

SÍNTESIS DE NUEVAS PIRAZOLO[1,5-a]-1,3,5-TRIAZINAS POR REACCIÓN DE
AROILIMINODITIOCARBONATOS DE S,S-DIETILO CON 5-AMINO-3-
ARILPIRAZOLES, USANDO IRRADIACIÓN CON MICROONDAS

NANCY PAOLA MIER PORTILLA
GINA XIMENA SUAREZ MOSQUERA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
NOVIEMBRE 2007

SÍNTESIS DE NUEVAS PIRAZOLO[1,5-a]-1,3,5-TRIAZINAS POR REACCIÓN DE
AROILIMINODITIOCARBONATOS DE S,S-DIETILO CON 5-AMINO-3-
ARILPIRAZOLES, USANDO IRRADIACIÓN CON MICROONDAS

NANCY PAOLA MIER PORTILLA
GINA XIMENA SUAREZ MOSQUERA

Trabajo de grado presentado como
Requisito parcial para optar al título de Químico

Director:
HENRY E. INSUASTY I., Ph.D.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
NOVIEMBRE 2007

Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son de responsabilidad exclusiva de los autores.

Artículo 1° del acuerdo No. 324 del 11 de Octubre de 1996, emanado del Honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2007

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por darme la vida.

A mi madre Yomar Portilla y mi padre Guillermo Mier por infundir sus enseñanzas, valores, amor y confianza, además por a su apoyo moral, espiritual y económico los cuales contribuyeron en mi buen desempeño en toda la carrera.

A mis hermanos Dorys, Patricia, Chucho, Pilar y Andres por su apoyo, consejos y colaboración.

A mis sobrinitos Sebastián, Sofia, Camilo, Nathalia, Gabriela, Alejandro y María Paula, a todos ellos por ser la alegría de mi corazón.

Una dedicación especial a la memoria de mi Tía María Emilia porque en vida contribuyo en mi formación académica y personal, y se que desde el cielo Tú estas muy orgullosa de mi, esto es para Ti.

A mi compañera Gina, por su apoyo y amistad brindado a lo largo de la carrera.

A toda mi familia, amigos y compañeros.

...Gracias

Paola Mier Portilla.

DEDICATORIA

A Dios...

A mi Madre, Fabiola Mosquera por su amor, sacrificio, apoyo, confianza.

A mis hermanos, Paula, Eval y Julian por creer en mí.

A mi tía, Janeth Mosquera mi segunda madre.

A mi familia, por su colaboración.

A mis amigas, Carmen, Paola Ibarra, Diana, LuzDary, Betty por estar en todo momento.

A Paola Mier, por su amistad y gran colaboración en el transcurso de toda la carrera.

A todos los amigos y compañeros que de alguna manera sumaron recuerdos, experiencias, alegrías... Gracias.

Gina Suarez Mosquera.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente al Doctor Henry E. Insuasty I., por todo el apoyo, confianza y asesoría brindados en la realización del presente trabajo de Investigación en el grupo de Síntesis de Compuestos Heterocíclicos de la Universidad de Nariño.

Un agradecimiento especial al profesor Jesús Romo, por su amistad, consejos y colaboración durante nuestra formación profesional.

Braulio Insuasty Ph.D., Jairo Quiroga Ph.D. y Rodrigo Abonía Ph.D. profesores del departamento de Química de la Universidad del Valle, por sus orientaciones y la cooperación con el GICH-UN.

Manuel Noguera Ph.D, Adolfo Sánchez y Justo Cobo Ph.D, profesores de la Universidad de Jaén – España y a las Universidades de St. Andrews y Alberdeen – Escocia, por la toma de los espectros de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y difracción de rayos X.

Al Dr. Masanori Baba, director del Center for Chronic Viral Diseases de la Universidad de Kagoshima-Japón y a la estudiante de Doctorado Paula Ordoñez, por la realización de las pruebas Biológicas.

A COLCIENCIAS y a la Vicerrectoría de Investigaciones, Posgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) de la Universidad de Nariño, por el soporte financiero de esta investigación.

A los profesores del Departamento de Química de la Universidad de Nariño por sus enseñanzas durante la carrera.

A todos nuestros compañeros de Química, por su amistad, motivación y solidaridad en el transcurso de la carrera.

A nuestras Familias, amigos y todas las personas que nos han acompañado, por brindarnos toda su confianza y apoyo incondicional en todo momento.

Un especial agradecimiento a la Doctora Silvia Cruz y a la Magíster Lynay Santacruz por sus recomendaciones en la culminación del Documento final.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. OBJETIVOS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
2. ANTECEDENTES	22
MATERIALES DE PARTIDA	22
2.1.1 Aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo.	22
2.1.1.1 Métodos de obtención de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dialquilo	22
2.1.1.2 Comportamiento Químico y uso en la Síntesis de Compuestos Orgánicos.	25
2.1.2 Los 5-amino-3-arilpirazoles. Estructura y Nomenclatura	27
2.1.2.1 Método de obtención de los 5-amino-3-arilpirazoles	28
2.1.2.2 Propiedades químicas de los 5-amino-3-arilpirazoles	29
2.2 PRODUCTOS OBJETIVO	30
2.2.1 Pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas. Estructura y Nomenclatura	30
2.2.2 Importancia Farmacológica	30
2.2.3 Métodos de obtención de las pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas	32
2.3 SINTESIS DE COMPUESTOS HETEROCLICOS ASISTIDA POR IRRADIACIÓN MICROONDAS	38
3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	43

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1 OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS OBJETIVO	45
4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y CITOTOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS OBJETIVO	66
5. PARTE EXPERIMENTAL	70
5.1 GENERALIDADES	70
5.2 OBTENCIÓN DE LOS PRECURSORES	71
5.2.1 Preparación de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo	71
5.2.1.1 Etapa 1. Obtención de los aroiliminoditiocarbamatos de S-etilo (3a-d)	71
5.2.1.2 Etapa 2. Obtención de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-d)	71
5.2.2 Preparación de los 5-amino-3-arilpirazoles	72
5.2.2.1 Etapa 1. Obtención de los β -clorocinamonitrilos (19a-c)	72
5.2.2.2 Etapa 2. Obtención de los 5-amino-3-arilpirazoles (21a-c)	73
5.3 OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS OBJETIVO	74
5.3.1 Obtención de las pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas mediante irradiación con microondas	74
5.4 PRUEBAS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	76
6. CONCLUSIONES	78
7. RECOMENDACIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	81

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo.	22
Figura 2. Centros electrofílicos del benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dimetilo.	27
Figura 3. Estructura de los 5-amino-3-arilpirazoles.	28
Figura 4. Formas tautoméricas de los 5-amino-3-arilpirazoles.	29
Figura 5. (a) Estructura general y nomenclatura de las pirazolo[1,5-a]-1,3,5 triazinas. (b) Numeración del sistema pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazínico.	30
Figura 6. Sustancias bioactivas que contienen el sistema pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazínico.	31
Figura 7. Los centros más reactivos de los 5-amino-3-arilpirazoles.	44
Figura 8. Los centros más reactivos de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo.	44
Figura 9. CCD de la reacción entre 5-amino-3-(<i>p</i> -clorofenil)pirazol (21c) y benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dietilo (4a) realizada a reflujo en DMF.	46
Figura 10. CCD de la reacción entre 5-amino-3-(<i>p</i> -clorofenil)pirazol (21c) y benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dietilo (4a) realizada por irradiación con microondas.	47
Figura 11. Estructura de los compuestos 59i y de su posible regioisómero 61i.	49
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) del compuesto 59i.	51
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 59i, expansión de las señales aromáticas.	52
Figura 14. Espectro de COSY del compuesto 59i.	53
Figura 15. Numeración de los Productos Objetivo 59a-l.	54
Figura 16. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT-135 del compuesto 59i.	57
Figura 17. Espectro de HSQC del compuesto 59i.	58
Figura 18. Espectro de HMBC del compuesto 59i.	59
Figura 19. Posibles regioisómeros de las pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas.	61
Figura 20. Espectro de NOESY del compuesto 59i.	62
Figura 21. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 59i.	63
Figura 22. Estructura molecular del producto 59i determinada por DRX.	63
Figura 23. CCD. Comportamiento de la reacción y proceso de purificación del posible intermedio.	65
Figura 24. Análogos estructurales. Las pirimidinas y purinas con las 1,3,5-triazinas y pirazolotriazinas.	67
Figura 25. Estructura de los compuestos control. d4T y Ed4T.	68

Figura 26. Representación del proceso de preparación de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-d).	72
Figura 27. Representación del proceso de preparación de los 5-amino-3-arilpirazoles (21a-c).	73
Figura 28. Representación del proceso de obtención de las pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas (59a-l) mediante irradiación con microondas.	75

LISTA DE ESQUEMAS

	Pag.
Esquema 1. Reacción general de obtención de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo.	23
Esquema 2. Hidrólisis ácida del benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dimetilo.	25
Esquema 3. Reacciones del benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dimetilo y el acetiluretano con fenilhidrazina.	26
Esquema 4. Reacciones de ciclación del benzoiliminoditiocarbonatos de S,S-dimetilo.	27
Esquema 5. Reacciones implicadas en la obtención de los 5-amino-3-arilpirazoles.	28
Esquema 6. El primer derivado de las pirazolo[1,5- <i>a</i>]-1,3,5-triazinas preparado por Checchi y Ridi.	32
Esquema 7. Reacción entre los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo y el 5-amino-3-metilpirazol.	33
Esquema 8. Ruta para la obtención de las 4-(<i>p</i> -clorobenzoil)-7-metilpirazolo[1,5- <i>a</i>]-1,3,5-triazinas 2-aminofuncionalizadas.	34
Esquema 9. Ruta alterna para la obtención de 4-aril-7-metil-2-tioetilpirazolo[1,5- <i>a</i>]-1,3,5-triazinas.	35
Esquema 10. Obtención de pirazolo[1,5- <i>a</i>]-1,3,5-triazinas, por interacción del 5-aminopirazol y el carbonilisotiocianato de etoxilo.	36
Esquema 11. Obtención pirazolo[1,5- <i>a</i>]-1,3,5-triazinas, metodología propuesta por Ried y Aboul-Fetouh.	36
Esquema 12. Obtención pirazolo[1,5- <i>a</i>]-1,3,5-triazinas, metodología propuesta por Elgemeie y colaboradores.	37
Esquema 13. Obtención 5-cianopirazolo[3,4- <i>b</i>]pirimidin-4-onas mediante irradiación con microondas.	40
Esquema 14. Obtención de pirazolo[3,4- <i>b</i>]quinolinas y pirazolo[3,4- <i>c</i>]pirazoles mediante irradiación con microondas.	40
Esquema 15. Reacción de cicloadición mediante irradiación microondas. Obtención de pirazolo[3,4- <i>b</i>]pirimidinas.	41
Esquema 16. Síntesis de 4-aminopirazolo[3,4- <i>d</i>]pirimidinas utilizando irradiación con microondas.	42
Esquema 17. Posibles regioisómeros de la reacción entre los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-d) y los 5-amino-3-arilpirazoles (21a-c).	43
Esquema 18. Posible ruta de ciclación para la obtención de las nuevas pirazolo[1,5- <i>a</i>]-1,3,5-triazinas.	66

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades físicas de los aroiliminoditiocarbamatos de S-etilo (3a-e).	24
Tabla 2. Propiedades físicas de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-e).	25
Tabla 3. Propiedades físicas de los 5-amino-3-arilpirazoles (21a-d).	29
Tabla 4. Características físicas de los productos (59a-l) obtenidos vía MW (1400 W).	48
Tabla 5. Datos de RMN ^1H (δ ppm) de los compuestos 59a-l. DMSO- d_6 , 400 MHz (TMS-estándar interno).	54
Tabla 6. Datos RMN ^{13}C (δ ppm) de los compuestos 59a-l. DMSO- d_6 , 400 MHz (TMS-estándar interno).	60
Tabla 7. Resultados de la actividad antiviral Anti-VIH y citotoxicidad.	67
Tabla 8. Fases móviles, empleadas en purificación de los productos 59a-l por CC.	74

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AcOEt: Acetato de Etilo
Ar: Grupo arilo
c: Cuartete
°C: Grados centígrados
CC: Cromatografía de Columna
CCD: Cromatografía de capa delgada
Cl: Cloro
d: Doblete
DCM: Diclorometano
DEPT: Distortionless enhancement by polarization transfer
DMF: Dimetilformamida
DMSO- d_6 : Dimetilsulfóxido Deuterado
d4T: 2',3'-didehidro-3'-deoxitimidina
Ed4T: 2',3'-didehidro-3'-deoxi-4'-etinitimidina
Et: Grupo etilo
EtOH: Etanol
EtSH: Tioetanol
eV: Electronvoltios
DRX: Difracción de rayos X
g: Gramos
GICH-UN: Grupo de Investigación de Compuestos Heterocíclicos, Universidad de Nariño
GICH-UV: Grupo de Investigación de Compuestos Heterocíclicos, Universidad del Valle
h: Hora
HMBC: Heteronuclear multiple bond connectivity
HSQC: Heteronuclear single quantum correlation
Hz: Hertz
i: Posición *ipso*
m: Posición *meta*
Me: Grupo Metilo
MeSH: Tioetanol
MHz: Megahertz
min.: Minutos
mL: Mililitros
MT4: Línea celular linfoblástica
MW: Irradiación con microondas
 nJ : Constantes de acoplamiento entre los protones y carbonos a n enlaces
NO₂: Grupo Nitro
NOESY: Nuclear overhauser spectroscopy
o: Posición *orto*

OEt: Grupo Etoxilo
p: Posición *para*
p.f.: Punto de fusión
Ph: Grupo fenilo
ppm: Partes por millón
p-TsOH: Acido *p*-toluensulfónico
R, R₁, R₂, R₃: Sustituyentes
Rend.: Rendimiento
Rf: Relación de Flujo
RMN ¹³C: Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹H: Resonancia magnética nuclear protónica
s: Singulete
t: Triplete
t.a.: Temperatura ambiente
TEA: Trietilamina
THF: Tetrahidrofurano
TMS: Tetrametilsilano
UV-vis: Ultravioleta – visible
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
W: Watts
δ: Escala de desplazamiento químico en resonancia magnética nuclear
%: Porcentaje

RESUMEN

Se estudió la interacción entre los aroiliminoditiocarbonatos de s,s-dietilo con 5-amino-3-arilpirazoles como una ruta para la preparación de nuevas 4,7-diaril-2-tioetilpirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas.

