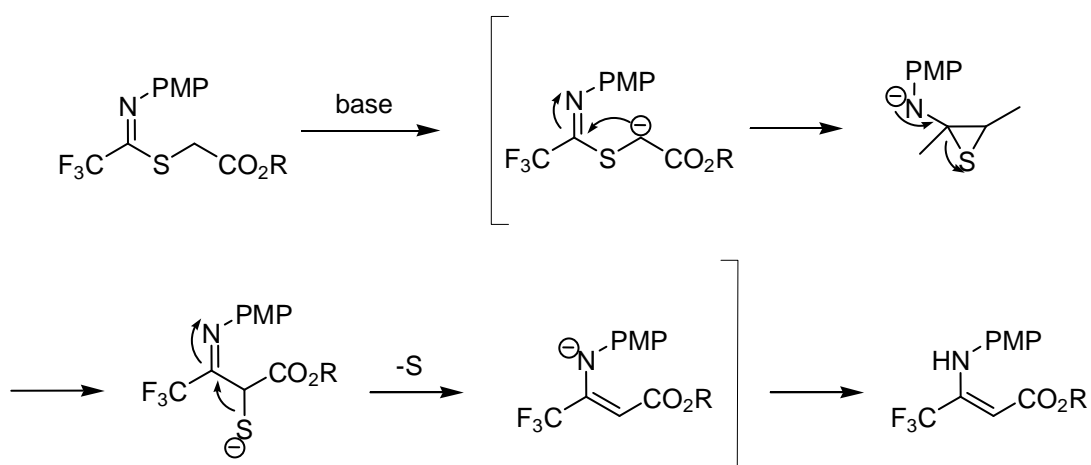
<sup>119</sup> Uneyama, K.; Hao, J.; Amii, H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4079-4082.



**Esquema 2.13**

El primer paso del proceso consiste en la adición de un éster  $\alpha$ -hidroxilado al cloruro de imidoílo, dando lugar a la formación del iminoéter. A continuación, el tratamiento del iminoéter con una base a bajas temperaturas conduce, tras un reordenamiento intramolecular, al  $\beta$ -iminoéster fluorado  $\alpha$ -hidroxilado con buenos rendimientos (81-89%).

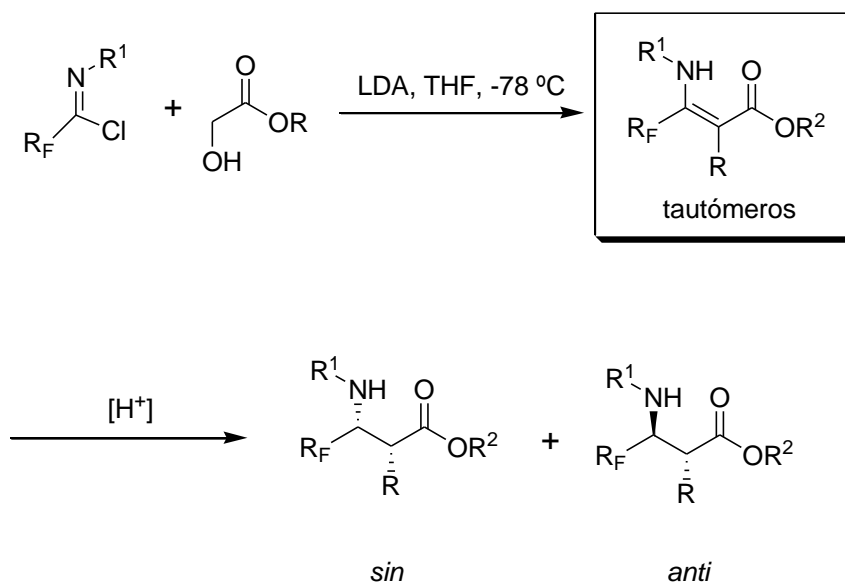
Sin embargo, cuando siguiendo el mismo proceso, trataron de obtener  $\alpha$ -tiohidroxi- $\beta$ -enaminoésteres,<sup>120</sup> el producto final obtenido era exclusivamente el  $\beta$ -enaminoéster y no los  $\alpha$ -tiohidroxi- $\beta$ -enaminoésteres esperados (Esquema 2.14). Esto era debido a que, en el proceso del reordenamiento intramolecular, se producía una desulfurización que no tenía lugar en los análogos hidroxilados.



**Esquema 2.14**

<sup>120</sup> Uneyama, K.; Ohkura, H.; Hao, J.; Amii, H. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 1026-1029.

En nuestro grupo de investigación<sup>121</sup> se han sintetizado  $\gamma$ -perfluoroalquil- $\beta$ -enaminoésteres fluorados como paso intermedio en la síntesis diastereo- y enantioselectiva de  $\beta$ -aminoésteres fluorados. El primer paso de la estrategia consiste en la adición de enolatos de litio de ésteres a cloruros de imidoilo fluorados (Esquema 2.15), lo que da lugar a una mezcla de los tautómeros imino y enamino con buenos rendimientos (71-92%). La conversión de los compuestos anteriores en los  $\beta$ -aminoésteres se llevó a cabo en distintas condiciones de reducción, obteniéndose los correspondientes  $\beta$ -enaminoésteres con excesos diastereoisoméricos de hasta el 96%.

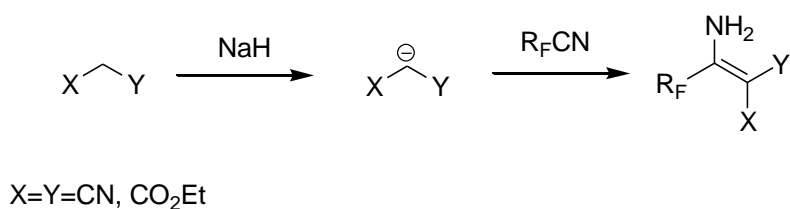


**Esquema 2.15**

<sup>121</sup> (a) Pina, B. Tesis Doctoral, Universitat de València, 2000. (b) Fustero, S.; Pina, B.; Simón Fuentes, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6771-6774. c) Fustero, S.; Pina, B.; García de la Torre, M.; Navarro, A.; Ramírez de Arellano, C.; Simón Fuentes, A. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 977-980. d) Fustero, S.; Pina, B.; Salavert, E.; Navarro, A.; Ramírez de Arellano, M. C.; Simón Fuentes, A. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4667-4679.

iv. Adición de compuestos con metilenos activos a nitrilos.

En 1964, Josey<sup>122</sup> describió la reacción entre compuestos con metilenos activos y nitrilos perfluoroalquilados, lo que condujo a los correspondientes derivados enamínicos. La reacción se llevó a cabo tratando con NaH el compuesto con el metileno activo y adicionando, a continuación, el fluoronitrilo, lo que dio lugar a los derivados de  $\beta$ -enaminoésteres con buenos rendimientos (70-74%) (Esquema 2.16).



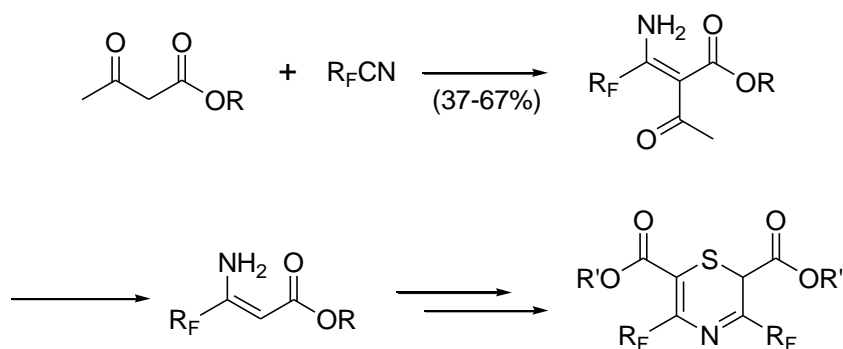
**Esquema 2.16**

El interés por los compuestos heterocíclicos fluorados llevó a Lee y Howe<sup>123</sup> a diseñar una síntesis de tiazinas fluoradas, ya que algunos compuestos biológicamente activos presentes en la naturaleza contienen este anillo. Para ello utilizaron  $\beta$ -enaminoésteres fluorados como materiales de partida, obtenidos mediante la adición de acetoacetato de etilo al nitrilo perfluorado apropiado, seguido del tratamiento del aducto resultante con hidróxido amónico (Esquema 2.17).

El procedimiento presenta algunas limitaciones, como los bajos rendimientos de la primera etapa del proceso (37-67%) y los elevados tiempos de reacción del segundo paso (64h).

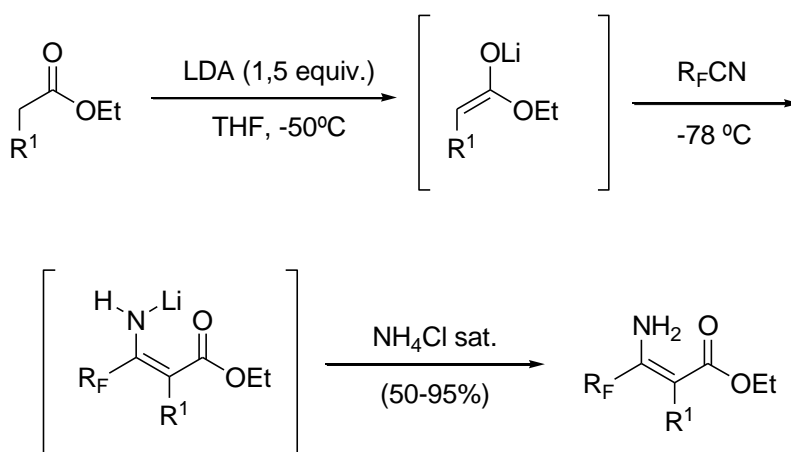
<sup>122</sup> Josey, A. D. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 707-710.

<sup>123</sup> Lee, L. F.; Howe, R. K. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 4780-4783.



**Esquema 2.17**

En nuestro grupo de investigación<sup>28</sup> se han sintetizado derivados de  $\beta$ -enaminoésteres fluorados como paso intermedio para la obtención de derivados de uracilo fluorados. El procedimiento consiste en el tratamiento del éster correspondiente con LDA a  $-50^\circ\text{C}$  para formar su enolato, tras 45 minutos, y a  $-78^\circ\text{C}$ , se adiciona el nitrilo fluorado, obteniéndose los correspondientes derivados de  $\beta$ -enaminoéster con rendimientos medio-altos (50-95%) y siempre en su forma enamínica (Esquema 2.18).



**Esquema 2.18**

### 2.2.2.3 Síntesis de derivados de uracilo fluorados

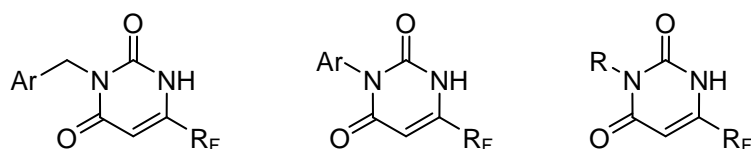
Como se ha indicado anteriormente, los derivados de uracilo fluorados poseen actividades biológicas de gran interés en el campo de la agroquímica, la salud y otros. Por ello, a partir de 1997, la práctica totalidad de los ejemplos descritos aparecen protegidos por patentes.<sup>124</sup>

Estas patentes describen mayoritariamente la obtención de derivados de uracilos *N*3-sustituídos con restos fluorados en posición C6. Es decir, compuestos que como vimos (Figura 2.8) poseen principalmente actividad herbicida y, en menor proporción, insecticida, acaricida, desecante o desfoliante.

Habitualmente estos derivados se obtienen a partir de la reacción del  $\beta$ -enaminoéster apropiado con un isocianato o carbamato en medio básico. Los derivados así obtenidos poseen agrupaciones fluoradas en C6, mayoritariamente  $\text{CF}_3$  y, en menor proporción,  $\text{CF}_2\text{H}$  y  $\text{CF}_2\text{CF}_3$ . Además, en la posición *N*3 presentan una gran variedad de estructuras, siendo los más frecuentes los derivados *N*-arilsustituídos, en los que el resto aromático puede variar considerablemente y estar más o menos sustituido, o con una agrupación bencílica directamente unida al resto aromático, con la misma diversidad que en el caso anterior; por último, son también abundantes los derivados que poseen restos alquílicos en esta posición (Figura 2.13).

---

<sup>124</sup> Ver, por ejemplo: (a) Menke, O.; Hamprecht, G.; Reinhard, R.; Schafer, P.; Zagar, C., Patent N° 2000023427 A1, 2000. (b) Menke, O.; Goetz, R.; Rack, M.; Hamprecht, G.; Menges, M.; Reinhard, R.; Schaefer, P.; Zagar, C.; Westphalen, K. O.; Walter, H.; Misslitz, U. Ger. Offen. 19738084 A1. (c) Konz, M. J.; Wendt, H. R. (Fmc Corporation, USA) Patent N° 5817814 A, 1998. (d) Andree, R.; Drewes, M. W.; Dollinger, M., (Bayer A.-G., Germany) Patent N° 9840362 A1, 1998. (e) Andree, R.; Schwarz, H. G.; Drewes, M. W.; Feucht, D.; Pontzen, R.; Wetcholowsky, I., Patent N° 2001034575 A1, 2001. (f) Schallner, O.; Hoischen, D.; Drewes, M. W.; Dahmen, P.; Feucht, D.; Pontzen, R. (Bayer Aktiengesellschaft, Germany). WO 2003006461, 2003 (g) Drewes, M.; Andree, R.; Dollinger, M. EP19970923907, 2005. (h) Fenwick, A. E.; Hickey D. M. B.; Ife R.J.; Leach C. A.; Pinto, I. L.; Smith, S. A. US Patent 7115616, 2006. (i) Lo, W. C.; Schmitzer, P. R.; Epp, J. B.; Yerkes, C. N. USPC 504239, 2008.



**Figura 2.15**

Un subtipo concreto de los derivados de uracilo fluorados *N*3-arilsustituídos son los fenil 2,4,6-trisustituídos con agrupaciones que poseen hidrofobicidad y efecto electronatrayente. En ellos se cumple que la suma de los volúmenes de dichos sustituyentes determina su actividad tanto insecticida como acaricida.<sup>125</sup>

Los derivados de uracilo con propiedades herbicidas, presentan, por su parte, una mayor variedad en los sustituyentes. Así, estos derivados pueden estar más o menos sustituidos y presentar restos sencillos o de gran complejidad.

En la bibliografía se recogen dos estrategias sintéticas básicas para obtener estos productos: i) a partir de precursores acíclicos, y ii) síntesis parcial de los mismo por modificación de otros uracilos.

*i. Síntesis total a partir de derivados acíclicos.*

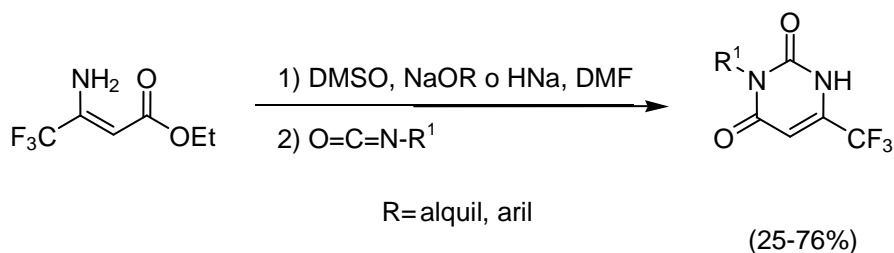
Antes de la aparición de las patentes anteriormente señaladas, habían sido descritos dos ejemplos de síntesis de derivados fluorados de uracilo a partir de derivados acíclicos.

El primero se debe a *Luzt y Trotto*<sup>126</sup> quienes, en 1972, hicieron reaccionar diferentes alquil- y arilsocianatos con 3-amino-4,4,4-trifluorocrotonato de etilo, obteniendo 6-trifluorometiluracilos 3-sustituídos en un solo paso (Esquema 2.19). La reacción se llevó a cabo mediante el tratamiento del enaminoéster fluorado con

<sup>125</sup> Yagi, K.; Akimoto, K.; Mimori, N.; Miyake, T.; Kudo, M.; Arai, K.; Ishii, S. *Pest. Manag. Sci.* **2000**, 56, 65-73.

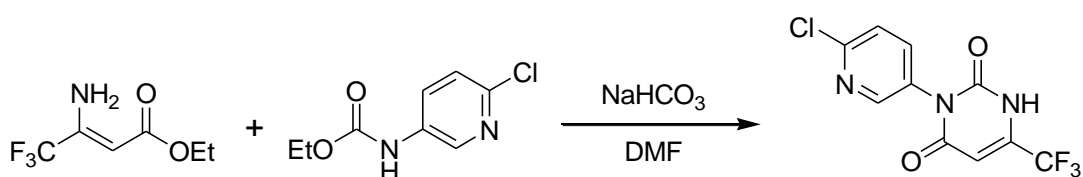
<sup>126</sup> Luzt, A. W.; Trotto, S. H. J. *Heterocyclic Chem.* **1972**, 9, 513-522.

un alcóxido en dimetilsulfóxido, seguida de la posterior adición del correspondiente isocianato. La utilización de otras bases fuertes como hidruro sódico, hidróxido potásico y pentametilguanidina, así como de otros disolventes, como dimetilformamida, tolueno, alcoholes, acetato de etilo e iso-butilmetilcetona también conducía a los uracilos trifluorometilados. La reacción tenía lugar en 3 horas desde la adición del isocianato con rendimientos variables (25-76%).



**Esquema 2.19**

Este es el método que se emplea generalmente en la mayoría de las patentes, aunque, en algunos casos, el isocianato es sustituido por un carbamato; un ejemplo de ello se indica en el Esquema 2.20, en el que se hace reaccionar el  $\beta$ -enaminoéster trifluorometilado con un carbamato en medio básico, dando lugar a un uracilo fluorado que presenta actividad como herbicida.<sup>127</sup>

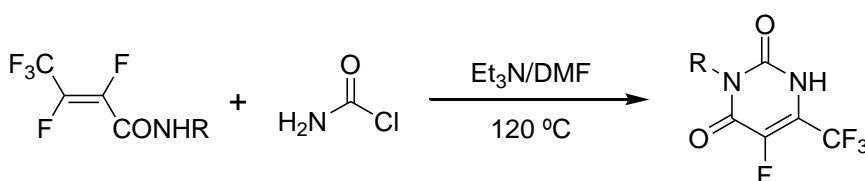


**Esquema 2.20**

<sup>127</sup> Andree, R.; Drewes, M. W.; Dollinger, M (Bayer A.-G., Germany) Ger. Offen. N° 19652431 A1, 1998.

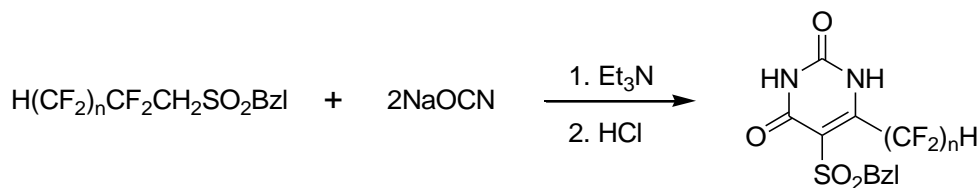


En 1986, *Ishihara et al.*<sup>128</sup> describieron la síntesis de uracilos fluorados a partir de derivados de ácidos carboxílicos fluorados  $\alpha,\beta$ -insaturados, concretamente de amidas fluoradas. La reacción de éstas con urea y trietilamina en dimetilformamida a 120°C proporcionaron los uracilos C-5 y C-6 disustituidos con átomos de flúor o agrupaciones fluoradas; sin embargo, los rendimientos fueron moderados (55-60%) y los tiempos de reacción elevados (4 días) (Esquema 2.21).



**Esquema 2.21**

Un ejemplo más reciente de obtención de pirimidinodionas 6-perfluoroalquiladas fue descrito por *Shermolovich et al.*<sup>129</sup> Estos autores hicieron reaccionar perfluoro-1,1-dihidroalquilsulfonas con cianato sódico en presencia de trietilamina, obteniendo sales de uracilo fácilmente transformables en los correspondientes uracilos por tratamiento con ácido clorhídrico (Esquema 2.22).

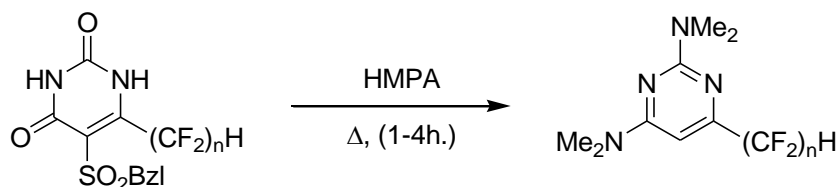


**Esquema 2.22**

<sup>128</sup> Ishihara, T.; Yamasaki, Y.; Ando, T. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2879-2880.

<sup>129</sup> Timoshenko, V. M.; Nikolin, Y. V.; Chernega, A. N.; Shermolovich, Y. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 10, 1619-1627.

El principal inconveniente reside en que la eliminación del grupo sulfonilo de la posición 5 del uracilo tiene lugar mediante tratamiento con hexametilfosforamida, lo que da lugar a la aminación de los carbonilos (Esquema 2.23).

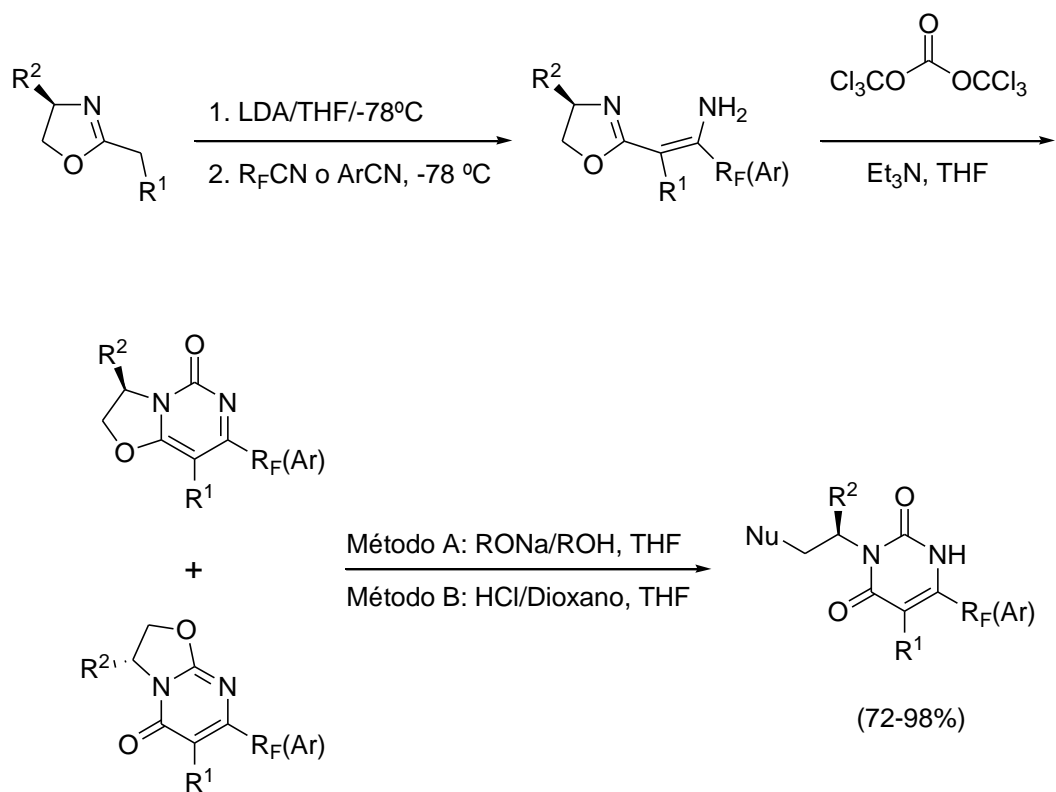


**Esquema 2.23**

Como se describió en el Capítulo 1, en nuestro grupo de investigación se han desarrollado dos nuevas estrategias que permiten la síntesis de uracilos fluorados di- y trisustituidos.

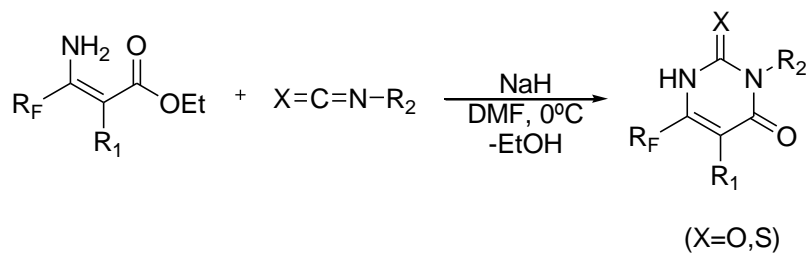
La primera de ellas, expuesta anteriormente, implicaba un proceso que se iniciaba con la reacción entre 2-alquil- $\Delta^2$ -oxazolininas y diferentes nitrilos fluorados.<sup>26,27,52</sup> Así, en una primera etapa los azaenolatos de litio de las oxazolininas se adicionaban a los correspondientes nitrilos proporcionando los  $\beta$ -enaminoácidos C-oxazolin-protectados con buenos rendimientos. A continuación, la condensación de los productos anteriores con fosgeno o trifosgeno, y la posterior hidrólisis de la mezcla de productos con KOH (5N) en frío (0-3 °C), conducía a una mezcla de oxazolopirimidonas isómeras (Esquema 2.24).

Una de las etapas claves del proceso era la apertura del anillo de oxazolina por la acción de nucleófilos, tanto en medio ácido como básico, para dar los correspondientes uracilos con buenos rendimientos.



**Esquema 2.24**

La segunda de las vías diseñadas permite obtener uracilos fluorados a partir de derivados de β-enaminoésteres e isocianatos (Esquema 2.25).<sup>28</sup> Estos estudios fueron ampliados con la síntesis de uracilos fluorados en fase sólida<sup>45</sup> y mediante síntesis fluorosa.<sup>65</sup>

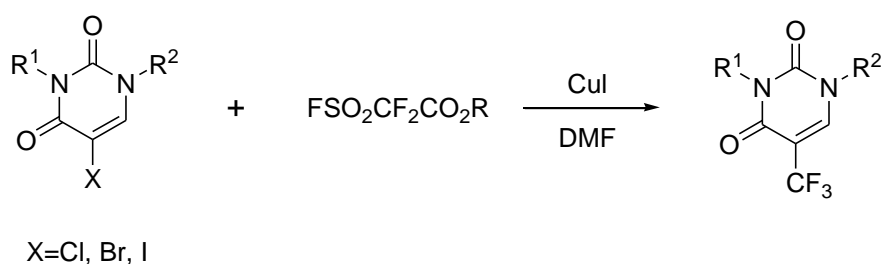


**Esquema 2.25**

ii. Síntesis parcial por modificación de otros uracilos.

Como se indicó anteriormente una segunda opción consiste en partir directamente de derivados de uracilo no fluorados y proceder a su fluoración mediante procedimientos tales como la introducción, sustitución o transformación de sustituyentes sobre el anillo de pirimidindiona ya formado.

Un antecedente es la obtención de uracilos 5-trifluorometilados<sup>130</sup> a partir de pirimidinonas halogenadas en C-5 mediante reacción de éstas con ésteres de ácido difluorometil(fluorosulfónico)acético, en presencia de yoduro de cobre (I) y DMF como disolvente (Esquema 2.26). La reacción se puede aplicar a escala industrial.



**Esquema 2.26**

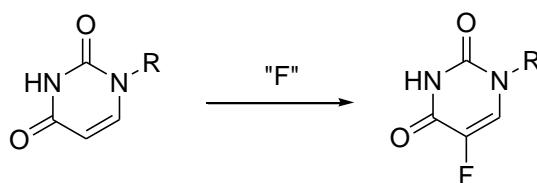
Por otra parte, la introducción directa de un átomo de flúor en la posición C-5 del anillo de uracilo puede llevarse a cabo por diferentes métodos, como la fluoración electroquímica empleando electrodos de níquel y ácido fluorhídrico anhidro,<sup>131</sup> o utilizando ácido hipofluoroso<sup>132</sup> generado *in situ*, o flúor elemental<sup>133</sup> en disolución acuosa (Esquema 2.27).

<sup>130</sup> Tamaki, S.; Tomoyuki, A.; Yoshitomi, M. (Asahi Glass Co., Ltd., Japan) 1999 Patente.

<sup>131</sup> Meinert, H.; Cech, D.; Berth, G.; Langen, P.; Etzold, G. Ger. (East) Patent 93561, 1971.

<sup>132</sup> Diksič, M.; Di Raddo, P. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 4885-4888.

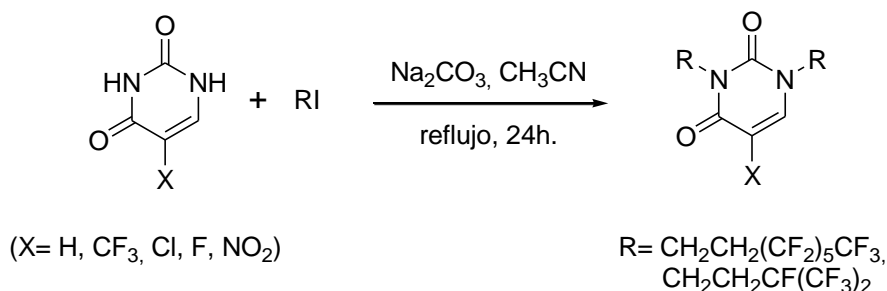
<sup>133</sup> Ozaki, S.; Watanabe, Y.; Nagase, T.; Ogasawara, T.; Ahmed, S.; Hoshi, A.; Iigo, M.; *Nucleosides Nucleotides*, **1987**, 6, 249-256.



**Esquema 2.27**

Por cualquiera de los métodos anteriores puede obtenerse 5-fluorouracilo, potente anticancerígeno descubierto en 1957 y que, aún hoy en día, sigue empleándose con éxito en la terapia antitumoral.

Por último, un método que permite la fluoroalquilación de uracilos, en este caso sobre los átomos de nitrógeno, fue descrito por *Gupta et al.*<sup>134</sup> El procedimiento consiste en la reacción de los uracilos con un yoduro de polifluoroalquilo en presencia de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a reflujo en acetonitrilo (Esquema 2.28). La alquilación tiene lugar sobre los dos átomos de nitrógeno, no siendo posible obtener un producto de monoalquilación variando la estequiometría y las condiciones de reacción. El proceso transcurre con rendimientos moderados (30-60%) y los compuestos obtenidos presentan actividad biológica de apreciable importancia como antivirales.

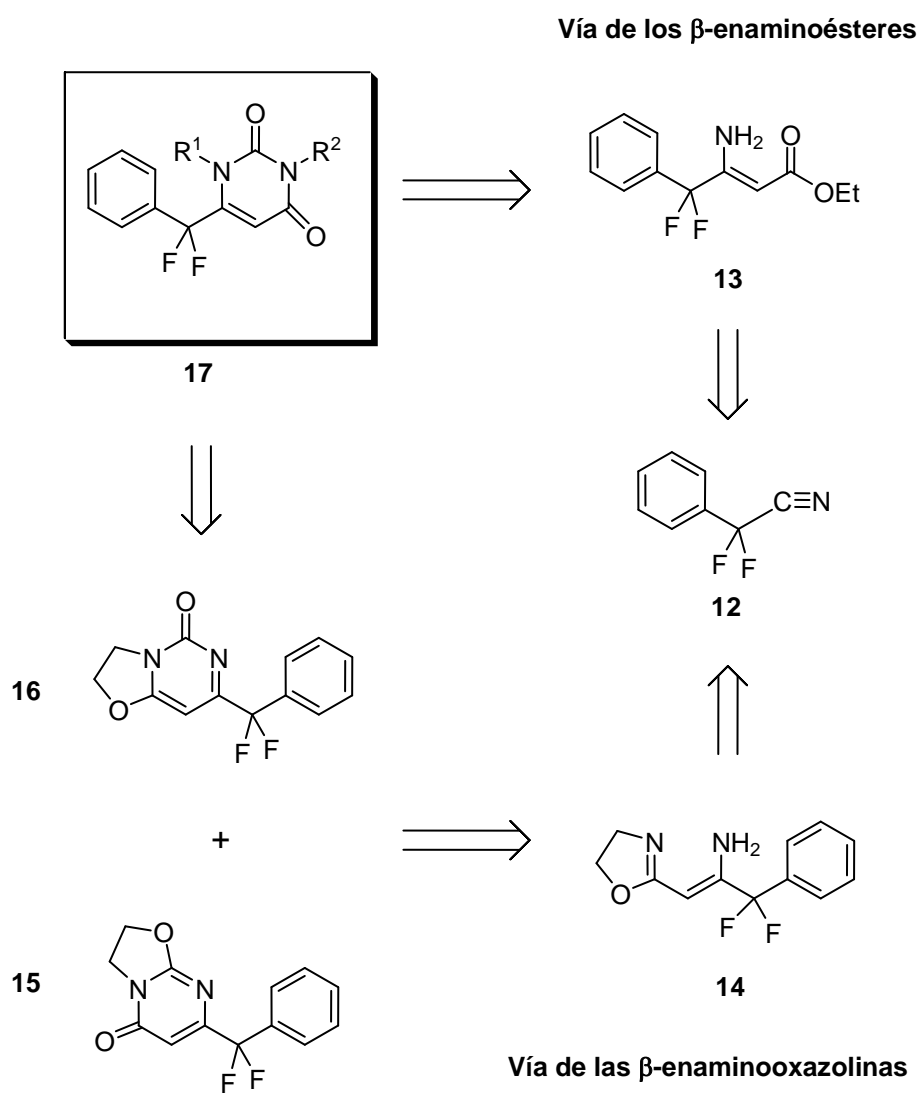


**Esquema 2.28**

<sup>134</sup> Gupta, O. D.; Twamley, B.; Kirchmeier, R. L.; Shreeve, J. M. *J. Fluorine Chem.* **2000**, 106, 199-204.

## 2.3 Resultados

Como se comentó en la Introducción, en la bibliografía se describen dos estrategias sintéticas básicas para obtener los uracilos fluorados: i) A partir de precursores acíclicos y ii) Síntesis parcial por modificación de otros uracilos. De acuerdo con ello, se plantea una estrategia sintética a tres niveles diferentes. Así, desde precursores acíclicos se prepararán derivados fluorados de uracilo mediante las dos vías sintéticas ya comentadas: la de los  $\beta$ -enaminoésteres y la de las  $\beta$ -enaminoxazolininas (Esquema 2.29).

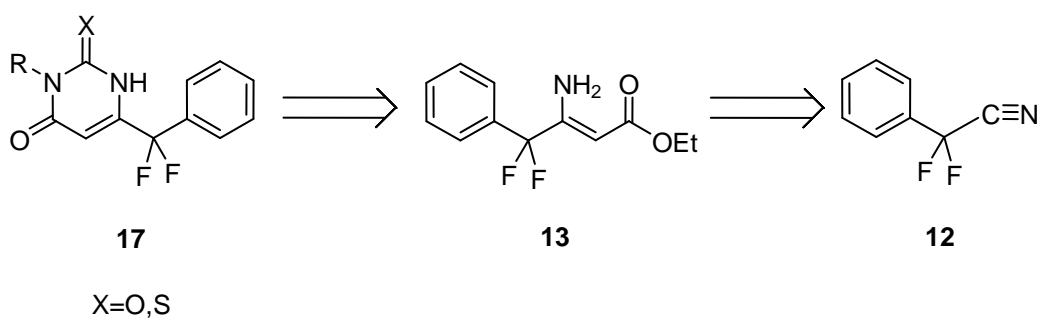


Además, también se desarrollará una reacción que permitirá la obtención de derivados fluorados mediante síntesis parcial a partir de otros uracilos.

Dado que la actividad acaricida de todos los productos obtenidos será objeto de estudio en el próximo capítulo, se realizará el escalado en las vías sintéticas, optimizando las reacciones en escala de gramo y multigramo.

### 2.3.1. Obtención de derivados de uracilo fluorados a través de la vía de los $\beta$ -enaminoésteres

Como puede observarse en el Esquema 2.29 hay un punto de partida común a ambas vías: el derivado de nitrilo fluorado **1**. A partir de él se obtiene el  $\beta$ -enaminoéster **13**, intermedio clave para la síntesis de las pirimidindionas y 2-tiopirimidinonas C-6 fluoradas N-3 sustituidas **17** (Esquema 2.30).

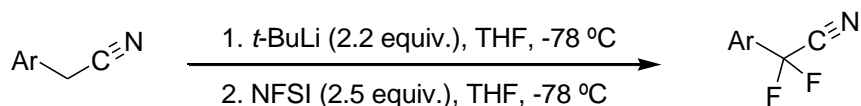


Esquema 2.30

La primera etapa del proceso requiere la disponibilidad del nitrilo fluorado, que no es comercial y por tanto, ha de prepararse previamente.

### 2.3.1.1. Obtención del nitrilo fluorado 12.

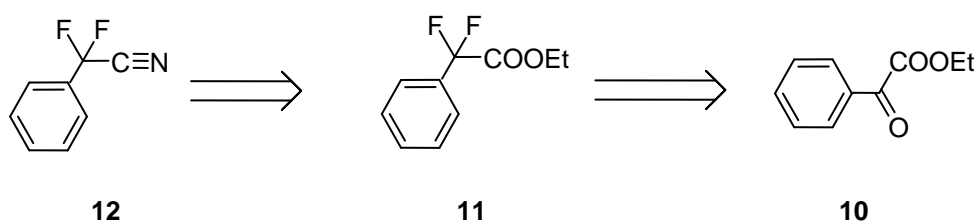
Para la obtención de estos compuestos *Taylor et al.*<sup>135</sup> desarrollaron un método consistente en la difluoración de 2-arilacetonitrilos mediante tratamiento con una base fuerte seguido de la adición de un agente de fluoración electrofílico, N-fluorobencenosulfonimida (Esquema 2.31).



**Esquema 2.31**

En la práctica este proceso no resulta apropiado ya que los rendimientos se mantienen bajos (alrededor de 30%),<sup>28</sup> aún cuando se divide en etapas; es decir, la obtención en primer lugar del derivado monofluorado y, a continuación, el producto difluorado.

Por ello, en nuestro caso se optó por una variante del método descrito en 1980 por *Bingham y Middleton*<sup>136</sup> (Esquema 2.32) que, si bien presenta mayor número de etapas, proporciona los derivados buscados con mejores rendimientos globales.



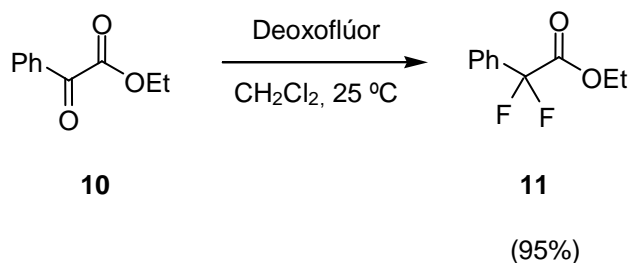
**Esquema 2.32**

<sup>135</sup> Kotoris, C. C.; Chen, M.-J.; Taylor, S. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 8052-8057.

<sup>136</sup> Middleton, W. J.; Bingham, E. M. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 2883-2887.



Para ello el  $\alpha,\alpha$ -difluoroéster intermedio **11**, puede obtenerse a partir del correspondiente  $\alpha$ -cetoéster (Esquema 2.33).



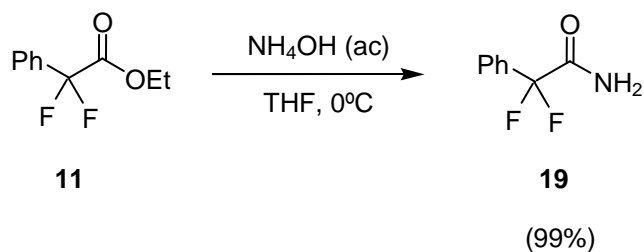
**Esquema 2.33**

El escalado de esta reacción no ofreció dificultad, llevándose a cabo reacciones con hasta 30 gramos de reactivo de partida, manteniendo los excelentes rendimientos. Para ello, no fue necesario modificar las condiciones de trabajo (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3 Síntesis del éster difluorado 11**

<b>10 (g)</b>	<b>11 (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
0.20	0.21	95
2.00	2.13	95
8.00	8.45	94
15.00	15.51	92
20.00	21.35	95
30.00	31.01	92

El éster difluorado **11** se transformó en la amida **19** por tratamiento con una disolución de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  en THF, durante 3-4 horas. La extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  proporcionó el producto final con rendimiento prácticamente cuantitativo (Esquema 2.34).



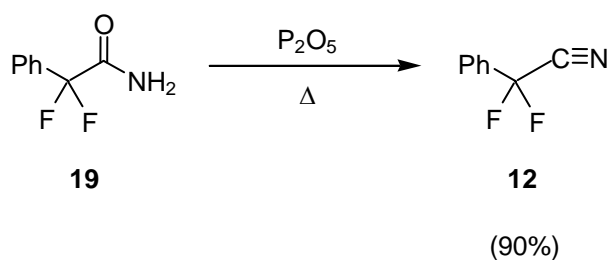
**Esquema 2.34**

De nuevo, el escalado del proceso no ofreció dificultad (Esquema 2.35).

**Tabla 2.4** Síntesis de la amida difluorada **19**

<b>11 (g)</b>	<b>19 (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
0.20	0.17	99
2.00	1.69	99
8.00	6.70	98
15.00	12.70	99
20.00	16.59	97
30.00	25.39	99

El último paso consiste en la transformación de la amida en el correspondiente nitrilo, lo que tuvo lugar por deshidratación de ésta con  $\text{P}_2\text{O}_5$  en caliente y a presión reducida. El nitrilo fluorado **12** es líquido, incoloro y muy volátil y fue obtenido con un rendimiento del 90% (Esquema 2.35).



**Esquema 2.35**

En este caso, el escalado no arrojó los resultados esperados, observándose una disminución progresiva del rendimiento en relación con la cantidad de compuesto de partida, que al cabo se mantiene por encima del 70% para las cantidades estudiadas (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5 Síntesis del nitrilo difluorado 12**

<b>19 (g)</b>	<b>12 (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
0.20	0.16	90
3.00	2.17	81
8.00	5.52	77
15.00	9.94	74
30.00	19.06	71

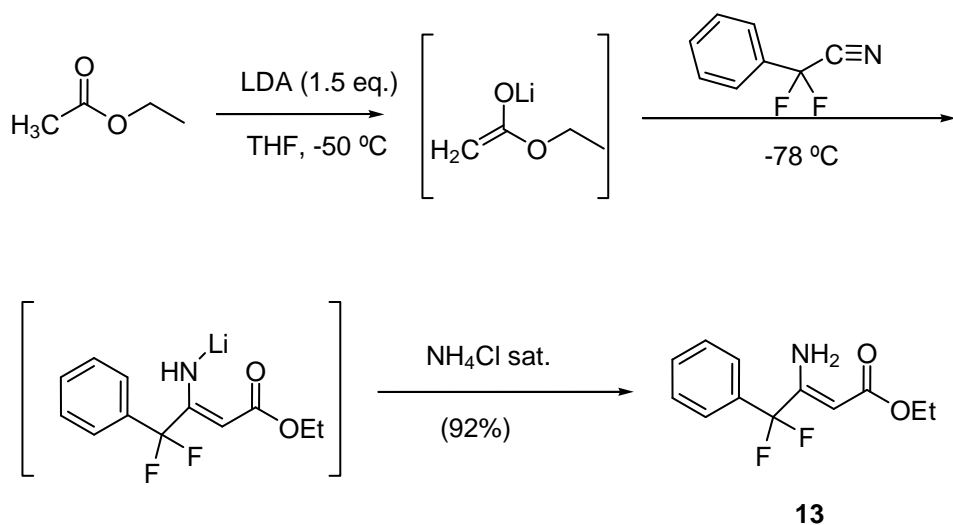
Dado los elevados rendimientos obtenidos en los dos primeros pasos (**10** a **19**), se procedió a llevar a cabo el proceso de obtención del nitrilo difluorado **12** a partir de **10** sin purificar los compuestos intermedios. Así, con 8 g de  $\alpha$ -cetoéster **10** se preparó el nitrilo  $\alpha,\alpha$ -difluorado **12** con rendimiento del 70%.

### **2.3.1.2 Síntesis del $\beta$ -enaminoéster difluorado 13.**

La transformación del nitrilo **12** en el correspondiente  $\beta$ -enaminoéster fluorado **13** se llevó a cabo por reacción con el enolato de acetato de etilo (Esquema 2.36).

Esta reacción había sido realizada previamente con nitrilos no fluorados (ver 2.2.2.1. Síntesis de  $\beta$ -enaminoésteres, en Antecedentes); sin embargo, poseía importantes limitaciones ya que, en general, se obtenían los  $\beta$ -enaminoésteres con rendimientos bajos o moderados y, además, el éxito del proceso dependía de las características de los sustratos de partida.

Seguendo el procedimiento desarrollado en nuestro grupo de trabajo,<sup>28</sup> 1,2 equivalentes del éster se hicieron reaccionar con 1,5 equivalentes de LDA a -50 °C; tras 45 minutos en agitación, la temperatura del baño se bajó a -78 °C y, a continuación, se adicionó lentamente el nitrilo fluorado sobre el enolato ya formado. Finalizada la reacción (CCF), se hidrolizó el crudo con una disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl obteniéndose el producto **13**, exclusivamente en su forma enamínica (92%) (Esquema 2.36).



**Esquema 2.36**

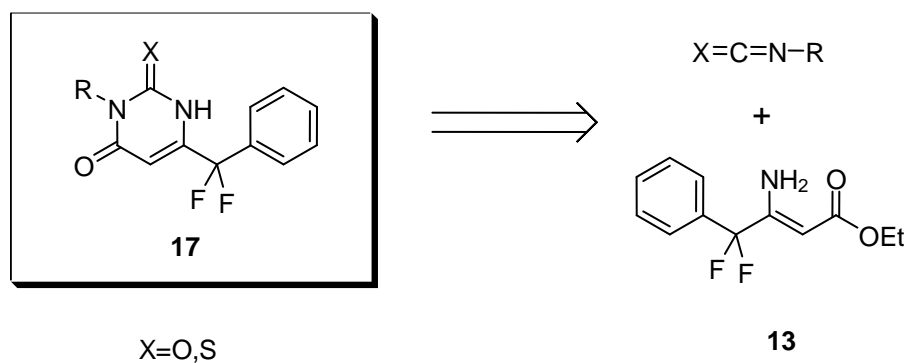
En este caso, el escalado del producto tuvo lugar con buenos rendimientos (Tabla 2.6). Se mantuvo el procedimiento de la reacción, así como en general las proporciones. Tan sólo se disminuyó la proporción de disolvente en la adición de nitrilo **12** en THF sobre el enolato ya formado a -78 °C. Así, se adicionaron 0,1 g disueltos en 1 ml de THF, en tanto que para cantidades superiores fue necesario disminuir esta proporción para mantener los rendimientos, de modo que la adición de 10 g se realizó con 25 ml de THF.

**Tabla 2.6** Síntesis de  $\beta$ -enaminoéster difluorado **13**

12 (g)	13 (g)	Rendimiento (%)
0.10	0.14	92
1.00	1.43	91
3.00	4.21	89
5.00	6.69	85
10.00	13.70	87

### 2.3.1.3 Síntesis de los derivados de uracilo fluorados **17**.

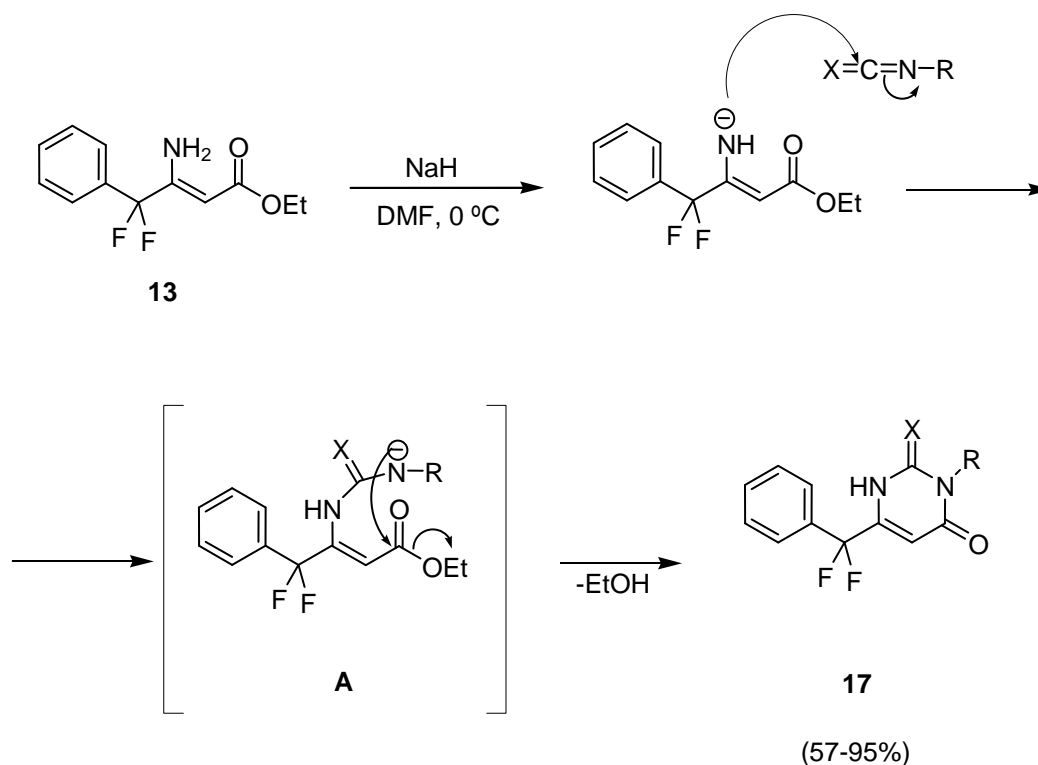
En este apartado se estudiará la obtención, a escala de miligramo y multigramo, de los (tio)uracilos **17** con la agrupación  $\text{PhCF}_2$  en C-6 a partir del  $\beta$ -enaminoéster fluorado **13**. Para ello, el  $\beta$ -enaminoéster reacciona con diferentes iso(tio)cianatos en presencia de una base fuerte aprótica. Esta ruta sintética ya había sido desarrollada previamente en nuestro grupo de trabajo<sup>28</sup> (Esquema 2.37).



**Esquema 2.37**

La reacción se llevó a cabo adicionando a una disolución del  $\beta$ -enaminoéster **13** a 0 °C, NaH (1,8 eq) en DMF, manteniendo la agitación durante media hora; a continuación se añadió lentamente el iso(tio)cianato (1,2 eq) y se

siguió la evolución de la reacción por CCF. Finalizada ésta se extrajeron y purificaron los productos.



X=O, S

R= *p*-F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, *m*-CF<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>COOEt, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, *p*-CF<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, *p*-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>,  
2,4,6-triCl-C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>, 2,4,6-triF-C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>, 2,4,6-triBr-C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>.

### Esquema 2.38

El primer paso consiste en la adición intermolecular del ión amiduro al carbono electrofílico del iso(tio)cianato, lo que conduce a un intermedio **A** tipo (tio)urea, que se cicla mediante condensación intramolecular dando el producto final. Los compuestos **17a-j** se obtuvieron con buenos rendimientos, en general.

El proceso de purificación original resultaba bastante laborioso, se ha mantenido parcialmente para algunos de los derivados obtenidos (**17a-17e**), sin

embargo para los nuevos derivados de uracilo sintetizados (**17f-17j**) fue necesario diseñar un nuevo proceso de purificación.

Básicamente se eliminaba el disolvente calentando a presión reducida. El residuo sólido era redisolto en agua, para a continuación extraer con diclorometano. La fase acuosa se concentraba y se extraía de nuevo con acetato de etilo. Las fases orgánicas de acetato de etilo se reunían, se secaban y se eliminaba el disolvente a presión reducida, quedando un residuo sólido que se purifica como se indica en la parte experimental. Este procedimiento se basaba en la solubilidad en agua de los derivados de uracilo **17**. Sin embargo, al aplicarlo en los nuevos uracilos que íbamos obteniendo (**17e-17j**), con nuevos grupos funcionales presentes en el anillo de benceno, observamos una aparente disminución del rendimiento, debida a que presentaban una solubilidad inferior en agua. Por ello, se optó por modificar el proceso. Así, se mantuvo la eliminación del disolvente calentando a presión reducida y redisolviendo a continuación en muy poca cantidad de agua (2 ml), para, a continuación, extraer directamente y sólo con AcOEt. Las fases orgánicas obtenidas se reunieron, secaron y se eliminó el disolvente a presión reducida, quedando un residuo sólido que se purificó en cada caso como se indica en la parte experimental.

El proceso de escalado se llevó a cabo utilizando hasta 500 mg de compuesto de partida, observándose ligeros descensos en los rendimientos respecto a las reacciones *standard* en las que se utilizaron 50 mg (Tabla 2.7); excepto para **17a**, con una mayor disminución del rendimiento (de 90% a 72%). Los productos **17f**, **17g** y **17i** se obtuvieron también a partir de 1 y 5 gramos de **13** con variaciones de los rendimientos entre 1 y 15%.

Finalmente, **17f** se preparó a partir del correspondiente isocianato utilizando 15 g del enaminoéster fluorado **13**. Se introdujo alguna pequeña variación en el procedimiento, consistente, básicamente en añadir algo más de base (2

equivalentes de NaH) y disminuir la proporción de disolvente, obteniendo el producto final con una disminución del rendimiento en torno al 10%.

**Tabla 2.7** Síntesis de los derivados de uracilo difluorados **17**

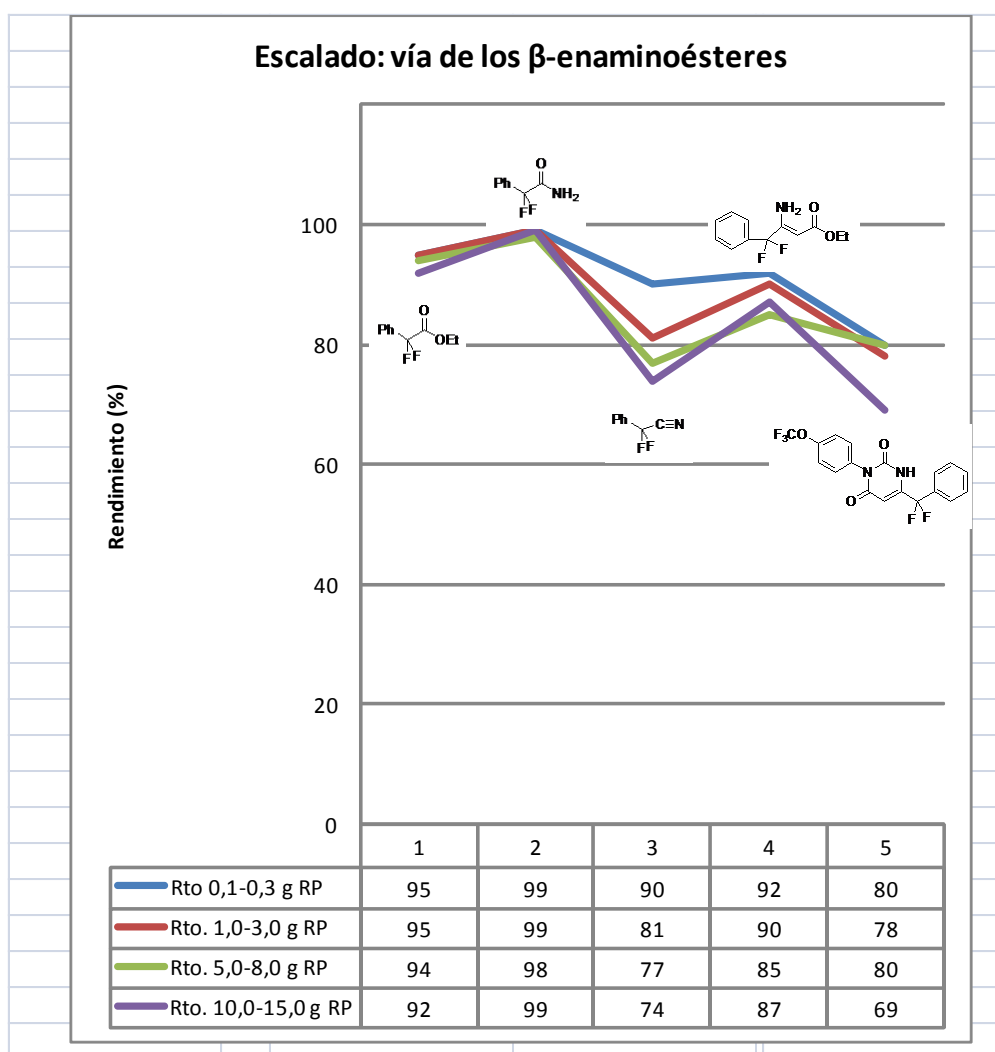
Entrada	X	R	13 (g)	17 (g)	Rendimiento (%)
<b>17a</b>	O	<i>p</i> -F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.05	0.06	90
			0.30	0.35	84
			0.50	0.50	72
<b>17b</b>	O	<i>m</i> -CF <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.05	0.06	73
			0.30	0.31	65
			0.50	0.50	63
<b>17c</b>	O	CH <sub>2</sub> COOEt	0.05	0.05	72
			0.30	0.28	70
			0.50	0.45	67
<b>17d</b>	O	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0.05	0.04	78
			0.30	0.24	73
			0.50	0.39	71
<b>17e</b>	S	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0.05	0.04	66
			0.30	0.22	64
			0.50	0.37	64
<b>17f</b>	O	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.05	0.07	81
			0.30	0.40	80
			0.50	0.66	80
			1.00	1.29	78
			5.00	6.61	80
			15.00	17.10	69
<b>17g</b>	O	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.05	0.07	95
			0.30	0.40	93
			0.50	0.68	95
			1.00	1.16	81
			5.00	5.71	80
<b>17h</b>	O	2,4,6-triCl-C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	0.05	0.06	75
			0.30	0.38	73
			0.50	0.64	74
<b>17i</b>	O	2,4,6-triF-C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	0.05	0.07	87
			0.30	0.39	85
			0.50	0.66	87
			1.00	1.22	80
			5.00	5.88	77
<b>17j</b>	O	2,4,6-triBr-C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	0.05	0.07	57
			0.30	0.36	52
			0.50	0.62	54



Se han obtenido, con buenos rendimientos en general, una amplia variedad de derivados de (tio)uracilo C-6 fluorados N-3-sustituidos **17**, lo que avala la versatilidad del método. Se ha procedido, además, a estudiar la metodología sintética a escala de gramo y multigramo, no encontrando grandes dificultades en el proceso.

Para  $R=CH_2CH_2Cl$  la reacción no prosperó, obteniendo una mezcla compleja de productos. Sin embargo, como veremos en el siguiente epígrafe, disponemos de una metodología que nos permitió obtenerlo.

### 2.3.1.4 Escalado de las reacciones.



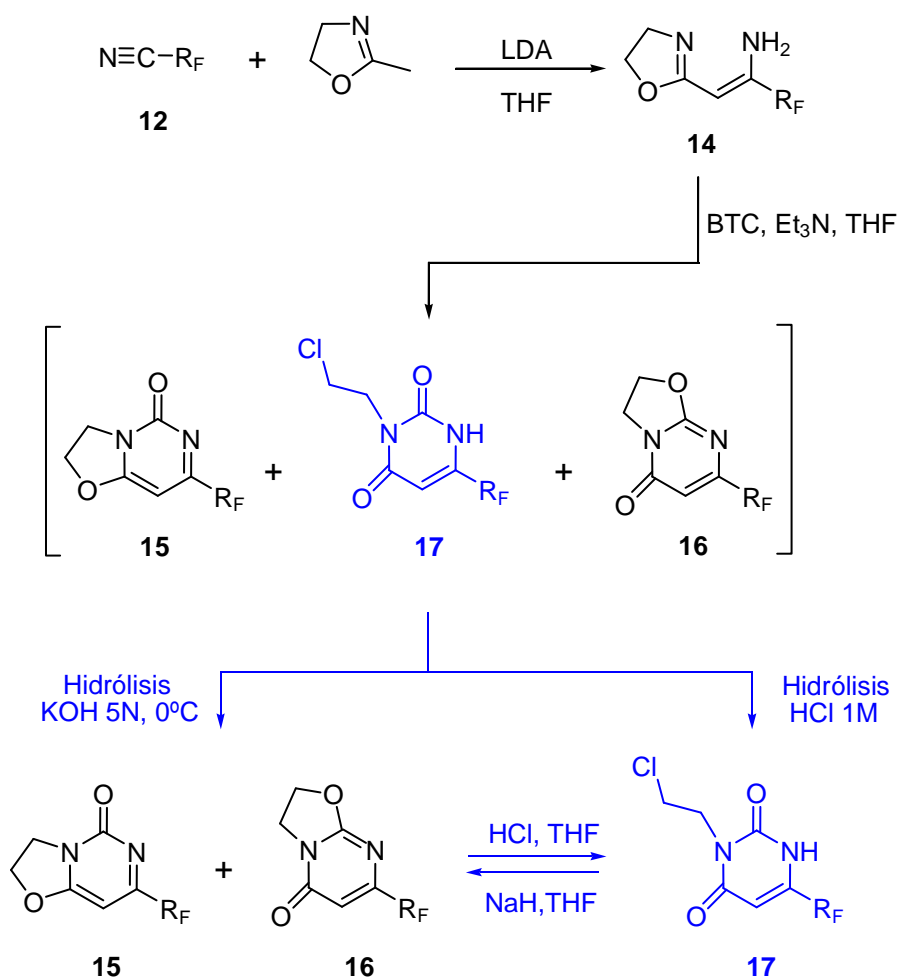
**Figura 2.16**

En la Figura 2.16 se resumen los resultados obtenidos en el escalado de los productos en cada una de las reacciones de la secuencia sintética para la preparación de los uracilos **17**. Los datos permiten concluir que los pasos más sensibles corresponden a la obtención de nitrilo difluorado **11** y a la del producto final, representado por **17f**.

### **2.3.2. Obtención de derivados de uracilo fluorados a través de la vía de las $\beta$ -enaminoxazolinias**

Como se puso de manifiesto en el Capítulo 1, cuando esta metodología se aplicó a la obtención de derivados fluorados de uracilo y pirimidinona<sup>22,23,49</sup> mediante reacción de  $\beta$ -enaminoxazolinias con diferentes derivados de ácido carbónico, no sólo se obtenían las esperadas 2-oxazolopirimidinonas, sino que, además, aparecían 4-oxazolopirimidinonas, lo que en parte justificaba el trabajo expuesto en el primer capítulo de la tesis. En este caso, se hará uso de esta metodología con el objeto de obtener nuevos derivados de uracilo y oxazolopirimidinona fluorados que formarán parte de la batería de compuestos cuya actividad biológica será evaluada en el último capítulo.

En el Esquema 2.39 se resume la secuencia sintética que permite la obtención de estos compuestos (en negro, los avances logrados previamente en nuestro grupo de investigación, en azul, los nuevos estudios).



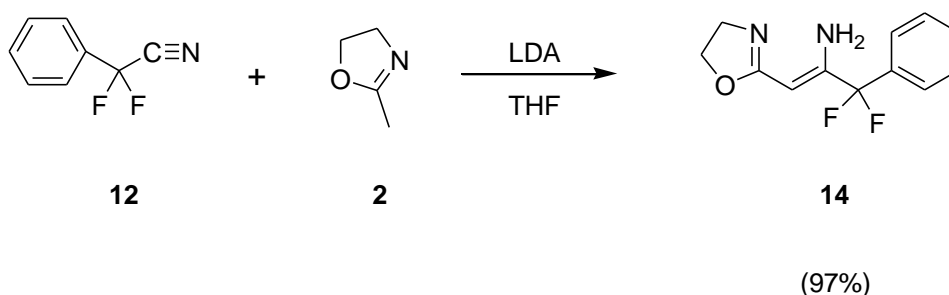
**Esquema 2.39**

Simultáneamente se procederá también a estudiar el escalado de la metodología, de nuevo desde escala miligramo hasta escala multigramo.

Entre la vía de los  $\beta$ -enaminoésteres fluorados, desarrollada en el epígrafe anterior, y la vía de las  $\beta$ -enaminoxazolinias fluoradas, que nos ocupa ahora, hay un punto de partida común: la obtención de los derivados de nitrilo fluorados **12**, como paso previo para cualquiera de las dos estrategias sintéticas referidas (Esquema 2.29).

### 2.3.2.1 Síntesis de la $\beta$ -enaminoxazolina fluorada **14**.

De modo similar a las  $\beta$ -enaminoxazolinas no fluoradas sintetizadas en el Capítulo primero, el derivado del  $\beta$ -enaminoéster  $\Delta^2$ -oxazolin-prottegido **14** se obtuvo como un único tautómero con un rendimiento de 97%, mediante la reacción entre 2-metil- $\Delta^2$ -oxazolina comercial **2** y  $\alpha$ -fenil- $\alpha,\alpha$ -difluoroacetnitrilo **12** en medio básico (Esquema 2.41).



**Esquema 2.41**

En el escalado de la reacción, desde 100 mg hasta 5 g de compuesto de partida, se mantiene el excelente rendimiento inicial, con una ligera disminución cuando la cantidad de nitrilo difluorado fue de 8 g (Tabla 2.8). Para esta cantidad fue necesario modificar ligeramente las condiciones de la reacción, disminuyendo la proporción de disolvente y aumentando el tiempo de la misma.

**Tabla 2.8** Síntesis y escalado de  $\beta$ -enaminoxazolina fluorada **14**

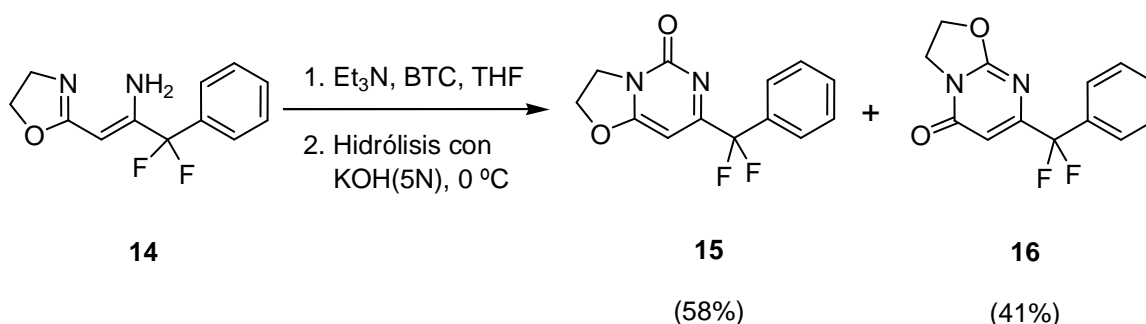
Cantidad R.P.	Cantidad P.F.	Rendimiento
0.10 g	0.15 g	97%
1.00 g	1.51 g	97%
3.00 g	4.43 g	95%
5.00 g	7.39 g	95%
8.00 g	11.20 g	90%

### 2.3.2.2 Síntesis de los isómeros fluorados de oxazolopirimidinona **15** y

**16**

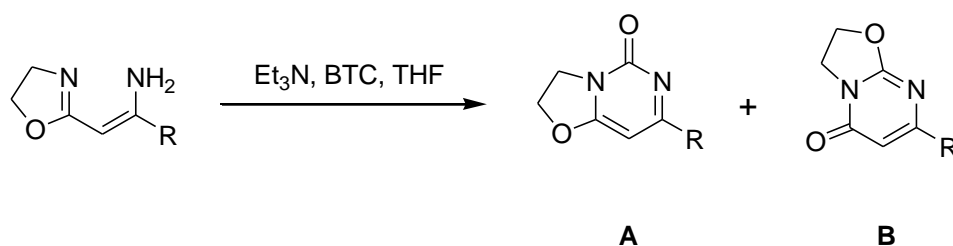
Para el acoplamiento de **14** con un derivado de ácido carbónico se eligió trifosgeno debido a las ventajas que ofrece su manejo y por su elevada reactividad frente a sistemas N,N'-binucleofílicos.

A una disolución de **14** (1,0 equiv.) y Et<sub>3</sub>N (2,0 equiv.) en THF, a temperatura ambiente, se adicionó lentamente una disolución de trifosgeno (1,0 equiv.) en THF. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 2-3 horas hasta que se consumió el compuesto de partida (CCF). A continuación, se hidrolizó con KOH (5N) a 0°C, obteniéndose una mezcla de los productos isómeros **15** y **16**, en la que la proporción del isómero **15** (58%) es superior a la del **16** (41 %).



Esquema 2.42

Los resultados son similares a los obtenidos en la síntesis de sus análogos no fluorados expuesto en el Capítulo 1, obteniendo en todos los casos mayor proporción del isómero A que del B (Esquema 2.43, Tabla 2.9); sin embargo, en experimentos anteriores realizados en nuestro grupo con reactivos que incorporan otras agrupaciones fluoradas<sup>27</sup> se obtuvieron proporciones distintas de estos isómeros siendo el mayoritario el B.



Entrada	R	Rto A (%)	Rto B (%)	Rto global
1 <sup>1</sup>	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	52	33	85
2 <sup>1</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	40	40	80
3 <sup>1</sup>	<i>p</i> -MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	50	28	78
4 <sup>1</sup>	Tiofenilo	62	22	84
5 <sup>2</sup>	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	27	61	88
6 <sup>2</sup>	<i>p</i> -FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	29	53	82
7	-CF <sub>2</sub> Ph	58	41	99

<sup>1</sup>Capítulo 1 de esta Tesis

<sup>2</sup>Estudios precedentes del grupo de investigación

#### Esquema 2.43, Tabla 2.9

La Tabla 2.9 recoge los resultados obtenidos para esta reacción con derivados fluorados y no fluorados. Como puede observarse, el isómero que se halla en mayor proporción es la oxazolo-pirimidinona **A** en todos los casos, excepto para las entradas 5 y 6, que corresponden a derivados con restos fluorados de fenilo en posición *para*. Como se vio en el Capítulo 1 (Esquema 1.20) la formación de la oxazolo-pirimidinona **B**, en el seno de la reacción, implicaba el ataque nucleofílico de anión cloruro sobre la oxazolo-pirimidinona **A** ya formada, dando lugar a un derivado cloroetilado de uracilo por apertura del anillo de oxazolona. Este sistema podía evolucionar hacia la obtención tanto de la oxazolo-pirimidinona **B** como de nuevo hacia la **A** por heterociclación con pérdida de HCl. La presencia de grupos electronegativos en posición *para* del anillo de benceno, favorecería el ataque nucleofílico del anión cloruro, retirando densidad electrónica de la posición atacada y explicando al cabo, la obtención de una mayor proporción de la oxazolo-pirimidinona **B**.

El escalado del proceso, hasta 1 g de compuesto de partida, resultó cuantitativo (Tabla 2.10).

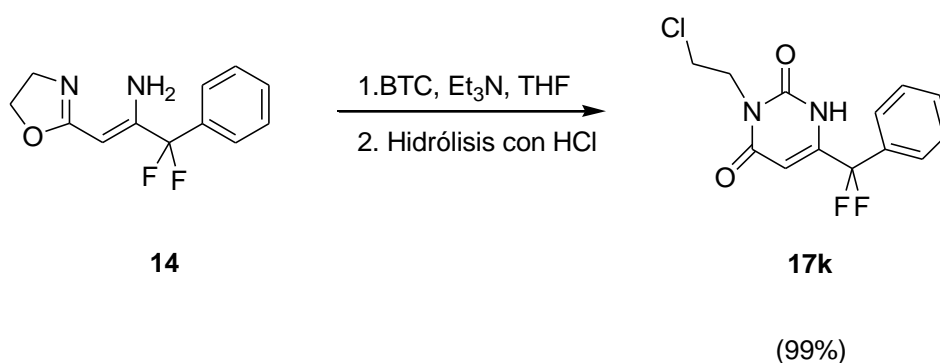
**Tabla 2.10** Síntesis de las 2 y 4-oxazolopirimidinonas difluoradas **15** y **16**

<b>14 (g)</b>	<b>15+16 (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
0.05	0.05	99
0.10	0.11	99
0.50	0.55	99
1.00	1.10	99

### 2.3.2.3 Obtención del derivado de uracilo clororetilado fluorado **17k**

De modo análogo a lo expuesto en el Capítulo 1, este derivado se obtuvo, tanto a partir de la  $\beta$ -enaminoxazolona fluorada **14**, como de la mezcla isomérica de oxazolopirimidinonas **15** y **16**.

En el primer caso, tras la reacción de **14** con trifosgeno, se hidrolizó la mezcla con una disolución de HCl, obteniéndose **17k** con rendimiento cuantitativo (Esquema 2.44).



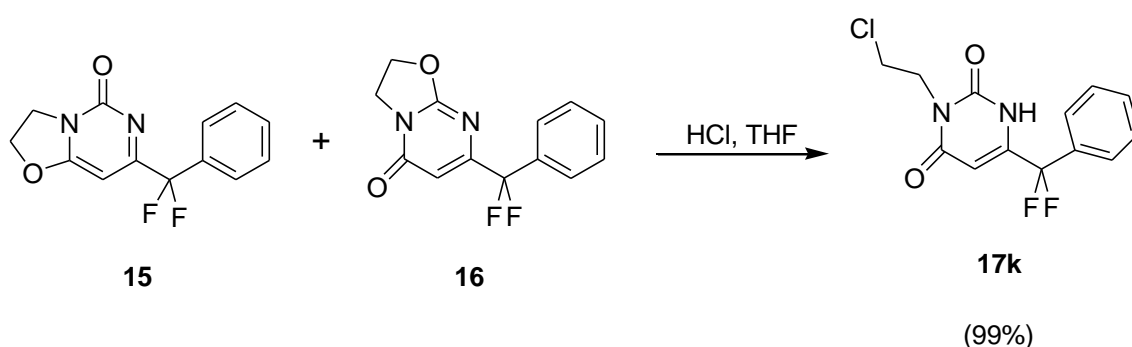
**Esquema 2.44**

El escalado, hasta 5 g, resultó también cuantitativo (Tabla 2.11).

**Tabla 2.11** Síntesis del derivado de uracilo difluorado **17k**

<b>14 (g)</b>	<b>17 (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
0.05	0.06	99
0.10	0.12	99
0.50	0.62	99
1.00	1.25	99
5.00	6.24	99

Un resultado análogo se obtuvo hidrolizando la mezcla de **15** y **16**.



**Esquema 2.45**

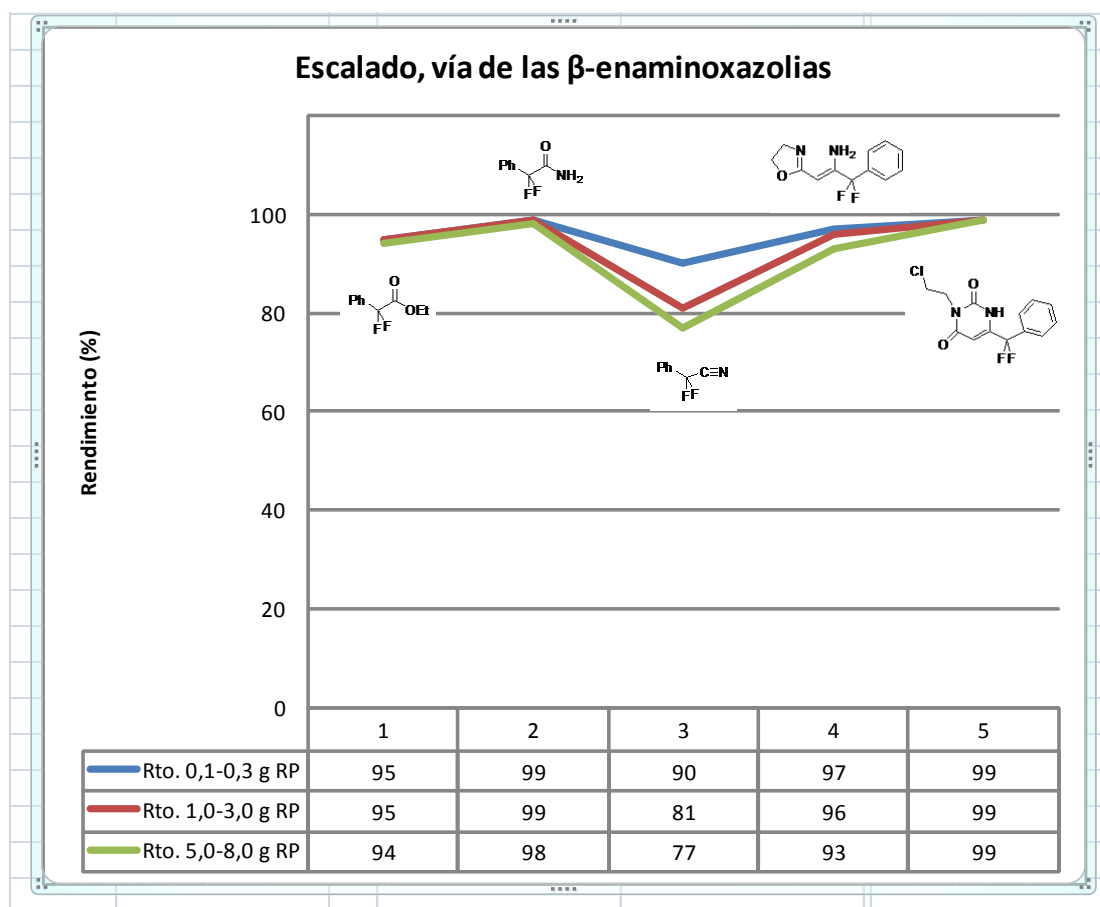
#### 2.3.2.4 Escalado de las reacciones.

El proceso de escalado desde escala miligramo hasta gramo y multigramo, en la vía que hemos definido como de los  $\beta$ -enaminoxazolininas para la obtención de derivados fluorados de uracilo, requirió escasas modificaciones. Tan sólo se modificaron ligeramente las condiciones de la reacción que nos permite la obtención de la  $\beta$ -enaminoxazolinina **14** para cantidades superiores a 8 g de compuesto de partida **12**.

En el siguiente gráfico se recopilan los resultados obtenidos en el proceso de escalado y que nos permite la obtención de los derivados de uracilo **17k**.



Obsérvese que los tres primeros pasos .hasta la obtención del derivado de nitrilo difluorado **12**- ya los estudiamos para la vía del  $\beta$ -enaminoéster.

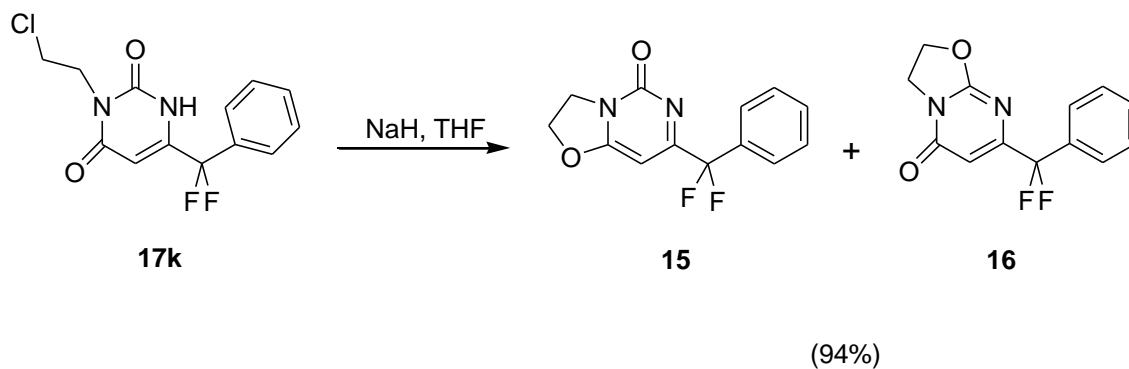


**Figura 2.17**

Como se observa en la figura precedente, de nuevo el paso más sensible – en este caso único- corresponde al escalado de la obtención de derivado de nitrilo difluorado **11**. Igualmente, podemos observar que la vía sintética, tras la optimización del escalado sigue siendo válida para el rango de cantidades estudiado (hasta 30 gramos en los tres primeros pasos, y hasta 8 y 5 g en los dos últimos, respectivamente).

### 2.3.3 Obtención de los derivados fluorados de oxazolopirimidinona **15** y **16** partiendo del derivado de uracilo fluorado cloro-etilado **17k**

Cuando **17k** se trató con una disolución de NaH en THF se obtuvieron los productos **15** y **16** con excelente rendimiento (Esquema 2.46).

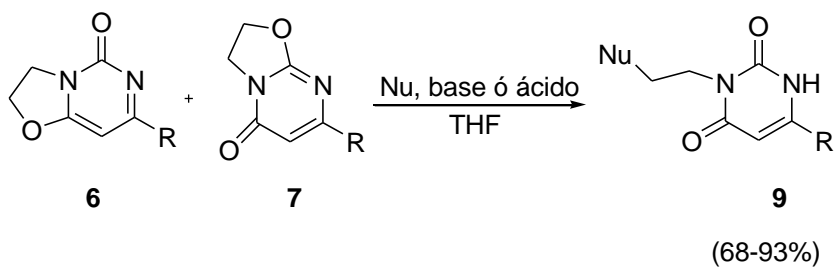


Esquema 2.46

### 2.3.4 Síntesis parcial de derivados de uracilo fluorados a partir de otros uracilos.

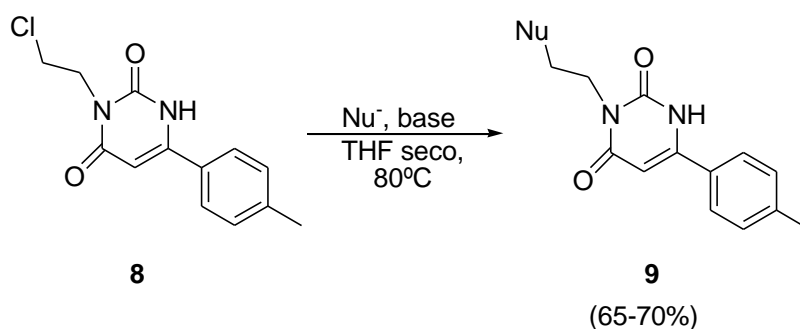
La nueva propuesta consiste en introducir átomos de flúor en las moléculas ya obtenidas, fluoradas o no, mediante la utilización de reactivos de fluoración.

En el primer capítulo describimos un método sintético que nos permitía la introducción de nucleófilos, en medio básico o en medio ácido, en el carbono en  $\alpha$  al oxígeno del anillo oxazólico de cualquiera de las dos oxazolopirimidinonas obtenidas, con la consiguiente apertura del ciclo y la formación de los derivados de uracilo **9**.



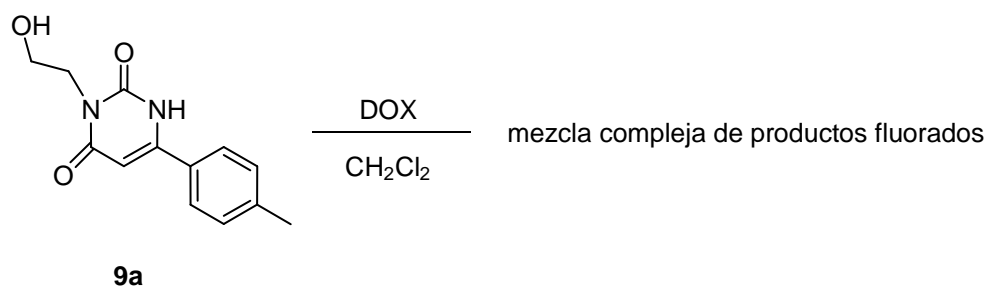
**Esquema 2.47**

De igual modo, desarrollábamos una reacción que nos permitía la introducción de nucleófilos en los derivados cloroetilados de uracilo, por sustitución nucleófila del cloro, en medio básico (Esquema 2.48)



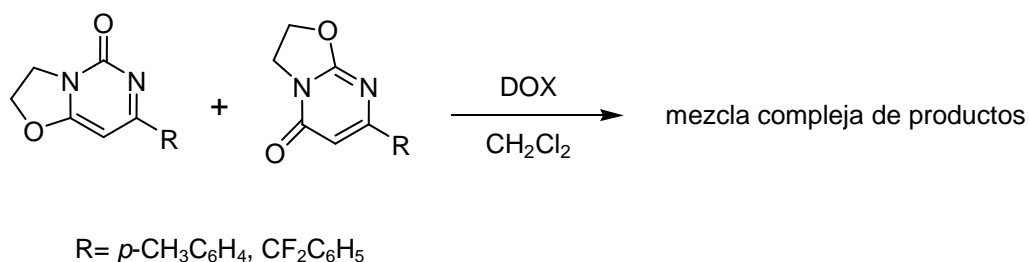
**Esquema 2.48**

La primera opción fue servirse de Deoxoflúor como agente nucleófilo de fluoración, un agente de fluoración especialmente indicado para fluorar hidroxilos, cetonas y aldehídos. Planteamos tres posibles vías de obtención del producto, sin embargo, en todos los casos la reacción no prosperó o se obtuvieron rendimientos muy bajos de producto final. La primera opción fue tratar de fluorar el hidroxilo del derivado **9a**, sin embargo, la reacción a temperatura ambiente y a 80 °C, dio como resultado una mezcla compleja de productos fluorados (Esquema 2.49).



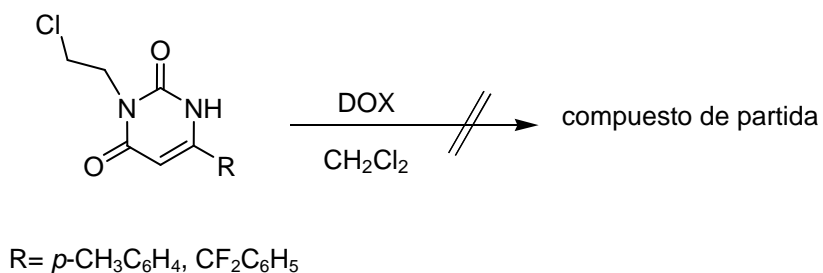
**Esquema 2.49**

Igualmente, cuando se hizo reaccionar una mezcla de oxazolopirimidinonas con Deoxoflúor durante 20 horas, tanto a temperatura ambiente como a 80 °C, se obtuvo una mezcla compleja de productos (Esquema 2.50). La misma reacción se repitió para  $R=p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$  a 80 °C y durante 90 horas, sin variar el resultado final.



**Esquema 2.50**

Cuando se intentó partiendo de los derivados cloroetilados de uracilo la reacción no avanzó, obteniéndose el compuesto de partida (Esquema 2.51). La misma reacción se repitió para  $R=p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$  a 80 °C y durante 90 horas, sin variar el resultado final.



**Esquema 2.51**

En la bibliografía existen precedentes sobre la utilización de TBAF<sup>137</sup>, como fuente orgánica de flúor en reacciones nucleofílicas de fluoración, siempre en disolventes apróticos, dada la elevada higroscopia de estos productos.

En 1998, *Albanese et al.*<sup>138</sup> obtuvieron derivados fluoroalquilados partiendo de derivados cloro y bromoalquilados. El agente de fluoración elegido fue TBAF·nH<sub>2</sub>O (n=0.5-10) y la reacción transcurría de manera cuantitativa dando lugar a una mezcla de productos finales: un derivado fluorado, otro hidroxilado y un alqueno. La proporción de cada uno de los productos finales variaba, siendo habitualmente mayoritaria (70-90%) la del producto fluorado, excepto para el caso de BrCH<sub>2</sub>Ph, en el que se obtenía exclusivamente el derivado fluorado FCH<sub>2</sub>Ph con un 90 % de rendimiento.



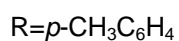
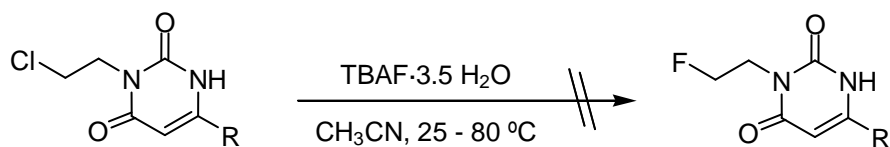
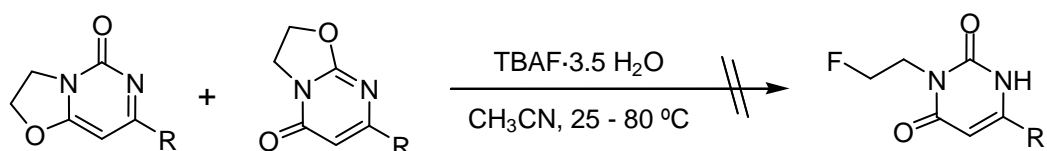
R= Alquilo

### Esquema 2.52

Las mismas condiciones aplicadas a nuestro caso no permitieron obtener el compuesto deseado (Esquema 2.53).

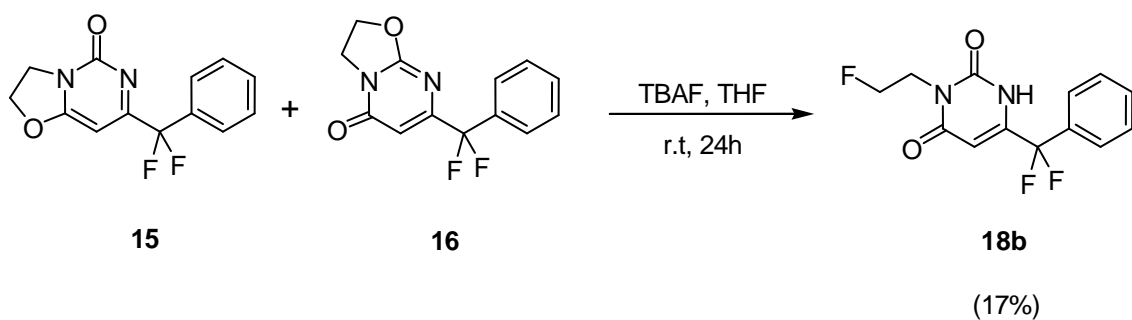
<sup>137</sup> (a) Clark, J.H. *Chem Rev.* **1980**, *80*, 429. (b) Gerstenberg, M.; Haas, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 647. (c) Haas, A.; Lieb, M. *Chimica* **1985**, *39*, 134 (d) Mascaretti, O.A. *Aldrichimica Acta* **1993**, *26*, 47. (e) Chi, D. Y.; Kilbourn, M. R.; Katzenellenbogen, J. A. *J.Org.Chem.* **1987**, *52*, 658.

<sup>138</sup> Albanese, D. ; Landisi, D. ; Penso, M. . *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9587-9589



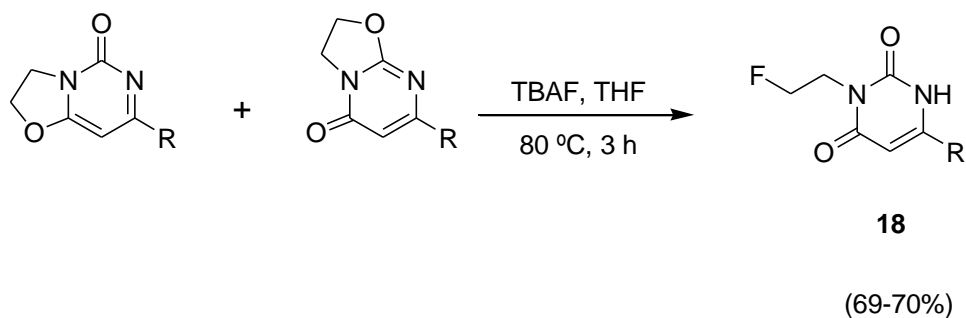
**Esquema 2.53**

Sin embargo, la reacción de la mezcla de **15** y **16** en THF y en ausencia de agua, a temperatura ambiente, condujo al derivado de uracilo fluoroetilado con un rendimiento de 17% (Esquema 2.54)



**Esquema 2.54**

El rendimiento se incrementó notablemente cuando la reacción se llevó a cabo a 80 °C en THF seco durante 3 horas, utilizando 2 equivalentes de TBAF (Esquema 2.55).

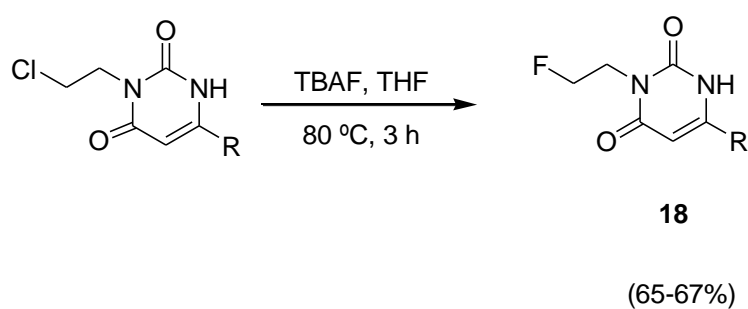


Producto	R	Rto (%)
<b>18a</b>	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	70
<b>18b</b>	CF <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	69

**Esquema 2.55, Tabla 2.12**

La reacción resulta viable tanto para el derivado de oxazolopirimidinona fluorado como no fluorado. En ambos casos se aumentó la cantidad de reactivo de partida hasta 0.5 g, manteniéndose los rendimientos.

En las mismas condiciones de reacción se obtuvieron los productos **18** a partir del uracilo cloroetilado correspondiente (Esquema 2.56).



Producto	R	Rto (%)
<b>18a</b>	<i>p</i> -MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	67
<b>18b</b>	CF <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	65

**Esquema 2.56, Tabla 2.13**

## 2.4 Parte Experimental

### Generalidades

Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera inerte de nitrógeno.

### Técnicas analíticas.

*Espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN).* Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron con un espectrómetro Bruker 300 utilizando deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) como disolvente. Los valores de los desplazamientos químicos de los núcleos se expresan en valores de  $\delta$  (ppm), tomando como referencia interna tetrametilsilano (TMS) (0,00 ppm) para los espectros de protón, triclorofluorometano (0,00 ppm) para los espectros de flúor y la señal intermedia del triplete del cloroformo deuterado (77,00 ppm) para los espectros de carbono. Las constantes de acoplamiento,  $J$ , se dan en Hercios (Hz).

*Espectrometría de masas.* Para la obtención de los espectros de masas se utilizó un equipo VG AUTOESPEC (micromass). Los espectros de impacto electrónico (IE) fueron realizados a 70 eV, siendo la velocidad de aceleración del haz de iones  $\text{C}_s^+$  en los espectros realizados por FAB de 30.000 V. Los valores listados para cada uno de los compuestos se expresan en unidades de m/z.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato "Cambridge Instruments", no han sido corregidos y son solamente indicativos.

Los análisis por cromatografía en capa fina (CCF) se llevaron a cabo en sílica gel activa al UV (Kieselgel 60  $\text{F}_{254}$  sobre plástico); las placas se visualizaron utilizando una luz UV de 254 nm de longitud de onda y revelando con yodo. En



determinados casos, se emplearon reactivos de Cerio<sup>139</sup> y Vainillina<sup>66</sup> para el revelado de las placas.

Para las cromatografías de columna flash se utilizó silica gel 60 (0,040-0,063). En algunos casos la sílice fue desactivada tratándola previamente con una disolución de Et<sub>3</sub>N en n-hexano al 2%.

### **Disolventes y reactivos.**

Los disolventes utilizados en las reacciones (THF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, etc) se secaron y destilaron previamente a su uso.<sup>67</sup>

Así, THF anhidro se obtuvo a partir de THF comercial, siendo sometido a un procedimiento de secado que consistió en calentarlo a reflujo sobre una aleación de sodio y potasio (K<sub>3</sub>Na) durante 12 horas, aproximadamente, hasta la ausencia total de agua, utilizando benzofenona como indicador. Una vez seco, el disolvente se destiló en atmósfera de nitrógeno y se almacenó del mismo modo.

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se secó sobre CaH<sub>2</sub>, almacenándose, a continuación, bajo atmósfera de nitrógeno.

De modo similar, CH<sub>3</sub>CN fue secado sobre LiAlH<sub>4</sub>, almacenándose, a continuación, bajo atmósfera de nitrógeno.

La diisopropilamina, utilizada en la formación de diisopropil amiduro de litio (LDA), fue destilada sobre lentejas de hidróxido sódico en atmósfera de nitrógeno y se conservó bajo las mismas condiciones.

El Hexano para lavado de NaH se secó sobre sodio hilado en atmósfera de argón.

---

<sup>139</sup> El reactivo indicado se preparó como sigue: A 500 ml de agua se añaden 21 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O (Aldrich Co.), 1 g de Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> y 31 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%). La mezcla se agita durante 30 minutos hasta la obtención de una solución amarilla clara. La CCF se introduce en la solución y después se quema en una placa calefactora hasta la aparición de la mancha color azul intenso debido a la oxidación del producto con el reactivo de cerio.

Por otro lado, los reactivos utilizados: etilbencilformato, *n*-BuLi, Deoxoflúor, metiloxazolona, los diferentes isocianatos, trifosgeno, TBAF (1M), TBAF·3.5 H<sub>2</sub>O, trietilamina, etanol absoluto, acetato de etilo, ácido clorhídrico, hidróxido potásico, NaHCO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, proceden de casas comerciales (*Aldrich, Fluka o Fluorochem*) del mejor grado posible y no se sometieron a purificación previa.

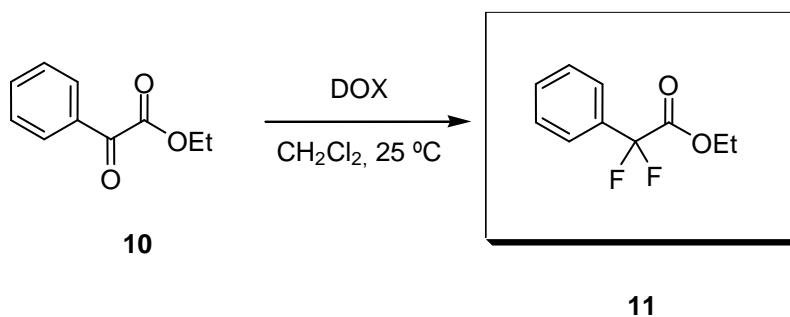
El reactivo Deoxoflúor procede de la casa comercial *Air Products and Chemicals, Inc.*

El reactivo NaH comercial, se lavó con hexano anhidro 5 o 6 veces en atmósfera inerte para limpiarlo del aceite del que viene impregnado (al 60%), antes de su utilización.

Algunos de los productos obtenidos se encuentran descritos y caracterizados en la literatura<sup>26,28</sup>, en cualquier caso y dado el la faceta de revisión que incluye esta tesis se incluyen los datos de todos los compuestos obtenidos correspondientes a este capítulo. En su caso, se notificará cuando los compuestos hayan sido obtenidos y caracterizados por vez primera.

#### 2.4.1. Obtención de derivados de uracilo fluorados a través de la vía de los β-enaminoésteres

##### 2.4.1.1. Síntesis del α,α-difluoroéster intermedio 11

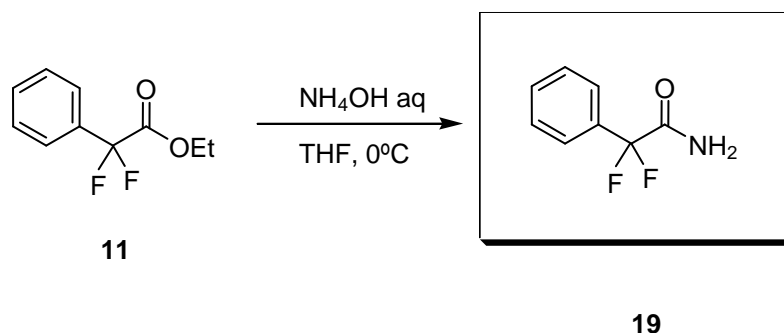


### *Procedimiento General.*

*Para 0.2 g de reactivo de partida.* Sobre una disolución de benzoilformato de etilo **10** en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (1,1 mmol, 3 ml) en atmósfera inerte, se adiciona lentamente 1,9 mmol de Deoxofluor y en baño de hielo-agua (0-3 °C). A continuación se añade 0,2 mmol de EtOH absoluto. Se deja a temperatura ambiente en agitación durante 20 h. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo por cromatografía en capa fina (CCF). Acabada la reacción se hidroliza con disolución de NaHCO<sub>3</sub> saturada abundantemente, hasta desaparecer el exceso de CO<sub>2</sub>. Separamos las dos fases formadas. Lavamos la fase acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 ml). Todas las fases orgánicas reunidas se lavan con HCl ac. (2 x 5 ml) y se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Por último se elimina el disolvente por destilación a presión reducida, obteniéndose un aceite incoloro.

*Para 30 g de reactivo de partida.* La reacción se mantiene dentro de los excelentes rendimientos sin necesidad de modificar el procedimiento, condiciones y proporciones de productos.

#### **2.4.1.2. Síntesis de la amida fluorada 19**



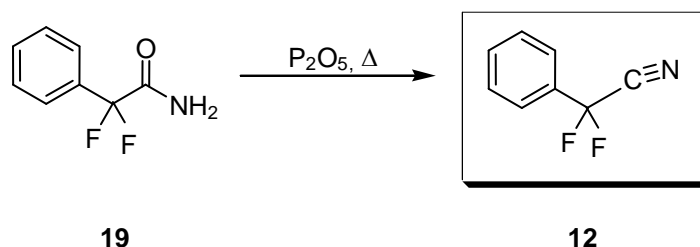
### *Procedimiento General*

*Para 0.2 g de reactivo de partida.* Se prepara una disolución de difluoroacetato de etilo **1** en THF (1.0 mmol, 3 ml). En condiciones inertes y en baño de hielo (0-3 °C) añadimos paulatinamente 1.9 ml de NH<sub>4</sub>OH al 25% (1.4 mmol). Se deja en agitación a temperatura ambiente 24 h. El seguimiento de la

reacción se lleva a cabo por cromatografía en capa fina (CCF). Acabada la reacción separamos las fases acuosa y orgánica, y lavamos la fase acuosa con AcOEt (3 x 5 ml). Todas las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtran. Por último, se elimina el disolvente por destilación a presión reducida, obteniéndose un sólido blanco.

*Para 30 g de reactivo de partida.* La reacción se mantiene dentro de los excelentes rendimientos sin necesidad de modificar el procedimiento, condiciones y proporciones de productos.

#### 2.4.1.3. Síntesis del nitrilo fluorado 12

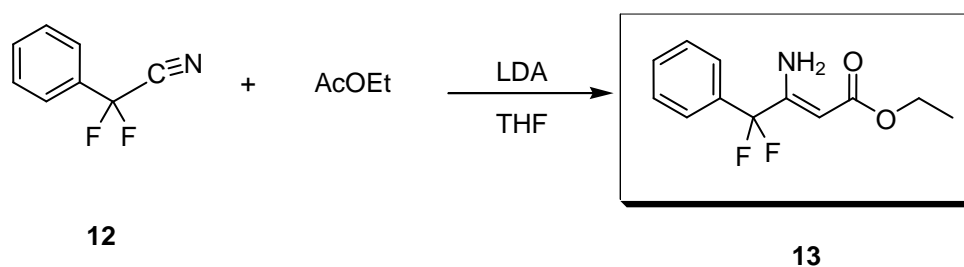


#### *Procedimiento General*

*Para 0.2 g de reactivo de partida.* Una mezcla de α,α-difluoroacetamida (1.2 mmol) y pentóxido de fósforo (2.4 mmol) se calienta prolongadamente (200-250 °C) , primero a presión atmosférica y más tarde a presión reducida, hasta que no destila más líquido. El líquido destilado se recoge en baño de acetona y nieve carbónica.

*Para 30 g de reactivo de partida.* Las proporciones y procedimientos se mantienen. El sistema de destilación debe estar perfectamente sellado.

#### 2.4.1.4. Síntesis del $\beta$ -enaminoéster fluorado 13



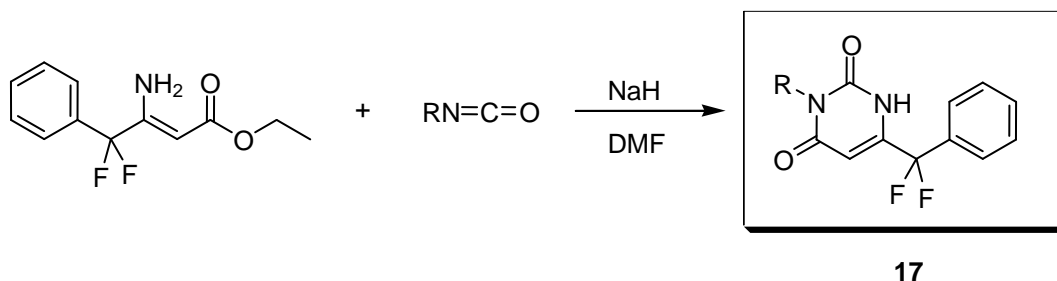
##### *Procedimiento General*

*Para 0.2 g de reactivo de partida.* Sobre una disolución de diisopropilamina (2.0 mmol) en THF (3 ml) a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en atmósfera inerte, se adiciona gota a gota *n*-butil litio (2.0 mmol) y se deja en agitación durante 30 minutos. A continuación se baja la temperatura del baño hasta  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se adiciona gota a gota el éster correspondiente (1.5 mmol) disuelto en THF (2 ml), manteniendo la agitación, hasta completar la formación del enolato (color amarillo claro). Seguidamente, se baja la temperatura del baño hasta  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se adiciona lentamente el nitrilo (1.3 mmol, 0.2 g) disuelto en THF (2 ml). El seguimiento de la reacción se lleva a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF). Después de 1,5 horas, se hidroliza el crudo de reacción con una disolución acuosa saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se extrae con acetato de etilo (3 x 6 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaCl}$  y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Por último se elimina el disolvente por destilación a presión reducida, obteniéndose un aceite que se purifica, posteriormente, por cromatografía *flash* [*n*-hexano-AcOEt (4:1)] en sílica gel desactivada con una disolución de  $\text{Et}_3\text{N}$  al 2% en *n*-hexano.

*Para 10 g de reactivo de partida.* Se mantiene el procedimiento de la reacción, así como en general las proporciones. Tan sólo disminuye la proporción de disolvente en la última adición. Así, sobre una disolución de diisopropilamina (100 mmol) en THF (60 ml) a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en atmósfera inerte, se adiciona gota a gota

*n*-butil litio (100.0 mmol) y se deja en agitación durante 30 minutos. A continuación se baja la temperatura del baño hasta -50 °C y se adiciona gota a gota el éster correspondiente (78.5 mmol) disuelto en THF (40 ml), manteniendo la agitación, hasta completar la formación del enolato (color amarillo claro). Seguidamente, se baja la temperatura del baño hasta -78 °C y se adiciona lentamente el nitrilo (65.4 mmol, 10 g) disuelto en THF (25 ml). El seguimiento de la reacción se lleva a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF). Después de 1,5 horas, se hidroliza el crudo de reacción con una disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl y se extrae con acetato de etilo (3 x 20 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl y se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Por último se elimina el disolvente por destilación a presión reducida, obteniéndose un aceite que se purifica, posteriormente, por cromatografía *flash* [*n*-hexano-AcOEt (4:1)] en sílica gel desactivada con una disolución de Et<sub>3</sub>N al 2% en *n*-hexano.

#### 2.4.1.5. Síntesis de los derivados de uracilo C6 fluorados 17



#### *Procedimiento General*

*Para 0.2 g de reactivo de partida.* Sobre una disolución del β-enaminoéster **13** (0,8 mmol) en DMF (2 ml) a 0 °C y atmósfera inerte se adiciona lentamente hidruro sódico (1,4 mmol) y se deja 30 minutos en agitación. Transcurrido ese tiempo, se adiciona el isocianato o isotiocianato (1,0 mmol) y se sigue el transcurso de la reacción por cromatografía en capa fina (CCF). Una vez ha desaparecido el compuesto de partida se hidroliza el crudo con agua desionizada. A partir de aquí el proceso de purificación varía dependiendo del derivado de uracilo que se trate:

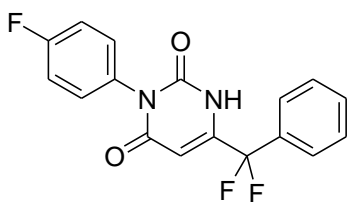
\_ para **17a-17e** se elimina el disolvente calentando a presión reducida. El residuo sólido se redisuelve en agua (3 ml) y se extrae con diclorometano (3 x 4 ml). Estos derivados de uracilo son bastante solubles en agua e insolubles en diclorometano. La fase acuosa se concentra hasta aproximadamente 1 ml y se extrae con acetato de etilo (3 x 4 ml); las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida quedando un residuo sólido que se purifica como se indica en cada caso.

\_ para **17e-17j** se elimina el disolvente calentando a presión reducida. El residuo sólido se redisuelve en agua (2ml) y se extrae con acetato de etilo (3 x 8 ml). Las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida quedando un residuo sólido que se purifica como se indica en cada caso.

*Para 15 g de reactivo de partida.* El procedimiento y las proporciones se mantienen, con alguna pequeña variación. Así se añade algo más de base (2 equivalentes) a la par que disminuye la proporción de disolvente empleado. Sobre una disolución del β-enaminoéster **13** (42.0 mmol) en DMF (80 ml) a 0 °C y atmósfera inerte se adiciona lentamente hidruro sódico (84.0 mmol) y se deja 30 minutos en agitación. Transcurrido ese tiempo, se adiciona el isocianato (50.4 mmol) y se sigue el transcurso de la reacción por cromatografía en capa fina (CCF). Una vez ha desaparecido el compuesto de partida se hidroliza el crudo con agua desionizada. Se elimina el disolvente calentando a presión reducida. El residuo sólido se redisuelve en agua (8 ml) y se extrae con acetato de etilo (3 x 40 ml). Las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida quedando un residuo sólido que se purifica como se indica en cada caso.

Los compuestos **17f**, **17h**, **17i**, **17j** fueron obtenidos, aislados e identificados por primera vez.

**Producto: 6-(Difluorofenilmetil)-3-(4-fluorofenil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (17a)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):** 90  
**Fórmula empírica:** C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
**Masa molecular** 332  
**Punto de fusión (°C):** 166-168

**<sup>1</sup>H-RMN (MeOD, 300 MHz) δ (ppm):** 5,87 (s, 1H), 7,04-7,07 (m, 4H), 7,32-7,35 (m, 3H), 7,52-7,55 (m, 2H).

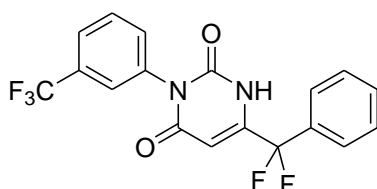
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 169,7 (s), 165,2 (t, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=29,6), 164,6 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub>=244,8), 162,0 (s), 138,0 (t, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=27,3), 135,2 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub>=2,8), 131,9 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub>=9,2), 131,5 (d), 129,9 (d), 127,2 (t, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub>=6,0), 119,7 (t, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub>=244,0), 116,9 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=23,0), 95,8 (t, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub>=5,2).

**<sup>19</sup>F-RMN (MeOD, 282,4 MHz) δ(ppm):** -101,6 (s, 2F), -117,4 (m, 1F).

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 332,0772. Experimental: 332,0764.

**Comentarios:** Purificación mediante lavado con n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

**Producto: 6-(Difluorofenilmetil)-3-(3-trifluorometilfenil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (17b)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):** 73  
**Fórmula empírica:** C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>F<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
**Masa molecular** 382  
**Punto de fusión (°C):** 165-167

**<sup>1</sup>H-RMN (MeOD, 300 MHz) δ (ppm):** 5,89 (s, 1H), 7,46-7,57 (m, 5H), 7,69-7,75 (m, 4H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 167,6 (s), 159,1 (t, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=30,7), 158,1 (s), 138,9 (s), 136,7 (t, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=26,7), 134,2 (d), 132,9 (c, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=32,5), 132,1 (d), 131,4 (d), 130,1 (d), 127,4 (c, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub>=3,8), 127,2 (t, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub>=6,0), 126,4 (c, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub>=4,9), 125,7 (c, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub>=271,3), 119,1 (t, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub>=244,5), 98,0 (t, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub>=5,2).

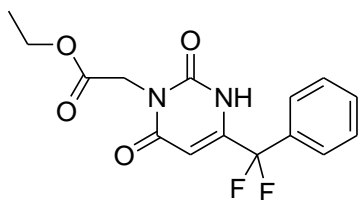
**<sup>19</sup>F-RMN (MeOD, 282,4 MHz) δ(ppm):** -62,1 (s, 3F), -99,52 (s, 2F).

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 382,0740 Experimental: 382,0755

**Comentarios:** Purificación mediante lavado con n-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



**Producto: [4-(Difluorofenilmetil)-2,6-dioxo-3,6-dihidro-pirimidin-1-il]-acetato de etilo (17c)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):** 73  
**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
**Masa molecular** 324  
**Punto de fusión (°C):** 98-100

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 1,15 (t, *J*=7,2, 3H), 4,07 (c, *J*=7,1, 2H), 4,54 (s, 2H), 5,79 (s, 1H), 7,34-7,35 (m, 3H), 7,49-7,52 (m, 2H)

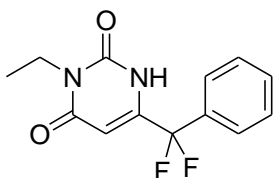
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 171,1 (s), 167,2 (s), 162,1 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=28,7), 160,1 (s), 138,7 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=27,3), 131,7 (d), 129,9 (d), 127,2 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=6,0), 119,6 (t, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub>=243,9), 96,0 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=5,2), 62,8 (t), 43,1 (t), 14,6 (c).

**<sup>19</sup>F-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 282,4 MHz) δ (ppm):** -98,1(s, 2F).

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 324,0921 Experimental: 324,0927

**Comentarios:** Purificación mediante lavado con *n*-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y posterior cromatografía *flash* [*n*-hexano-AcOEt (2:1)] en sílica gel.

**Producto: 3-etil-6-(difluorofenilmetil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (17d)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):** 78  
**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
**Masa molecular** 266  
**Punto de fusión (°C):** 135-137

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 1,17 (t, *J*=7,1, 3H), 3,89 (c, *J*=7,0, 2H), 5,77 (s, 1H), 7,42-7,50 (m, 5H).

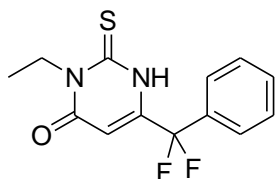
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 168,5 (s), 160,9 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=30,0), 160,2 (s), 137,5 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=27,3), 131,7 (d), 129,8 (d), 127,2 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=5,7), 119,4 (t, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub>=243,9), 96,6 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=4,9), 37,0 (t), 13,7 (c),

**<sup>19</sup>F-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 282,4 MHz) δ (ppm):** -100,6 (s, 2F).

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 266,0866 Experimental: 266,0861

**Comentarios:** Purificación mediante lavado con *n*-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Producto: 3-etil-6-(difluorofenilmetil)-2,3-dihidro-2-tioxopirimidin-4(1H)-ona (17e)**



**Estado físico:** Sólido amarillo

**Rendimiento (%):** 66

**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS

**Masa molecular** 282

**Punto de fusión** 110-112

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 1,29 (t, J=7,0, 3H), 4,41 (c, J=7,0, 2H), 5,94 (s, 1H), 7,52-7,55 (m, 5H), 9,30 (s, 1H)

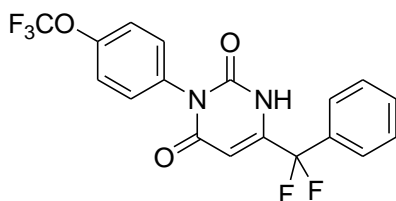
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 176,7 (s), 159,9 (s), 146,3 (t, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=27,6), 132,2 (d), 131,9 (t, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=27,6), 129,6 (d), 125,9 (t, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub>=5,7), 116,4 (t, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub>=243,9), 104,6 (d), 42,7 (t), 11,6 (c),

**<sup>19</sup>F-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 282,4 MHz) δ (ppm):** -128,5 (s, 2F).

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 283,0717 Experimental: 283,0714

**Comentarios:** Purificación mediante lavado con *n*-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y posterior cromatografía *flash* [*n*-hexano-AcOEt (2:1)] en sílica gel.

**Producto: 6-(Difluorofenilmetil)-3-(4-trifluorometoxifenil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (17f)**



**Estado físico:** Sólido blanco

**Rendimiento (%):** 81

**Fórmula empírica:** C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>F<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Masa molecular** 398

**Punto de fusión (°C):** 140-142

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 6,01 (s, 1H), 7,27-7,54 (m, 9H)

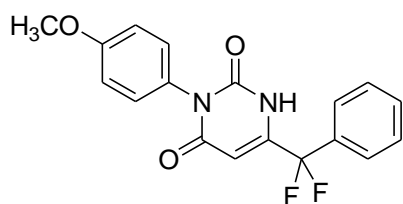
**<sup>13</sup>C-RMN (MeOD, 75,5 MHz) δ (ppm):** 99,4 (t, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub>=4,9), 116,5-122,2 (señales C-OCF<sub>3</sub>), 121,4 (d), 125,4 (t, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub>=6,0), 128,7 (d), 130,3 (d), 131,2 (t, <sup>5</sup>J<sub>CF</sub>=1,6), 133,0 (t, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=26,4), 133,5 (s) 146,0 (t, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub>=254,2), 148,6 (t, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=32,9), 148,9 (q, <sup>5</sup>J<sub>CF</sub>=2,2), 151,4 (s), 163,4 (s)

**<sup>19</sup>F-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 282,4 MHz) δ (ppm):** -100,4 (s, 2F), -58,3 (s, 3F)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 398,0690, encontrada: 398,0664.

**Comentarios:** Purificación por cromatografía columna *flash* [*n*-hexano-AcOEt (4:1)] en sílica gel. Posterior lavado en Diisopropil-eter.

**Producto: 6-(Difluorofenilmetil)-3-(4-metoxifenil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (17g)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):** 95  
**Fórmula empírica:** C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
**Masa molecular** 344  
**Punto de fusión (°C):** 175-177

**<sup>1</sup>H-RMN (MeOD, 300 MHz) δ (ppm):** 3,85 (s, 3H), 6,00 (s, 1H), 7,01 (d, *J*=9,0, 2H), 7,11 (d, *J*=9,0, 2H) 7,48-7,50 (m, 3H), 7,67-7,70 (m, 2H).

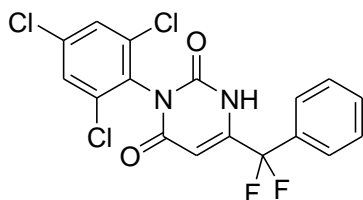
**<sup>13</sup>C-RMN (MeOD, 75,5 MHz) δ (ppm):** 56,3 (c), 96,1 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=4,9), 115,8 (d), 119,6 (t, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub>=244,0), 127,2 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=6,0), 129,8 (d), 130,9 (d), 131,5 (d), 131,6 (d), 137,9 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=27,3), 161,0 (s), 161,7 (s), 163,6 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=29,9), 169,7 (s)

**<sup>19</sup>F-RMN (MeOD, 282,4 MHz) δ(ppm):** -101,6 (s, 2F)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 344,0972, encontrada: 344,0987.

**Comentarios:** Purificación mediante lavado con *n*-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Producto: 3-(2,4,6-triclorofenil)-6-(difluorofenilmetil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (17h)**



**Estado físico:** Sólido blanco  
**Rendimiento (%):** 75  
**Fórmula empírica:** C<sub>17</sub>H<sub>9</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>  
**Masa molecular** 418  
**Punto de fusión (°C):** 170-172

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 5,96 (s, 1H), 7,45 (t, *J*=2,5, 3H), 7,57 (s, 2H), 7,62 (d, *J*=3,6, 2H)

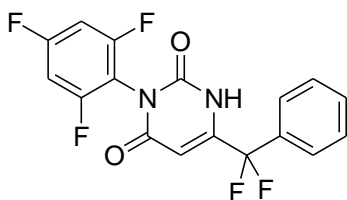
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 99,7 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=4,9), 110,2 (t, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub>=245,9), 127,5 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=6,0), 130,3 (d), 130,8 (d), 132,5 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=27,3), 133,1 (d), 136,8 (s), 137,1 (s), 149,8 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=29,9), 153,7 (s), 176,4 (s)

**<sup>19</sup>F-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 282,4 MHz) δ (ppm):** -101,1 (s, 2F)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 414,9619, encontrada: 414,9620

**Comentarios:** Purificación por cromatografía columna *flash* [*n*-hexano-AcOEt (4:1)] en sílica gel. Posterior lavado en Diisopropil-eter.

**Producto: 6-(difluorofenilmetil)-3-(2,4,6-trifluorofenil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-dione (17i)**



**Estado físico:** Sólido amarillo claro

**Rendimiento (%):** 87

**Fórmula empírica:** C<sub>17</sub>H<sub>9</sub>F<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Masa molecular** 368

**Punto de fusión (°C):** 100-102 °C

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):** 6,02 (s, 1H), 6,86 (t, *J*<sub>HF</sub>=7,5, 2H), 7,42-7,56 (m, 5H)

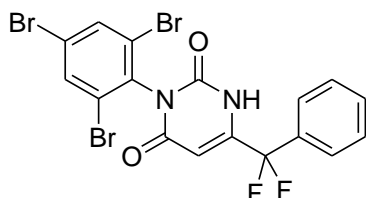
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):** 100,2 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=5,0), 100,9 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=24,0, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub>=3,8), 101,3 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=24,0, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub>=3,8), 107,7 (td, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=17,0, <sup>4</sup>*J*<sub>CF</sub>=5,5), 116,0 (t, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub>=247,0), 125,5 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=5,5), 129,0 (d), 131,6 (d), 132,0 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=26,9), 148,0 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=33,5), 150,5 (s), 159,0 (ddd, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub>=253,7, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=15,4, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=6,5), 160,8 (s), 163,0 (dt, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub>=253,0, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=15,0)

**<sup>19</sup>F-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 282,4 MHz) δ (ppm):** -114,4 (t, *J*<sub>HF</sub>=7,2, 2F), -104,8 (m, 1F), -100,5 (s, 2F)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 368,0584, encontrada: 368,0661.

**Comentarios:** Purificación por cromatografía columna *flash* [*n*-hexano-AcOEt (4:1)] en sílica gel. Posterior lavado en Diisopropil-eter.

**Producto: 3-(2,4,6-tribromofenil)-6-(difluorofenilmetil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (17j)**



**Estado físico:** Sólido blanco

**Rendimiento (%):** 42

**Fórmula empírica:** C<sub>17</sub>H<sub>9</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>3</sub>

**Masa molecular** 551

**Punto de fusión (°C):** 225-227 °C

**<sup>1</sup>H-RMN (MeOD, 300 MHz) δ (ppm):** 6,04 (s, 1H), 7,58-7,61 (m, 3H), 7,70-7,73 (m, 2H), 8,00 (s, 2H)

**<sup>13</sup>C-RMN (MeOD, 75,5 MHz) δ (ppm):** 98,3 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=4,9), 117,5 (t, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub>=247,0), 123,2 (s), 125,4 (s), 126,1 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=5,7), 129,3 (d), 131,6 (d), 134,2 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=27,3), 135,1 (d), 135,1 (s), 151,3 (s), 152,3 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=29,9), 161,5 (s)

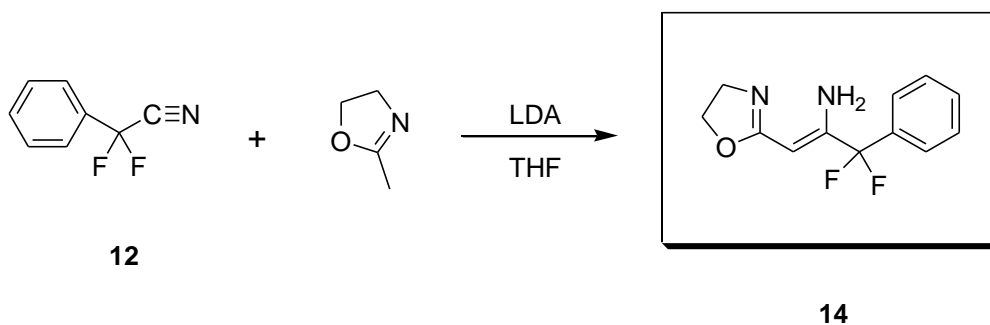
**<sup>19</sup>F-RMN (MeOD, 282,4 MHz) δ(ppm):** -101,5 (s, 2F)

**EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 546,8104, encontrada: 546,8113

**Comentarios:** Purificación por cromatografía columna *flash* [*n*-hexano-AcOEt (4:1)] en sílica gel. Posterior lavado en Diisopropil-eter.

## 2.4.2. Obtención de derivados de uracilo fluorados a través de la vía de las $\beta$ -enaminoxazolinas

### 2.4.2.1. Síntesis de la $\beta$ -enaminoxazolina fluorada **14**



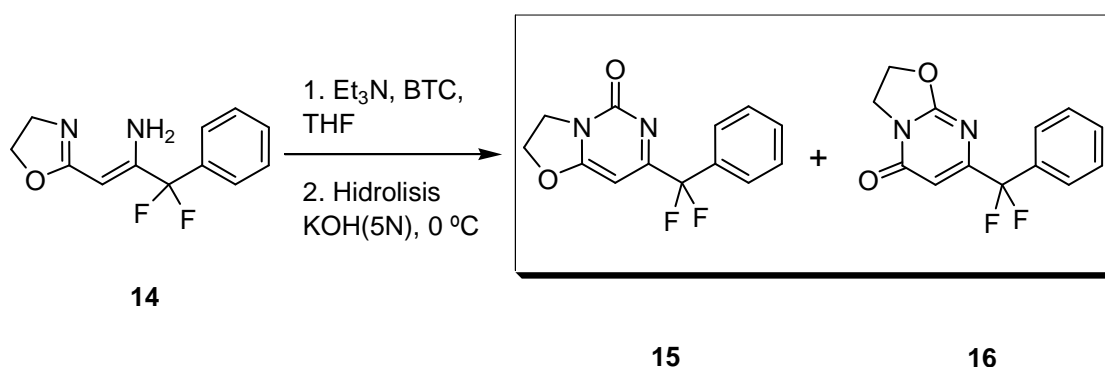
#### *Procedimiento General*

Para 0.2 g de reactivo de partida. Se prepara primero una disolución de LDA en THF seco a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Para ello, sobre una disolución de diisopropilamina en THF (2.0 mmol, 2 ml THF) en atmósfera inerte se gotea lentamente 2 mmol de n-BuLi (2.5 M en hexano, Aldrich). Tras 30' en agitación a  $-30^{\circ}\text{C}$  -para la completa formación del LDA- se disminuye la temperatura a  $-50^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se adiciona lentamente una disolución de metiloxazolina **2** en THF seco (1.6 mmol, 1.5 ml). Al cabo de 45 minutos en agitación a esta temperatura se ha completado la formación del azaenolato que se manifiesta en la tonalidad amarillo-naranja que toma la disolución. Bajamos la temperatura del baño hasta  $-78^{\circ}\text{C}$  y adicionamos lentamente una disolución del nitrilo fluorado **12** en THF seco (1.3 mmol, 1.5 ml). Finalizada la reacción (CCF, 3 horas), se hidroliza el crudo con una disolución acuosa saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y extraemos el producto con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Finalmente, se elimina el disolvente por destilación a presión reducida, lo que proporciona un aceite **14** que se purifica mediante cromatografía *flash* en sílica gel Hex-AcOEt (3:1).

Para 8 g de reactivo de partida. Las proporciones de los reactivos se mantienen: 1 equivalente de nitrilo fluorado, 1.2 equivalentes de metiloxazolina, 1.5

equivalentes de base, variando la proporción de disolvente y aumentando el tiempo de reacción (5 horas). Así, sobre una disolución de diisopropilamina en THF (78.4 mmol, 55 ml THF) en atmósfera inerte se gotea lentamente 78.4 mmol de *n*-BuLi (2.5 M en hexano, Aldrich). Tras 30' en agitación a -30°C -para la completa formación del LDA- se disminuye la temperatura a -50°C. A continuación, se adiciona lentamente una disolución de metiloxazolina **2** en THF seco (62.7 mmol, 55 ml). Al cabo de 45 minutos en agitación a esta temperatura se ha completado la formación del azaenolato que se manifiesta en la tonalidad amarillo-naranja que toma la disolución. Bajamos la temperatura del baño hasta -78°C y adicionamos lentamente una disolución del nitrilo fluorado **12** en THF seco (52.2 mmol, 25 ml). Finalizada la reacción (CCF, 5 horas), se hidroliza el crudo con una disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl y extraemos el producto con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl y se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Finalmente, se elimina el disolvente por destilación a presión reducida, lo que proporciona el aceite **14** que se purifica mediante cromatografía *flash* en sílica gel Hex-AcOEt (3:1).

#### 2.4.2.2 Síntesis de los isómeros de oxazolopirimidinona **15** y **16** fluoradas



##### *Procedimiento General*

Para 0.2 g de reactivo de partida. Sobre una disolución de trifosgeno en THF seco (0,8 mmol, 3 ml THF, 25°C, atmósfera N<sub>2</sub>) se adiciona lentamente una

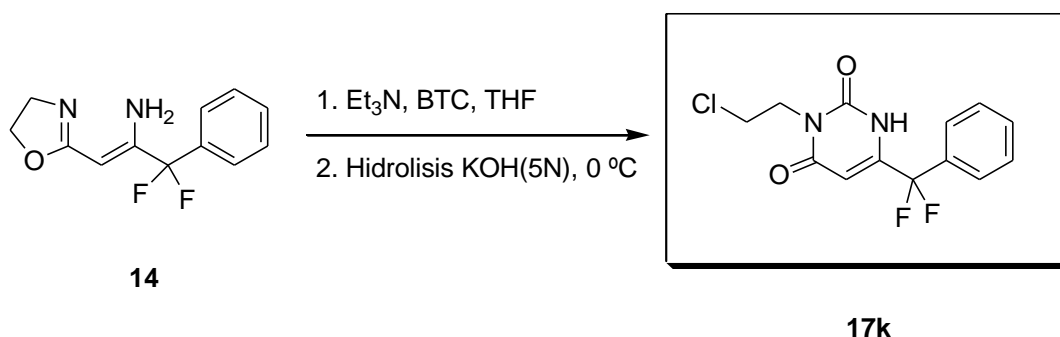
disolución de  $\beta$ -enaminoxazolina **14** en THF seco (0,8 mmol, 3 ml THF). A continuación se adiciona una nueva disolución de  $\text{Et}_3\text{N}$  en THF seco (1,6 mmol  $\text{Et}_3\text{N}$ , 3 ml THF). Al cabo de 24 h, se hidroliza con  $\text{KOH}$  5N en frío y se extrae con  $\text{AcOEt}$  (3 x 5 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaCl}$ , se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se filtran. Por último, se elimina el disolvente por destilación a presión reducida y se obtiene un sólido, mezcla en proporciones variables de **15** y **16**, que se purifica mediante lavado con Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4:1).

*Para 1 g de reactivo de partida.* Se mantiene el procedimiento de la reacción en todos sus aspectos, tanto en proporciones de reactivos y disolventes como en el protocolo y trabajo de la misma, manteniendo los excelentes rendimientos (99%).

#### 2.4.2.3 Obtención del derivado de uracilo cloroetilado fluorado **17k** a través de la vía de las $\beta$ -enaminoxazolinas.

El derivado **17k** podemos obtenerlo directamente desde la  $\beta$ -enaminoxazolina correspondiente o bien desde la mezcla de oxazolopirimidinonas **15** y **16**. A continuación detallamos el procedimiento para ambos casos.

a. Obtención del derivado de uracilo cloroetilado fluorado **17k** directamente desde la  $\beta$ -enaminoxazolina correspondiente.



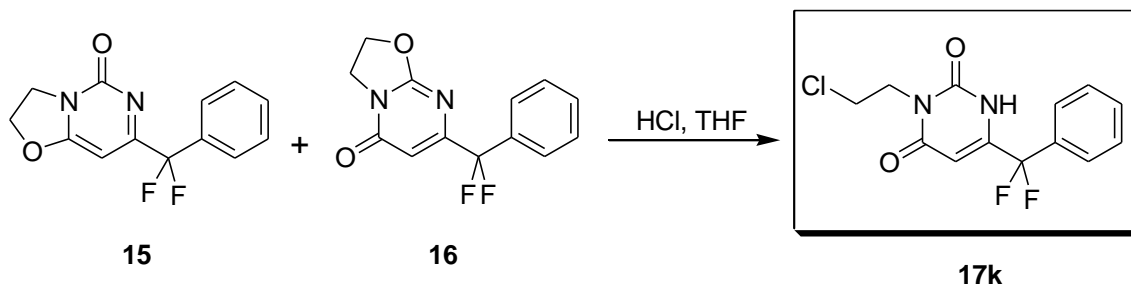
### *Procedimiento General*

*Para 0.2 g de reactivo de partida.* Sobre una disolución de trifosgeno en THF seco (0,8 mmol, 3 ml THF, 25°C, atmósfera N<sub>2</sub>) se adiciona lentamente una disolución de β-enaminooxazolina **14** en THF seco (0,8 mmol, 3 ml THF). A continuación se adiciona una nueva disolución de Et<sub>3</sub>N en THF seco (1,6 mmol Et<sub>3</sub>N, 3 ml THF). Al cabo de 24 h, se hidroliza con HCl 1M y se extrae con AcOEt (3 x 5 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtran. Por último, se elimina el disolvente por destilación a presión reducida y se obtiene un sólido correspondiente al producto **17k**. La purificación se realizó por cromatografía en columna *flash* [*n*-hexano-AcOEt (4:1)] en sílica gel y posterior lavado con Diisopropil-eter.

*Para 5 g de reactivo de partida.* Se mantienen las proporciones de reactivos, disminuye algo las proporciones de disolventes. Sobre una disolución de trifosgeno en THF seco (20,0 mmol, 60 ml THF, 25°C, atmósfera N<sub>2</sub>) se adiciona lentamente una disolución de β-enaminooxazolina **14** en THF seco (20,0 mmol, 60 ml THF). A continuación se adiciona una nueva disolución de Et<sub>3</sub>N en THF seco (40,0 mmol Et<sub>3</sub>N, 60 ml THF). Al cabo de 24 h, se hidroliza con HCl 1M y se extrae con AcOEt (3 x 40 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtran. Por último, se elimina el disolvente por destilación a presión reducida y se obtiene un sólido correspondiente al producto **17k**. La purificación se realizó por cromatografía en columna *flash* [*n*-hexano-AcOEt (4:1)] en sílica gel y posterior lavado con Diisopropil-eter.

b. Obtención del derivado de uracilo cloroetilado fluorado **17k** desde la mezcla de oxazolopirimidinonas **15** y **16**.





### Procedimiento General

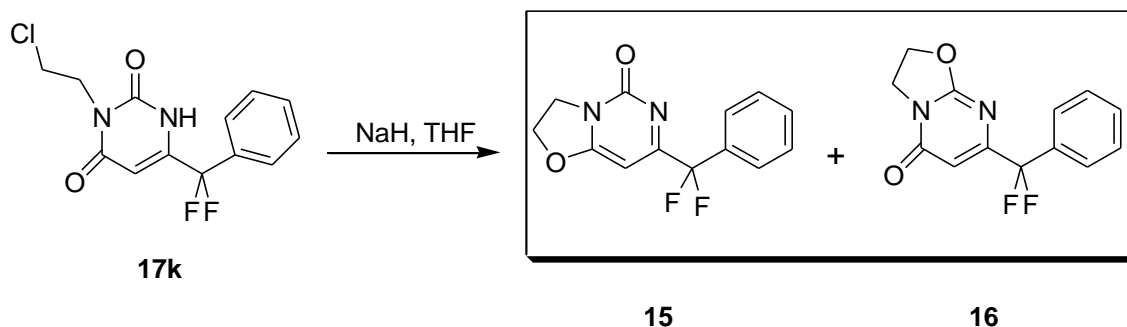
Para 0.2 g de reactivo de partida. Sobre una disolución de oxazolopirimidonas isoméricas **15** y **16** en THF seco (0,8 mmol, 5 ml), se adicionan 1,0 mmol de HCl concentrado. A continuación, se hidroliza con NH<sub>4</sub>Cl acuoso y se extrae con AcOEt (3 x 3 ml). Después de secar la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se evaporan los disolventes a presión reducida, obteniéndose así un residuo bastante limpio del producto final. Se lava el sólido con Hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1).

La reacción implica un paso más en la estrategia sintética, por lo que no se procedió a estudiar el escalado de la misma.

### Producto: 3-(2-cloroetil)-6-(difluorofenilmetil)-pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (**17k**)

	<b>Estado físico:</b>	Sólido blanco
	<b>Rendimiento (%):</b>	99
	<b>Fórmula empírica:</b>	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	<b>Masa molecular</b>	300
	<b>Punto de fusión (°C):</b>	154-156
<b><sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):</b>	3,64 (t, J=6,9, 2H), 4,14 (t, J=6,9, 2H), 5,76 (s, 1H), 7,46-7,57 (m, 5H)	
<b><sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):</b>	39,1 (t), 41,2 (t), 98,8 (t, <sup>4</sup> J <sub>CF</sub> =5,5), 116,5 (s), 125,3 (t, J <sub>CF</sub> =6,0), 128,7 (d), 131,2 (t, J <sub>CF</sub> =6,5), 132,9 (t, <sup>2</sup> J <sub>CF</sub> =25,3), 147,9 (t, <sup>1</sup> J <sub>CF</sub> =259), 163,2 (t, <sup>2</sup> J <sub>CF</sub> no se aprecia)	
<b><sup>19</sup>F-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 282,4 MHz) δ (ppm):</b>	-99,5 (s, 2F)	
<b>EMAR (EI<sup>+</sup>):</b>	Calculada para (M <sup>+</sup> ): 300,0477, encontrada: 300,0449.	
<b>Comentarios:</b>	Purificación como se indica en cada uno de las dos procedimientos.	

### 2.4.3 Obtención de los derivados fluorados de oxazolopirimidinona 15 y 16 partiendo del derivado de uracilo fluorado cloro-etilados 17k.



#### *Procedimiento general*

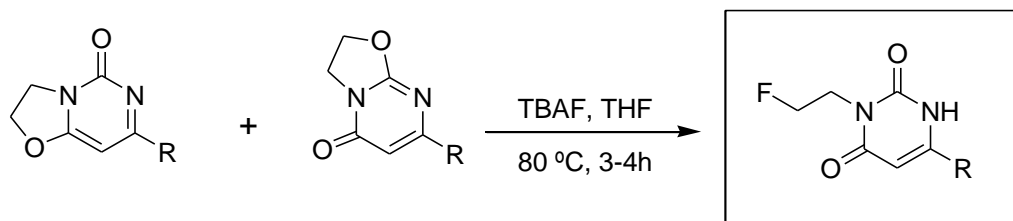
Previamente lavamos el NaH comercial con hexano anhidro 5 o 6 veces en atmósfera inerte para limpiarlo de la materia grasa de la que viene impregnado.

Para 0.2 g de reactivo de partida. Preparamos una disolución del derivado de uracilo N3-cloroetilado **17k** en THF anhidro (0,7 mmol, 3 ml). Adicionamos con cuidado NaH en exceso (2,1 mmol) y dejamos en agitación a r.t. durante 10 horas. Seguimos la reacción por CCF. Al cabo de 10 horas hidrolizamos con H<sub>2</sub>O destilada y extraemos con AcOEt. La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y a continuación concentramos disolvente hasta sequedad a presión reducida. El espectro de <sup>1</sup>H RMN muestra la mezcla de los dos isómeros limpia, que se purifica mediante lavado con Hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1).

La reacción implica un paso más en la estrategia sintética, por lo que no se procedió a estudiar el escalado de la misma.

## 2.4.4 Síntesis parcial de derivados de uracilo fluorados a partir de otros uracilos.

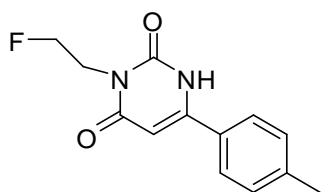
### 2.4.4.1 Síntesis de derivados N3 fluoroetilados 18 a partir de oxazolo-pirimidinonas isómeras.



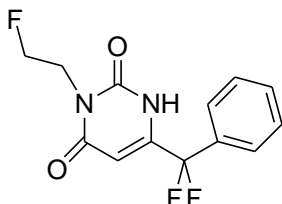
18

#### *Procedimiento General*

Sobre una disolución de oxazolopirimidonas isoméricas en THF seco (0,8 mmol, 5 ml), se adicionan 2,0 mmol de TBAF (1M en THF, Aldrich). Se deja a reflujo 3-4 horas, siguiendo la reacción por CCF. A continuación, se hidroliza con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  acuoso y se extrae con AcOEt (3 x 4 ml). Después de secar la fase orgánica con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se evaporan los disolventes a presión reducida, obteniéndose así un residuo que se purifica como se indica en cada caso.

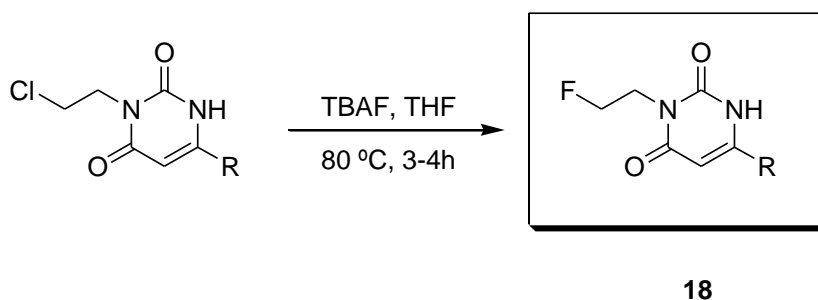
**Producto: 3-(2-fluoroetil)-6-*p*-tolilpirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (18a)****<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):****<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz):****<sup>19</sup>F-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 282,4 MHz):****EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 248,0961 Experimental: 248,0958**Comentarios:** Purificación: lavado Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1), lavado éter dietílico.**Estado físico:** Sólido blanco**Rendimiento (%):** <sup>140</sup> v1: 70, v2: 67**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>F**Masa molecular (g/mol):** 248**Punto de fusión:** 160-1632,43 (s, 3H), 4,33 (dt, *J*<sub>1</sub>=23,3, *J*<sub>2</sub>=5,2, 2H), 4,69 (dt, *J*<sub>1</sub>=47,1, *J*<sub>2</sub>=5,2, 2H), 6,01 (s, 1H), 7,30 (d, 2H), 7,54 (d, 2H)163,9 (s), 153,4 (s), 151,2 (s), 142,8 (s), 130,5 (d), 128,8 (s), 126,5 (d), 98,3 (d), 81,1 (t, *J*<sub>C-F</sub>=170,2), 40,8 (t, *J*<sub>C-F</sub>=22,4), 21,9 (q)

-225,5 (m)

**Producto: 6-(difluorofenilmetil)-3-(2-fluoroetil)-pirimidine-2,4(1*H*,3*H*)-diona (18b)****<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm):****<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz) δ (ppm):****<sup>19</sup>F-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 282,4 MHz) δ (ppm):****EMAR (EI<sup>+</sup>):** Calculada para (M<sup>+</sup>): 283,0694 encontrada: 283,0697**Comentarios:** Purificación por cromatografía *flash* en sílica gel Hexano/AcOEt (3:1).**Estado físico:** Sólido blanco**Rendimiento (%):** <sup>140</sup> v1: 69, v2: 65**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**Masa molecular** 284**Punto de fusión (°C):** 141-1443,98 (dt, *J*<sub>1</sub>=23,7 Hz, *J*<sub>2</sub>=5,1 Hz, 2H), 4,36 (dt, *J*<sub>1</sub>=47,1 Hz, *J*<sub>2</sub>=4,9 Hz, 2H), 5,53 (s, 1H), 7,14-7,33 (m, 5H).40,7 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=22,0 Hz), 80,2 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub>= 170,3 Hz), 100,0 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=4,9 Hz), 116,5 (t, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub>=246,0 Hz), 125,6 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=6,0 Hz), 129,0 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>CF</sub>=6,6 Hz), 131,6, 132,7 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=26,4), 135,2, 147,9 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=26,9), 151,7, 163,4

<sup>140</sup> Dado que nos hemos servido de dos estrategias distintas para la obtención de estos productos, v1 indica el rendimiento cuando partimos de la mezcla de oxazolopirimidinonas isómeras y v2, el rendimiento cuando partimos del correspondiente derivado N3 cloroetilado de uracilo.

#### 2.4.4.2 Síntesis de derivados N3 fluoroetilados 18 a partir de derivados de uracilo N3 cloroetilados



##### *Procedimiento General*

Sobre una disolución del correspondiente derivado de uracilo N3 cloroetilado en THF seco (0,8 mmol, 5 ml), se adicionan 2,0 mmol de TBAF (1M en THF, Aldrich). Se deja a reflujo 3-4 horas, siguiendo la reacción por CCF. A continuación, se hidroliza con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  acuoso y se extrae con AcOEt (3 x 4 ml). Después de secar la fase orgánica con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se evaporan los disolventes a presión reducida, obteniéndose así un residuo que se purifica como se indica en cada caso.

## 2.5. Conclusiones

Siguiendo líneas de investigación previas en nuestro laboratorio,<sup>21,22,23,49</sup> se han estudiado y ampliado metodologías que permiten la síntesis de derivados de uracilo y de pirimidinona fluorados, procediéndose al escalado de alguna de estas vías sintéticas y diseñando nuevas estrategias para la obtención de estos derivados. Las conclusiones de este capítulo son:

1. Se ha obtenido una colección de derivados de uracilo fluorados a través de la **vía de los  $\beta$ -enaminoésteres**. Cuatro de estos compuestos **17f**, **17h**, **17i**, **17j** han sido obtenidos, aislados e identificados por primera vez.

2. Se ha procedido al estudio del **escalado** de la vía de síntesis de derivados de uracilo fluorados de los  $\beta$ -enaminoésteres, optimizando los procedimientos sintéticos de escala miligramo a escala de gramo y multigramo.

3. Los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis se han aplicado ahora a la obtención de derivados de uracilo y oxazolopirimidinona fluorados, a través de la vía de las  **$\beta$ -enaminoxazolinás**.

4. Se ha procedido, también, al estudio del **escalado** de esta vía ( **$\beta$ -enaminoxazolinás**) de síntesis de derivados de uracilo y oxazolopirimidinona fluorados optimizando los procedimientos sintéticos de escala miligramo a escala de gramo y multigramo.

5. Se ha diseñado **una nueva estrategia** sintética que, en continuidad con la vía de las  **$\beta$ -enaminoxazolinás**, permite la obtención de nuevos derivados de uracilo N3 fluoroetilados a partir bien de los correspondientes derivados de uracilo N3 cloroetilados, o bien de la correspondiente mezcla isomérica de oxazolopirimidinonas. De este modo se han obtenido e identificado por vez primera los derivados **18a** y **18b**.

6. Por último y a consecuencia de todo esto, se han obtenido **una veintena de productos finales fluorados** que serán objeto de estudio de actividad biológica en el Capítulo 3.

### **Capítulo 3**

***Actividad acaricida, toxicidad y estudio por topología molecular de derivados de uracilo y pirimidinona.***





### 3.1 Introducción

El trabajo de investigación desarrollado a lo largo de los dos primeros capítulos de esta tesis permitió obtener un elenco de productos orgánicos derivados de uracilo y pirimidinona funcionalizados en C6 con restos fluorados o no. Como se ha apuntado de modo reiterado, en el mercado se hallan comercializados derivados semejantes a los obtenidos con fines herbicidas<sup>19-21</sup>, así como diversos derivados C5 fluorados<sup>35</sup> con actividad antitumoral.

Anualmente, miles de hectáreas de diversos cultivos a lo largo de todo el mundo se ven sometidas a los daños ocasionados por plagas de diferente naturaleza (insectos, ácaros, malas hierbas, etc.) provocando graves pérdidas económicas, afectando también, de modo indirecto, al medioambiente y a la salud de algunas poblaciones (desnutrición, enfermedades, etc.)

En el presente trabajo se ha optado por realizar el estudio y valoración de la actividad acaricida de los productos obtenidos sobre la especie *Tetranychus urticae*, un ácaro fitófago, ampliamente distribuido a nivel global. Esta especie es polífaga, es decir, se alimenta de un elevado número de especies vegetales distintas, por lo que ocasiona daños en múltiples cultivos diferentes, con una repercusión económica notable.

El ácaro *Tetranychus urticae*, como veremos, afecta también de modo especial y a distintos niveles a la agricultura española (hortalizas, vid y cítricos), siendo también relevante la acción de este ácaro en la Comunitat Valenciana debido, fundamentalmente, a la abundante cosecha anual de cítricos que se genera en esta comunidad.

Realizados los estudios de actividad biológica, se procederá al estudio de la toxicidad de los productos testados, ya que, en la práctica, tan importante es encontrar nuevas sustancias activas, como que -una vez halladas- manifiesten un

rango de toxicidad que permita su utilización más allá del ámbito del laboratorio (campo, cultivos, invernaderos...).

Por último relacionaremos las estructuras químicas sintetizadas con el nivel de actividad biológica que presentan, sirviéndonos para ello de los métodos QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) que nos presta la Topología Molecular.

## 3.2 Antecedentes bibliográficos

Desarrollamos en este punto el estado actual de los diversos aspectos que nos ocupan sirviéndonos de antecedentes bibliográficos:

3.2.1. Acarología,

3.2.2. Impacto económico,

3.2.3. Toxicología y

3.2.3. Topología molecular.

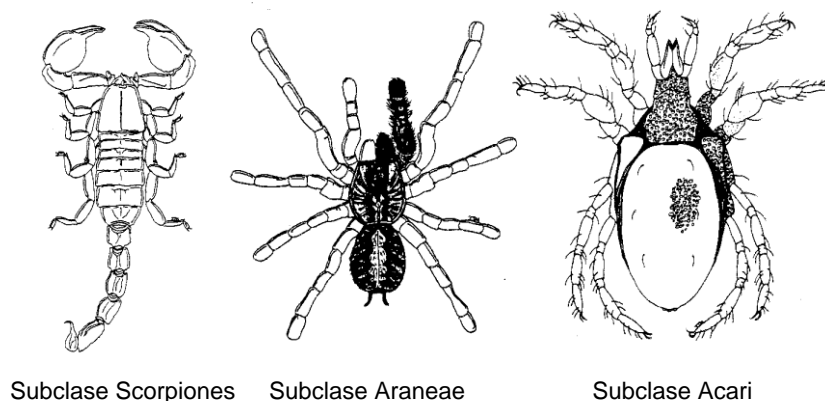
### 3.2.1. Acarología

Los Ácaros, son el grupo más amplio y diverso de la clase *Arachnida*, constituida por once subclases distintas que incluyen entre otras las subclases de los Escorpiones y las Arañas (Figura 3.1). Los ácaros se hallan distribuidos por todo el mundo ocupando tanto hábitats terrestres como acuáticos y desarrollando, en ocasiones, relaciones estrechas y diversas con otros animales: comensalismo, parasitismo, etc. Son organismos bastante poco estudiados, por lo que no sólo se describen continuamente nuevos géneros y especies, sino incluso familias. Actualmente se conocen en torno a las 60.000 especies si bien, su número real se estima entre 500.000 y el millón de especies.<sup>141</sup>

---

<sup>141</sup> a) De Liñán, C. *Entomología Agroforestal, Insectos y Ácaros que dañan montes, cultivos y jardines*. 1998, 1177-1200. Ed. Agrotécnicas, S.L., Madrid.. b) Iraola, V. *Bol. S.E.A.*, **1998**, 23, 13-19.

Clase Arachnida



**Figura 3.1**

El término Acaro, fue utilizado por primera vez por Aristóteles<sup>142</sup> y quiere decir sin cabeza. Cuando Linneo en 1758 editó su obra *Sistema Naturae*<sup>143</sup> consideró que las 19 especies que conocía, eran Insectos, y los incluyó en el género *Acarus*. La moderna Acarología tardaría aún casi un siglo más en iniciarse (1850) y otro siglo más en cobrar importancia. Un Acarólogo que jugó un papel fundamental en el estudio de estos organismos, y que es considerado el padre de la moderna Acarología, es el francés Grandjean, que desarrolló su labor en el periodo comprendido entre los años 1920 y 1970.

La importancia de los Ácaros es grande. Desde el punto de vista agrícola son plagas de muchos cultivos tanto al aire libre como en almacén y son transmisores de virosis y otros patógenos. No obstante también nos reportan importantes beneficios al ser depredadores de otros Artrópodos plaga, lo que permite en algunos casos su utilización en la lucha biológica.<sup>141</sup> En el suelo, los ácaros macrofitófagos, que se alimentan de material vegetal muerta, son los descomponedores primarios. Debido a su elevado número y a su voracidad (pueden consumir hasta el 20% de su peso al día) su papel es fundamental en el

<sup>142</sup> Aristóteles, *Investigación sobre los animales*, introducción de Carlos Garcia Gual, traducción y notas de Julio Pallí Bonet, Ed. Gredos, Madrid, 1992.

<sup>143</sup> Caroli Linnæi, *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio decima reformata 1758, Holmiæ, Impensis direct. Laurentii Salvii (Salvius publ.).

reciclaje de las sustancias del suelo, ya que facilitan la actuación de las bacterias y hongos, tanto al triturar la materia como al modificarla químicamente, por lo que indirectamente son reguladores del proceso trófico del suelo.<sup>144</sup> Por otro lado, algunos Ácaros son importantes parásitos del hombre y animales vertebrados, a los que además pueden transmitir gran número de patógenos, jugando un gran papel en las alergias del hombre.

Es frecuente citar una serie de características como definitorias de lo que es un ácaro; sin embargo, muchas de estas características aparecen en otros grupos de arácnidos, especialmente en los Ricinuleidos, por lo que se ha llegado a definir a los ácaros por lo que no son, en vez de lo que son. Ofrecemos, no obstante, aquellos caracteres<sup>141</sup> que más o menos pueden darnos una idea muy aproximada de su morfología y biología:

a. Animales de pequeño tamaño, entre 0,1 y 10 mm (excepto garrapatas llenas de sangre: 2-3 cm).

b. Respiración traqueal o cutánea.

c. Reproducción mediante espermatóforos que se depositan en el sustrato o son transferidos directamente del macho a la hembra.

d. Patrón básico de desarrollo postembrionario que incluye una prelarva quiescente hexápoda, una larva activa, también hexápoda y tres ninfales octópodos (protoninfa, deutoninfa, tritoninfa) antes de llegar al adulto. Sin embargo existen muchas variaciones posibles dentro de este esquema.

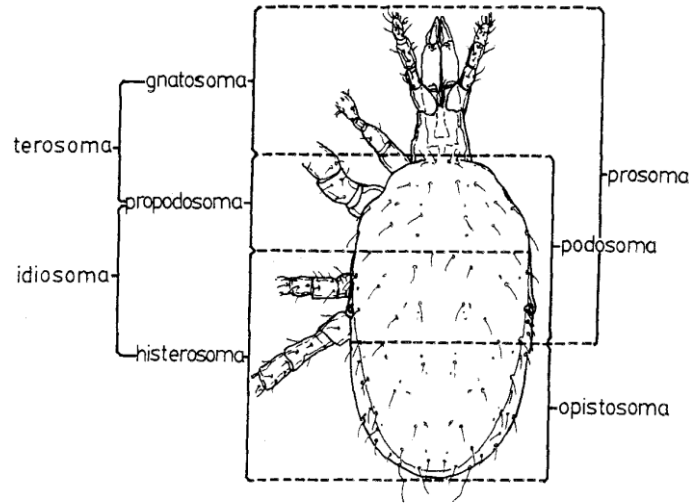
e. La mayoría de los ácaros ovipositan. Los huevos son muy grandes en relación al tamaño corporal del ácaro y los pueden dejar aislados o en grupos.

f. El cuerpo se halla dividido en dos regiones: el prosoma y el opistosoma. Esta división no es clara y únicamente en algunos grupos se aprecia un surco que

---

<sup>144</sup> Iraola, V. *Aracnet 7 -Bol. S.E.A.*, **2001**, 28, 141-146.

divide ambas partes. Esta división externa se corresponde con una interna formada por 19 segmentos: 7 para el prosoma y 12 para el opistosoma (ver Figura 3.2).



**Figura 3.2**

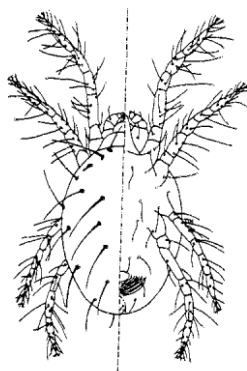
En el prosoma todos los segmentos menos el primero tienen un par de apéndices. Los apéndices del segundo segmento forman los quelíceros (piezas bucales del ácaro). Los del tercer segmento los palpos (con función sensorial). Estos tres primeros segmentos están colocados en la parte anterior del cuerpo, formando el equivalente de la cabeza de los insectos, recibiendo el nombre de gnatosoma.

El resto del cuerpo (los cuatro segmentos restantes del prosoma y todos los del opistosoma) se denomina idiosoma y constituye el “cuerpo” de los ácaros. Puede tener formas muy diversas (redondos, subcirculares, cuadrados, etc.) si bien, generalmente es ovalado. En el idiosoma se hallan la mayoría de los órganos y las 8 patas (excepto, los Eriófididos que poseen 4 patas y las larvas, con 6). En la parte dorsal del idiosoma se pueden encontrar diversas partes endurecidas en forma de placas o escudos que pueden estar muy ornamentados. El proceso de endurecimiento del tegumento varía desde los oribátidos (que se asemejan a

pequeños escarabajos) hasta los ácaros del polvo, que carecen de tegumento endurecido.

### 3.2.1.a Ácaros fitófagos

La alimentación de los ácaros es muy variada. Pueden ser fitófagos (Figura 3.3) y constituir plagas de la parte aérea o subterránea de los cultivos, o atacar los productos almacenados e incluso transformados (p.ej. harinas). Pueden ser polinívoros, sapróvoros, copróvoros o necróvoros. También pueden ser depredadores de otros Artrópodos o parasitoides. Finalmente pueden ser hematófagos y ser parásitos del hombre y animales vertebrados.<sup>141, 144</sup>



**Figura 3.3**

Los ácaros fitófagos (ver Figura anterior) tienen una serie de características típicas, entre las que se encuentran:

a. Quelíceros transformados en estiletes finos para picar y chupar los jugos de las plantas. Como sus estiletes son cortos y no llegan a los vasos conductores, son chupadores de superficie y lo único que pueden hacer es extraer el jugo de las células subepidérmicas del vegetal. Al inyectar saliva a las plantas para alimentarse, pueden originar la aparición de agallas, y a veces, transmiten microorganismos patógenos.

b. Tegumentos blandos, poco esclerotizados.



c. Desplazamientos lentos sobre las plantas, en comparación con los ácaros depredadores.

d. Ciclos de vida que están muy adaptados a la planta, para lo cual tienen diapausa y quiescencia.

e. Muchas especies son monófagas, pero hay algunas polífagas, con gran interés económico.

f. Para desarrollarse, prefieren temperaturas altas y humedades relativas bajas, en general, por lo que son plagas de los meses cálidos.

g. Algunas especies pueden segregar sedas, que desempeñan varios papeles vitales.

Hay dos grandes grupos, los aéreos y los terrestres. La familia Tetranychidae pertenece a los ácaros fitófagos aéreos.

### 3.2.1.b Familia Tetranychidae<sup>141a, 145</sup>

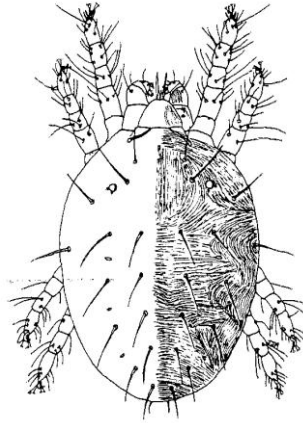
Los tetraníquidos son el grupo de ácaros fitófagos más importante en la agricultura, ya que muchas especies son plagas en los principales cultivos. Estos ácaros se alimentan de las células de la epidermis y el parénquima de los tejidos verdes y se caracterizan por su tendencia a agruparse en colonias cubiertas de seda y especialmente por la extremada polifagia de algunas de sus especies, que se desarrollan de forma óptima sobre elevado número de especies vegetales.

La familia Tetranychidae es quizás el grupo de Ácaros más corriente sobre los cultivos y su importancia ha aumentado fundamentalmente debido al uso de plaguicidas de amplio espectro que afectaron a sus enemigos naturales en mucha mayor medida que a ellos, aunque otros factores tales como el monocultivo, la eliminación de malas hierbas y la introducción de cultivos en zonas nuevas, también han influido.

---

<sup>145</sup> Soler-Salcedo, E.; Rodrigo, E.; Ferragut, F. *Bol. San. Veg. Plagas*, **2006**, 32, 523-534.

Familia Tetranychidae (Actinedida)



**Figura 3.4**

Esta familia de ácaros posee una talla en torno a los 0,5 mm con colores rojos, amarillos y verdes. Presenta dimorfismo sexual acusado, siendo las hembras más redondeadas y de mayor talla.

Los quelíceros adoptan la forma de dos estiletes finos y un estilóforo bulboso, que es una estructura prácticamente exclusiva, lo que permite reconocerlos, y que se puede mover una cierta distancia longitudinalmente por el idiosoma. En su base se aprecian 2 estigmas con su peritrema o canal.

Los pedipalpos de poseen 4-5 segmentos acabados en un complejo uña-tarso característico, útil en taxonomía. Llevan 3 sedas, 3 eupatidios birrefringentes y 1 solenidio. Muchas especies segregan sedas y entonces un eupatidio es grueso y tiene un orificio que conecta con una glándula de seda, que ocupa la mayoría del palpo. Las sedas realizan diversas funciones: protección de los huevos; captura de presas; locomoción y dispersión; protección frente al medio ambiente y sus enemigos; defensa frente a los acaricidas, y regulación de las relaciones interespecíficas, ya que las especies que las producen pueden desplazar a las otras.

La reproducción es sexual y partenogenética, fundamentalmente arrenotóquica.

Sus ciclos de desarrollo son muy rápidos, por lo que tienen muchas generaciones al año, y los sincronizan con los de las plantas hospedantes, por medio de la diapausa y la quiescencia. Según las especies, estas paradas de desarrollo se pueden dar como huevo o como hembra adulta, en verano o invierno.

Son Ácaros de desplazamientos lentos y dispersión por aire fundamentalmente, aunque si producen sedas, éstas facilitan la tarea.

En general son monófagos, aunque alguna especie de interés es altamente polífaga, como *Tetranychus urticae* Koch. En las plantas se sitúan en el envés de hojas preferentemente, ocasionando moteaduras claras, manchas irregulares blanquecinas, tonos marrones, defoliación, etc. La importancia de los daños depende no sólo de la especie de ácaro, sino también del estado de desarrollo de la planta hospedante, ya que hay periodos más sensibles como el de plántula, la floración o la formación del fruto; de las condiciones ambientales, ya que en general le son favorables las temperaturas altas y las humedades relativas bajas; o de los requerimientos del mercado.

Para alimentarse clavan los estiletes entre 70 y 120  $\mu\text{m}$  e inyectan saliva con reguladores de crecimiento poco conocidos, que son responsables de los síntomas cuando hay poca población.

Los daños en las plantas son de tres tipos: mecánicos, al vaciar las células del mesofilo; químicos, al bajar el contenido en Nitrógeno y Fósforo, así como en proteínas, en clorofila, etc.; y fisiológicos, al alterar la transpiración de las plantas y la fotosíntesis (aumentan los azúcares solubles al bloquearse la síntesis del almidón, aumentan los aminoácidos, baja la asimilación del carbónico, etc).

En los cultivos hortícolas españoles, al aire libre y en invernaderos, se encuentran cuatro especies del género *Tetranychus*: *Tetranychus urticae* Koch, *T.*

*turkestani* Ugarov y Nikolski, *T. luden* Zacher y *T. evansi* Baker y Pritchard, conocidas popularmente como “arañas rojas”, que presentan una gran similitud morfológica y son muy difíciles de distinguir en el campo.<sup>146</sup>

### 3.2.1.c *Tetranychus urticae*

#### i. Generalidades

El ácaro de las dos manchas *Tetranychus urticae* Koch, 1836, es considerado una plaga severa en numerosos cultivos de importancia económica a nivel mundial. Los síntomas típicos producidos por la alimentación de los tetraníquidos en la planta hospedera incluyen alteraciones mecánicas y bioquímicas, las cuales se manifiestan como cambios en la coloración de la hoja, reducción de la tasa de crecimiento, retraso de la floración y disminución en la producción de frutos.<sup>147</sup>

Es una especie cosmopolita y con una distribución muy amplia que incluye los cinco continentes. Las poblaciones de zonas geográficas diferentes presentan con frecuencia características morfológicas o biológicas ligeramente distintas, lo que ha dado lugar a infinidad de sinonimias, dependiendo de los distintos autores. Tradicionalmente ha presentado problemas ocasionales en prácticamente todas las zonas de clima mediterráneo, pero, en el último cuarto de siglo, ha ido reapareciendo como plaga en Israel, Italia, Marruecos y Grecia.

En España se ha convertido en plaga clave en clementino en la zona de la Plana de Castellón, donde se concentra gran parte de la producción de mandarinas españolas. Este ácaro es muy temido en esta variedad, que es particularmente sensible a su ataque, y en la que ocasiona intensas y bruscas defoliaciones.<sup>148</sup>

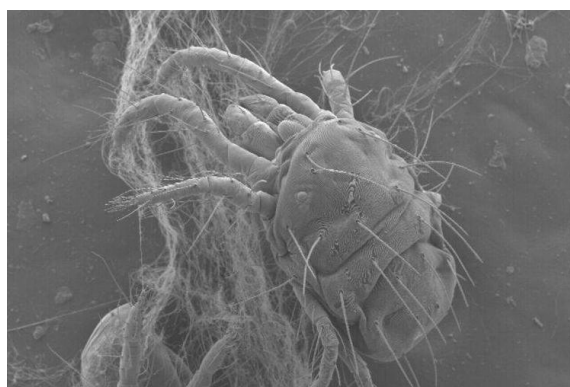
---

<sup>146</sup> Escudero, L.A.; Baldó-Gosálvez, M.; Ferragut, F. *Bol. San. Veg. Plagas*, **2005**, *31*, 377-383.

<sup>147</sup> a) Jeppson, H.; Keifer, H.; Baker, E. *Mites Injurious to Economic Plants*. Univ. of California. Press. Riverside, pp 614, 1975. b) Bolland, H.R.; Gutiérrez, J.; Fletchmann, C.H.W. *World Catalogue of the Spider Mite Family* (Acari: Tetranychidae). Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands. Pp XX, 1998.

<sup>148</sup> Aucejo, S.; Jacas J. *Vida Rural*, **2005**, *210*, 30-33.

La araña roja o *Tetranychus urticae* adulta (Figura 3.5) mide unos 0,55 mm por término medio, siendo sensiblemente mayores las hembras. La hembra es ovalada y el macho tiene el cuerpo más estrecho y fusiforme, presentando una coloración más pálida que la hembra y las patas proporcionalmente más largas. El cuerpo de *T. urticae* es muy transparente, percibiéndose en ocasiones manchas laterales más oscuras, que son causadas por los alimentos visibles a través de la epidermis. Su color varía con la planta huésped, la edad del ácaro, la época del año, etc. cambiando desde un verde-amarillento a un anaranjado-rojizo, lo que da lugar a sus diferentes nombres vulgares (araña roja, araña amarilla, etc.).<sup>148</sup>



**Figura 3.5**

El huevo es esférico y liso e inicialmente incoloro, volviéndose opaco y vítreo a medida que la incubación avanza. Poco antes de la eclosión puede distinguirse perfectamente los dos puntos rojos correspondientes a los ojos de la larva. El tamaño del huevo suele ser de 0,12 a 0,14 mm.

La larva es esférica, de 0,15 mm de tamaño. Recién emergidas son incoloras y transparentes, con los ojos de color rojo oscuro. A diferencia del resto de estados posee sólo tres pares de patas. Después de haberse alimentado su color cambia a verde claro, amarillo marrón, o verde oscuro. En este estado aparecen en el centro del cuerpo las dos manchas oscuras. Cuando va a producirse el cambio de estado, permanece inmóvil, con las patas extendidas sobre el sustrato vegetal, paralelas al eje del cuerpo.

Las protoninfas son ligeramente más grandes que las larvas. Poseen cuatro pares de patas, al igual que las deutoninfas y los adultos. Son de color verde, que varía de claro a intenso. Las manchas son más grandes y nítidas que las de las larvas.

El tamaño de la deutoninfa es mayor, pero de coloración similar a la de la protoninfa. También posee cuatro pares de patas. En este estado se pueden ya diferenciar claramente las formas que darán origen a las hembras y a los machos. Las hembras son mayores, más voluminosas y redondeadas.

*Tetranychus urticae* es una especie adaptada a climas cálidos y secos. El rango de temperaturas en el que puede desarrollarse oscila entre los 12° y los 40 °C, siendo 30 °C su temperatura de desarrollo óptimo. Esta especie pasa el invierno como hembra adulta, fertilizada, de color naranja intenso, guarecida en diversos refugios: corteza de árboles, suelo, hojarasca, etc. En primavera se traslada preferentemente a los cultivos herbáceos, donde se alimenta situándose en el envés de las hojas. La puesta, de huevos aislados, se realiza sobre estas hojas y los estados por los que pasa son: larva hexápoda (3-5 días), ninfas (6-10 días) y adulto, pudiendo completarse una generación en tan sólo 10-15 días si las condiciones son favorables. Pero este factor está altamente influenciado por las condiciones ambientales, así como por la calidad del sustrato alimenticio, de hecho hay autores que hablan de ciclos de 7 días.<sup>149</sup> <sup>150</sup>

Tras cumplirse una o más generaciones en las plantas herbáceas, pueden dirigirse a los cultivos leñosos o a la vid, hacia el mes de junio. A finales de otoño, las hembras se retiran a invernar. Con temperaturas elevadas y las humedades relativas bajas, pueden reproducirse continuamente.

Es una plaga extraordinariamente polífaga, causando daños graves tanto en cultivos hortícolas diversos, judía (*Phaseolus vulgaris* L.), tomate (*Lycopersicon*

---

<sup>149</sup> García Marí, F.; Llorens, J.M.; Costa, J.; Ferragut, F. *Ácaros de las plantas cultivadas y su control biológico*. Pp, 175. Pisa Ediciones, Valencia, 1991.

<sup>150</sup> Bounfour, M.; Tanigoshi, L.K. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **2001**, *94*, 400-401.

*esculentum* Mill.), guisante (*Pisum sativum* L.), etc; como en ornamentales, frutales, o vid (*Vitis vinifera* L.), especialmente en el centro y sur de nuestro país.



**Figura 3.6**

La araña roja produce hilos de seda en cantidad (Figura 3.7), de modo que existe una relación directa entre el movimiento de la araña adulta y la producción de seda.<sup>151</sup>



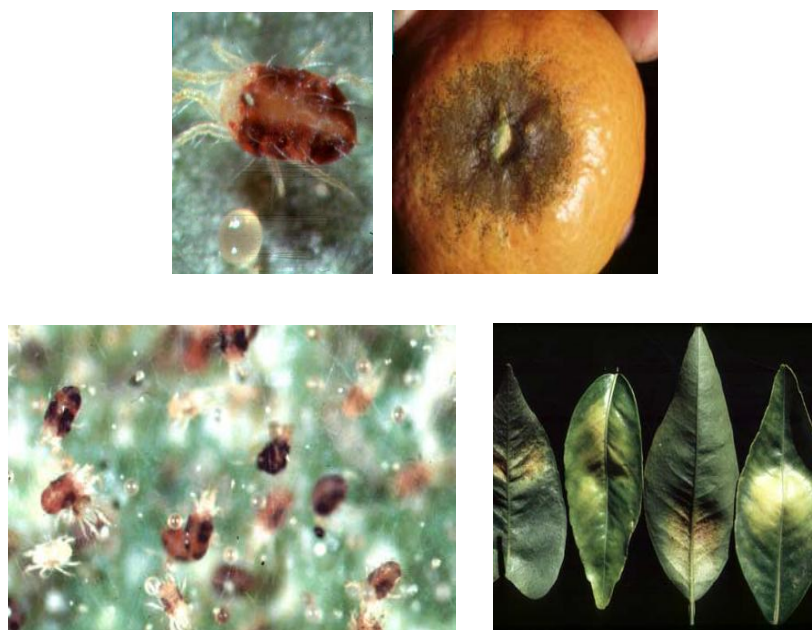
**Figura 3.7**

Vive agrupada en colonias entre dichos hilos, creando un microclima favorable al retener la humedad de la transpiración de la planta, lo que le permite sobrevivir en climas muy secos y le protege de la lluvia, depredadores y acaricidas.

<sup>151</sup> Saito, Y. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **1977**, 21, 27-34.

La seda también se utiliza como mecanismo de dispersión: cuando agotan el alimento las hembras de la colonia se dirigen al extremo de la hoja o brote, donde se acumulan formando densas aglomeraciones. Estos individuos tejen hilos de seda, de los que penden en espera de que una corriente de aire los transporte a otra planta sobre la que fundar una nueva colonia.

La araña roja desarrolla sus colonias en el envés de las hojas y la zona afectada toma una coloración amarillo-herrumbrosa, con una concavidad característica. El haz se abomba y amarillea. Las hojas pueden caer, siendo sensible especialmente a esta defoliación el clementino. También puede vivir sobre los frutos, dando lugar a manchas herrumbrosas difusas por toda la superficie del fruto maduro, que se inician en la zona estilar o peduncular.<sup>152</sup> En caso de fuertes ataques, el fruto aparece de color gris sucio (Figura 3.8).



**Figura 3.8**

El clementino es una especie particularmente sensible, a este ácaro, por loas graves y súbitas defoliaciones que puede llegar a producir. También en

<sup>152</sup> a) Aucejo, S.; Foó, M.; Ramis, M.; Troncho, P.; Gómez-Cadenas, A.; Jacas, J.A. *Bol. San. Veg. Plagas*, **2003**, 29, 453-459. b) Garrido, A.; Ventura, J.J. *Plagas de los cítricos. Bases para el manejo integrado*. Ministerio de agricultura, Pesca Y Alimentación, Madrid, pp 183, 1993. c) Villalba, D; Garrido, *Plagas de los cítricos más importantes de la Comunidad Valenciana*, Dirección Gral. de Innovación Agraria y Ganadera, Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, Generalitat Valenciana, 2001.



limonero es una grave plaga por desarrollar colonias sobre los frutos, dando lugar a manchas herrumbrosas que los deprecian. En el limón (Figura 3.9) da lugar a un síntoma muy característico, ya que produce una mancha de color marrón oscuro denominada "bigote"<sup>145,146</sup>. Otras especies de cítricos, como satsuma o naranjo dulce son algo menos susceptibles a esta plaga.

Con frecuencia esta especie produce abundantes sedas en las partes atacadas, pudiendo llegar a cubrir totalmente la planta, si el ataque es fuerte (Figura 3.9).<sup>152</sup>



**Figura 3.9**

La reproducción de *T. urticae* se produce mediante partenogénesis arrenotoca, es decir, los huevos no fecundados dan lugar a machos y son haploides, mientras que los fertilizados, y por lo tanto diploides, dan lugar a hembras. Cada hembra adulta puede poner unos 100-120 huevos, con una frecuencia de 3-5 huevos por día. La fecundidad y la tasa de puesta diaria, sin embargo, varía en función de muchos factores, como la cantidad y calidad del alimento o las condiciones ambientales. Las hembras adultas de *T. urticae* pueden vivir entre veinte y veintiocho días. La proporción normal de hembras y machos en una población de este fitófago es 3:1.<sup>148</sup>

En las zonas de climas fríos, la araña roja presenta formas invernales, que permanecen quiescentes resguardadas en los troncos o la vegetación circundante. La diapausa está inducida por las bajas temperaturas, los días cortos y la escasez de recursos alimenticios. Sin embargo, no siempre se produce este fenómeno. Las condiciones ambientales en la zona litoral mediterránea, por ejemplo, son tales que permiten la presencia de formas móviles a lo largo de todo el año.