Se encontró que la reacción es altamente regioselectiva y mediante el análisis espectroscópico se ha propuesto el siguiente mecanismo: inicialmente, el carbono imínico de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo es atacado por el grupo amino en posición cinco de los 5-amino-3-arilpirazoles (5-NH₂), ocasionando la eliminación de etanotiol, para generar un intermedio no ciclado, el cual, después de una ciclocondensación intramolecular entre el grupo amino en posición 1 y el grupo carbonilo, conduce a las nuevas pirazolotriazinas.

Por primera vez, la síntesis de estos sistemas pirazolotriazínicos se realizó aplicando irradiación con microondas. Los nuevos productos fueron obtenidos, en una sola etapa, en tiempos cortos de reacción (7-15 min) y con buenos rendimientos (58 y 73%).

La estructura de los nuevos compuestos se estableció con las técnicas espectroscópicas (RMN ¹H y ¹³C, COSY ¹H-¹H, HSQC, HMBC, NOESY) y espectrometría de masas. adicionalmente, la obtención de cristales de tres compuestos de la serie, permitieron por análisis de difracción de rayos X, corroborar sin ambigüedad, la estructura propuesta.

ABSTRACT

Reaction of S,S-diethyl aroyliminodithiocarbonates with 5-amino-3-arylpirazole was studied as a route for the preparation of novel 4,7-diaryl-2-ethylthiopyrazolo [1,5-a]-1,3,5-triazines.

It was found that the reaction is highly regioselective and on basis of spectroscopic data, the following mechanism has been proposed. Initially, the C=N double bond of S,S-diethyl aroyliminodithiocarbonates suffers an addition from exocyclic nitrogen of 5-amino-3-arylpirazoles (5-NH₂), with the subsequent ethanethiol elimination to give an acyclic intermediate, which after an intramolecular cyclocondensation between endocyclic NH and carbonyl group, leads to new pyrazolotriazines.

For first time, the synthesis of these systems was performed by applying microwave irradiation. New products were obtained in one step, in a short reaction time (7-15 min) and with good yields (58-73%).

The structures of new compounds were established by spectroscopic techniques (NMR ¹H and ¹³C, COSY ¹H-¹H, HSQC, HMBC, NOESY) and mass spectrometry. Additionally, the isolation of single crystals of three compounds allowed us to corroborate unambiguously the proposed structure, by X-ray diffraction analysis.

INTRODUCCIÓN

Las pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas son compuestos de gran importancia dentro de la Química Heterocíclica, por lo cual, se han realizado estudios acerca de su obtención y propiedades. Muchos de sus derivados poseen una amplia variedad de aplicaciones médicas. Por ejemplo, se utilizan como efectivos dilatadores bronquiales, como analgésicos y antiinflamatorios. También, son empleados en el tratamiento de algunos desórdenes del sistema nervioso central como la psicosis, la esquizofrenia, la depresión, el mal de Parkinson y el mal de Alzheimer. Otros derivados de este sistema, son útiles en el tratamiento de desórdenes alimenticios como la obesidad y la bulimia, como también de desórdenes cardiovasculares como la hipertensión.

Esta clase de compuestos, se han sintetizado por reacción de ciclación de diferentes 5-aminopirazoles con reactivos 1,3-bielectrofilicos, que permiten construir el anillo 1,3,5-triazínico sobre el anillo pirazólico ya existente. En general, estas reacciones se han realizado en solución y no hay reportes de la obtención de pirazolotriazinas empleando metodologías libres de solvente, como la irradiación con microondas. La cual, se ha aplicado en la producción de muchos compuestos heterocíclicos.

Las reacciones donde se emplea la irradiación con microondas presentan ventajas en comparación con las que se realizan en solución. Las primeras, se llevan a cabo en pocos minutos, con alta regioselectividad y con buenos rendimientos; convirtiéndose en un proceso práctico y eficiente. Las segundas, requieren de solventes orgánicos, que resultan muy contaminantes, y tiempos de reacción más prolongados, lo cual, puede favorecer la formación de subproductos.

Respecto a la regioselectividad, las reacciones vía microondas, en general, presentan un comportamiento similar a las reacciones en solución. Sin embargo, en algunos casos la regioselectividad puede ser modificada e incluso invertida.

Por estos motivos, en el presente trabajo de grado, se evaluó la irradiación con microondas como una metodología alterna a las condiciones clásicas en solución, que condujo a la síntesis regioselectiva de nuevas pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas 4,7-diarilsustituidas por interacción de los 5-amino-3-arylpirazoles con los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las reacciones de ciclación entre 5-amino-3-arilpirazoles y aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo, como una ruta alterna de una sola etapa para la obtención de nuevos derivados del sistema pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazínico.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la utilización de una nueva metodología como la irradiación con microondas para la síntesis de las nuevas pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas.
- Establecer las condiciones óptimas de reacción, como el tiempo y la potencia del horno microondas.
- Evaluar la regioselectividad de la reacción de ciclación entre 5-amino-3-arilpirazoles y aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo.
- Caracterizar los nuevos productos con la ayuda de las técnicas espectroscópicas: RMN ^1H y ^{13}C mono y bidimensional, espectrometría de masas y difracción de rayos X (DRX), en los casos donde sea posible obtener cristales.
- Proponer la posible ruta de ciclación con base en la información espectroscópica de los productos finales y los posibles intermedios de reacción.

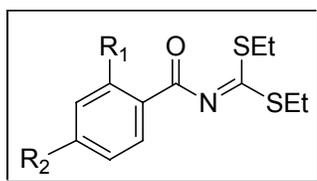
2. ANTECEDENTES

Este capítulo contiene la revisión bibliográfica de los métodos de síntesis y ejemplos del comportamiento químico de los materiales de partida así como las rutas sintéticas utilizadas para la obtención de compuestos con el sistema pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinico y una breve descripción de la aplicación de irradiación con microondas en la síntesis de compuestos heterocíclicos.

2.1 MATERIALES DE PARTIDA

2.1.1 Aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo. Esta clase particular de compuestos orgánicos poseen la estructura general mostrada en la figura 1, donde R_1 y R_2 pueden ser hidrógenos o cualquier sustituyente de carácter electrodonante o electroatrayente.

Figura 1. Estructura de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo.



2.1.1.1 Métodos de obtención de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dialquilo. Existen tres métodos generales para la obtención de estos compuestos, cada uno de ellos se describe de acuerdo a la naturaleza de los precursores utilizados. El primero de ellos, utiliza el isotiocianato de benzoilo como precursor, esta metodología fue iniciada por Dixon,¹ modificada por Elmore y colaboradores² y finalmente estandarizada por Nash y colaboradores.³ La segunda ruta de obtención fue propuesta por Wheeler y Merriam⁴ utilizando como precursores el ácido tiobenzoico y el tiocianato de metilo. El tercer método fue reportado por Sato y su grupo⁵ donde las amidas aromáticas son las precursoras en la obtención de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dimetilo.

¹ Dixon, A. *J. Chem. Soc.* 1899, 75, 375.

² Elmore, D. T.; Ogle, J. R.; Fletcher, W.; Toseland, P. A. *J. Chem. Soc.* 1956, 4458.

³ Nash, B. W.; Newberry, R. A.; Pickles, R.; Warburton, W. K. *J. Chem. Soc. (C)*, 1969, 2794.

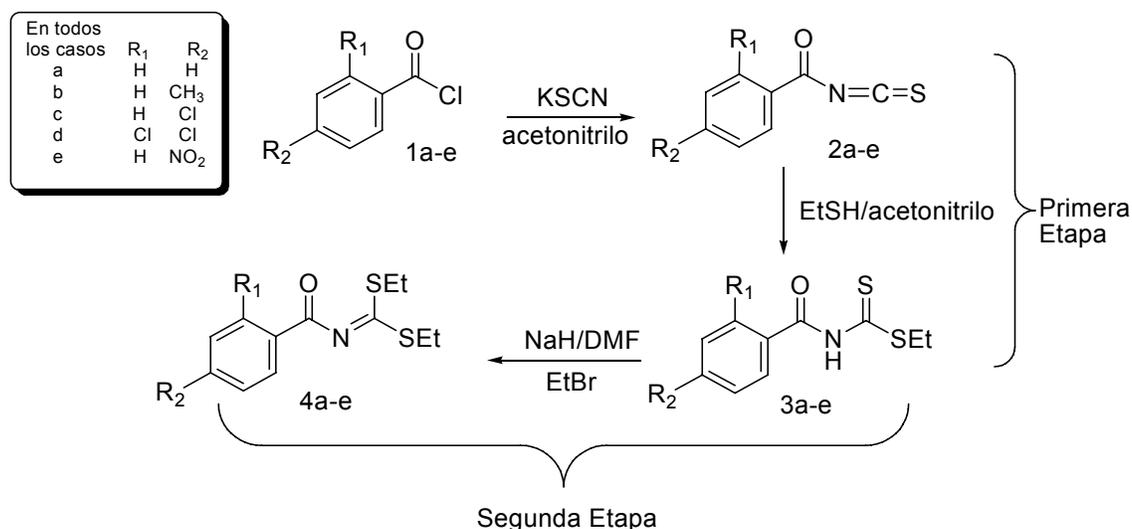
⁴ Wheeler, H. L.; Merriam, H. F. *J. Am. Chem. Soc.* 1901, 23, 283.

⁵ Sato, M.; Fukada, N.; Kurauchi, M.; Takeshima, T. *Synthesis* 1981, 554.

Recientemente, el Grupo de Investigación de Compuestos Heterocíclicos de la Universidad de Nariño⁶ (GICH-UN), reportó en un trabajo de grado, la optimización de una metodología para la obtención de aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo. Esta metodología se describirá detalladamente en esta sección debido a que es la que se usó en el presente trabajo de investigación.

El método propuesto por el GICH-UN consta de dos etapas. La primera, es la preparación de los aroiliminoditiocarbonatos de S-etilo (3a-e) y la segunda, es la etilación de los derivados 3a-e que conduce a los productos 4a-e, usados en la presente investigación (Esquema 1).

Esquema 1. Reacción general de obtención de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo.



En la primera etapa, se sintetizan los aroiliminoditiocarbonatos de S-etilo (3a-e) reproduciendo la metodología original propuesta por Elmore,² que consistió en hacer reaccionar cloruro de benzoilo (1a-e) con un exceso de tiocianato de potasio (KSCN) disueltos en acetonitrilo seco obteniendo los productos 2a-e, los cuales se hicieron reaccionar con un alcanotiol para obtener los aroiliminoditiocarbonatos (3a-e). Sin embargo, las variaciones hechas en el proceso de extracción y purificación de estos compuestos, marcaron la diferencia en cuanto al porcentaje de rendimiento. La técnica propuesta por Elmore recomienda precipitar el producto adicionando agua-hielo para su posterior filtración, lavado y recristalización. La modificación propuesta consistió en realizar una extracción usando acetato de etilo en lugar de promover la precipitación con agua; esto permitió aislar una mayor parte de los compuestos deseados, incrementando significativamente el

⁶ Checa, C.; Lagos, Y. Evaluación de las interacciones del 5-amino-1-fenil-3-metilpirazol con los isotiocyanatos de aroilo y con los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo. San Juan de Pasto, 2005, 99 p. Trabajo de grado. Universidad de Nariño.

porcentaje de recuperación de los mismos en un 40%. Los extractos orgánicos se secaron usando sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) por 12 horas, se filtraron y se evaporaron a sequedad hasta la obtención de los compuestos 3a-e que se lavaron con hexano para eliminar alguna impureza presente. Este último proceso, evita la recristalización de los compuestos favoreciendo aún más el rendimiento.

En la tabla 1, se muestran las principales propiedades físicas de los aroiliminoditiocarbamatos de S-etilo (3a-e) obtenidos por este método. Cabe mencionar que los compuestos 3a-e tienen un olor desagradable y son corrosivos (en especial 3a,b).

Tabla 1. Propiedades físicas de los aroiliminoditiocarbamatos de S-etilo (3a-e).

3	R ₁	R ₂	p.f. °C	Rend %	Color	Apariencia	Tiempo de reacción (h)
a	H	H	81-83	89	amarillo	cristales	24
b	H	Me	86-89	95	amarillo	cristales	20
c	H	Cl	124-126	91	amarillo	cristales	18
d	Cl	Cl	105-108	89	amarillo	cristales	27
e	H	NO ₂	162-163	88	amarillo	cristales	28

Fuente: Checa, C.; Lagos, Y. Evaluación de las interacciones del 5-amino-1-fenil-3-metilpirazol con los isotiocyanatos de aroilo y con los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo. San Juan de Pasto, 2005, 99 p. Trabajo de grado. Universidad de Nariño.