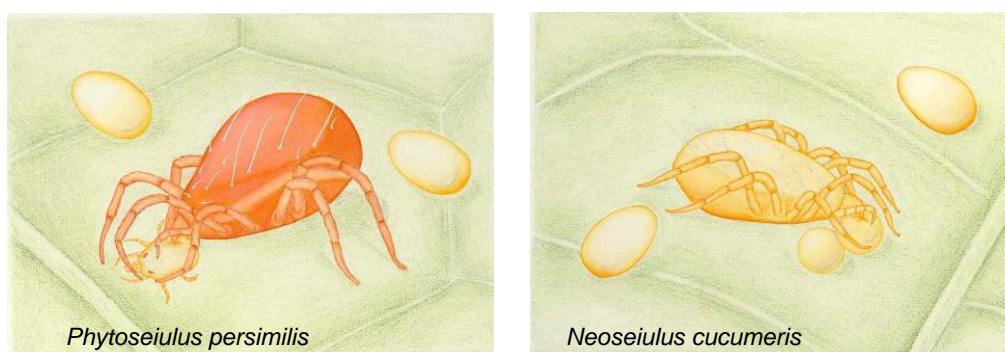
## ii. Control biológico

Los principales enemigos naturales que posee *T. urticae* son los ácaros depredadores de la familia de los *Phytoseiidae*. Se trata de una familia de amplia distribución geográfica. Se conocen más de 1600 especies pertenecientes a 70 géneros en todo el mundo, de las que algunas se encuentran también en España (hasta 40 especies distintas en diversos cultivos). El tamaño de los fitoseidos es muy similar al de sus presas y su coloración suele ser blanquecina, si bien la transparencia de su tegumento les hace aparecer rojizos cuando se han alimentado de arañas o ácaros. Poseen una extraordinaria movilidad y rapidez, lo cual, junto con su coloración, los hace fácilmente distinguibles, a simple vista, sobre las hojas. Tienen los mismos estados de desarrollo que los tetraníquidos (huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto), pero, salvo algunas excepciones, no existen estados quiescentes entre ellos. Por ello, su ciclo biológico es más corto que el de sus presas, estimándose su duración entre 5 y 7 días en condiciones favorables.<sup>148</sup>

Las especies de fitoseidos más comunes en el arco mediterráneo son *Neoseiulus californicus*, *Euseius stipulatus*, *Typhlodromus phialatus* y *Phytosiulus persimilis*. La mayoría de estas especies –y otras no citadas por ser menos

abundantes- son polípagas, alimentándose de una gran variedad de microartrópodos, así como de melaza, polen u hongos. Esta capacidad resulta muy interesante en los agentes de control biológico, puesto que les permite sobrevivir en épocas en las que no hay fitófagos y poder responder a los incrementos poblacionales de la plaga cuando éstos se producen.

Otras especies son de alimentación específica y se desarrollan casi exclusivamente sobre ácaros tetraníquidos productores de seda.<sup>148</sup> Las plantas atacadas por cepas de arañas emiten sustancias volátiles que son captadas por depredadores de tetraníquidos.<sup>153</sup> Es el caso de *P. persimilis*,<sup>146</sup> que se encuentra en plantas donde hay ácaros del género *Tetranychus*, prácticamente su única presa. Este fitoseido es el más empleado en el control biológico de tetraníquidos, especialmente en invernaderos (Figura 3.10). En España, sin embargo, se ha comprobado que, pese a ser una especie autóctona, es poco abundante y de distribución errática, puesto que no soporta las elevadas temperaturas que se producen durante el verano. *Neoseiulus californicus*<sup>146,154</sup> es una especie parcialmente monófaga, con clara preferencia por los géneros *Tetranychus* o *Eotetranychus*, pero que también puede sobrevivir con otros alimentos. A diferencia de *P. persimilis*, tolera las altas temperaturas, lo que le hace un candidato interesante en el control biológico de la araña roja en la zona mediterránea (Figura 3.10).



**Figura 3.10**

Además de los ácaros fitoseidos, existen otros depredadores de *Tetranychus urticae*, principalmente en los órdenes Coleoptera, Neuroptera y Heteroptera. Destacan *Stethorus punctillum*, un coccinélido muy frecuente en los

<sup>153</sup> Maeda, T.; Takabayashi, J. *Appl. Entomol. Zool.* **2001**, 36, 47-52.

<sup>154</sup> Easterbrook, M.A.; Fitzgerald, J.D.; Solomon, M.G. *Exp. Appl. Acarol.* **2001**, 25, 25-36.

cítricos de nuestro país, *Chrysoperla carnea* y *C. septempunctata*, así como *Conwentzia psociformis* y *Hemrobius*, todos ellos depredadores generalistas y abundantes sobre todo en primavera. Por último, cabe citar a los antocóridos del género *Orius* o al cecidómico *Feltiella acarisuga*.

### iii. Control químico

El uso de fitosaidos tiene ciertas limitaciones, ya que no sólo no siempre se obtienen resultados eficaces, sino que además frecuentemente el tratamiento resulta comparativamente más costoso desde el punto de vista económico que los acaricidas químicos y conlleva además cierto impacto ecológico que puede llegar a limitar la conveniencia de su uso.<sup>155</sup> Además, en el caso de la araña roja, es frecuente el incremento de poblaciones de este fitófago a finales de verano. Todo ello conlleva que se suela recurrir al control químico aplicando acaricidas específicos como Tebufenpyrad, dicofol, hexitiazox, etc.

Se debe tratar al aparecer los primeros síntomas con productos acaricidas específicos de acción ovicida y adulticida, ya que conviven todas las formas simultáneamente. Su proliferación se ve favorecida con tiempo cálido y seco. El producto a aplicar depende de la planta sobre la que se encuentra y de los productos con los que ha sido tratado previamente y a los que ha podido desarrollar resistencias.

En frutales y en vid, los tratamientos invernales, que se efectúan para combatir diversos problemas entomológicos, son muy poco efectivos contra este ácaro. Los tratamientos en vegetación en estas plantas, se harán a partir de junio, que es cuando se empiezan a trasladar desde las plantas herbáceas, examinando el tanto por ciento de ocupación de hojas, para ver la necesidad de aplicar o no un producto.

En plantas herbáceas y ornamentales hay que tratar repetidamente desde que aparecen los primeros síntomas.

Entre el listado de las materias activas autorizadas en España contra este ácaro, se encuentran acaricidas específicos como clofentezín, dicofol, fenazaquín, fenbutaestán, fenperoximato, piridaben, propargita, tebufenpyrad o tetradifón, Así

---

<sup>155</sup> Collier, T.; Van Steenwick, R. *Biol. Control*, **2004**, 31, 245-256.

como los aceites de verano y hexitiazox, con actividad ovicida, por lo que suele utilizarse en mezcla con dicofol. Los acaricidas específicos y las diversas combinaciones de los mismos resuelven el problema a corto plazo, pero con el tiempo dan lugar a consecuencias en ocasiones indeseables. Para cítricos las materias activas recomendadas son: dicofol, dicofol + hexitiazox, dicofol + tetradifón, fenbutestan, piridaben y tebufenpirad.<sup>152</sup>

Una de ellas es la aparición de problemas de resistencia, especialmente a dicofol, fenbuestán y tetradión.<sup>156</sup> Los primeros fenómenos de resistencia a plaguicidas aparecieron en los años cincuenta, y desde entonces el número de casos no ha hecho más que aumentar.<sup>157</sup> Se considera que el mecanismo más importante por el que una población se convierte en resistente a un producto químico es el de la selección genética: los individuos presentan diversos grados de sensibilidad al plaguicida y, al verse sometidos a la presión selectiva de éste, la proporción de genes resistentes en la población aumenta.

Otro fenómeno que contribuye a la proliferación de *T. urticae* tras aplicaciones excesivas de productos químicos es la eliminación de fitoseidos y otros artrópodos beneficiosos. Dicofol y tetradifón, por ejemplo, suelen aplicarse juntos por su acción complementaria, ya que el primero es larva-adulticida y el segundo ovicida. Esta mezcla, sin embargo, resulta altamente tóxica para los fitoseidos. Los fosforados penetrantes resultan asimismo muy perjudiciales para los ácaros depredadores.<sup>148</sup>

A estos efectos secundarios de las aplicaciones químicas cabe añadir la creciente prohibición de materias activas por parte de la Administración pública por motivos medioambientales y toxicológicos.

Según todo lo expuesto, se entiende que el control de *T. urticae* implique cierta dificultad y que habitualmente los resultados obtenidos sean solo parciales.

En la actualidad, las estrategias de control de plagas tienden a un control integrado, es decir, la integración de todos los medios de que se dispone, tanto químicos como naturales, dando prioridad a los agentes de control biológico.

---

<sup>156</sup> Viñuela, E. *Bol. San. Veg. Plagas*, **1998**, 24, 487-496.

<sup>157</sup> a) Van Leeuwen, T.; Van Pottelberge, L.T. *Pest Man. Sci.*, **2005**, 61, 499-507. b) Devine, G.J.; Barber, M.; Denholm, I. *Pest Man. Sci.* **2001**, 57, 443-448. c) Stumpf, N.; Nauen, R. *J. Econ. Entomol.* **2001**, 94, 1577-1583.

### 3.2.2 Impacto económico

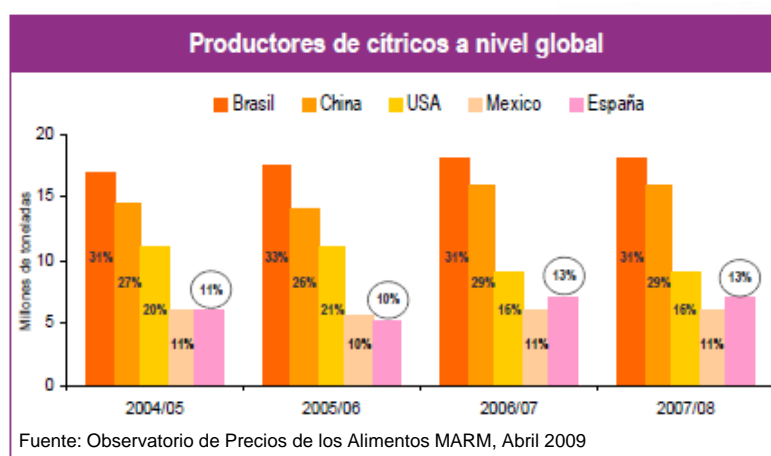
El ácaro *Tetranychus urticae* Koch, 1836, es un fitófago considerado una plaga severa en numerosos cultivos de importancia económica a nivel mundial.<sup>147</sup> En nuestro país actúa sobre productos básicos de nuestra agricultura como vid, hortalizas y frutas<sup>158</sup> (Figura 3.11). Entre los frutales, el de los cítricos, es un ejemplo de especial relevancia en España y en la Comunidad Valenciana.

**Evolución de la Exportación española de Hortalizas, Frutas y Cítricos.**

	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2007
Hortalizas	748.584	1.274.892	1.277.573	2.674.541	3.426.055	4.044.199	4.088.213
Frutas	346.754	492.181	640.658	1.480.835	1.851.493	2.258.434	2.216.616
Cítricos	1.554.201	1.559.629	2.362.412	2.793.394	3.349.080	3.082.506	3.781.997
<b>TOTALES</b>	<b>2.649.539</b>	<b>3.326.702</b>	<b>4.280.643</b>	<b>6.948.770</b>	<b>8.626.628</b>	<b>9.385.139</b>	<b>10.086.826</b>

**Figura 3.11**

En el mundo se producen anualmente 85 millones de toneladas de cítricos. España ocupa actualmente la cuarta posición de países productores y el primero de Europa, con unas 6,5 millones de toneladas para la temporada 2008/2009<sup>159</sup>, lo que implica un incremento del 23% frente a la campaña anterior, que fue entorno a 5 millones de toneladas (ver figura 3.11).<sup>160</sup>



**Figura 3.11**

<sup>158</sup> Planells, J.M.; Mir, J. *Distribución y Consumo*, Jul-Ago 2009, 63-79.

<sup>159</sup> *Cítricos de la Comunitat Valenciana*, Instituto Valenciano de la Exportación, Generalitat Valenciana, Julio 2009.

<sup>160</sup> *Estudio de la cadena de valor y formación de precios del sector cítrico*, Observatorio de Precios de los Alimentos (MARM), Ministerio de Medioambiente y Medio Rural y Marino, Gobierno de España, Abril 2009.

Del total de cítricos producido en España un 48% se destina a exportación. Este volumen de productos exportados sitúa a nuestro país como el mayor exportador de cítricos del mundo, generando alrededor del 40% de las exportaciones globales<sup>159</sup> (Figura 3.12).



**Figura 3.12**

La producción española se reparte principalmente entre naranjas (50%), mandarinas (38%) y limones (9%), que proviene de las cerca de 340.000 ha de cítricos cultivadas a lo largo del arco litoral mediterráneo, desde el sur de Cataluña hasta el límite de Andalucía con Portugal.

Sólo en exportaciones, los cítricos españoles alcanzaron un valor de unos 2400 millones de euros en 2008, de los cuales 1820 millones corresponden a la comunidad valenciana. Y es que la mitad de nuestra producción se exporta a diferentes mercados, principalmente europeos, lo que nos convierte en el primer exportador mundial de cítricos. La Comunitat Valenciana es la primera región española exportadora de cítricos, con un 76% del total de España, porcentaje que se eleva al 87% para las mandarinas.<sup>159</sup>

La citricultura, tanto en nuestro país, como en todo el mundo, tiene planteados numerosos problemas, algunos de ellos relacionados con la sanidad del cultivo. Así, para hacernos una idea cabal de la importancia de este capítulo en la producción citrícola española, basta decir solamente que el valor de los fitosanitarios aplicados en este cultivo en 2002 fue superior a los 90 millones de euros, de los que la mitad corresponden a insecticidas y acaricidas.<sup>148</sup>



Existen numerosas plagas potenciales que pueden afectar a los cítricos, algunas de las cuales se encuentran bajo un control natural/biológico excelente o satisfactorio, mientras que otras pueden necesitar de una atención especial y requerir tratamiento químico. Como hemos visto, éste es el caso de *Tetranychus urticae*, un ácaro fitófago que ocasiona plagas dañinas en estos árboles, siendo de especial relevancia su acción sobre el clementino.<sup>148</sup> Así, en la zona de Castellón de la Plana, donde se concentra gran parte de la producción de mandarinas españolas, este ácaro es muy temido ya que ocasiona intensas y bruscas defoliaciones. La cuestión no es baladí, ya que como hemos visto, España representa más del 70% del total del mercado europeo de mandarinas y más de la mitad de las naranjas en época de oferta.<sup>158</sup>

### **3.2.3 Toxicología de pesticidas y plaguicidas**

#### **3.2.3.a. Generalidades y Legislación**

La “Reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas” aprobada por el Real Decreto 3349/1983, de 30 de noviembre, y modificada por el Real Decreto 162/1991, de 8 de febrero y el Real Decreto 443/1994, de 11 de marzo de 1994 establece unas definiciones y normas muy concretas para los plaguicidas.

A su vez, y en relación a la legislación específica relativa a los productos fitosanitarios o plaguicidas de uso fitosanitario, por sus características y mayor aplicación a nivel general, deben cumplir, además de lo exigido en la Reglamentación Técnico-Sanitaria, otros requisitos recogidos en el R.D. 2163/1994, de 4 de noviembre, por el que se implanta el sistema armonizado comunitario de autorización para comercializar y utilizar productos fitosanitarios. Por último, el Ministerio de la Presidencia publica la ORDEN PRE/1983/2007<sup>161</sup>, de 29 de Junio, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 2163/1994, de 4 de noviembre, por el que se implanta el sistema armonizado comunitario de autorización de comercializar y utilizar productos fitosanitarios para incluir una serie de sustancias activas concretas (metamidofos, dinocap, carbendazima, etc.)

Según toda la legislación precedente, y considerando las definiciones fijadas en ellas, se entiende por:

---

<sup>161</sup> ORDEN PRE/1983/2007, BOE, 160, de 05/07/2007



Plaguicidas: como las sustancias o ingredientes activos, así como las formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos, destinados a cualquiera de los fines siguientes:

a. Combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales o prevenir su acción.

b. Favorecer o regular la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la enmienda de suelos.

c. Conservar los productos vegetales, incluida la protección de las maderas.

d. Destruir los vegetales indeseables.

e. Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos.

f. Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan a los vegetales.

Según datos recientes acaecidos en España, se estima que los tóxicos que originan mayor número de intoxicaciones fueron los insecticidas (80%), seguidos de los acaricidas con un 8% y de los fungicidas con un 7%. Dentro de los primeros los más frecuentes han sido los organofosforados con un 55%, carbamatos con un 30% organoclorados un 10% y el resto un 5%.<sup>162</sup>

### 3.2.3.b Riesgos higiénicos generales

El manejo de plaguicidas en general y de productos fitosanitarios en la agricultura, en particular, representa un beneficio innegable, facilitando una mayor producción agrícola y haciendo que ésta sea mucho más estable. Sin embargo, la aplicación de estos insumos entraña riesgos tóxicos para la salud ya sea en forma accidental o por un manejo inapropiado de los mismos, son los que venimos a definir como riesgos higiénicos generales.<sup>162</sup>

Las vías de entrada de estas sustancias en el cuerpo humano pueden ser cualquiera de las clásicas, ahora bien en un orden de importancia:

---

<sup>162</sup> Falagán Rojo, M.J. *Higiene Industrial, manual práctico, Tomo II: Agentes físicos y actividades especiales.*, Fundación Luis Fernández de Velasco, 2008.

1. La dérmica o cutánea: generalmente obedece a contactos directos o vehicularizados a través del aire. Aunque varía la penetración en su velocidad de tránsito de unas zonas a otras es más fácil si esta caliente o dañada. La absorción por la piel no es uniforme a lo largo de toda la superficie corporal para un compuesto concreto.

2. La respiratoria o inhalatoria: sus factores más determinantes, son las propiedades del ingrediente activo (volatilidad), formulación y técnica empleada. Su estado, gas, vapor, aerosol y polvo, sobre todo con diámetros pequeños y en espacios cerrados implican riesgo.

3. La digestiva u oral. A veces fruto de una salpicadura accidental, de un frotamiento en la zona bucal, pero también de malos hábitos en la higiene como comer o beber sin lavarse. Deberíamos incluir aquí la vía de la conjuntiva.

#### 3.2.3.c Riesgos específicos

Además de los riesgos higiénicos generales, es necesario considerar también los riesgos específicos. Así, puede decirse que muchos compuestos organoclorados afectan al sistema nervioso central (depresión, narcosis, etc.). Si bien los mecanismos de acción de los pesticidas sobre los organismos, sea esta familia u otra, presentan entre sí grandes divergencias, lo que en la práctica supone que incluso dentro de una misma familia química puedan encontrarse compuestos clasificados desde escasamente peligrosos hasta muy tóxicos.

3.2.3.d Clasificación de los productos fitosanitarios en función de su toxicidad.

La clasificación de los productos fitosanitarios según el grado de toxicidad diferencia las categorías de muy tóxicos, tóxicos o nocivos, atendiendo a su toxicidad aguda expresada en DL50 (dosis letal media), por vía oral o dérmica para la rata, o en CL50 (concentración letal media) por vía respiratoria para la rata.<sup>163</sup>

Estos parámetros toxicológicos serán determinados por métodos internacionalmente reconocidos y los criterios son distintos según la vía y estado

---

<sup>163</sup> R.D. 162/1991, de 8 de febrero, por el que se modifica la reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de los plaguicidas "R.D. 3349/1983.

físico del preparado, y se aplicarán determinados criterios. Así en el caso de la DL50 por vía oral:<sup>164</sup>

a. Los plaguicidas sólidos, excepto los cebos y los presentados en forma de tabletas, se clasifican como:

- Muy tóxicos: DL50 inferior o igual a 5 miligramos por kilogramo de peso corporal.

- Tóxicos: DL50 superior a 5 e inferior o igual a 50 miligramos por kilogramo de peso corporal.

- Nocivos: DL50 superior a 50 e inferior o igual a 500 miligramos por kilogramo de peso corporal.

b. Los plaguicidas líquidos, así como los cebos y los presentados en forma de tabletas, se clasifican como:

- Muy tóxicos: DL50 inferior o igual a 25 miligramos por kilogramo de peso corporal.

- Tóxicos: DL50 superior a 25 e inferior o igual a 200 miligramos por kilogramo de peso corporal.

- Nocivos: DL50 superior a 200 e inferior o igual a 2.200 miligramos por kilogramo de peso corporal.

### 3.2.3.e Hipersensibilidad tópica

Las reacciones de hipersensibilidad son procesos patológicos que resultan de las interacciones específicas entre antígenos (Ag) y anticuerpos (Ac) o linfocitos sensibilizados.<sup>165</sup>

El término *Hipersensibilidad* se refiere a la excesiva o inadecuada respuesta inmunitaria frente a antígenos ambientales, habitualmente no

---

<sup>164</sup> La DL50 (Dosis Letal 50 %) oral aguda significa la cantidad de una sustancia que es necesario ingerir de una sola vez para producir la muerte del 50% de los animales en ensayo". Esta dosis se expresa generalmente en mg/kg de peso del animal ensayado.

<sup>165</sup> VanArsdel, Jr. *Trastornos por hipersensibilidad*. Berkow R, ed. El Manual Merck. 9ª ed. España: Doyma libros, SA, 1994: 351- 382.

patógenos, que causan inflamación tisular y malfuncionamiento orgánico. Gell y Coombs<sup>166</sup> clasificaron los mecanismos inmunopatogénicos o reacciones de hipersensibilidad en 4 tipos, en cada uno de ellos participan de forma secuencial diferentes tipos de células y mediadores solubles.

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV son reacciones de hipersensibilidad celular o mediada por células, causadas por linfocitos T sensibilizados al entrar en contacto con el Ag específico. Así, en la hipersensibilidad por contacto, un hapteno reacciona covalentemente con proteínas para dar lugar a un complejo antígeno-proteínico objetivo de los linfocitos T. En la piel, las células que reconocen este complejo son las células de Langerhan. Tras un segundo contacto con el hapteno, se produce una reacción inflamatoria causada por la liberación de citocinas como IL-2, IL-3, GM-CSF e IFN $\gamma$ , así como por la proliferación de linfocitos T.<sup>167</sup>

Así, se ha demostrado que cerca de 3000 sustancias químicas son alérgenos por contacto, las sustancias más comúnmente implicadas son: níquel, cobalto, mercurio, relojes, botones y hebillas de metal, cuero, así como los componentes que se añaden al látex en su fabricación, aceleradores, antioxidantes, derivados del tiurán, carbamatos, derivados de la tiourea, fenoles y los derivados aminos.

### **3.2.4 Topología molecular**

#### **3.2.4.a Generalidades**

Los métodos QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships), relacionan la estructura de una molécula con la actividad basándose en la caracterización numérica de la estructura molecular. Mediante la cuantificación de

---

<sup>166</sup> Coombs, R. R. A.; P. G. H. Gell. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In *Clinical Aspects of Immunology*. P. G. H. Gell, R. R. A. Coombs, and P. J. Lachman, editors. Blackwell Scientific, London, 1975. England.

<sup>167</sup> Roitt, I. M.; Brostoff, J.; Male, D. K. *Immunology* 3ª ed. Mosby-Year Book Europe Limited, London, 1993

las diferencias estructurales es posible diferenciar numéricamente unas estructuras de otras.<sup>168</sup>

Dentro de los métodos QSAR está incluido el método de topología molecular, que caracteriza la molécula a través de unos índices o descriptores topológicos basados en la teoría de grafos.

Si una cuantificación de la topología de las moléculas lleva consigo una información estructural suficiente, será posible una correlación con las propiedades físicas, químicas y biológicas de las mismas. Este es el objetivo del método de topología molecular. Se trata de obtener funciones de correlación multilineal entre dichas propiedades y una serie de descriptores, llamadas funciones topológicas:

$$P(IT) = A_0 + \sum_{i=1}^m A_i(IT)_i$$

Donde  $A_0$  y el conjunto de términos  $A_i$  representan los coeficientes de regresión de la ecuación obtenida e  $(IT)_i$  representa cada uno de los descriptores mencionados.

Cada ecuación de regresión se acompaña de una serie de parámetros estadísticos:

$N$  = número de moléculas empleadas en la regresión.

$r$  = coeficiente de correlación.

EEE = error estándar de la ecuación de regresión.

$C_p$  = parámetro de Mallows de la ecuación de regresión.

$F$  = parámetro de Fisher-Snedecor.

$p$  = significación estadística de la regresión.

El interés del método radica en que si se sustituyen los valores de los índices en la función topológica para moléculas no utilizadas en la correlación, se

---

<sup>168</sup> Selassie, C. D.; Mekapati, S. B.; Verma, R. P. *Curr Top Med Chem.* **2002**, 2, 1357- 1379.

puede predecir aproximadamente el valor teórico de la propiedad P para ese compuesto.

El método de topología molecular se basa en representar la molécula mediante un grafo. Los fundamentos de la teoría de grafos aplicada a la química se describen a continuación.

### 3.2.4.b Teoría de grafos

La teoría de grafos es una subdisciplina de la topología, íntimamente relacionada con la combinatoria. Se le han encontrado aplicaciones en disciplinas como la química, y específicamente en áreas como química sintética, química de los organometálicos, química del petróleo, termoquímica, cinética química, mecánica estadística, equilibrios de fase, etc.

Concretamente, en la química estructural la teoría de grafos ha facilitado enormemente la comprensión del concepto de estructura química al representarla como un grafo. Un grafo representa las interconexiones de los elementos dentro de un conjunto, y en el caso de una molécula las conexiones son los enlaces químicos entre sus átomos.<sup>169</sup> La aplicación química de la teoría de grafos fue desarrollada por Randić<sup>170</sup> y Kier-Hall<sup>171</sup> en una serie de artículos publicados en la década de los 70. Siguiendo a estos autores, esta visión parte del establecimiento de las equivalencias:

#### **MATEMÁTICA**

GRAFO →  
ARISTA →  
VÉRTICE →

#### **QUÍMICA**

ESTRUCTURA QUÍMICA  
ENLACE  
ÁTOMO

Desde este punto de vista, la cuestión fundamental es qué átomo está ligado a cualquier otro y cuál es el camino para ir de un átomo a otro dentro de la molécula, sin necesidad de estudiar aspectos tales como la morfología

<sup>169</sup> a) Balaban, A.T. *J Chem Inf Comput Sci.* **1985**; 25, 334-343. b) Hansen, P.; Jurs, P. *J Chem Ed.* **1987**, 65, 574-580.

<sup>170</sup> Randić, M. *J Am Chem Soc.* **1975**, 97, 6609-6615.

<sup>171</sup> a) Kier, L. B.; Murray, W. J.; Randić, M.; Hall, L. H. *J Pharm Sci.* **1975**, 64, 1971-1974. b) Hall, L. H.; Kier, L. B.; Murray, W. J. *J Pharm Sci.* **1975**, 64, 1974-1978. c) Murray, W. J.; Kier, L. B.; Hall, L. H. *J Med Chem.* **1976**, 19, 573-578. d) Kier, L. B.; Hall, L. H. *Molecular connectivity in chemistry and drug research.* Ed. Academic Press, London, 1976.

tridimensional del compuesto, la naturaleza y la longitud de los enlaces químicos que ligan los átomos o los ángulos entre dichos enlaces.

Un grafo  $G$  viene definido por una serie de elementos o términos que se especifican a continuación:

- Vértice o nodo: cada uno de los puntos que forman parte de un grafo, viene representado por  $v_i$ . La letra  $n$  se emplea para designar el número total de vértices que constituyen el grafo.

- Arista: cada una de las líneas que conecta dos vértices en un grafo. Una arista se designa haciendo referencia a los vértices que la limitan  $(v_i, v_j)$ , éstos vértices son llamados extremos. La letra  $m$  se emplea para designar el número total de aristas que aparecen en el grafo.

- Grafo de hidrógenos suprimidos: se trata de la representación del esqueleto carbonado de una molécula, sin representar los átomos de hidrógeno, los cuales se presuponen en función de la valencia del carbono.

- Grafo libre o de árbol: aquel que no contiene ninguna estructura cíclica en su representación, donde se cumple que  $m = n - 1$ .

- Circuito: grafo que contiene una estructura cíclica.

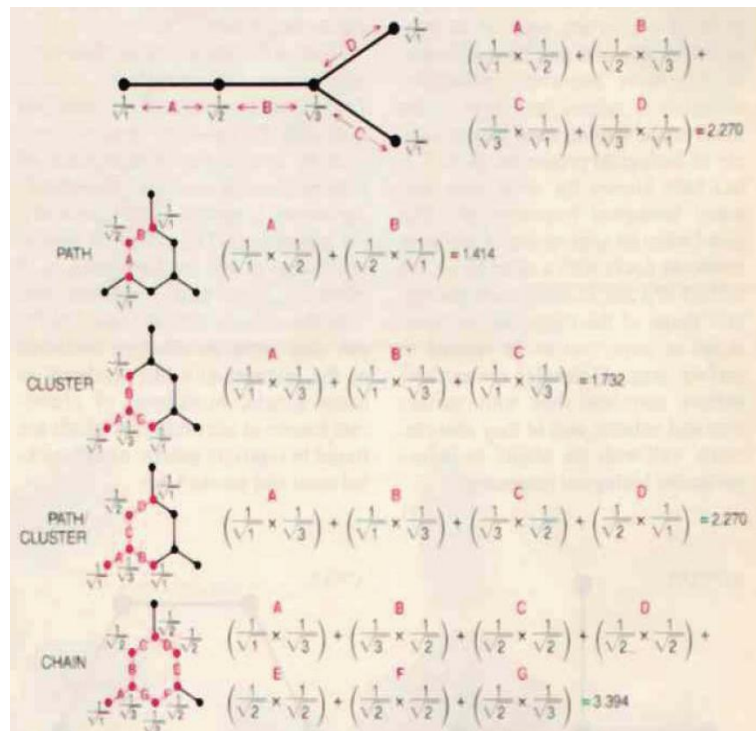
- Subgrafo: es una porción de un grafo; entendiéndose por tal, cualquier parte de un grafo constituido por una o varias de sus aristas interconectadas. Los subgrafos se clasifican según su orden  $m$  y su tipo  $t$ . El orden de un subgrafo no es más que el número de aristas que contiene. A su vez, se clasifican en cuatro tipos (figura 3.13)<sup>172</sup>: *path*, *cluster*, *path-cluster* y *chain*.

- Tipo *PATH* ( $t = p$ ), son aquellos subgrafos en los que los grados de sus vértices son menores o iguales a 2.

---

<sup>172</sup> Fuente: Randić Molecular-Connectivity Index. *Scientific American* 9/86

- Tipo *CLUSTER* ( $t = c$ ), constituido por aquellos subgrafos que tienen por lo menos algún vértice con grado 3 o 4, pero ninguno con grado 2.
- Tipo *PATH-CLUSTER* ( $t = pc$ ), son los subgrafos que incluyen vértices con grado 2, además de alguno con valores 3 o 4.
- Tipo *CHAIN* ( $t = ch$ ), formado por secuencias de enlaces conteniendo al menos un ciclo.



**Figura 3.13**

• Grado o valencia del vértice  $v_i$ : se define como el número de aristas del que  $v_i$  es extremo y se designa como  $\delta_i$ . La suma de las valencias de cada uno de los vértices de que está compuesto el grafo es igual al doble del número de aristas del grafo:  $\sum \delta_i = 2m$ .

• Arista secuencia en G: se define como un grupo de aristas conectadas en G y representadas por  $(v_i, v_j) (v_j, v_k) (v_k, v_l) \dots (v_{m-1}, v_m)$  donde cada arista termina



en dos vértices que son extremos de otras aristas en la secuencia, con la excepción de los vértices terminales.

- Longitud de una secuencia es el número de aristas que tiene.

#### 3.1.4.c La matriz topológica

La representación de una estructura química como un grafo se puede convertir en una entidad matemática (una matriz, un vector o un algoritmo que proporcione un único número asociado a un solo grafo). El primero en demostrar que una molécula podía ser representada por una matriz fue el matemático Sylvester en 1874. Dicha matriz se llama matriz topológica o adyacente.<sup>173</sup>

Para construir la matriz, en primer lugar se representa el grafo correspondiente a la molécula estudiada, suprimiendo los hidrógenos (grafo de hidrógenos suprimidos). A continuación, se numeran los vértices del grafo sin importar el orden en que se haga. Finalmente se construye la matriz topológica o adyacente **A**, cuyos elementos adquieren valores nulos o no en función de las conexiones existentes entre los distintos elementos del grafo.

Esta matriz cuadrada de  $n$  filas por  $n$  columnas, siendo  $n$  el número de vértices del grafo, es simétrica.

El grado topológico o valencia de cada vértice,  $\delta_{ij}$ , es igual a la suma de los valores que hay en la fila o columna correspondientes a dicho vértice o lo que es lo mismo, el número de aristas que llegan a él, es decir:

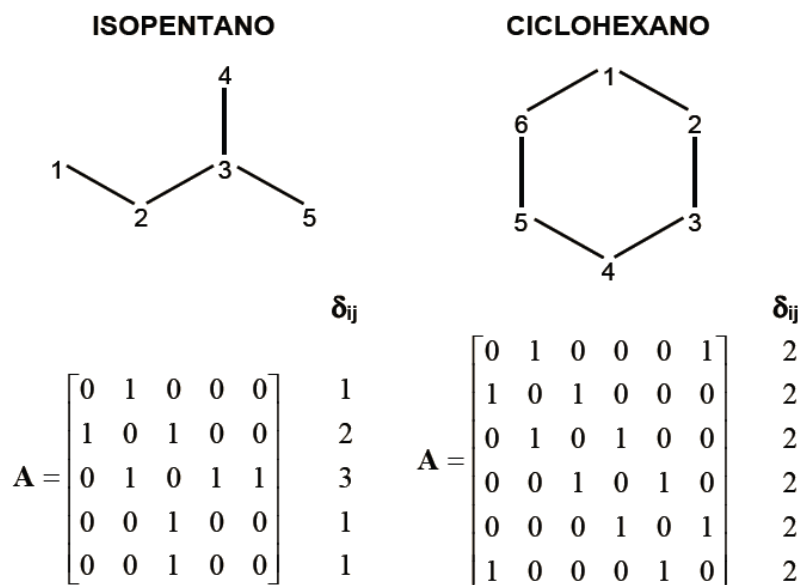
$$\delta_{ij} = \sum_{j=1}^m a_{ij}$$

Como se aprecia, es un tipo de expresión matemática que relaciona la estructura mediante una descripción numérica. Su importancia en los estudios estructura-actividad radica en que a partir de ella se calculan la mayoría de los índices topológicos.

---

<sup>173</sup> Sylvester, J. J. *Am J Math.* **1874**, *1*, 64-83.

La figura 3.14 ilustra la construcción de la matriz topológica para el isopentano y el ciclohexano, junto con los valores obtenidos para las valencias de los diferentes átomos.



**Figura 3.14**

#### 3.2.4.d Índices Topológicos

Los índices topológicos son descriptores numéricos de la estructura molecular que llevan información implícita acerca de los átomos, enlaces entre ellos y ensamblaje topológico.

Para definir dichos índices, el primer paso es representar el grafo de la molécula, construyendo a continuación la matriz topológica. A partir de esta matriz, por medio de los algoritmos adecuados, se obtienen los índices topológicos más importantes. Deben ser, por definición, invariantes de grafo, es decir, su valor debe ser independiente de la numeración de los vértices del grafo.

El primer índice fue propuesto por Wiener en 1947 para la caracterización de moléculas con ramificaciones.<sup>174</sup> Otros muchos índices se han definido desde finales de los 40, entre los que destacan el de Hosoya,<sup>175</sup> el de Randić,<sup>170</sup> los

<sup>174</sup> a) Wiener, H. *J Am Chem Soc.* **1947**, 69, 17-20. b) Wiener, H. *J Am Chem Soc.* **1947**, 69, 2636-2638.

<sup>175</sup> Hosoya, H. *Bull Chem Soc Jpn.* **1971**, 44, 2332-2339.

índices de conectividad de Kier y Hall,<sup>171d</sup> el de Balaban.<sup>169a, 176</sup> Posteriormente Kier y Hall modifican el índice de conectividad con el fin de introducir la contribución de los heteroátomos.<sup>177</sup>

Cada autor introduce dentro de su modelo parámetros que considera importantes para tratar de explicar algunas de las características propias de las moléculas, lo cual ha conducido al desarrollo de índices muy elaborados que incluyen el análisis de la información tridimensional.

Como ejemplo se pueden citar el propuesto por Hahn-Rogers, como una nueva técnica para usar modelos receptores de superficies como descriptores para QSAR, y por medio de este modelo se pueden establecer también técnicas 3D-QSAR.<sup>178</sup>

Pogliani usa una combinación lineal de índices de conectividad (LCCI) y una combinación lineal de índices ortogonales de conectividad (LCOCI), definidos a partir de bases mínimas y extendidas de dichos índices, para relacionar la estructura con la solubilidad y puntos de ebullición de homólogos de la cafeína.<sup>179</sup>

Siguiendo a Lowell Hall y Lemont Kier podemos clasificar los índices en:

1. Índices de Conectividad Molecular<sup>180</sup>: codifican el tamaño, ramificaciones, insaturación, presencia de heteroátomos y ciclos en las moléculas objeto de estudio. Recogen información electrónica a través del recuento de electrones sigma, pi así como de pares libres de electrones.
2. Índices Kappa<sup>177</sup>: representan atributos referentes a la forma de la molécula y se derivan del recuento de los diferentes enlaces sencillos, dobles y triples presentes en las moléculas.

---

<sup>176</sup> a) Balaban, A. T. *Chem Phys Lett.* **1982**, *89*, 399-404. b) Balaban, A. T. *J Mol Struct (Theochem)*. **1988**; *165*, 243-253.

<sup>177</sup> a) Kier, L. B.; Hall, L. H. *J Pharm Sci.* **1976**, *65*, 1806-1809. b) Kier, L. B.; Hall, L. H. *J Pharm Sci.* **1981**, *70*, 583-589. c) Kier, L. B. *Quant Struct-Act Relat.* **1985**, *4*, 109.

<sup>178</sup> Hahn, M., Rogers, D. *J Med Chem.* **1995**, *38*, 2091-2102.

<sup>179</sup> Pogliani, L. *J Phys Chem.* **1995**, *99*, 925-937.

<sup>180</sup> Hall, L.H.; Kier, L.B. "The Molecular Connectivity Chi Indexes and Kappa Shape Indexes in Structure-Property Relations", in *Reviews of Computational Chemistry*, Chap. 9, pp 367-422, Donald Boyd and Ken Lipkowitz, eds., VCH Publishers, Inc. **1991**.

3. Índices del estado electrotopológico<sup>181</sup>: codifican la información referente tanto al entorno topológico de un átomo como la debida a las interacciones electrónicas debidas a la presencia del resto de átomos de la molécula. Permiten caracterizar la polaridad presente en la molécula así como la capacidad de la misma de formar enlaces por puente de hidrógeno

---

<sup>181</sup> Kier, L.B.; Hall, L.H. *Molecular Structure Description: The Electrotopological State*, Academic Press, San Diego **1999**.

### 3.3 Objetivos

A la luz de los antecedentes bibliográficos recogidos y contando con un elenco de productos con potencial biológico de interés, es este capítulo nos proponemos:

1. Realizar en primer lugar un estudio de actividad acaricida de los productos obtenidos. En concreto estudiaremos la mortalidad e inhibición de la fecundidad remanente provocada por nuestros compuestos sobre la especie *Tetranychus urticae*, una plaga que afecta a múltiples cultivos, ocasionando pérdidas económicas cuantiosas.

2. Con aquellas sustancias activas que nos ofrezcan resultados acaricidas relevantes, comparables a sustancias ya comercializadas, se procederá a realizar un estudio preliminar de toxicología, evaluando la DL50 aguda oral, así como reacciones de hipersensibilidad en ratones.

3. Por último se realizará un estudio por topología molecular relacionando las estructuras químicas sintetizadas con la actividad biológica con el objeto de desarrollar un modelo matemático que nos permita predecir la actividad acaricida de nuevos compuestos.

### 3.4 Materiales y Métodos

Los ensayos biológicos de los derivados de uracilo y pirimidinona obtenidos se llevaron a cabo, en los laboratorios del Departamento Entomología Vegetal de la *Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos* de la Universidad Politécnica de Valencia, bajo la asesoría del Dr. Francisco Ferragut. Los ensayos se hicieron sobre la araña roja *Tetranychus urticae*, evaluando la capacidad adulticida e inhibidora de la fecundidad de los compuestos preparados.

#### 3.4.1 Actividad acaricida

Siguiendo una metodología ya descrita en la bibliografía,<sup>182</sup> los preparados de los productos en disolución a ensayar se aplicaron por pulverización en Torre de Potter (Burkard Scientific Ltd<sup>®</sup>, Uxbridge, UK) sobre discos de hoja de judía.

Para conocer el efecto tóxico del producto sobre la muestra de araña roja, se estudió la supervivencia de las hembras y el efecto producido sobre su fecundidad, cuando eran sembradas sobre plantas hojas de judía tratadas. Para ello se compararon los datos obtenidos con los referentes a un testigo o control blanco (agua destilada + mojante + disolvente) y con los referentes a un testigo superior (Tebufenpirad a dosis eficaces).

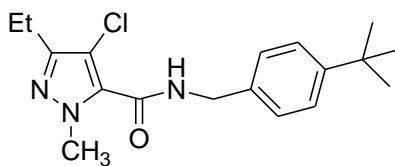
Tebufenpirad es un plaguicida de amplio espectro. Presenta una actividad notable como *ovicida* y *larvicida* en una gran variedad de especies de *insectos*, así como en *ácaros* que afectan a animales y plantas, como *Tetranychus urticae* o *Tetranychus cinnabarinus*, entre otros.<sup>183</sup> Es un compuesto con baja toxicidad en mamíferos (DL<sub>50</sub> aguda, vía oral en rata, 148 mg/Kg, DL<sub>50</sub> aguda, vía cutánea en rata, >4000 mg/Kg, CL<sub>50</sub> aguda, por inhalación, >3,21 mg/l/4h, no produce irritación cutánea primaria, no produce irritación en las mucosas y sin aparente acción sensibilizante). Además, tiene una moderada permanencia en el medio ambiente.

---

<sup>182</sup> a) García-Marí, F.; Roca, D.; Fonbuena, P.; Ferragut, F.; Costa-Comelles, J. *Bol. San. Veg. Plagas*, **1988**, *14*, 163-169.

<sup>183</sup> Okada, I.; Okui, S., *Mitsubishi Chemical Corp.* 1994; US. Patent 4950668; EP 289879.

Tebufenpirad actúa inhibiendo el sistema de transporte electrónico mitocondrial del insecto y, en consecuencia, su respiración.



**Tebufenpirad**

**Figura 3.15**

#### 3.4.1.a Condiciones generales

Los ácaros *T. urticae* se obtuvieron de parcelas de cítricos no tratados. Se multiplicaron en laboratorio, sobre hojas de judía, hasta el momento de realizar los ensayos. Tanto la cría en colonias como los ensayos se llevaron a cabo en cámaras a 20-25° C, 50-80% H.R. y un fotoperiodo de 16 horas de luz (Figura 3.16).

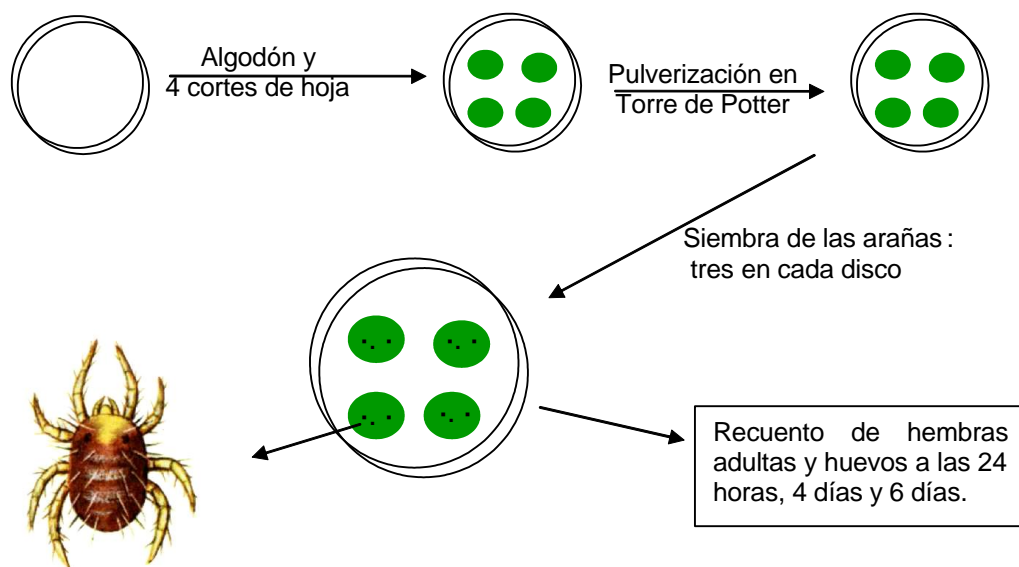


**Figura 3.16**

Los productos empleados fueron Tebufenpirad (Masai) como control acaricida de referencia y los derivados de uracilo y pirimidinona C6 funcionalizados obtenidos mediante síntesis orgánica y referidos en los capítulos 1 y 2 de esta tesis. Además, en todos los ensayos nos servimos de un blanco: un ensayo sin aplicar sustancia activa alguna.

El protocolo consta de cuatro pasos básicos de trabajo (Figura 3.17): 1. Preparación de las microjaulas mediante Placas de Petri, 2. Pulverización de los

preparados mediante Torre de Potter, 3. Siembra de hembras de la especie *Tetranychus urticae* en cada uno de los discos de hoja de judía y 4. Seguimiento del bioensayo y recuento de hembras y huevos.



Esquema del Protocolo de Trabajo

**Figura 3.17**

#### 3.4.1.b Preparación de las disoluciones de producto.

La aplicación de los compuestos a testar (Tebufenpirad, derivados de uracilo y pirimidinona y blanco) se llevó a cabo en forma líquida disolviendo previamente los compuestos en agua destilada a distintas concentraciones, añadiendo una pequeña cantidad de mojante Sandovit no iónico (líquido miscible) en una concentración de un 0.1%.

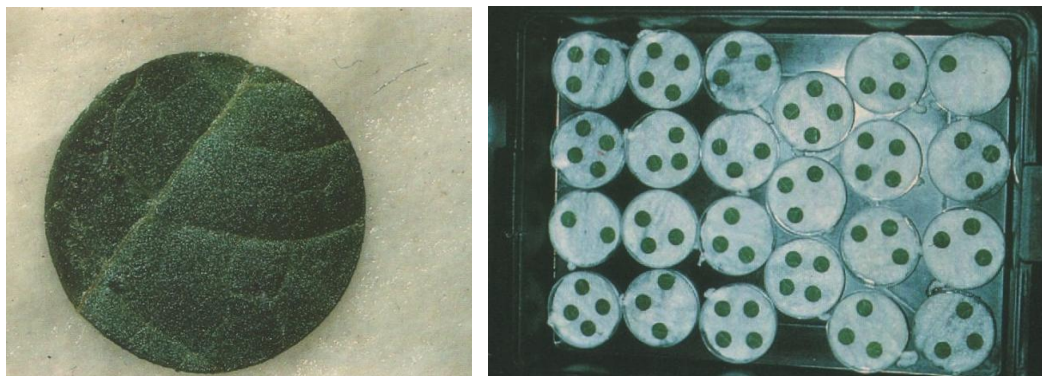
La función del mojante es proporcionar una mayor extensión a cubrir y aumentar la resistencia de los preparados pulverizados a los efectos del viento o de lluvia.

#### 3.4.1.c Placas de Petri como microjaulas de ensayo.

Los bioensayos se realizaron en discos de hoja de judía de 2 cm de diámetro situados a su vez, sobre una base de algodón hidrófilo empapado en agua, todo ello, en placa de Petri de 9 cm de diámetro. En cada placa se colocaron



cuatro discos de hoja con el envés hacia arriba, quedando el haz directamente en contacto con la superficie de algodón humedecido (Figura 3.18).



**Figura 3.18**

Las tapas de las placas de Petri fueron manualmente modificadas practicándoseles una apertura circular en el centro de las mismas de unos 5 cm de diámetro y cubriendo a continuación dichas aperturas con una fina redcilla o tela porosa con el doble fin de permitir, por un lado, el intercambio de aire dentro y fuera de la placa y por otro, evitar la condensación de gotas de agua en el interior de la misma.

#### 3.4.1.d Aplicación de los preparados por pulverización.

Los preparados de los productos en disolución a ensayar se aplicaron por pulverización en Torre de Potter (ver figura 3.19) sobre los discos de hoja de judía, dispuestos como se indicaba en el apartado anterior.



**Figura 3.19**

La torre de Potter cuenta con un pequeño vial de carga en la parte superior de la misma, que conecta con un pulverizador. Las placas de Petri preparadas anteriormente se disponen en la base de la torre y tras definir las condiciones de pulverización y cargar el vial se procede a pulverizar la muestra sobre las placas. Tras cada ensayo, el dispositivo se lava 3 veces con agua destilada para evitar contaminaciones.

La solución acaricida, así como las de los blancos y los controles, se aplicaron a una presión de 100 KPa controlando la cantidad aplicada para que se depositaran 2 mg del producto por cm<sup>2</sup> de superficie tratada.

En cada ensayo se evaluaron cinco derivados de uracilo y pirimidinona, el control Tebufenpirad y un blanco, estudiando la actividad adulticida de los productos testados.

#### 3.4.1.e Siembra de *Tetranychus urticae*

Tras la pulverización, mediante Torre de Potter, de los preparados de los productos sobre los discos de hoja de judía, se dejó un tiempo de espera (30 minutos) durante el que las soluciones aplicadas sobre los discos fueron secándose.

A continuación y con los discos de hoja de judía ya secos, se procedió a la siembra de las hembras adultas, a razón de 3 hembras por disco. Para ello nos servimos de las colonias criadas en las cámaras del laboratorio, seleccionando hembras adultas de apariencia sana, tomadas con pincel modificado manualmente -de dos o tres hebras- y bajo microscopio de 10x aumentos. De este modo, los ensayos nos permiten evaluar el efecto residual de cada disolución sobre la araña roja.

Es aquí donde cobra sentido el algodón humedecido de las placas de Petri, ya que no sólo conserva durante más tiempo los discos de hoja de judía, sino que además, impide que las hembras de araña roja sembradas puedan abandonar libremente el disco en el que han sido sembradas.

Una vez sembradas, todas las placas de Petri sometidas a ensayo se depositan en una bandeja, distantes entre sí, y se introducen en la cámara del laboratorio bajo las condiciones ya descritas.

#### 3.4.1.f Seguimiento del ensayo

Como hemos visto, en cada bioensayo, es decir, en cada placa Petri tratada, se colocaron 3 hembras de araña roja por disco, haciendo un total de 12 hembras por placa. Los resultados de cada bioensayo fueron evaluados tres veces: a las 24 horas, a los 4 días y a los 6 días. Para ello, en cada uno de esos momentos se extrajeron las placas de la cámara procediéndose a continuación, a contabilizar el número de hembras de araña supervivientes en cada disco, así como la cantidad de huevos presentes en los mismos. Todo ello bajo microscopio 10x.

Tras cada recuento hay que proceder a empapar de nuevo el algodón de cada una de las placas de Petri, ya que si bien las condiciones de humedad y temperatura de las cámaras (20-25 °C, 50-80% H.R.) permite que este se mantenga húmedo, acaba secándose si no se toma esta precaución.

A continuación se disponen de nuevo en las bandejas y se introducen en la cámara hasta el siguiente recuento.

#### 3.4.1.g Los datos

En todos los casos la mortalidad encontrada se corrigió mediante la fórmula de Abbot, con el objeto de separar la mortalidad contabilizada y debida al producto de la mortalidad natural.

Fórmula de Abbot:

$$\text{Eficacia (\%)} = 100 \times (m_c - m_t) / m_c$$

Siendo m el promedio de arañas vivas en las placas de Petri, tanto para los ensayos tratados con producto en estudio ( $m_t$ ), como para los controles no tratados o blancos ( $m_c$ ).

El primer estudio se realizó sobre el acaricida de referencia o testigo superior, Tebufenpirad (Masai) con 5 concentraciones diferentes del producto con el objeto de encontrar una concentración que matara paulatinamente a las hembras presentes hasta alcanzar un 100% de mortalidad al cabo de 6 días. Para cada concentración se realizaron tres bioensayos lo que implica un total de 15 bioensayos y 180 hembras de araña roja testadas. La concentración de Tebufenpirad en el preparado Masai es del 20%.

Se realizó el estudio de un total de 20 derivados de uracilo y pirimidinona fluorados y no fluorados, procurando testar cada uno de ellos a dos dosis diferentes y a razón de tres bioensayos por dosis. Estos estudios siempre se acompañaron de un bioensayo de Testigo superior (Tebufenpirad a la concentración idónea) y de un bioensayo de un blanco. Sumados a los ya realizados para encontrar la concentración de referencia de Tebufenpirad hacen un total de unos 130 bioensayos distintos, es decir unas 1500 hembras de araña roja.

Se procedió a realizar un análisis de varianzas de los datos obtenidos. Nos servimos del Test de Levene para examinar la plausibilidad de homoscedaticidad, aplicando el test LSD cuando los datos obtenidos manifestaron homogeneidad en sus varianzas ( $p < 0.05$ ), en tanto que cuando no fue así, esto es, cuando las varianzas difirieron, nos servimos del test de Dunnet T3.<sup>184</sup>

### **3.4.2 Toxicidad**

El manejo de plaguicidas en general y de productos fitosanitarios en la agricultura, en particular, representa un notable beneficio para la sociedad actual, si bien, la aplicación de estos insumos entraña riesgos tóxicos para la salud ya sea en forma accidental o por un manejo inapropiado de los mismos.

Las vías de entrada de estas sustancias en el cuerpo humano pueden ser cualquiera de las clásicas: la dérmica o cutánea, la respiratoria o inhalatoria y la

---

<sup>184</sup> SPSS v. 15 for Windows. SPSS Inc., Chicago, IL (2007).

digestiva u oral. Por ello, seleccionamos dos metodologías para realizar una evaluación básica de la toxicidad dérmica y la toxicidad oral sobre aquellos derivados que mejor actividad acaricida habían mostrado.

Los ensayos toxicológicos de los derivados de uracilo y pirimidinona realizados, se llevaron a cabo en los laboratorios del Departamento de Farmacología de Universidad de Valencia, en el campus de Burjassot, bajo la dirección del Dr. José Luis Ríos.

#### 3.4.2.a Determinación de la dosis oral letal 50 (DL<sub>50</sub>)

Es una prueba clásica e imprescindible ya que aporta información muy valiosa para el futuro de las nuevas moléculas. Las pruebas de toxicidad tienen grandes limitaciones por las diferencias según especie animal, vía de administración, etc. Por definición, DL<sub>50</sub> es la cantidad de producto que produce la muerte del 50% de los animales que la reciben. Se administra por vía intraperitoneal u oral. Las dosis guardan relación entre ellas, siendo crecientes en progresión aritmética o geométrica.<sup>185</sup>

Evaluada mediante el método de Reed y Muench.<sup>186</sup> Se trata de un método gráfico sencillo, basado en el principio de que un animal muerto con una dosis, debe morir con una dosis mayor, y que a su vez, todo superviviente con una dosis lo será también con una dosis más pequeña.

Realizaremos nuestro estudio con grupos de seis ratones, a los que se les suministra por vía oral distintas cantidades de los acaricidas estudiados. Los animales son observados día a día durante una semana, tomando nota de vivos y muertos al cabo de la misma.

---

<sup>185</sup> Esplugues, J; Morcillo, E. *Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico*, Farmacología General, Vol. VII, Valencia, Fundación García Muñoz, 1982.

<sup>186</sup> Reed, L; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. *H. Am. J. Hyg.*, **1938**, 27, 493-497.

Animales.

Ratón albino “Swiss”, hembra, en grupos de seis (Figura 3.20). Peso entre 25-30 g. Alimentados mediante dieta standard, “ad libitum”. Control de Temperatura y ciclo luz/oscuridad (12 horas). Procedimiento experimental y cuidado de animales conforme a la regulación europea vigente (CEE Council 86/609).



**Figura 3.20**

Metodología.

Distribuimos los ratones en grupos de seis asignando a cada grupo un producto y dosis concreta. El estudio se realiza con tres dosis distintas cuya concentración oscila entre 0.5 g/Kg y 2 g/Kg.

Cada dosis se prepara mediante una disolución en una mezcla de agua, etanol y tween, en una proporción de 7/2/1.

Las distintas dosis se administraron “in situ” mediante jeringa y canula, por vía oral, en el estómago del ratón. A razón de 0.2 ml por ratón.

El seguimiento se realizó, hora a hora, durante el primer día tras la administración y, día a día, hasta cumplirse el plazo de una semana. Observamos y tomamos nota de todo efecto manifestado en los ratones: somnolencia, afaxia, nerviosismo, así como de las muertes que se producen. Al final de la experiencia se realiza un recuento de vivos y muertos.

### 3.4.2.b Pruebas de Hipersensibilidad tópica

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado son manifestaciones biológicas de inmunidad mediada por células y juegan un importante papel en la patología y situaciones crónicas de muchos desórdenes inflamatorios. Una de las expresiones más características de este fenómeno es la hipersensibilidad por contacto.<sup>164</sup>

Para evaluar la hipersensibilidad por contacto, nos serviremos de un procedimiento descrito en la bibliografía mediante la inducción de edema en oreja de ratón.<sup>187</sup>

#### Animales

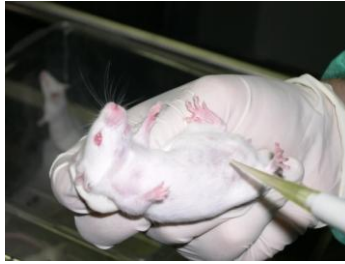
Ratón albino "Swiss", hembra, en grupos de siete. Peso entre 25-30 g. Alimentados mediante dieta standard, "ad libitum". Control de temperatura y ciclo luz/oscuridad (12 horas). Procedimiento experimental y cuidado de los animales de acuerdo a la regulación europea para el uso de animales con fines científicos (CEE Council 86/609).

#### Metodología

Inicialmente se procedió a afeitar el abdomen de las hembras de ratón (día 0). Se dejaron transcurrir 24 horas de intervalo para garantizar la buena cohesión de la piel del animal frente a posibles raspaduras producidas tras el afeitado. Al cabo de estas 24 horas se procedió a la sensibilización de las hembras de ratón por aplicación tópica de 50 µl de una disolución en acetona de los productos a estudiar (al 5%, p/v) sobre el abdomen afeitado de los animales (Figura 3.21), durante dos días consecutivos (días 1 y 2).

---

<sup>164</sup> a) Young, J. M.; De young, L. M. *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation*, Alan R. Liss, New York, 215-231. b) Giner, R.M.; Villalba, M. L.; Recio, M. C.; Máñez, S.; Cerdá-Nicolás, M.; Ríos, J. L. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, 389, 243-253.



**Figura 3.21**

Cuatro días más tarde, es decir, el día 6 del experimento, se aplicó 30  $\mu$ l de la misma disolución en cada una de las orejas de cada ratón, en toda la superficie de las mismas, tanto en la parte interior, como en la exterior (Figura 3.22). A continuación y durante tres días consecutivos se realiza un seguimiento y evaluación de la posible reacción de hipersensibilidad, mediante observación de las orejas de los ratones. En caso de inflamación, ésta se mide con micrómetro.



**Figura 3.22**

#### Protocolo

Día 0: Afeitado del abdomen del animal.

Días 1 y 2: Aplicación de 50  $\mu$ l de una disolución en acetona de los productos a estudiar (al 5%, p/v).

Día 6: Aplicación de 30  $\mu$ l de la misma disolución en cada oreja de cada ratón, en toda la superficie de las orejas, tanto en la parte interior, como en la exterior.



Días 7, 8 y 9: Evaluación de la posible reacción de hipersensibilidad mediante observación de de las orejas de los ratones. Inflamación medida con micrómetro, si procede.

### 3.4.3 Topología molecular

Como vimos en la introducción a este capítulo, mediante la topología molecular podemos desarrollar modelos matemáticos que relacionan estructura y actividad biológica y que a su vez, poseen valor predictivo del comportamiento biológico de nuevos compuestos. Valiéndonos de los resultados obtenidos en el estudio de actividad acaricida de los derivados de uracilo y pirimidinona estudiados se ha desarrollado un modelo matemático que permite predecir la actividad acaricida de nuevos compuestos frente a *Tetranychus urticae*.

#### 3.4.3.a Criterio de actividad

Para desarrollar el modelo matemático contemplamos como criterio de actividad biológica la mortalidad observada en los estudios de actividad acaricida sobre la araña roja. En concreto, se consideró activo el compuesto que con una dosis de 5,0 g/l manifestó en el estudio acaricida una actividad adulticida superior al 50% el sexto día desde el tratamiento. Por el contrario, se consideró inactivo aquél que manifestó una mortalidad del 0 % en las mismas condiciones.

Para la selección de los compuestos activos, no se consideró el mecanismo de acción de los mismos. Tampoco se consideró la información propia de las geometrías 3D. El método resulta más simple y requiere menos tiempo de estudio que otros basados en mecanismos moleculares<sup>188</sup>, descriptores químicos cuánticos<sup>189</sup>, aproximaciones de similitud/disimilitud<sup>190</sup> o modelos 3D-QSAR<sup>191</sup>.

---

<sup>188</sup> Siebel, G. L.; Kollman, P. A. Molecular Mechanics and the Modeling of Drug Structures. Comprehensive Medicinal Chemistry (Vol. IV): Quantitative Drug Design; Hansch, C., Sammes, P. G., Taylor, J. B., Ramsden, C. A., Eds., Pergamon: Oxford, 1990; p 125-138.

<sup>189</sup> Weistein, H.; Osman, R.; Green, J. P., Computer-assisted Drug Design; ACS Symposium Series Olson, E. C., Cristofersen, R. E. Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1979; p 161.

<sup>190</sup> Johnson, M. A.; Maggiora, G. M. Concepts and applications of molecular similarity; John Wiley, Intersciences: New York, 1990.

### 3.4.3.b Softwares e índices topológicos

En primer lugar, todas las estructuras químicas de las que nos servimos en el estudio topológico fueron introducidas y procesadas por el software *ChembiDraw*, versión 11.

Posteriormente se procedió a caracterizar cada uno de los compuestos mediante una selección de índices topológicos obtenidos de dos software diferentes: *Dragon*, versión 5.4<sup>192</sup> y *MolconnZ*, versión 4.0<sup>193</sup>. En concreto, los índices topológicos de los que nos servimos para construir nuestro modelo fueron: a) Hes14<sup>194</sup>, índice que valora el estado electrotopológico del Hidrógeno para átomos de Nitrógeno, b) HNar<sup>195</sup>, índice topológico armónico de Narumi, c) e9, vértices con excentricidad 9 y d) S19, índice del estado electrotopológico para átomos de flúor.

El primero de los modelos se desarrolló con el programa *MolconnZ*, 4.0, un software diseñado para realizar el cálculo de una amplia gama de índices topológicos de una estructura molecular. El modelo se desarrolló sirviéndonos del índice del estado electrotopológico del Hidrógeno Hes14.

El segundo de los modelos elegidos fue diseñado con el programa *Dragon*, 5.4, una aplicación que permite el cálculo de una ingente cantidad de descriptores moleculares. En concreto, en este caso, nos servimos del índice topológico armónico de Narumi, HNar.

Finalmente, el tercero de los modelos se desarrolló con el programa *MolconnZ* y en él nos servimos de dos nuevos índices, e9 y S19 que por correlación multilineal nos permitió obtener un modelo predictivo de la mortalidad de los compuestos estudiados sobre la especie *Tetranychus urticae*.

---

<sup>191</sup> Cramer, R. D., III; Paterson, D. E.; Bunce, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 110, 5959.

<sup>192</sup> Talete s.r.l. *Dragon*. [5.4.2006]. 2007. Milan (Italy). Software

<sup>193</sup> *MolconnZ*, version 4.0; eduSoft, LC: Ashland, VA, 2002. Software

<sup>194</sup> G. E. Kellogg, L. B. Kier, P. Gaillard and L. H. Hall, "The E-State Fields. Applications to 3D QSAR", *J. Comp. Aid. Molec. Des.* **1996**, 10, 513-520,.

<sup>195</sup> Narumi, H. New Topological Indices for Finite and Infinite Systems, *MATCH* (1987), 22, 195-207.

### 3.4.3.c Funciones discriminantes

Existen propiedades cualitativas o categóricas que no están cuantificadas numéricamente, como por ejemplo la presencia o ausencia de actividad biológica (acaricida) en cada uno de los compuestos de un grupo de estudio. En estos casos podemos efectuar el análisis lineal discriminante (ALD). Las funciones de clasificación o discriminantes (DF) se obtienen siguiendo el método paso a paso.

Este método es capaz de clasificar un conjunto de categorías de objetos numéricamente descriptibles, mediante la combinación lineal de variables que mejor predice la categoría a la cual pertenece cada objeto. Como se ha dicho, en nuestro caso utilizamos dos categorías de compuestos: una referenciada como acaricidas adulticidas frente a *Tetranychus urticae* y la otra integrada por moléculas sin actividad contrastada. Estas dos categorías constituyen los grupos de entrenamiento de activos y de inactivos, respectivamente. El software utilizado para el ALD fue BMDP<sup>196</sup> *New System 2 package*, módulo 7M.

El criterio de clasificación fue la mínima distancia de Mahalanobis (distancia de cada uno a la media de todos los casos en cada categoría). Para evaluar la calidad de la función discriminante nos servimos del parámetro  $\lambda$  de Wilks, que comprueba la igualdad entre las medias de grupo para la variable o variables de la función.

La selección de variables se realiza paso a paso, y se basa en el parámetro F de Fisher-Snedecor. En primer lugar, se selecciona aquella variable cuyos promedios para las distintas categorías están más alejados. En las siguientes etapas, se va añadiendo de una en una aquellas variables que contribuyen a una mayor discriminación entre los grupos. Este proceso está guiado por los respectivos valores de F para *entrar* y F para *quitar* las variables (*F to enter*, *F to remove*). El valor de F para una variable indica su importancia estadística en la discriminación entre los grupos, es decir, es una medida de hasta qué punto una variable aporta una contribución única para clasificar a los miembros del grupo. En general, el algoritmo continuará escogiendo variables para ser incluidas en el modelo si su respectivo valor de F es mayor que el especificado para entrar (*F to*

---

<sup>196</sup> Dixon WJ. (1990) BMDP Statistical Software; University of California: Berkeley, CA.

enter). Por el contrario, excluirá aquellas variables cuya importancia estadística sea menor que el valor de F especificado para quitarlas (F to remove).

#### 3.4.3.d Diagramas de distribución (PDDs)

Los diagramas de distribución de actividad farmacológica (PDD) – de actividad acaricida en nuestro caso- son representaciones parecidas a histogramas que aportan información sobre la eficacia de una función de clasificación. Además, nos permiten visualizar las funciones de regresión multilineal que pueden actuar como funciones limitantes, así como los intervalos de valores de las mismas en los que se pueden definir zonas de actividad biológica. Llamamos propiedades limitantes a aquellas cuyas ecuaciones de predicción pueden emplearse como funciones de clasificación.<sup>197</sup>

Dado un intervalo arbitrario de una función de clasificación, podemos definir en él una expectativa (probabilidad) de actividad como:

$$E_a = a/(i+1)$$

Siendo:

a = compuestos activos en el intervalo/compuestos activos totales

i = compuestos inactivos en el intervalo/compuestos inactivos totales

Análogamente, definimos la expectativa de inactividad en un intervalo arbitrario como:

$$E_i = i/(a+1)$$

Cuando una función topológica representa una propiedad limitante, la expectativa de actividad,  $E_a$ , adquiere la forma de una distribución, y la expectativa de inactividad,  $E_i$ , tiende a cero bajo esa curva, de modo que su solapamiento es mínimo.

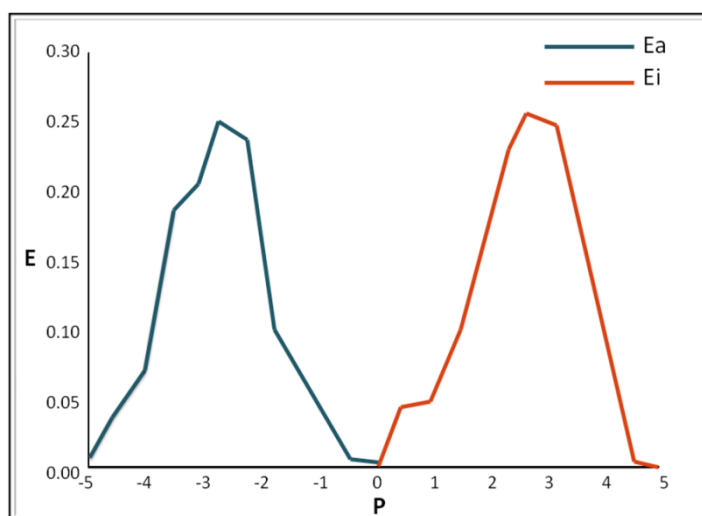
La principal utilidad de estos diagramas es que sirven para encontrar propiedades limitantes, y permiten determinar visualmente aquellos intervalos de la propiedad donde la probabilidad de encontrar nuevos compuestos activos sea

---

<sup>197</sup> Galvez J, Garcia-Domenech R, de Gregorio Alapont C, de Julian-Ortiz JV, Popa L, *J Mol Graph*, **1996**, 14: 272–276. *Pharmacological distribution diagrams: a tool for de novo drug design*.

máxima, en relación con la posibilidad de hallar *falsos positivos*, entendiendo por tales aquellos compuestos que son seleccionados como antituberculosos sin que realmente posean dicha actividad.

La siguiente figura ilustra un diagrama de distribución de actividad farmacológica “ideal”, donde no hay solapamiento entre  $E_a$  y  $E_i$ , y donde puede observarse que la máxima probabilidad para encontrar compuestos activos estaría comprendida en el intervalo  $0 < P < 5$ .



**Figura 3.23**

#### 3.4.3.e Regresión multilineal (MLR)

El análisis por regresión multilineal permite en nuestro estudio predecir la que habría de ser la mortalidad (%) de acaricidas potenciales en adultos de araña roja al sexto día de la aplicación (monodosis).

Para desarrollar esta herramienta predictiva se realizó la correlación entre los índices topológicos calculados y los valores de log M observados en trece de nuestros compuestos. El análisis de regresión multilineal se llevó a cabo con el módulo 9R del programa BMDP del Software MolconnZ 4.0. Como criterio de selección de variables se utiliza el algoritmo de Furnival-Wilson, el cual es capaz de identificar adecuadamente las series, mientras calcula una pequeña parte de las ecuaciones de regresión posibles.

La estabilidad del modelo matemático elegido puede evaluarse mediante un estudio de estabilidad, también llamado de validación cruzada. Consiste en

eliminar un compuesto del conjunto con su correspondiente propiedad, y se vuelve a correlacionar utilizando como grupo de entrenamiento el conjunto de  $N - 1$  compuestos y las mismas variables obtenidas con el conjunto inicial, prediciendo el valor de la propiedad del compuesto eliminado. El proceso se repite tantas veces como compuestos formen el grupo. Las ecuaciones obtenidas deben ser similares a la original, en cuyo caso ésta se considera estable.

## 3.5 Resultados

### 3.5.1. Actividad acaricida

Del conjunto de derivados de uracilo y pirimidinona obtenidos mediante síntesis orgánica, como se vio en los Capítulos 1 y 2, se hizo una selección de una treintena de productos finales. En todos ellos se procedió a estudiar la actividad adulticida e inhibidora de fecundidad sobre la plaga *Tetranychus urticae*.

Para ello se seleccionó como testigo superior Tebufenpirad (Masai), un plaguicida de amplio espectro que, como se ha dicho, presenta una eficaz actividad como *ovicida* y *larvicida* en gran variedad de especies de *insectos*, así como en *ácaros*, incluyendo especies como *Tetranychus urticae* o *Tetranychus cinnabarinus*, entre otros.

3.5.1.a Estudio y selección de la concentración del testigo superior (Tebufenpirad).

En una primera etapa se realizó un estudio del testigo superior (Tabla 3.1) con el ánimo de encontrar una concentración de producto que resultara eficaz y comparable: con una mortalidad sobre hembras adultas y una inhibición de la fecundidad elevados (80-90%).

**Tabla 3.1:** Estudio de la acción de diversas concentraciones de Tebufenpirad sobre *Tetranychus urticae*, Koch.

Teb. (g/l)	Ensayos	$\bar{x}_1$ hb/d	$\bar{x}_1$ hv/d	$\bar{x}_2$ hb/d	$\bar{x}_2$ hv/d	$\bar{x}_3$ hb/d	$\bar{x}_3$ hv/d
<b>0,05</b>	n3/p36	2,8	4,8	2,0	8,2	1,0	8,1*
<b>0,40</b>	n3/p36	2,2	0,7	1,8	0,6	0,6	0,5
<b>0,60</b>	n3/p36	2,0	0,5	1,3	0,4	0,4	0,3
<b>1,50</b>	n20/p240	1,3	0,3	0,7	0,1	0,2	0,0
<b>5,00</b>	n3/p36	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>H<sub>2</sub>O</b>	n20/p240	2,9	10,7	2,2	16,8	1,2	21,2*

\* Media teórica de huevos por disco de judía, en la práctica el dato corresponde a la suma de la media de huevos hallados por disco más la media de larvas que ya han eclosionado.

Seleccionamos cinco concentraciones diferentes de Tebufenpirad: 0,05 g/l; 0,40 g/l; 0,60 g/l; 1,50 g/l; 15,00 g/l. Lo que implicó realizar 18 bioensayos y un total

de 216 hembras de araña roja adulta estudiadas. Los resultados obtenidos se recogen en tabla anterior (Tabla 3.1).

Donde:

- $n$  representa el número de bioensayos realizados. Como hemos visto, en cada bioensayo –cada placa de Petri- colocábamos 4 discos de hoja de judía con 3 hembras de *Tetranychus urticae* en cada disco, lo que viene representado por  $p$ .

- $p$  indica el número total de arañas testadas. Así, en cada disco hoja de judía sembramos 3 arañas. A razón de 4 discos de hoja de judía por placa y con tres bioensayos totales, hace un total de 36 arañas. Tanto en la tabla 3.1, como en las sucesivas exposiciones de resultados, los datos referentes al testigo control blanco (sin producto activo) y a la dosis de Tebufenpirad finalmente elegida (1,5 g/l) recogen los recuentos y medias globales, es decir los recogidos a lo largo de todos los experimentos realizados, ya que, como controles, estuvieron presentes en todos ellos.

- $\bar{x}_1$  hb/d indica la media de hembras de araña roja por disco a las 24 horas (subíndice 1).

- $\bar{x}_1$  hv/d indica la media de huevos de araña roja por disco a las 24 horas (subíndice 1).

- $\bar{x}_2$  hb/d indica la media de hembras de araña roja por disco a los 4 días de experimento (subíndice 2).

- $\bar{x}_2$  hv/d indica la media de huevos de araña roja por disco a los 4 días de experimento (subíndice 2).

- $\bar{x}_3$  hb/d indica la media de hembras de araña roja por disco a los 6 días de experimento (subíndice 3).



- $\bar{x}_3$  hv/d indica la media de huevos de araña roja por disco a los 4 días de experimento (subíndice 3).

Como podemos observar en la Tabla 3.1, la concentración correspondiente a 15,0 g/l de Tebufenpirad está ocasionando la muerte de todas las arañas rojas testadas a lo largo de todo el ensayo, con una eficacia ciertamente máxima ( $x_{1,2,3}$  hb/d = 0,0). Además e igualmente, no se observan huevos ( $x_{1,2,3}$  hv/d = 0,0). Una dosis diez veces menor (1,5 g/l) se queda en un intervalo interesante: así a los 6 días es capaz de ocasionar la muerte de prácticamente todas las arañas presentes ( $x_3$  hb/d = 0,2), inhibiendo totalmente la fecundidad ( $x_3$  hv/d = 0,0).

Aplicando la fórmula de Abbot obtenemos los datos correspondientes a la Eficacia adulticida (E%) y a la inhibición de fecundidad (IF%) que las diferentes concentraciones de Tebufenpirad están ocasionando en nuestros ensayos (Tabla 3.2).

Fórmula de Abbot:

$$\text{Eficacia (\%)} = 100 \times (m_c - m_t) / m_c$$

**Tabla 3.2:** Estudio de la eficacia adulticida e inhibición de la fecundidad de diversas concentraciones de Tebufenpirad sobre *Tetranychus urticae*, Koch.

Teb. (g/l)	Ensayos	E <sub>1</sub> (%)	IF <sub>1</sub> (%)	E <sub>2</sub> (%)	IF <sub>2</sub> (%)	E <sub>3</sub> (%)	IF <sub>3</sub> (%)
<b>0,05</b>	n3/p36	3,4	55,1	9,1	51,2	16,7	61,8*
<b>0,40</b>	n3/p36	24,1	93,5	18,2	96,4	50,0	97,6
<b>0,60</b>	n3/p36	31,0	95,3	40,9	97,6	66,7	98,6
<b>1,50</b>	n20/p240	32,6	97,3	69,7	99,5	81,1	99,8
<b>5,00</b>	n3/p36	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

\* Para el cálculo se tomó tanto los huevos como las larvas presentes.

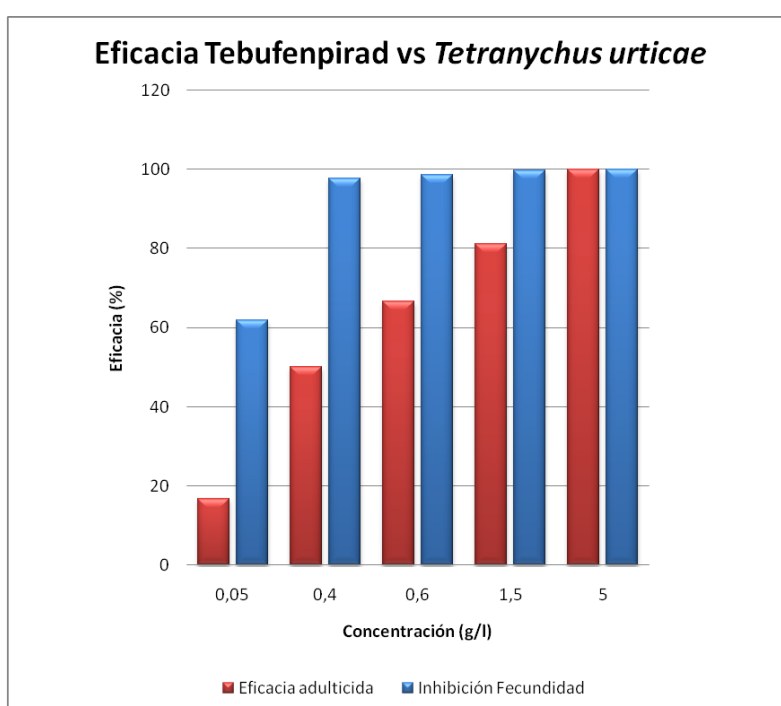
Donde:

- E indica la eficacia de Tebufenpirad debida a su mortalidad sobre las hembras adultas en tanto por ciento.

- IF corresponde a la inhibición de la fecundidad, debida a la influencia del producto sobre la puesta de huevos y viene expresada en tanto por ciento.

- Los subíndices 1,2 y 3 se corresponden con los momentos de observación y recuento, a saber: 1 día, 4 días y 6 días. Así, por ejemplo M<sub>1</sub> corresponde a la mortalidad al cabo de 24 horas.

Los resultados de las diversas concentraciones de Tebufenpirad en el sexto día del experimento quedan reflejados en el siguiente gráfico:



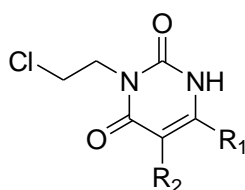
**Figura 3.23**

De acuerdo a los resultados obtenidos seleccionamos como testigo superior para nuestros experimentos Tebufenpirad a la concentración de 1,5 g/l, con una eficacia adulticida de 81,1% y una capacidad de inhibir la fecundidad de las hembras de *Tetranychus urticae* de 99,8%, en el sexto día de los bioensayos.

3.5.1.b Estudio de la actividad adulticida e inhibitoria de la fecundidad de derivados de uracilo no fluorados.

La selección de los compuestos a testar fue paulatina y acorde a los resultados que se iban obteniendo. Dado que los derivados fluorados iban manifestando, en términos generales, una actividad biológica de interés mayor que los no fluorados. El grupo de derivados de uracilo y pirimidinona fluorados estudiados resultó finalmente más numeroso que el de los no fluorados.

Los derivados de uracilo no fluorados tienen, todos, una estructura similar:



**Figura 3.24**

Se estudiaron cinco derivados no fluorados de uracilo, que vienen recogidos en la siguiente tabla (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3** Derivados de uracilo no fluorados seleccionados para los bioensayos

Entrada	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>8b</b>	Ph	H
<b>8c</b>	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H
<b>8e</b>	Ph	Cl
<b>8f</b>	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Cl
<b>8g</b>	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Br

Las entradas **8e**, **8f** y **8g** corresponden a derivados de uracilo no obtenidos en el primer capítulo. Estos productos habían sido sintetizados anteriormente por el Dr. Julio Piera<sup>30</sup> en nuestro grupo de trabajo.

Los resultados del estudio de actividad adulticida e inhibidora de la fecundidad de estos derivados se recogen en la tabla 3.4. Se realizaron 14 bioensayos totales, lo que supone un estudio sobre 168 hembras de araña roja.

**Tabla 3.4** Estudio de la acción de diversos derivados de uracilo no fluorados sobre la especie *Tetranychus urticae*.

Entr.	[g/l]	Ens.	$\bar{x}_1$ hb/d	$\bar{x}_1$ hv/d	$\bar{x}_2$ hb/d	$\bar{x}_2$ hv/d	$\bar{x}_3$ hb/d	$\bar{x}_3$ hv/d
<b>8b</b>	5,0	n3/p36	2,3	0,8	1,8	3,0	1,6	6,1
<b>8c</b>	5,0	n3/p36	2,9	9,3	2,3	27,0	1,6	28,0
<b>8e</b>	5,0	n3/p36	2,8	4,3	1,5	5,6	0,3	5,6
<b>8f</b>	5,0	n3/p36	2,8	6,8	2,3	11,3	1,7	11,3
<b>8g</b>	5,0	n3/p36	2,5	2,5	2,0	3,3	1,0	3,5
<b>Tebuf.</b>	1,5	n20/p240	1,9	0,3	0,7	0,1	0,3	0,04
<b>Tebuf.</b>	5,00	n3/p36	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>H<sub>2</sub>O</b>	---	n20/p240	2,9	10,7	2,2	16,8	1,5	21,2*

\* Media teórica de huevos por disco de judía, en la práctica el dato corresponde a la suma de la media de huevos hallados por disco más las la media de larvas que ya han eclosionado.

Si aplicamos la fórmula de Abbot obtenemos los datos correspondientes a la eficacia adulticida (E%) y a la inhibición de fecundidad (IF %), Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.1** Estudio de la Actividad adulticida de diversos derivados de uracilo no fluorados sobre la especie *Tetranychus urticae*.

Producto	Mortalidad adultos			Eficacia adult. día 6 (%) <sup>a</sup>
	Día 1	Día 4	Día 6	
<b>Tebufenpirad</b>	100.0 (±0.0) <sup>b</sup>	100.0 (±0.0) <sup>c</sup>	100.0 (±0.0) <sup>c</sup>	100.0
<b>8b</b>	25.0 (±14.4)	38.9 (±12.7) <sup>c</sup>	47.2 (±12.7)	0.0
<b>8c</b>	2.8 (±4.8)	25.0 (±8.3)	47.2 (±9.6)	0.0
<b>8e</b>	8.3 (±8.3)	50.0 (±8.3) <sup>c</sup>	88.9 (±12.7) <sup>c</sup>	79.0
<b>8f</b>	8.3 (±8.3)	25.0 (±8.3)	44.4 (±12.7)	0.0
<b>8g</b>	16.7 (±8.3)	33.3 (±8.3)	66.7 (±8.3) <sup>c</sup>	33.3
<b>Control</b>	4.2 (±4.6)	26.4 (±8.2)	48.6 (±12.3)	-
a. Obtenido aplicando la Fórmula de Abbott				
b. Significativamente diferente vs Control (p < 0.05; test T3 de Dunnett).				
c. Significativamente diferente vs Control (p < 0.05; test DMS).				

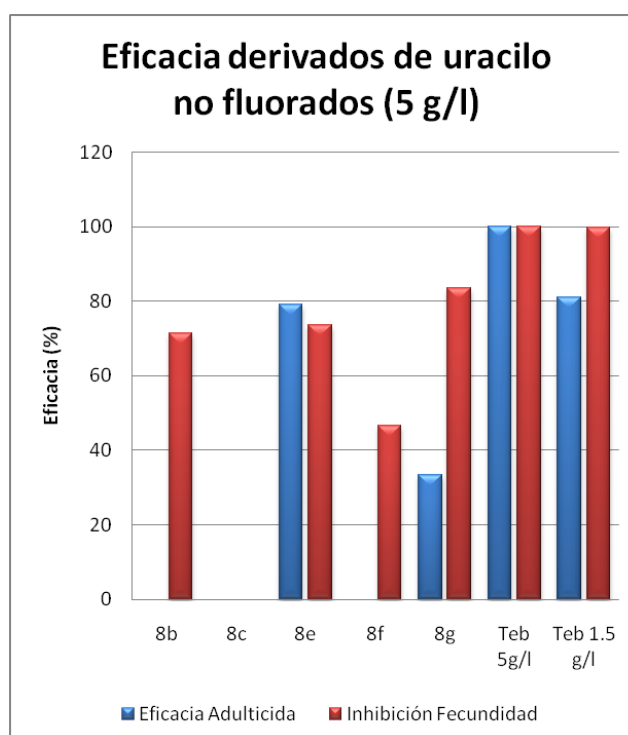
**Tabla 3.5.2** Estudio de la Inhibición de la Fecundidad inducida por diversos derivados de uracilo no fluorados sobre la especie *Tetranychus urticae*.

Producto	Puesta de huevos	
	Huevos por ensayo ( $\pm$ SE)	Inhibición Fec. día 6 (%) <sup>a</sup>
<b>Tebufenpirad</b>	0.0 ( $\pm$ 0.0) <sup>b</sup>	100.0
<b>8b</b>	24.3 ( $\pm$ 7.0) <sup>b</sup>	84.9
<b>8c</b>	105.0 ( $\pm$ 14.7)	0.0
<b>8e</b>	22.3 ( $\pm$ 6.0) <sup>b</sup>	73.5
<b>8f</b>	45.3 ( $\pm$ 13.1)	46.7
<b>8g</b>	14.0 ( $\pm$ 2.6) <sup>b</sup>	84.9
<b>Control</b>	84.8 ( $\pm$ 17.3)	-

a. Obtenido aplicando la Fórmula de Abbott  
b. Significativamente diferente vs Control ( $p < 0.05$ ; test T3 de Dunnett).