La segunda etapa, consiste en la obtención de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-e) que son los precursores que se utilizaron en esta investigación. El único reporte de la síntesis de estos compuestos que se conocía, era el trabajo de Nash y colaboradores,³ quienes obtuvieron el benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dimetilo a partir de la reacción del benzoiliminoditiocarbamato de S-metilo con yoduro de metilo (MeI) en presencia de sodio en etanol absoluto con agitación constante a temperatura ambiente por cuatro días. Los autores reportaron que la purificación de este compuesto se hace por extracción con acetato de etilo seguida de una redestilación del aceite hasta la obtención del benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dimetilo con un rendimiento del 65%.

Las condiciones de metilación descritas por Nash fueron optimizadas por el GICH-UN; para ello, se tomó como base los estudios realizados por Kristian y colaboradores,⁷ quienes reportaron algunas reacciones de metilación, usando una base fuerte y yoduro de metilo ($\text{CH}_3\text{-I}$) como agente metilante para la obtención de los productos deseados en corto tiempo, de fácil purificación y con buenos rendimientos de reacción.

⁷ Kristian P.; Kutschy P.; Dzurilla M. *Collection Czechoslov Chem. Commun.* 1979, 44, 1324.

Para la obtención de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-e) se usan cantidades equimolares del aroiliminoditiocarbamato de S-etilo (3a-e), una suspensión de hidruro de sodio (NaH) al 60% como base fuerte y bromuro de etilo (EtBr) como agente alquilante, DMF como solvente, agitación magnética y temperatura ambiente, entre 1 y 2 horas.

El uso de NaH como base fuerte reduce significativamente el tiempo de reacción. Además, la presencia de DMF en el medio, favorece la separación y posterior purificación de los compuestos sólidos por precipitación en agua. De la misma manera, en esta metodología, se incrementaron los porcentajes de rendimiento de los productos obtenidos puesto que, la purificación de éstos se hace por recristalización de etanol para los compuestos sólidos (4c,e), y cromatografía de columna usando sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de hexano-acetato de etilo como fase móvil para los compuestos líquidos (4a,b,d).

En la tabla 2, se muestran las principales características de los compuestos (4a-e) obtenidos por el GICH-UN.⁶

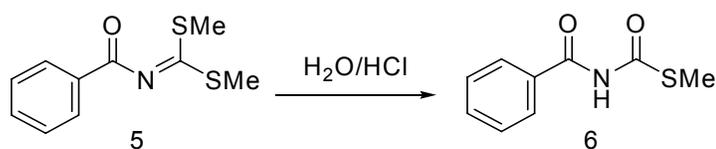
Tabla 2. Propiedades físicas de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-e).

4	R ₁	R ₂	p.f. °C	Rend %	Color	Apariencia	Tiempo de reacción (h)
a	H	H	--	92	amarillo	aceite	2
b	H	Me	--	70	amarillo	aceite	1.5
c	H	Cl	50-53	95	blanco	cristales	1.5
d	Cl	Cl	--	87	amarillo	aceite	2
e	H	NO ₂	77-79	92	amarillo	cristales	1

Fuente: Checa, C.; Lagos, Y. Evaluación de las interacciones del 5-amino-1-fenil-3-metilpirazol con los isotiocyanatos de aroilo y con los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo. San Juan de Pasto, 2005, 99 p. Trabajo de grado. Universidad de Nariño.

2.1.1.2 Comportamiento químico y uso en la síntesis de compuestos orgánicos. Wheeler y Johnson⁸ iniciaron el estudio sobre el comportamiento químico de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dimetilo; entre sus rasgos característicos encontraron que son hidrolizados en medio ácido. Por ejemplo, el ditiocarbonato 5 se hidroliza en presencia de ácido clorhídrico concentrado, produciendo el tiocarbamato 6 (Esquema 2).

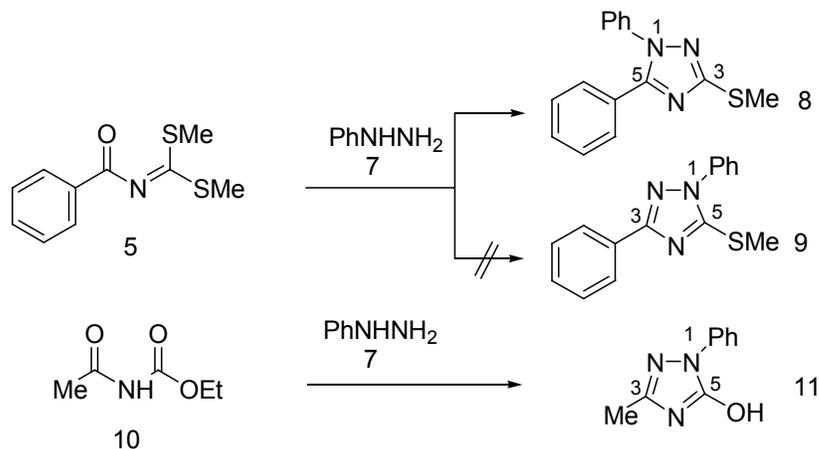
Esquema 2. Hidrólisis ácida del benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dimetilo.



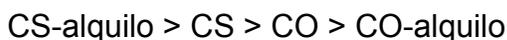
⁸ Wheeler, H. L.; Johnson, T. B. *Am. Chem. J.* 1901, 26, 185.

Igualmente, 5 reaccionó con fenilhidrazina⁹ 7 para formar el correspondiente 1,5-difenil-3-metiltiofotriazol 8 y no el isómero posible, el 1,3-difenil-5-metiltiofotriazol 9. Esto evidencia que el grupo amino de la hidrazina reacciona primero con la porción iminoéster [-N=C(SMe)₂] de 5 y no con el grupo carbonilo amídico, como generalmente ocurre con los derivados oxigenados, como el acetiluretano 10, cuya reacción con 7, conduce exclusivamente al isómero 11 (Esquema 3).

Esquema 3. Reacciones del benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dimetilo y el acetiluretano con fenilhidrazina.



Las observaciones anteriores dieron origen a un estudio comparativo de la reactividad de varios precursores frente a la fenilhidrazina¹⁰ estableciendo el siguiente orden de reactividad:



Este orden expresa la tendencia de ciertos grupos funcionales para reaccionar con el grupo amino de la fenilhidrazina e indica que un tiol es eliminado con mayor facilidad que el ácido sulfhídrico y estos dos a su vez más fácilmente que agua y alcohol.

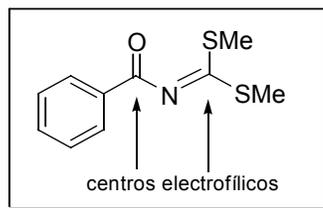


El estudio anterior demuestra claramente que el ditiocarbonato 5 posee dos centros electrofílicos; el carbono de la porción iminoéster y el carbono del grupo carbonilo, siendo el primero, más susceptible que el segundo frente al ataque de un agente nucleofílico (Figura 2).

⁹ Wheeler, H. L.; Beardsley, A. P. *Am. Chem. J.* 1902, 27, 257.

¹⁰ Wheeler, H. L.; Beardsley, A. P. *Am. Chem. J.* 1903, 29, 73.

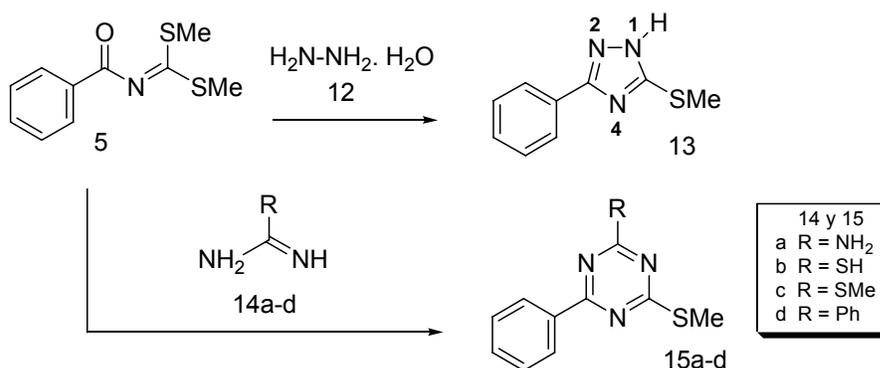
Figura 2. Centros electrofílicos del benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dimetilo.



Más adelante, se realizaron otras reacciones de adición y cicloadición con el ditiocarbonato 5, que confirmaron la mayor reactividad del carbono imínico de los ditiocarbonatos frente a diferentes agentes nucleofílicos. Parte de estos trabajos, se describen a continuación y fueron publicados por Agustín y colaboradores¹¹ en un artículo donde se muestra la aplicabilidad de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dimetilo en la obtención de diferentes compuestos orgánicos, entre los cuales, se destaca la síntesis de compuestos heterocíclicos.

El ditiocarbonato 5 se hizo reaccionar con el hidrato de hidrazina 12 en etanol a reflujo, para producir los triazoles 13. Además, el compuesto 5 reaccionó con la guanidina 14a, la tiourea 14b, la S-metilisotiourea 14c y la benzamidina 14d generando las triazinas 15a-d (Esquema 4).

Esquema 4. Reacciones de ciclación del benzoiliminoditiocarbonatos de S,S-dimetilo.



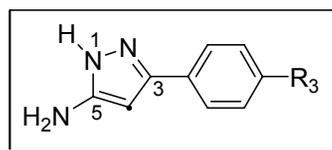
Otros ditiocarbonatos con sustituyentes electrodonantes o electroatrayentes sobre el anillo aromático, presentan un comportamiento similar al descrito para el ditiocarbonato 5.

2.1.2 5-Amino-3-arilpirazoles. Estructura y Nomenclatura. Los 5-amino-3-arilpirazoles empleados en esta investigación, poseen la estructura mostrada en la figura 3 donde R₃ sobre el anillo bencénico puede ser un hidrógeno o un

¹¹ Agustín, M.; Richter, M.; Salas, S. *J. Prakt. Chem.* 1980, 322, 55.

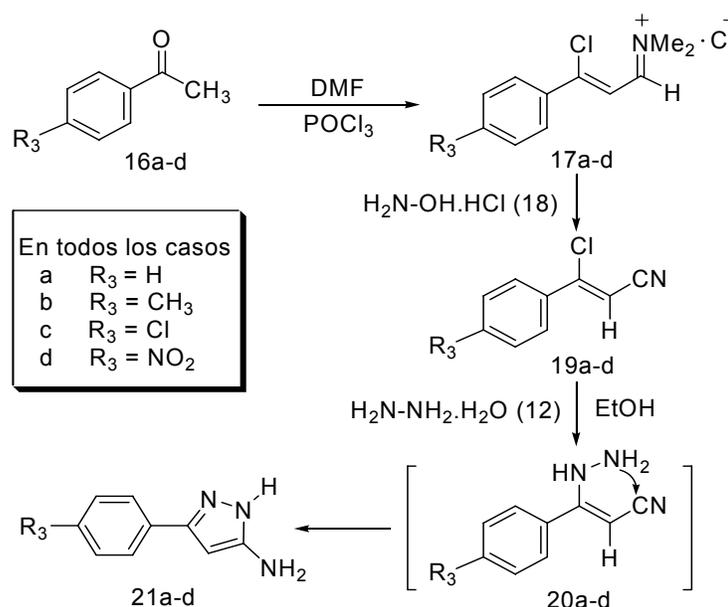
sustituyente electrodonante o electroatrayente. Estos compuestos se numeran partiendo desde el nitrógeno enlazado al átomo de hidrógeno, continuando hacia el otro átomo de nitrógeno, de tal forma que el grupo arilo quede en la posición 3 y los grupos amino en las posiciones 1 y 5.

Figura 3. Estructura de los 5-amino-3-arilpirazoles.



2.1.2.1 Método de obtención de los 5-amino-3-arilpirazoles. Hartmann y Liebscher^{12,13} reportaron un método de obtención de los 5-amino-3-arilpirazoles 21a-d con rendimientos entre el 51% y el 84%. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas (Esquema 5).

Esquema 5. Reacciones implicadas en la obtención de los 5-amino-3-arilpirazoles.



En la primera etapa, se sintetizan los β -clorocinamonitrilos 19a-d por el método reportado por Liebscher y colaboradores.¹² La dimetilformamida (DMF), y el oxidocloruro de fósforo forman un reactivo clorante que reacciona con la acetofenona correspondiente 16a-d y con hidrocloreto de hidroxilamina 18. La reacción implica la formación de sales intermedias de amonio 17a-d, que son equivalentes

¹² Liebscher, J; Hartmann, H; Neumann, B. *J. Prakt. Chem.* 1983, 325, 915.

¹³ Hartmann, H; Liebscher, J. *Synthesis*, 1984, 276.

sintéticos versátiles en química orgánica, especialmente, en la síntesis de compuestos heterocíclicos.

La segunda etapa, implica la conversión de los nitrilocompuestos 19a-d en los 5-amino-3-arylpirazoles 21a-d.¹³ Este proceso es una heterociclación simple de los intermedios 19a-d, aplicando calentamiento a reflujo, con un exceso de hidrato de hidracina (12) en solución alcohólica. El β -hidracinocinamonitrilo respectivo 20a-d se presume que es el intermedio de la reacción, ya que no hay reporte de su aislamiento. Los 5-amino-3-arylpirazoles son compuestos sólidos altamente higroscópicos con puntos de fusión que oscilan entre 126 y 253°C.