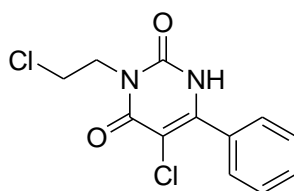
Como vemos en las Tablas 3.5.1 y 3.5.2 los derivados de uracilo estudiados dieron, en general, pobres resultados como adulticidas, si bien sí manifestaron, cierta capacidad para inhibir parcialmente la fecundidad.

Si presentamos ahora la eficacia observada el sexto día del experimento, en un gráfico de columnas agrupadas, obtenemos:



**Figura 3.25**

El derivado de uracilo correspondiente a la entrada **8e** (Figura 3.22) fue el que mejores resultados dio (5,0 g/l; 79,0% Eficacia adulticida a los 6 días; 73,5% de Inhibición de la Fecundidad a los 6 días), con una eficacia e inhibición de la fecundidad por encima del 70% al cabo de seis días de experimento, eso sí, a una concentración de producto 3,3 veces superior a la del Tebufenpirad de referencia (1,5 g/l; 79,0% Mortalidad a los 6 días; 100,0% de Inhibición de la Fecundidad a los 6 días).

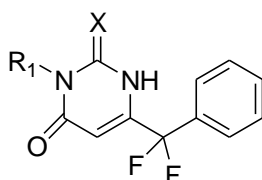


**Figura 3.26**

3.5.1.c Estudio de la actividad adulticida e inhibitoria de la fecundidad de derivados de uracilo y pirimidinona fluorados.

El estudio de los derivados de uracilo y pirimidinona fluorados se realizó en tres tandas de ensayos con una dosis de cuatro o cinco derivados fluorados en cada una de ellas. De cada uno de los compuestos testados se realizó un estudio acaricida a dos dosis diferentes: 5 g/l y 1,5 g/l, a razón de tres bioensayos por producto y dosis.

Los derivados de uracilo fluorados estudiados tienen la siguiente estructura común:



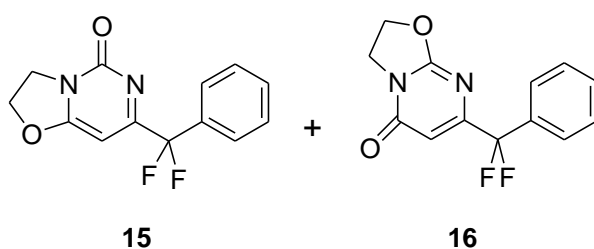
**Figura 3.27**

Se estudiaron trece derivados fluorados de uracilo, que vienen recogidos en la siguiente tabla (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6** Derivados de uracilo fluorados seleccionados para los bioensayos

Entrada	R <sub>1</sub>	X
17a	<i>p</i> -F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
17b	<i>m</i> -CF <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
17c	CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	O
17d	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	O
17e	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S
17f	<i>p</i> -CF <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
17g	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
17h	2,4,6 triclorofenilo	O
17i	2,4,6 trifluorofenilo	O
17j	2,4,6 tribromofenilo	O
17k	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl	O
17l	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	O
18b	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	O

Además se estudió la actividad acaricida de los derivados de oxazolopirimidinona **15** y **16**, tomados como mezcla isomérica sin separar (ver figura 3.28).



**Figura 3.28**

El conjunto de los datos obtenidos tanto de la actividad adulticida como de la inhibidora de la fecundidad de estos derivados se recogen en la tabla 3.7. Se llevaron a cabo un total de 90 bioensayos, trabajando con 1100 hembras adultas de *Tetranychus urticae*, Koch.

**Tabla 3.7** Estudio de la acción de diversos derivados de uracilo fluorados sobre la especie *Tetranychus urticae*.

Entr.	[g/l]	Ens.	$\bar{x}_1$ hb/d	$\bar{x}_1$ hv/d	$\bar{x}_2$ hb/d	$\bar{x}_2$ hv/d	$\bar{x}_3$ hb/d	$\bar{x}_3$ hv/d
17a	5,0	n3/p36	2,8	5,3	1,8	23,0	1,6	35,3
17a	1,5	---	---	---	---	---	---	---
17b	5,0	n3/p36	2,5	6,8	2,2	45,5	1,6	71,6
17b	1,5	---	---	---	---	---	---	---
17c	5,0	n3/p36	2,8	6,8	1,2	11,0	0,6	15,6
17c	1,5	n3/p36	2,9	4,8	1,7	11,1	1,0	11,2
17d	5,0	n3/p36	2,8	5,5	1,5	13,0	0,8	13,8
17d	1,5	n3/p36	2,7	5,5	1,8	15,5	0,8	16,1
17e	5,0	n3/p36	2,9	18,0	2,3	77,1	0,9	77,0
17e	1,5	---	---	---	---	---	---	---
17f	5,0	n3/p36	2,2	3,5	0,2	3,2	0,1	3,3
17f	1,5	n3/p36	2,0	1,5	0,4	2,3	0,2	3,3
17g	5,0	n3/p36	2,5	4,8	1,2	5,9	0,7	8,8
17g	1,5	n3/p36	2,4	1,8	1,5	5,8	0,7	6,7
17h	5,0	n3/p36	2,6	4,3	0,5	9,5	0,4	11,8
17h	1,5	n3/p36	2,6	7,6	1,2	13,9	0,5	15,1
17i	5,0	n3/p36	2,4	5,5	0,1	6,3	0,1	7,3
17i	1,5	n3/p36	2,5	3,8	0,2	4,3	0,2	4,5
17j	5,0	n3/p36	3,0	10,2	2,3	56,8	1,6	116,8
17j	1,5	---	---	---	---	---	---	---
17k	5,0	n3/p36	2,9	4,7	2,0	5,8	0,8	6,0
17k	1,5	n3/p36	2,6	4,1	1,6	4,8	0,7	5,6
17l	5,0	n3/p36	2,5	4,5	1,9	13,7	0,9	19,2
17l	1,5	n3/p36	2,8	4,8	1,8	14,1	1,2	19,6
18b	5,0	n3/p36	2,9	4,0	2,3	8,5	1,4	10,4
18b	1,5	n3/p36	2,8	6,3	2,3	9,0	1,6	12,2
15, 16	5,0	n3/p36	3,0	18,2	2,4	94,3	1,7	127,4
15, 16	1,5	---	---	---	---	---	---	---
Tebuf.	1,5	n20/p240	1,9	0,3	0,7	0,1	0,3	0,04
Tebuf.	5,00	n3/p36	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
H <sub>2</sub> O	---	n20/p240	2,9	10,7	2,2	16,8	1,5	21,2*

\* Media teórica de huevos por disco de judía, en la práctica el dato corresponde a la suma de la media de huevos hallados por disco más las la media de larvas que ya han eclosionado.

Si nos fijamos en la tabla anterior hay varios datos que llaman la atención en uno u otro sentido. Así, vemos un grupo de derivados (**17f, 17g, 17h, 17i y 17k**)



que están disminuyendo notablemente tanto el número de hembras adultas vivas, como el de huevos por disco.

Sin embargo, y en el sentido opuesto también observamos un grupo de derivados que están ocasionando un aumento, cuando menos aparente, de la fecundidad (**17b**, **17e**, **17j** y la mezcla de isómeros **15** y **16**).

Si aplicamos, ahora, la fórmula de Abbot, obtenemos los datos correspondientes a la eficacia adulticida (E%) y a la inhibición de fecundidad (IF %), primero a la dosis de 5.0 g/l (Tablas 3.8.) y a continuación a la dosis de 1.5 g/l (Tablas 3.9).

**Tabla 3.8.1** Estudio de Actividad adulticida de diversos derivados de uracilo fluorados sobre la especie *Tetranychus urticae* a una dosis de 5 g/l.

Producto	Mortalidad hembras adultas			Eficacia adult. día 6 (%) <sup>a</sup>
	Día 1	Día 4	Día 6	
<b>Tebufenpirad</b>	100.0 (±0.0) <sup>b</sup>	100.0 (±0.0) <sup>c</sup>	100.0 (±0.0) <sup>c</sup>	100.0
<b>17a</b>	5.6 (±4.8)	38.9 (±4.8) <sup>c</sup>	47.2 (±9.6)	0.0
<b>17b</b>	16.7 (±8.3)	27.8 (±9.6)	47.2 (±4.8)	0.0
<b>17c</b>	5.6 (±4.8)	61.1 (±4.8) <sup>c</sup>	80.6 (±12.7) <sup>c</sup>	64.9
<b>17d</b>	5.6 (±9.6)	50.0 (±8.3) <sup>c</sup>	75.0 (±8.3) <sup>c</sup>	50.9
<b>17e</b>	2.8 (±4.8)	25.0 (±8.3)	69.4 (±9.6) <sup>c</sup>	42.2
<b>17f</b>	27.8 (±4.8)	94.4 (±4.8) <sup>c</sup>	97.2 (±4.8) <sup>c</sup>	93.0
<b>17g</b>	16.7 (±16.7)	61.1 (±4.8) <sup>c</sup>	77.8 (±4.8) <sup>c</sup>	57.9
<b>17h</b>	13.9 (±12.7)	83.3 (±8.3) <sup>c</sup>	86.1 (±4.8) <sup>c</sup>	71.9
<b>17i</b>	19.4 (±9.6)	97.2 (±4.8) <sup>c</sup>	97.2 (±4.8) <sup>c</sup>	93.0
<b>17j</b>	0.0 (±0.0)	22.2 (±12.7)	47.2 (±9.6)	0.0
<b>17k</b>	2.8 (±4.8)	33.3 (±14.4)	72.2 (±9.6) <sup>c</sup>	43.9
<b>17l</b>	16.7 (±8.3)	36.1 (±12.7)	69.4 (±12.7) <sup>c</sup>	36.8
<b>18b</b>	2.8 (±4.8)	25.0 (±8.3)	52.8 (±4.8)	8.3
<b>15/16</b>	0.0 (±0.0)	19.4 (±4.8)	44.4 (±12.7)	0.0
<b>Control</b>	4.2 (±4.6)	26.4 (±8.2)	48.6 (±12.3)	-
a. Obtenido aplicando la fórmula de Abbott.				
b. Significativamente diferente vs. Control (p < 0.05; test T3 de Dunnett).				
c. Significativamente diferente vs. Control (p < 0.05; test DMS).				

**Tabla 3.8.2** Estudio de Inhibición de la Fecundidad de diversos derivados de uracilo fluorados sobre la especie *Tetranychus urticae* a una dosis de 5 g/l.

Producto	Puesta de Huevos	
	Huevos por ensayo ( $\pm$ SE)	Inhibición Fec. (%) <sup>a</sup>
<b>Tebufenpirad</b>	0.0 ( $\pm$ 0.0) <sup>b</sup>	100.0
<b>17a</b>	128.3 ( $\pm$ 28.6)	0.0
<b>17b</b>	153.0 ( $\pm$ 34.1)	0.0
<b>17c</b>	62.3 ( $\pm$ 9.6)	26.5
<b>17d</b>	55.0 ( $\pm$ 7.5)	35.3
<b>17e</b>	( $\pm$ 15.0) <sup>b</sup>	0.0
<b>17f</b>	13.0 ( $\pm$ 2.6) <sup>b</sup>	84.7
<b>17g</b>	35.3 ( $\pm$ 9.4)	44.2
<b>17h</b>	47.0 ( $\pm$ 8.5)	44.6
<b>17i</b>	29. ( $\pm$ 8.9) <sup>b</sup>	65.9
<b>17j</b>	157,3 ( $\pm$ 35.1)	0.0
<b>17k</b>	24.0 ( $\pm$ 8.0) <sup>b</sup>	71.9
<b>17l</b>	76.7 ( $\pm$ 8.6)	9.6
<b>18b</b>	41.7 ( $\pm$ 6.7)	50.9
<b>15/16</b>	169.7 ( $\pm$ 37.0)	0.0
<b>Control</b>	84.8 ( $\pm$ 17.3)	-

a. Obtenido aplicando la fórmula de Abbott.

b. Significativamente diferente vs. Control ( $p < 0.05$ ; test T3 de Dunnett).

Como se ha dicho, obtenidos estos datos de actividad acaricida sobre *Tetranychus urticae* a la dosis de 5.0 g/l, se seleccionaron aquellos derivados fluorados que manifestaron mejor actividad acaricida y se procedió al estudio de la misma a una dosis inferior (1.5 g/l). Los resultados obtenidos en esta nueva tanda de ensayos se recoje en las siguientes tablas.

**Tabla 3.9.1** Estudio de Actividad adulticida de diversos derivados de uracilo fluorados sobre la especie *Tetranychus urticae* a una dosis de 1.5 g/l.

Producto	Mortalidad hembras adultas			Eficacia adulticida, día 6 (%) <sup>a</sup>
	Día 1	Día 4	Día 6	
<b>Tebufenpirad</b>	56.9 (±4.8) <sup>b</sup>	77.8 (±4.8) <sup>b</sup>	90.3 (±8.3) <sup>b</sup>	81.1
<b>1h</b>	2.8 (±4.8)	44.4 (±12.7) <sup>b</sup>	66.7 (±8.3) <sup>b</sup>	35.2
<b>1i</b>	11.1 (±4.8)	41.7 (±14.4)	75.0 (±8.3) <sup>b</sup>	51.4
<b>1k</b>	33.3 (±8.3) <sup>b</sup>	86.1 (±4.8) <sup>b</sup>	94.4 (±4.8) <sup>b</sup>	89.2
<b>1l</b>	19.4 (±9.6) <sup>b</sup>	50.0 (±16.7) <sup>b</sup>	77.8 (±9.6) <sup>b</sup>	56.8
<b>1m</b>	13.9 (±4.8) <sup>b</sup>	61.1 (±4.8) <sup>b</sup>	83.0 (±8.3) <sup>b</sup>	67.6
<b>1n</b>	16.7 (8.3) <sup>b</sup>	94.4 (±4.8) <sup>b</sup>	94.4 (±4.8) <sup>b</sup>	89.2
<b>1p</b>	13.9 (±4.8) <sup>b</sup>	47.2 (±12.7) <sup>b</sup>	72.2 (±4.8) <sup>b</sup>	46.0
<b>1q</b>	5.6 (±4.8)	41.7 (±14.4)	61.1 (±9.6) <sup>b</sup>	24.4
<b>1r</b>	5.6 (±4.8)	25.0 (±16.7)	47.2 (±9.6)	0.0
<b>Control</b>	4.2 (±4.6)	26.4 (±8.2)	48.6 (±12.3)	-
a. Obtenido aplicando la fórmula de Abbott.				
b. Significativamente diferente vs. Control (p < 0.05; test DMS).				

**Tabla 3.9.2** Estudio de Inhibición de la Fecundidad de diversos derivados de uracilo fluorados sobre la especie *Tetranychus urticae* a una dosis de 1.5 g/l.

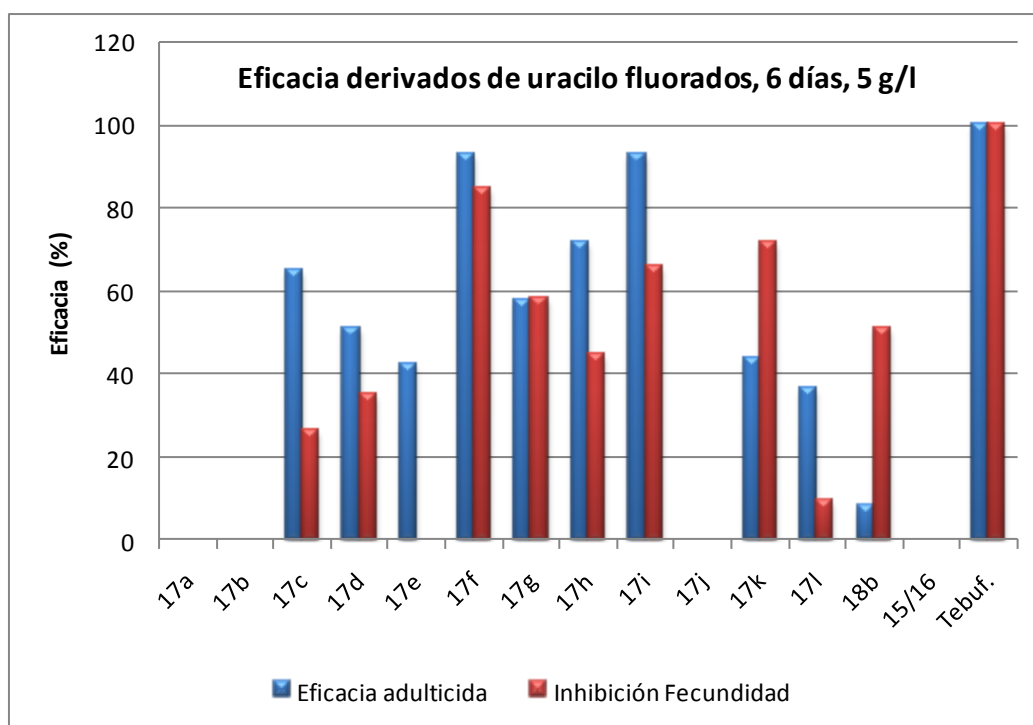
Producto	Puesta de Huevos	
	Huevos por ensayo (±SE)	Inhibición de la fecundidad (%) <sup>a</sup>
<b>Tebufenpirad</b>	0.2 (±0.6) <sup>b</sup>	99.8
<b>1h</b>	44.7 (±10.3) <sup>b</sup>	47.1
<b>1i</b>	64.3 (±9.7) <sup>b</sup>	24.1
<b>1k</b>	13.0 (±3.0) <sup>b</sup>	84.7
<b>1l</b>	26.7 (±10.0) <sup>b</sup>	68.6
<b>1m</b>	60.3 (±10.0) <sup>b</sup>	28.9
<b>1n</b>	18.0 (±7.0) <sup>b</sup>	78.8
<b>1p</b>	22.3 (±9.6) <sup>b</sup>	73.7
<b>1q</b>	78.3 (±18.2)	7.6
<b>1r</b>	48.7 (±9.5) <sup>b</sup>	42.6
<b>Control</b>	84.8 (±17.3)	-
a. Obtenido aplicando la fórmula de Abbott.		
b. Significativamente diferente vs. Control (p < 0.05; test DMS).		

Si observamos las tablas anteriores (Tablas 3.9), dos productos (**17f** y **17i**) están actuando con una gran eficacia sobre las hembras de *Tetranychus urticae*

manifestando una eficacia adulticida e inhibitoria de la fecundidad, comparable a la del testigo superior. Otros tres productos (**17g**, **17h** y **17k**) manifiestan una actividad de cierta consideración.

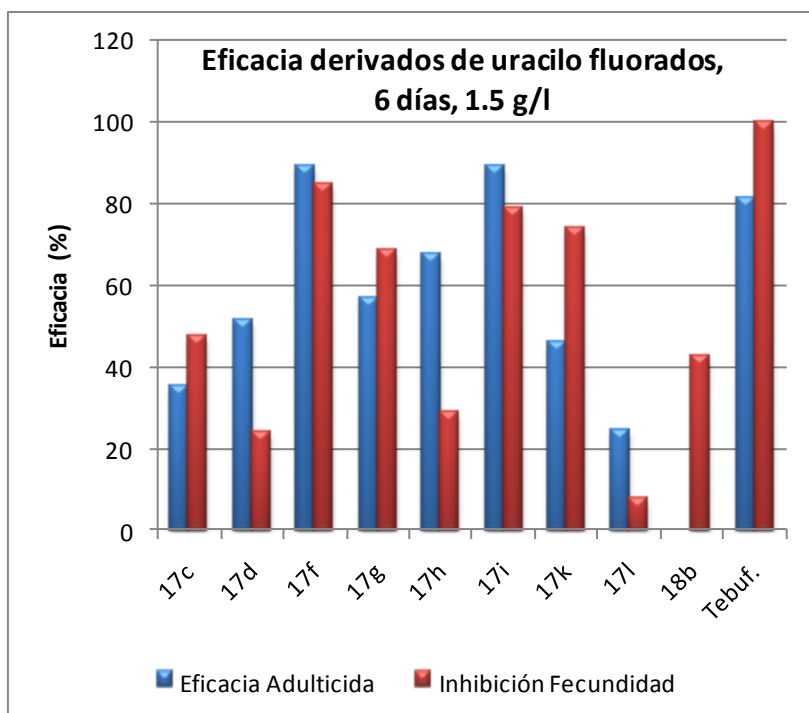
Los siguientes gráficos representan la eficacia acaricida de los derivados de uracilo fluorados testados, mostrando tanto la eficacia adulticida sobre las hembras de araña roja, como la inhibición de la fecundidad inducida en las mismas. En ellos queda de manifiesto la notable actividad del grupo de derivados de uracilo que comentábamos (**17f**, **17i**, **17g**, **17h** y **17k**).

El primero (**Figura 3.29.1**), recoge la actividad observada el sexto día desde el tratamiento con derivados fluorados de uracilo a una dosis de 5 g/l.



**Figura 3.29.1**

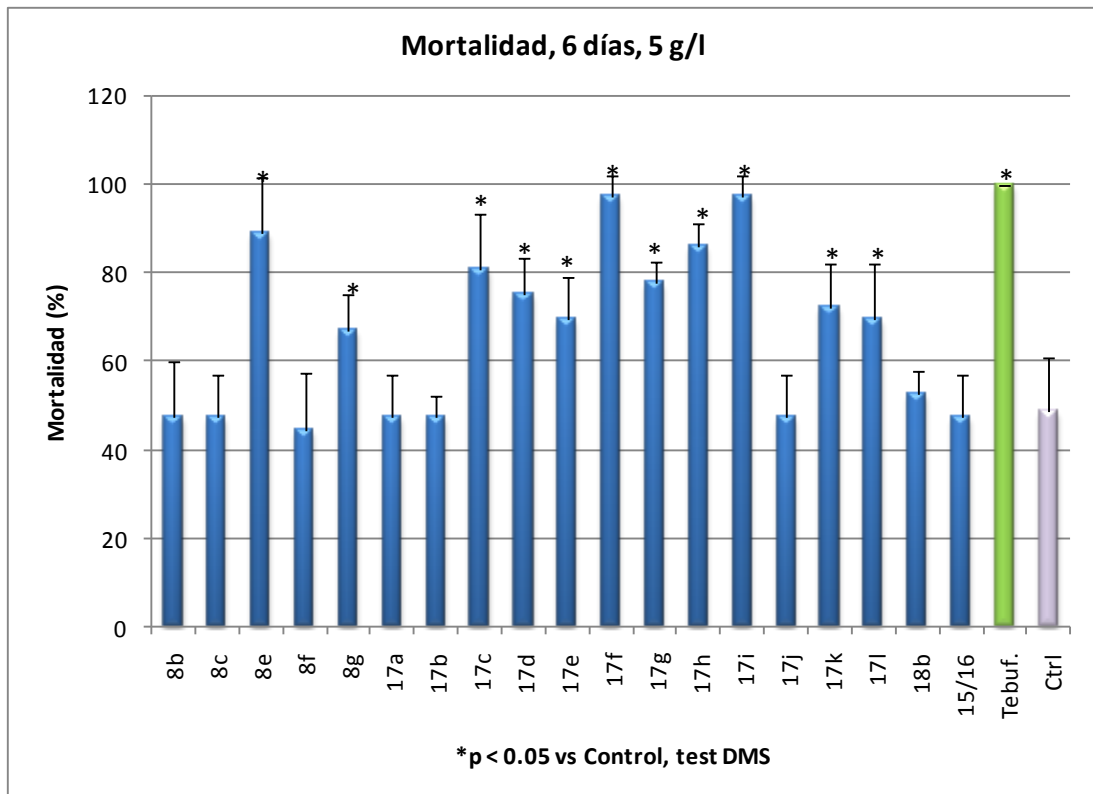
El segundo muestra la eficacia acaricida de los derivados de uracilo fluorados a una dosis de 1.5 g/l, quedando de manifiesto que algunos poseen (**17f**, **17i**, **17g**, **17h** y **17k**) a esta dosis una actividad biológica comparable a la del testigo de referencia.



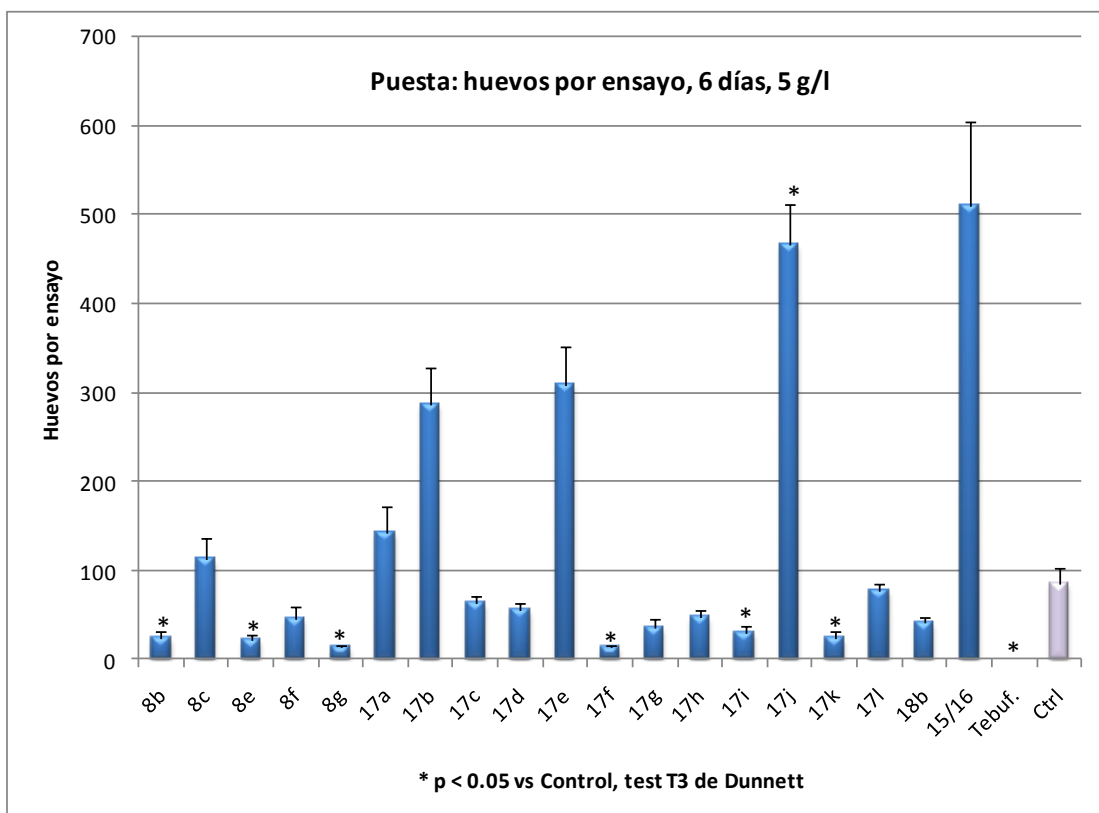
**Figura 3.29.2**

### 3.5.1.c Estudio acaricida: recopilación y consideraciones finales.

Del conjunto total de derivados de uracilo sintetizados, seleccionamos un grupo de 20 compuestos mayoritariamente fluorados cuya actividad acaricida se estudió sobre la especie *Tetranychus urticae*, a una dosis inicial de 5 g/l. Los resultados obtenidos a esta dosis se recopilan en los dos siguientes gráficos que presentan la mortalidad observada ( $\pm\sigma$ ), así como el recuento de huevos por ensayo ( $\pm\sigma$ ). El test DMS permitió señalar aquellos que presentaban unos valores significativamente diferentes del Control ( $p < 0.05$ ) en el estudio de la mortalidad. La puesta o recuento de huevos sin embargo difirió mucho de un producto a otro, observándose heterocedasticidad, por lo que aplicamos el test T3 de Dunnett para determinar qué valores diferían significativamente del Control ( $p < 0.05$ ).

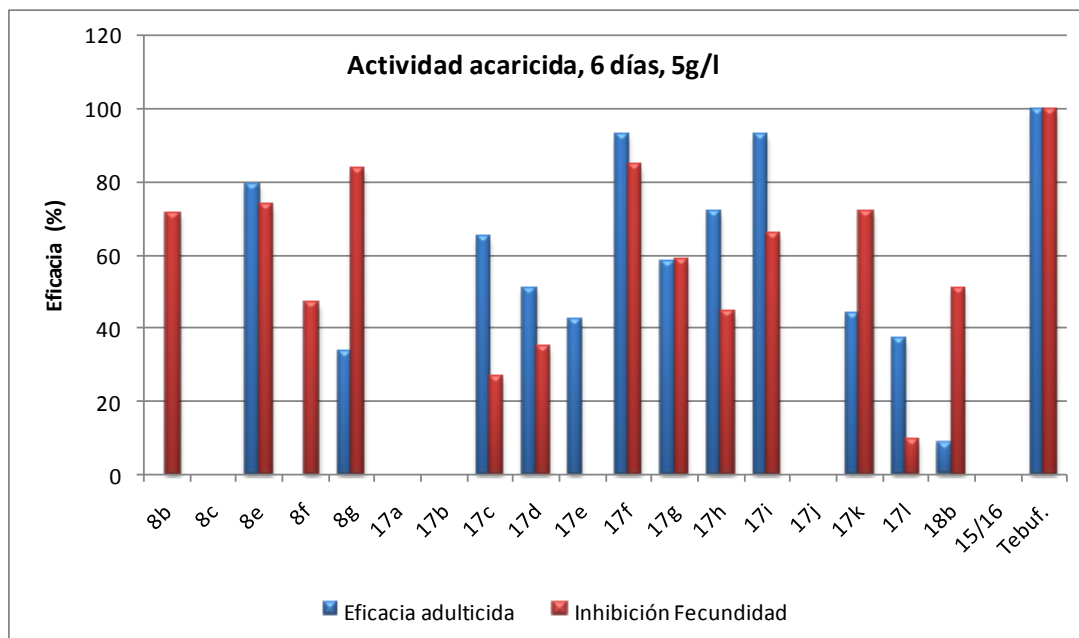


**Figura 3.30.1**



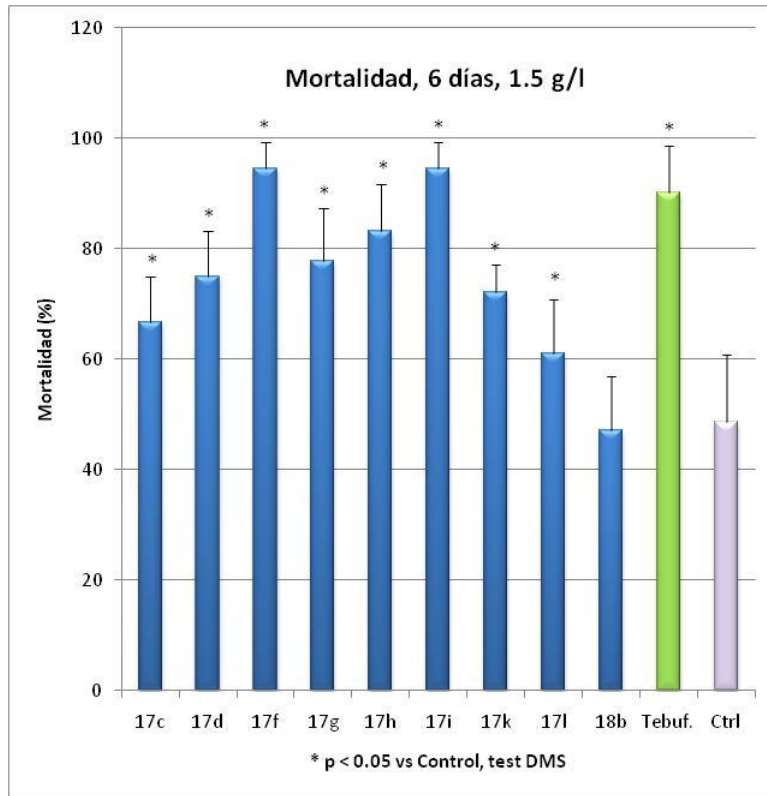
**Figura 3.30.2**

La aplicación de la fórmula de Abbott sobre los datos presentados en las dos figuras precedentes, permitió obtener valores de eficacia de los diferentes derivados de uracilo. Estos valores se recogen en la siguiente figura (**Figura 3.31**).

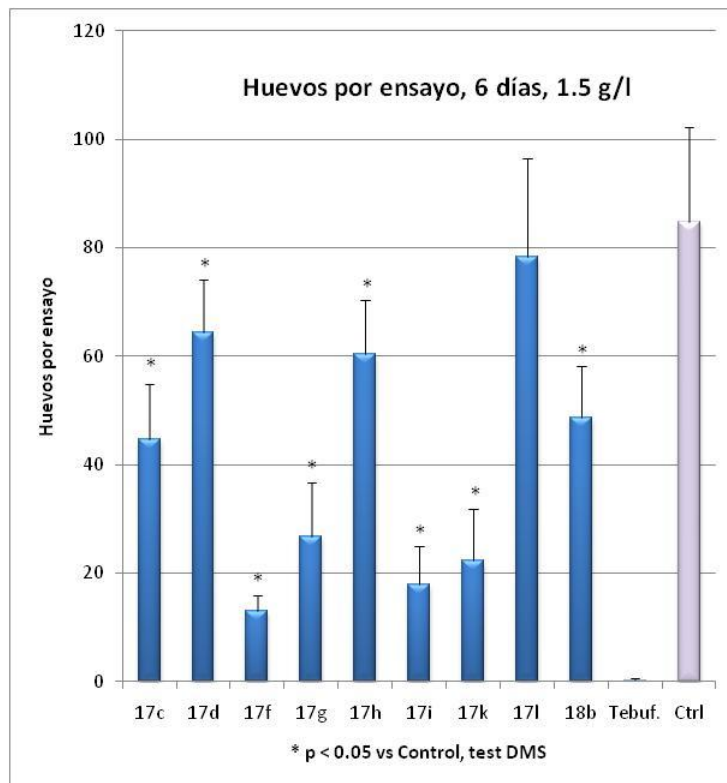


**Figura 3.31**

Llegados a este punto se procedió a seleccionar los derivados fluorados de uracilo que habían manifestado una actividad acaricida relevante, repitiendo la experiencia a una dosis menor de 1.5 g/l, dosis a la que el testigo de referencia (Tebufenpirad) mostraba valores de eficacia ciertamente elevados, pero no del 100%. Los resultados obtenidos a esta nueva dosis se recopilan en los dos siguientes gráficos que presentan la mortalidad observada ( $\pm\sigma$ ), así como el recuento de huevos por ensayo ( $\pm\sigma$ ). De nuevo, el test DMS permitió señalar aquellos que presentaban unos valores significativamente diferentes del Control ( $p<0.05$ ), ahora en cada uno de los parámetros estudiados.



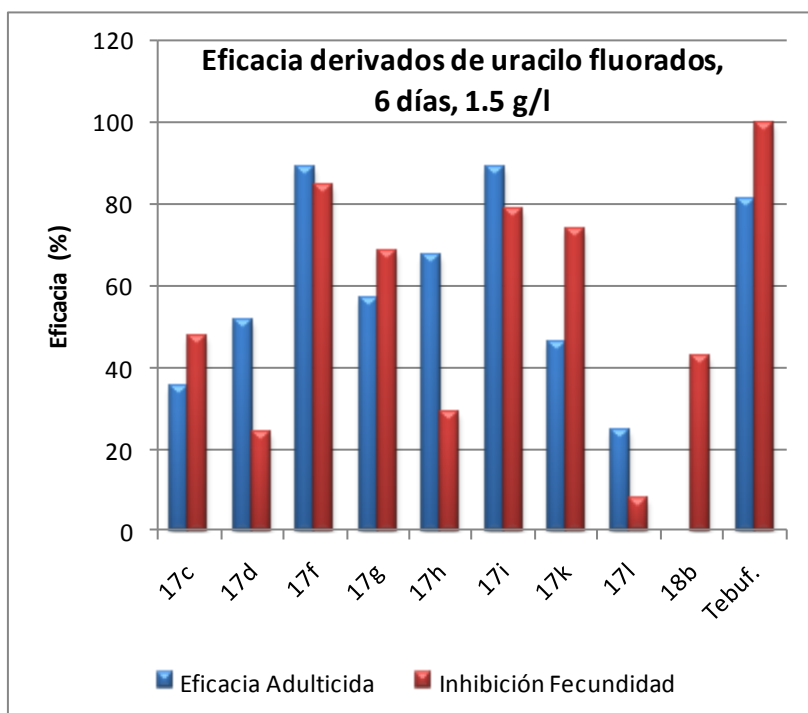
**Figura 3.32.1**



**Figura 3.32.2**



La aplicación de la fórmula de Abbott sobre los datos presentados en las dos figuras precedentes, permitió obtener valores de eficacia de los diferentes derivados de uracilo. Estos valores se recogen en la siguiente figura (**Figura 3.33**), figura ya presentada anteriormente (**Figura 3.29.2**).



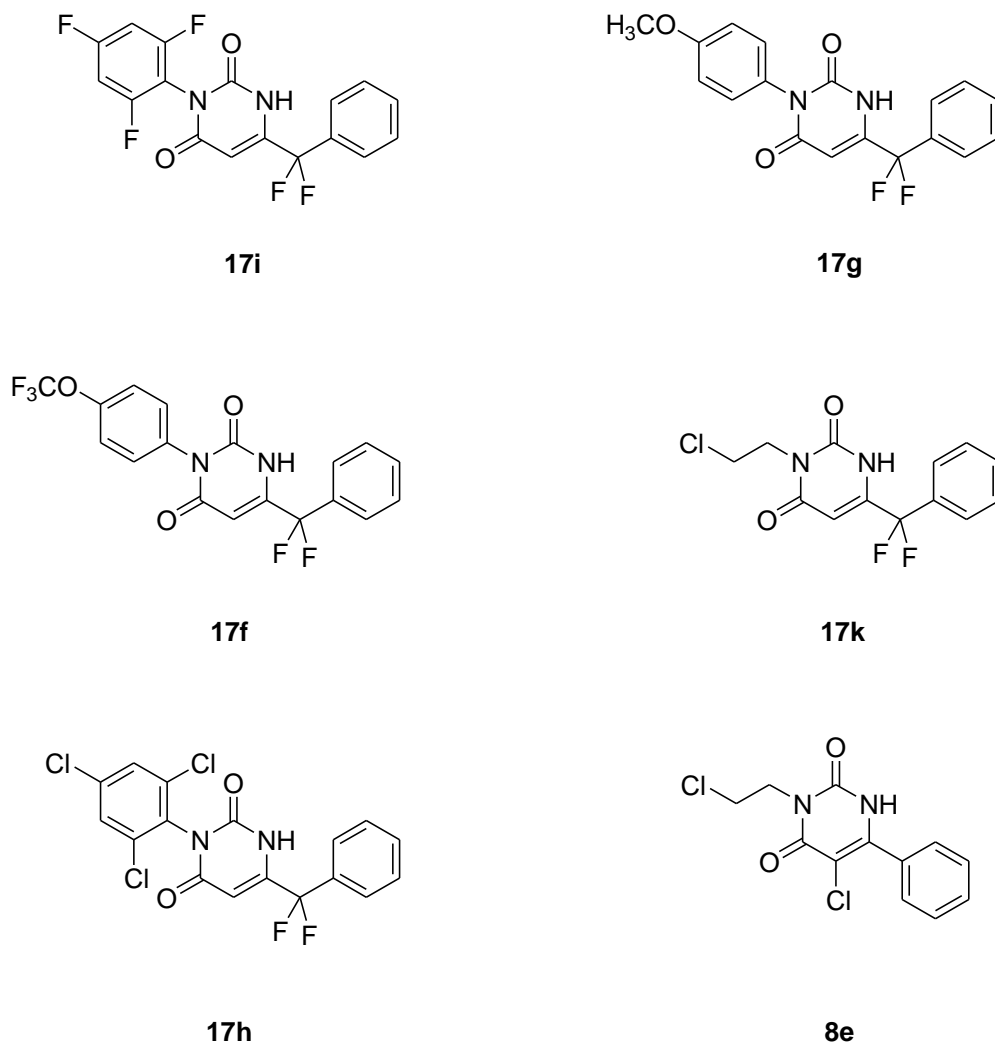
**Figura 3.33**

Contamos por tanto con un conjunto de 6 derivados de uracilo fluorados y no fluorados que han manifestado una eficacia adulticida e inhibidora de la fecundidad media-alta.

Así, y como vemos en los gráficos precedentes, los productos **17f** y **17i** presentan una actividad acaricida pareja a la del Tebufenpirad, con una eficacia adulticida superior y una inhibición de la fecundidad algo inferior. Los compuestos **17g** y **17k**, por su parte, se comportan de un modo similar al testigo superior pero con una actividad algo inferior. El compuesto **17h** presenta una acción adulticida notable, sin embargo, la inhibición de la fecundidad tiene un valor medio que

resulta insuficiente. Por su parte, el compuesto **8e** manifiesta una buena actividad biológica, si bien, a una concentración 3,3 veces superior a la del resto.

Estos derivados vienen recogidos en la siguiente figura.



**Figura 3.34**

De los cuales y como se ha dicho, los compuestos **17f** y **17i** manifestaron una elevada eficacia adulticida e inhibidora de la fecundidad, a un nivel parejo al del testigo superior, Tebufenpirad, producto comercializado y recomendado para esta plaga.

### 3.5.2. Estudios de Toxicidad

Como se ha visto, tres son las vías de entrada de las sustancias potencialmente tóxicas en el cuerpo humano: la dérmica o cutánea, la respiratoria o inhalatoria y la digestiva u oral. Las metodologías elegidas y aplicadas a nuestros compuestos nos permitieron obtener información básica acerca de la toxicidad oral y dérmica.

El estudio de toxicidad se realizó sobre cuatro de los productos que mejor actividad acaricida habían mostrado: **17f**, **17g**, **17k** y **17i**. El producto **17h** se descartó por su menor actividad inhibitoria de la fecundidad de las hembras de *Tetranychus urticae*. En tanto **8e** lo fue, por dos motivos, porque disponíamos tan solo de valores de actividad para una concentración de 5 g/l y por ser un compuesto doblemente clorado, en un contexto como el actual, en el que muchos de los compuestos clorados están quedando fuera de mercado.

a) Toxicidad oral: DL<sub>50</sub> aguda oral.

Siguiendo el método de Reed y Muench,<sup>183</sup> los resultados obtenidos se van recopilando a lo largo del experimento haciendo recuento de vivos y muertos y tomando nota de las manifestaciones de interés que podamos observar en los ratones (caída de pelo, poca movilidad, hinchazón de vientre, etc.)

De este modo, los resultados obtenidos a lo largo del experimento se recogen en distintas tablas, a razón de una para cada producto, calculando los siguientes parámetros de interés para cada una de las concentraciones testadas: número de vivos y muertos, número de vivos y muertos acumulados y mortalidad (%).

A continuación se realiza una representación gráfica. Así, en un eje de coordenadas representamos en las abscisas las distintas dosis de producto administradas y en las ordenadas el número de animales (vivos o muertos acumulados). Situamos en el eje las pautas correspondientes a muertos y vivos acumulados.

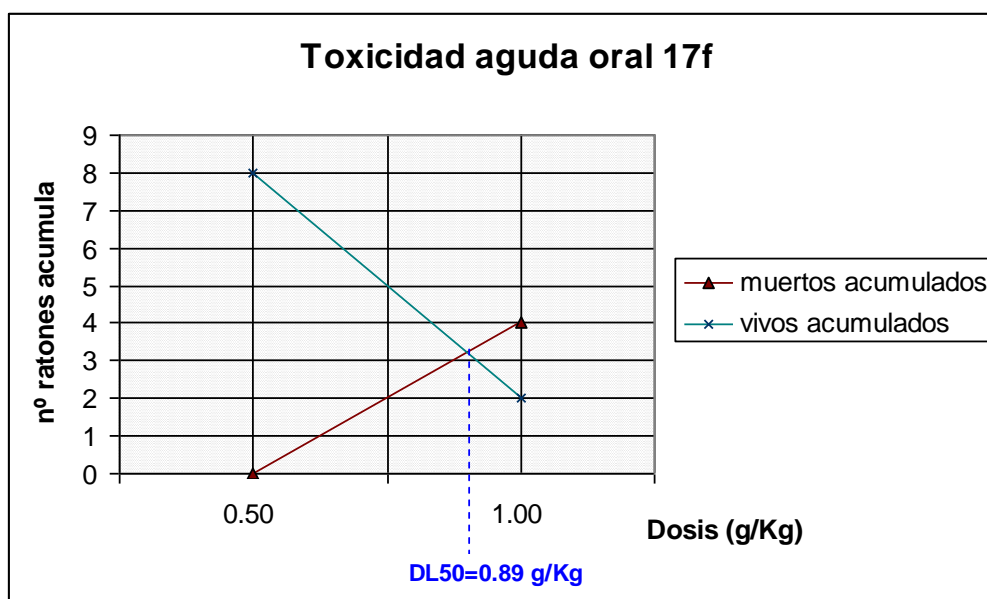
La unión de los puntos correspondientes a vivos acumulados, y de los puntos referentes a muertos acumulados, nos permite obtener dos líneas que se cortan. Desde este punto de cruce trazamos una perpendicular al eje de abscisas, obteniendo así la dosis letal 50.

a.1.  $DL_{50}$  aguda oral del compuesto **17f**, 6-(Difluorofenilmetil)-3-(4-trifluorometoxifenil)-pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona.

**Tabla 3.10**  $DL_{50}$  aguda oral del compuesto **17f**

Dosis (g/Kg)	Muertos	Vivos	Muertos ac.	Vivos ac.	Total	% Mortalidad
0.50	0	6	0	8	8	0.0
1.00	4	2	4	2	6	66.6

Representamos, ahora, gráficamente los vivos y muertos acumulados a las dos dosis del estudio, lo que nos permite hallar la  $DL_{50}$  aguda oral.



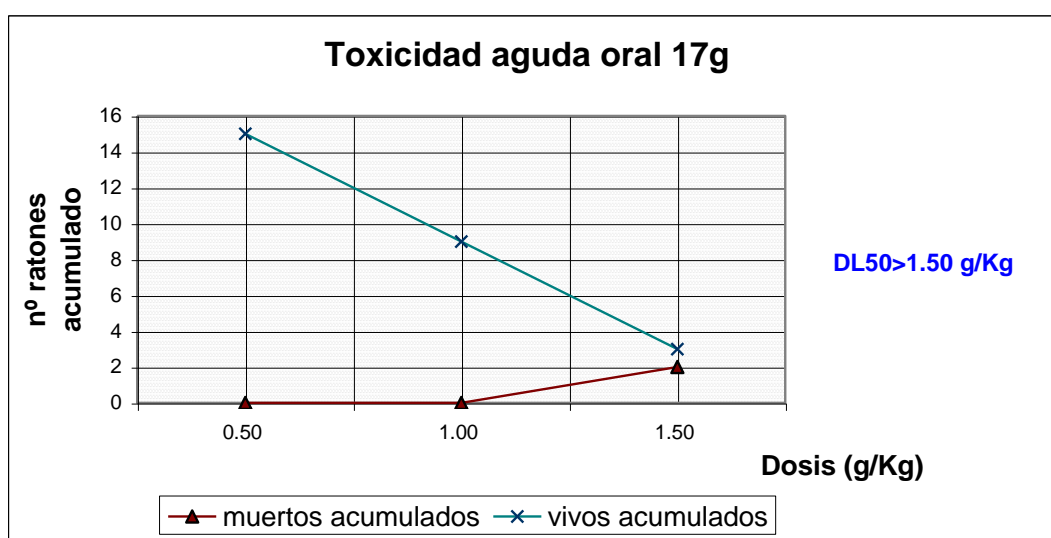
**Figura 3.35**

a.2. DL<sub>50</sub> aguda oral del compuesto **17g**, 6-(Difluorofenilmetil)-3-(4-metoxifenil)-pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona

**Tabla 3.11** DL<sub>50</sub> aguda oral del compuesto **17g**

Dosis (g/Kg)	Muertos	Vivos	Muertos ac.	Vivos ac.	Total	% Mortalidad
0.50	0	6	0	15	15	0.0
1.00	0	6	0	9	9	0.0
1.50	2	3	2	3	5	40.0

La representación gráfica de esta tabla: los vivos y muertos acumulados a las dos dosis del estudio, nos permite hallar la DL<sub>50</sub> aguda oral.



**Figura 3.36**

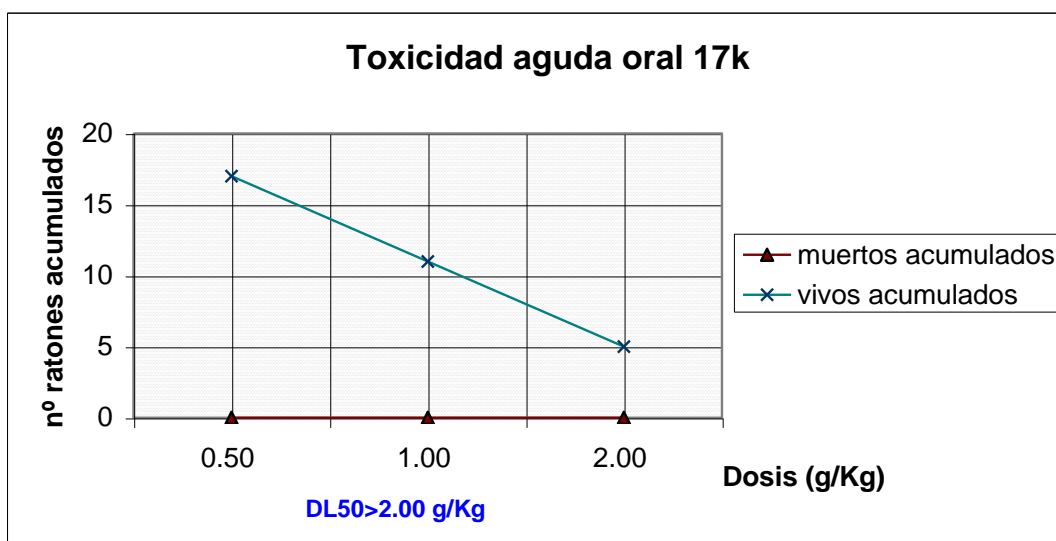
Si extrapolamos en el gráfico anterior obtenemos una DL<sub>50</sub> en torno a 1,56 g/Kg.

a.3. DL<sub>50</sub> aguda oral del compuesto **17k**, 3-(2-cloroetil)-6-(difluorofenilmetil)-pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona

**Tabla 3.12** DL<sub>50</sub> aguda oral del compuesto **17k**

Dosis (g/Kg)	Muertos	Vivos	Muertos ac.	Vivos ac.	Total	% Mortalidad
0.50	0	6	0	17	17	0.0
1.00	0	6	0	11	11	0.0
2.00	0	5	0	5	5	0.0

La representación gráfica de esta tabla: los vivos y muertos acumulados a las dos dosis del estudio, nos permite hallar la DL<sub>50</sub> aguda oral.



**Figura 3.37**

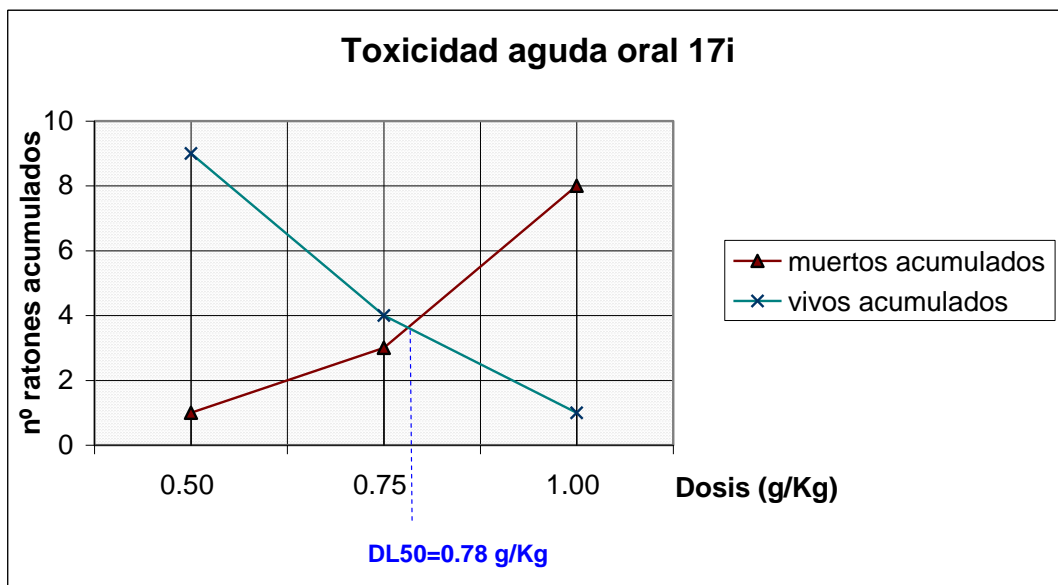
En este caso y con los datos obtenidos no resulta posible extrapolar, ya que no se ha producido ninguna muerte con las dosis estudiadas. Lo que podemos afirmar es que la DL<sub>50</sub> de este producto es superior a 2 g/Kg, no habiéndose manifestado ninguna muerte a esta dosis.

a.4. DL<sub>50</sub> aguda oral del compuesto **17i**, 6-(difluorofenilmetil)-3-(2,4,6-trifluorofenil)-pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona.

**Tabla 3.13** DL<sub>50</sub> aguda oral del compuesto **17i**

Dosis (g/Kg)	Muertos	Vivos	Muertos ac.	Vivos ac.	Total	% Mortalidad
0.50	1	5	1	9	10	10.0
0.75	2	3	3	4	7	42.9
1.00	5	1	8	1	9	88.9

La representación gráfica de esta tabla: los vivos y muertos acumulados a las dos dosis del estudio, nos permite de nuevo, hallar la DL<sub>50</sub> aguda oral.



**Figura 3.38**

Los compuestos, por tanto, están manifestando una toxicidad aguda oral baja. Como referencia podemos recordar la clasificación de los productos fitosanitarios según el grado de toxicidad atendiendo a su toxicidad aguda expresada en DL<sub>50</sub>, por vía oral para rata.<sup>161,162</sup>

Así, los plaguicidas sólidos, excepto los cebos y los presentados en forma de tabletas, se clasifican como:

- Muy tóxicos: DL<sub>50</sub> inferior o igual a 5 miligramos por kilogramo de peso corporal.
- Tóxicos: DL<sub>50</sub> superior a 5 e inferior o igual a 50 miligramos por kilogramo de peso corporal.
- Nocivos: DL<sub>50</sub> superior a 50 e inferior o igual a 500 miligramos por kilogramo de peso corporal.

Teniendo siempre presente que son datos orientativos, ya que el estudio se ha realizado en ratones y no en ratas, observamos que todos nuestros productos se hallan por encima del valor límite de 500 miligramos por kilogramo de peso

corporal: la  $DL_{50}$  en ratón de **17f** es 890 miligramos por kilogramo de peso corporal, la del compuesto **17g** en torno a 1560 miligramos por kilogramo de peso corporal, superior a 2000 miligramos por kilogramo en el caso de **17k** y de 780 miligramos por kilogramo para **17i**.

Siguiendo con las referencias, podemos contrastar esta información con la toxicidad oral de Tebufenpirad, compuesto del que nos hemos servido como testigo superior en las pruebas de estudio acaricida. Así, para el producto comercializado, es decir el ya formulado: Masai (Tebufenpirad, 20%), la  $DL_{50}$  aguda oral en rata es de 150 miligramos por kilogramo. Teniendo en cuenta la proporción de Tebufenpirad en el producto formulado, hablamos de una  $DL_{50}$  aguda oral en rata del principio activo en torno a 30 miligramos por kilogramo. Como vemos, una toxicidad oral importante muy por encima de la que manifiestan los derivados de uracilo estudiados.

#### b) Toxicidad dérmica: Hipersensibilidad tópica.

Para evaluar la hipersensibilidad por contacto, nos hemos servido de un procedimiento descrito en la bibliografía mediante la inducción de edema en oreja de ratón.<sup>184</sup>

La observación a partir del sexto día de experimento, en el que se 30  $\mu$ l de la disolución de producto en cada una de las orejas de cada ratón ya sensibilizado, permitió constatar la ausencia total de manifestaciones de hipersensibilidad dérmica. Así y tras tres días seguido realizando el seguimiento y evaluación de los ratones testados, no se observó signo alguno (irritación, edema, rubor, vesículas, etc.) de una posible reacción de hipersensibilidad.

### **3.5.3 Modelo matemático**

Finalmente, se ha construido un modelo topológico que permita la búsqueda y rápida obtención de nuevos productos, potencialmente acaricidas, en base a la estructura química de los mismos.



3.5.3.a. Selección de grupos de acuerdo a criterios de actividad e inactividad.

El primer paso en el desarrollo del modelo topológico, fue la constitución de dos grupos de productos tomados de nuestros derivados de uracilo y pirimidinona, en atención a los resultados de actividad acaricida que habían manifestado.

El grupo de compuestos activos incluye 8 productos seleccionados de acuerdo al criterio de actividad, a saber: eficacia adulticida (hembra adulta) superior al 50% al sexto día de tratamiento con una dosis de 5,0 g/l (ver Tablas 3.5 y 3.8). De acuerdo a este criterio, ocho fueron los compuestos activos seleccionados, a saber: **17c, 17d, 17f, 17g, 17h, 17i, 8e** y tebufenpirad.

El segundo de los grupos incluye 9 compuestos inactivos, entendiendo por tales, aquéllos que presentaron una eficacia adulticida (hembra) del 0% el sexto día desde el tratamiento con una dosis de 5,0 g/l (Tablas 3.5 y 3.8). En concreto, los compuestos que comprenden este grupo son: **15, 16, 17a, 17b, 17j, 18b, 8b, 8c y 8f.**

### 3.5.3.b. Análisis discriminante

#### *Funciones discriminantes (DF)*

Todos estos compuestos una vez seleccionados, se clasificaron por medio del modelo topológico desarrollado, consistente en dos funciones discriminantes (Ecuaciones 1 y 2, ver más abajo) y una ecuación predictiva (Ecuación 3).

La primera de las funciones discriminantes se obtuvo con el software *MolconnZ*, 4.0 y contiene tan solo una variable independiente:

$$DF_1 = 3.455 \text{ Hes14} + 0.972$$

#### **Ecuación 1**

Los parámetros estadísticos fueron los siguientes:  $N$  (tamaño de la muestra) = 17,  $F$  (Fisher-Snedecor) = 6.99 y  $\lambda$  (Wilks) = 0.68.

Esta función permite predecir un valor positivo o negativo de actividad acaricida frente a *Tetranychus urticae* con un intervalo de confianza del 95%. Así, del grupo de trabajo de 17 compuestos seleccionados como activos e inactivos en el apartado 3.5.3.a, 7 de los 8 compuestos activos –experimentalmente activos– fueron correctamente clasificados por la función  $DF_1$  (87,5% de probabilidad). En cuanto al grupo de inactivos,  $DF_1$  clasificó correctamente 5 de los 9 compuestos experimentalmente inactivos (55,6% de probabilidad).

La segunda de las funciones discriminantes se obtuvo con el software *Dragon*, 5.4 y contiene también una sola variable independiente:

$$DF_2 = -17.65 \text{ HNar} + 31.60$$

### **Ecuación 2**

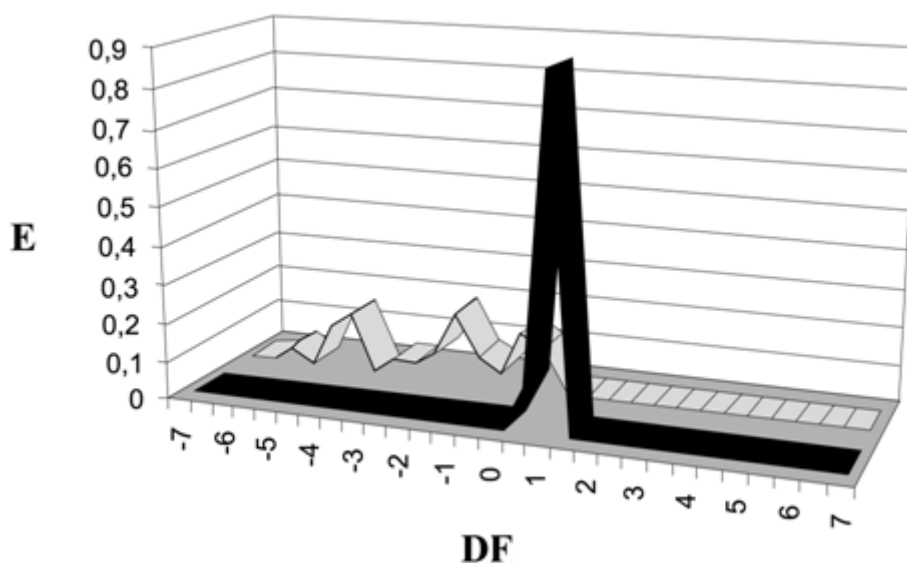
En este caso, los parámetros estadísticos fueron los siguientes:  $N = 17$ ,  $F = 4,2$  y  $\lambda = 0.78$ .

Como en la primera de las funciones discriminantes,  $DF_2$  permite predecir un valor positivo o negativo de actividad acaricida frente a *Tetranychus urticae* con un intervalo de confianza del 95%. La función clasificó correctamente 6 de los 8 compuestos experimentalmente activos (75,0% de probabilidad) y 5 de los 9 inactivos (55,6% de probabilidad).

#### *Diagramas de distribución de actividad acaricida (PDDs)*

Una vez se habían obtenido las funciones de discriminación, los correspondientes diagramas de distribución de actividad acaricida facilitaron la selección de los compuestos activos.

Como se observa en el siguiente diagrama de distribución obtenido con MolconnZ , los compuestos con valores de  $DF_1$  entre 0 y 1 quedan clasificados como activos, en tanto que aquéllos con valores entre -6,5 y 0 se clasifican como inactivos. No se observan zonas de superposición para los compuestos con actividad acaricida teórica de  $DF_1 > 0$  y  $DF_1 < 1$ , quedando la más alta expectativa de actividad comprendida en este rango.



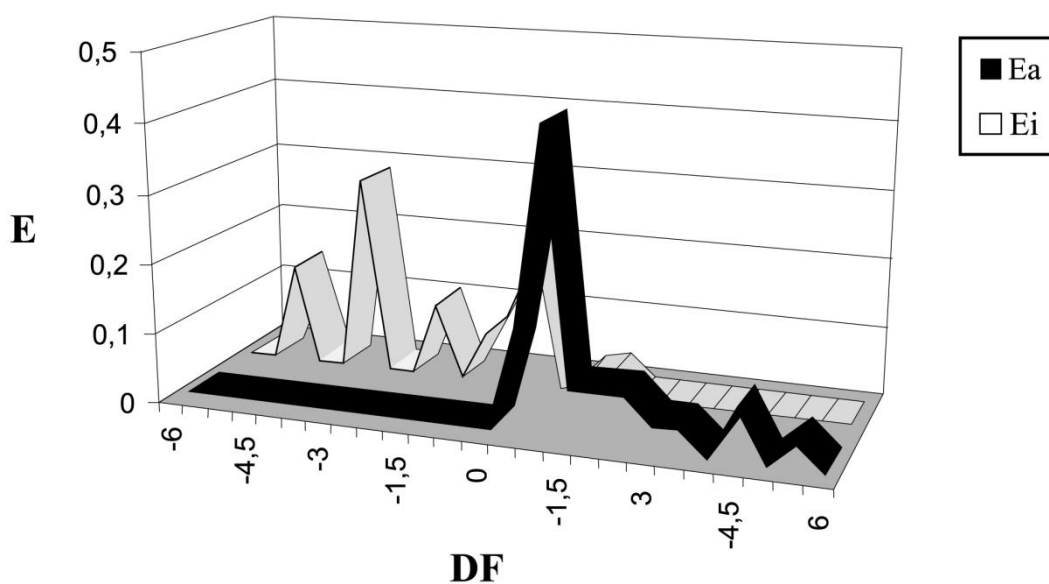
**Figura 3.39**

En la siguiente figura (figura 3.37) se representa el PDD obtenido con el software Dragon para la segunda de las funciones de discriminación ( $DF_2$ ).

En este caso, los compuestos con valores de  $DF_2$  comprendidos entre 0 y 5,3 se clasificaron como activos, en tanto que los inactivos recibieron valores entre -5,3 y 0. El intervalo de valores de 0 a 1,5 queda definido como incierto para esta función. Asimismo, los valores por encima de 5,5 o por debajo de -5,5 se consideraron inclasificables.

Como podemos observar en la Figura 3.37 queda de manifiesto que las regiones con mínima superposición y por tanto, máxima expectativa de actividad

son las definidas para valores teóricos de actividad acaricida de  $DF_2 > 1,5$  y  $DF_2 < 5,5$ .



**Figura 3.40**

#### *Grupo externo*

Una vez diseñadas las dos funciones discriminantes, seleccionamos un grupo externo de compuestos incluyendo tanto derivados de uracilo y pirimidinona sintetizados y estudiados en el presente trabajo (**17e**, **6b**, **18a**, **8g**, **5b**, **6d**, etc.) como otros productos comercializados y con una actividad o estructura química similar a la de nuestros productos (bromacilo, 5-fluorouracilo, dicofol, trifluridina, zidovudina, etc.). De este modo seleccionamos un total de 37 productos (ver tabla 3.14) sobre los que se realizó un estudio virtual topológico.

La estrategia consiste en aplicar secuencialmente las dos funciones discriminantes ( $DF_1$  y  $DF_2$ ) de modo que sólo los productos que revelen un resultado positivo en ambas funciones –dentro de los rangos especificados anteriormente para cada una de las funciones- los consideraremos como potencialmente activos.

Los resultados obtenidos quedan recogidos en la siguiente tabla:

**Tabla 3.14** Aplicación de  $DF_1$  y  $DF_2$  a un grupo de compuestos externo.

<b>Grupo externo</b>			
<b>Compuestos</b>	<b><math>DF_1</math></b>	<b><math>DF_2</math></b>	<b>Clasificación</b>
17e	0,97	0,89	+
17k	0,97	0,71	+
17l	-2,76	0,71	-/+
18a	-0,17	-0,17	-
5a	0,97	-3,70	+/-
5b	0,97	-3,70	+/-
5-Fluorouracilo	0,97	2,65	+
6a	-4,76	-3,70	-
6b	-4,69	-5,29	-
6c	-5,18	-3,70	-
6d	-0,55	-5,29	-
7a	-4,63	-3,70	-
7b	-4,56	-5,29	-
7c	-5,04	-3,70	-
7d	-0,55	-5,29	-
8a	0,11	-0,17	+/-
8d	-0,51	-1,05	-
8g	-1,96	0,36	-/+
9a	0,18	-0,17	+/-
9b	0,07	-0,35	+/-
9c	-0,48	0,18	-/+
Bromacilo	-2,28	4,07	-/+
Butafenacilo	0,97	3,18	+
Clofentezina	-2,45	-3,70	-
Dicofol	0,97	1,77	+
Diflubenzuron	-0,76	0,18	-/+
Fenazaquin	0,97	-2,46	+/-
Floraflur	0,97	-0,70	+/-
Floxuridina	0,97	1,42	+
Fluaciripirim	0,97	1,24	+
Flufenoxuron	-5,35	0,89	-/+
Lenacilo	-2,14	-3,70	-
Piridaben	-2,31	2,30	-/+
Saflufenacilo	0,97	4,07	+
Terbacilo	-3,69	5,30	-/+
Trifluridina	-6,49	2,30	-/+
Zidovudina	0,97	0,71	+

Cuando los valores teóricos de ambas funciones fueron positivos la clasificación se muestra como +, cuando ambos fueron negativos se muestran como -, en tanto que, cuando hubo divergencia de resultado, éste se expresa como +/- o -/+ de acuerdo a los resultados teóricos obtenidos en cada una de las funciones discriminantes.

### *Conclusiones preliminares*

Si unimos ambos modelos discriminantes, sólo dos compuestos, **17b** y **17j** serían dados como falsos activos, si bien DF<sub>1</sub> (MolconnZ) con mayor probabilidad (72,6% en ambos casos). Es decir, la primera de las funciones discriminantes diseñada por MolconnZ acierta más en los activos (es más sensible) pero también se equivoca más en los inactivos (es menos específica), aunque en general ambas funciones son más sensibles que específicas.

En todo caso, la unión de ambos modelos conduce a un modelo global en el que solo hay un fallo en los activos (**8e**) y dos en los inactivos (**17b** y **17j**).

3.5.3.c Correlación multilínea y predicción de la propiedad: predicción de la eficacia adulticida en el sexto día desde el tratamiento.

### *Log E y ecuación predictiva de eficacia adulticida (E)*

Si definimos la eficacia adulticida al sexto día de la aplicación sobre la especie *T. urticae*, como E (eficacia %); log E puede tomarse como una representación válida de este valor. Así, podemos construir una ecuación de regresión multilínea capaz de predecir log E. Para ello nos servimos de 13 de los compuestos (grupo de trabajo, ver tabla 3.15, más abajo) estudiados previamente y de los que, por tanto conocíamos su valor experimental de log E. Los resultados obtenidos se validaron mediante un estudio de estabilidad también llamado de validación cruzada.

La mejor ecuación predictiva fue:

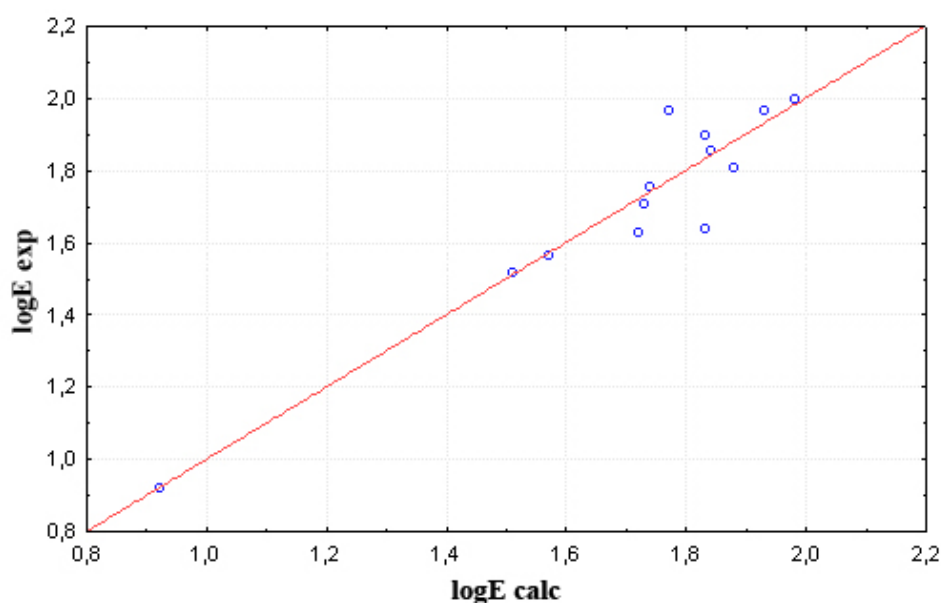
$$\log E = 1.832 - 0.0642 s19 + 0.529 e9$$

### **Ecuación 3**

Los parámetros estadísticos para esta ecuación fueron los siguientes:  $r$  (coeficiente de regresión) = 0,95; Error standard = 0,10;  $F$  (Fisher-Snedecor) = 44,90; y  $P$  (significación) < 0,00001.

#### *Correlación obtenida y grupo de trabajo*

La siguiente figura manifiesta la buena correlación obtenida entre los valores de log E experimentales y los calculados con la ecuación 3 para los 13 compuestos seleccionados (grupo de trabajo: **18b**, **8g**, **17I**, **17e...**) y especificados en la tabla 3.15, más abajo.



**Figura 3.41**

Como venimos anunciando, los trece compuestos seleccionados, así como los valores de log E obtenidos, quedan recogidos en la siguiente tabla (Tabla 3.15).

Los valores experimentales se obtuvieron previamente mediante el estudio de actividad acaricida, cuyos resultados se recogen en este mismo capítulo, en el apartado 3.5.1. Los valores calculados son los obtenidos al aplicar la ecuación 3 diseñada por correlación lineal, como se ha comentado.

**Tabla 3.15** Grupo de trabajo y valores de logE experimentales y calculados

Comuestos	logE exp	logE calc	Residual
18b	0,919	0,922	-0,002
8g	1,522	1,506	0,016
17l	1,566	1,574	-0,008
17e	1,625	1,722	-0,096
17k	1,643	1,830	-0,187
17d	1,707	1,730	-0,023
17g	1,763	1,736	0,026
17c	1,812	1,884	-0,072
17h	1,857	1,837	0,020
8e	1,898	1,832	0,065
17f	1,969	1,767	0,202
17i	1,969	1,931	0,038
Tebufenpirad	2,000	1,979	0,021

#### *Grupo externo*

Este nuevo grupo externo se seleccionó tomando aquellos productos que habían de ser activos teóricamente pero que no estaban incluidos en el ejercicio precedente de correlación multilínea para obtener la ecuación 3 (grupo de trabajo, Tabla 3.15).

Así pues, a este nuevo grupo externo se le aplicó la ecuación 3, predictiva de la eficacia adulticida en araña roja. El grupo estaba formado, como se ha apuntado, por el resto de compuestos que habían dado indicios de actividad en el análisis discriminante, es decir, habían dado un resultado positivo en cualquiera de las dos funciones discriminantes ( $DF_1$  y  $DF_2$ ).

De este modo, pudimos obtener valores predictivos de log E calculados y Eficacia adulticida (%) calculada para el nuevo set de compuestos. Como se puede ver en la siguiente tabla (3.16) los valores de log E comprendidos entre 1,7 y 2,0 reflejan un amplio rango de actividad acaricida entre los diversos productos estudiados.



**Tabla 3.16** Valores de log E calculados en el estudio QSAR para el resto de compuestos teóricamente activos.

Compuesto	logE calc	% E calc
<b>5a</b>	1,832	68
<b>5b</b>	1,832	68
<b>5-Fluorouracilo</b>	1,832	68
<b>8a</b>	1,867	74
<b>9a</b>	2,701	502
<b>9b</b>	1,777	60
<b>9c</b>	1,861	73
<b>Bromacilo</b>	1,892	78
<b>Butafenacilo</b>	1,501	32
<b>Dicofol</b>	2,277	189
<b>Diflubenzuron</b>	1,733	54
<b>Fenazaquin</b>	1,784	61
<b>Floraflur</b>	1,832	68
<b>Floxuridina</b>	2,677	475
<b>Fluacripirim</b>	1,723	53
<b>Flufenoxuron</b>	1,781	60
<b>Piridaben</b>	1,038	11
<b>Saflufenacilo</b>	1,723	53
<b>Terbacilo</b>	1,832	68
<b>Trifluridina</b>	1,799	63
<b>Zidovudina</b>	2,101	126

### *Conclusiones preliminares*

El tercero de los modelos es bastante bueno ya que da como activo al derivado **8e** (1.83), corrigiendo así el error que se producía en el análisis discriminante previo.

El mejor criterio a la hora de aplicar este estudio topológico sería una vez escogidas por análisis discriminante las moléculas teóricamente activas aunando las predicciones de los dos modelos discriminantes ( $DF_1$  y  $DF_2$ ) se aplicaría el modelo 9R (correlación multilineal) obtenido con MolconnZ.

### 3.6 Conclusiones

De los más de 40 derivados de uracilo y pirimidinona fluorados y no fluorados obtenidos como se ha indicado en los dos primeros capítulos, se seleccionó una veintena de compuestos para proceder al estudio de su actividad acaricida. Estudio que se llevó a cabo sobre la especie *Tetranychus urticae*, Koch, un fitófago que ocasiona frecuentes plagas en muchos cultivos de interés agrícola provocando cuantiosas pérdidas económicas.

1. Los derivados de uracilo y pirimidinona estudiados manifestaron un rango de actividad acaricida muy amplio, tanto como adulticidas como inhibidores de la fecundidad.

2. La actividad acaricida fue en general más acusada en los derivados fluorados estudiados que en los no fluorados. Los derivados no fluorados manifestaron cierta capacidad inhibitoria de la fecundidad, pero una muy escasa eficacia adulticida. Así, tan solo el derivado **8e** manifestó una eficacia adulticida e inhibitoria de la fecundidad por encima del 70%, si bien a una concentración de 5 g/l.

3. La quincena de derivados fluorados estudiados mostraron un rango de resultados más amplio, encontrando desde productos que apenas actuaban sobre las arañas rojas (**15, 16, 17a, 17b**), a otros con una actividad ciertamente notable y comparable a la del testigo superior, Tebufenpirad (**17f, 17g, 17k, 17h y 17i**).

4. En concreto **los derivados de uracilo fluorados 17f y 17i, presentaron los mejores resultados**, con una mayor eficacia adulticida que el testigo superior y una ligeramente inferior inhibición de la fecundidad, a la concentración de 1,5 g/l.

A continuación se procedió a realizar un estudio toxicológico de los derivados que mejor actividad acaricida habían manifestado, seleccionándose cuatro de ellos, a saber: **17f, 17g, 17k y 17i**.

5. Estos derivados de uracilo manifestaron **una toxicidad aguda oral en ratón muy inferior** a los varemos que clasifican los productos pesticidas en función de su toxicidad, en rata.

6. A su vez los ensayos de hipersensibilidad tópica resultaron también negativos, es decir, los derivados de uracilo **no manifestaron ningún signo de reacción de hipersensibilidad.**

7. Se han obtenido **dos modelos matemáticos por análisis discriminante** ( $DF_1$  y  $DF_2$ ) **que permiten predecir el carácter potencialmente activo o inactivo de nuevos compuestos frente a *Tetranychus urticae*.** En el estudio realizado, se observa que si unimos ambos modelos discriminantes, sólo dos compuestos, **17b** y **17j**, serían catalogados como falsos activos, a la par que sólo un compuesto activo (**8e**) se clasificaría erróneamente como inactivo.

8. Asimismo se ha desarrollado un **tercer modelo** matemático por **correlación multilineal** con carácter predictivo de propiedad, en concreto de la **eficacia** adulticida sobre araña roja. Este modelo corrige parcialmente los anteriores ya que caracteriza el compuesto **8e** como activo.

9. **El mejor criterio a la hora de aplicar el estudio topológico** sería una vez escogidas por análisis discriminante las moléculas teóricamente activas aunando las predicciones de los dos modelos discriminantes ( $DF_1$  y  $DF_2$ ) aplicar el tercer modelo predictivo de actividad (eficacia adulticida). En conjunto disponemos de una herramienta muy sensible, capaz de discriminar dando como activos los que han de serlo y moderadamente específica (yerra ocasionalmente en los inactivos) que puede facilitar mucho la búsqueda de nuevos compuestos acaricidas.

## ***Conclusiones Generales***



Siguiendo líneas de investigación previas en nuestro laboratorio,<sup>26-28</sup> se ha estudiado y ampliado una metodología que permite la síntesis de derivados de uracilo y de pirimidinona para derivados no fluorados. Así:

1. Se ha profundizado en el conocimiento de la reacción clave de la metodología, a saber, la condensación de una  $\beta$ -enaminoxazolina **3** con un derivado del ácido carbónico. El estudio nos lleva a concluir que se generan tres productos distintos en proporciones variables en el seno de la reacción, siendo la **hidrólisis** elegida (agentes hidrolíticos y condiciones) la que constituye el **paso clave** para poder controlar el resultado de la reacción.

2. Se han sintetizado los derivados de **4-oxazolopirimidinona 7 no fluorados**, no obtenidos anteriormente.

3. Se han sintetizado, además, nuevos **derivados de uracilo no fluorados N3-cloroetilados 8**.

4. Comparando los resultados obtenidos con los de trabajos precedentes se ha constatado cierta variación en la proporción de los isómeros **6** y **7**, en función de la **presencia de o ausencia de flúor** en los grupos sustituyentes C6.

4. Además, hemos podido conectar sintéticamente los diversos productos obtenidos, iniciando así, el estudio de la **reactividad de los nuevos derivados de uracilo N3-cloroetilados 8**. De ellos se han podido obtener, tanto los derivados de oxazolopirimidinona **6** y **7**, como los derivados de uracilo N3,C6-disustituídos **9**.

5. Se han obtenido de este modo **una veintena de productos finales no fluorados**.

Además, se han estudiado y ampliado metodologías que permiten la síntesis de derivados de uracilo y de pirimidinona fluorados, procediéndose al escalado de alguna de estas vías sintéticas y diseñando nuevas estrategias para la obtención de estos derivados. De este modo:

6. Se ha obtenido una colección de derivados de uracilo fluorados a través de la **vía de los  $\beta$ -enaminoésteres**. Cuatro de estos compuestos **17f**, **17h**, **17i**, **17j** han sido obtenidos, aislados e identificados por primera vez.

7. Se ha procedido al estudio del **escalado** de la vía de síntesis de derivados de uracilo fluorados de los  $\beta$ -enaminoésteres, optimizando los procedimientos sintéticos de escala miligramo a escala de gramo y multigramo.

8. Los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis se han aplicado ahora a la obtención de derivados de uracilo y oxazolopirimidinona fluorados, a través de la vía de las  **$\beta$ -enaminooxazolinás**.

9. Se ha procedido, también, al estudio del **escalado** de esta vía ( **$\beta$ -enaminooxazolinás**) de síntesis de derivados de uracilo y oxazolopirimidinona fluorados optimizando los procedimientos sintéticos de escala miligramo a escala de gramo y multigramo.

10. Se ha diseñado **una nueva estrategia** sintética que, en continuidad con la vía de las  **$\beta$ -enaminooxazolinás**, permite la obtención de nuevos derivados de uracilo N3 fluoroetilados a partir bien de los correspondientes derivados de uracilo N3 cloroetilados, o bien de la correspondiente mezcla isomérica de oxazolopirimidinonas. De este modo se han obtenido e identificado por vez primera los derivados **18a** y **18b**.

11. Por último y a consecuencia de todo esto, se han obtenido **una veintena de derivados de uracilo y pirimidinona fluorados**.

De los más de 40 derivados de uracilo y pirimidinona fluorados y no fluorados obtenidos, se seleccionó una veintena de compuestos para proceder al estudio de su actividad acaricida. Estudio que se llevó a cabo sobre la especie *Tetranychus urticae*, Koch, un fitófago que ocasiona frecuentes plagas en muchos cultivos de interés agrícola provocando cuantiosas pérdidas económicas. De modo que:

12. Los derivados de uracilo y pirimidinona estudiados manifestaron un rango de actividad acaricida muy amplio, tanto como adulticidas como inhibidores de la fecundidad.

13. La actividad acaricida fue en general más acusada en los derivados fluorados estudiados que en los no fluorados. Los derivados no fluorados manifestaron cierta capacidad inhibitoria de la fecundidad, pero una muy escasa eficacia adulticida. Así, tan solo el derivado **8e** manifestó una eficacia adulticida e inhibitoria de la fecundidad por encima del 70%, si bien a una concentración de 5 g/l.

14. La quincena de derivados fluorados estudiados mostraron un rango de resultados más amplio, encontrando desde productos que apenas actuaban sobre las arañas rojas (**15, 16, 17a, 17b**), a otros con una actividad ciertamente notable y comparable a la del testigo superior, Tebufenpirad (**17f, 17g, 17k, 17h y 17i**).

15. En concreto **los derivados de uracilo fluorados 17f y 17i, presentaron los mejores resultados**, con una mayor eficacia adulticida que el testigo superior y una ligeramente inferior inhibición de la fecundidad, a la concentración de 1,5 g/l.

A continuación se procedió a realizar un estudio toxicológico de los derivados que mejor actividad acaricida habían manifestado, seleccionándose cuatro de ellos, a saber: **17f, 17g, 17k y 17i**.

16. En el estudio de toxicidad, **17f, 17g, 17k y 17i** manifestaron **una toxicidad aguda oral en ratón muy inferior** a los varemos que clasifican los productos pesticidas en función de su toxicidad, en rata.

17. A su vez los ensayos de hipersensibilidad tópica resultaron también negativos, es decir, los derivados de uracilo **no manifestaron ningún signo de reacción de hipersensibilidad**.



18. Se puede concluir por tanto que se han desarrollado ampliamente metodologías sintéticas que permiten la obtención de derivados de uracilo y pirimidinona fluorados o no en C6. Algunos de estos compuestos presentan una actividad acaricida frente a la plaga de la araña roja eficaz en laboratorio. Así mismo estos productos manifiestan una escasa toxicidad, tanto oral aguda como de hipersensibilidad tóxica.

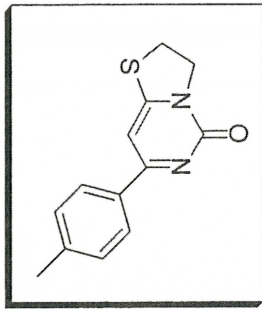
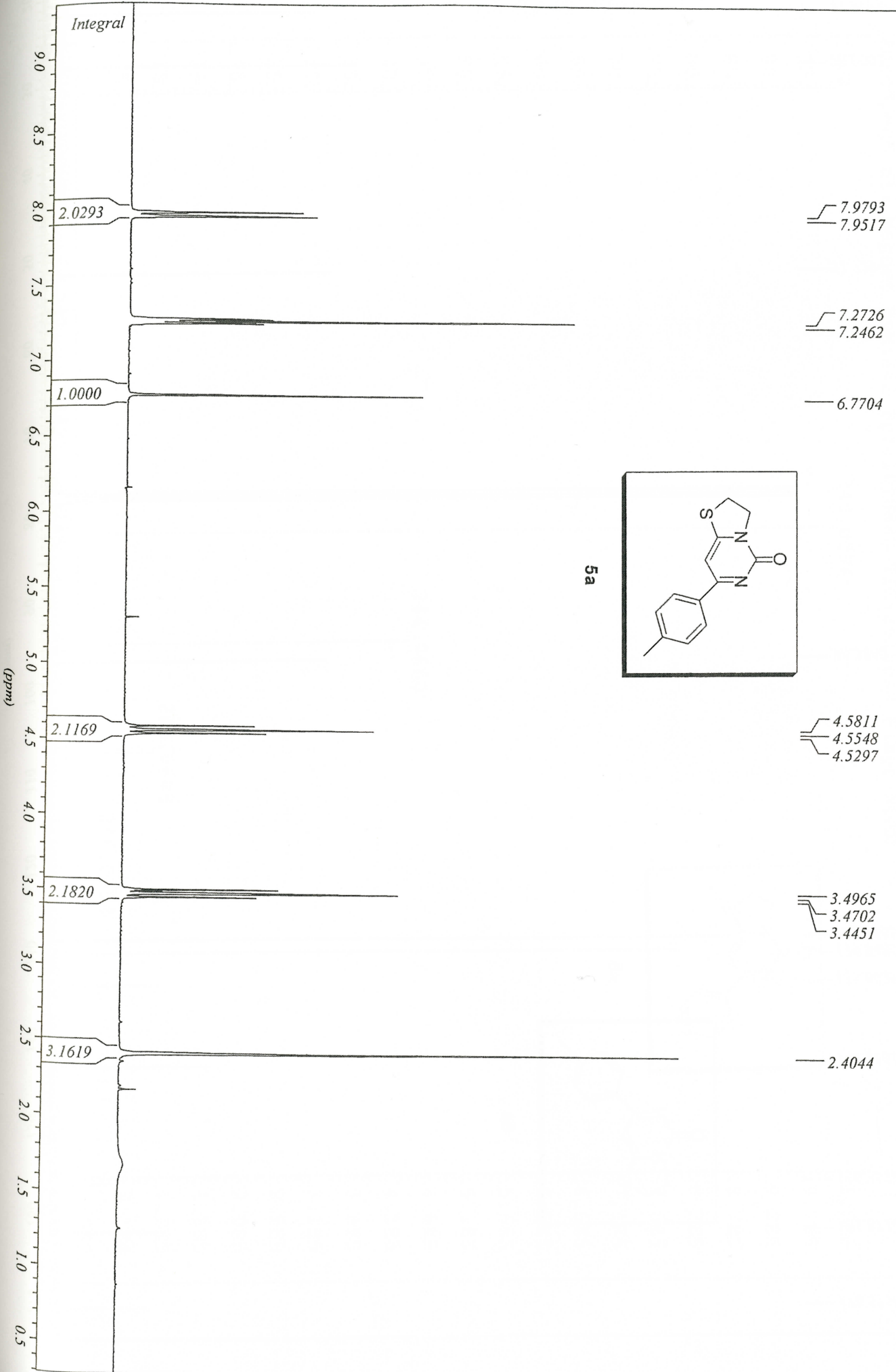
19. Se han obtenido **dos modelos matemáticos por análisis discriminante** ( $DF_1$  y  $DF_2$ ) **que permiten predecir el carácter potencialmente activo o inactivo de nuevos compuestos frente a *Tetranychus urticae***. En el estudio realizado, se observa que si unimos ambos modelos discriminantes, sólo dos compuestos, **17b** y **17j**, serían catalogados como falsos activos, a la par que sólo un compuesto activo (**8e**) se clasificaría erróneamente como inactivo.

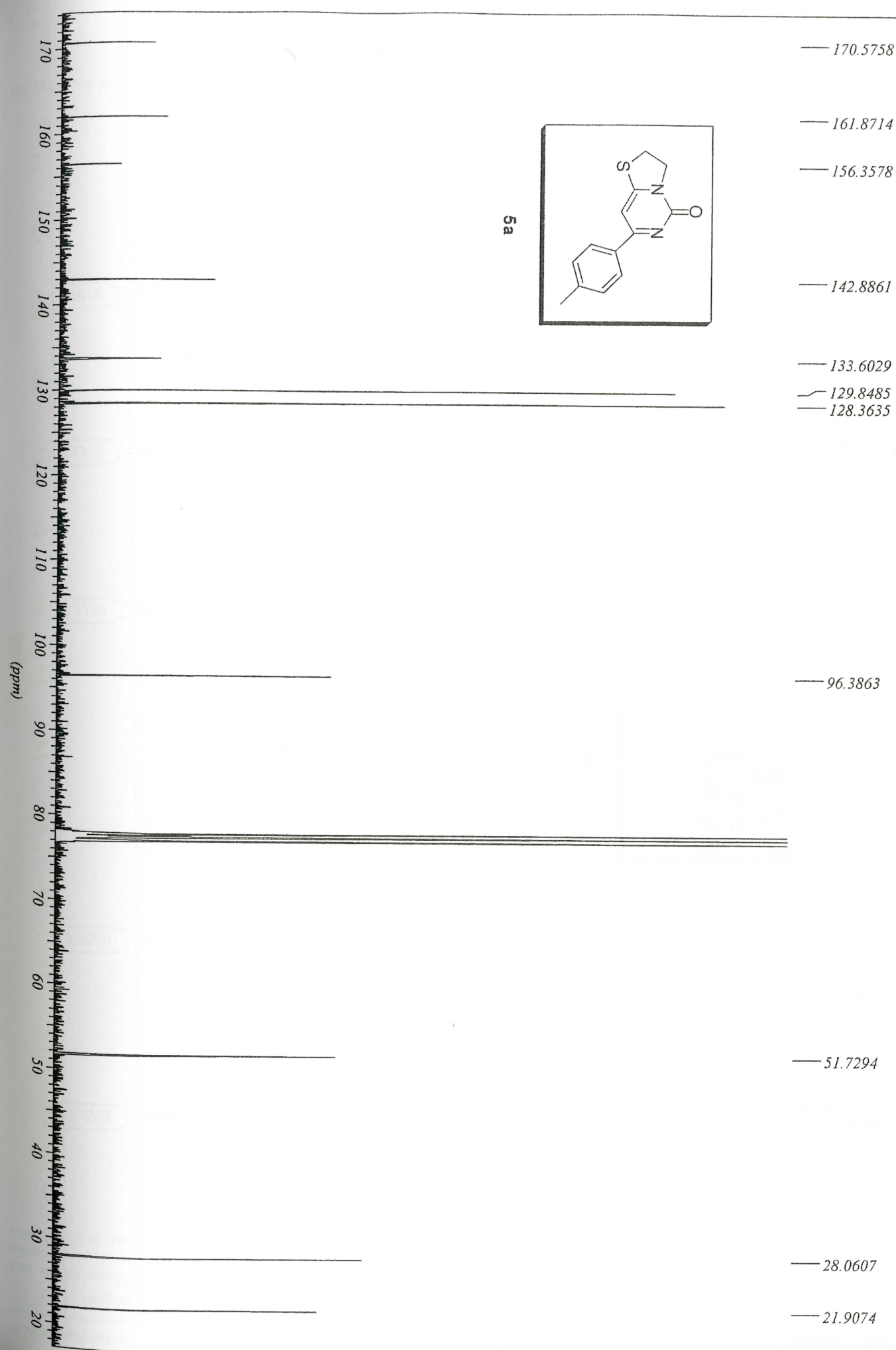
20. Asimismo se ha desarrollado un **tercer modelo** matemático por **correlación multilineal** con carácter predictivo de propiedad, en concreto de la **eficacia adulticida** sobre araña roja. Este modelo corrige parcialmente los anteriores ya que caracteriza el compuesto **8e** como activo.

21. **El mejor criterio a la hora de aplicar el estudio topológico** sería una vez escogidas por análisis discriminante las moléculas teóricamente activas aunando las predicciones de los dos modelos discriminantes ( $DF_1$  y  $DF_2$ ) aplicar el tercer modelo predictivo de actividad (eficacia adulticida). En conjunto disponemos de una herramienta muy sensible, capaz de discriminar dando como activos los que han de serlo y moderadamente específica (yerra ocasionalmente en los inactivos) que puede facilitar mucho la búsqueda de nuevos compuestos acaricidas.

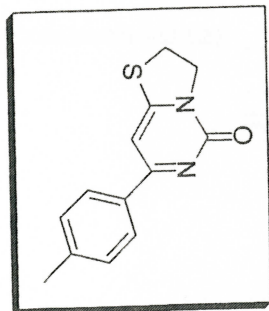
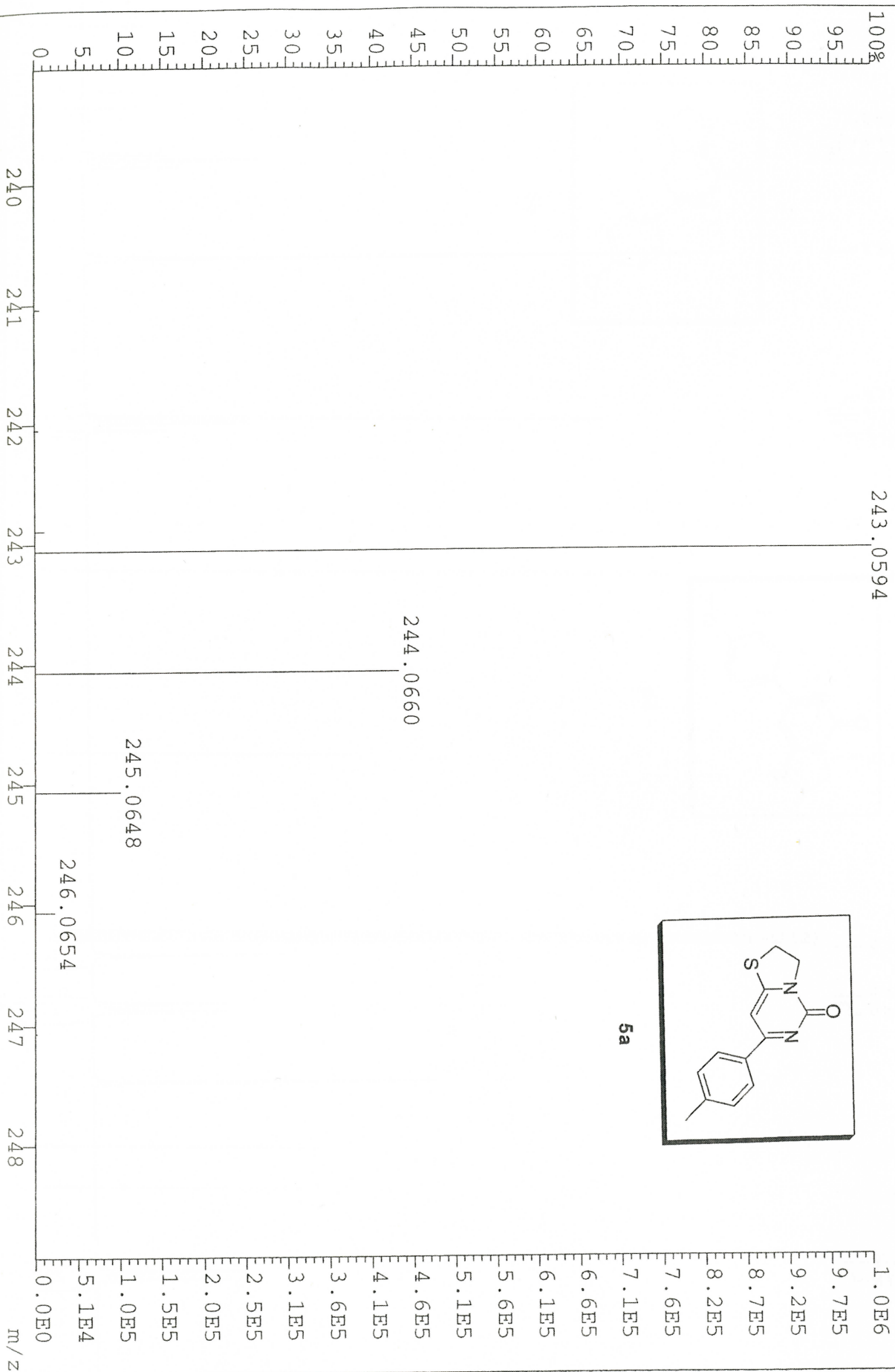
## ***Apéndice***



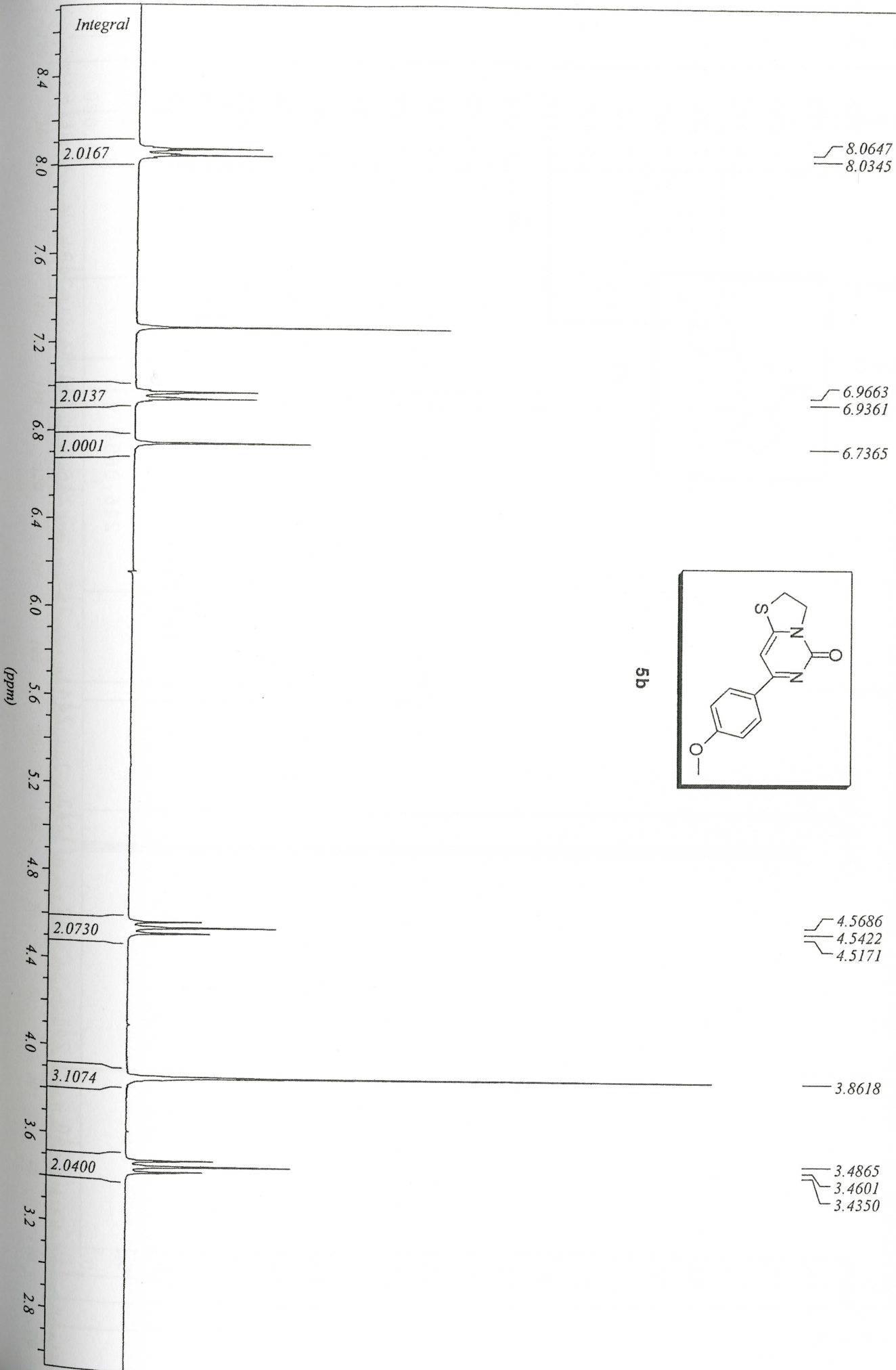


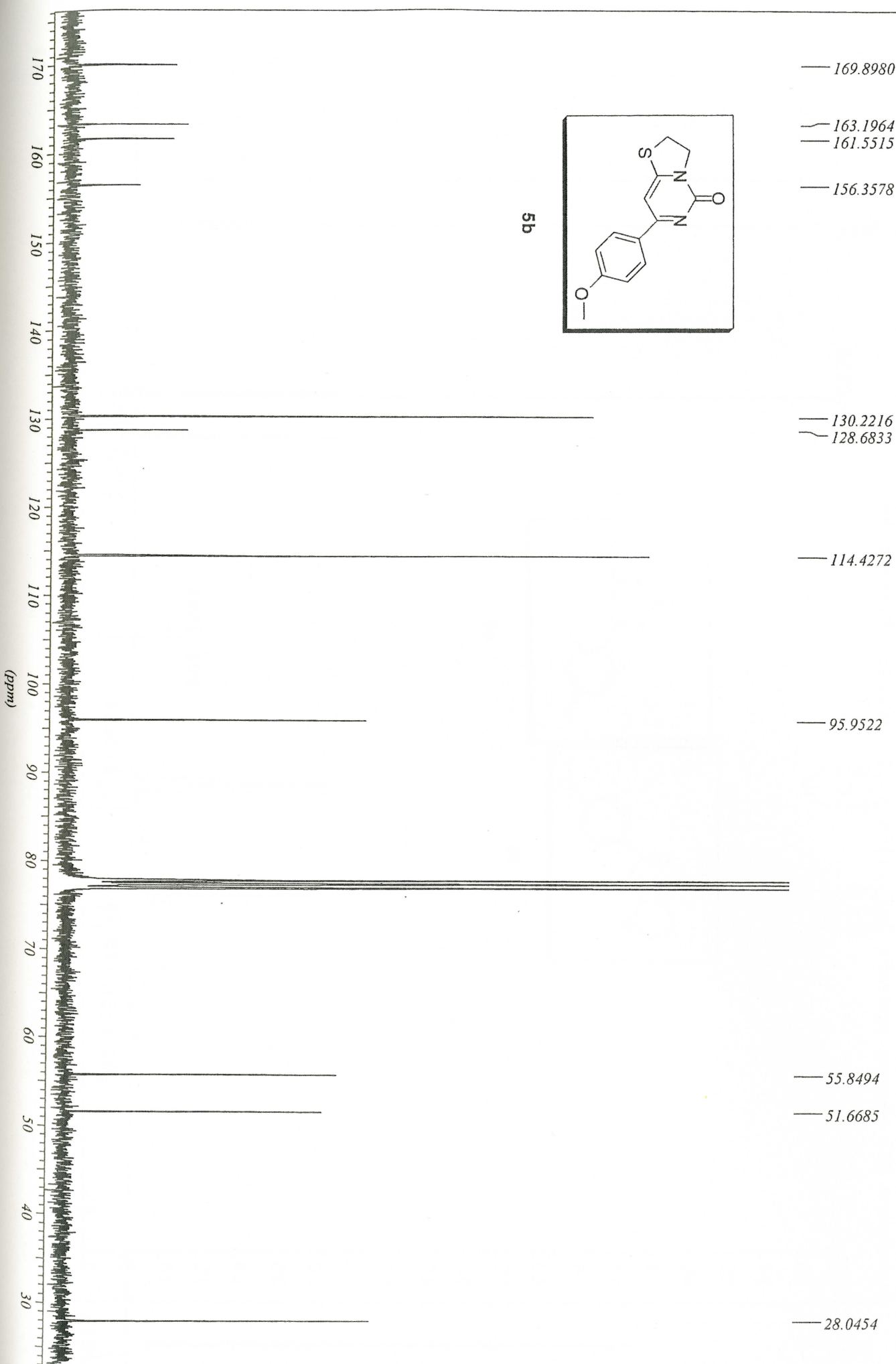


AutospecEI+ Magnet BPM:243 BPI:1018880 TIC:2615032 Flags:NORM

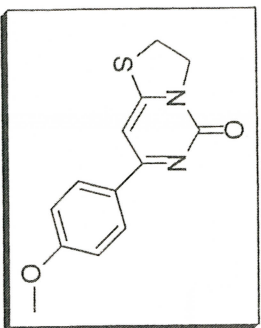


5a

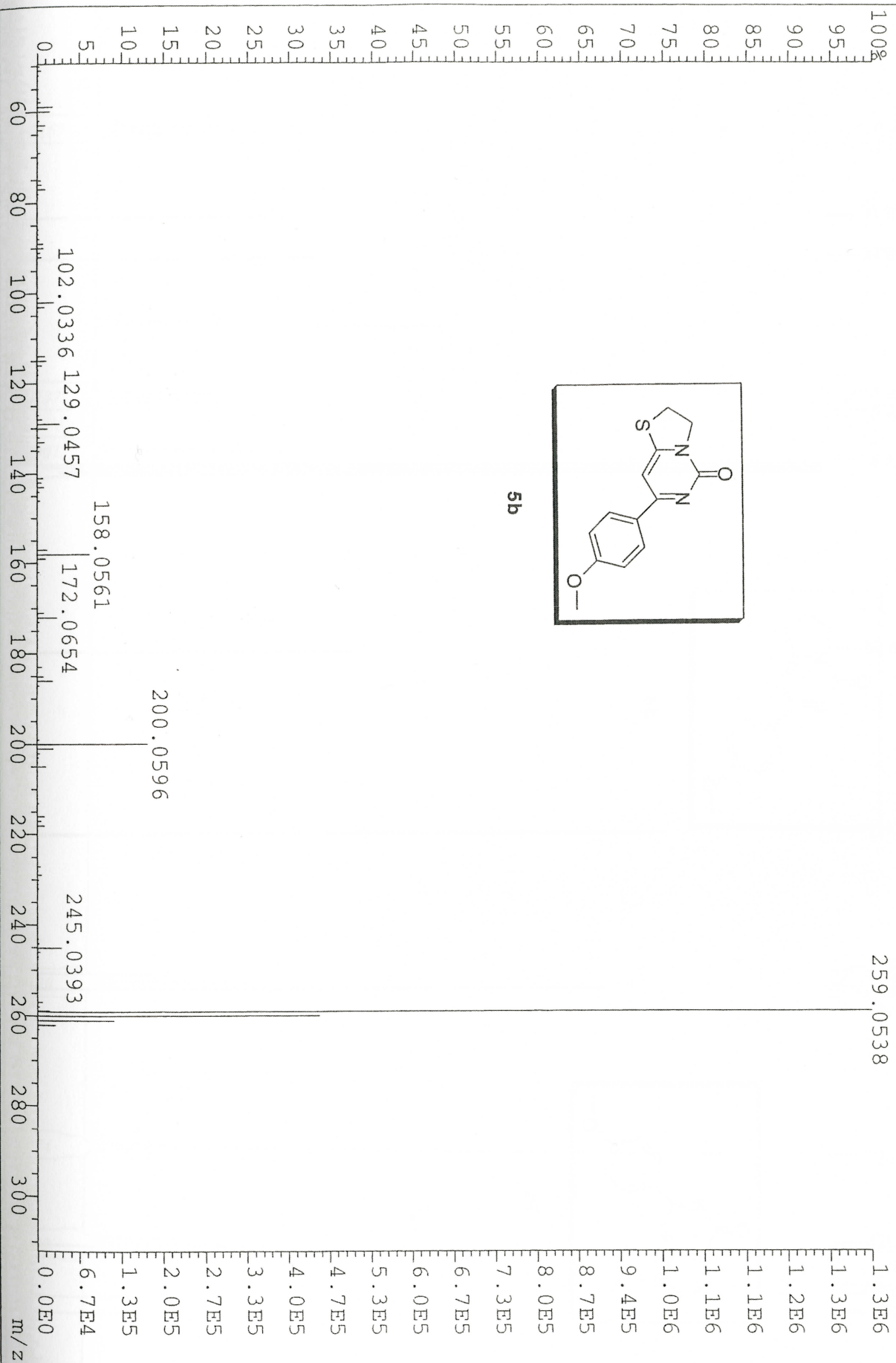




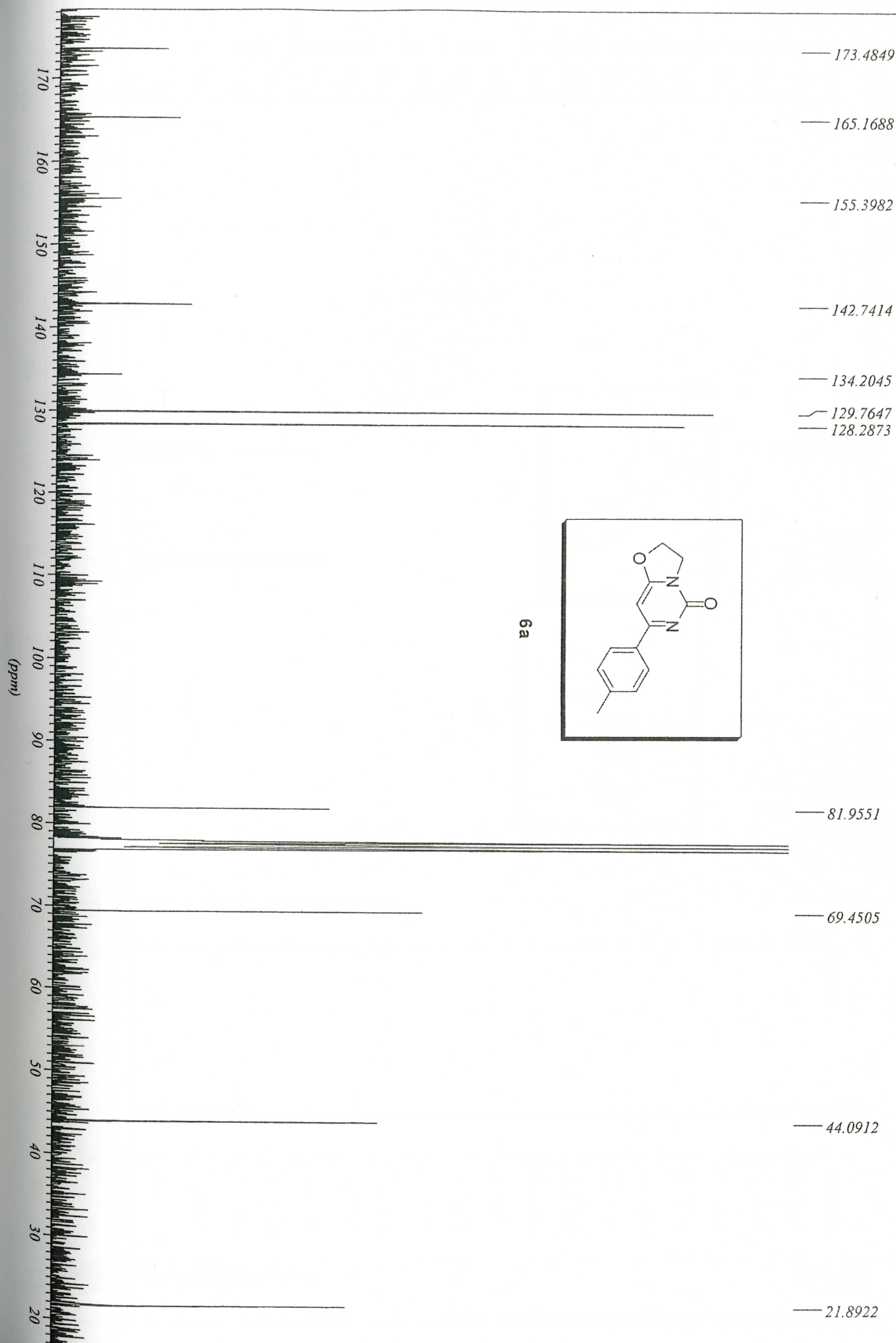


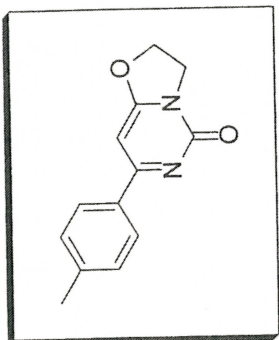


5b

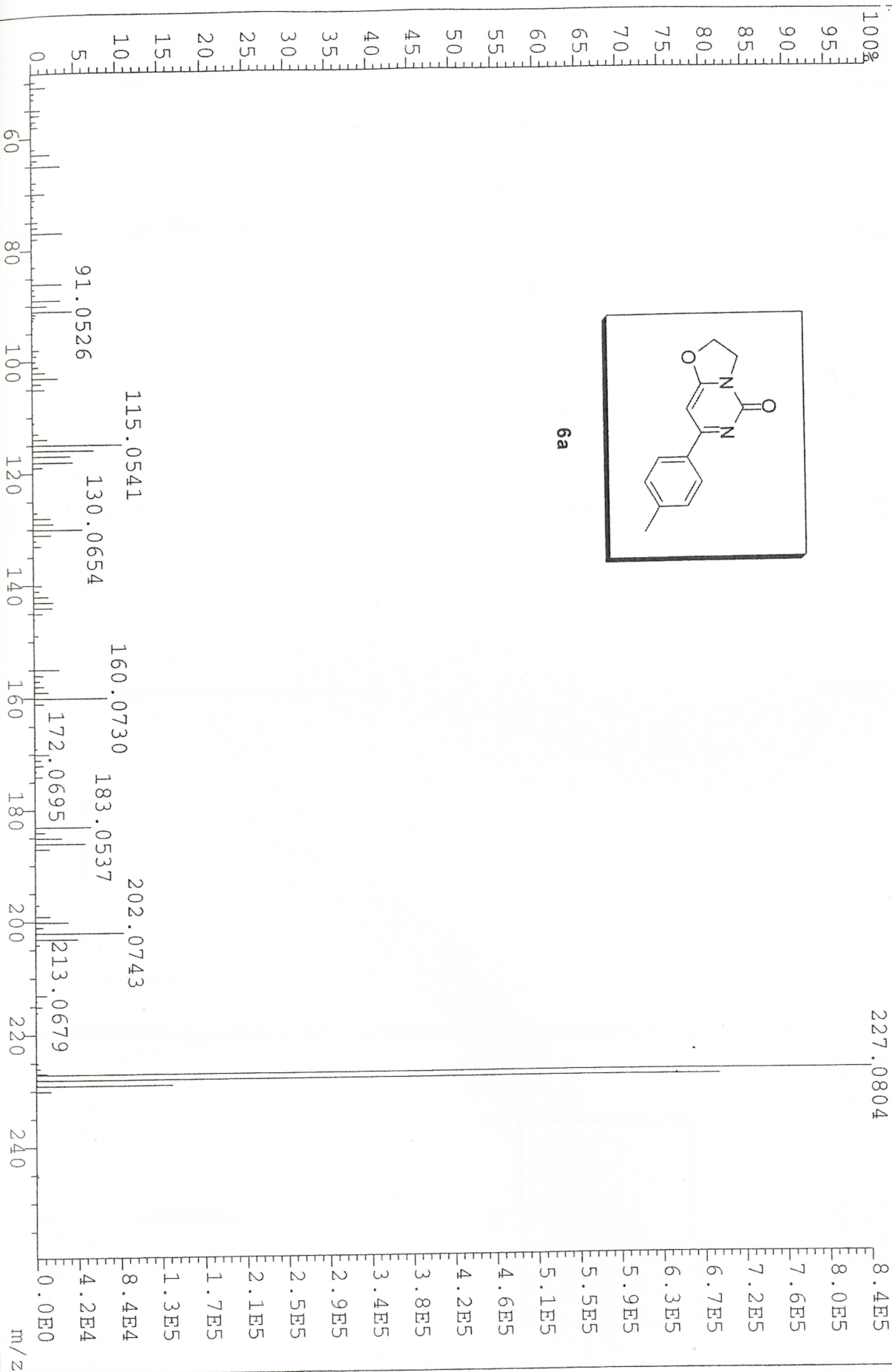


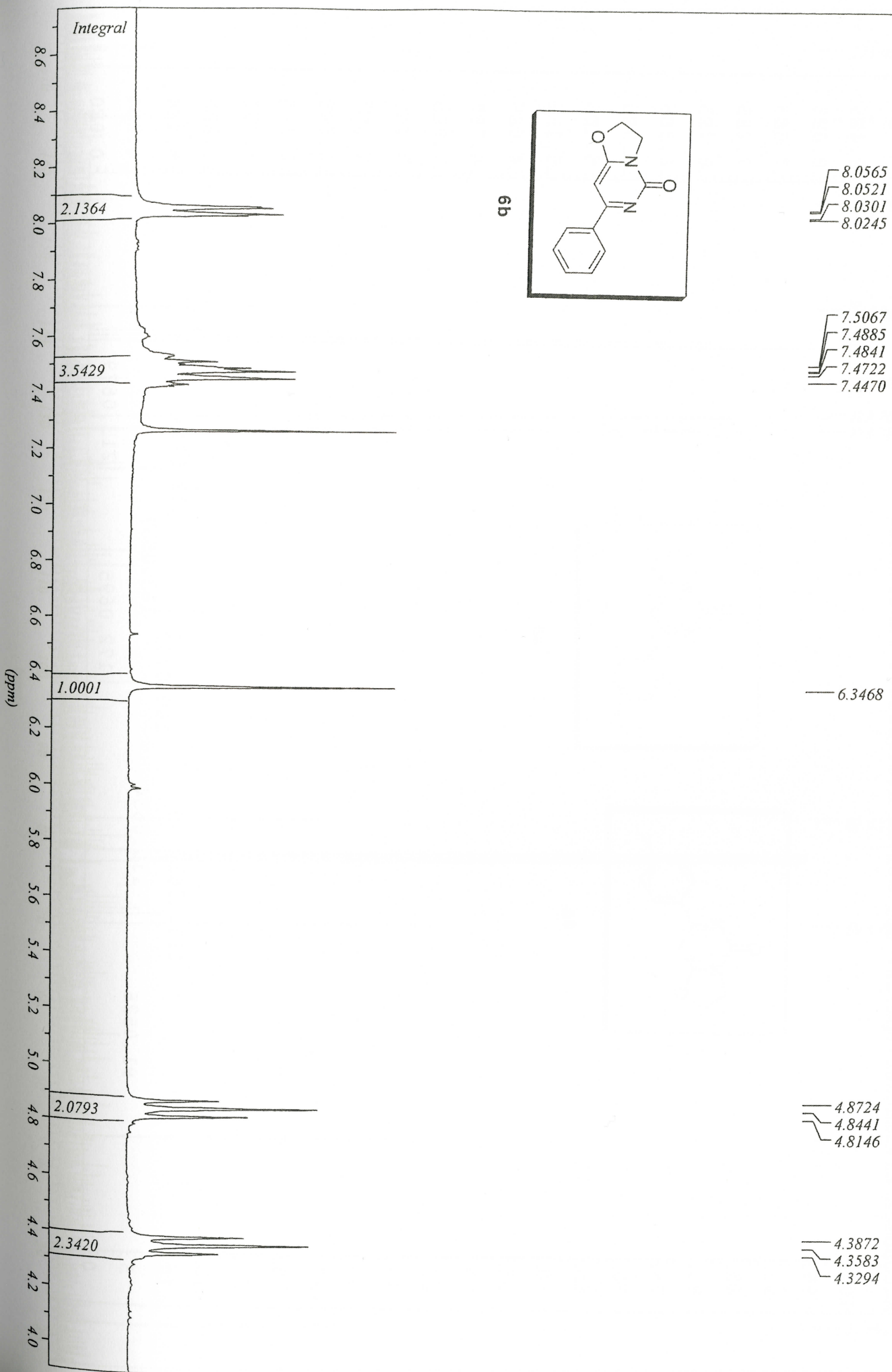


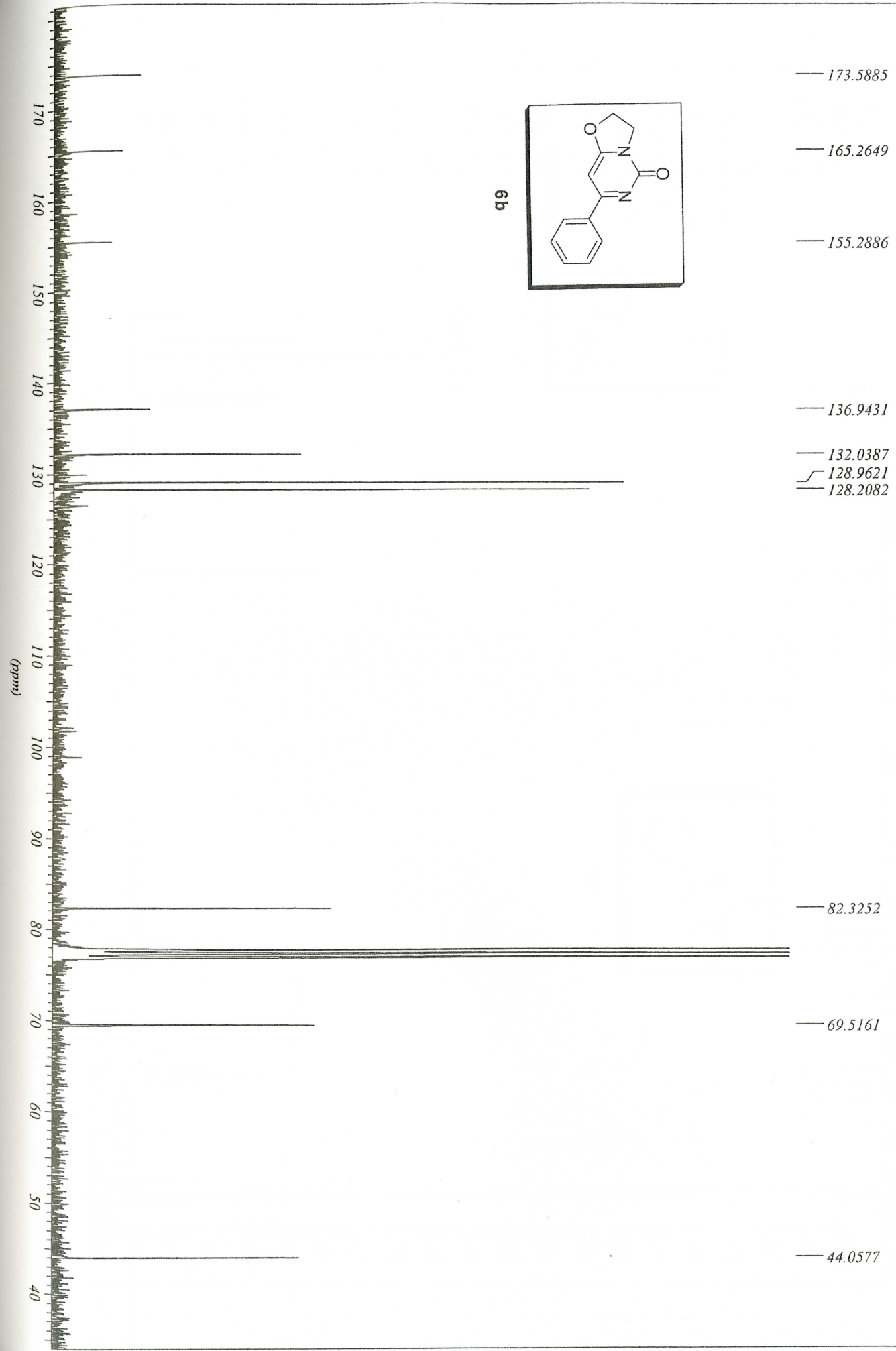




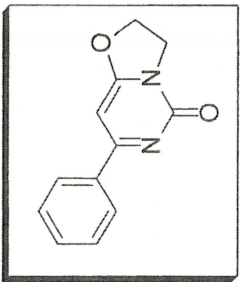
6a





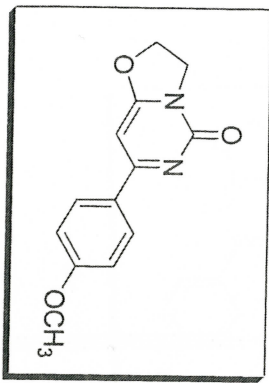
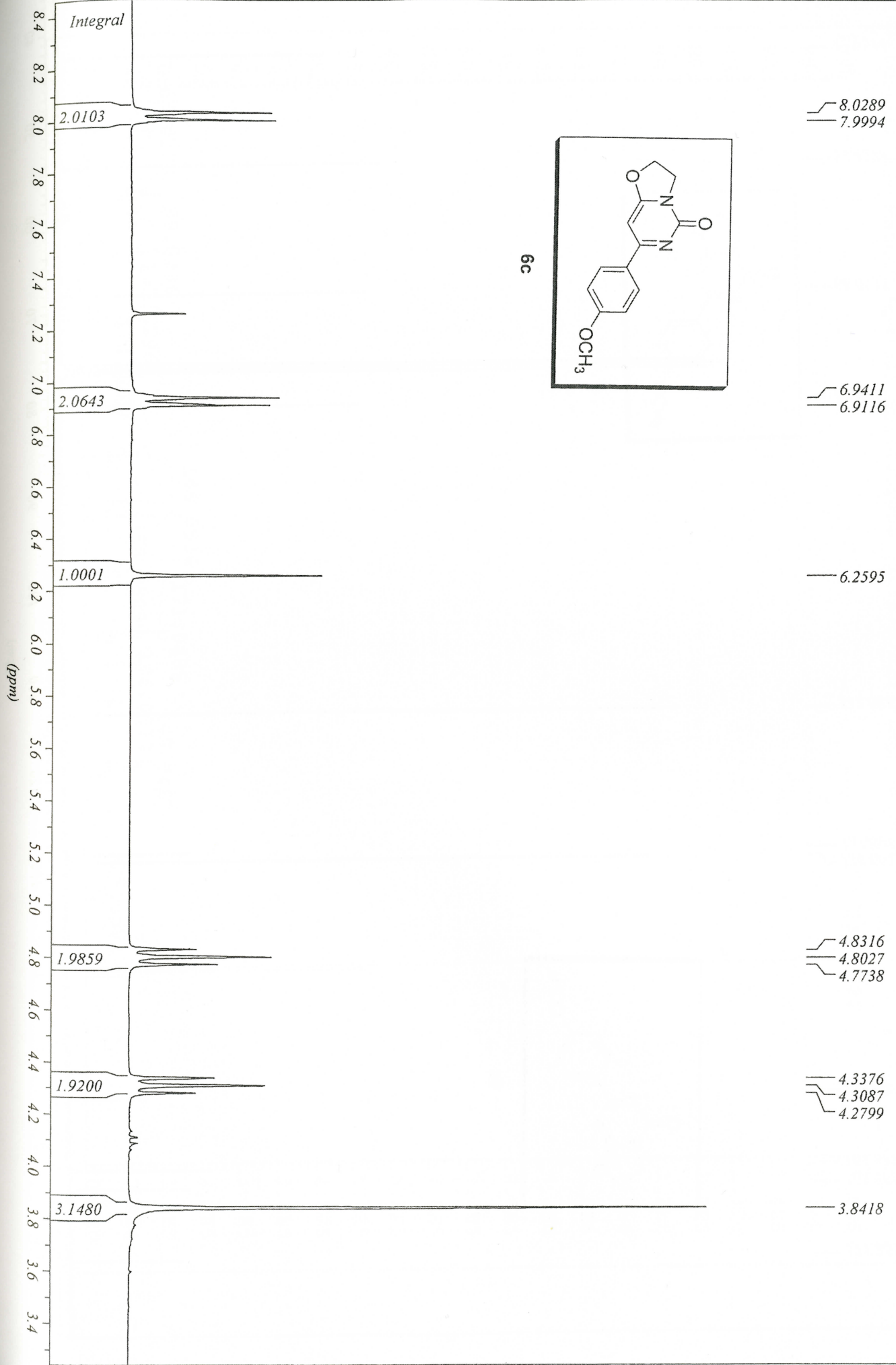






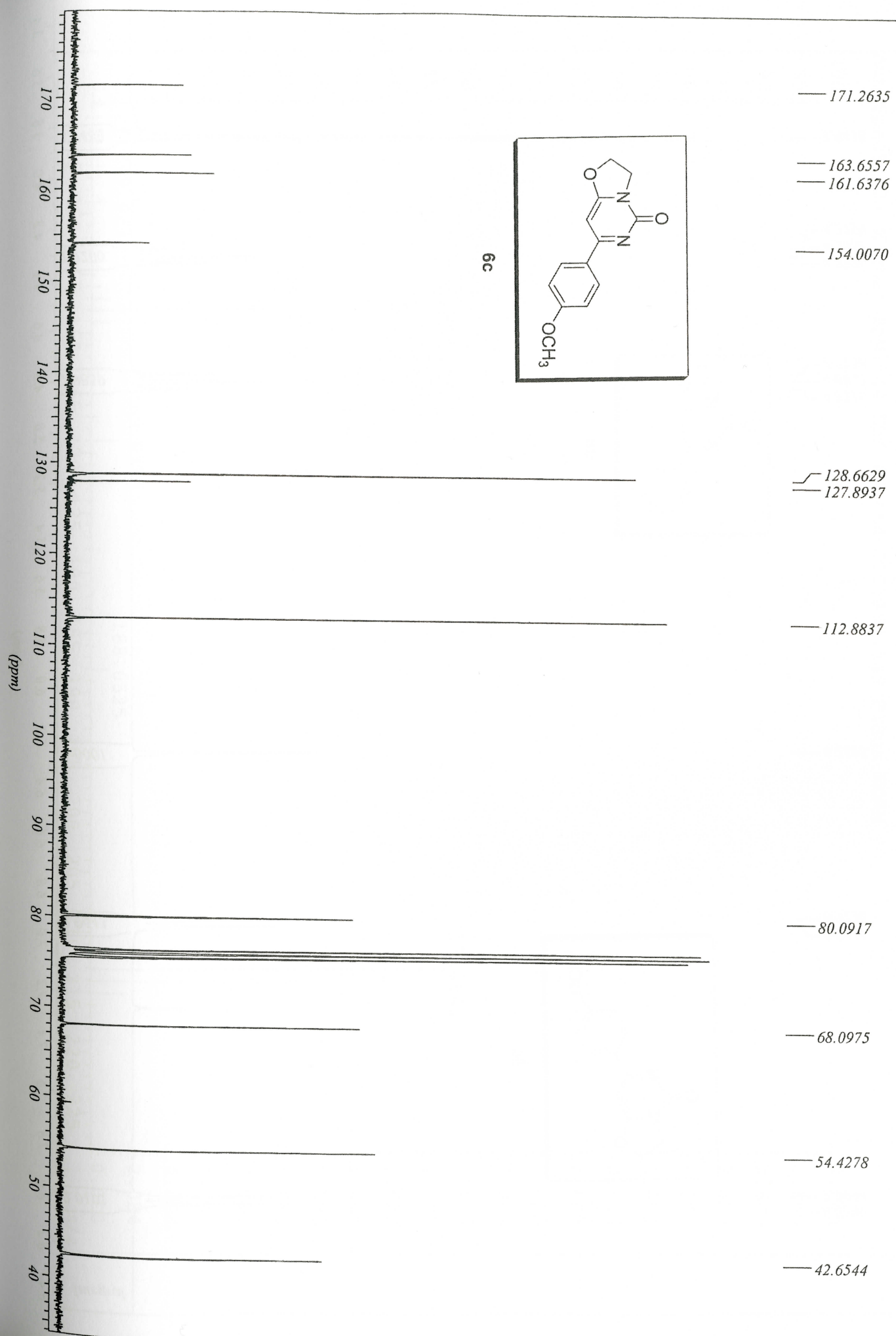
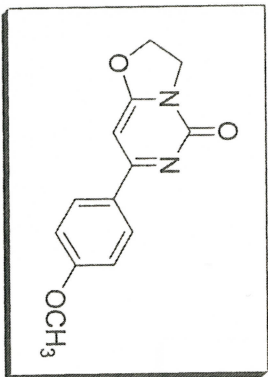
6b

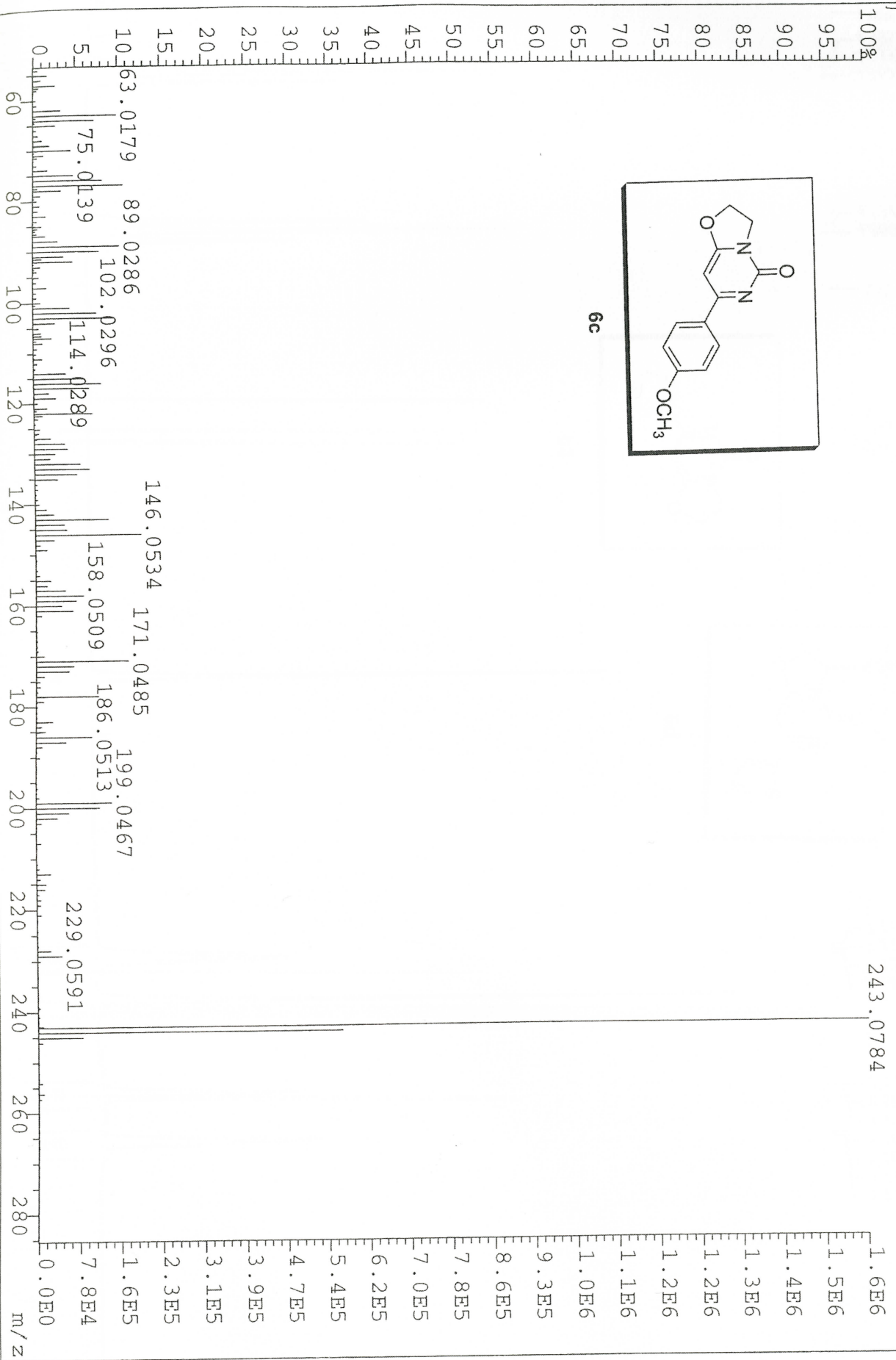
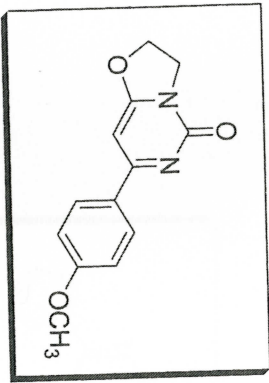




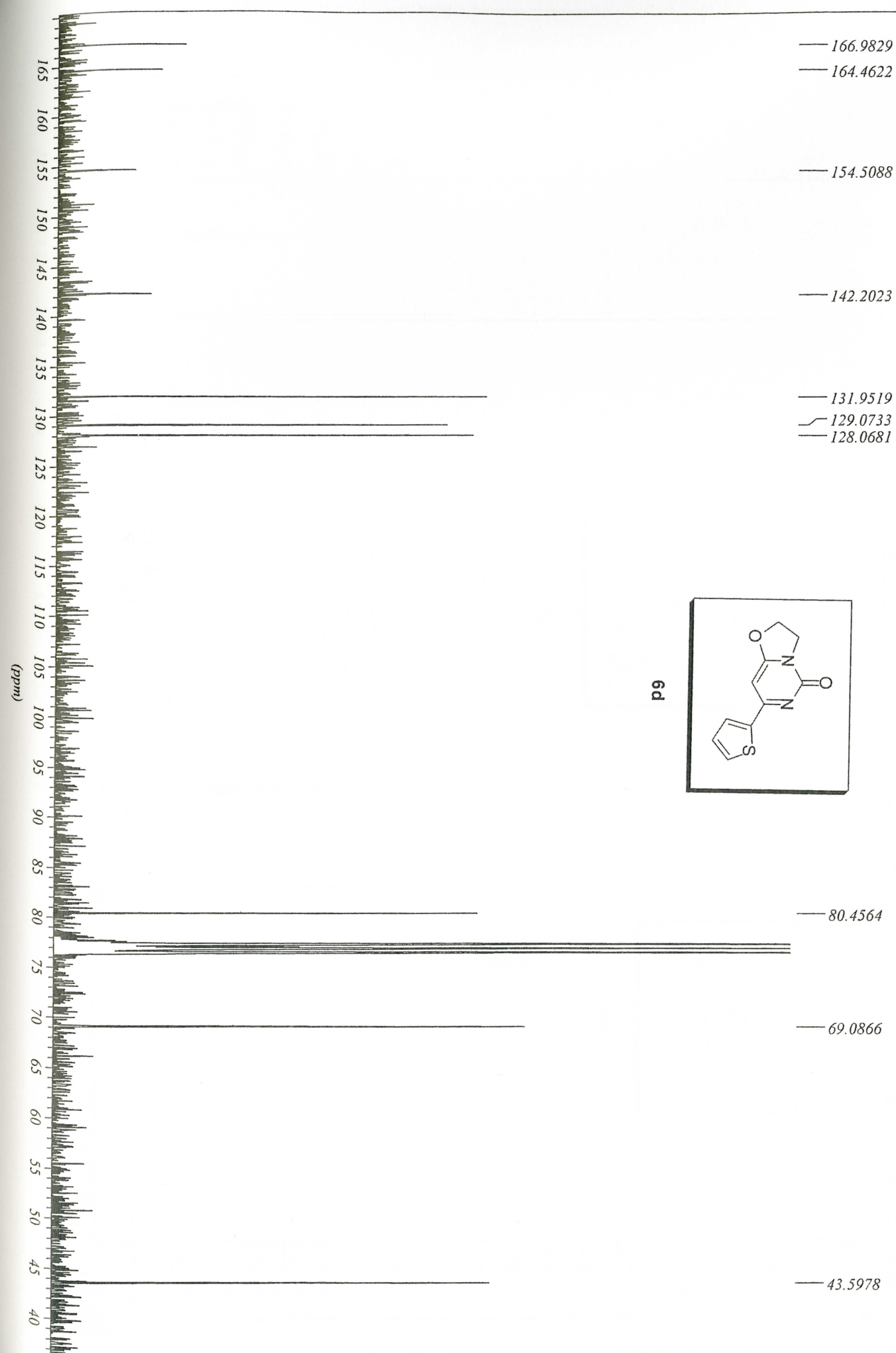
6c



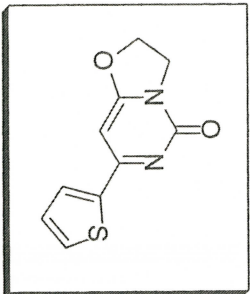




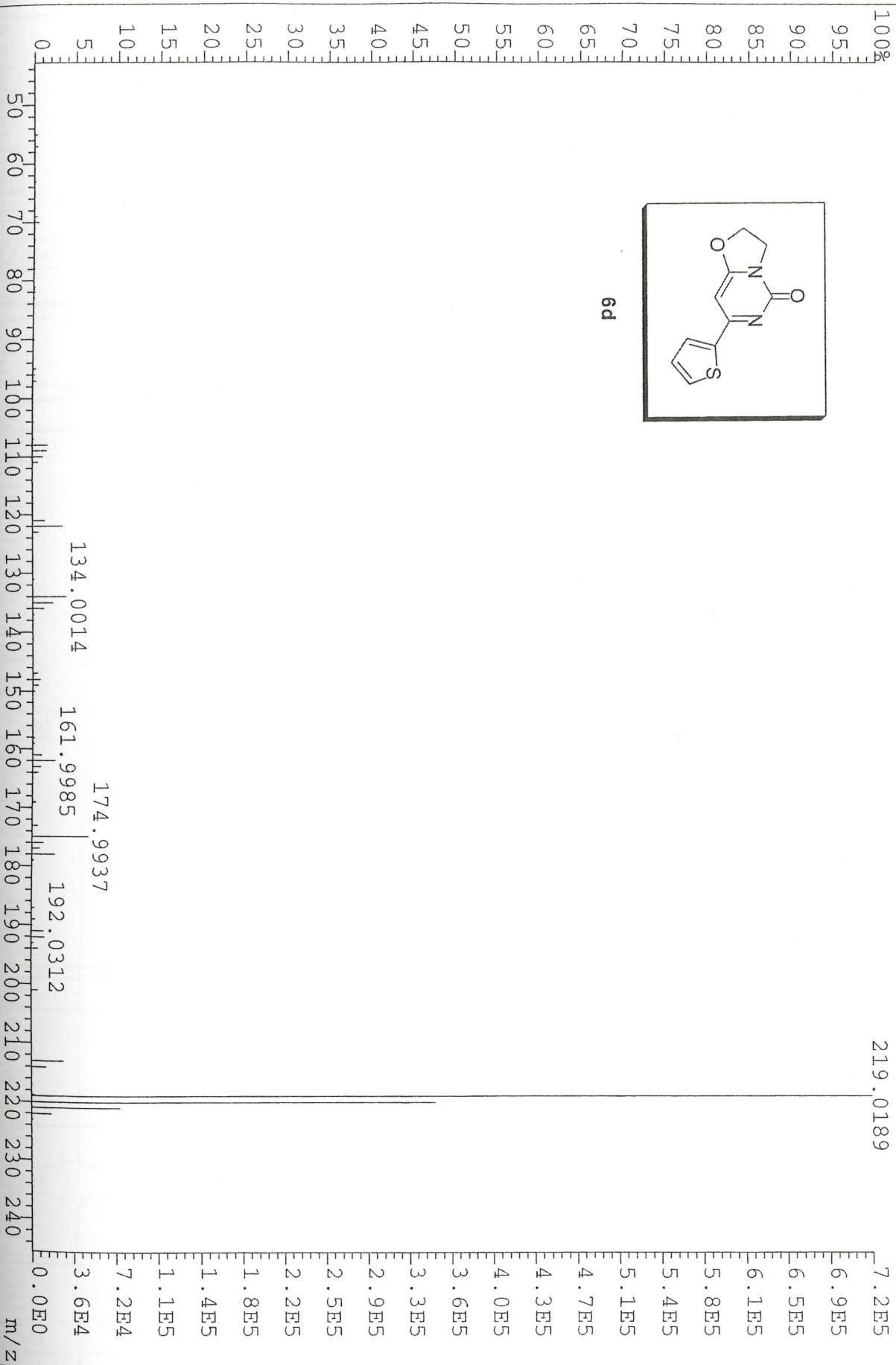


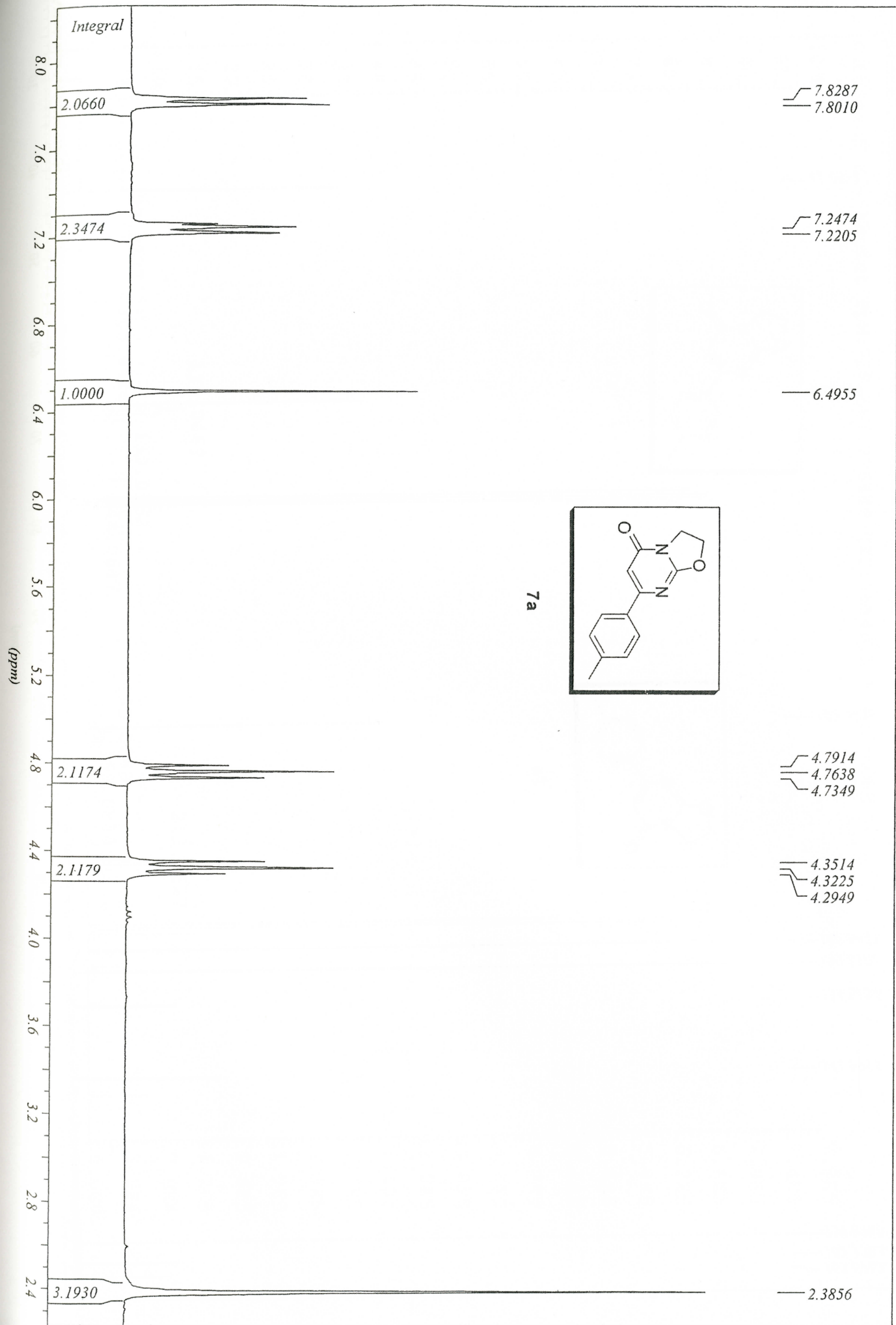


AutoSpecE EI+ Magnet BpM:219 BpI:723456 TIC:1594394 Flags:NORM

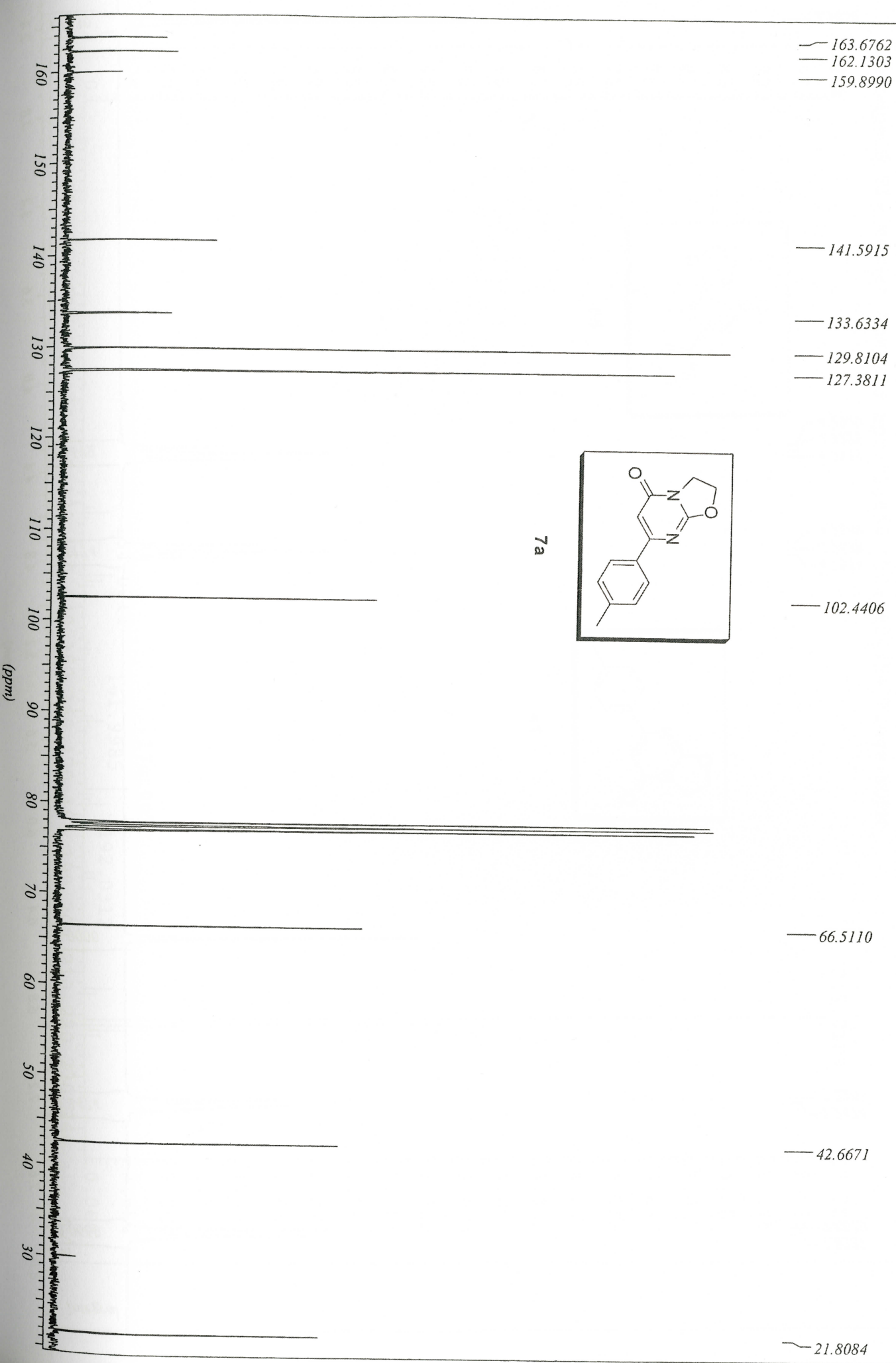


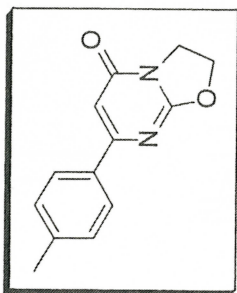
6d



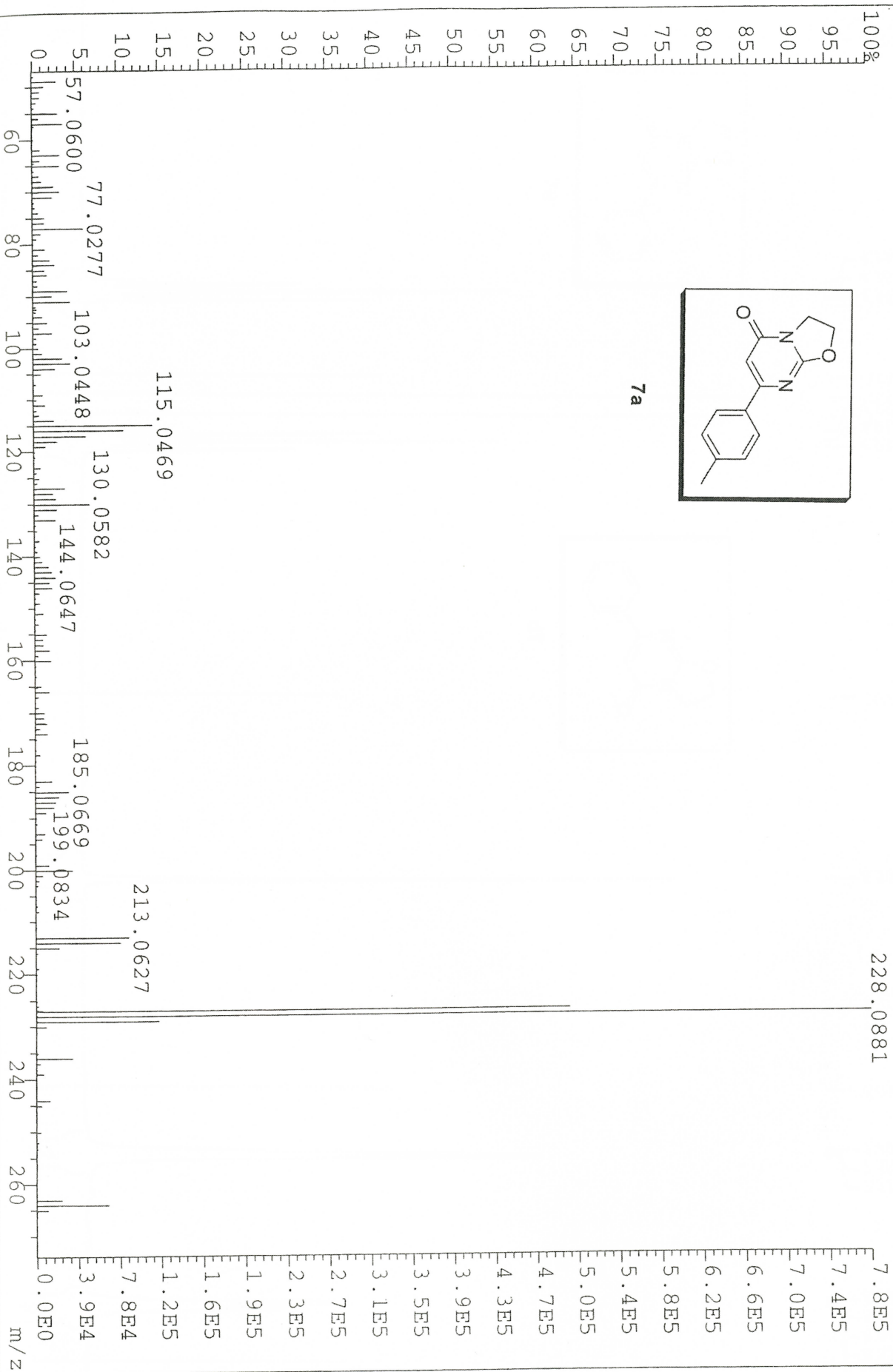




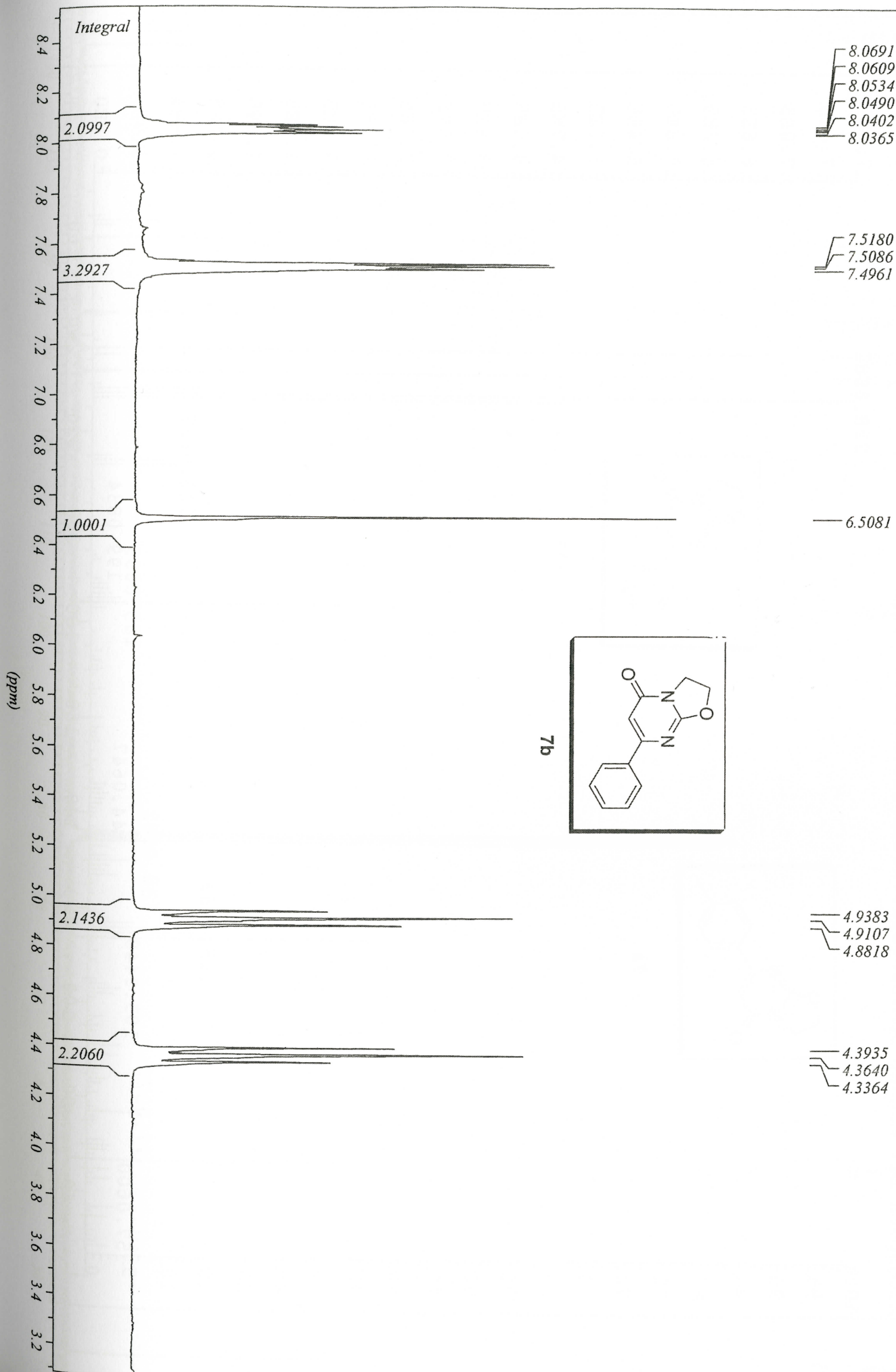


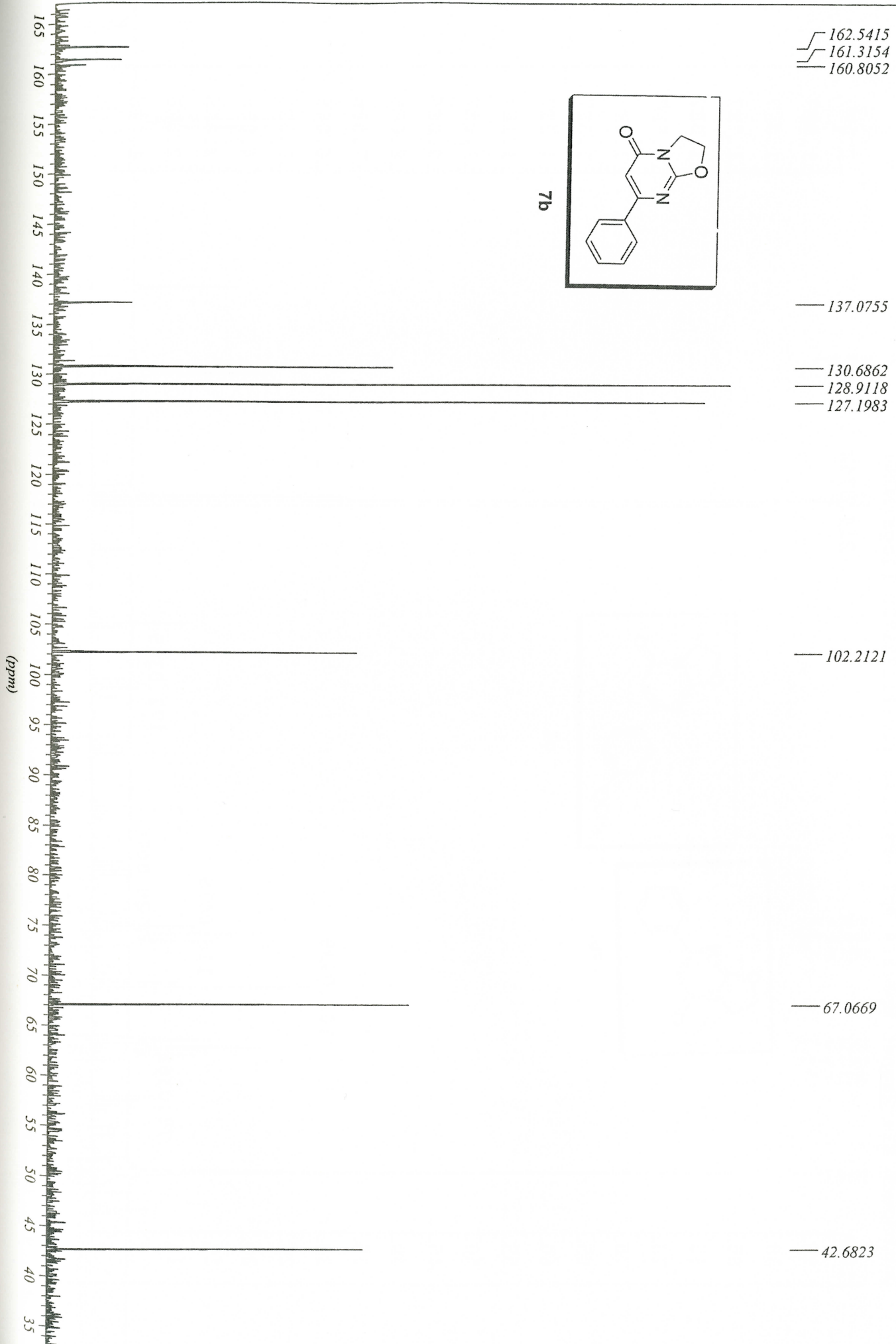


7a



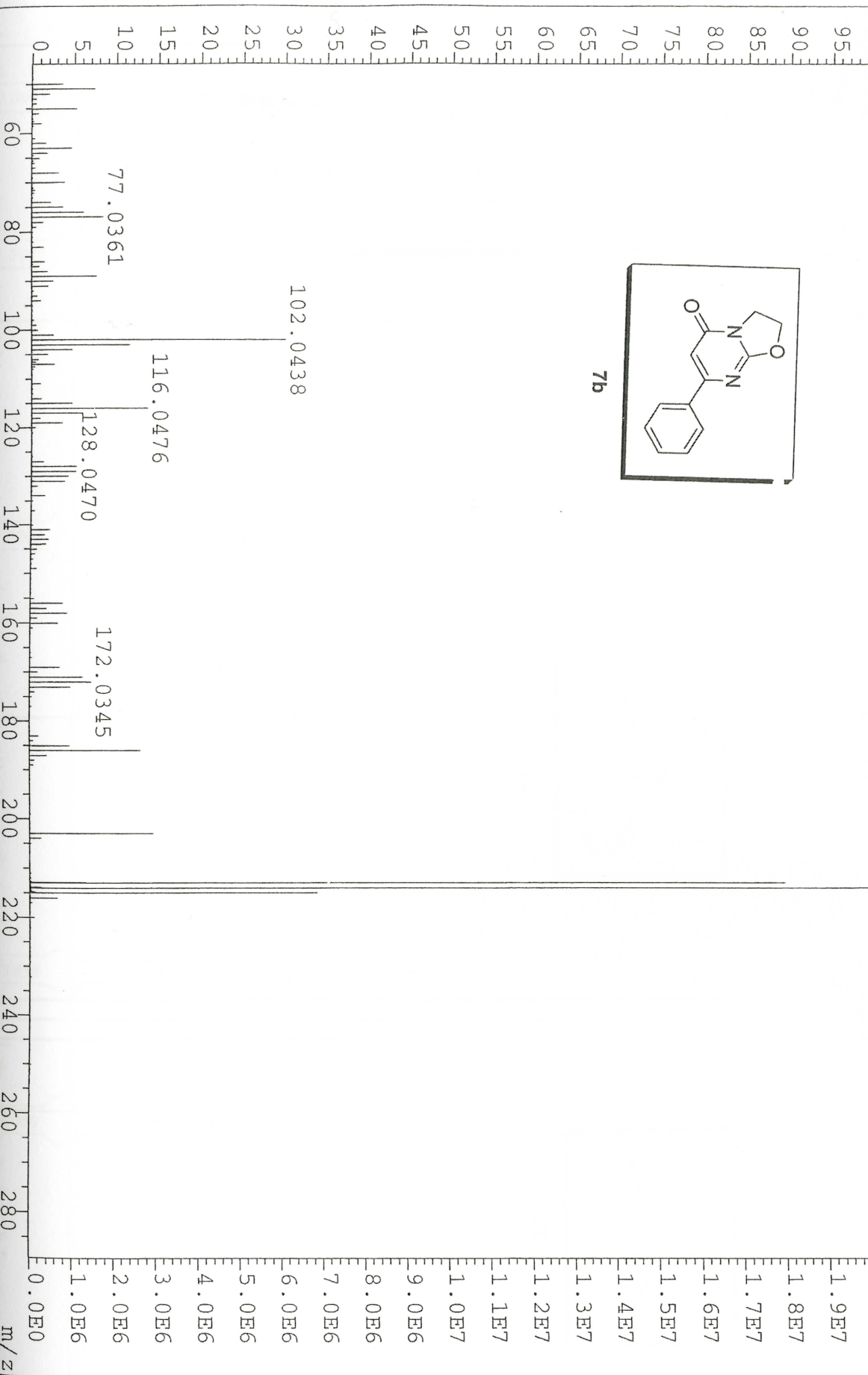
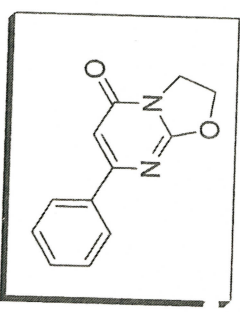


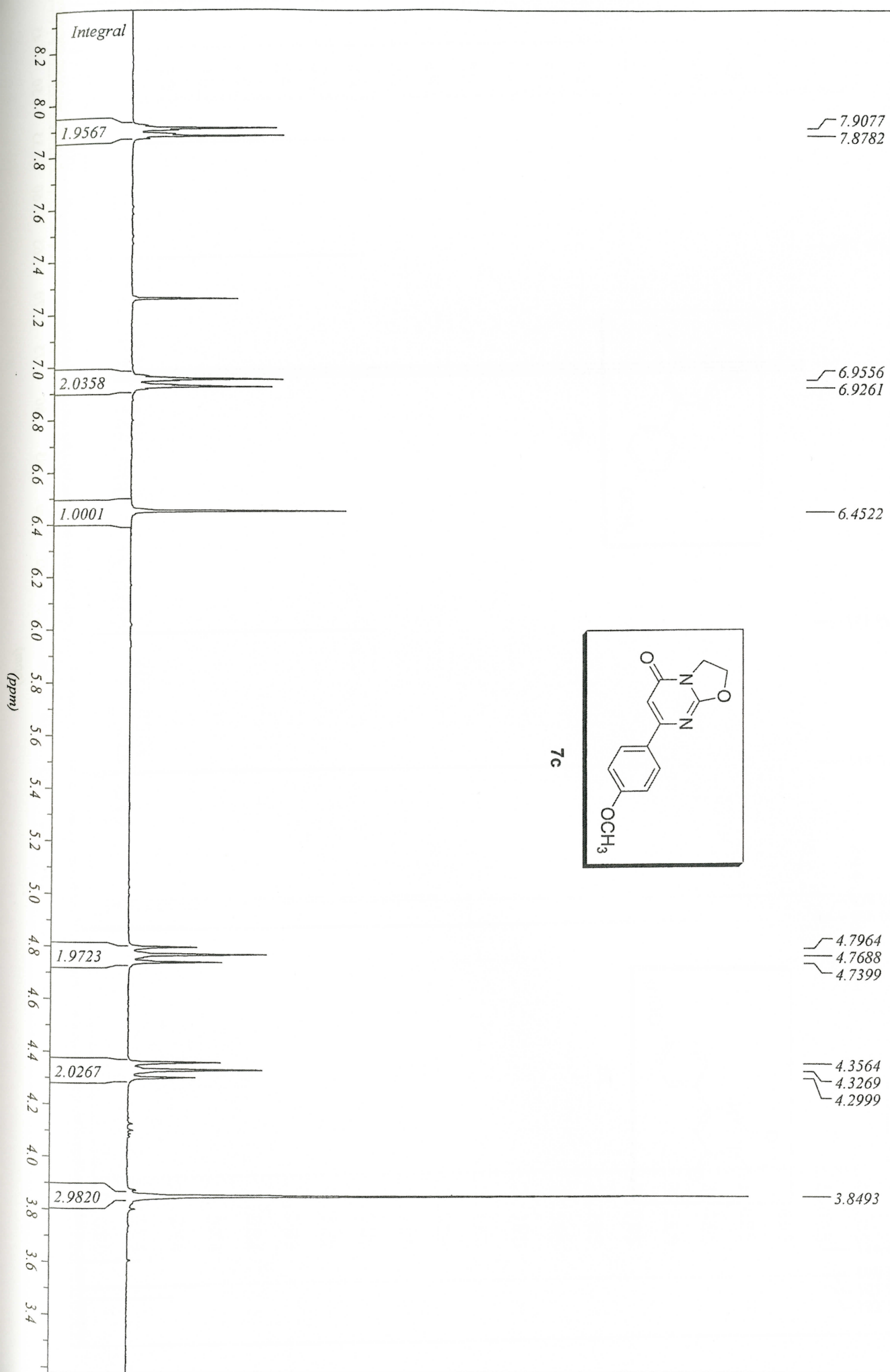


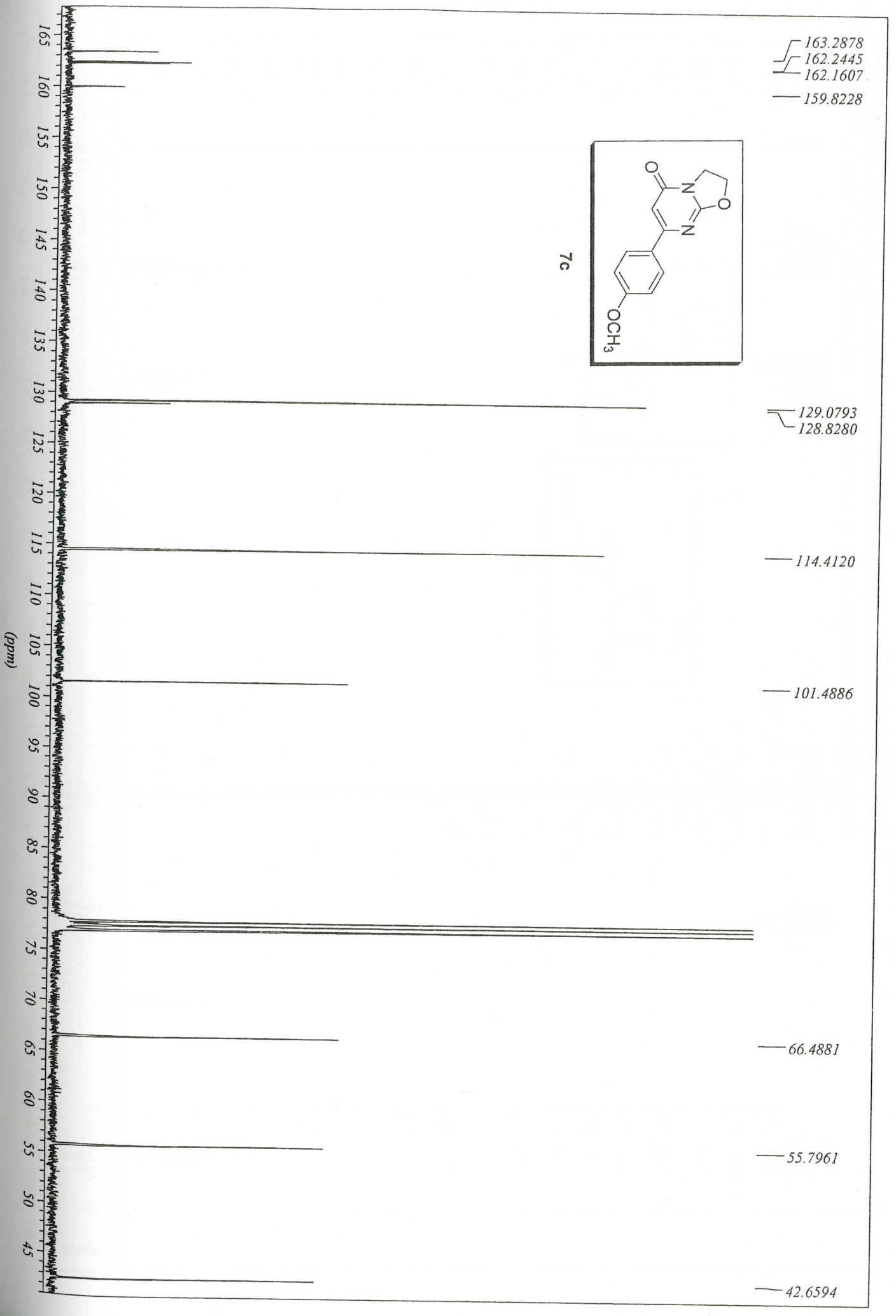


AutoSpecF EI+ Magnet BpM:214 BpI:19931136 TIC:111721720 Flags:NORM

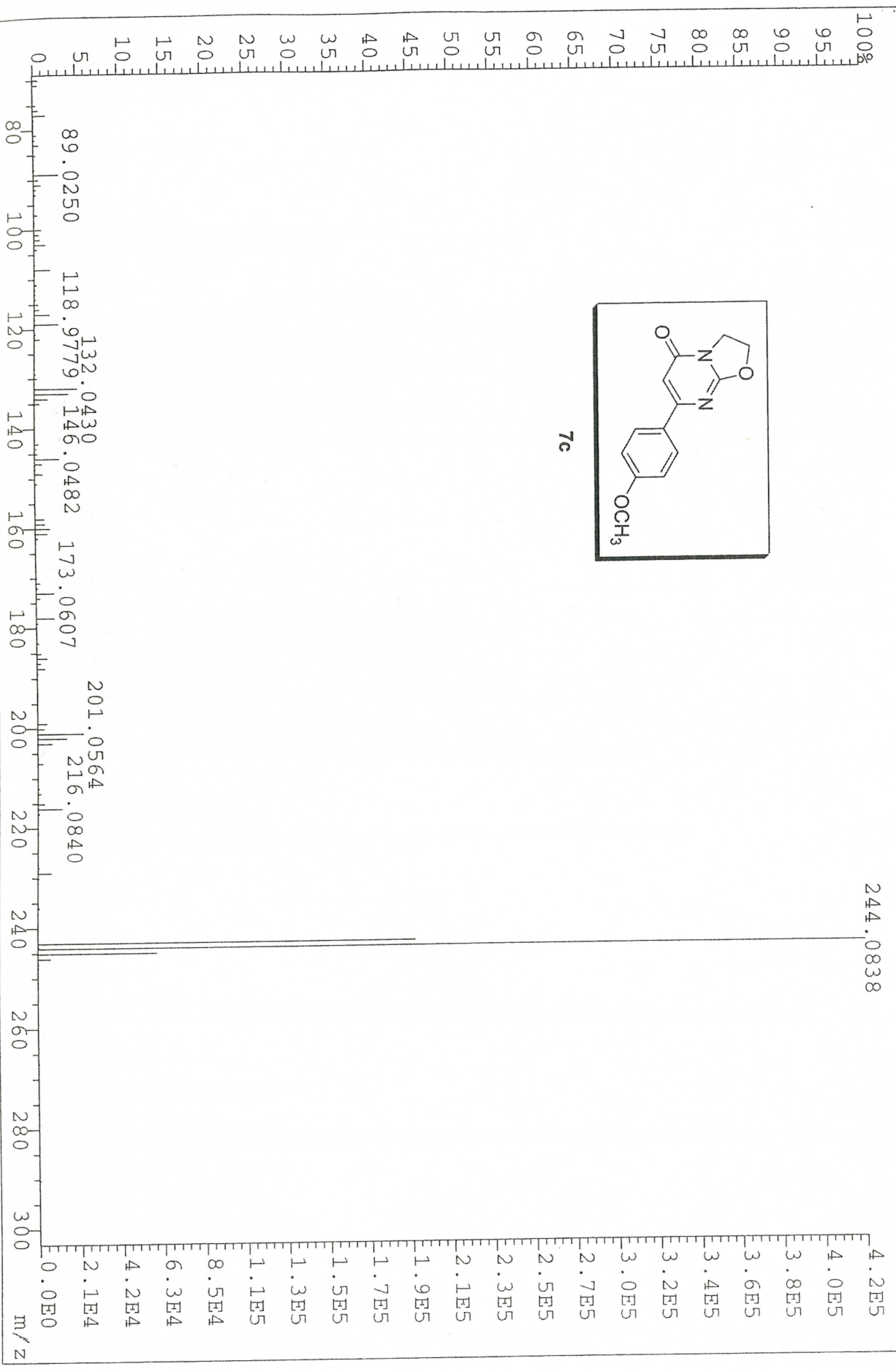
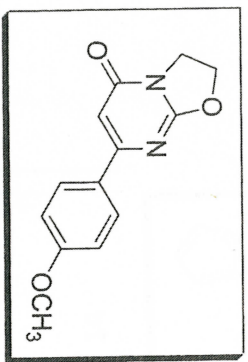
100% 214.0742 2.0E7