Los puntos de fusión y los rendimientos de los compuestos 21a-d sintetizados por el método de Hartmann y Liebscher son reportados en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades físicas de los 5-amino-3-arylpirazoles (21a-d).

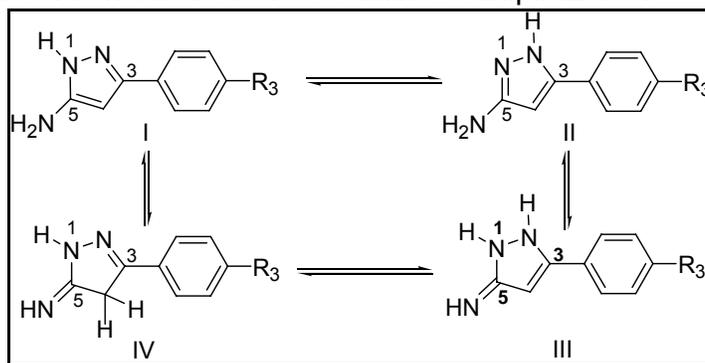
2	R_3	Rend. %	p.f. °C
a	H	51	126-127
b	CH ₃	74	147-150
c	Cl	84	173-175
d	NO ₂	62	248-253

Fuente: Hartmann, H; Liebscher, J. *Synthesis*, 1984, 276.

2.1.2.2 Propiedades químicas de los 5-amino-3-arylpirazoles. Estas moléculas presentan alta estabilidad y reactividad química debido a que pueden existir en forma de los tautómeros I-IV (Figura 4); siendo los tautómeros I y II los que predominan sobre los tautómeros III y IV. Igualmente, estos pirazoles pueden reaccionar a través de sus tres centros nucleofílicos; el grupo amino en posición 1, el grupo amino en posición 5 y el carbono 4.

En la siguiente sección de productos objetivo se encontrarán ejemplos específicos donde se puede observar el comportamiento químico de esta clase de compuestos orgánicos.

Figura 4. Formas tautoméricas de los 5-amino-3-arylpirazoles.

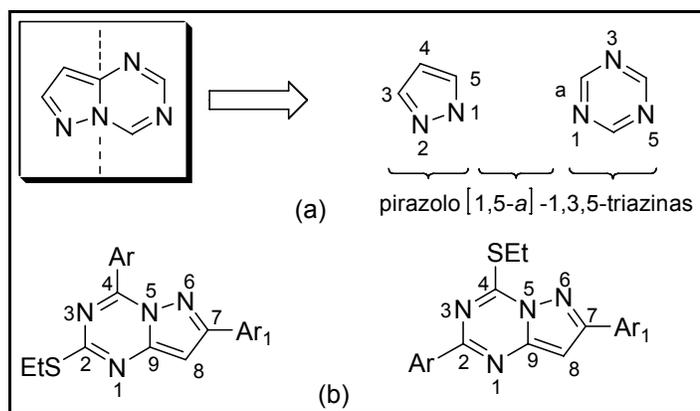


2.2 PRODUCTOS OBJETIVO

2.2.1 Pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas. Estructura y Nomenclatura. Son compuestos que poseen la estructura mostrada en la figura 5. Su nombre se debe a que el anillo del pirazol (1,2-diazol), heterocíclico de cinco miembros se encuentra unido a través de las posiciones 1 y 5 a la cara "a" del anillo triazínico, heterocíclico de seis miembros con tres átomos de nitrógeno en posiciones 1,3 y 5 como se observa en la figura 5a.

La numeración del sistema bicíclico, inicia en el nitrógeno triazínico adyacente al anillo del pirazol y continua hacia el siguiente nitrógeno triazínico como se muestra en la figura 5b. Esta numeración sirve para asignar la posición que ocupan los diferentes sustituyentes dentro de la molécula.

Figura 5. (a) Estructura general y nomenclatura de las pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas. (b) Numeración del sistema pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazínico.



2.2.2 Importancia Farmacológica. En los últimos años se han reportado diferentes sustancias que contienen el sistema pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazínico con una amplia variedad de aplicaciones médicas; tal es el caso de la 4-amino-8-(4-piridil)-pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazina (figura 6a) reportada por Rooney y colaboradores¹⁴ como efectivo dilatador bronquial que inhibe la constricción inducida por la histamina. Otra aplicación fue reportada por Kim y su grupo¹⁵ para el derivado b (figura 6) en la prevención y control de la úlcera péptica y son especialmente útiles para las personas que deben consumir antiinflamatorios no esteroides, ya que poseen también, propiedades analgésicas y antiinflamatorias que permiten reducir la dosis de dichos medicamentos que en muchos casos son los responsables de inducir este tipo de úlceras.

¹⁴ Rooney, S. S.; Williams, H.W.R. *Patente Estadounidense*; 3,995,039; 1976.

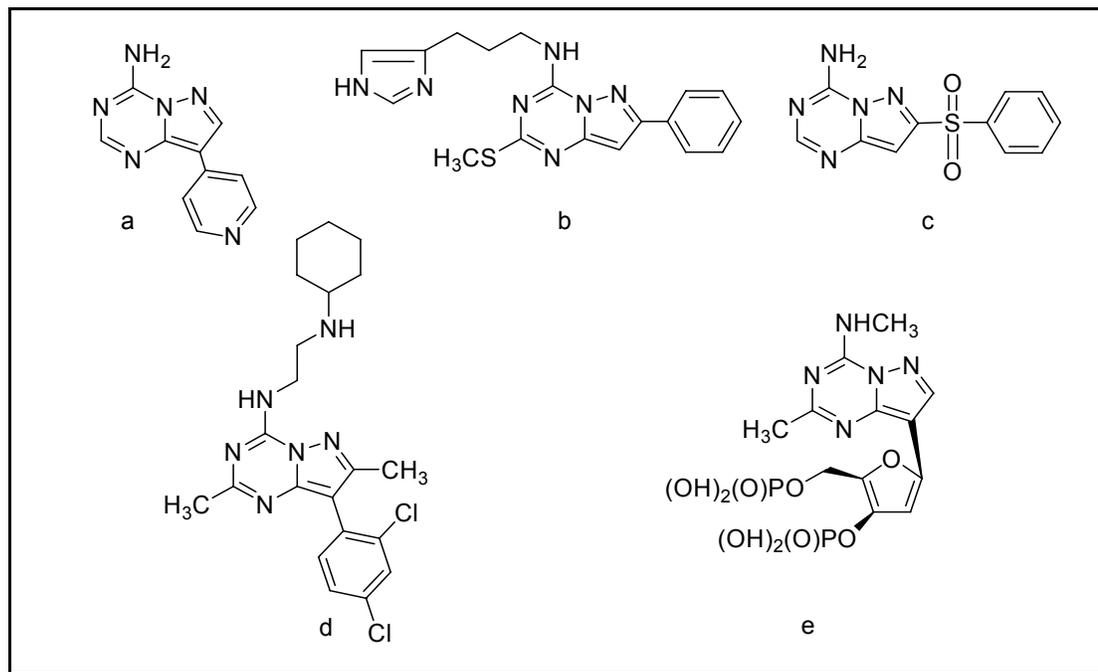
¹⁵ Kim, S.H.; Moreau, J. P. *Patente Estadounidense*; 4,565,815; 1986.

Bös y su grupo¹⁶ reportaron, el uso de la pirazolotriazina c (figura 6) en el tratamiento de algunos desórdenes del sistema nervioso central tales como la psicosis, la esquizofrenia, la depresión, el mal de Parkinson y el mal de Alzheimer.

Una aplicación novedosa fue reportada por Darrow y colaboradores¹⁷. La pirazolotriazina d (figura 6) actúan como antagonistas no peptídicos de los receptores del neuropéptido Y (NPY) cuya sobreexpresión en el organismo ocasionan respuestas fisiológicas como el incremento del apetito, la acumulación de grasa, el aumento del nivel de azúcar en la sangre y la presión arterial. Debido a esto, se ha comprobado que estas pirazolotriazinas son sustancias útiles en el tratamiento de desórdenes alimenticios como la obesidad y la bulimia, o de desórdenes cardiovasculares como la hipertensión.

En general, el interés en esta clase de sustancias se debe a su analogía estructural con las bases purínicas que permite incluso la construcción de análogos de los nucleótidos como el derivado e (figura 6) un antagonista selectivo de los receptores de ATP sintetizado por Raboisson y colaboradores.¹⁸

Figura 6. Sustancias bioactivas que contienen el sistema pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazínico.



¹⁶ Bös, M.; Riemer, C.; Stadler, H. *Patente Estadounidense*; 6,194,410 B1; 2001

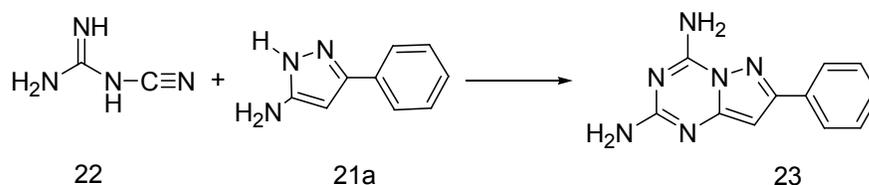
¹⁷ Darrow, J. W.; De Lombaert, S.; Blum, C.; Tran, J.; Giangiordano, M.; Griffith, D. A.; Carpino, P. A. *Patente Estadounidense*; 6,476,038 B1; 2002.

¹⁸ Raboisson, P.; Schultz, D.; Lugnier, C.; Mathieu, R.; Bourguignon, J.J.; *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 703.

2.2.3 Métodos de obtención de las pirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinas. El primer derivado de este sistema; la 2,4-diamino-7-fenilpirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazina 23, fue preparado por Checchi y Ridi,¹⁹ a partir de la ciclación del 5-amino-3-fenilpirazol 21a con la cianoguanidina 22 (Esquema 6).

Desde entonces, se han sintetizado varios derivados de estos compuestos siguiendo estrategias similares a la primera, es decir, por reacción de diferentes 5-aminopirazoles con reactivos bielectrofilicos, que permiten construir el anillo 1,3,5-triazínico sobre el anillo pirazólico ya existente.

Esquema 6. El primer derivado de las pirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinas preparado por Checchi y Ridi.

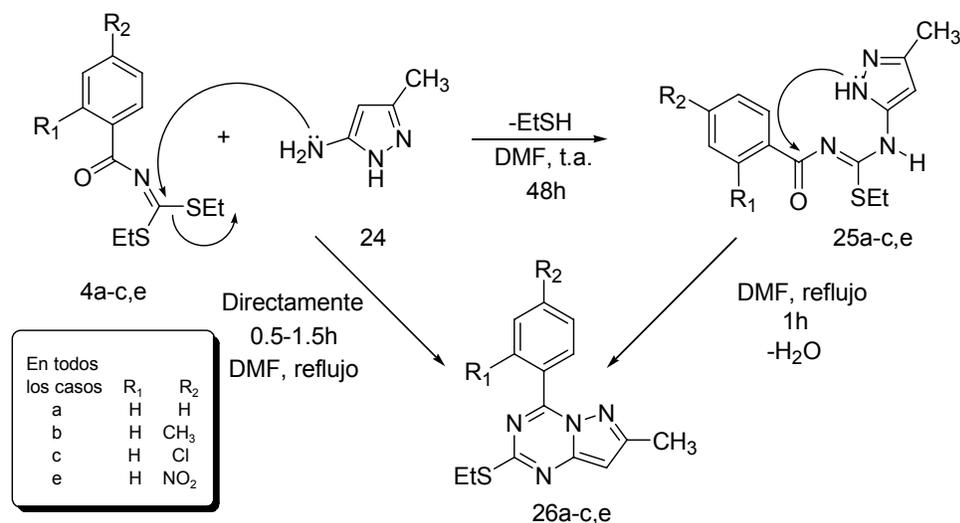


Estudios recientes acerca de la obtención de pirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinas han sido reportados por el GICH-UN. Inicialmente, se evaluó la interacción entre los aroiliminoditiocarbonatos de *S,S*-dietilo 4a-c,e y el 5-amino-3-metilpirazol 24 obteniendo las 4-aryl-7-metil-2-tioetilpirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinas 26a-c,e,²⁰ donde se demostró que la reacción es altamente regioselectiva, en una sola etapa, bajo condiciones suaves y con rendimientos altos (50-93%). Se estableció la ruta de ciclación de esta reacción, la cual, empieza con el ataque nucleofílico del grupo 5-NH₂ del pirazol al carbono imínico de los ditiocarbonatos 4a-c,e ocasionando la eliminación del grupo tioetilo en forma de etanotiol y conduciendo al correspondiente intermedio 25a-c,e, el cual, finalmente elimina una molécula de agua para dar origen a las pirazolotriazinas 26a-c,e (Esquema 7).

¹⁹ Checchi, S.; Ridi, M. *Gazz. Chim. Ital.* 1957; 87, 597.

²⁰ Insuasty, H.; Estrada, M.; Cortes, E.; Quiroga, J.; Insuasty, B.; Abonía, R.; Nogueras, M.; Cobo, J. *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 5441.