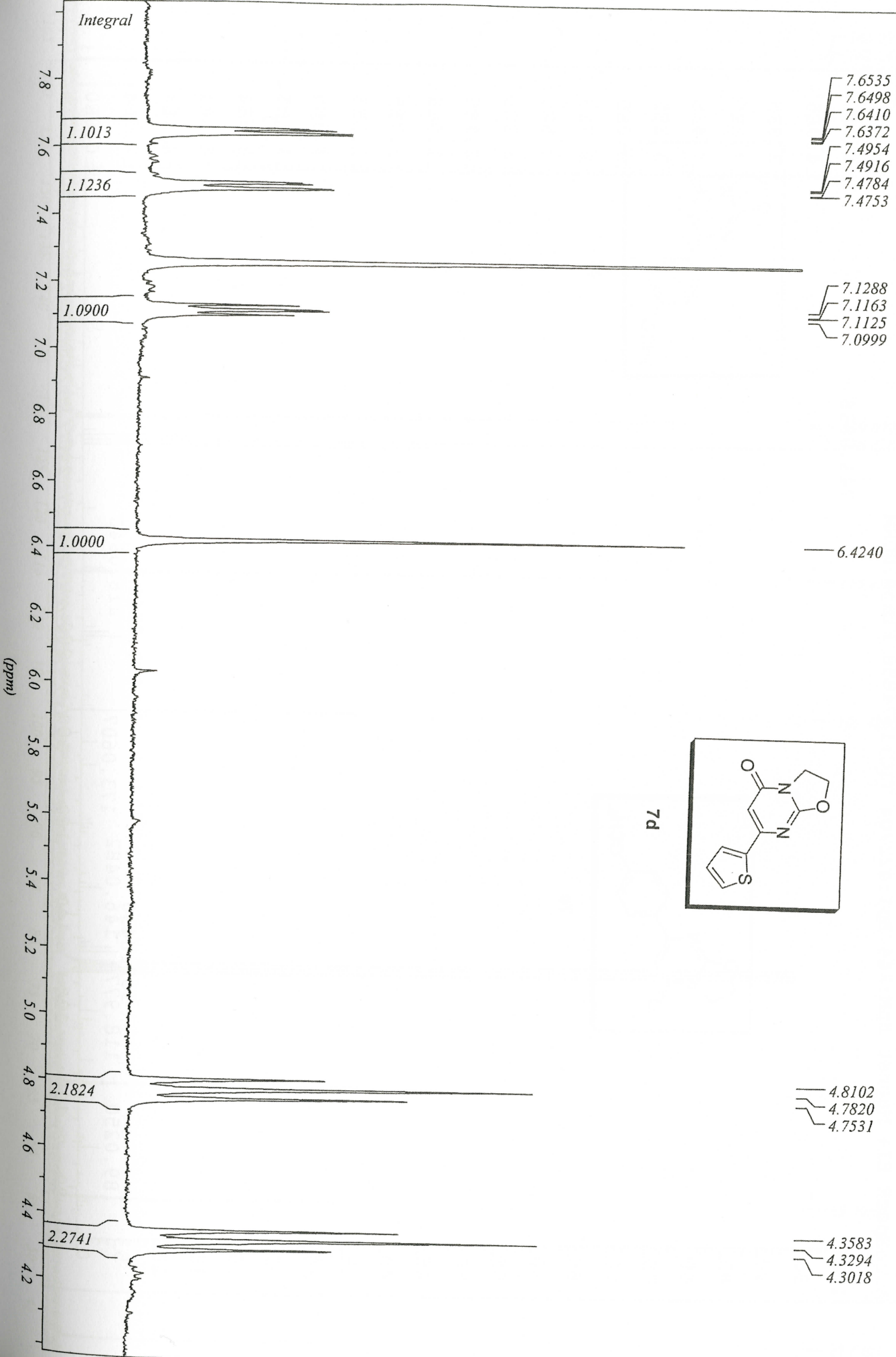


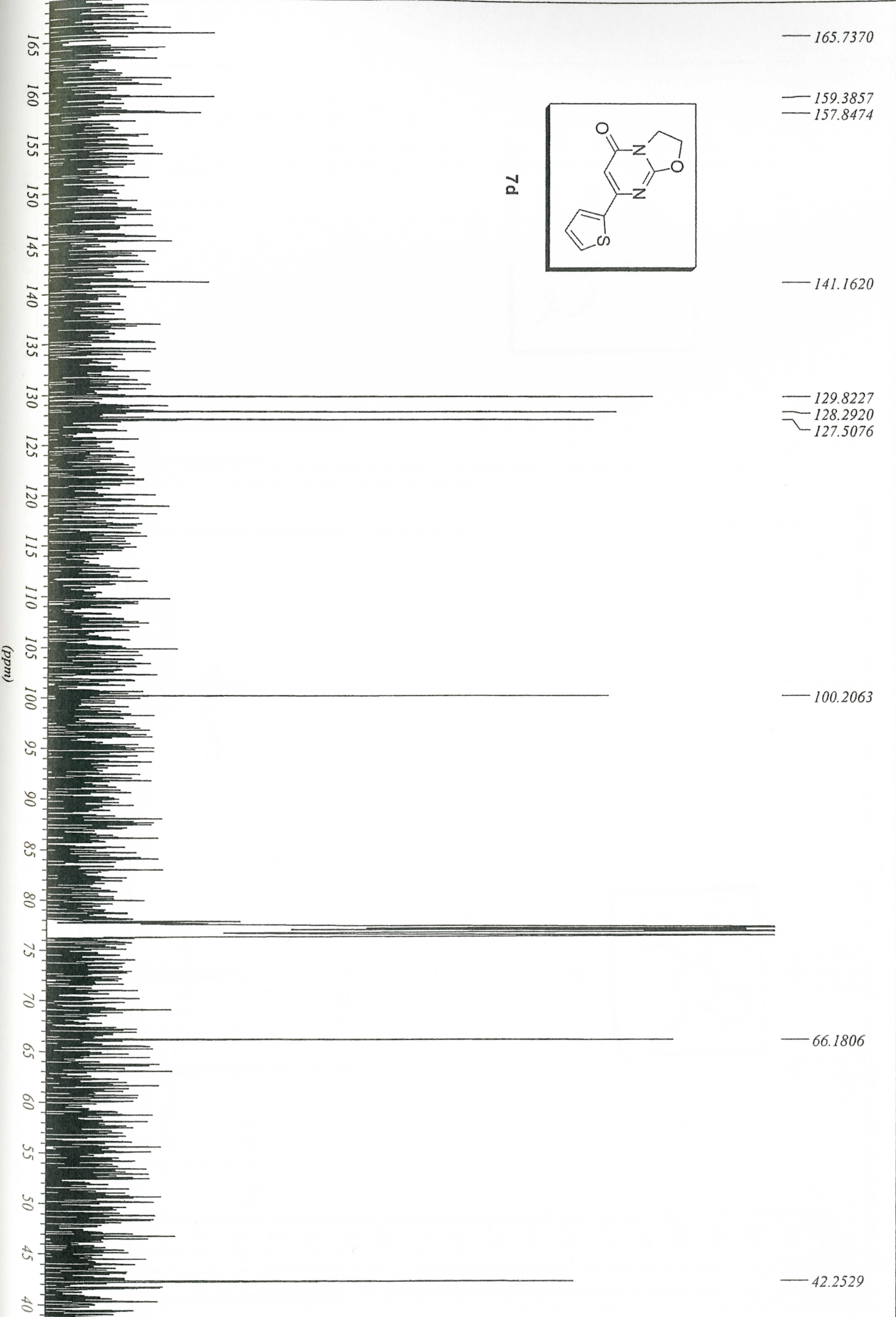


AutoSpecE EI+ Magnet BpM:244 BpI:422/04 TIC:1174858 Flags:NORM

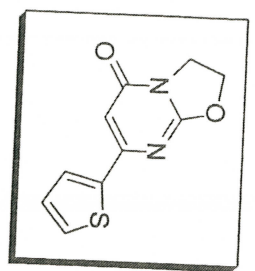




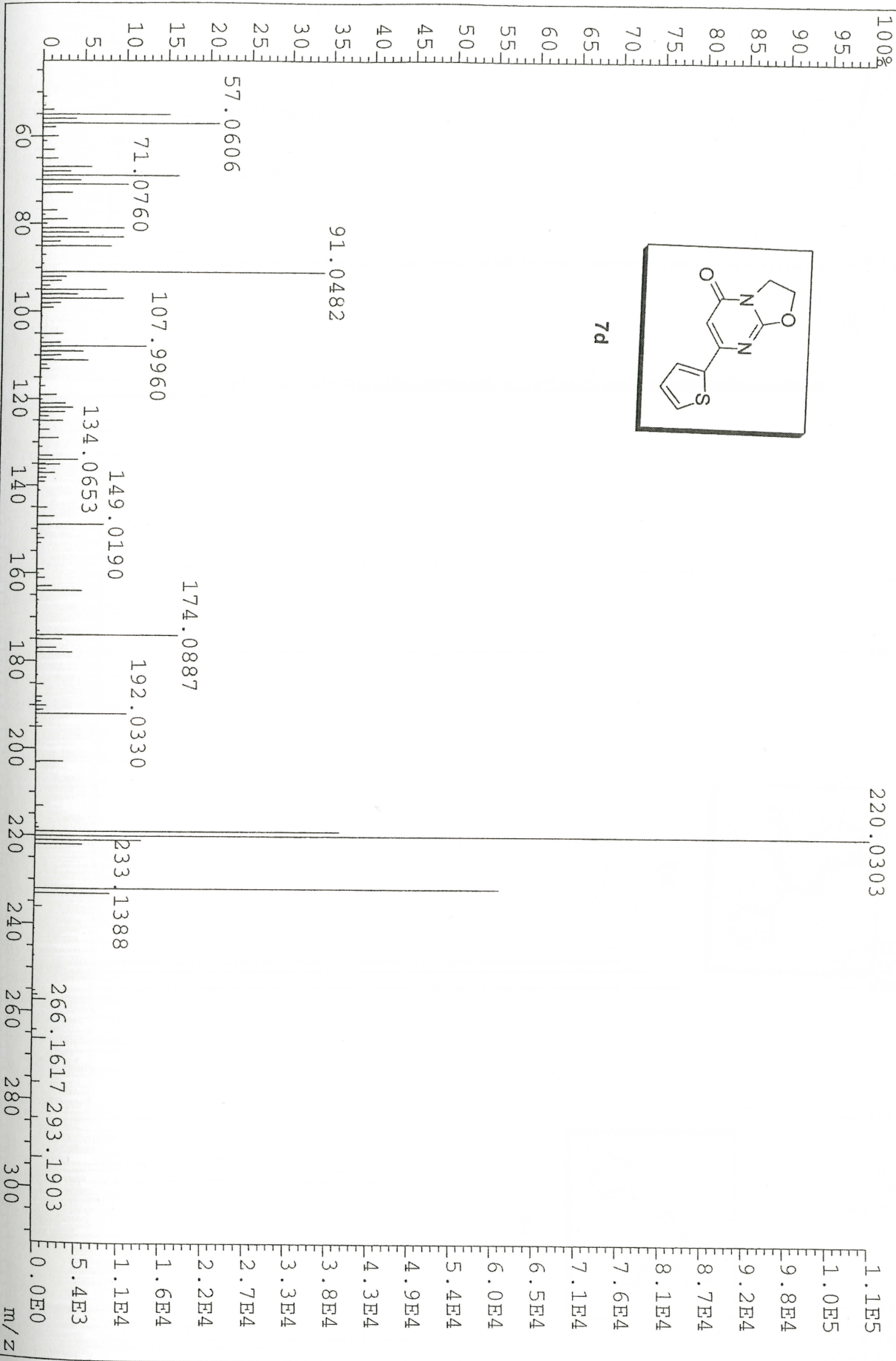


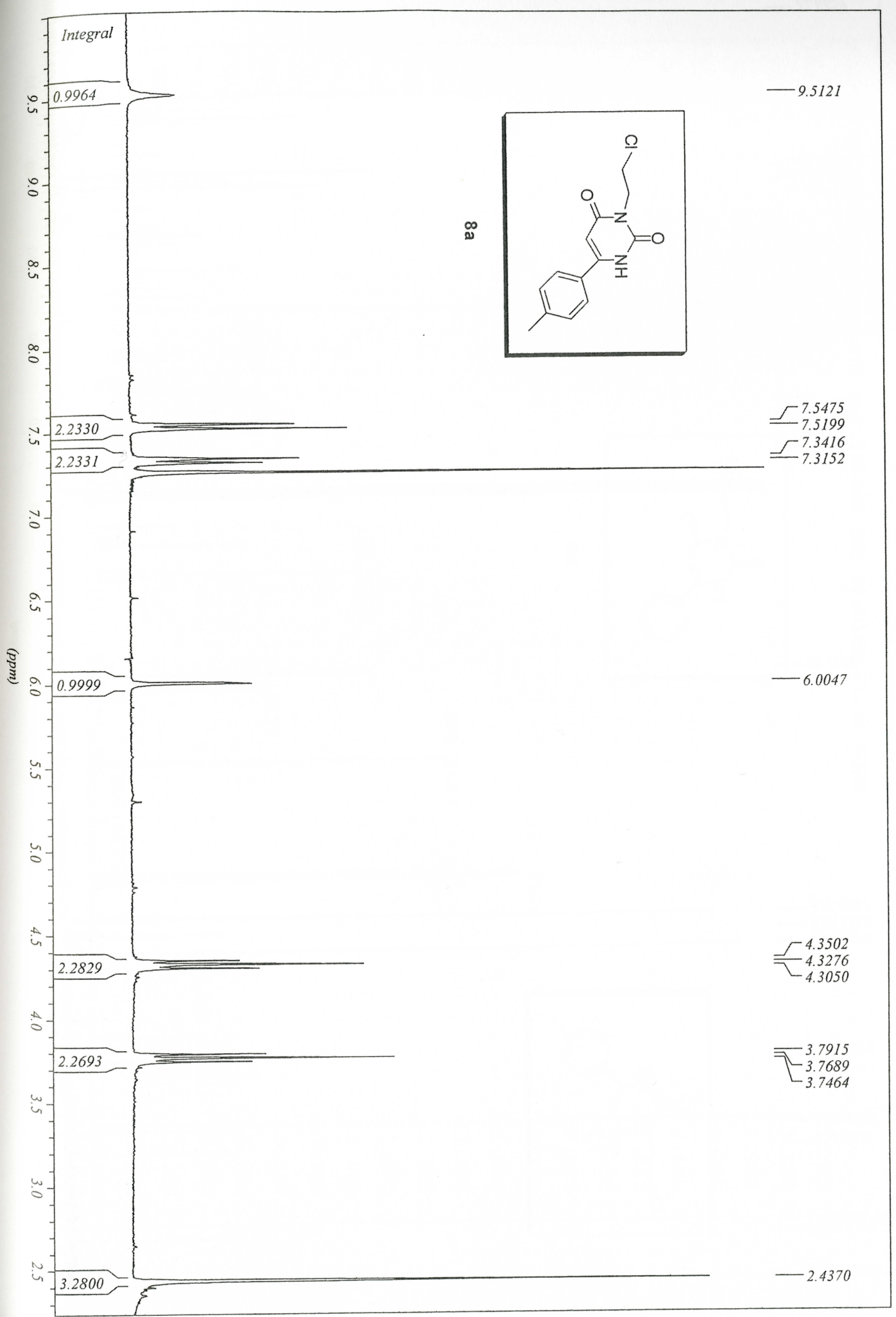


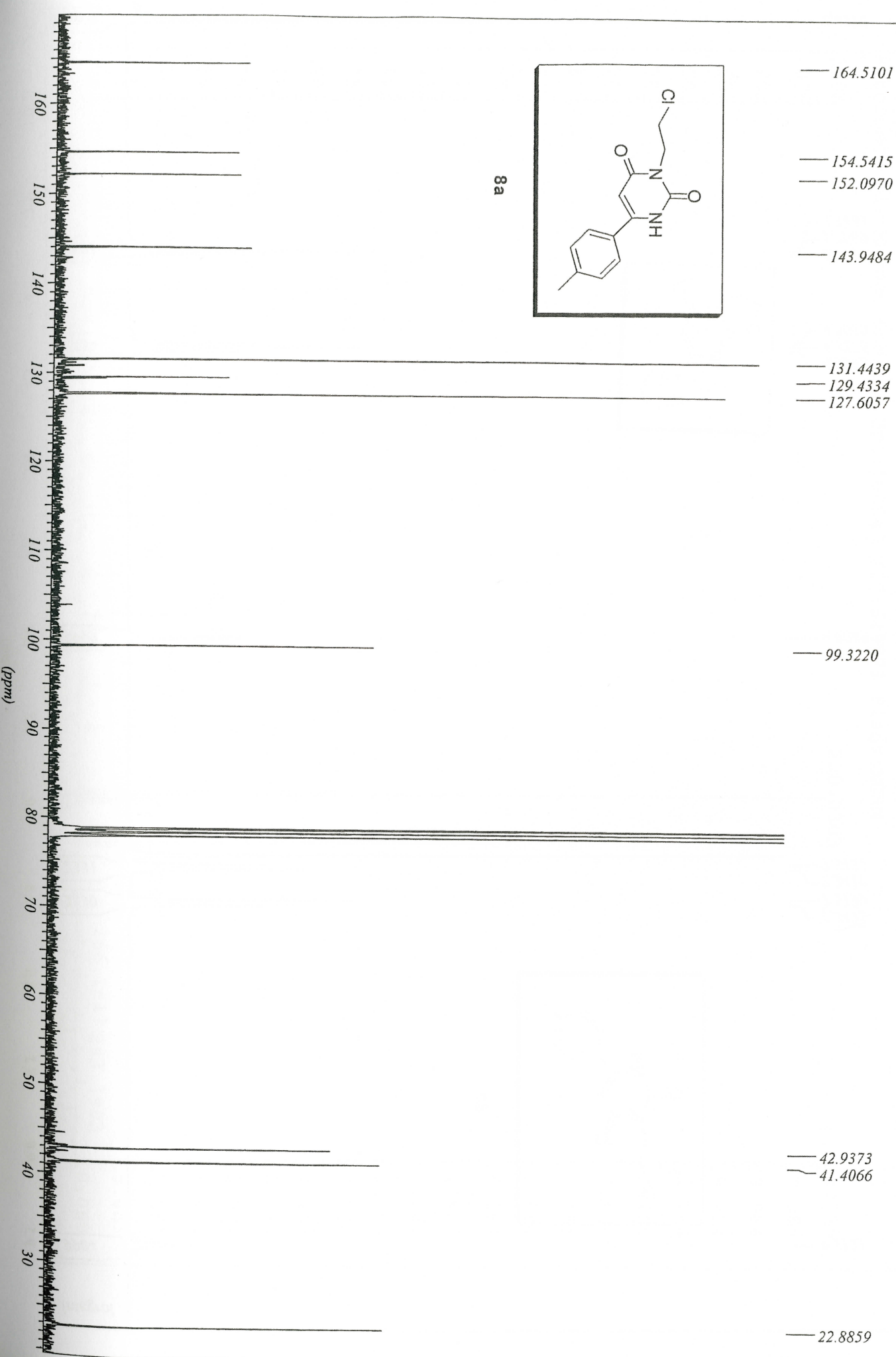




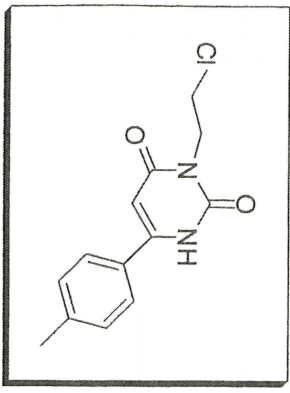
7d

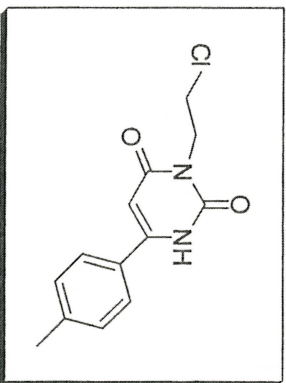
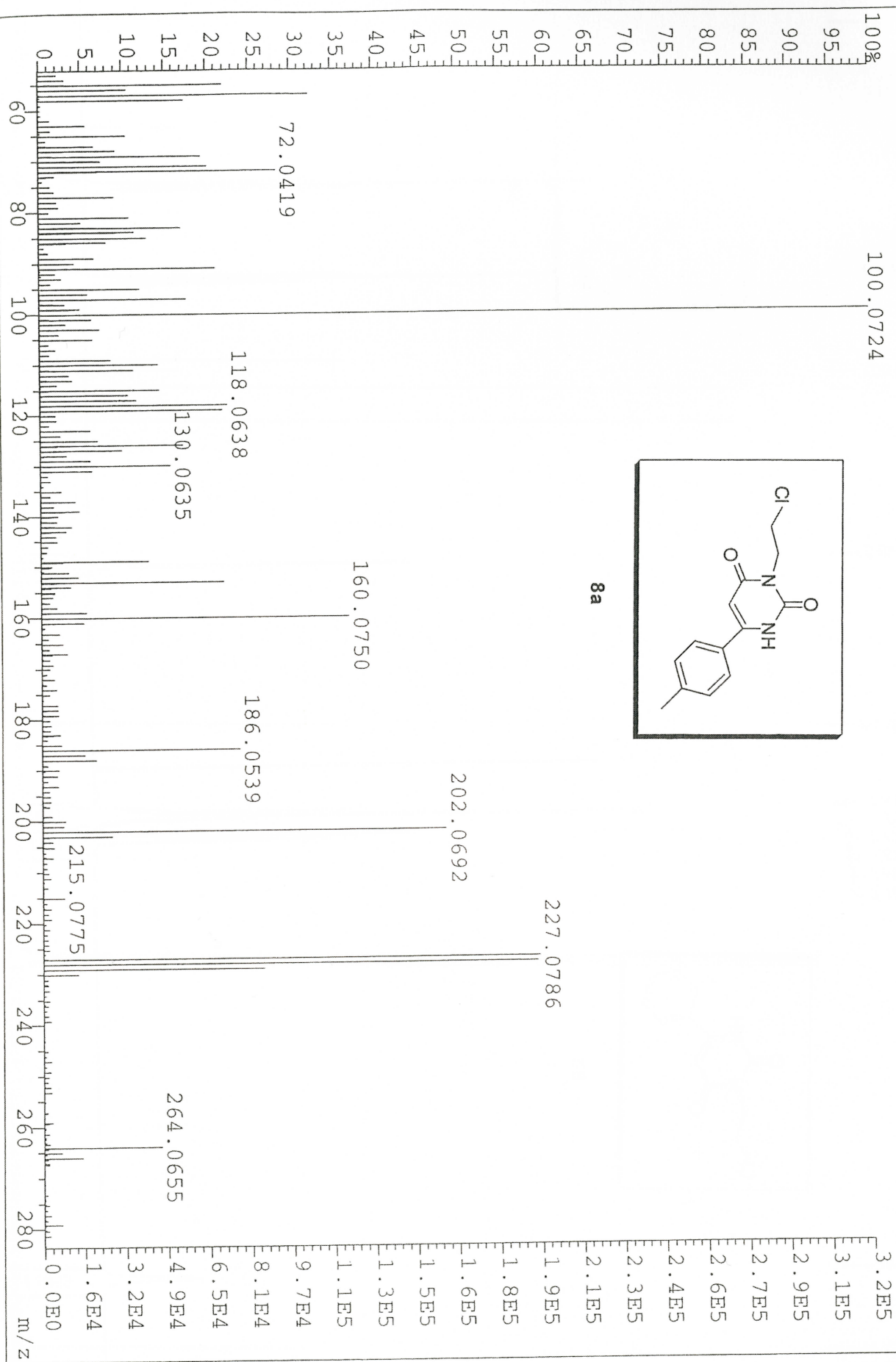




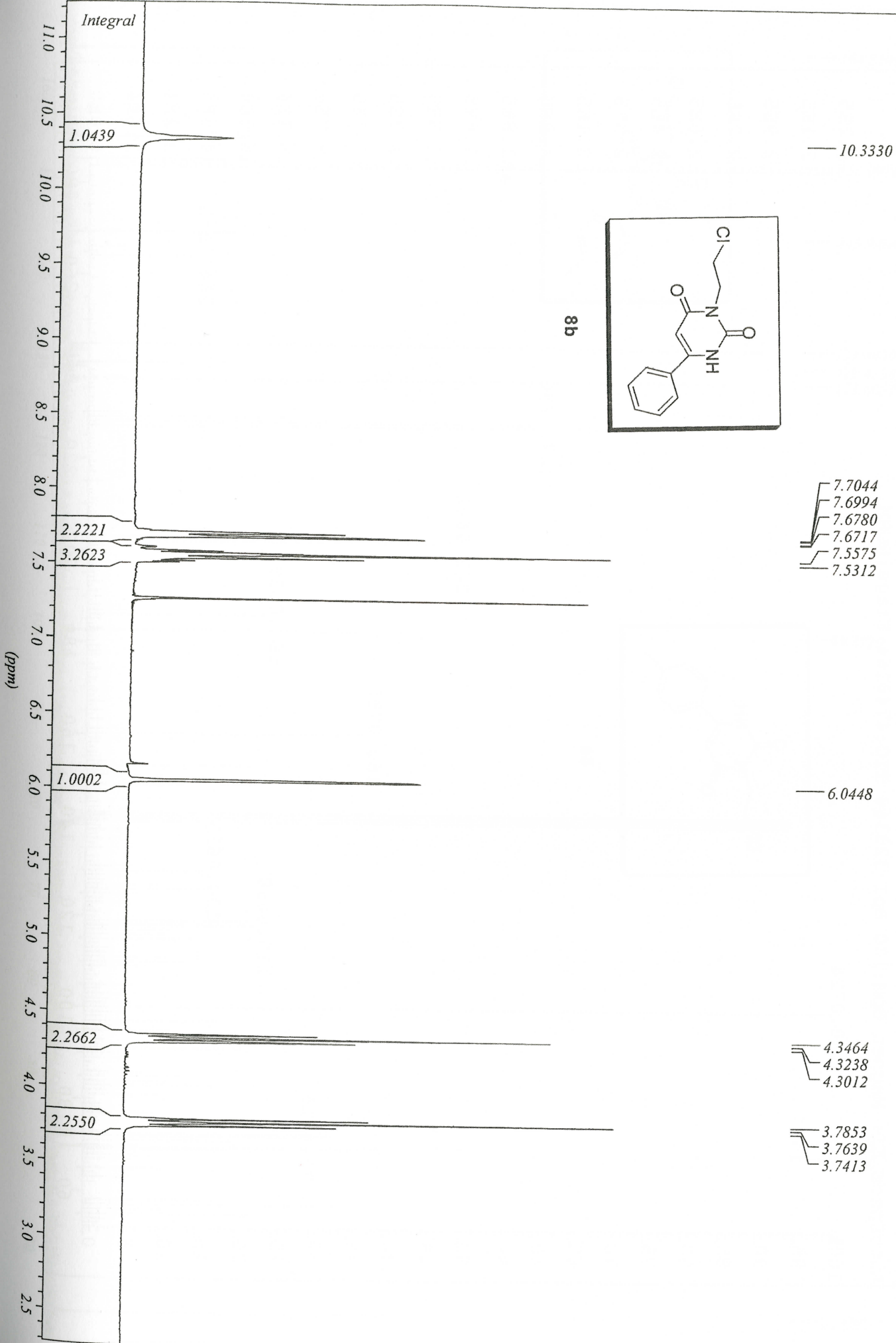


8a



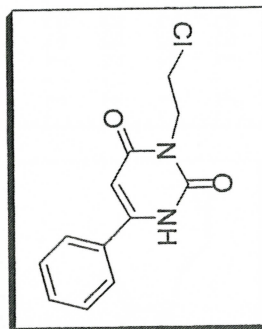


8a

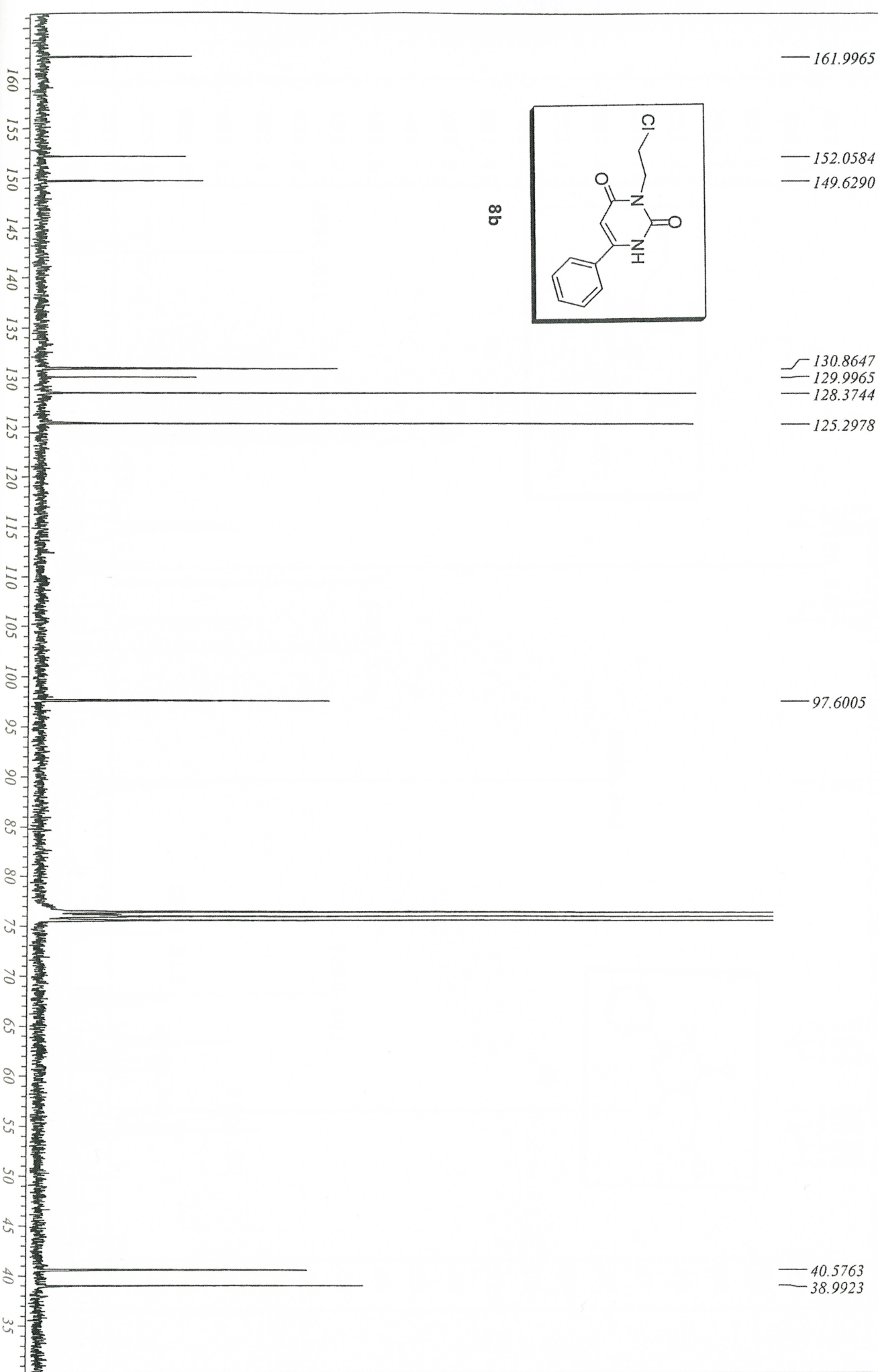


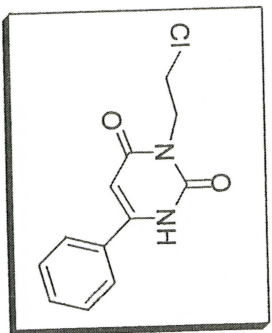


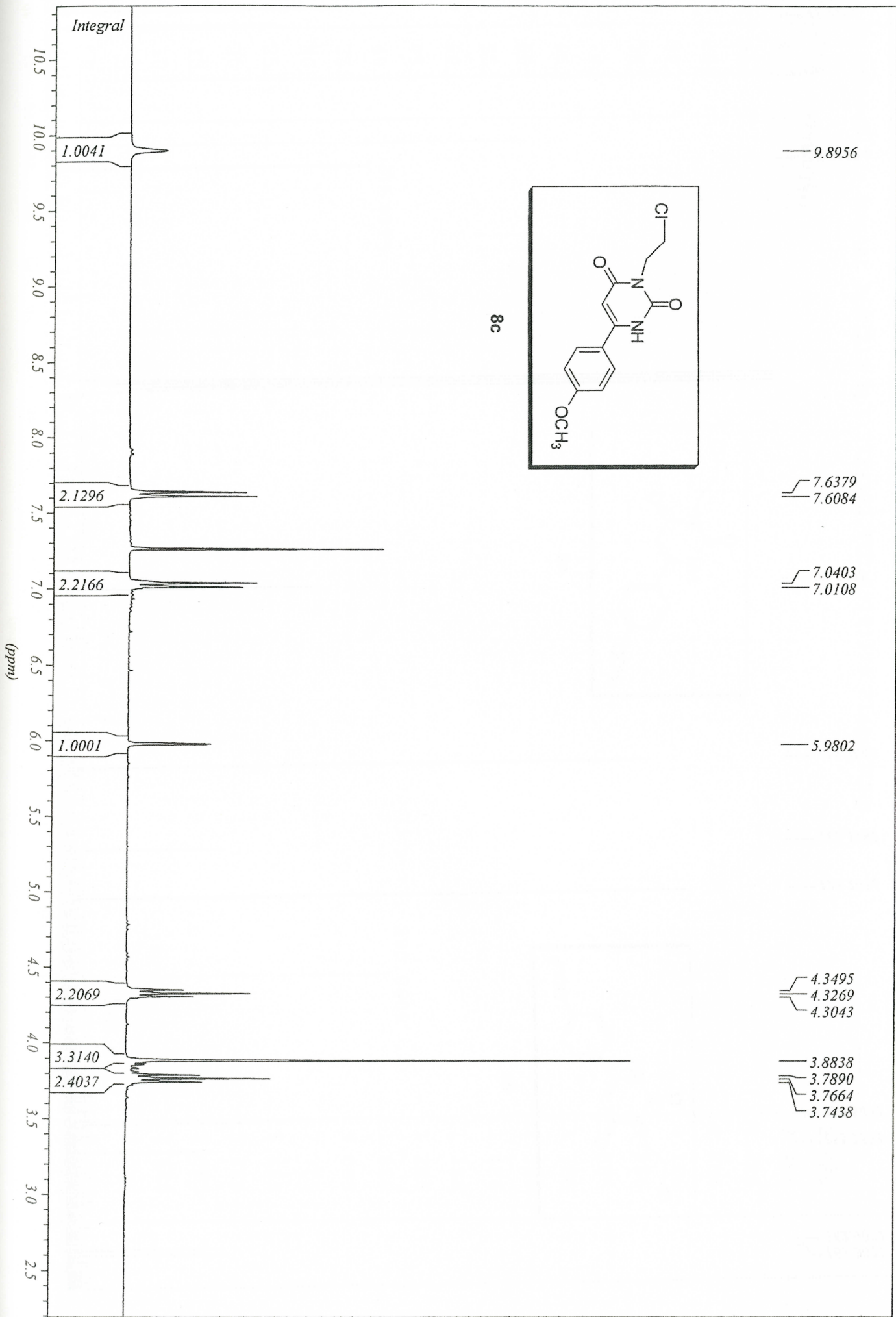
8b



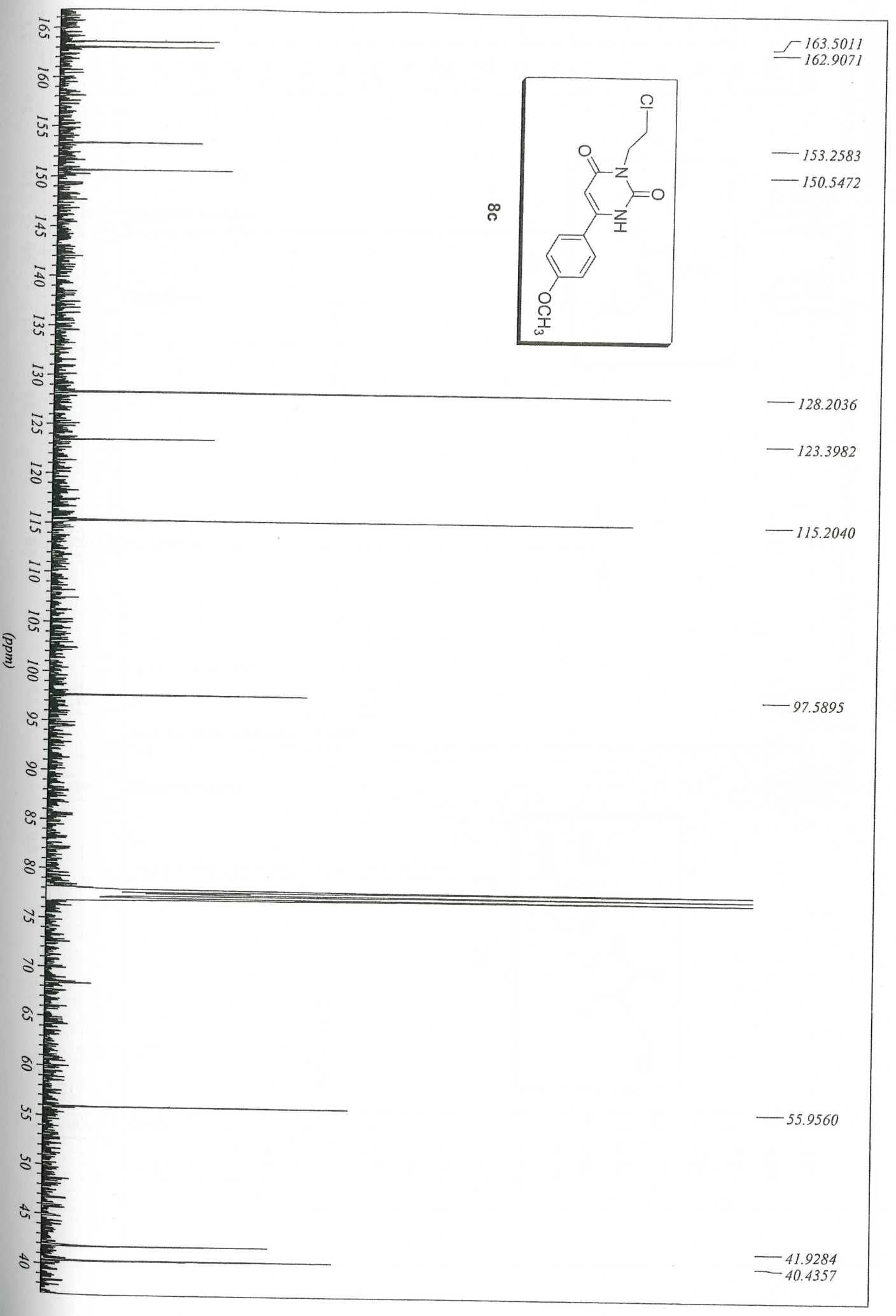
(ppm)

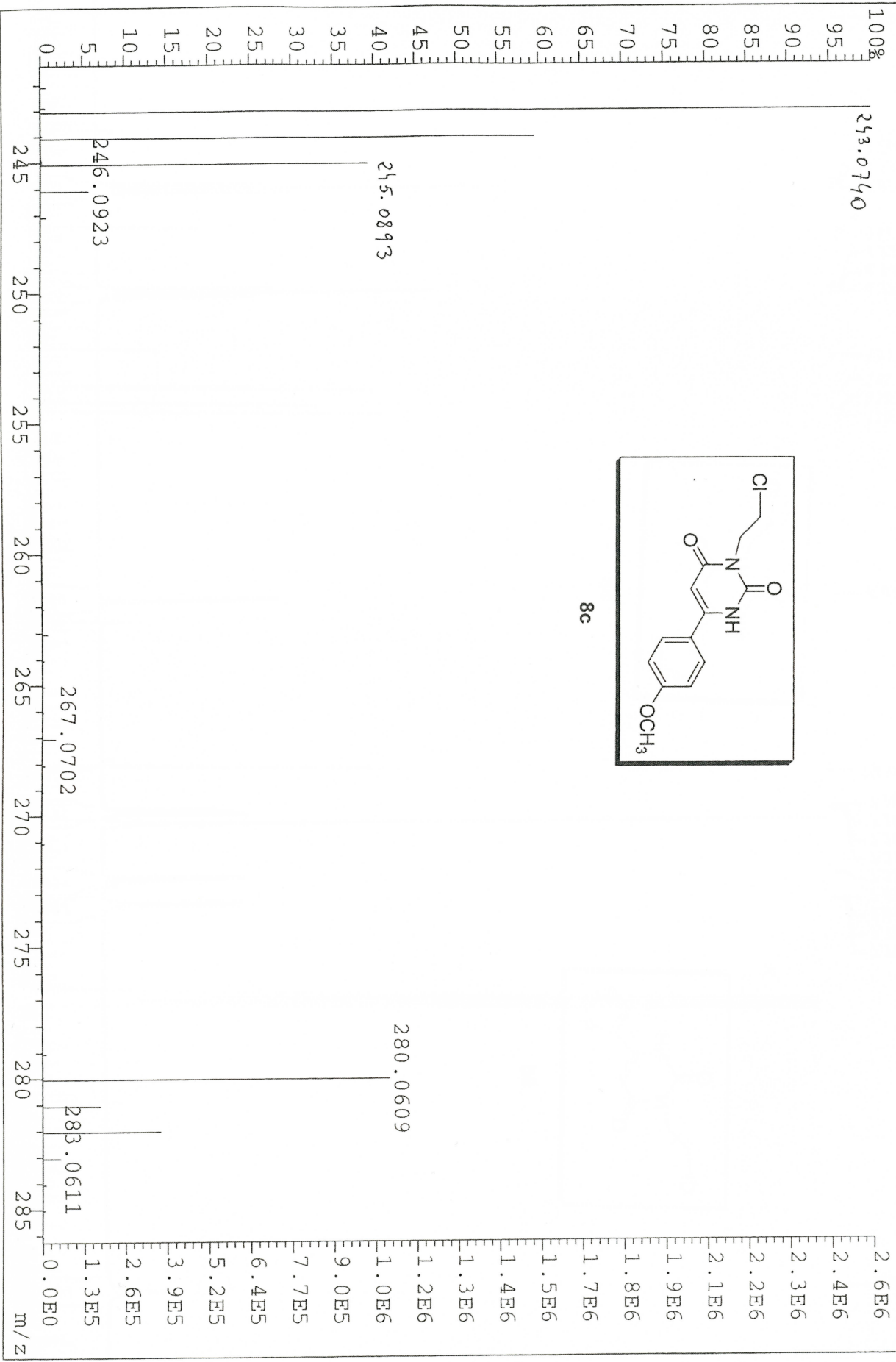
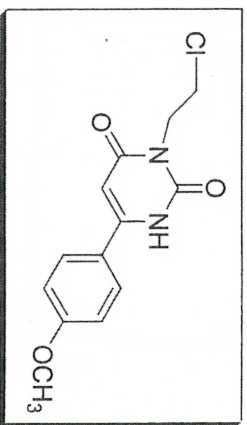


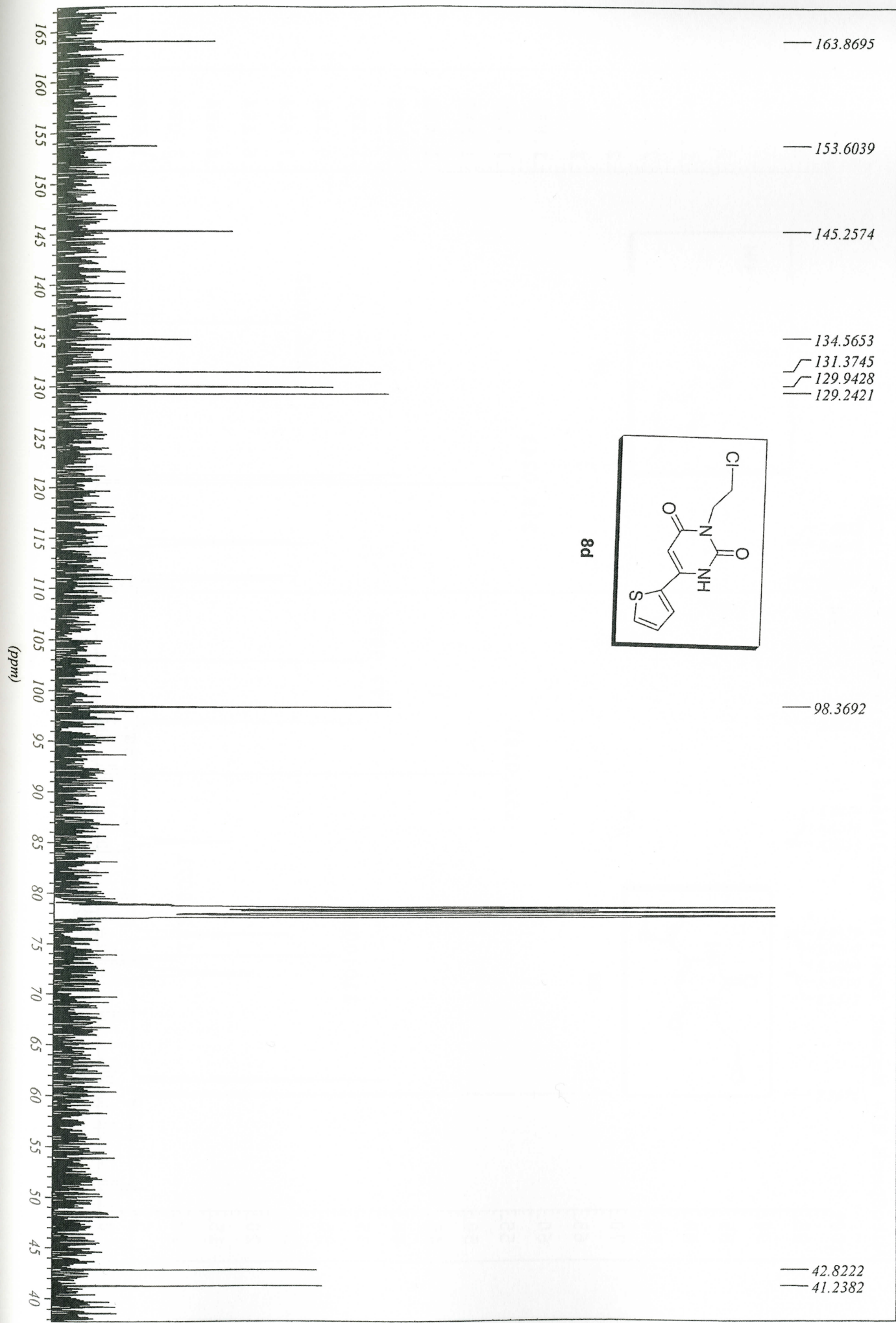












— 163.8695

— 153.6039

— 145.2574

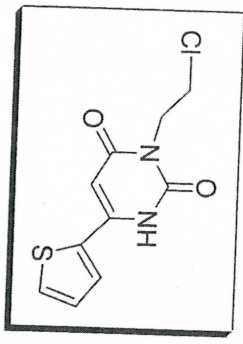
— 134.5653

— 131.3745

— 129.9428

— 129.2421

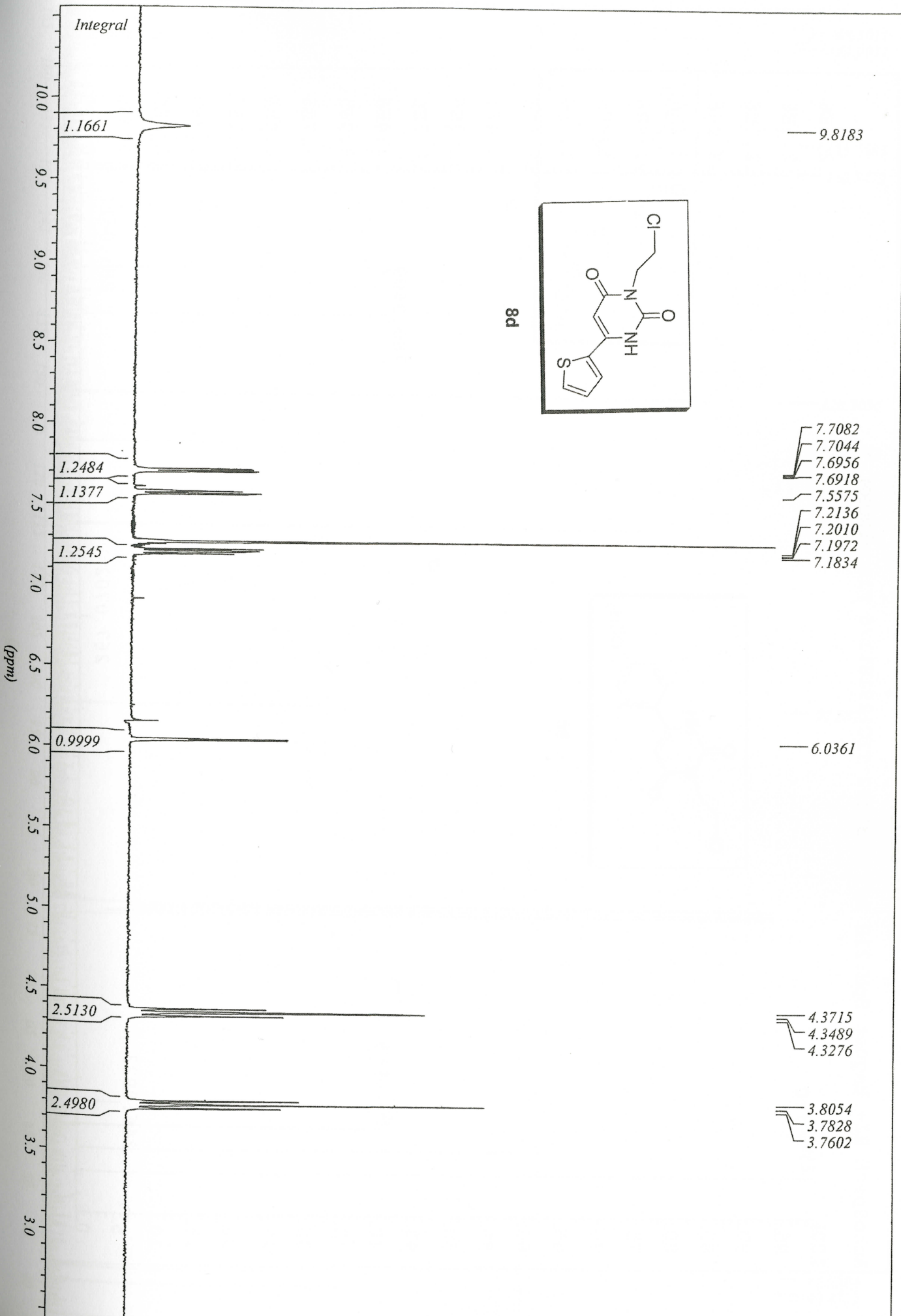
p8

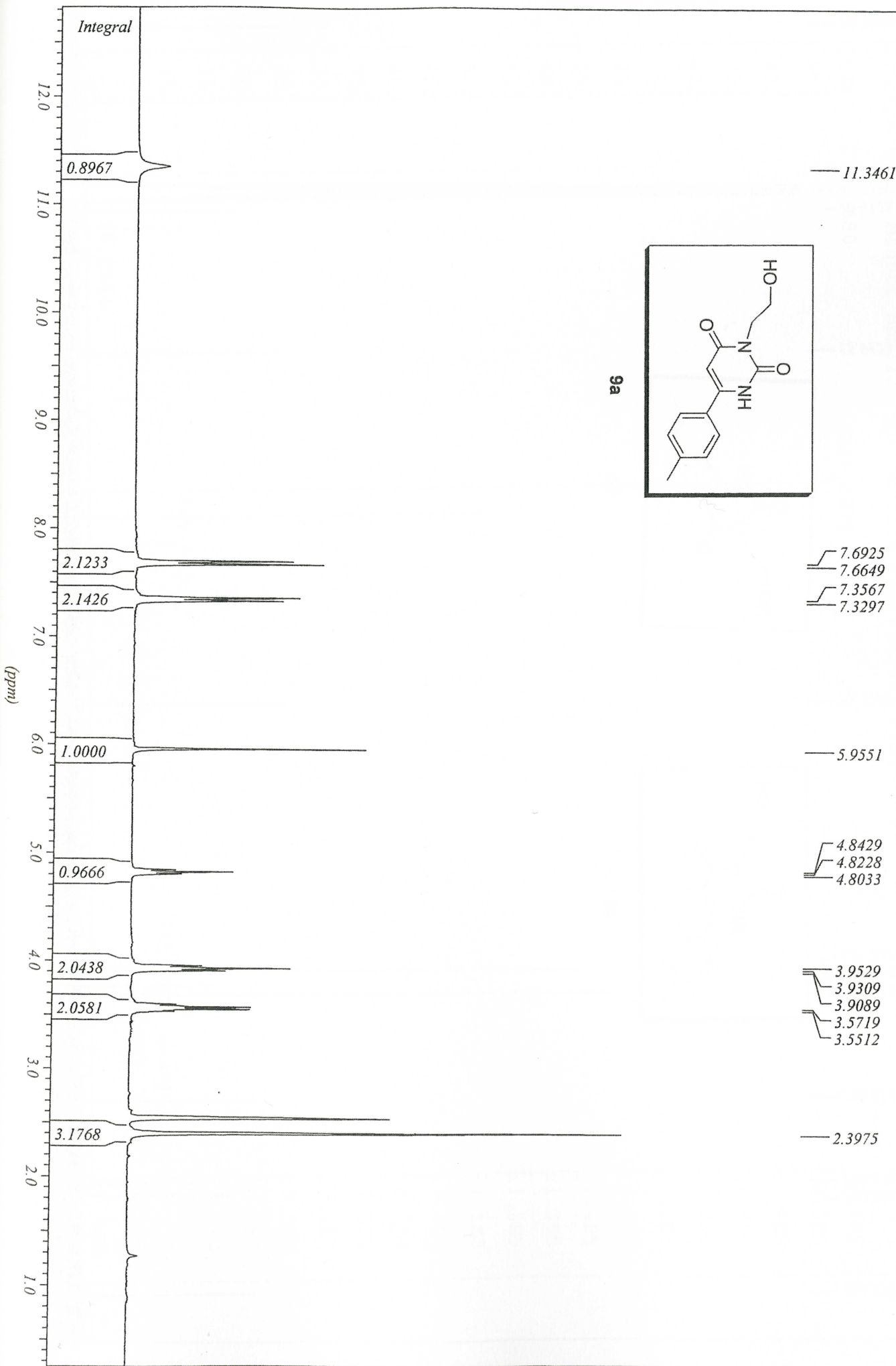


— 98.3692

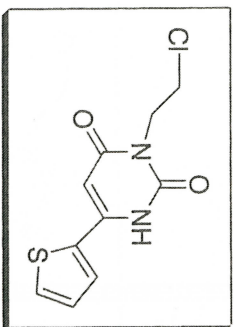
— 42.8222

— 41.2382

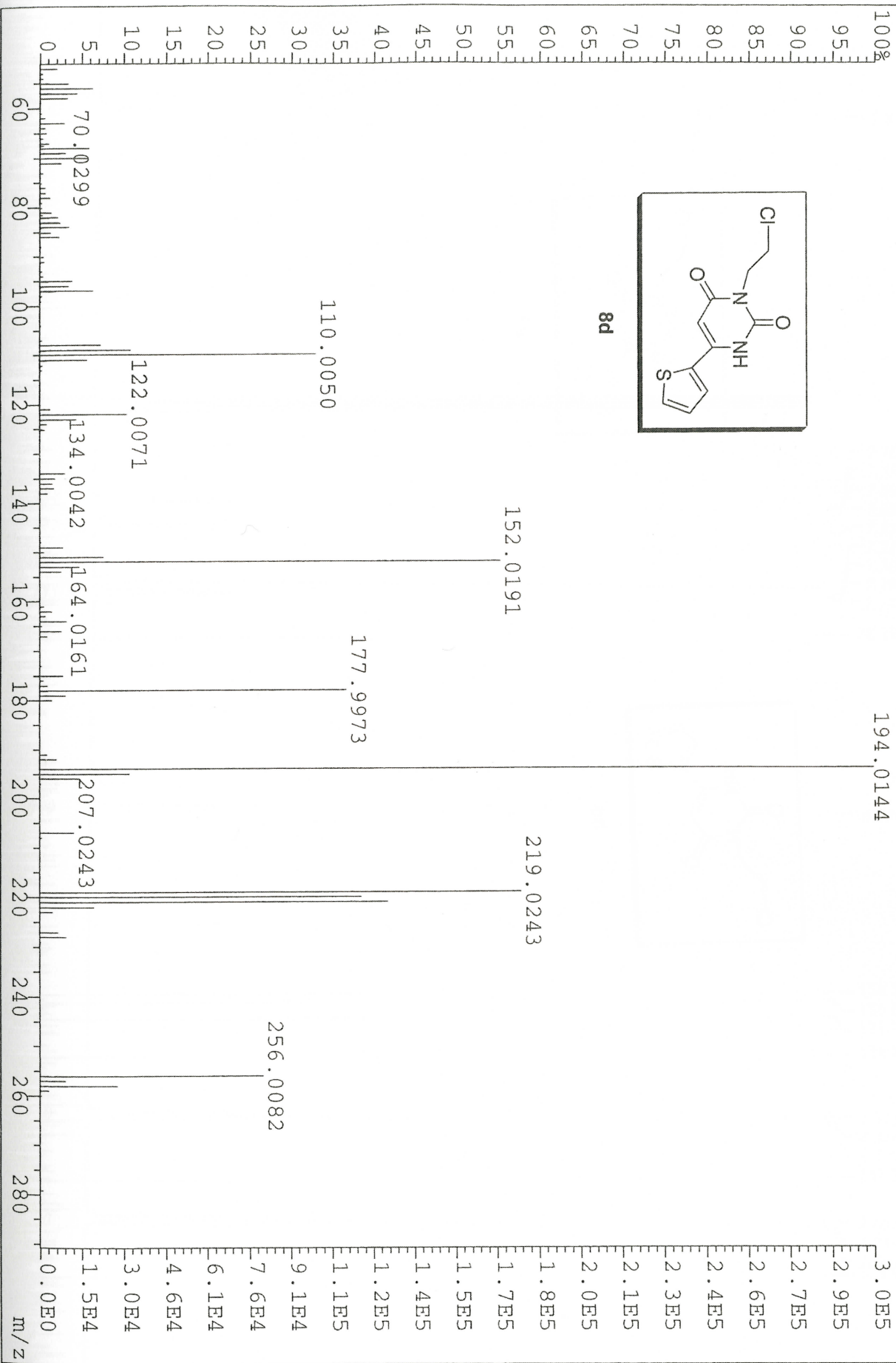




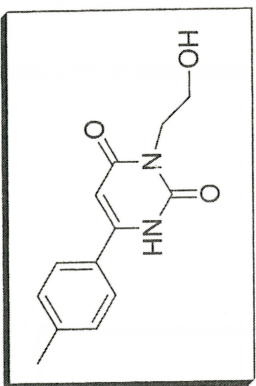
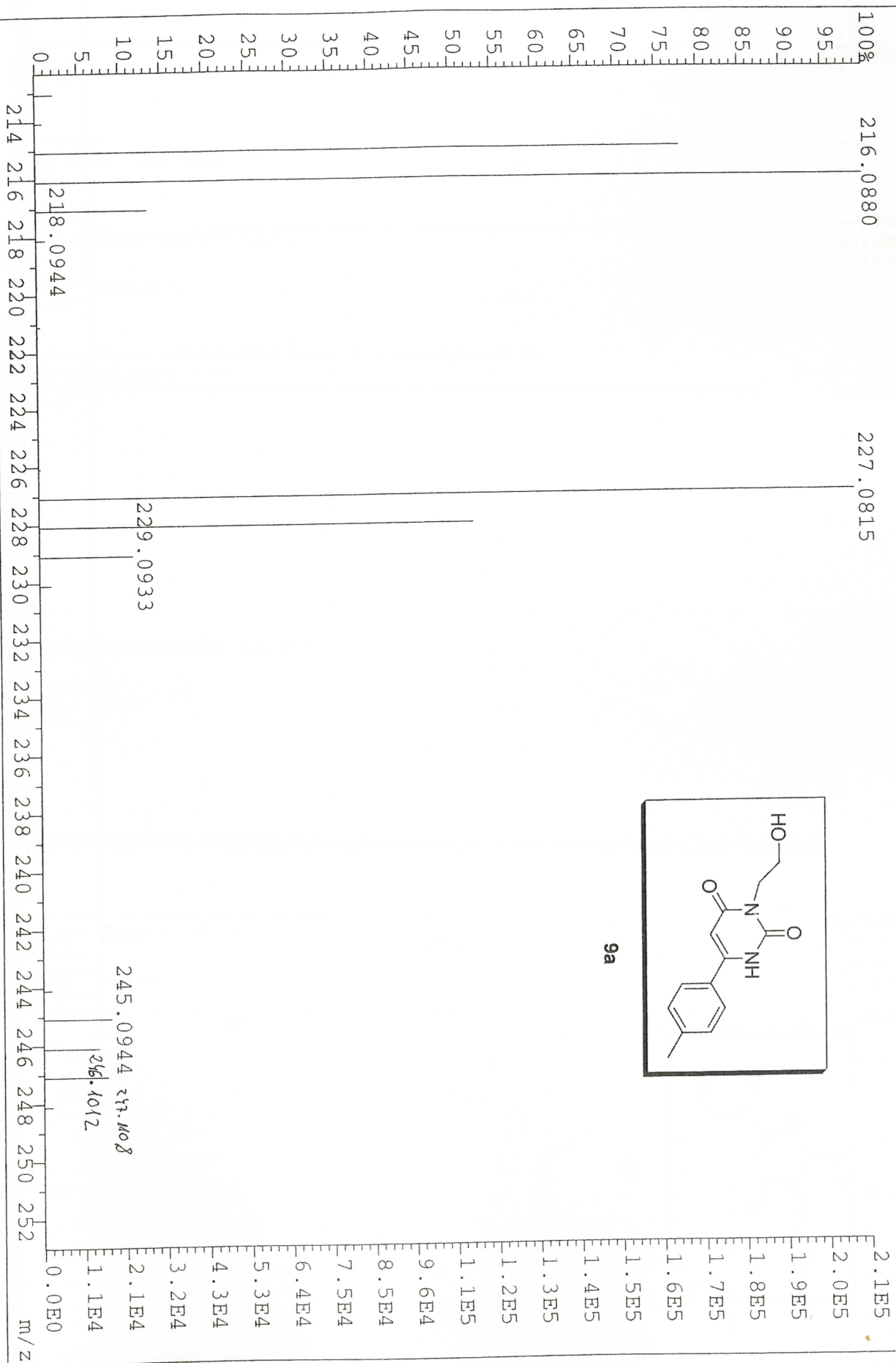


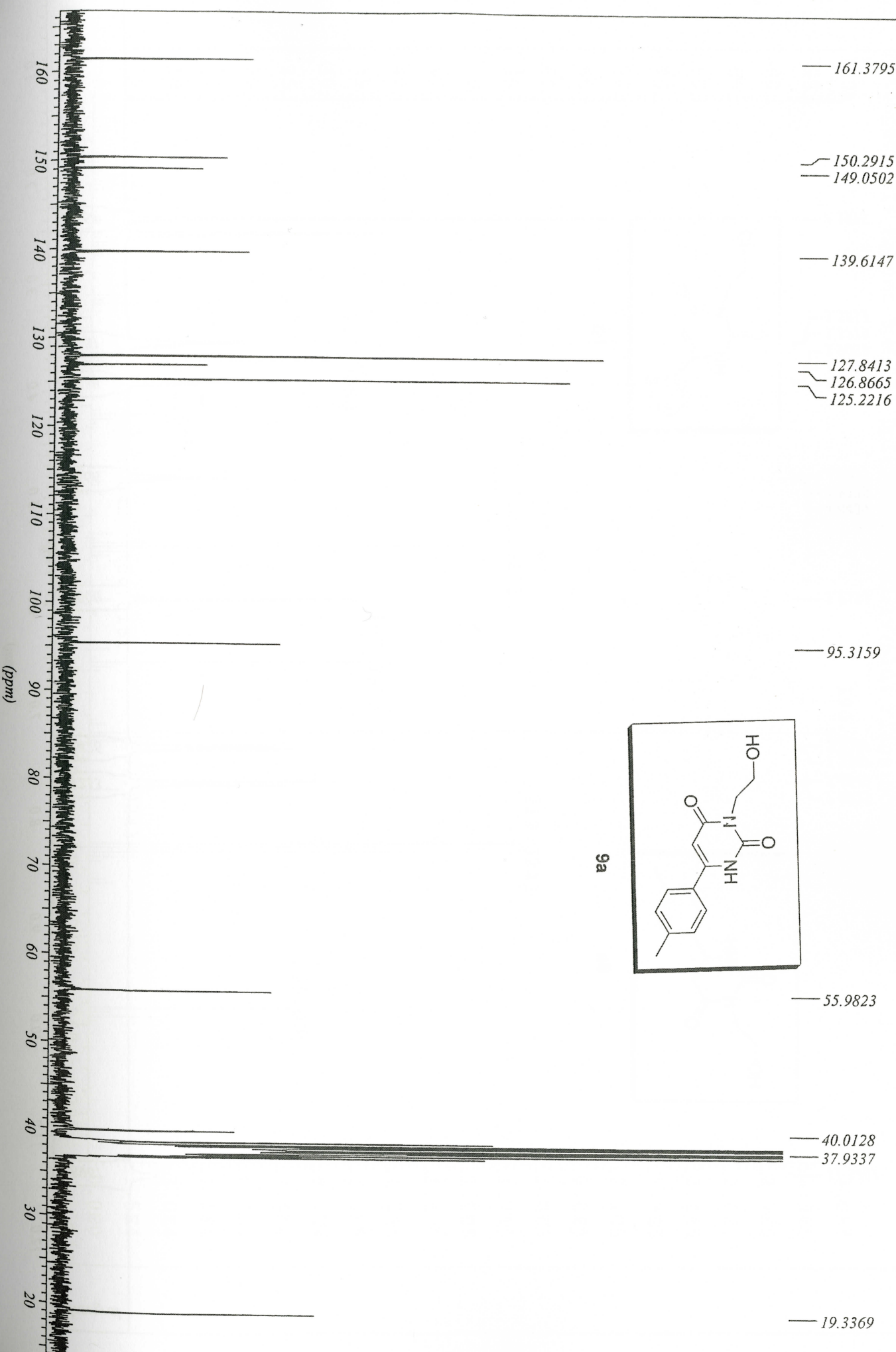


8d

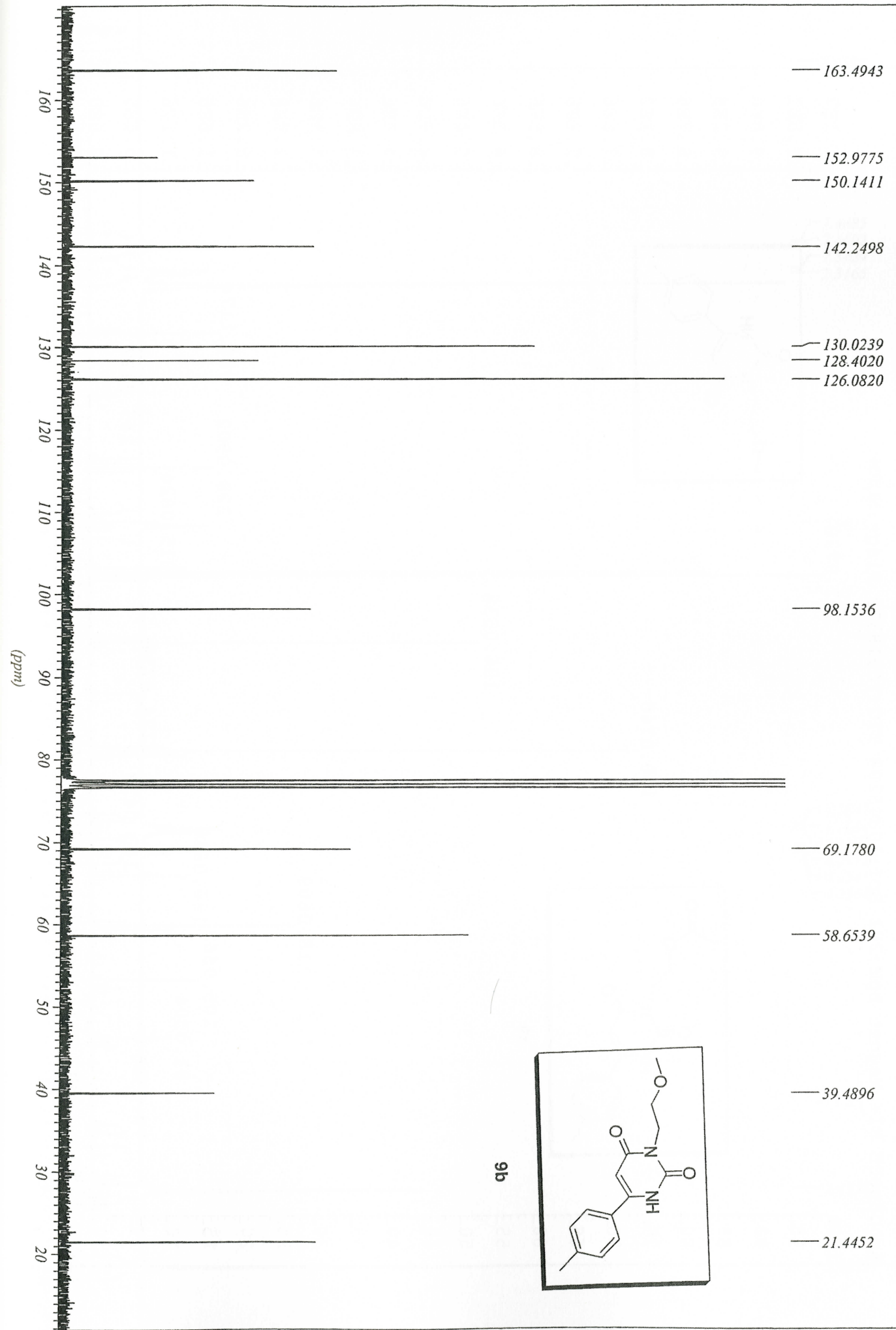


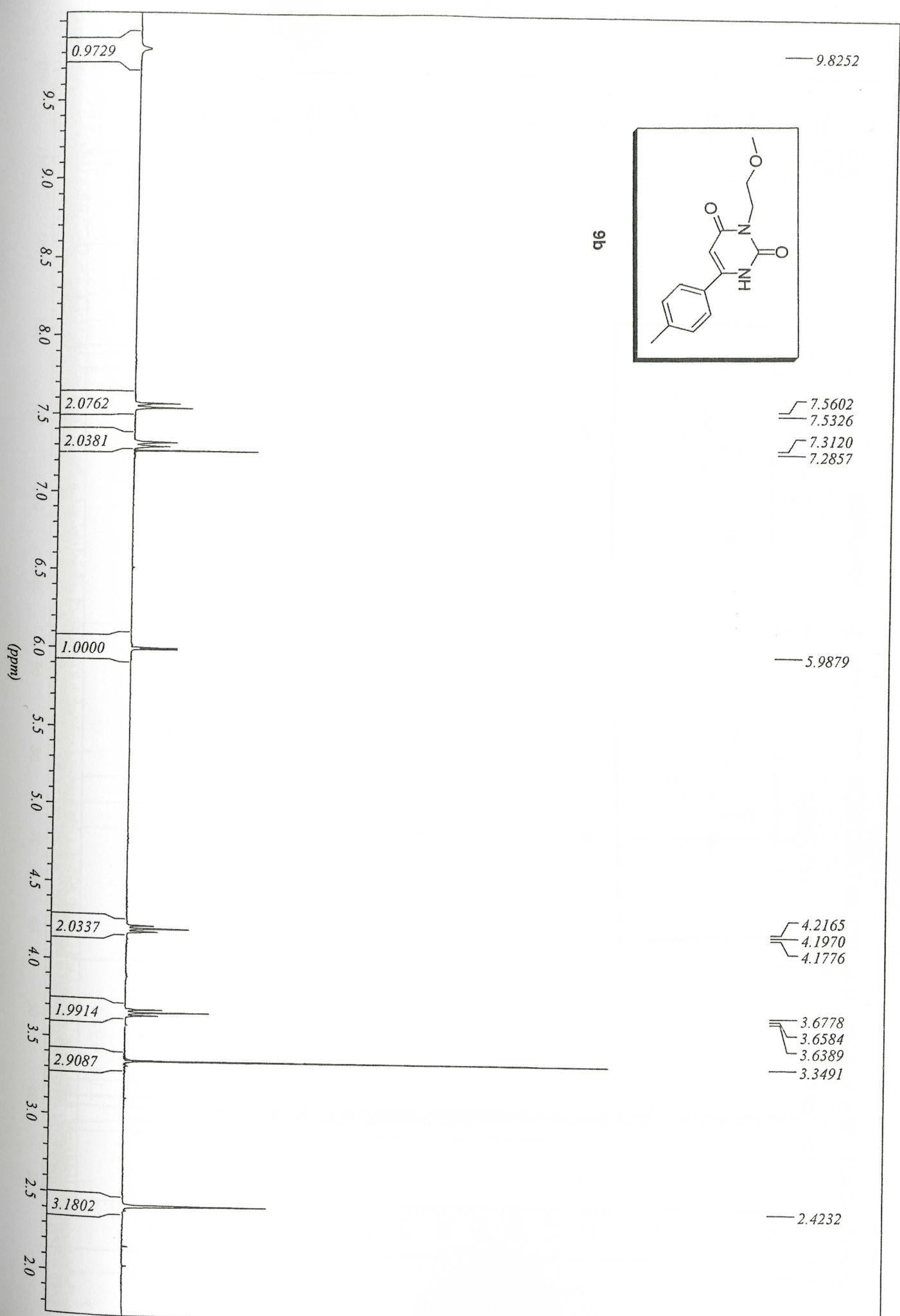
AutospecE EI+ Magnet BPM:203 BPI:3675136 TIC:9145401 Flags:NORM



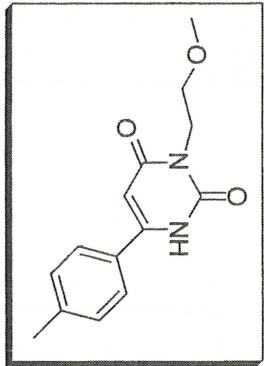








9b



9.8252

7.5602  
7.5326

7.3120  
7.2857

5.9879

4.2165  
4.1970  
4.1776

3.6778  
3.6584  
3.6389  
3.3491

2.4232

0.9729

2.0762

2.0381

1.0000

2.0337

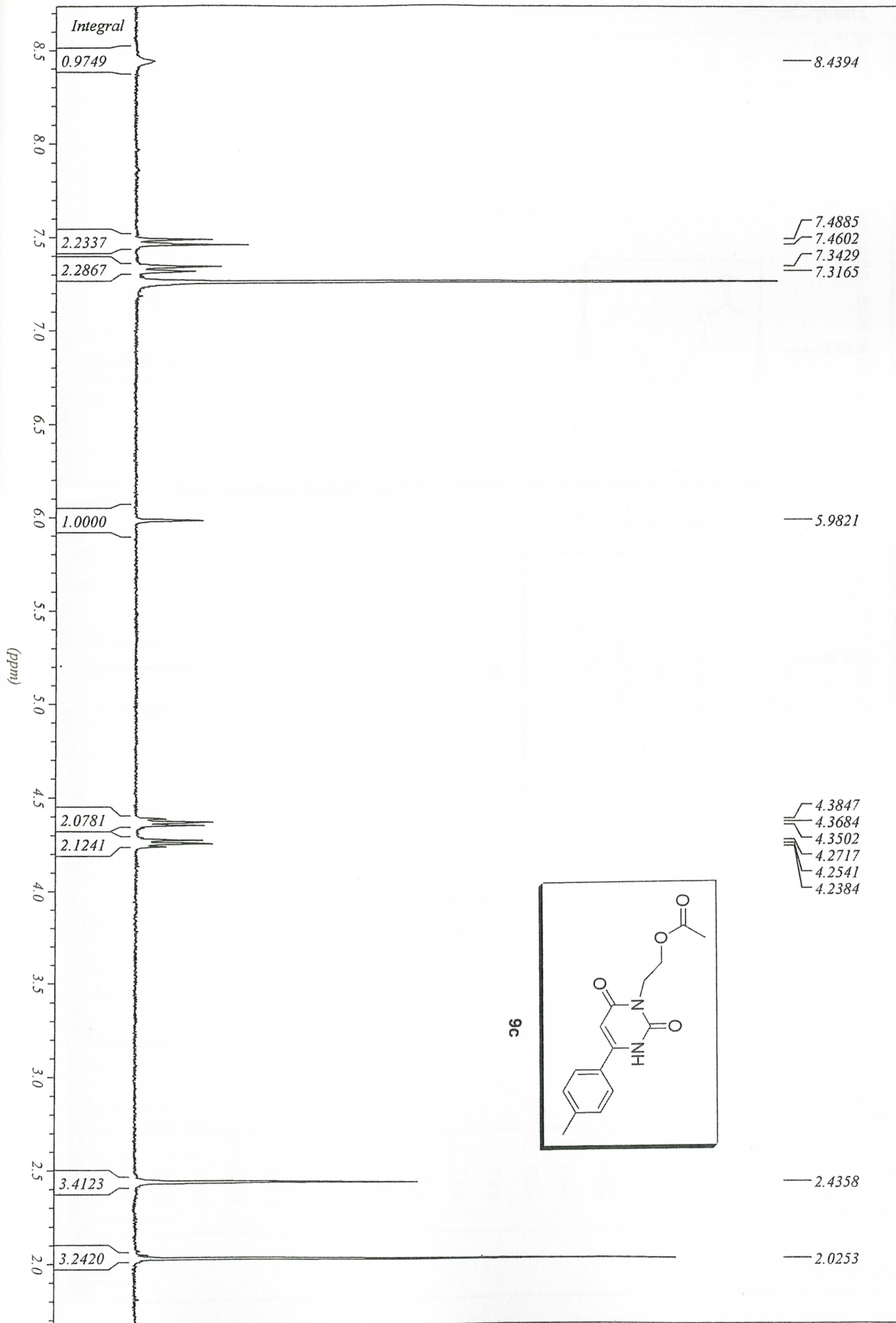
1.9914

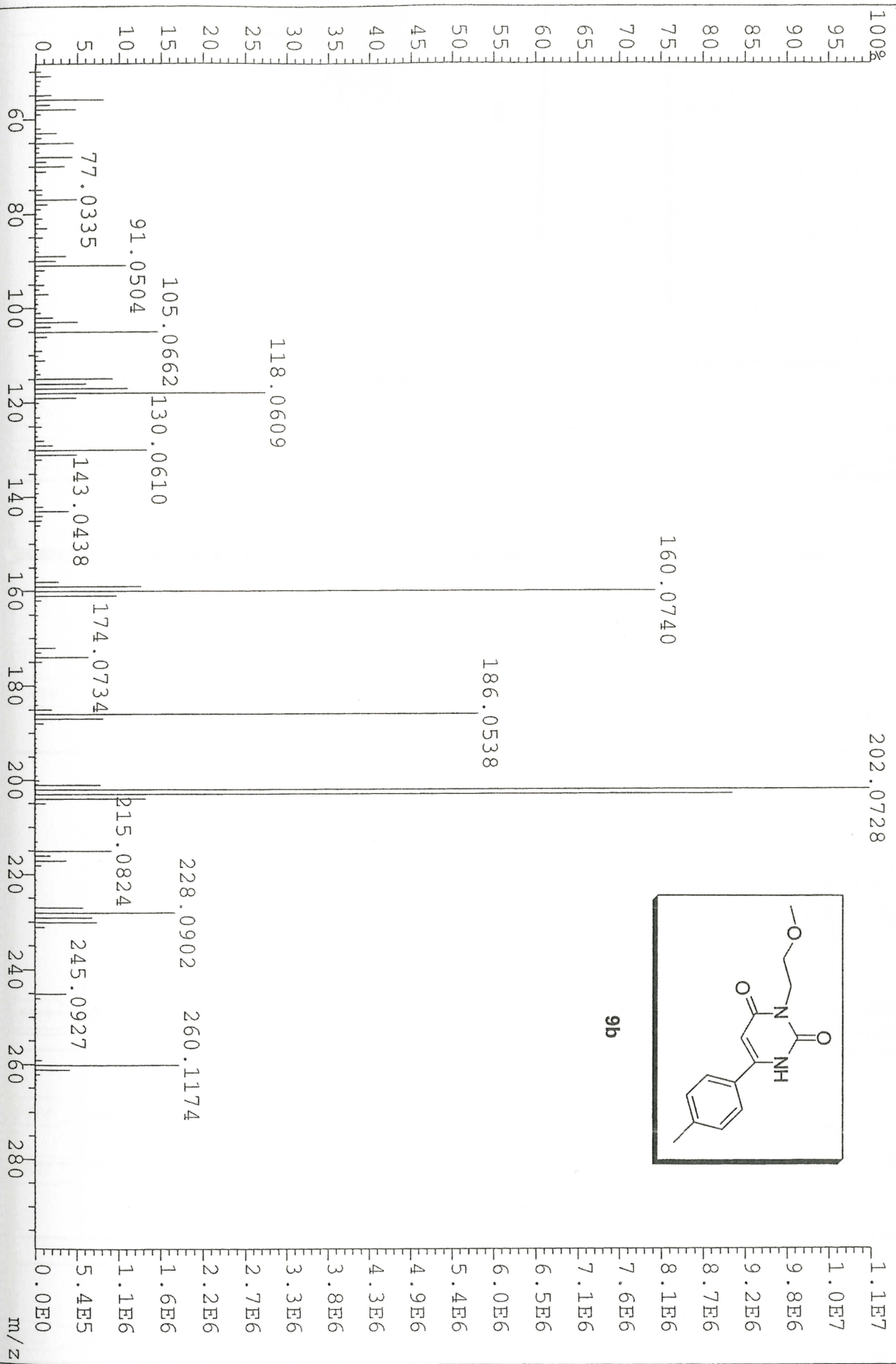
2.9087

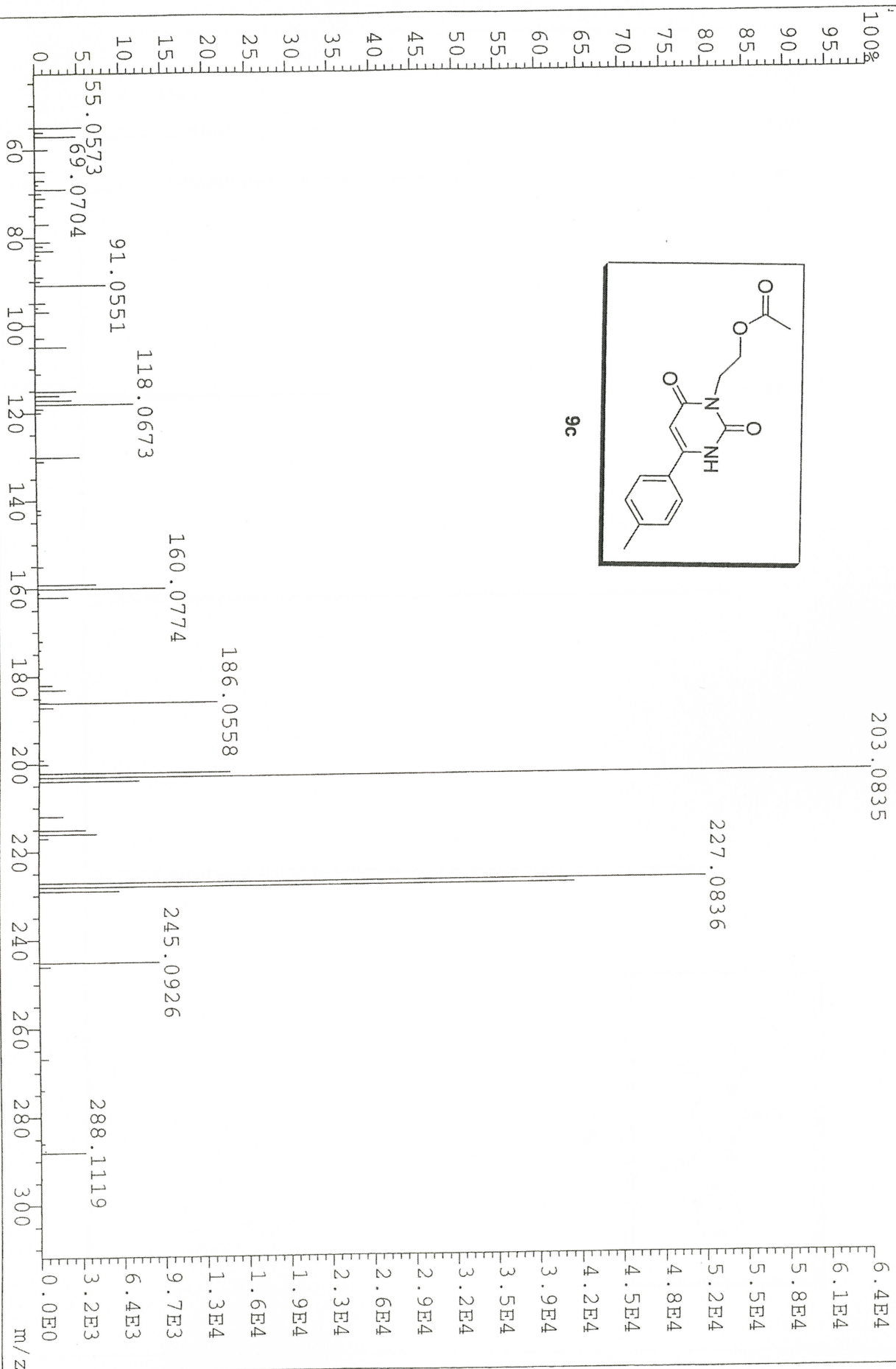
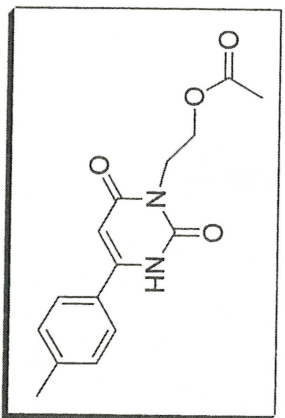
3.1802

(ppm)

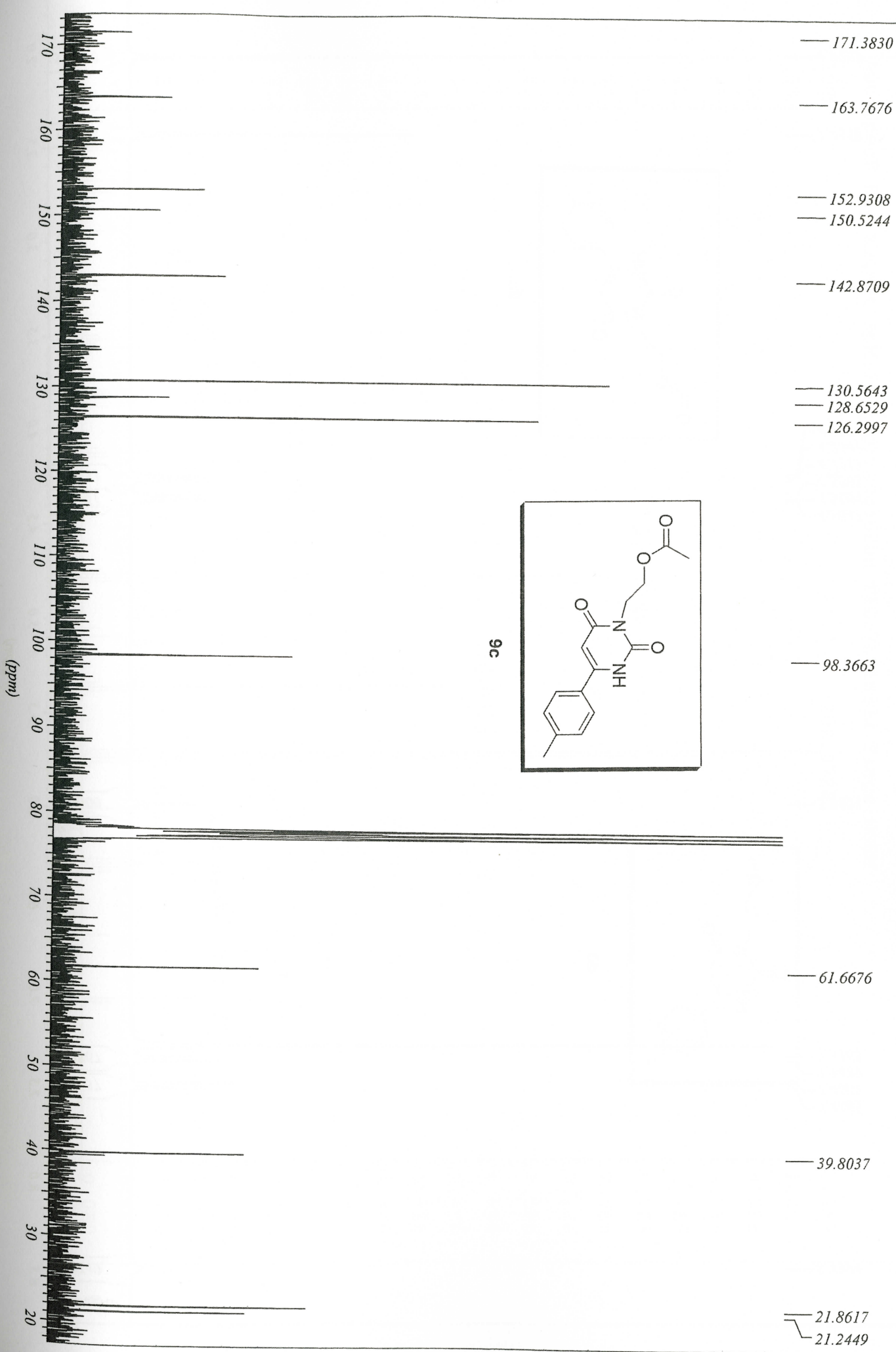
9.5  
9.0  
8.5  
8.0  
7.5  
7.0  
6.5  
6.0  
5.5  
5.0  
4.5  
4.0  
3.5  
3.0  
2.5  
2.0



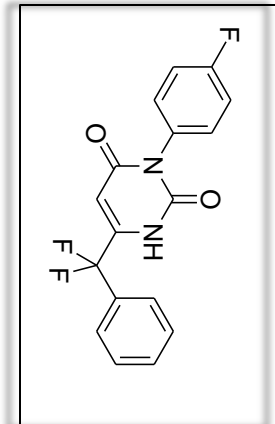
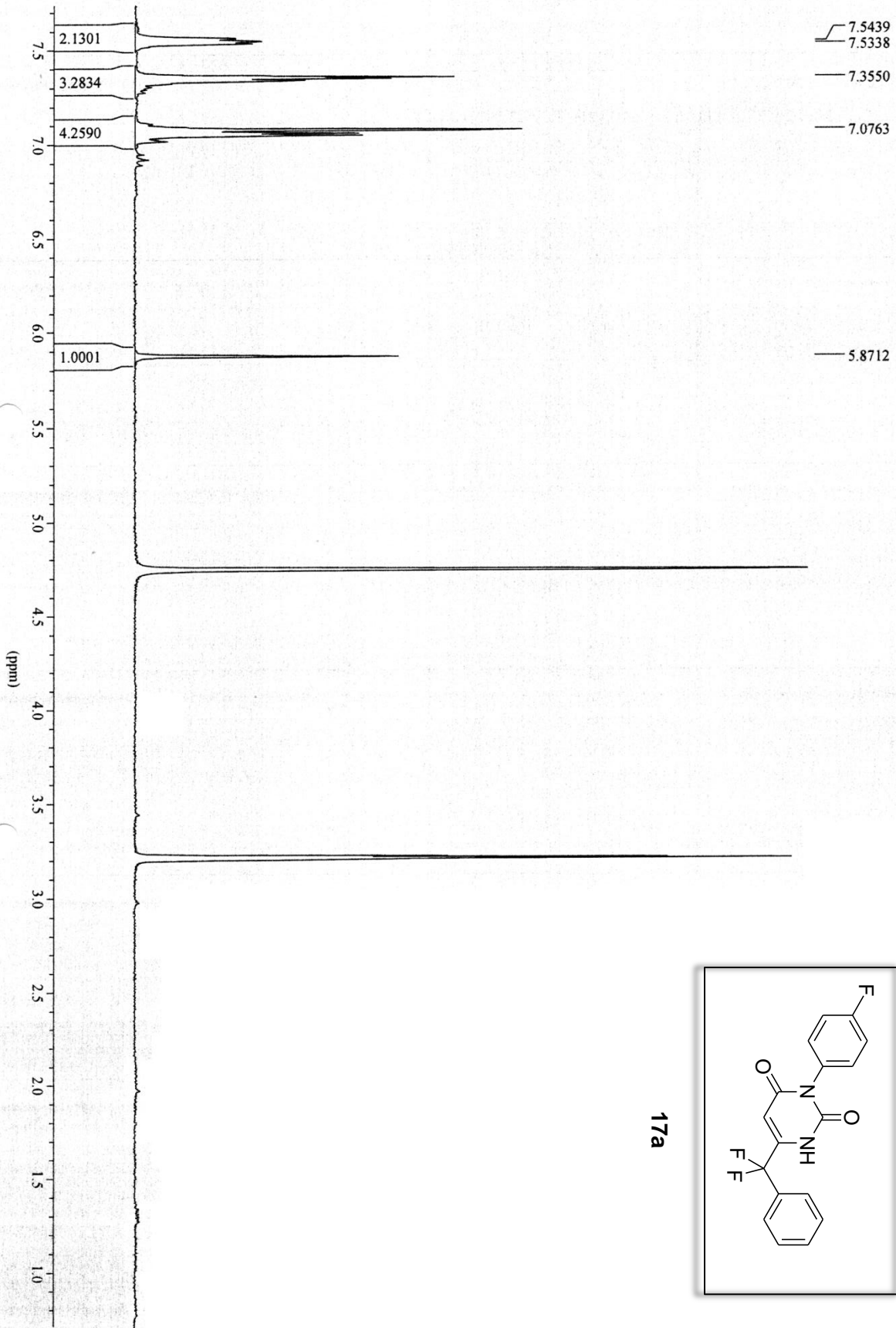






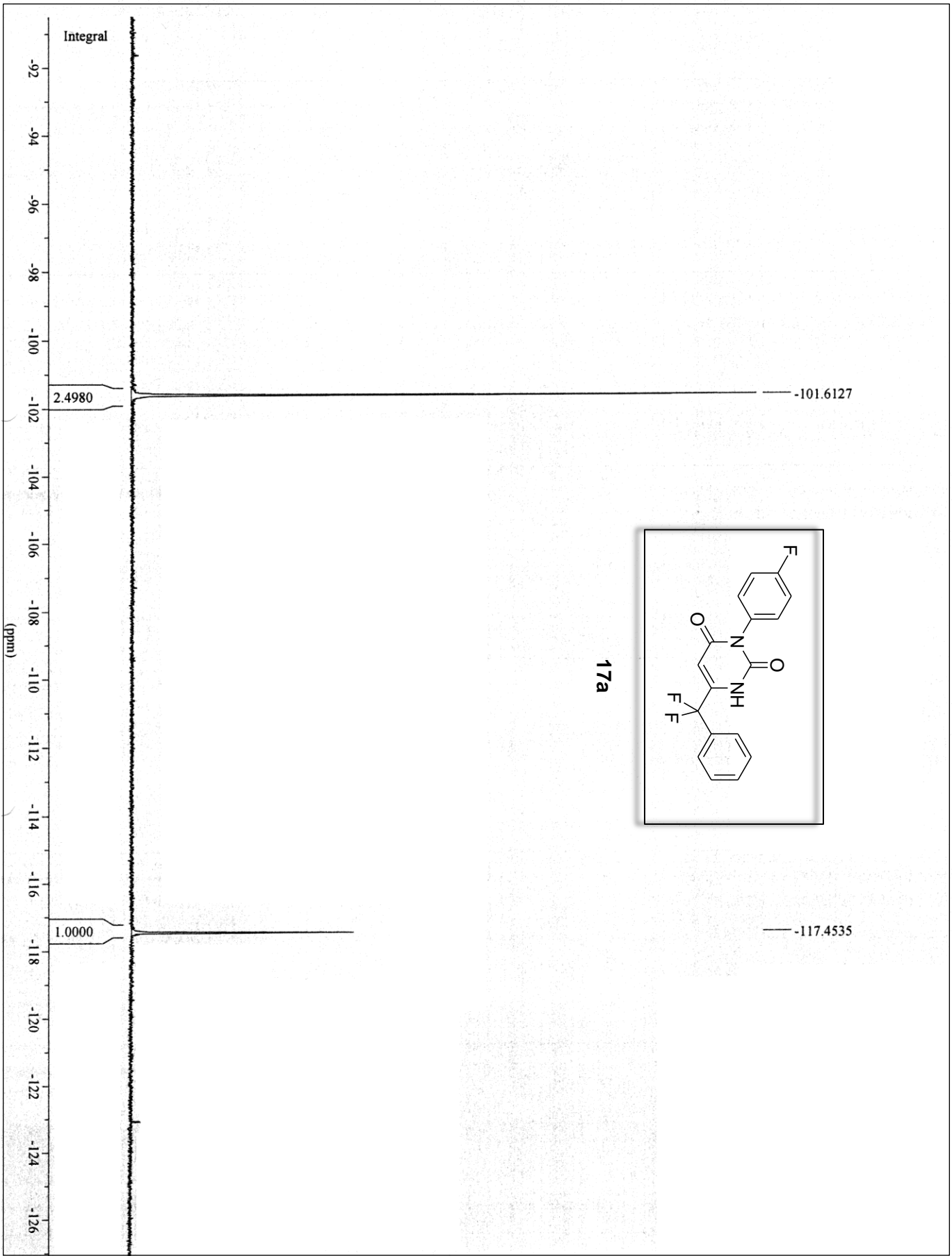


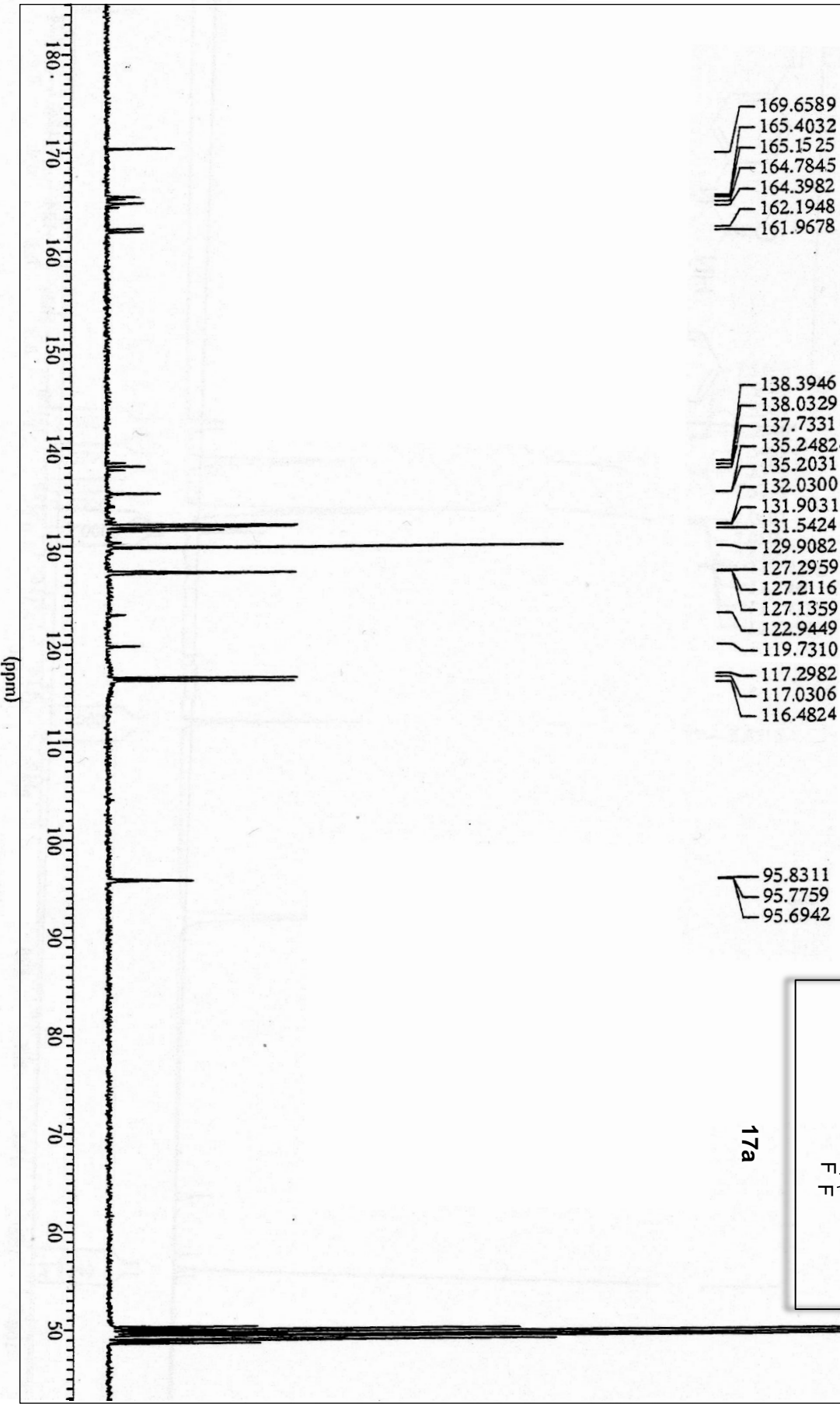




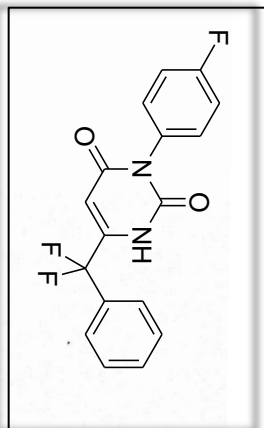
17a

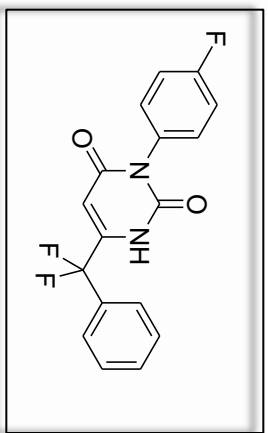
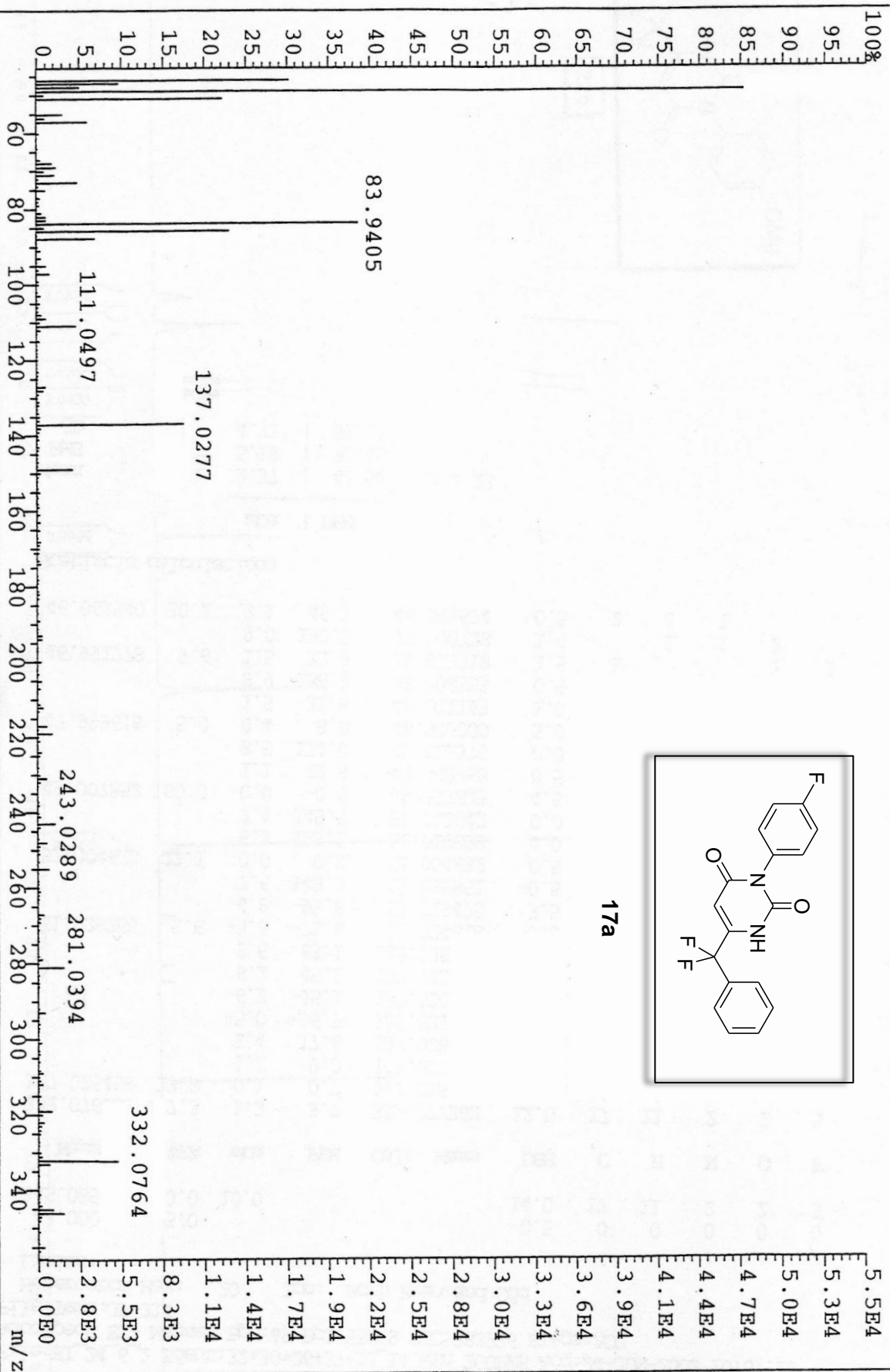




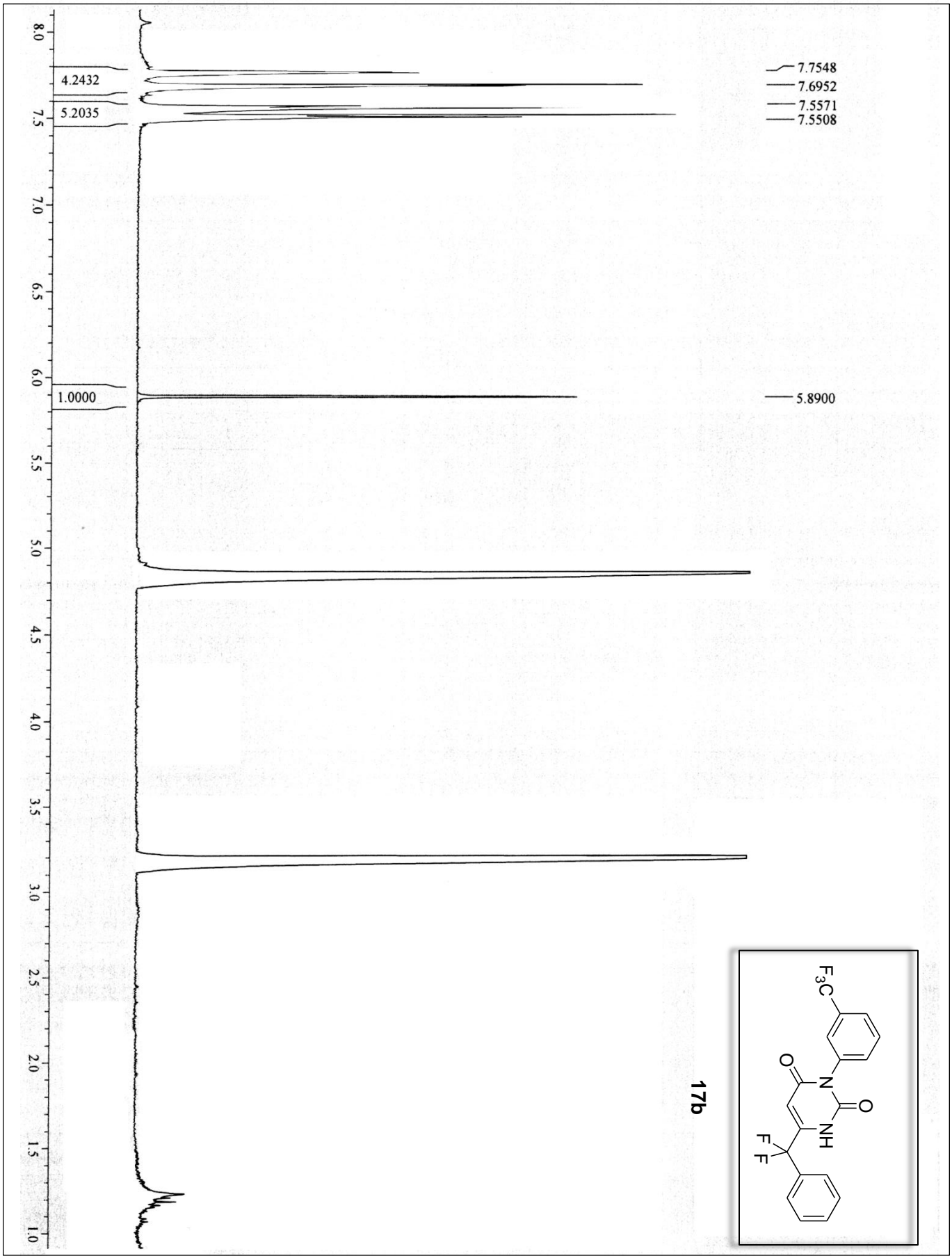


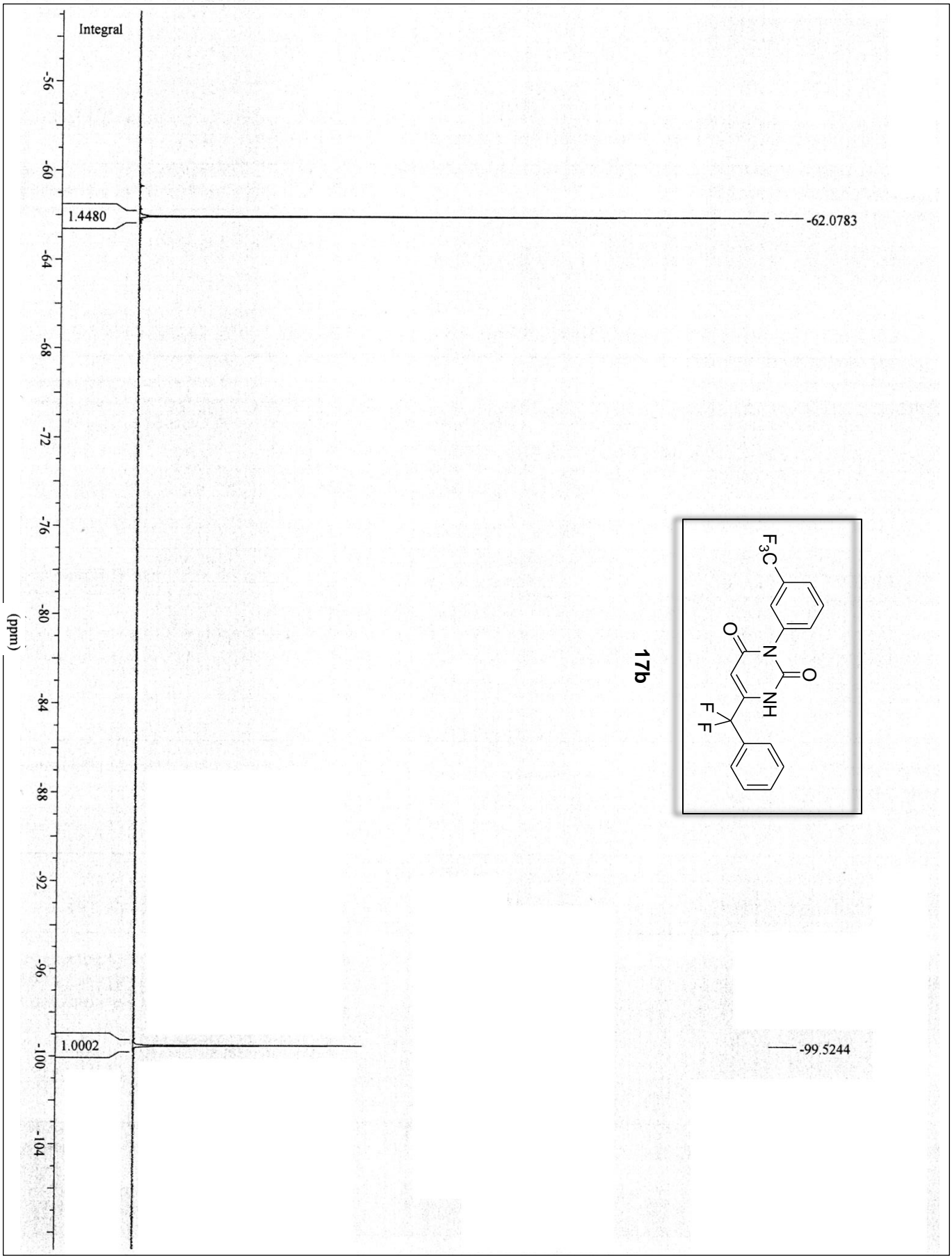
17a

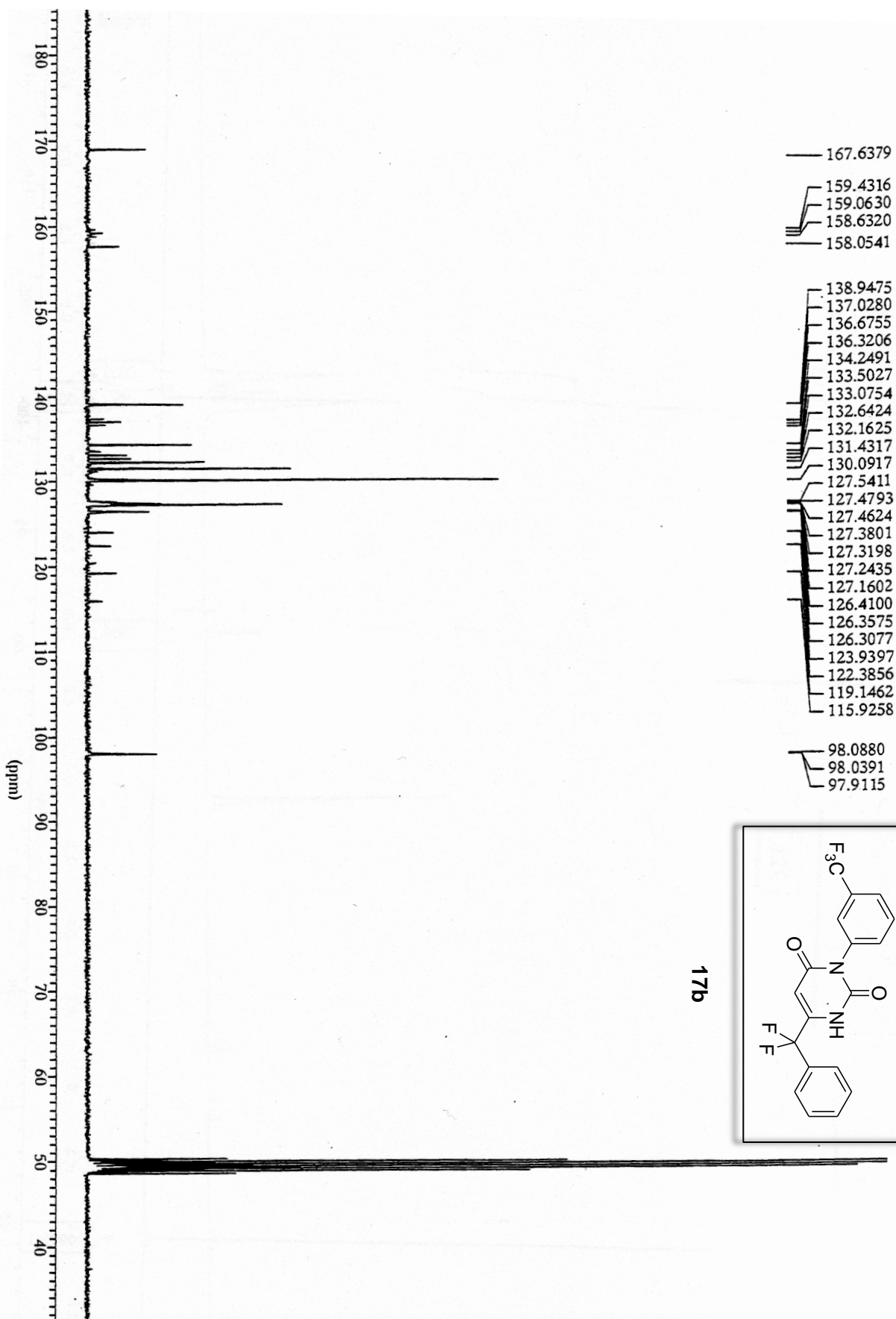




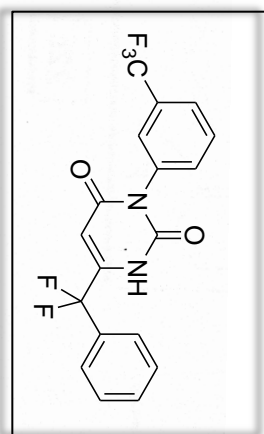
17a



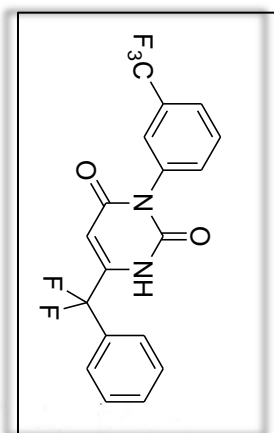




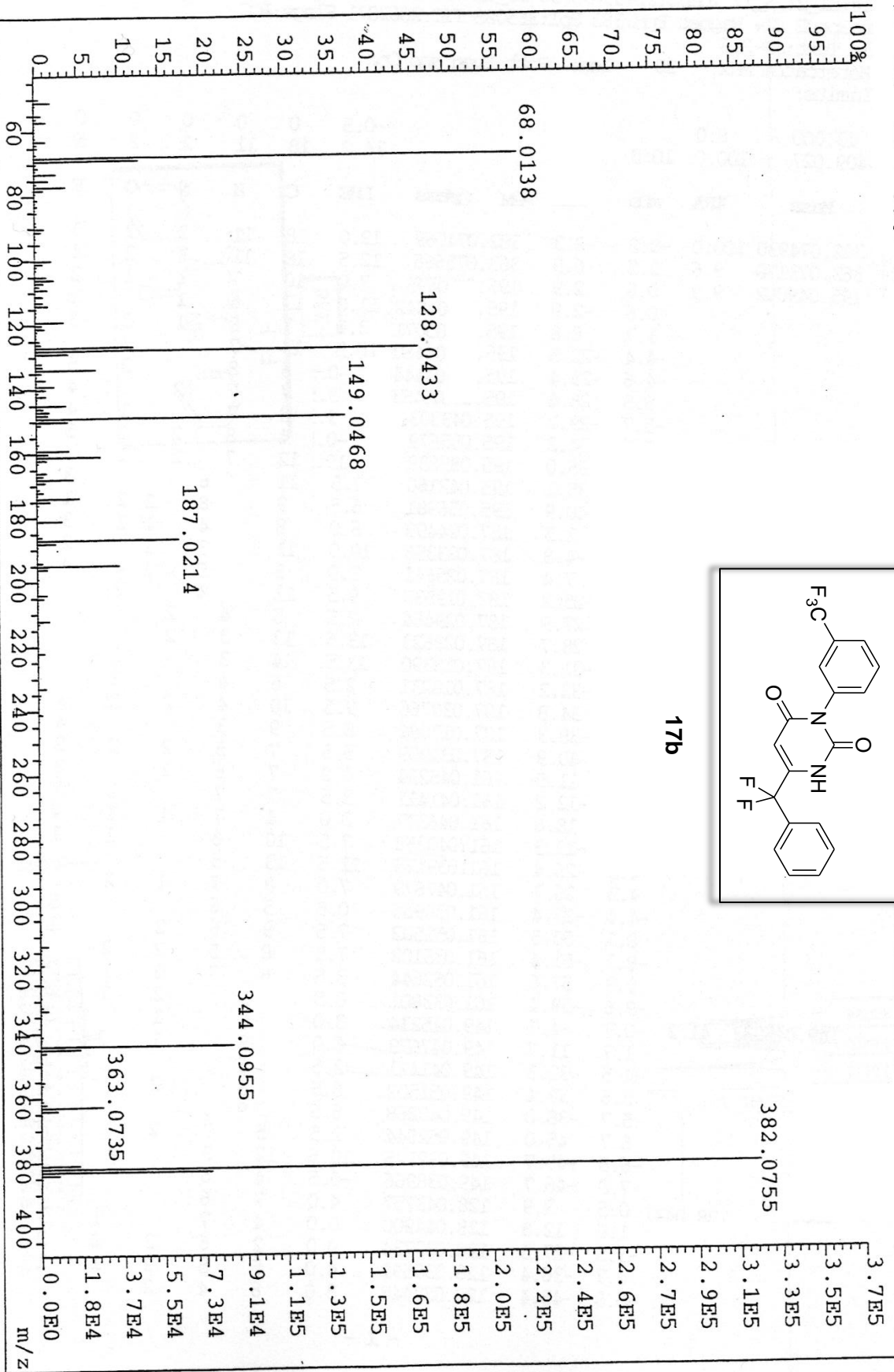
17b

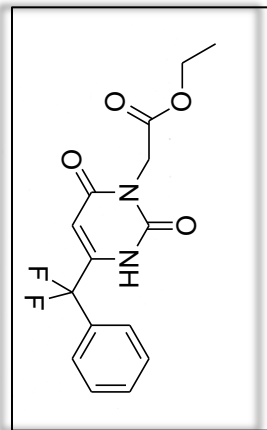
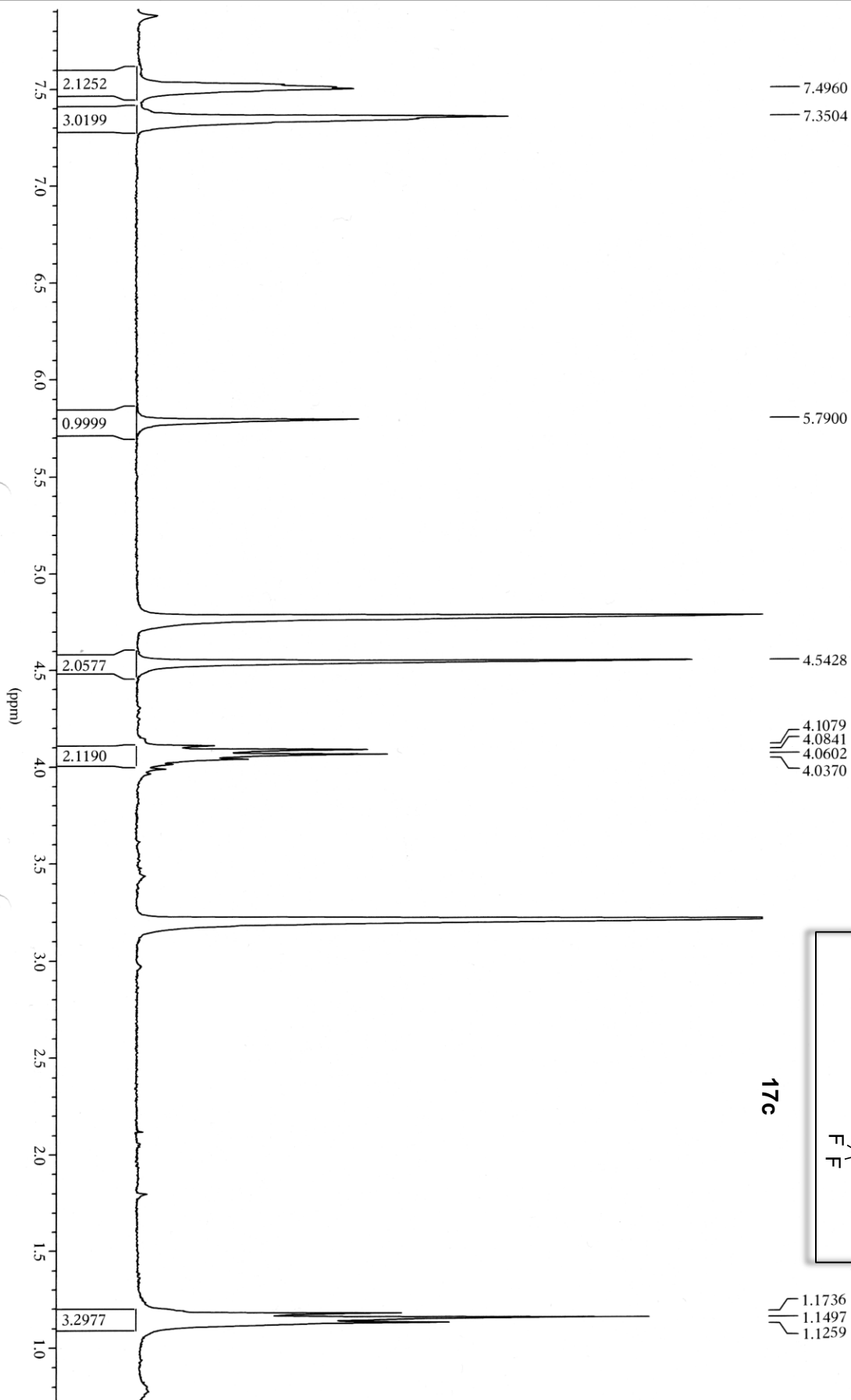


AutoSpecE EI+ Magnet

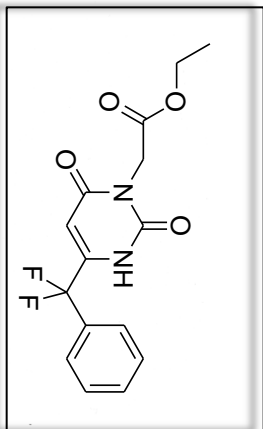


17b

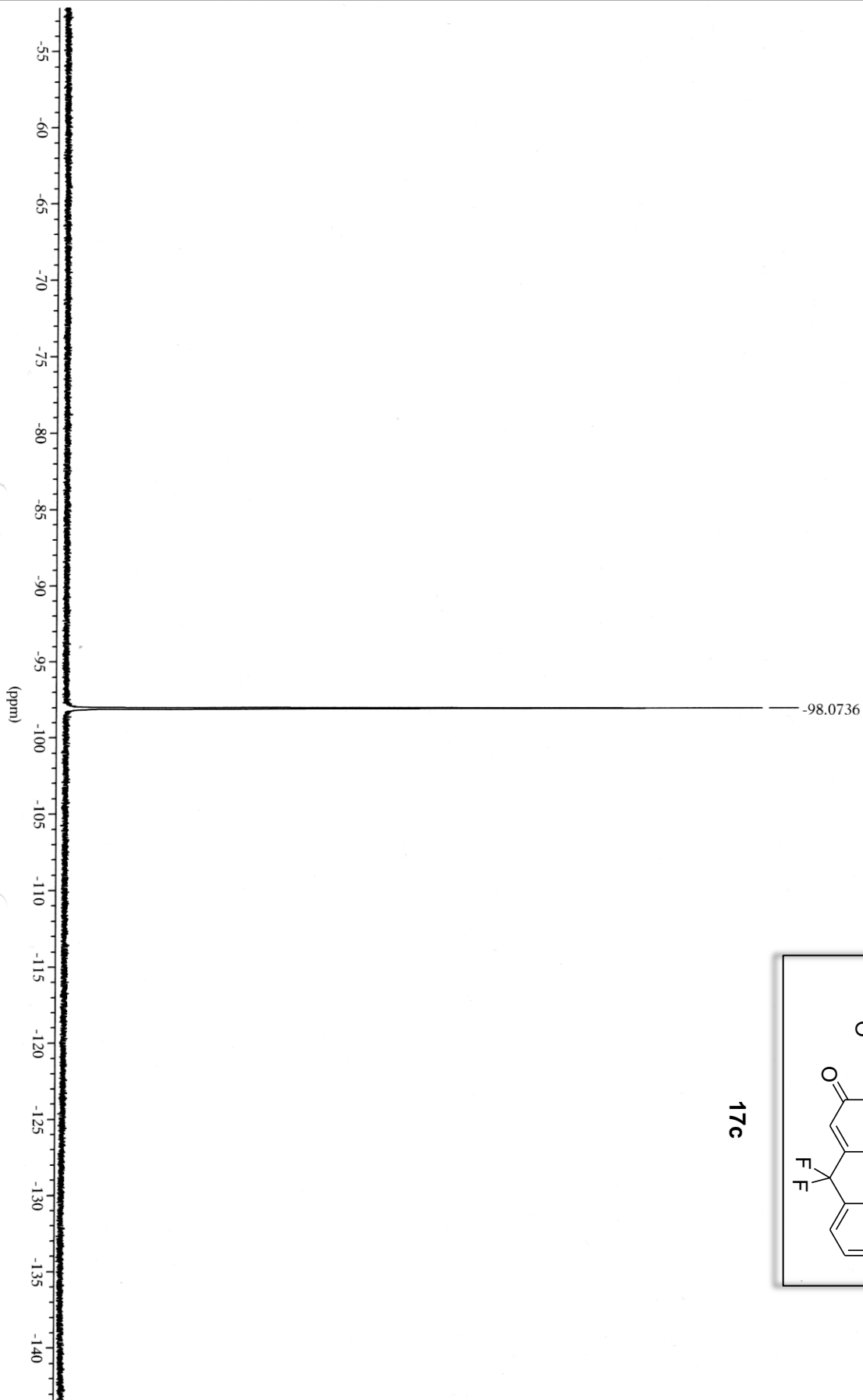


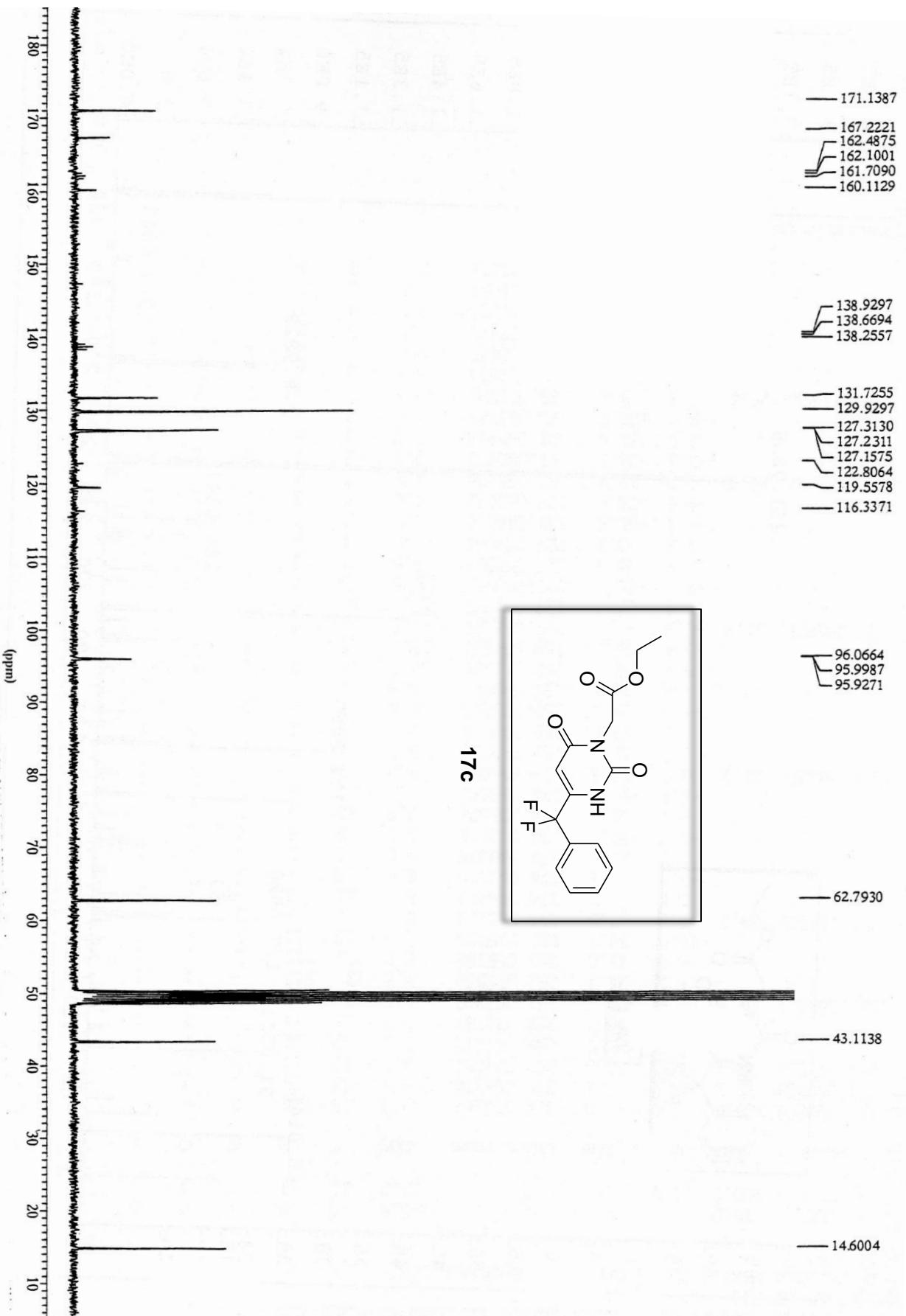


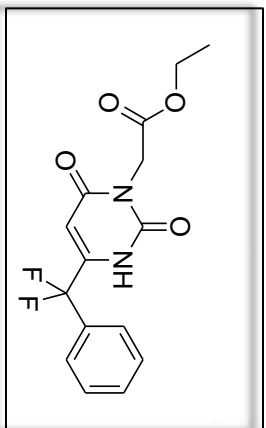




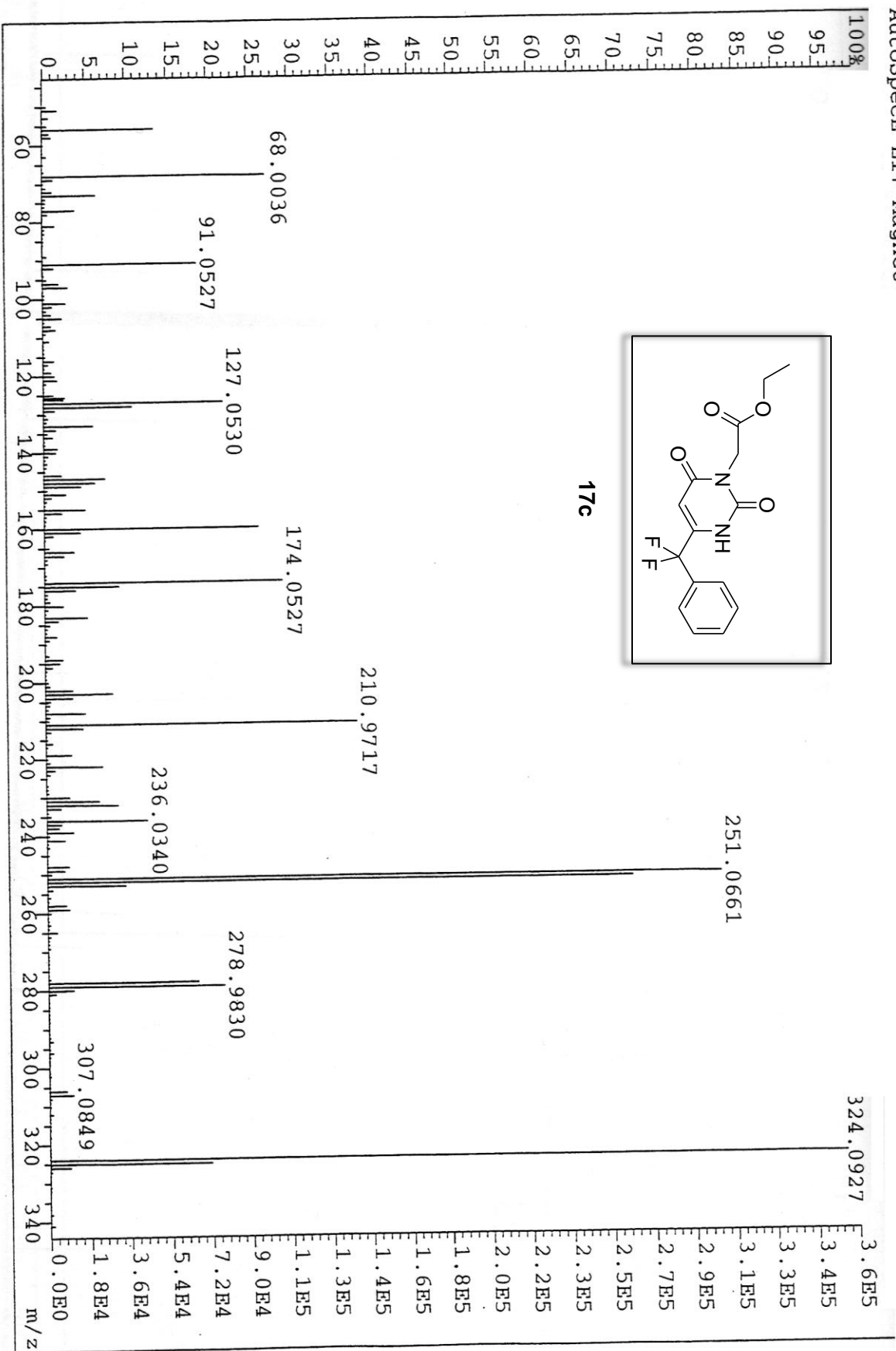
17c

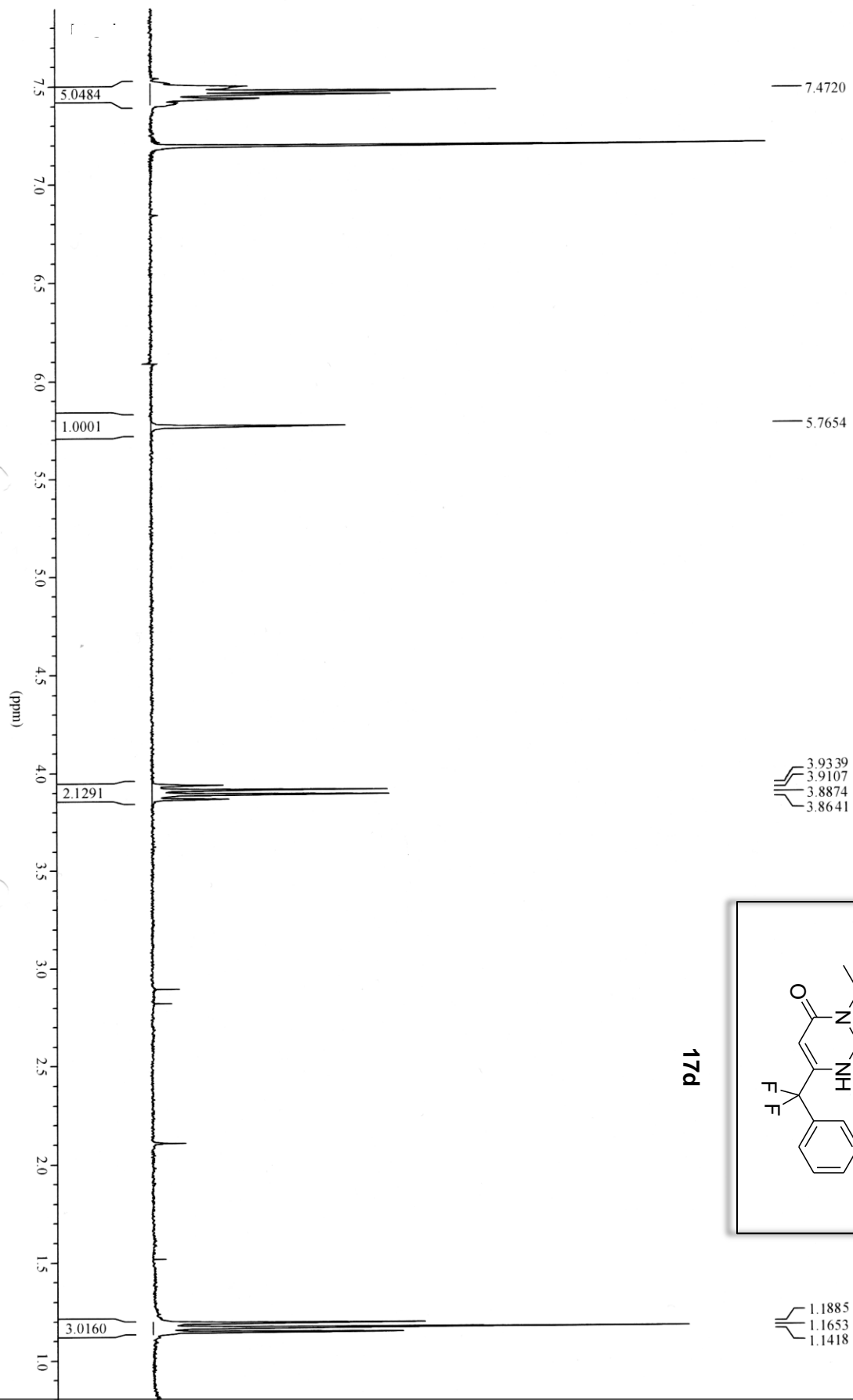




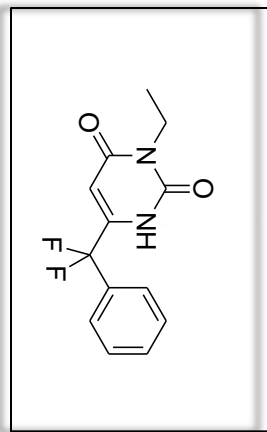


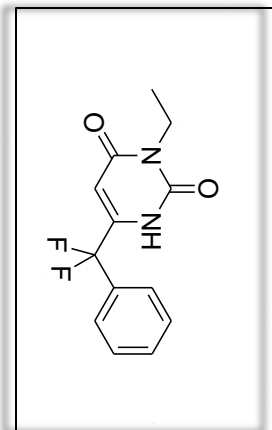
17c



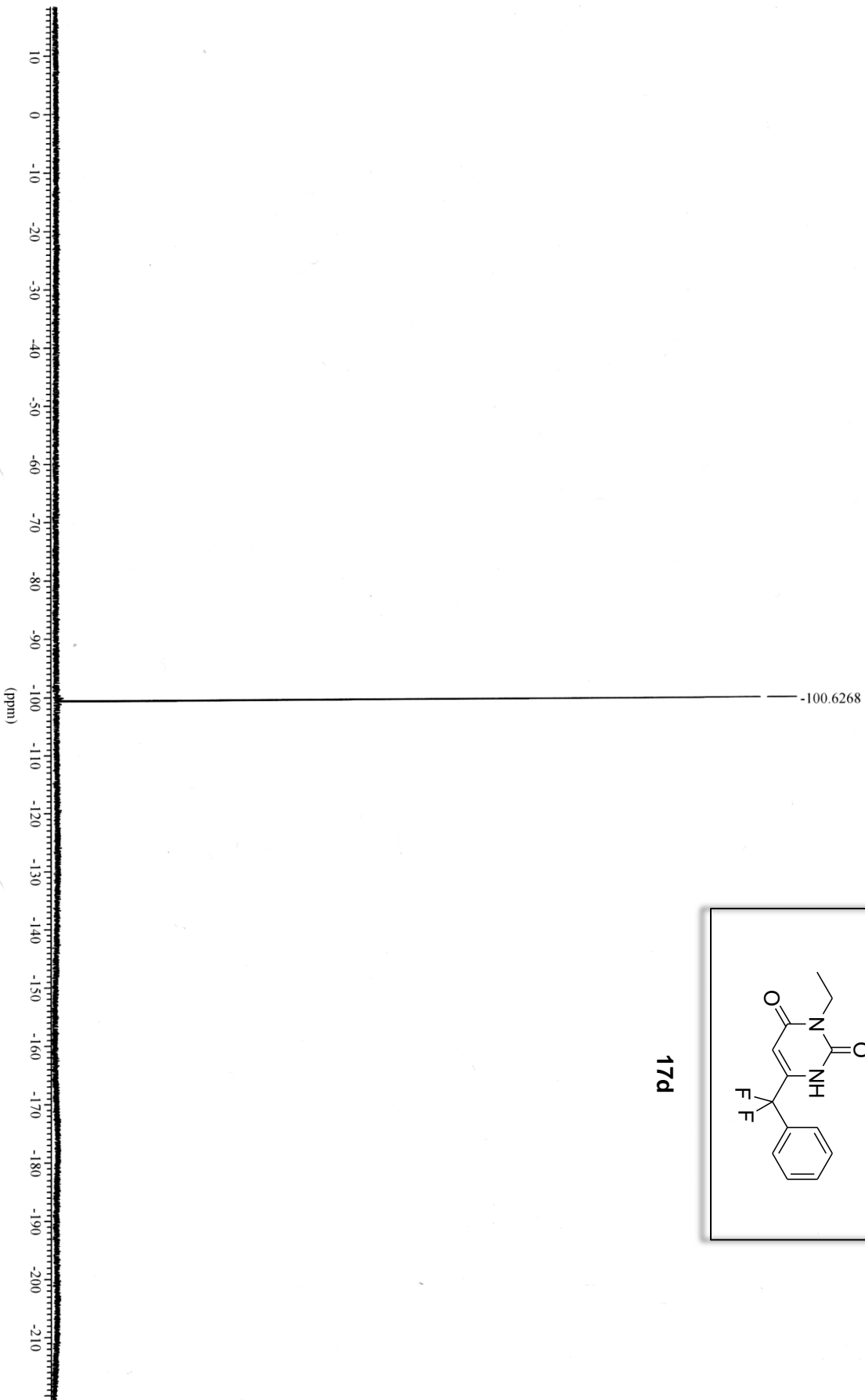


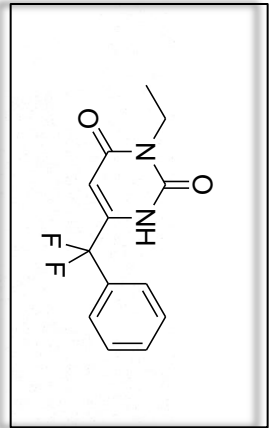
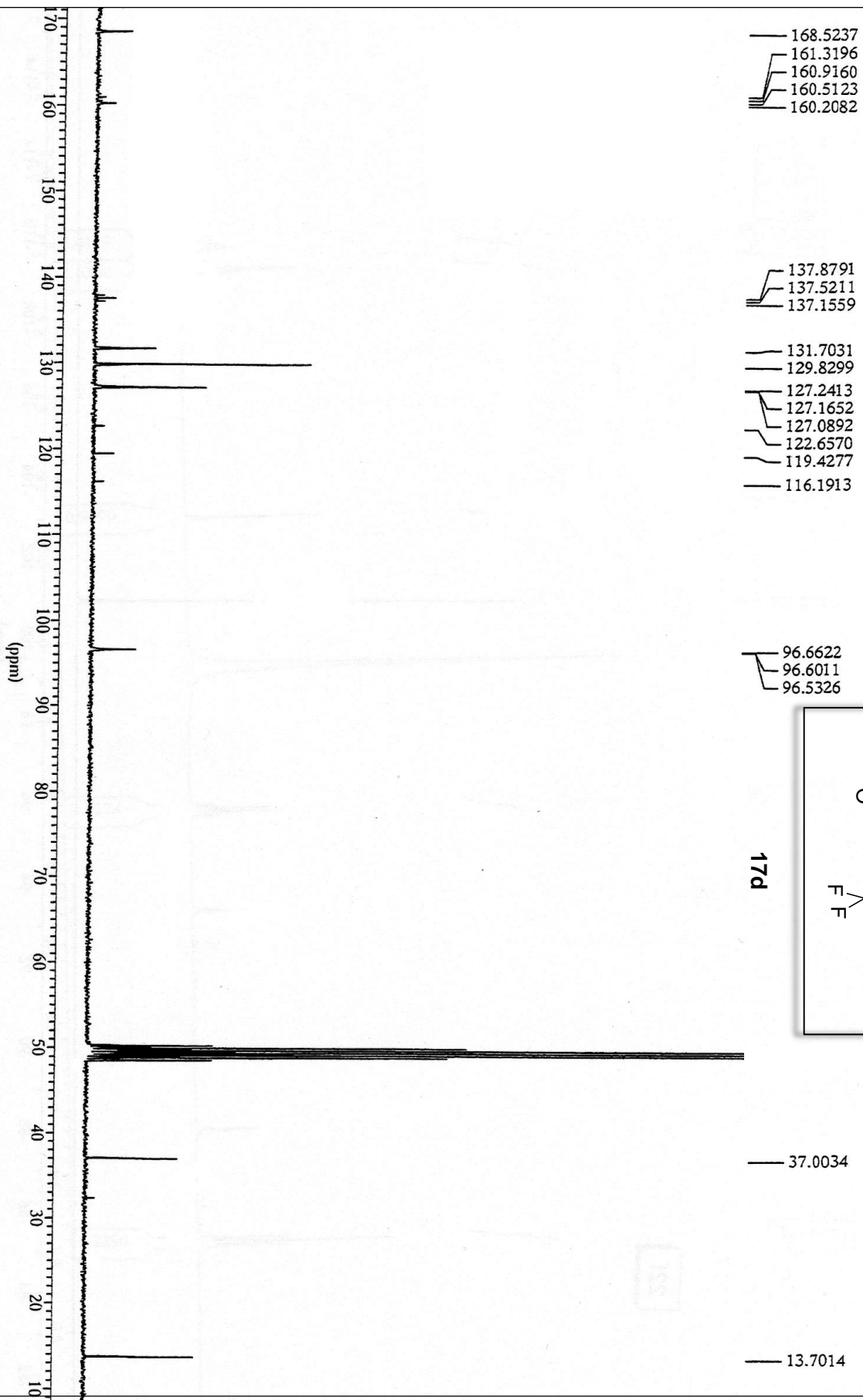
17d

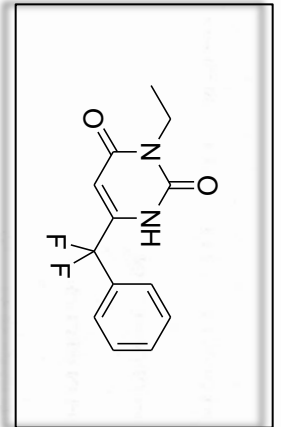




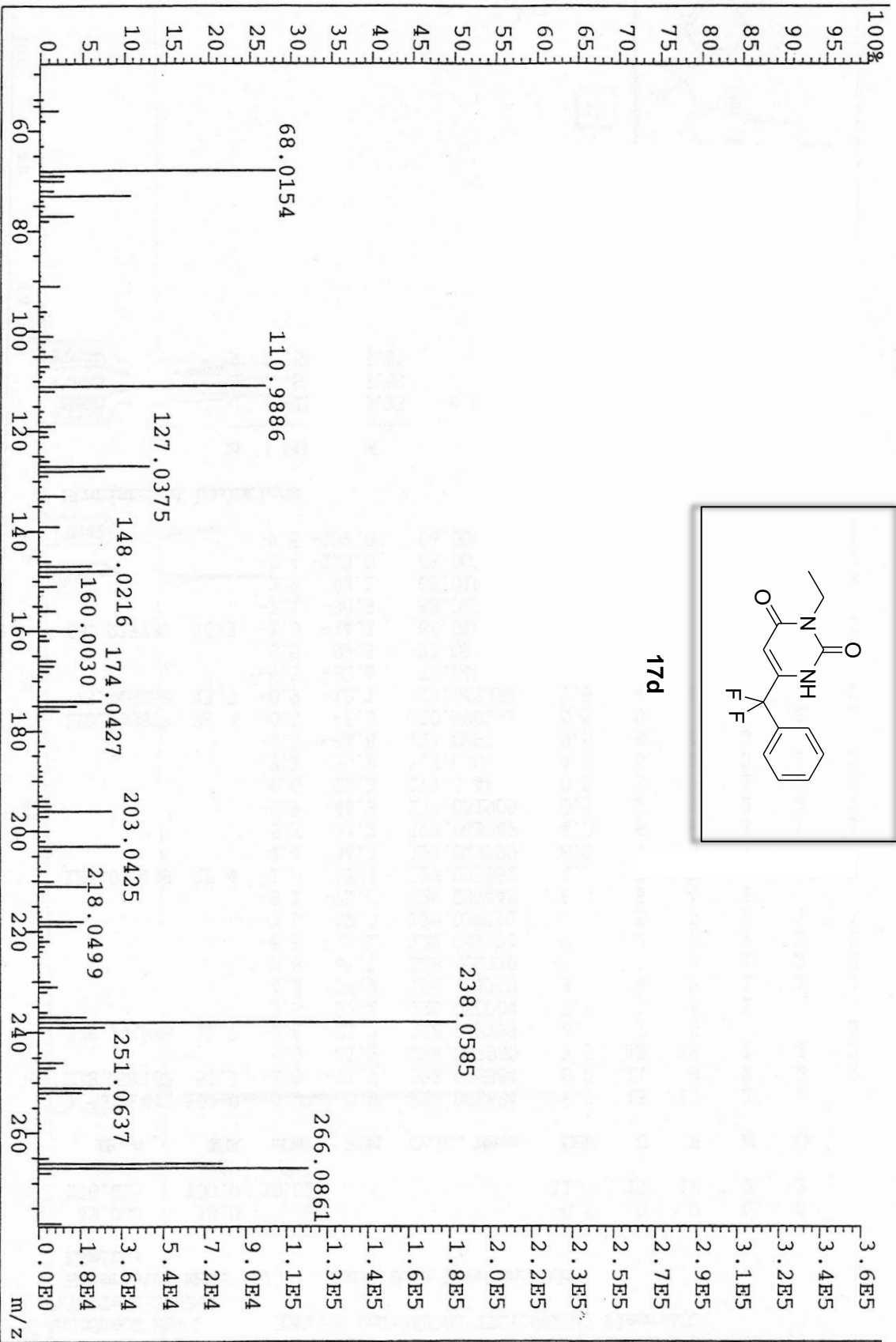
17d

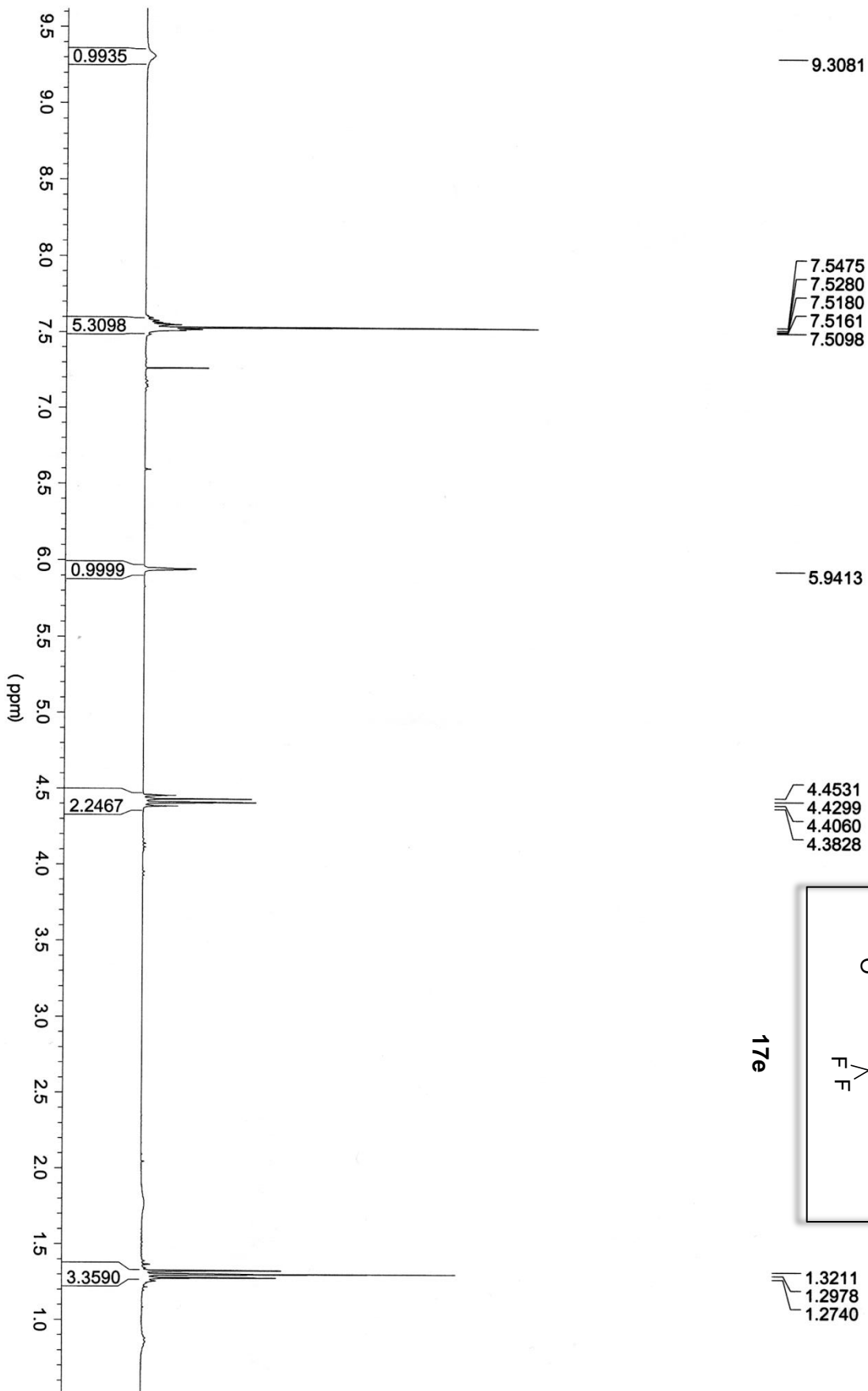




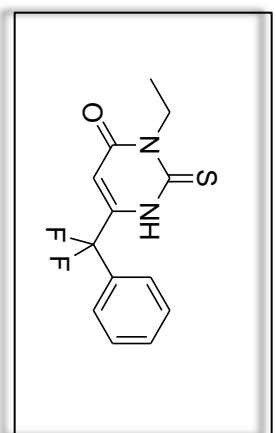


17d

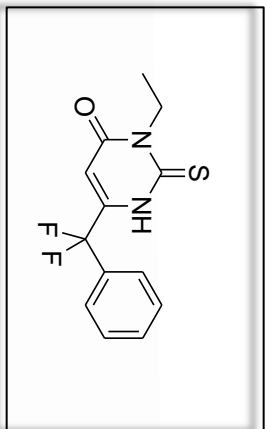




17e

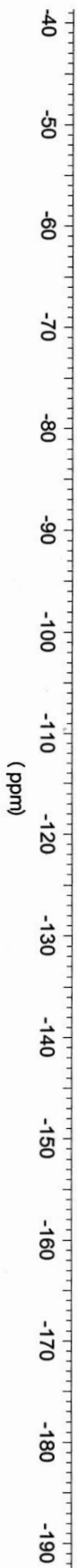


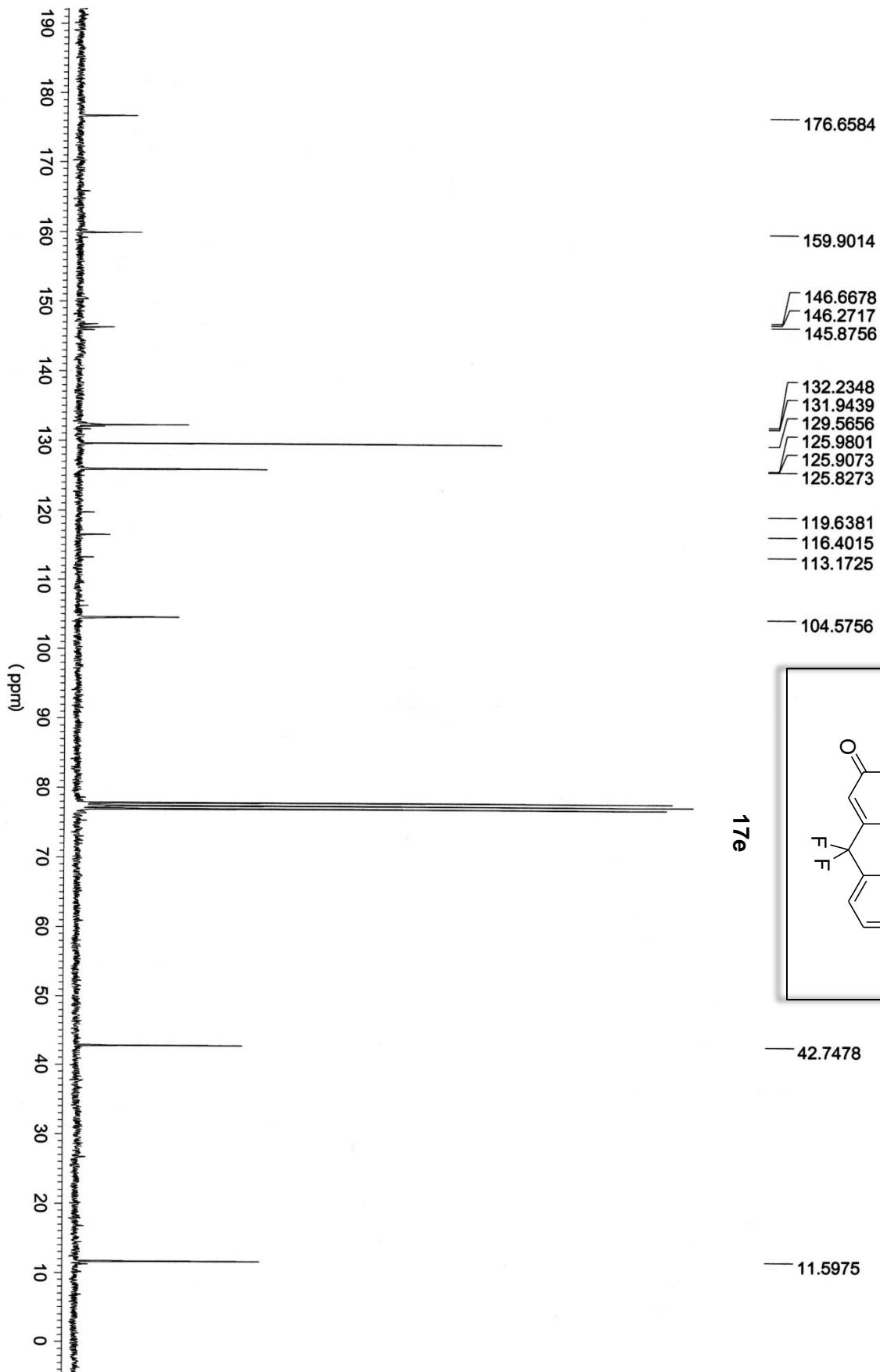




17e

-128.5035





176.6584

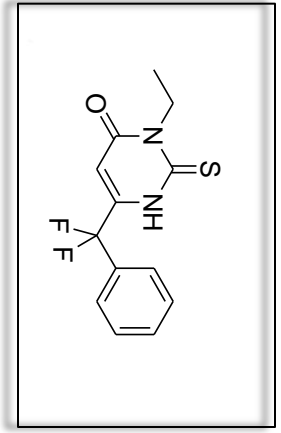
159.9014

146.6678  
146.2717  
145.8756

132.2348  
131.9439  
129.5656  
125.9801  
125.9073  
125.8273

119.6381  
116.4015  
113.1725

104.5756

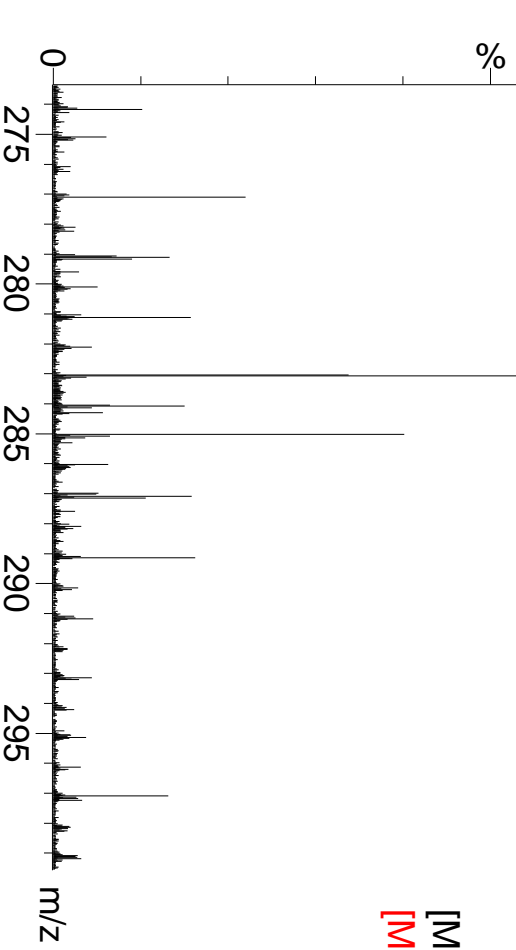
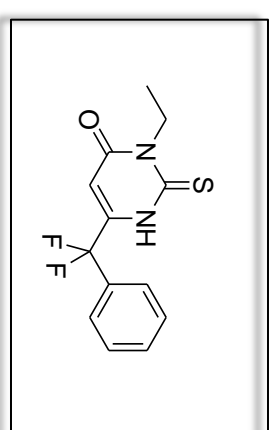


42.7478

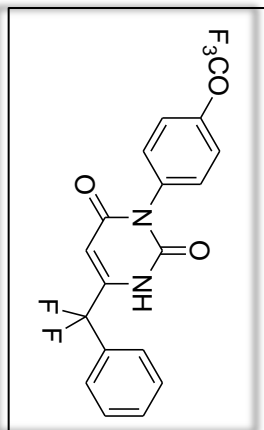
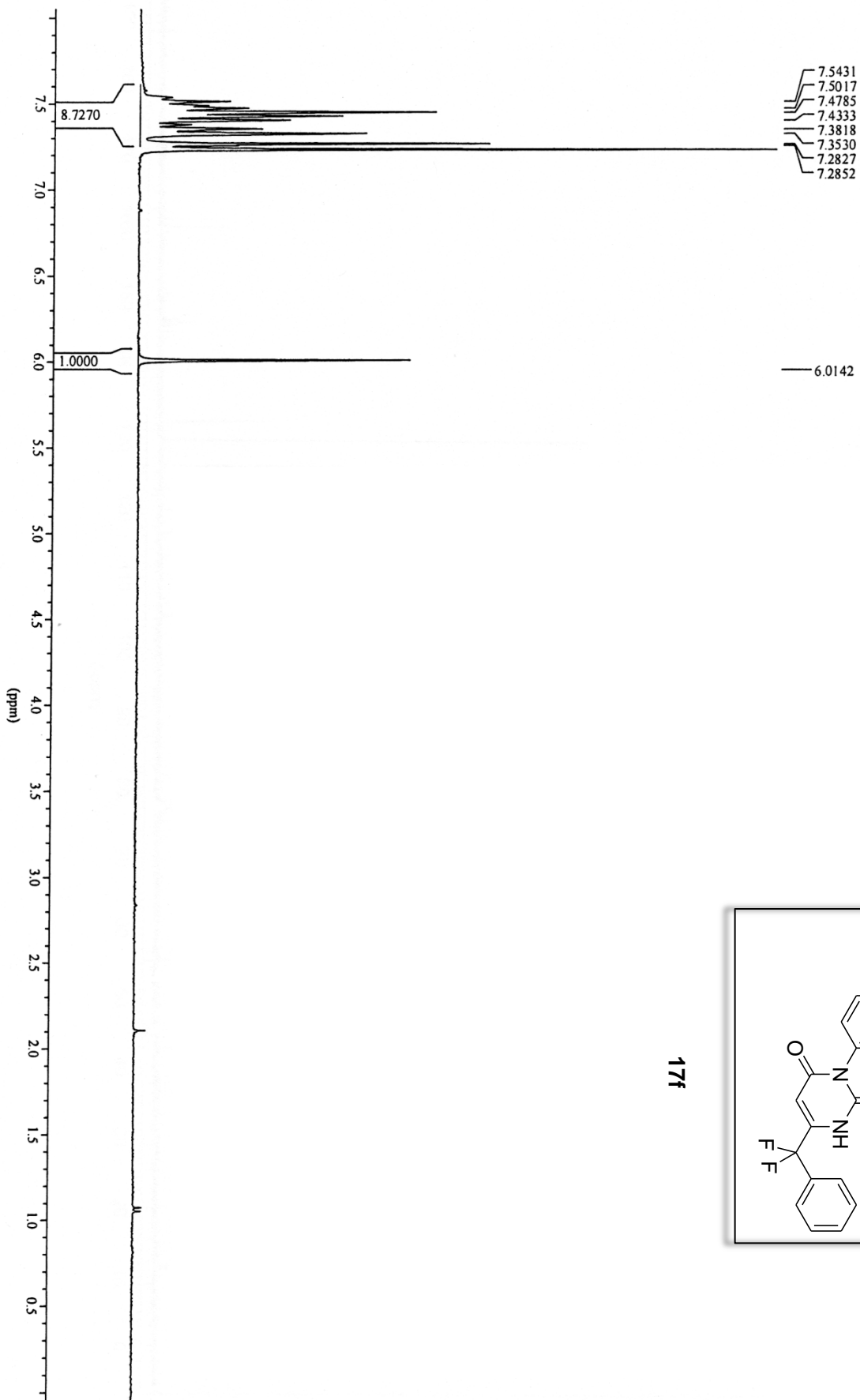
11.5975

scic\_uv\_0643 74 (0.797) Cm (72:108)  
283.0714

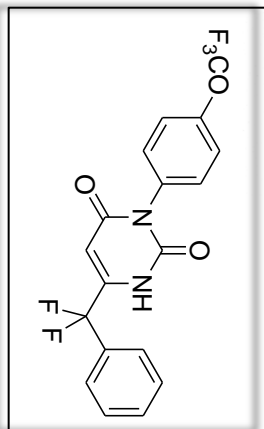
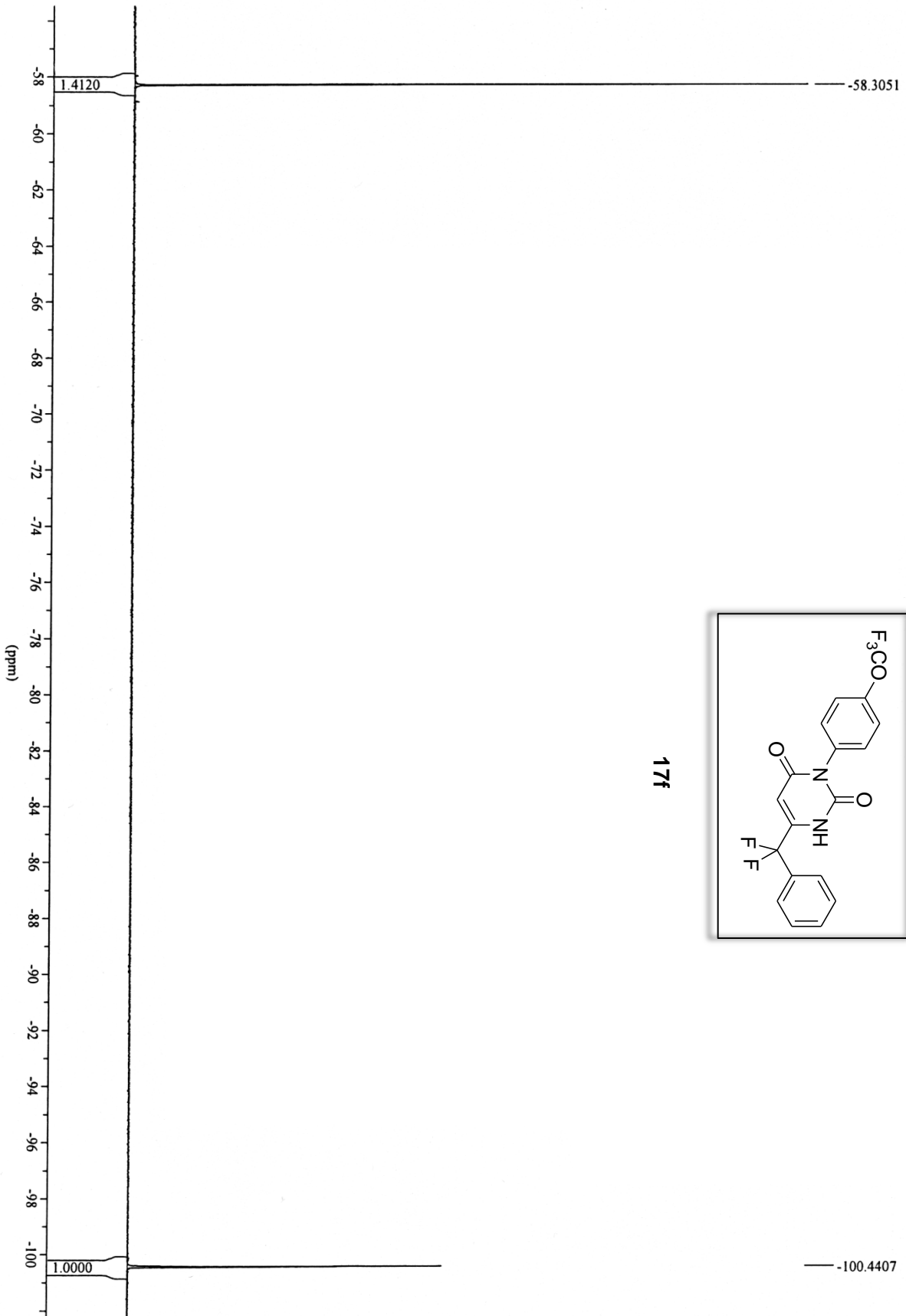
1: TOF MS ES+  
1.09e3