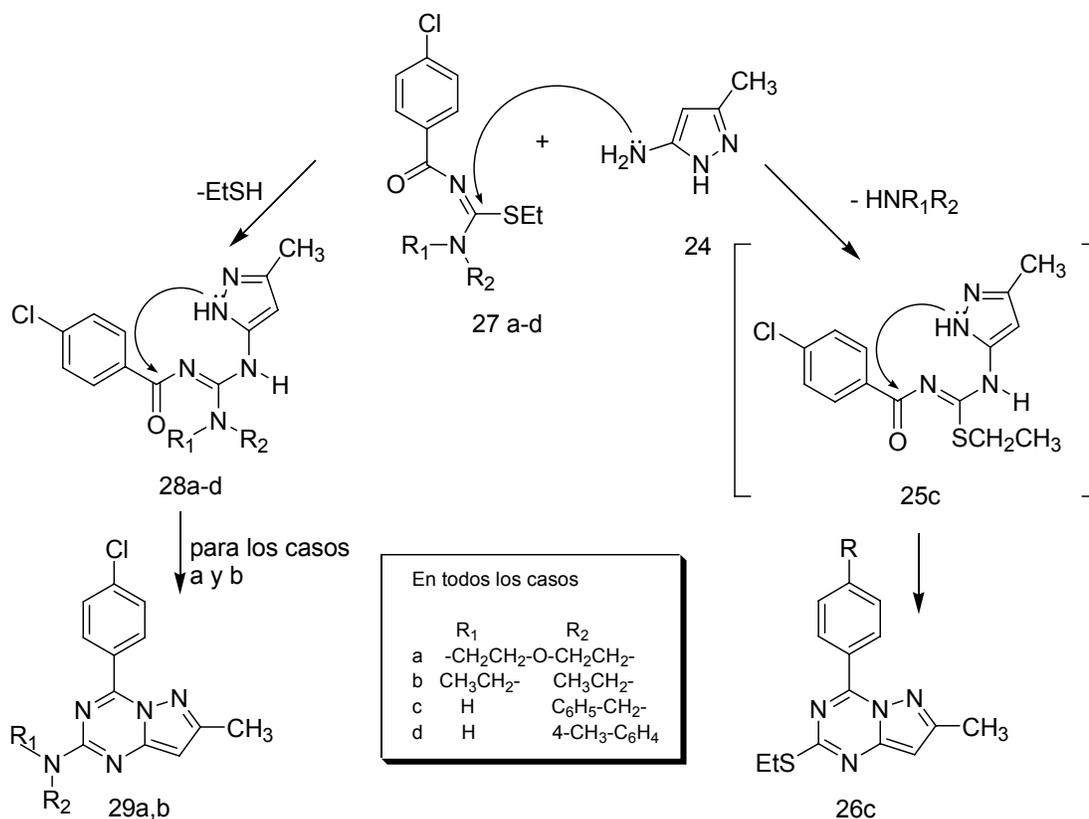
Esquema 7. Reacción entre los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo y el 5-amino-3-metilpirazol.



Igualmente, el GICH-UN²¹ realizó un estudio de la interacción de las 1-(*p*-clorobenzoil)-2-etilisotiureas 3,3 disustituidas 27a-d con el 5-amino-3-metilpirazol 24 para la obtención de las 4-(*p*-clorobenzoil)-7-metilpirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinas 2-aminofuncionalizadas 29a,b. Esta interacción produjo dos productos; el 4-(*p*-clorobenzoil)-7-metilpirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinas-2-aminofuncionalizadas 29a,b como producto mayoritario, donde se da el ataque nucleofílico del grupo amino en posición 5 del pirazol 24 al carbono imínico de las isotiureas aminofuncionalizadas 27a-d, ocasionando la eliminación del grupo tioetilo en forma de etanotiol y conduciendo a los intermedios 28a-d, de los cuales 28a,b sufren una cicloadición intramolecular entre el grupo amino endocíclico y el grupo carbonilo para dar origen a las pirazolotriazinas 29a,b. El producto minoritario 26c se forma cuando el grupo amino en posición 5 del pirazol 24 ataca nucleofílicamente al carbono imínico de las isotiureas aminofuncionalizadas 27a-d ocasionando la eliminación de los fragmentos amino y conduciendo al intermedio 25c, el cual, después de sufrir una ciclocondensación intramolecular del grupo amino endocíclico y el grupo carbonilo da origen a la pirazolotriazina 26c (Esquema 8).

²¹ Burbano, V.; García, N. Síntesis de nuevas pirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinas amino-funcionalizadas, por reacción de con 5-amino-3-metilpirazol con las 1-(*p*-clorobenzoil)-2-etilisotiureas 3,3 disustituidas., San Juan de Pasto, 2006, 74 p. Trabajo de grado. Universidad de Nariño.

Esquema 8. Ruta para la obtención de las 4-(*p*-clorobenzoil)-7-metilpirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinas 2-aminofuncionalizadas.

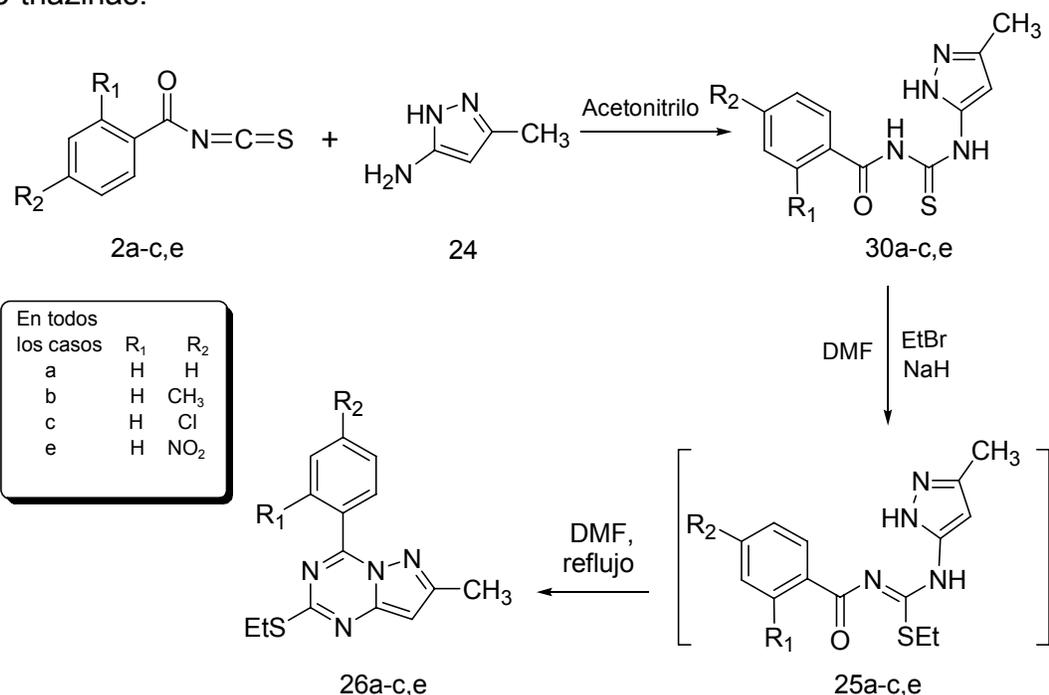


El GICH-UN²⁰ también encontró otra ruta alterna de dos etapas para la síntesis de las 4-aril-7-metil-2-tioetilpirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinas 26a-c,e (Esquema 9).

La primera etapa, consistió en la interacción de los isotiocyanatos de aroilo 2a-c,e con el 5-amino-3-metilpirazol 24 para formar las tioureas 30a-c,e. En la segunda etapa los compuestos 30a-c,e, fueron S-etilados en presencia de bromuro de etilo (EtBr), NaH y DMF como solvente, con agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 hora, para generar los intermedios no aislados 25a-c,e, cuya posterior ciclación por calentamiento en DMF a reflujo durante 1 hora, condujo a las pirazolotriazinas 26a-c,e.

Este estudio permitió corroborar que en este tipo de reacciones el centro más nucleofílico del 5-amino-3-metilpirazol es el grupo amino en posición 5 seguido del grupo amino en posición 1 y el centro más electrofílico de los isotiocyanatos de aroilo es el carbono íminico del grupo isotiocianato seguido del grupo carbonilo.

Esquema 9. Ruta alternativa para la obtención de 4-aryl-7-metil-2-tioetilpirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas.



La anterior conclusión esta acorde con otros trabajos de investigación reportados en 1971 por Capuano y Schrepfer²² y por Kobe y colaboradores en 1974.²³ Capuano y Schrepfer²² obtuvieron la N-carbetoxi-N'-(3-pirazolil)tiourea 33 por reacción entre el 5-aminopirazol 31 y el carbonilisotiocianato de etoxilo 32, cuya ciclación en piridina condujo a la 4-carbonil-2-tiocarbonilpirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazina 35, demostrando que el centro más reactivo del 5-aminopirazol 31 es el grupo amino en posición 5 (Esquema 10).

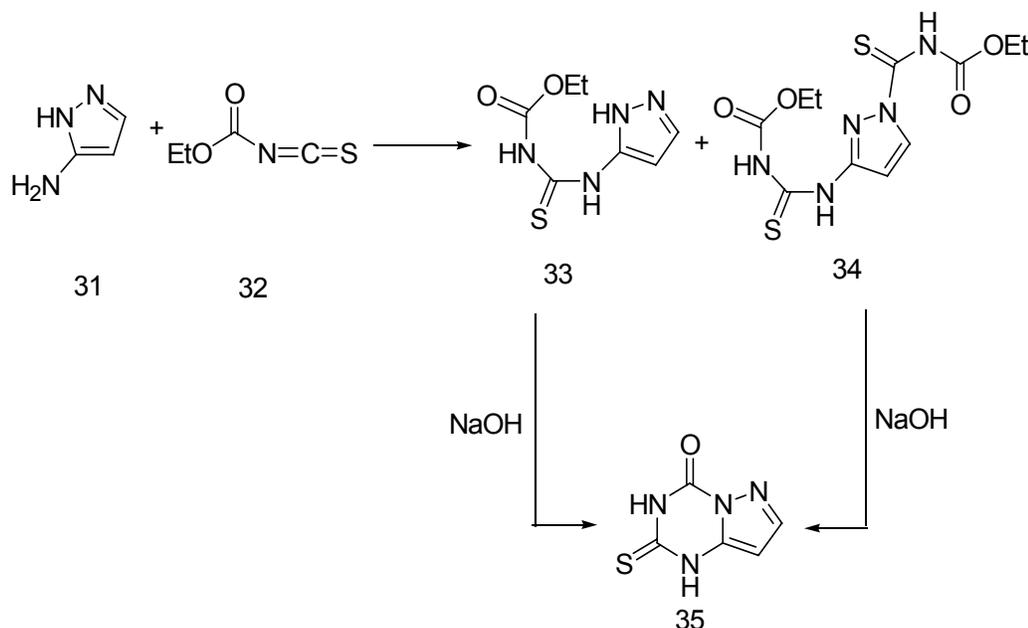
Esta metodología fue reproducida por Kobe y colaboradores,²³ quienes reportaron que la reacción entre 31 y 32 conduce a la formación de un precipitado que se separa por filtración y se recristaliza de una mezcla de acetato de etilo/hexano correspondiente a la tiourea 33; del filtrado resultante se separan mediante cromatografía de columna dos fracciones principales, una correspondiente a la tiourea 33 y otra correspondiente a la tiourea 34 con un rendimiento total del 59% y 15%, respectivamente.

Cuando los productos 33 y 34 fueron tratados por separado con NaOH 2N a temperatura ambiente, ambos condujeron a la pirazolotriazina 35 con un rendimiento total del 54% (Esquema 10).

²² Capuano, L.; Schrepfer, H. J. *Chem. Ber.* 1971,104, 3039.

²³ Kobe, J.; Robins, R. K.; O'Brien, D. E. *J. Heterocycl. Chem.* 1974, 11, 199.

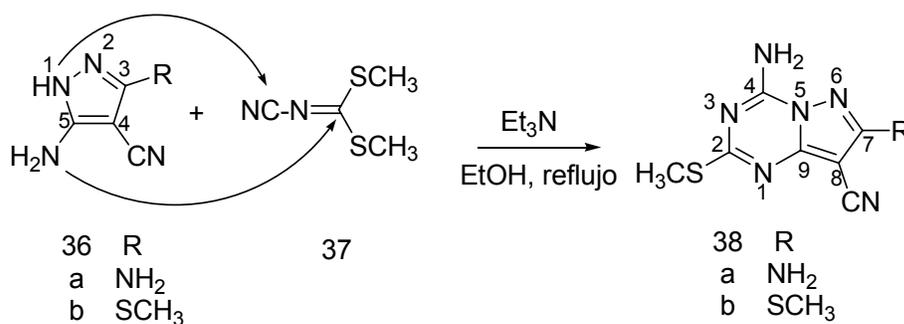
Esquema 10. Obtención de pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas, por interacción del 5-aminopirazol y el carbonil isotiocianato de etoxilo.



Por otra parte, Ried y Aboul-Fetouh,²⁴ sintetizaron en un solo paso, las pirazolotriazinas 38a,b sometiendo los pirazoles 36a,b y al N-cianoiminoditiocarbonato de S,S-dimetilo 37 a calentamiento en etanol a reflujo y agitación durante dos horas en presencia de trietilamina (Esquema 11).

El análisis de RMN ¹H y ¹³C monodimensional de los productos ciclados les permitió concluir que la reacción empieza con el ataque nucleofílico del grupo amino en posición 5 (5-NH₂) de 36 sobre el carbono imínico de 37 y termina con la ciclación entre el grupo amino en posición 1 (1-NH) y el grupo ciano (C≡N) de 37.

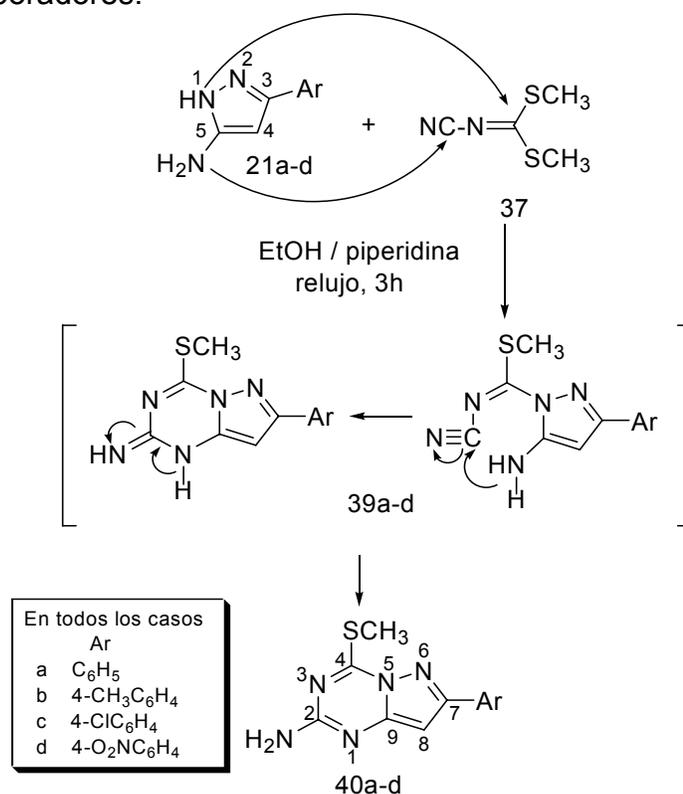
Esquema 11. Obtención pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas, metodología propuesta por Ried y Aboul-Fetouh.



²⁴ Ried, W.; Aboul-Fetouh, S. *Tetrahedron*; 1988; 44, 7155.

Sin embargo, en otro estudio posterior realizado por Elgemeie y colaboradores,²⁵ se concluyó que la formación de los productos 40a-d mediante reacción entre el N-cianoiminoditiocarbonato de S,S-dimetilo 37 y los 5-amino-3-arylpirazoles 21a-d en etanol a reflujo y con cantidades catalíticas de piperidina, procede a través de los intermedios no aislados 39a-d. La estructura de los productos finales 40a-d fue establecida con la ayuda de las técnicas espectroscópicas de RMN ¹H y ¹³C monodimensional y los autores proponen que la reacción inicia con el ataque nucleofílico del nitrógeno endocíclico (1-NH) del pirazol sobre el carbono de la porción iminoéster de 37 y termina con la ciclación entre el grupo amino en posición 5 y el grupo ciano (Esquema 12).

Esquema 12. Obtención pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas, metodología propuesta por Elgemeie y colaboradores.



Lo interesante de los dos trabajos propuestos por Ried y Aboul-Fetouh²⁴ y Elgemeie y colaboradores,²⁵ es que, a pesar de que ambos parten del N-cianoiminoditiocarbonato de S,S-dimetilo 37 y de 5-aminopirazoles con posibilidades de reaccionar por el grupo amino en posición 5 y por el grupo amino en posición 1, la regioselectividad es totalmente opuesta; esto es fácil de observar si se compara la ubicación de los grupos amino (-NH₂) y tiometilo (-SCH₃) entre los productos 38a,b y los productos 40a-d.

²⁵ Elgemeie, G. H.; El-Ezbawy, S. R.; El-Aziz, H. A. *Synth. Commun.* 2001, 31, 3453.

Es importante resaltar que en ninguno de los dos trabajos mencionados anteriormente, se aislaron los intermedios de la reacción, por lo tanto, las dos propuestas mecanísticas son hasta ahora una hipótesis. Además, no emplearon la técnica NOESY, ni la difracción de rayos X, que en estos casos, es de gran ayuda para establecer la disposición de los sustituyentes en la molécula.

Estas investigaciones, demuestran que aunque haya gran similitud estructural entre los materiales de partida, la orientación de la reacción puede cambiar dependiendo de las condiciones en que se realice la misma. De aquí también surgió el interés en evaluar la interacción de los 5-aminopirazoles 21a-c con los ditiocarbonatos de S,S-dietilo 4a-d, estructuralmente análogos, al cianoditiocarbonato 37; ya que uno de los objetivos es establecer la orientación de esta nueva interacción propuesta en el presente trabajo de grado.

2.3 SÍNTESIS DE COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS ASISTIDA POR IRRADIACIÓN CON MICROONDAS

Esta sección fue incluida dentro del marco teórico, debido a que los productos objetivo del presente trabajo de investigación fueron obtenidos por reacciones asistidas por microondas y por lo tanto, es pertinente hacer una breve descripción de esta técnica y sus aplicaciones.

La síntesis orgánica asistida por microondas es conocida por las aceleraciones significativas que se producen en muchas reacciones como consecuencia de la velocidad del calentamiento que no puede ser reproducida por la calefacción clásica. Además, esta metodología se ha aplicado extensivamente en la síntesis de diferentes compuestos heterocíclicos. Así, algunas reacciones que no ocurren en solución o transcurren con muy bajos rendimientos pueden ser realizadas con buenos rendimientos por irradiación con microondas. También la quimio, regio y estereoselectividad pueden ser modificadas e incluso invertidas. En la mayoría de los casos la selectividad puede ser controlada por la potencia aplicada del equipo a los materiales de partida de una reacción. Algunos autores postulan la existencia de un efecto específico asociado al campo de microondas, conocido como el "efecto microondas"²⁶ y no debido a la calefacción rápida.

La técnica se ha utilizado en reacciones de oxidación, reducción, esterificación, transesterificación, protección y desprotección, cicloadición, condensación, alquilación, sustitución aromática y nucleofílica, N-acilación y muchos otros procesos utilizados en la química orgánica.²⁷ La irradiación con microondas le ha contribuido a los procesos químicos características tales como mayor selectividad, rendimientos altos y la facilidad de la manipulación.

²⁶ Langa, F.; De la Cruz, P.; De la Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Diez-Barra, E. *Contemporary Org. Synth.*, 1997, 373.

²⁷ Blackwell, H. *Org. Biomol. Chem.*, 2003, 1, 1251.

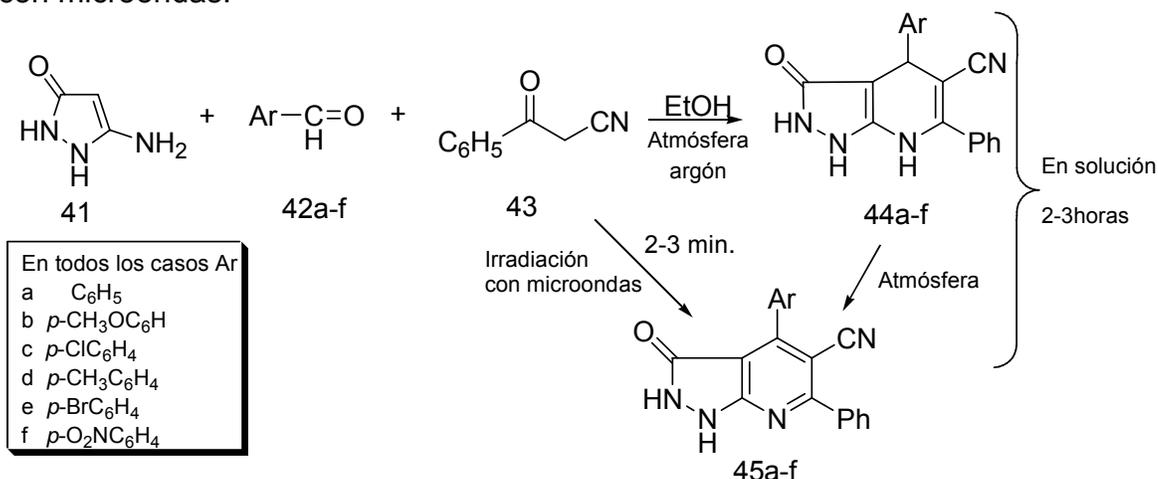
Según Blackwell²⁷ la irradiación con microondas (MW) acelera las reacciones orgánicas debido a que posee un campo oscilador eléctrico y magnético de alta frecuencia. Las moléculas con un dipolo permanente que se sujetan a esta oscilación campo eléctrico y magnético intentarán alinearse con el campo. Por tanto, las moléculas están en constante alineación y realineación. Este movimiento rápido produce una fricción intermolecular y es la causa del calor interno intenso que pueda aumentar hasta 10°C por segundo. Además la irradiación con microondas es un método más homogéneo comparado a la calefacción tradicional, con la calefacción tradicional, el calor se transfiere a la mezcla de reacción a través de la pared del recipiente, esto puede causar el recalentamiento localizado en las paredes, dando por resultado la formación de subproductos y/o la descomposición de productos, especialmente con la calefacción prolongada. Sin embargo, la radiación del microondas se distribuye por todo el sistema, evitando el recalentamiento local en las paredes del recipiente de la reacción. Esto puede eliminar la formación de subproductos, facilitando su purificación y la obtención de productos con buenos rendimientos.

En 1986, se conoció el primer reporte de reacciones orgánicas que se podían acelerar con irradiación con microondas empleando hornos domésticos.²⁸ A pesar de las dificultades, la química orgánica asistida por microondas ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos 20 años y muchos grupos han contribuido al estudio del “efecto microondas”. En la actualidad se encuentran reportados varios trabajos aplicando esta metodología en la síntesis orgánica. Por ejemplo, Quiroga y Colaboradores²⁹ sintetizaron las cianopirazolopiridinas 45a-f por reacción del 5-aminopirazol 41 con los aldehídos 42a-f y el benzoilacetnitrilo 43. Demostrando que mediante irradiación con microondas la reacción se lleva a cabo en cuestión de minutos (2–3 min) y en un solo paso, con alta regioselectividad, versatilidad y buenos rendimientos (75-85%). En comparación con las condiciones clásicas, donde la misma reacción se lleva a cabo en un tiempo de 2-3 horas, en dos pasos, obteniendo primero el intermedio 44a-f y con rendimientos entre 45-70% (Esquema 13).

²⁸ Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J.; *Tetrahedron Lett.* 1986, 27,279.

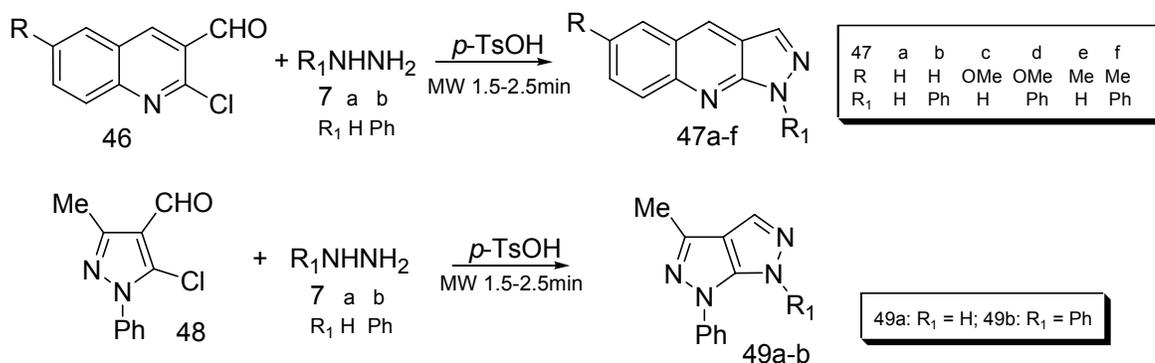
²⁹ Quiroga, J.; Cruz, S.; Insuasty, B.; Abonía, R. *Heterocyclic Commun.*, 2000,6, 275.

Esquema 13. Obtención 5-cianopirazolo[3,4-*b*]piridin-4-onas mediante irradiación con microondas.



En otra investigación, Paul y su grupo,³⁰ reportaron la síntesis de las pirazolo[3,4-*b*]quinolinas 47a-f y los pirazolo[3,4-*c*]pirazoles 49a,b asistida por irradiación con microondas usando *p*-TsOH como catalizador. Los compuestos 47a-f y 49a,b se sintetizaron a partir de la reacción de ciclocondensación de las 2-cloro-3-formilquinolinas 46 ó las 5-cloro-3-metil-1-fenil-1H-pirazolo-4-carbaldehído 48 con hidrazina 7a y felhidrazina 7b (Esquema 14). En esta síntesis las reacciones suceden en tiempos cortos (1.5 - 2.5 min) y con altos rendimientos (78-69%). Además, los autores mencionan que las reacciones orgánicas realizadas bajo condiciones secas sin solvente reducen el uso de solventes tóxicos, previniendo así la contaminación en síntesis orgánica. Por lo tanto, las reacciones bajo irradiación con microondas son relativamente más limpias, rápidas y menos costosas.