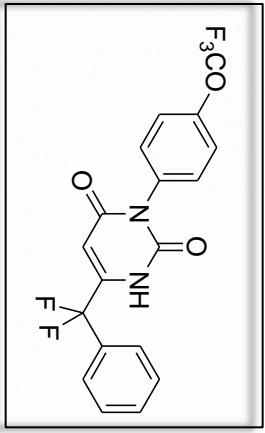
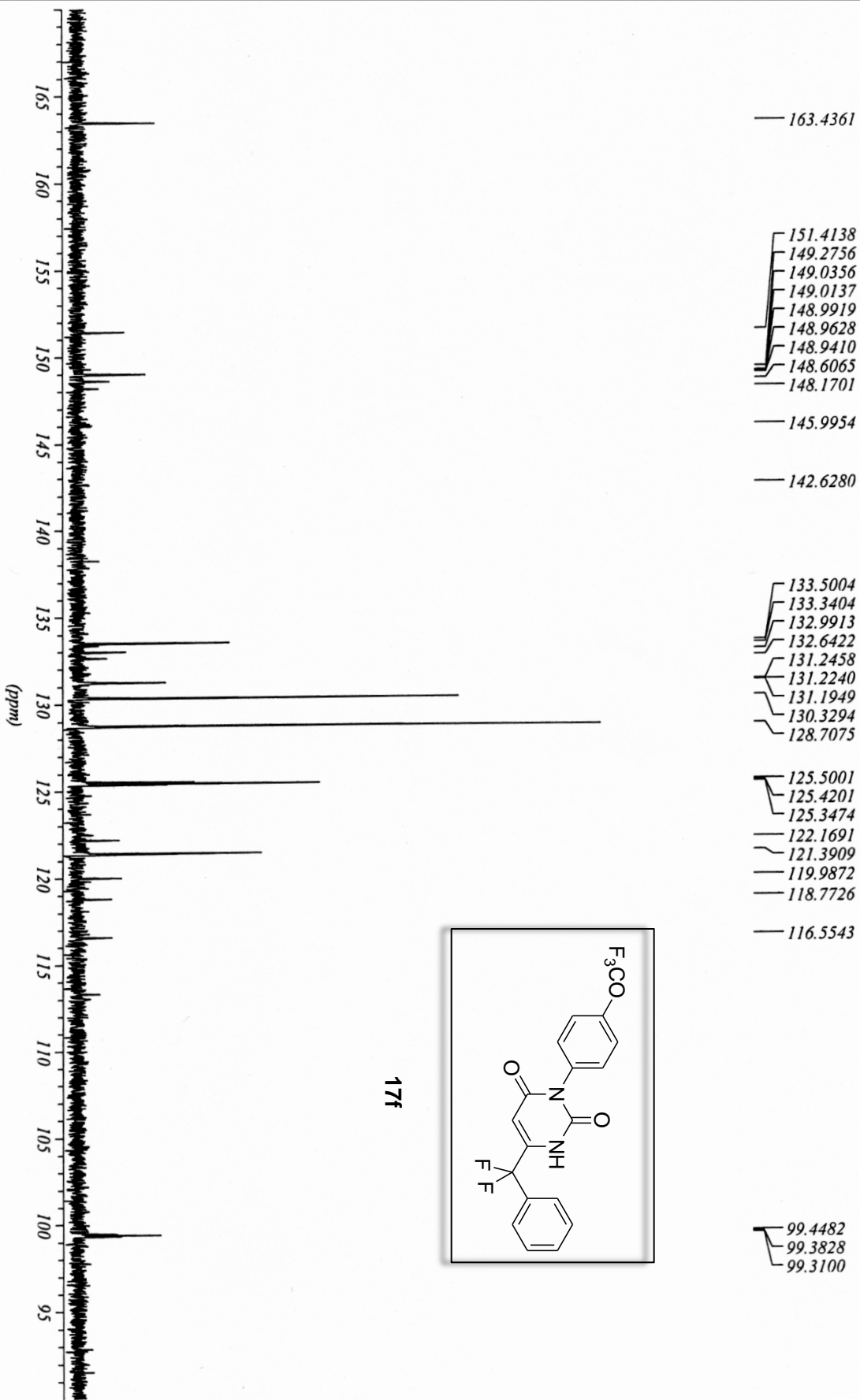
[M+H]<sup>+</sup>=283.0717 teórico  
[M+H]<sup>+</sup>=283.0714 (1.1 ppm) experimental



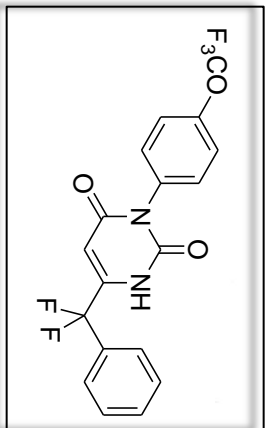
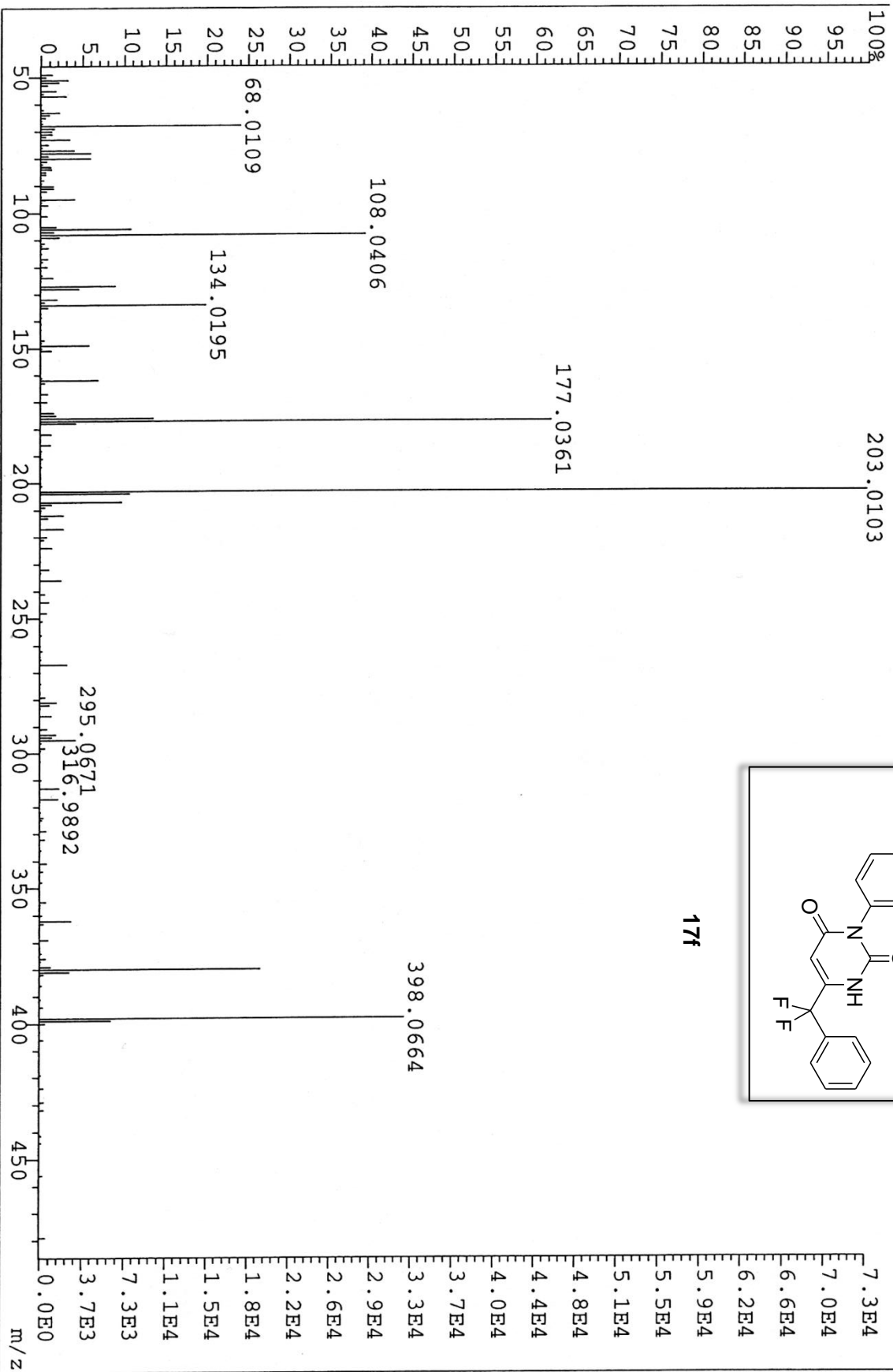
177f



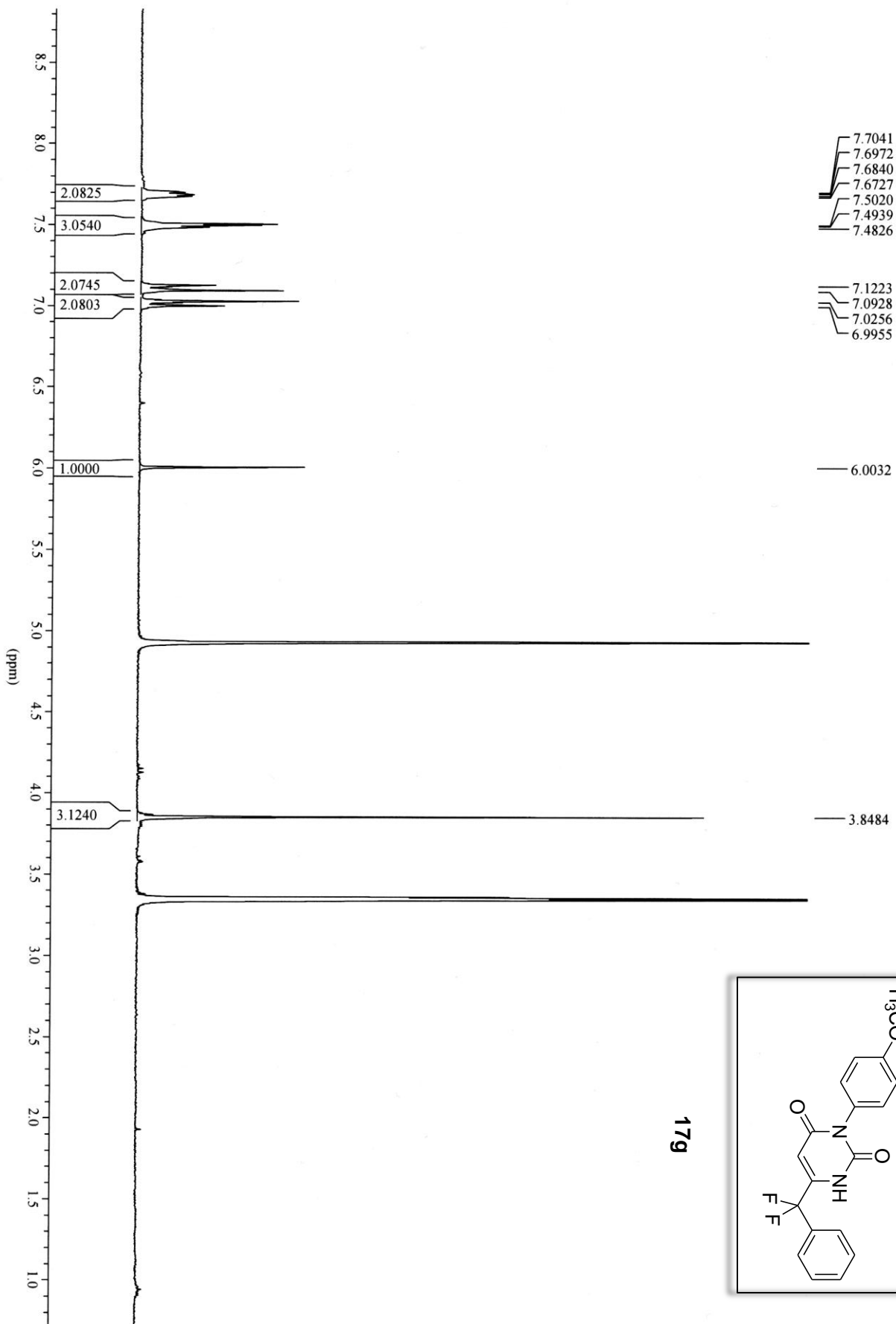
17F



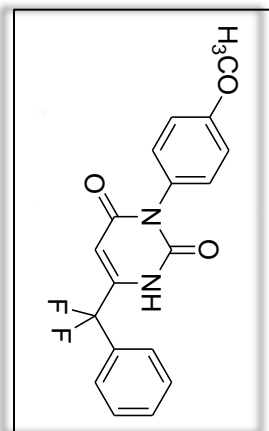
AutoSpec EI+ Magnet



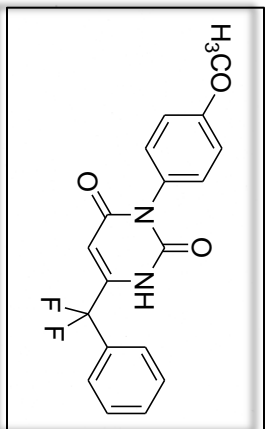
177



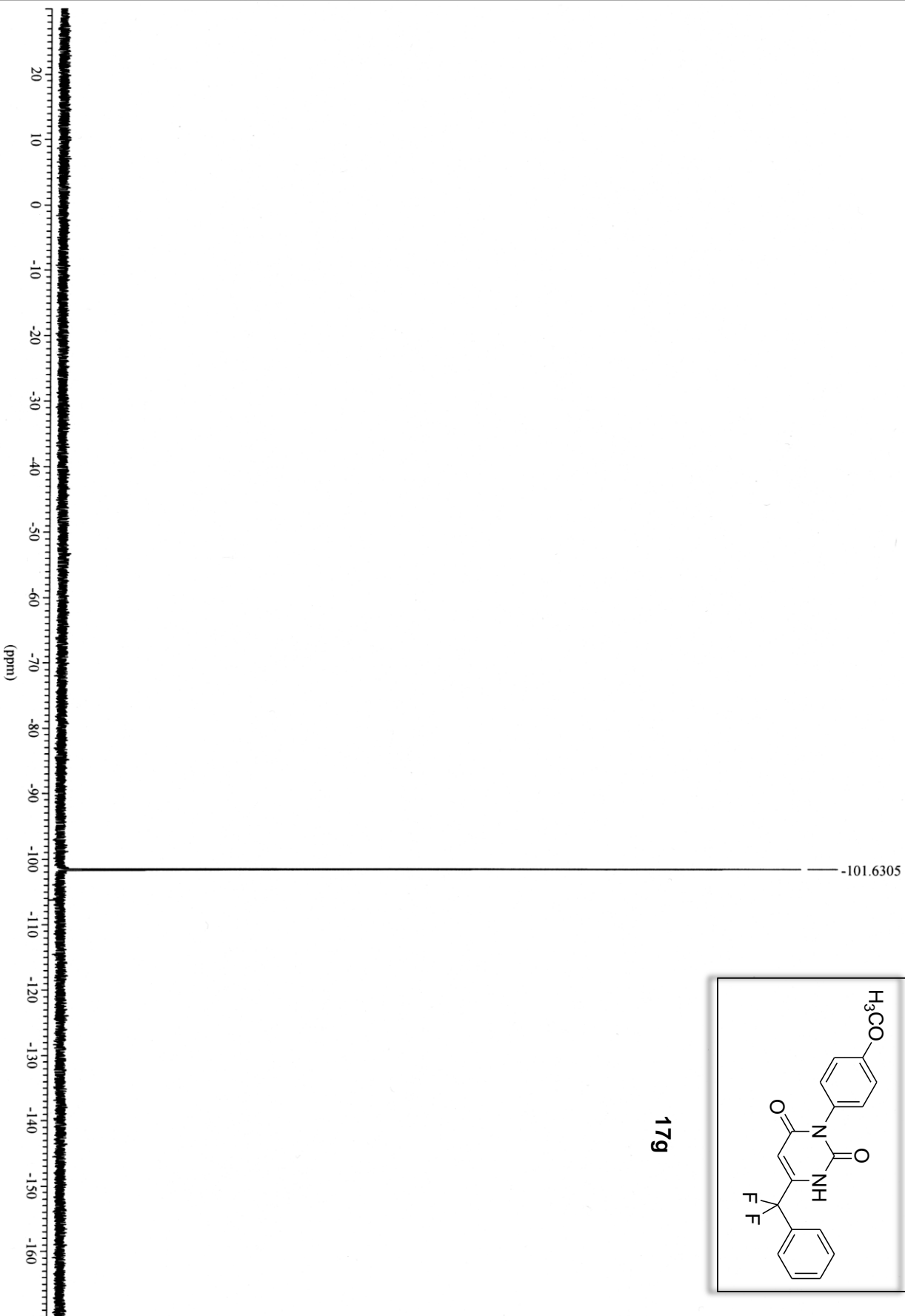
17g

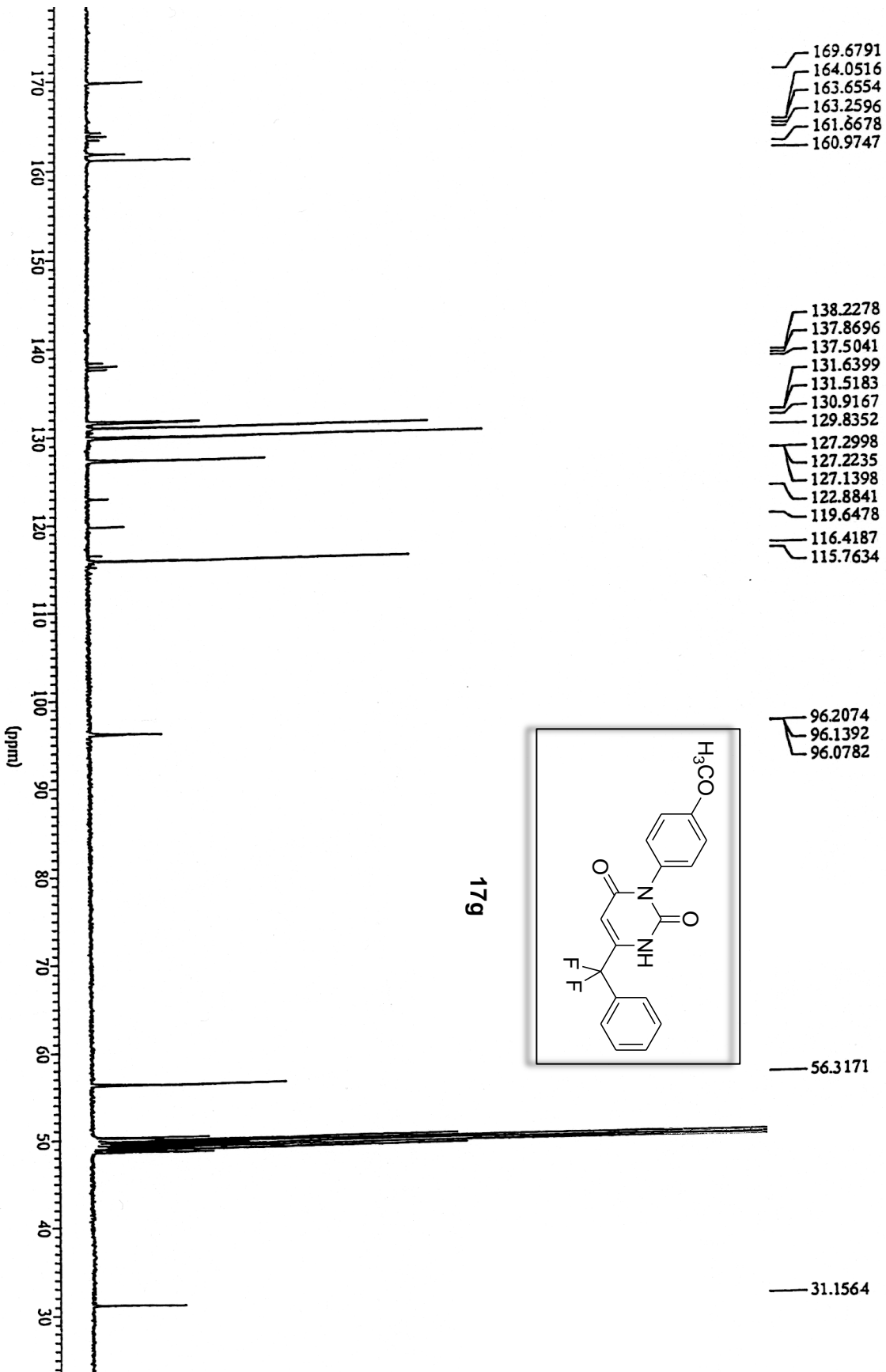




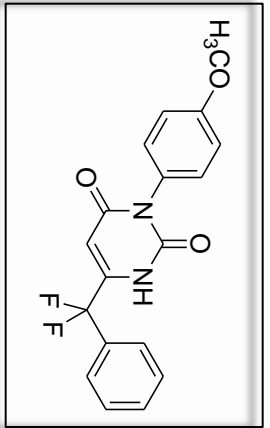
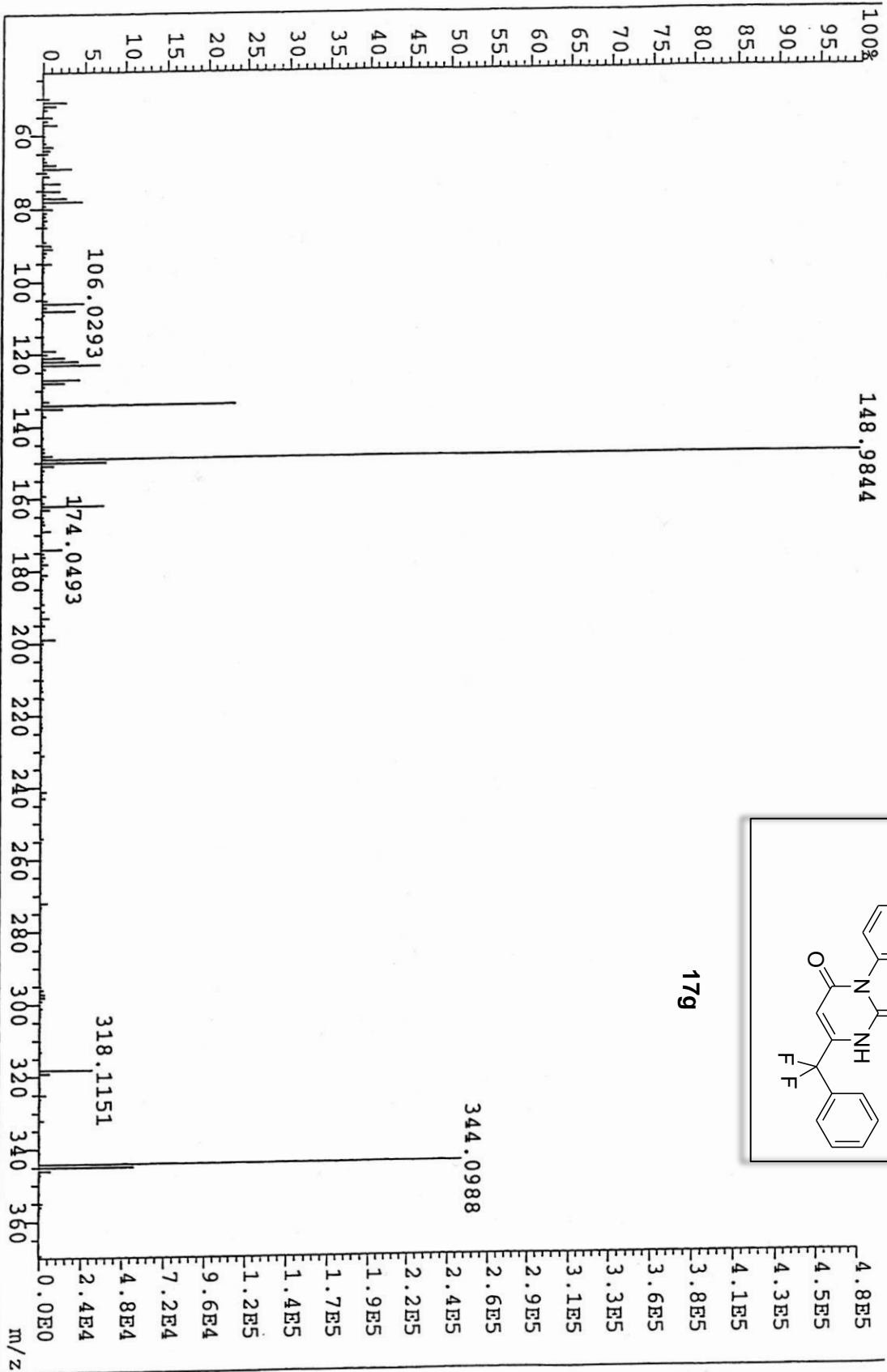


17g

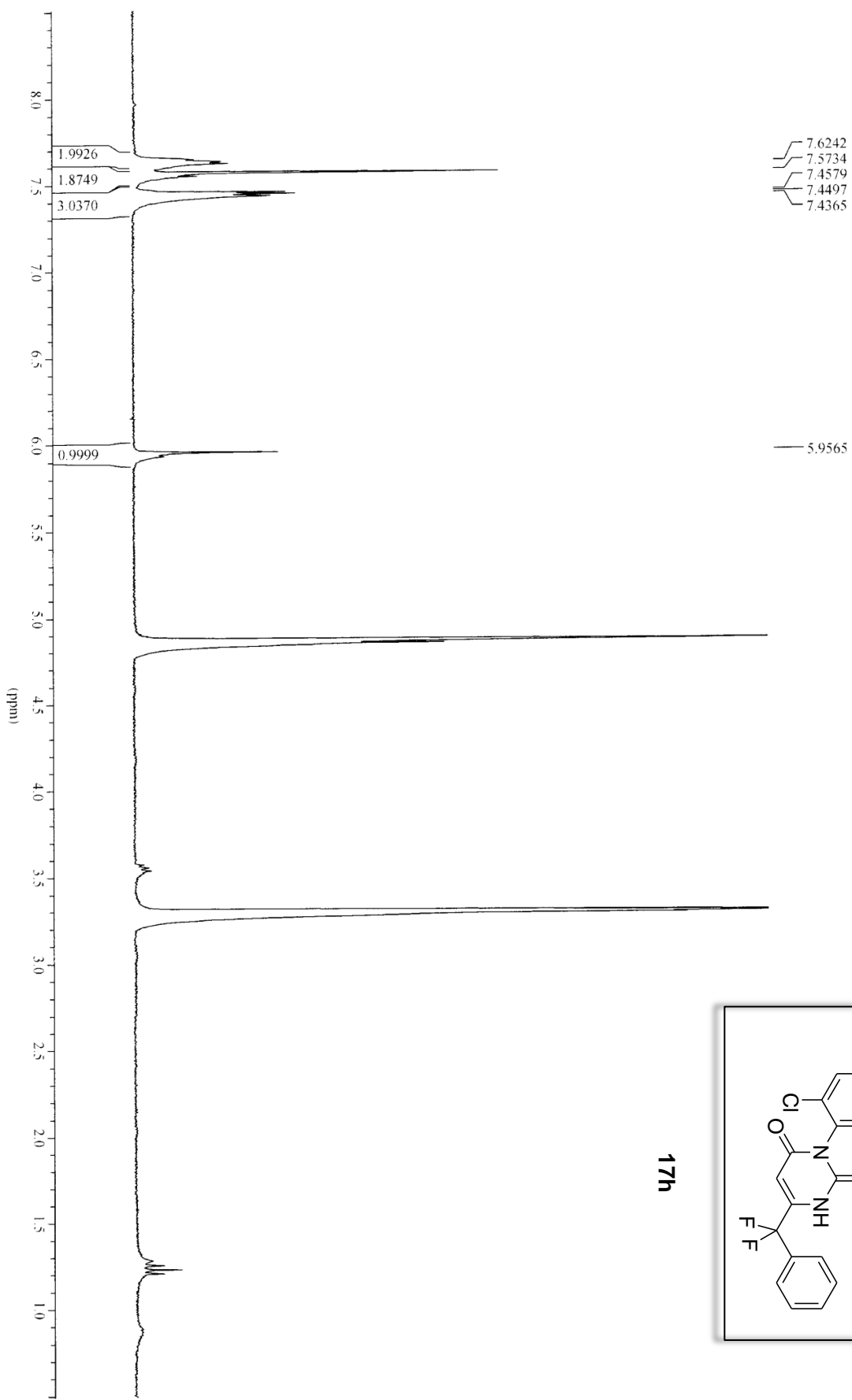




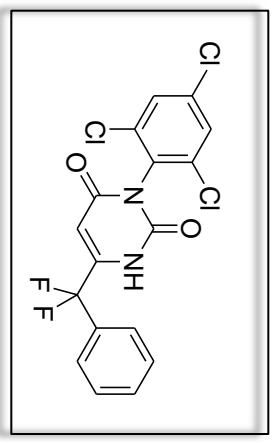
AutoSpecE EI+ Magnet

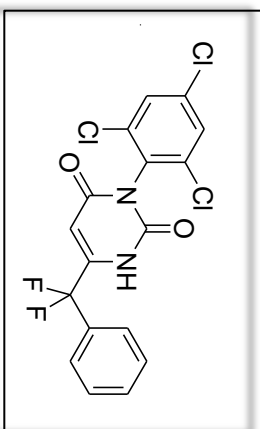


17g

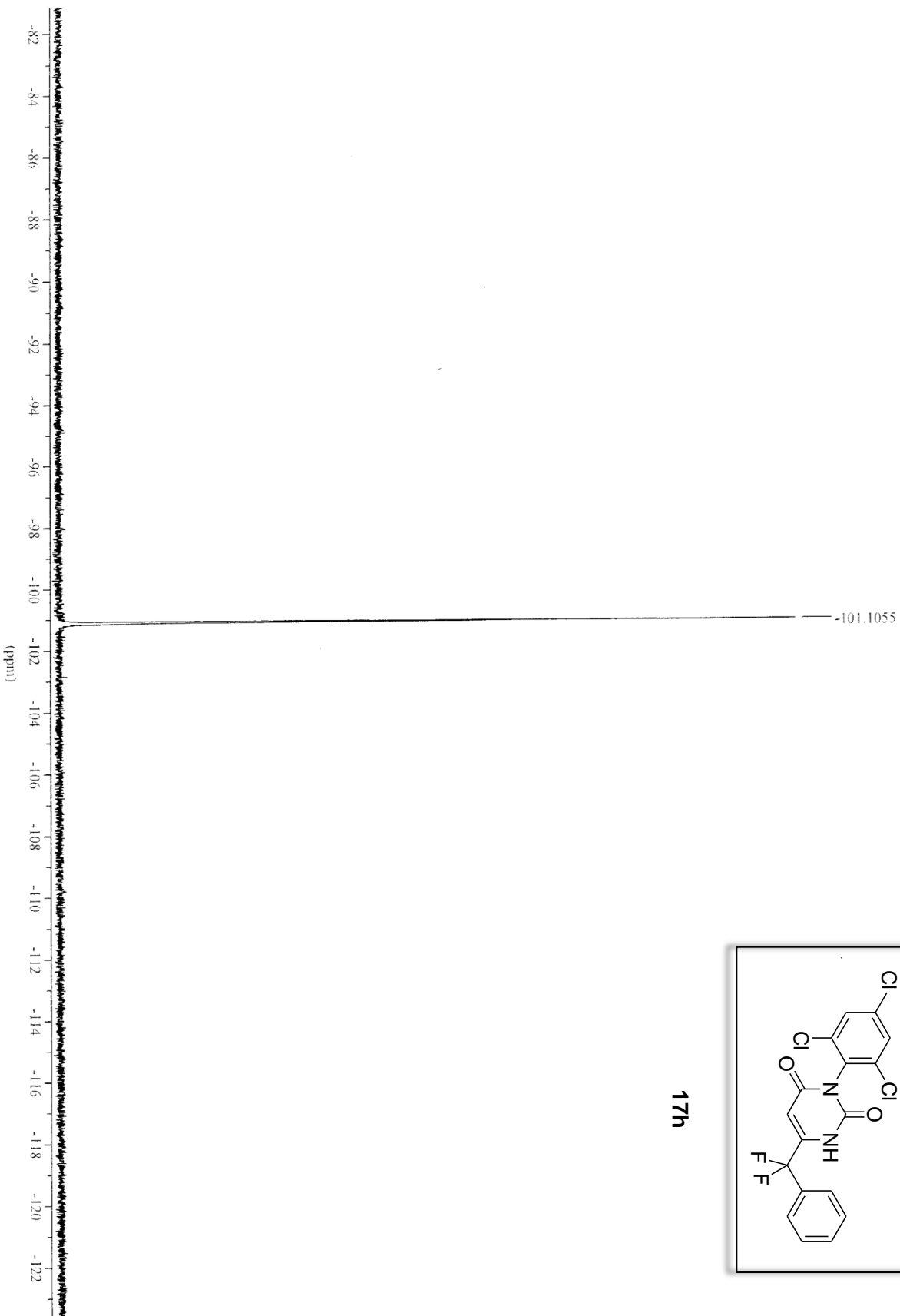


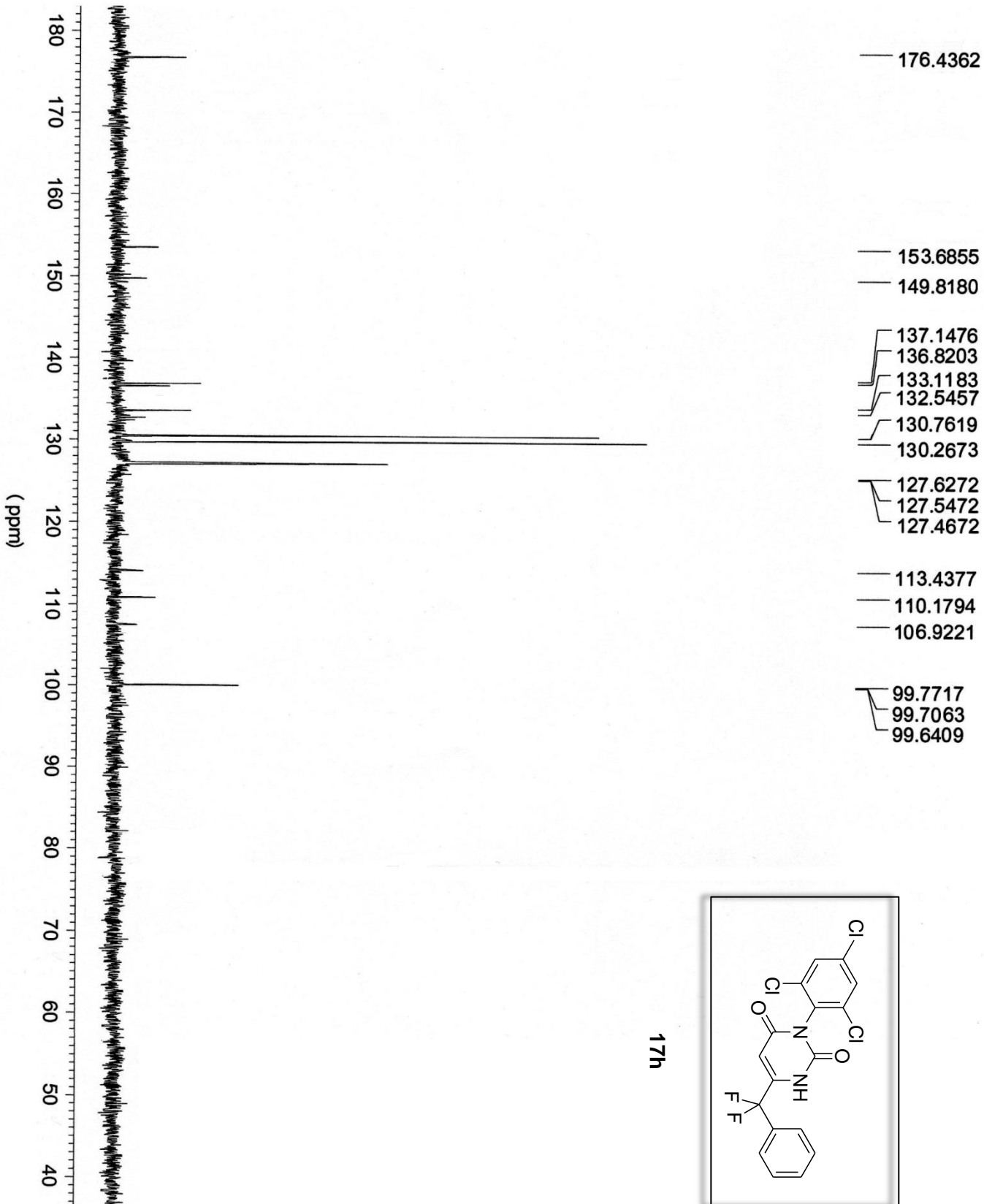
17h



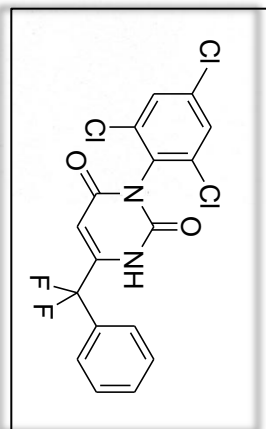


17h





17h



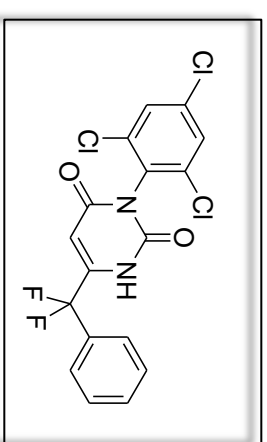
scic\_uv\_0644 56 (0.605) Cm (49:58)  
414.9620

1: TOF MS ES-  
5.40e3

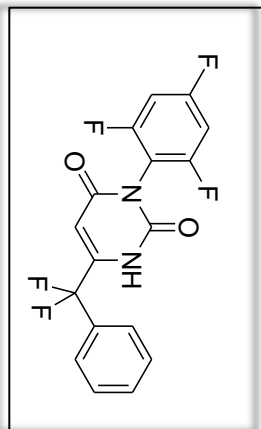


[M-H]<sup>-</sup>=414.9619 teórico

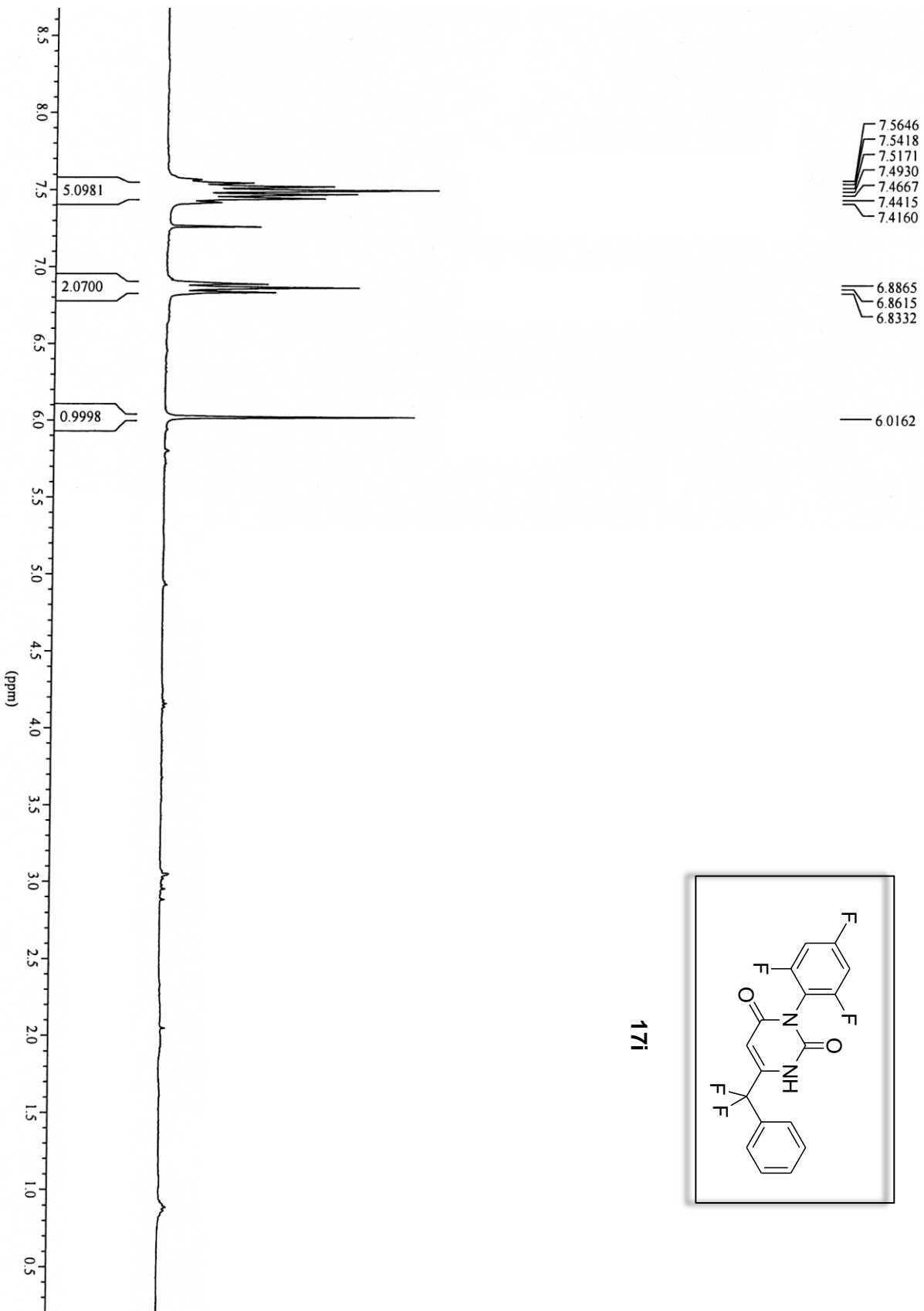
[M-H]<sup>-</sup>=414.9620 (0.2 ppm) experimental



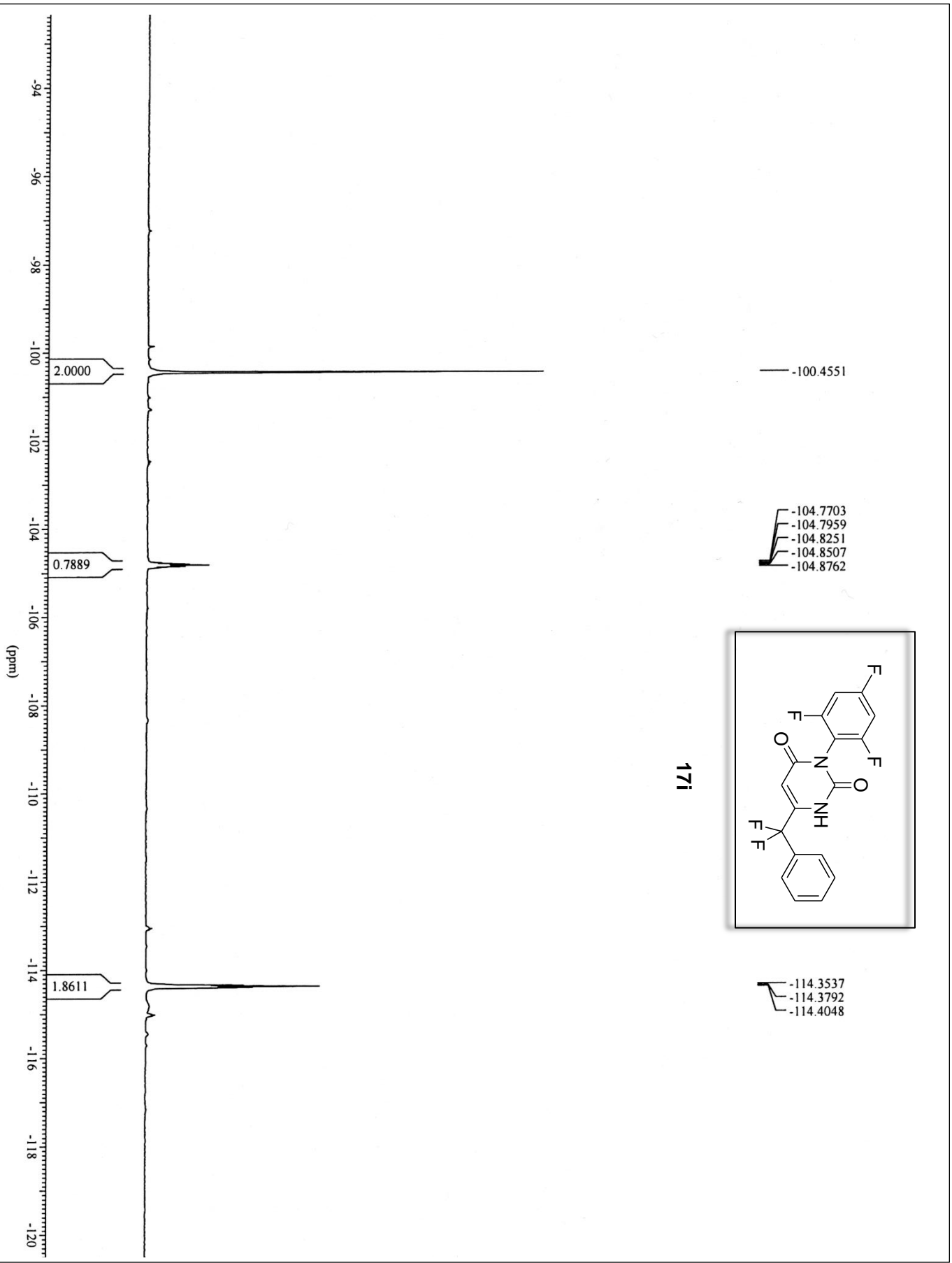
17h

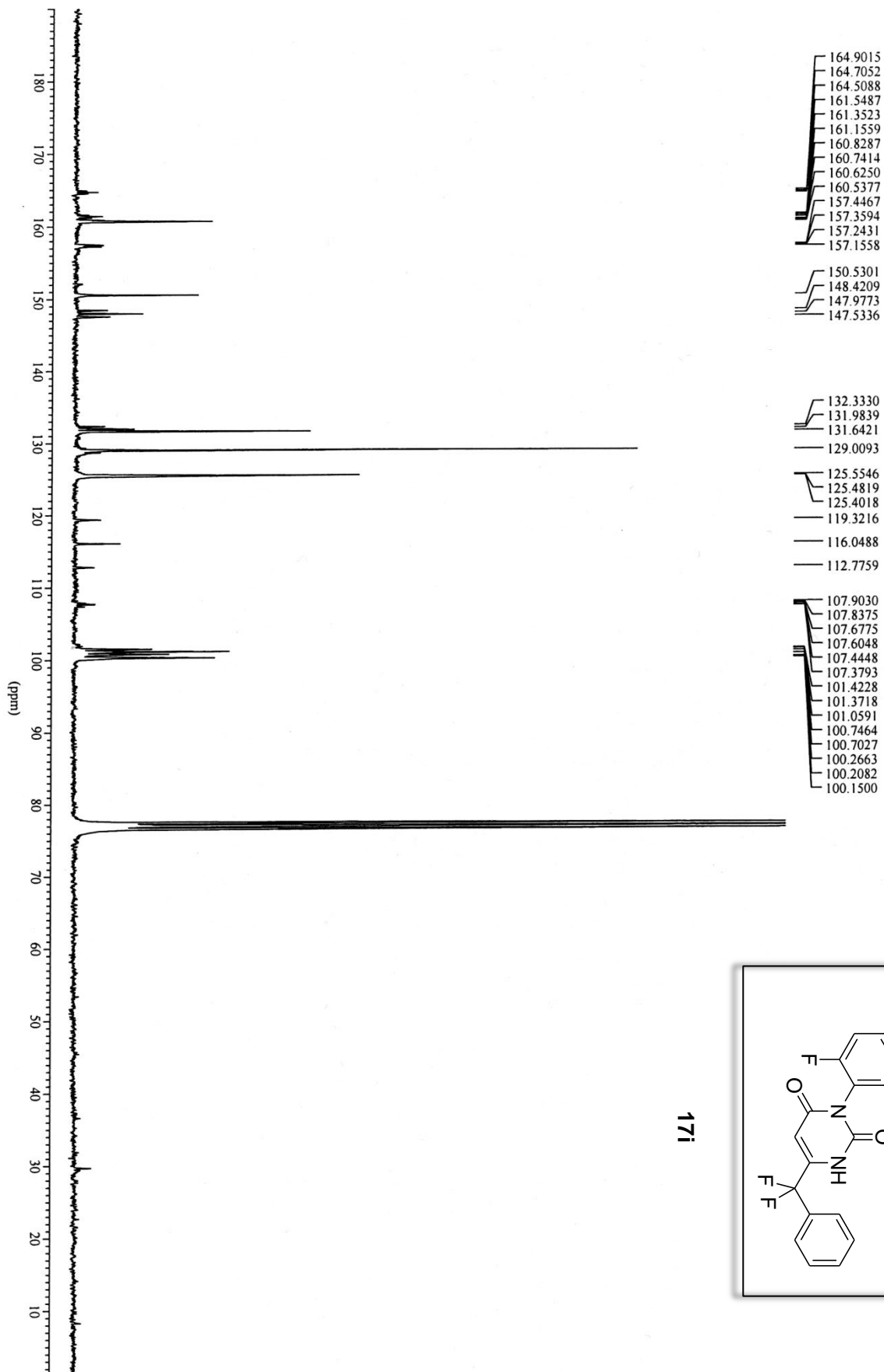


17i

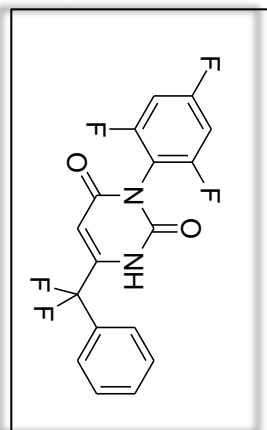


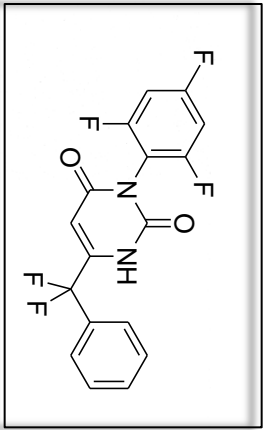
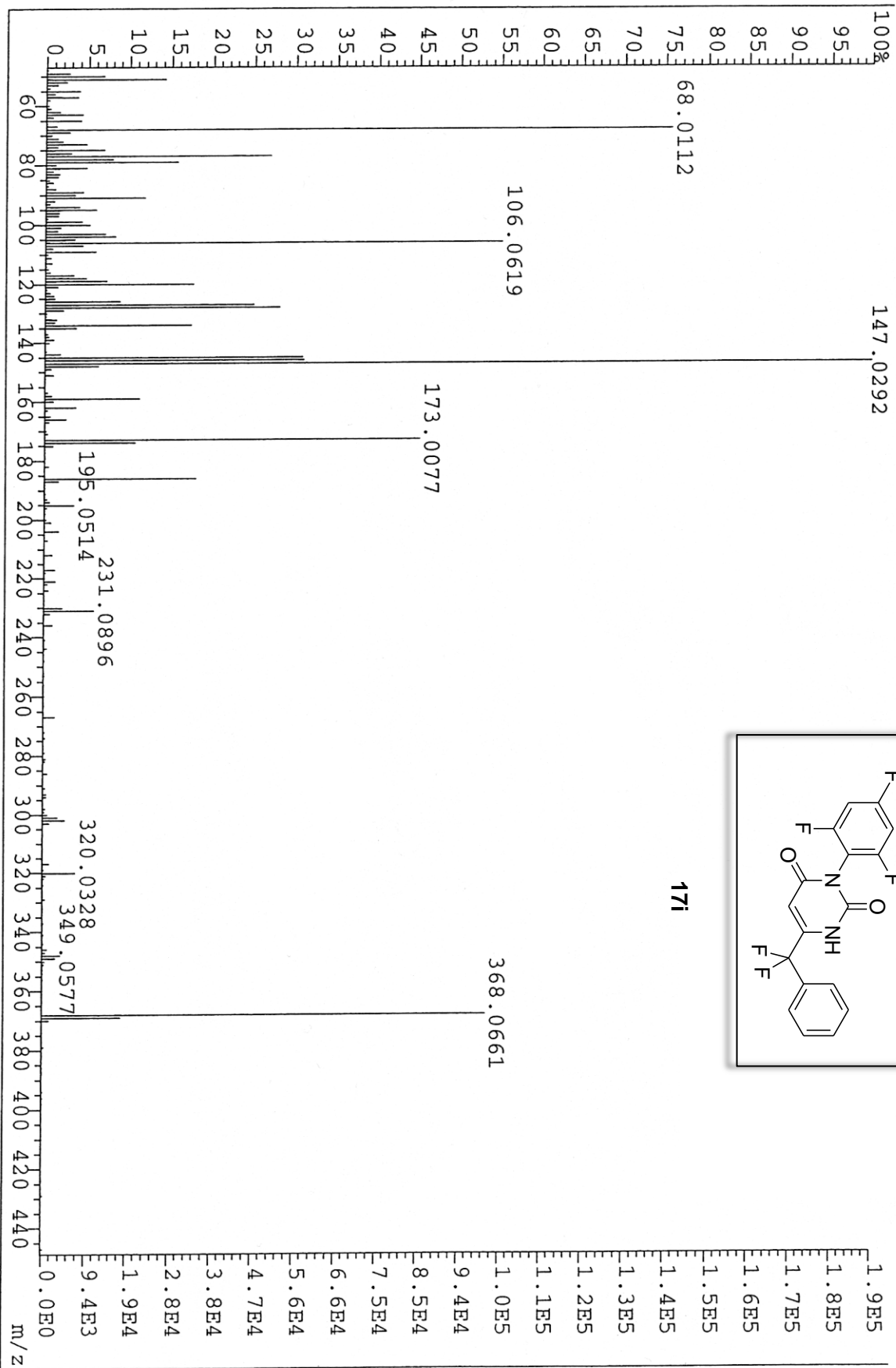




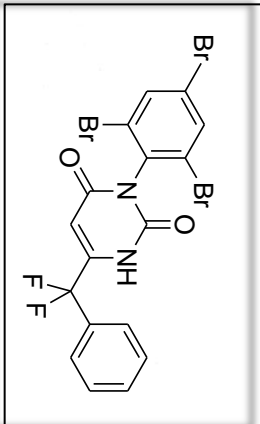
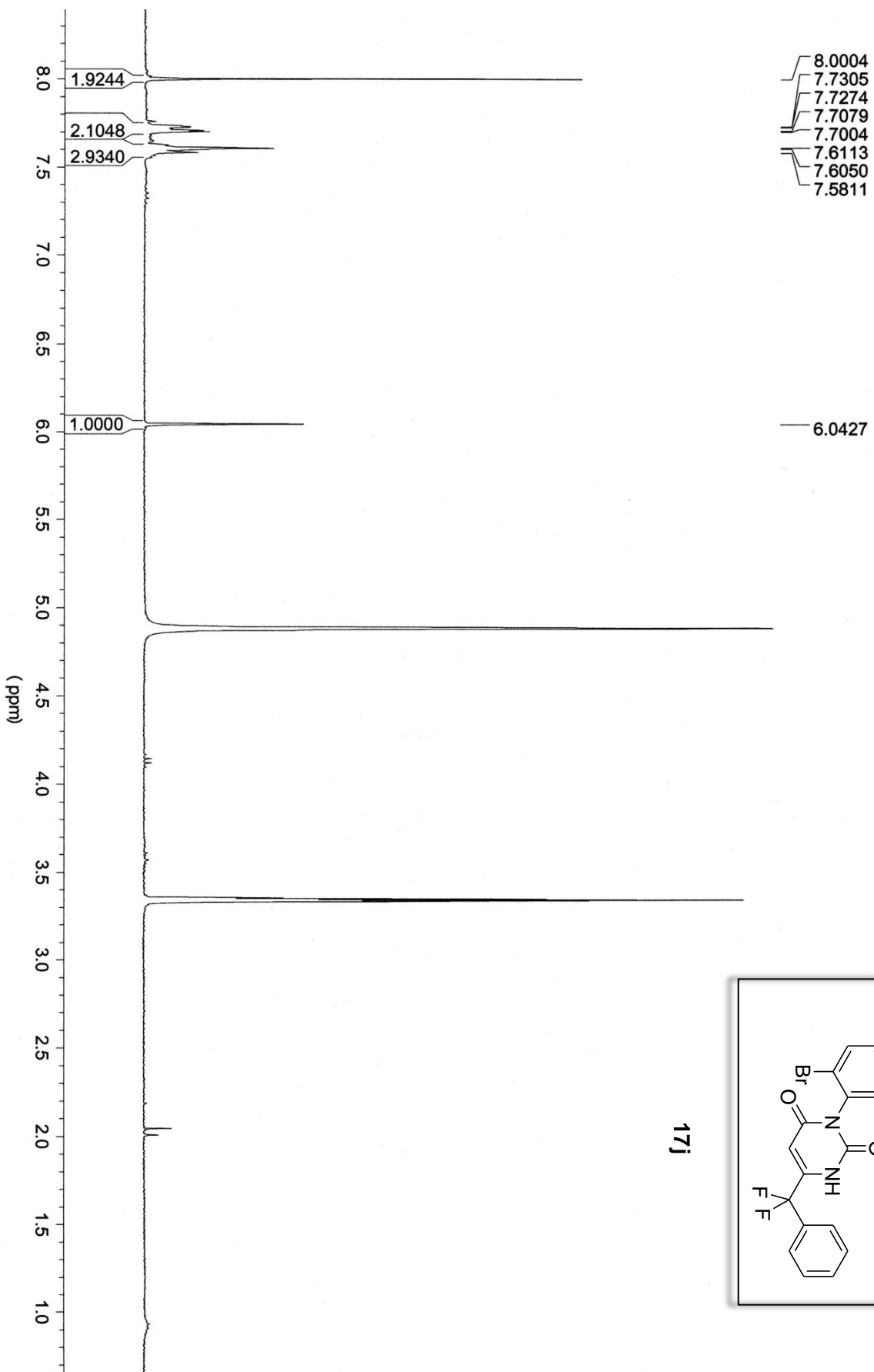


171

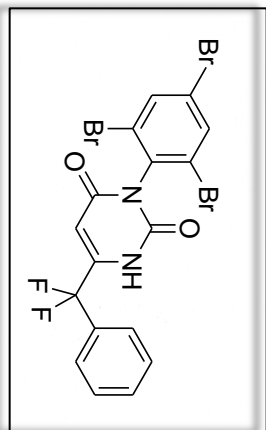




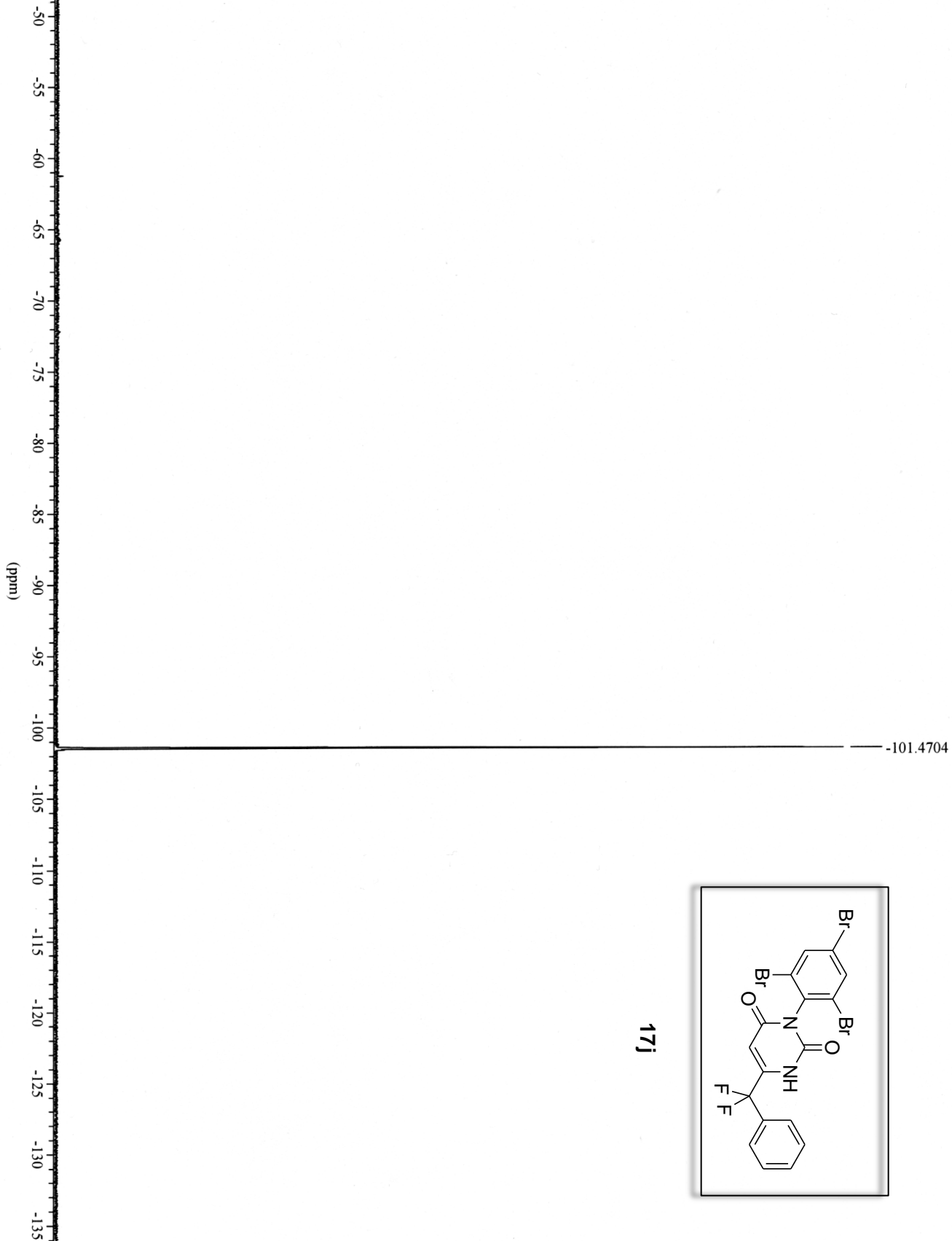
171



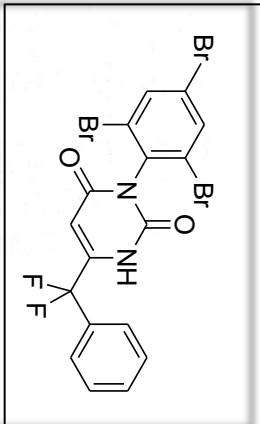
17j



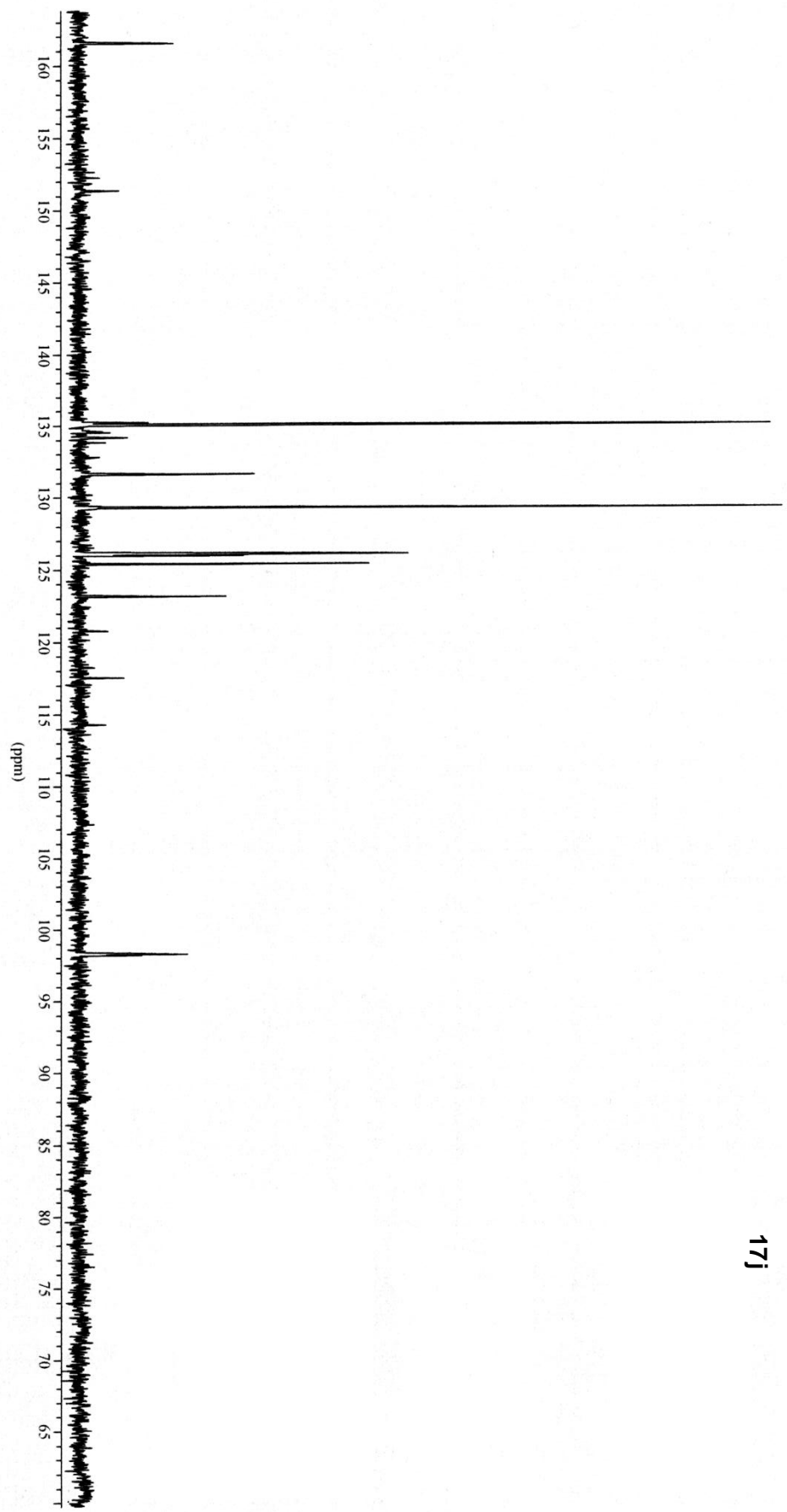
17j

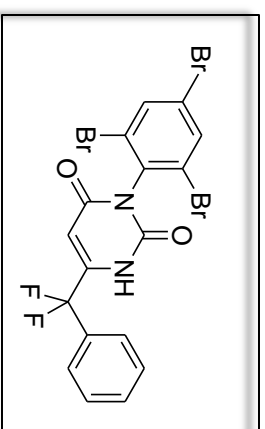


- 161.5439
- 152.3255
- 151.3545
- 135.2543
- 135.0727
- 134.1740
- 131.6229
- 129.3078
- 126.0788
- 125.3935
- 123.1774
- 120.7995
- 117.5267
- 114.2538
- 98.2673

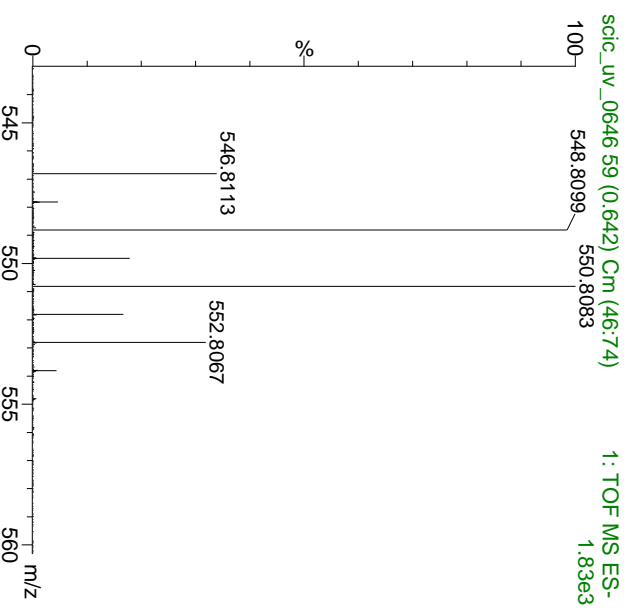
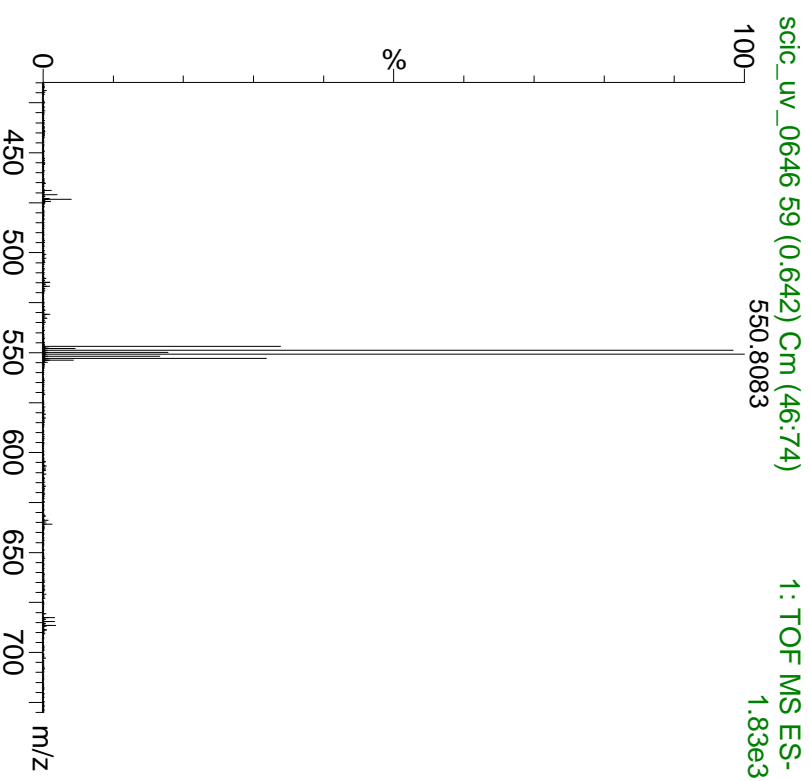


17j



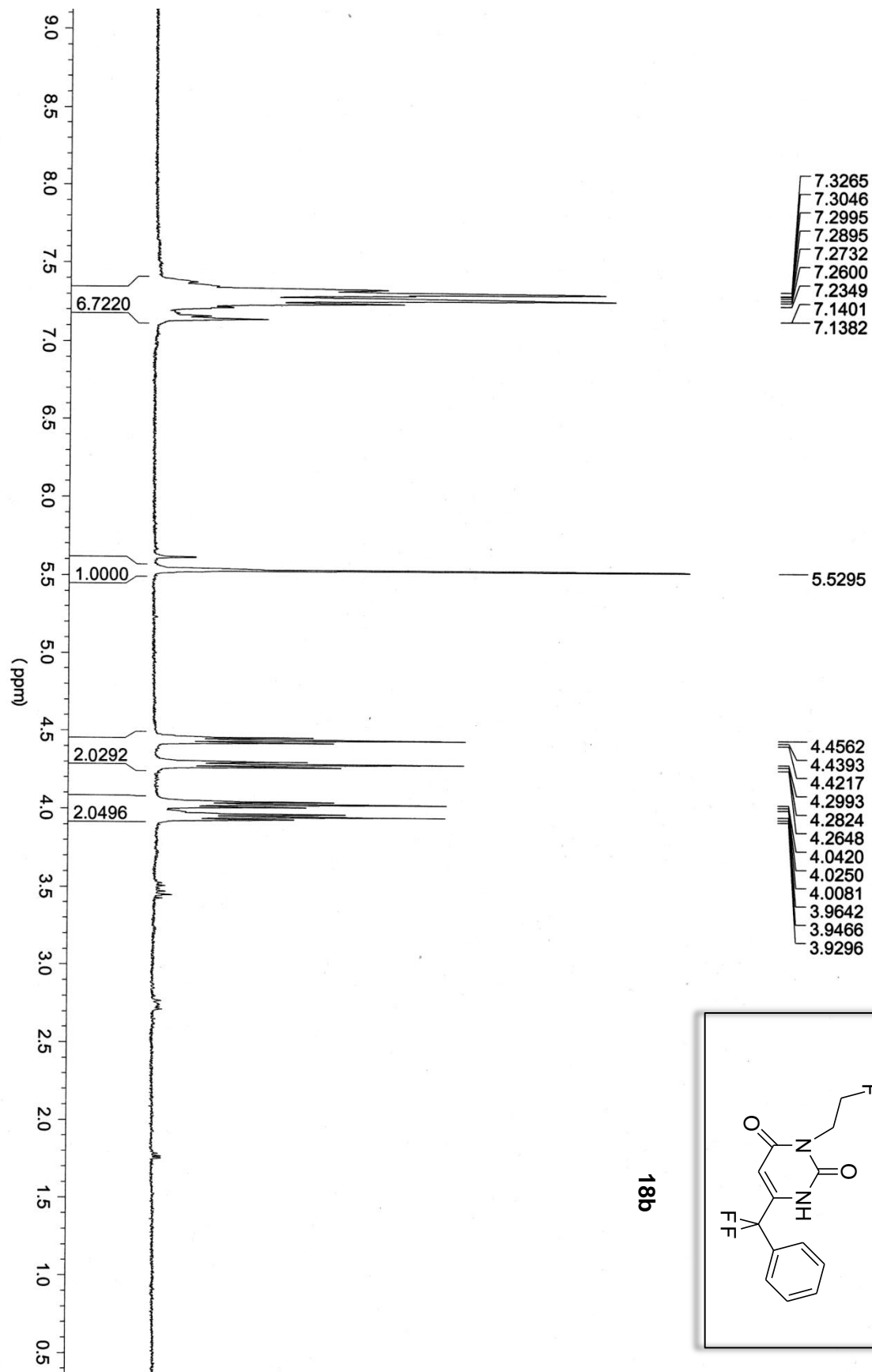


17j

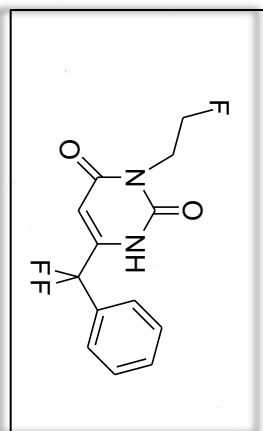


[M-H]<sup>-</sup>=546.8104 teórico

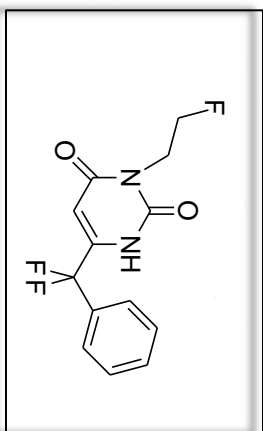
[M-H]<sup>-</sup>=546.8113 (1.9 ppm) experimental



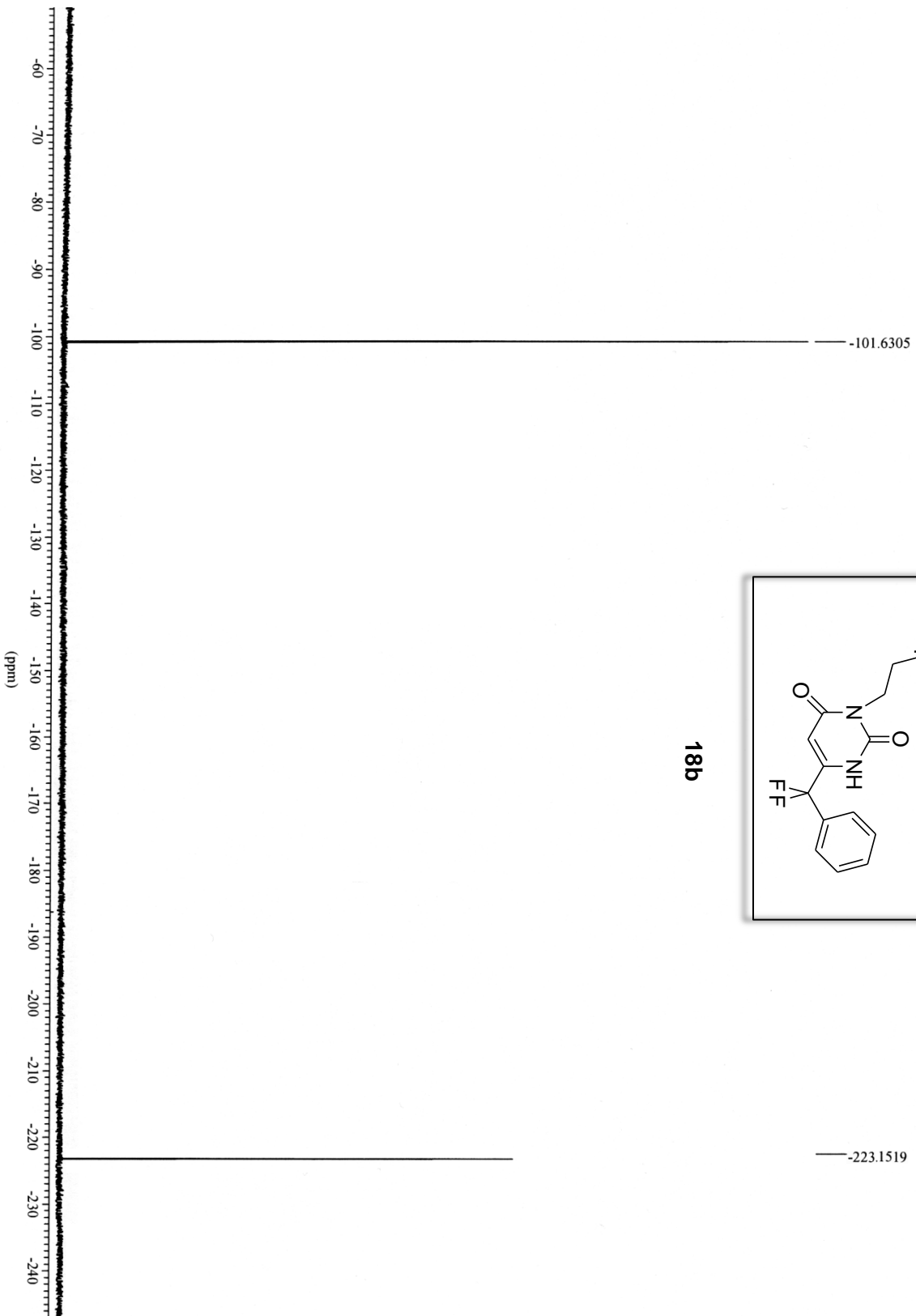
18b

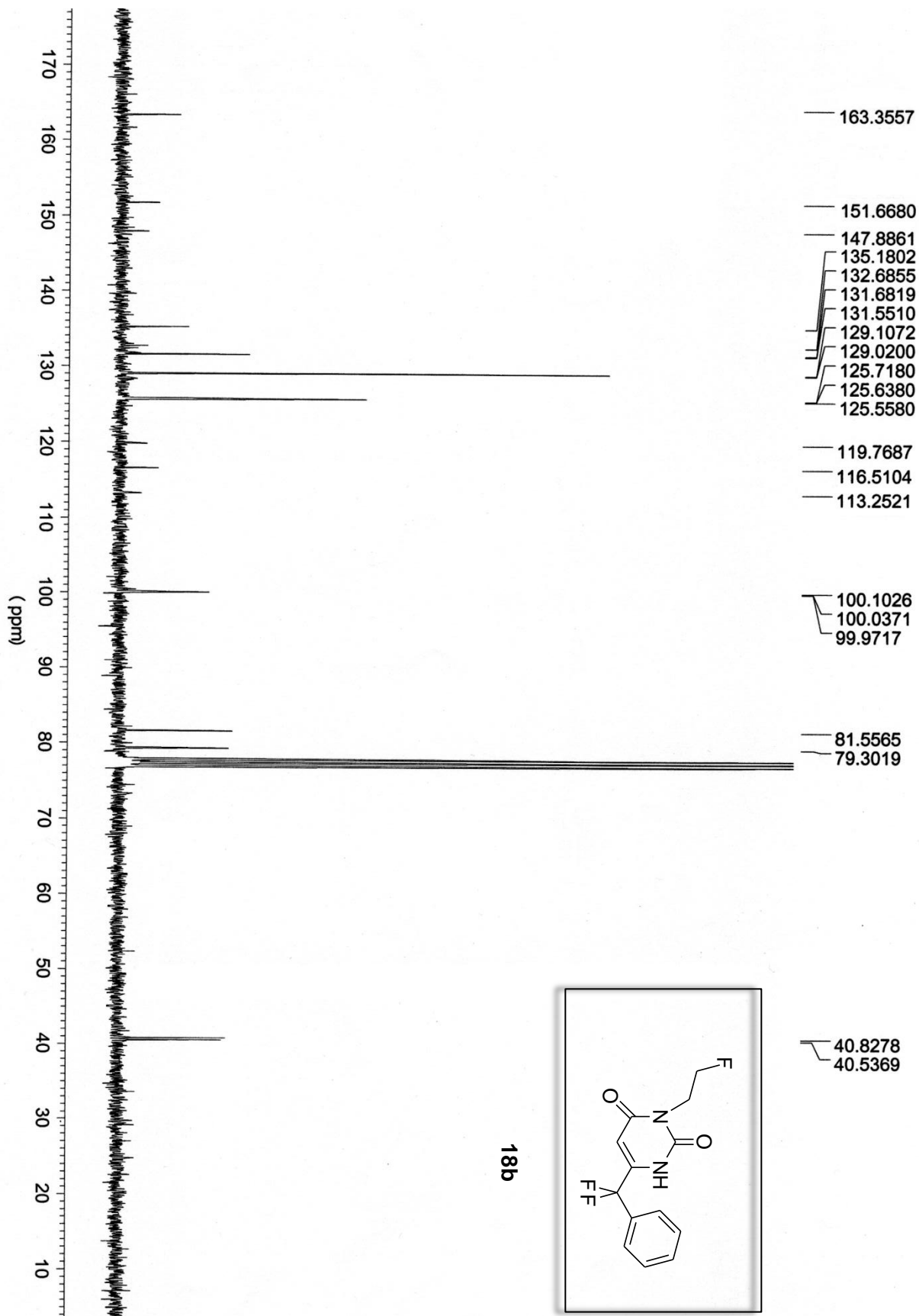




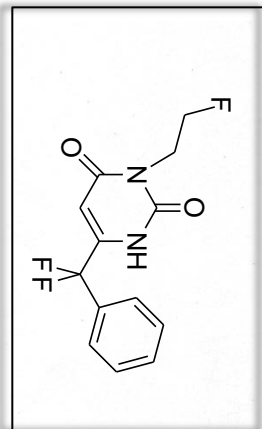


18b



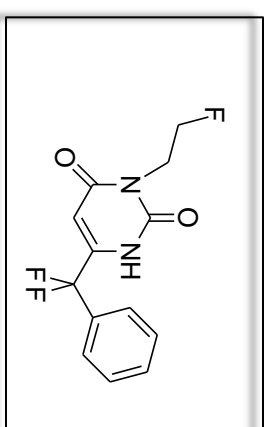


18b

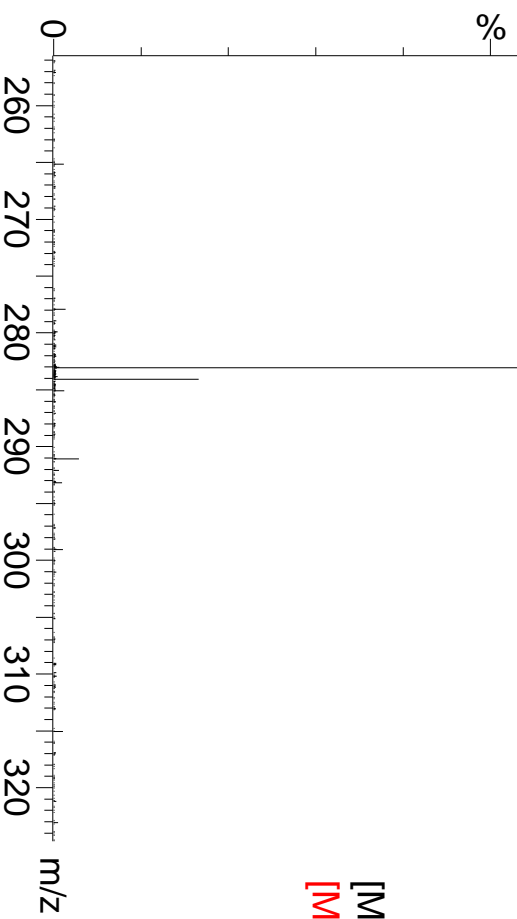


scic\_uv\_0645 22 (0.240) Cm (15:24)  
283.0697

1: TOF MS ES-  
1.57e3



18b



[M-H]<sup>-</sup>=283.0694 teórico  
[M-H]<sup>-</sup>=283.0697 (1.1 ppm) experimental