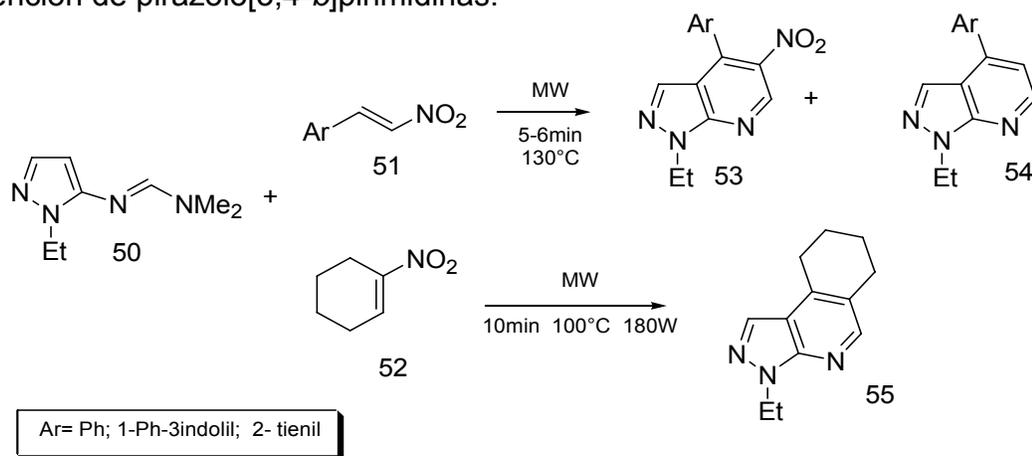
Esquema 14. Obtención de pirazolo[3,4-*b*]quinolinas y pirazolo[3,4-*c*]pirazoles mediante irradiación con microondas.



³⁰ Paul, S.; Gupta, M.; Gupta, R.; Loupy, A. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 3827.

Otra aplicación importante de la irradiación con microondas fue reportada por Diaz y Colaboradores,³¹ en la síntesis de pirazolo[3,4-*b*]piridinas 53-55 por reacción de cicloadición del 2-azadieno 50 con nitroalquenos alifáticos 51 y otro dienófilo 52. Todas las cicloadiciones fueron realizadas en ausencia de solvente, a presión atmosférica en un reactor microondas, que permitió establecer de una forma más precisa las condiciones de reacción como la potencia, la temperatura y el tiempo. Dichas condiciones para este estudio fueron: potencia de 180 W, temperatura entre 100-130 °C y tiempos de reacción de 5-10 min (Esquema 15).

Esquema 15. Reacción de cicloadición mediante irradiación microondas. Obtención de pirazolo[3,4-*b*]pirimidinas.

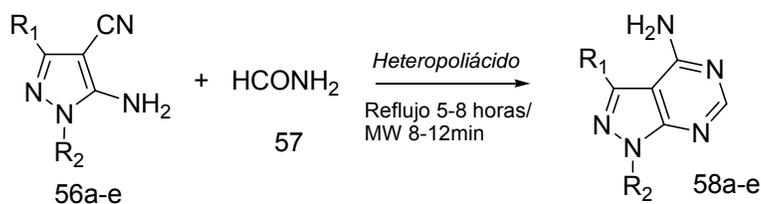


Estudios recientes sobre la aplicación de irradiación con microondas siguen confirmando las ventajas de esta metodología frente a las condiciones clásicas de reacción, como lo demuestra Heravi y su grupo,³² en la síntesis de 4-amino-pirazolo[3,4-*d*]pirimidinas (58a-e) por la interacción de los 5-amino-4-cianopirazoles 56a-e con formamida 57 utilizando heteropoliácidos sólidos como catalizadores. Bajo condiciones clásicas los compuestos 58a-e se obtuvieron a reflujo en ácido acético de 5-8 horas de reacción con rendimientos entre el 26-58%. Utilizando irradiación con microondas (1000 W) la reacción se produjo en tiempos cortos (8-12 min) y con rendimientos entre 58% y 88% (Esquema 16).

³¹ Diaz, A.; Carrillo, J.; Cossio, F.; Gomez, M.; De la Hoz, A.; Moreno, A.; Prieto, P. *Tetrahedron Lett.* 2000, 56, 1569.

³² Heravi, N.; Rajabzadeh, G.; Bamoharram, F.; Seifi, N. *J. Mol. Catalysis*, 2006, 256, 238.

Esquema 16. Síntesis de 4-aminopirazolo[3,4-*d*]pirimidinas utilizando irradiación con microondas.



En todos los casos	a	b	c	d	e
R ₁	H	H	H	CH ₃	CH ₃
R ₂	CH ₃	C ₆ H ₅	2,4-O ₂ NC ₆ H ₃	CH ₃	C ₆ H ₅

Heteropoliácidos:
H₃PW₁₂O₄₀; H₃PMo₁₂O₄₀; H₃PW₁₂O₄₀;

Todas las Investigaciones reportadas demuestran que cuando los procedimientos convencionales requieren un tiempo de reacción considerable, la irradiación con microondas puede sustituir estos métodos clásicos permitiendo el acceso fácil y rápido a los nuevos compuestos heterocíclicos, reduciendo los tiempos de reacción de horas a minutos con mejores rendimientos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente, se encuentra una descripción sobre la optimización de las condiciones de reacción que permitieron sintetizar los productos objetivo. Posteriormente, se ilustrará para uno de los compuestos sintetizados, la contribución de las técnicas RMN ^1H y ^{13}C , COSY ^1H - ^1H , HSQC, HMBC, NOESY, espectrometría de masas y difracción de rayos X (DRX), empleadas en la determinación de la estructura y la confirmación de la orientación de la reacción. Adicionalmente, se describirán los resultados de la actividad biológica, probada a ocho de los doce compuestos obtenidos en la presente investigación.

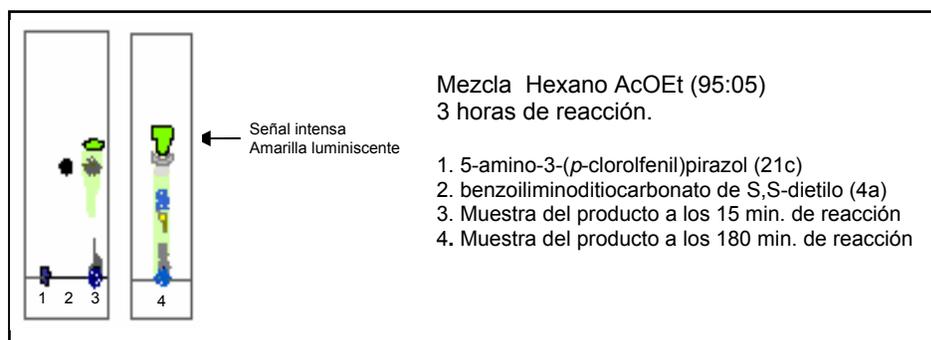
4.1 OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS OBJETIVO

El interés fundamental de esta investigación fue la obtención de las nuevas pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas (59a-l), por reacción de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-d) y los 5-amino-3-arilpirazoles (21a-c).

Los precursores se obtuvieron en el laboratorio de investigación de la Universidad de Nariño, debido a que son muy costosos o no se encuentran disponibles comercialmente. Los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-d) se obtuvieron siguiendo la metodología optimizada y reportada en otro trabajo de grado realizado en el grupo de Investigación de Compuestos Heterocíclicos de la Universidad de Nariño⁶ y los 5-amino-3-arilpirazoles (21a-c) se obtuvieron siguiendo la metodología reportada por Hartmann y Liebscher.^{12,13}

El estudio de la interacción entre los materiales de partida se inició con el siguiente ensayo: cantidades equimolares del benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dietilo (4a) y el 5-amino-3-(*p*-clorofenil)pirazol (21c) se sometieron a calentamiento a reflujo en DMF. Durante el control de la reacción por CCD se observaron tres señales, dos de ellas, correspondientes a los precursores, que disminuían su intensidad a medida que avanzaba la reacción y al mismo tiempo se intensificaba la señal de un compuesto nuevo con una característica interesante, presentaba luminiscencia (verde), cuando la placa se reveló bajo la luz ultravioleta de 365nm. Esta propiedad se presenta en los compuestos pirazolotriazinicos y se ha observado en estudios previos realizados por el GICH-UN,^{20,21} hecho que permitió predecir que la señal luminiscente del nuevo compuesto correspondería al producto objetivo. Esta señal se observó desde los 15 minutos de reacción hasta el término de la misma, a las 3 horas de calentamiento en DMF a reflujo. La CCD también reveló que además del producto principal (señal luminiscente) existen otros productos de menor proporción de acuerdo a la intensidad de las señales en la placa cromatográfica (figura 9), hecho que dificultó la purificación del compuesto objetivo.

Figura 9. CCD de la reacción entre 5-amino-3-(*p*-clorofenil)pirazol (21c) y benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dietilo (4a) realizada a reflujo en DMF.



Con el fin de optimizar las condiciones para la interacción entre 4a y 21c, se probó otra metodología sin disolvente, que consistió en irradiar los materiales de partida en un horno microondas doméstico, variando la potencia del equipo y el tiempo de reacción.

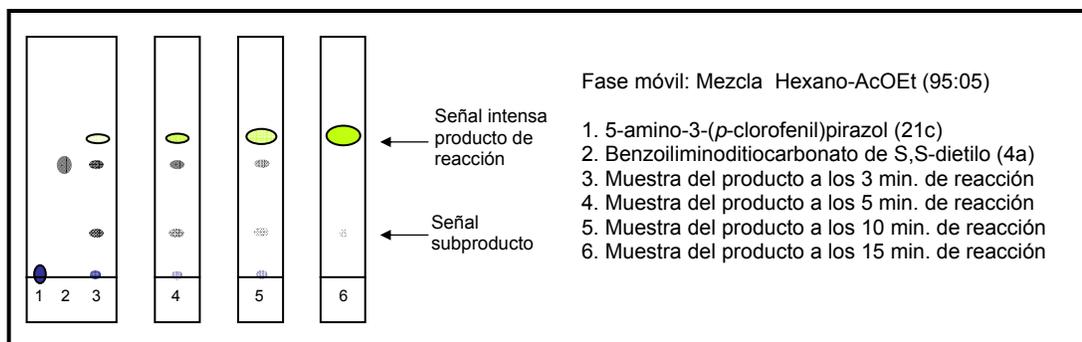
Inicialmente, se realizaron ensayos variando la potencia del horno, entre 140 y 1400 W. El seguimiento por CCD de los diferentes ensayos demostró que la máxima potencia (1400 W) es la más adecuada, ya que a potencias menores la reacción se llevaba a cabo en periodos de tiempo más largos, permitiendo la formación de subproductos.

Luego de establecer la potencia adecuada, se realizaron otros ensayos, pero en esta ocasión, se varió el tiempo de reacción, entre 1 y 15 min. Los ensayos se realizaron a 1 min., 2 min., 3 min., etc., y se monitorearon por CCD. Desde los primeros minutos se observó la formación de un producto nuevo, señal luminiscente revelada bajo luz ultravioleta de 365 nm, que se intensificaba a medida que se incrementaba el tiempo de reacción. Se determinó que el tiempo óptimo de la reacción fue de 15 minutos, al observar en la CCD que las señales correspondientes a los precursores se consumieron en su totalidad. En el seguimiento por CCD también se observó la formación de un subproducto en muy baja proporción (Figura 10).

El producto mayoritario, que en este caso corresponde al compuesto 59i, se purificó por cromatografía de columna empleando una mezcla de hexano:acetato de etilo (95:05) como fase móvil. Este producto se obtuvo con un rendimiento del 63%.

La irradiación con microondas dió los resultados esperados; la reacción se llevó a cabo en pocos minutos, con un buen rendimiento, eliminando la utilización de solventes.

Figura 10. CCD de la reacción entre 5-amino-3-(*p*-clorofenil)pirazol (21c) y benzoiliminoditiocarbonato de S,S-dietilo (4a) realizada por irradiación con microondas.



Según la CCD las dos metodologías aplicadas condujeron al mismo producto, ya que la señal luminiscente en los dos casos, posee la misma relación de flujo (Rf). Pero, el tiempo de reacción es considerablemente mayor en solución (3 horas) en comparación con la metodología vía microondas (15 min). Además, es importante mencionar que en la reacción vía microondas se redujo la presencia de subproductos en comparación con la reacción en solución, hecho que hizo más fácil la purificación, incrementando así el porcentaje de recuperación del producto deseado después de la cromatografía de columna.

Lo anterior demostró que la irradiación con microondas es la mejor alternativa para la obtención de los productos de interés (59a-l). Por lo tanto, la síntesis de las nuevas pirazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinas se realizó sometiendo los materiales de partida a irradiación en un horno microondas doméstico, a la máxima potencia (1400 W), con tiempos de 7 a 15 minutos.

Los productos finales, son sólidos amarillos, solubles a temperatura ambiente en THF, medianamente solubles (con un suave calentamiento) en AcOEt, DCM, DMSO e insolubles en Hexano, ciclohexano y EtOH.

Las características físicas de los compuestos 59a-l, se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Características físicas de los productos (59a-l) obtenidos vía MW (1400 W).

Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	Color cristales	p.f. °C	Tiempo de reacción (min)	Rend. (%)
59a	H	H	H	Amarillo	140-141	15	67
59b	H	CH ₃	H	Amarillo pálido	112-116	10	72
59c	H	Cl	H	Amarillo	126-128	10	62
59d	Cl	Cl	H	Blanco	156-160	7	58
59e	H	H	CH ₃	Amarillo pálido	120-124	12	60
59f	H	CH ₃	CH ₃	Amarillo	132-134	15	73
59g	H	Cl	CH ₃	Amarillo	116-117	10	61
59h	Cl	Cl	CH ₃	Amarillo pálido	169-172	10	61
59i	H	H	Cl	Amarillo	131-134	15	63
59j	H	CH ₃	Cl	Amarillo pálido	146-148	15	67
59k	H	Cl	Cl	Anaranjado	156-158	15	71
59l	Cl	Cl	Cl	Blanco	198-202	10	60

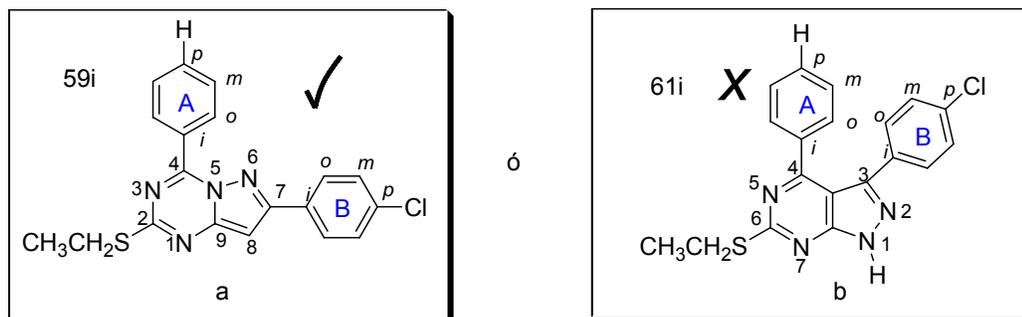
En general, los compuestos nuevos se obtuvieron en tiempos de reacción cortos y con buenos rendimientos, entre 58 y 73%. Además, la cromatografía de columna garantizó una alta pureza de los productos objetivo, ya que, la recrystalización de los mismos no funcionó adecuadamente porque la CCD mostró que el producto principal seguía contaminado en baja proporción con el subproducto de la reacción.

La caracterización de los productos sintetizados se realizó con las técnicas espectroscópicas RMN ¹H y RMN ¹³C mono y bidimensionales (COSY ¹H-¹H, HMBC, HSQC y NOESY) y espectrometría de masas de alta resolución. Estos experimentos fueron realizados en los laboratorios de espectroscopía de la Universidad de Jaén-España. Además tres compuestos de la serie (59e,i,k) fueron caracterizados, adicionalmente, por difracción de rayos X, en equipos de alta resolución de las Universidades de Aberdeen y St Andrews-Escocia.

El análisis espectroscópico determinó que la estructura de estos compuestos corresponde al sistema pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinico (Figura 11a) y no al sistema pirazolo[3,4-a]pirimidínico (Figura 11b). Asimismo, permitió concluir que la interacción estudiada condujo regioselectivamente a la formación de las pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas 59a-l y no a sus regioisómeros 60a-l.

A continuación, se presenta como ejemplo, el análisis espectroscópico del compuesto 59i, uno de los sistemas pirazolotriazinicos sintetizados en esta investigación, que permitirá ilustrar como se llegó a las anteriores conclusiones.

Figura 11. Estructura de los compuestos 59i y de su posible regioisómero 61i.



Las señales características del compuesto 59i en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN ^1H) (Figura 12) son: un triplete a 1.41 ppm que integra para tres hidrógenos y un cuartete a 3.21 ppm que integra para dos hidrógenos, señales correspondientes al grupo metilo y metileno del sustituyente tioetilo. A campo bajo a 7.17 ppm, se observa un singulete que integra para un protón, esta señal es característica del hidrógeno aromático en posición 8 (H8), lo cual, confirmó que el sistema formado es el pirazolotriazinónico y no el sistema pirazolopirimidínico. La formación del sistema pirazolopirimidínico, implicaría en el espectro de RMN ^1H , la presencia de un singulete entre 10-12 ppm correspondiente al grupo NH en posición 1 según la estructura de los productos 61a-l, señal que no se evidencia en el espectro.

Igualmente, a campo bajo entre 7.58 y 8.69 ppm, se observan las señales típicas de los protones del grupo fenilo (anillo aromático A) y del grupo *p*-clorofenilo (anillo aromático B), las cuales, están compuestas por tres dobletes y dos tripletes, que integran en total para 9 protones, correspondiendo con la estructura del compuesto 59i, como se observa en la expansión del espectro de RMN ^1H (Figura 13).

Teniendo en cuenta la multiplicidad y el valor de la integral de cada señal, se pudo inferir que el triplete ubicado a 7.76 ppm que integra para un protón, corresponde al hidrógeno en posición *para* del grupo fenilo (anillo A) y que el triplete ubicado a 7.68 ppm que integra para dos protones, corresponde a los hidrógenos en posición *meta* del anillo aromático A, porque estas señales son las únicas en el espectro, que cumplen apropiadamente con la multiplicidad y la integral esperadas para los hidrógenos *meta* y *para* de este anillo aromático A.

Con base en lo anterior y con ayuda del espectro COSY ^1H - ^1H (figura 14) se pudo establecer fácilmente, cuál de los tres dobletes correspondía a los hidrógenos en posición *orto* del anillo aromático A. Esto se evidenció por la correlación mostrada en el espectro COSY ^1H - ^1H entre los hidrógenos *meta* y los hidrógenos *orto* del anillo aromático A.

El espectro COSY ^1H - ^1H , también permitió establecer que los dos dobletes restantes, presentan una correlación entre sí y corresponden a los hidrógenos de las posiciones *orto* y *meta* del grupo *p*-clorofenilo (anillo aromático B), aunque aún no se pudo establecer específicamente, cuál de ellos era *Ho* y cuál *Hm*.

Los protones *Ho* y *Hm* del grupo *p*-clorofenilo (anillo B) se asignaron correctamente con ayuda del espectro HMBC. En este experimento sólo los protones *Ho* del anillo B pueden presentar una correlación a dos enlaces (3J) con el carbono en posición 7 (identificado por su correlación adicional a tres enlaces con el protón ocho (H8)). Por lo tanto, se concluyó que el doblete a 8.09 ppm corresponde a los *Ho*, y por ende, el otro doblete ubicado a 7.59 ppm corresponde a los *Hm* del anillo aromático B. Estas correlaciones se observarán más adelante en la Figura 18, en el análisis completo del espectro HMBC.

Los espectros de RMN ^1H para los demás compuestos de la serie, presentan características similares y sus datos se resumen en la tabla 5.

Figura 12. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) del compuesto 59i.

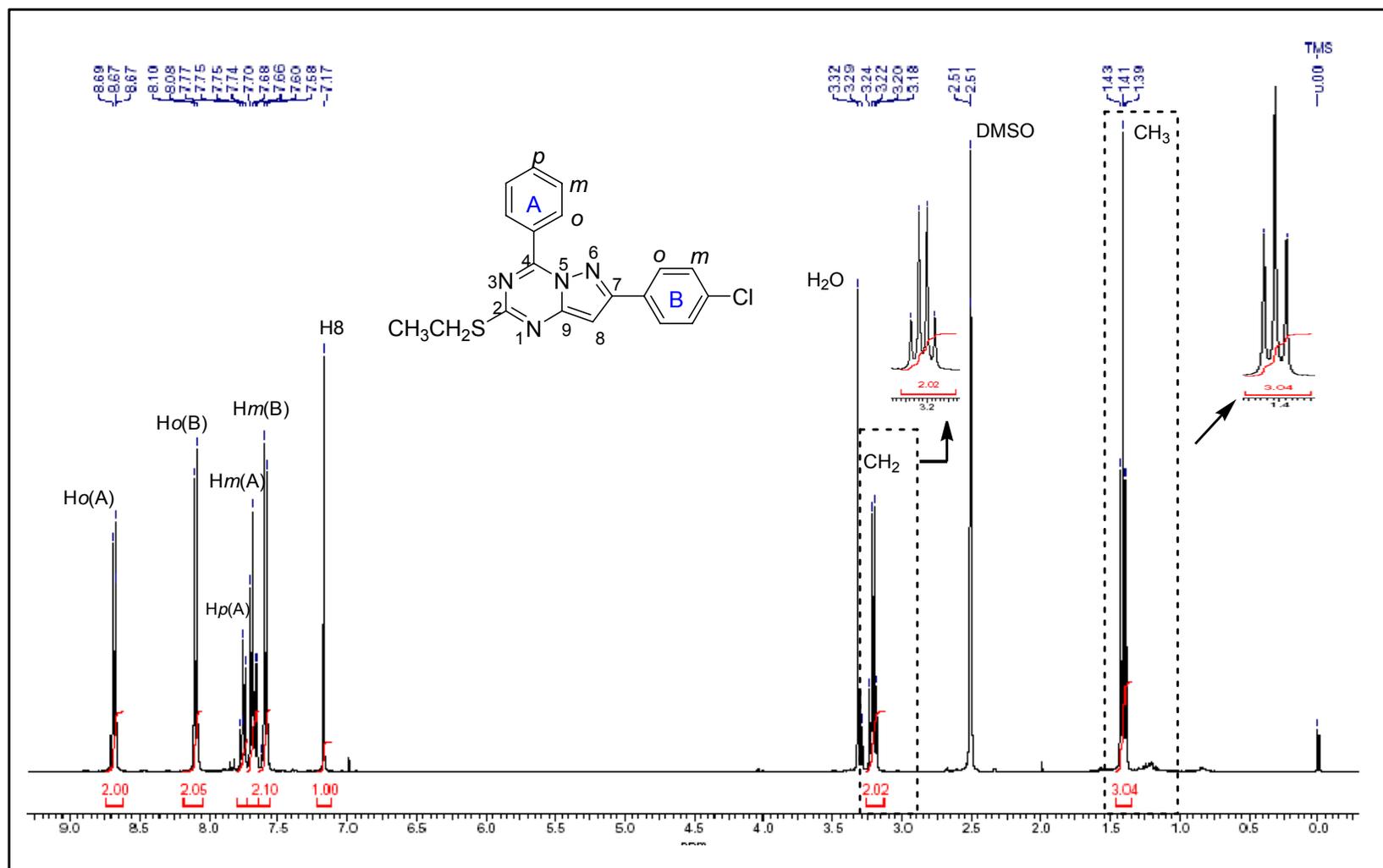


Figura 13. Espectro de RMN ^1H del compuesto 59i, expansión de las señales aromáticas.

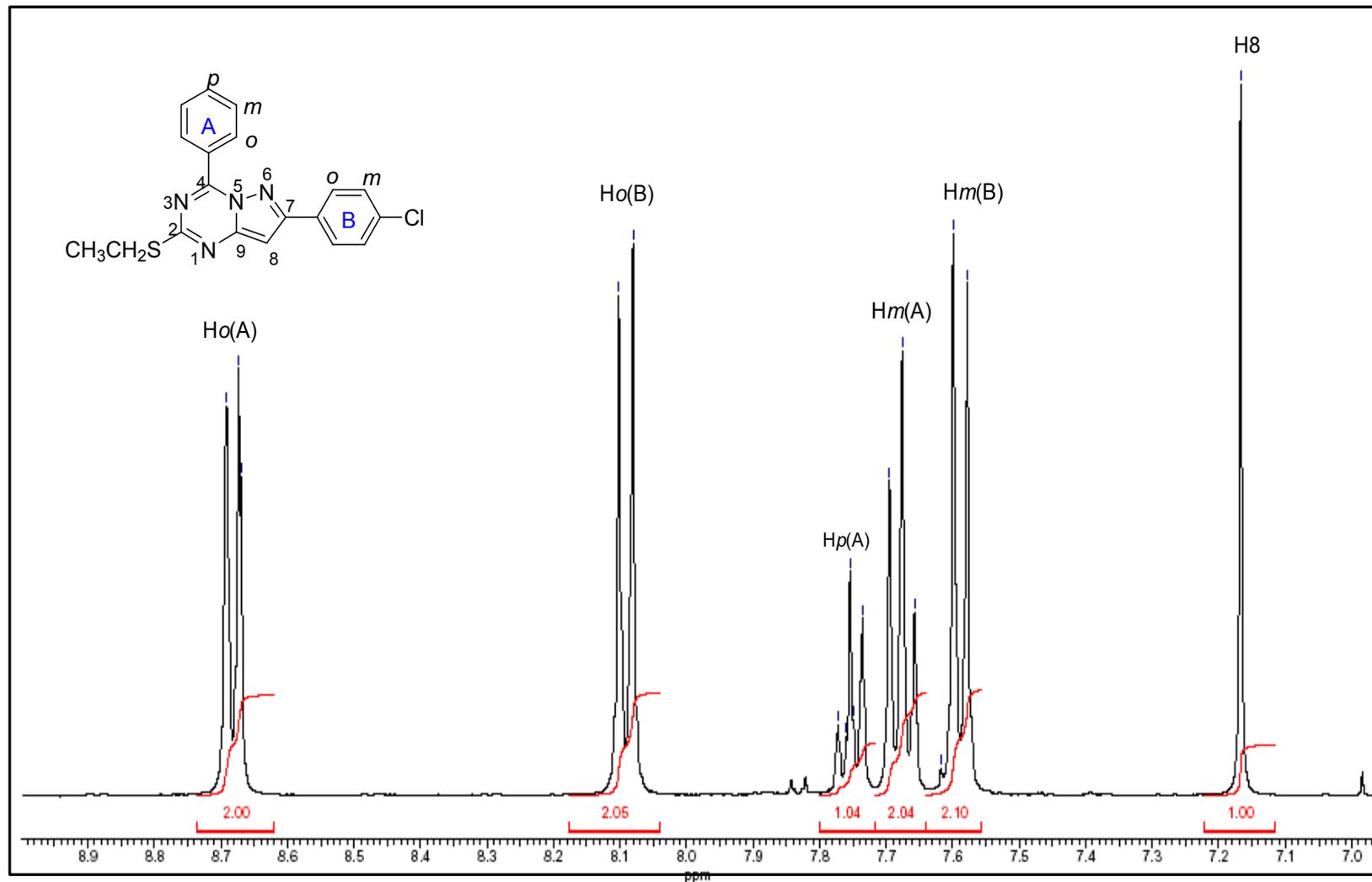


Figura 14. Espectro de COSY del compuesto 59i.

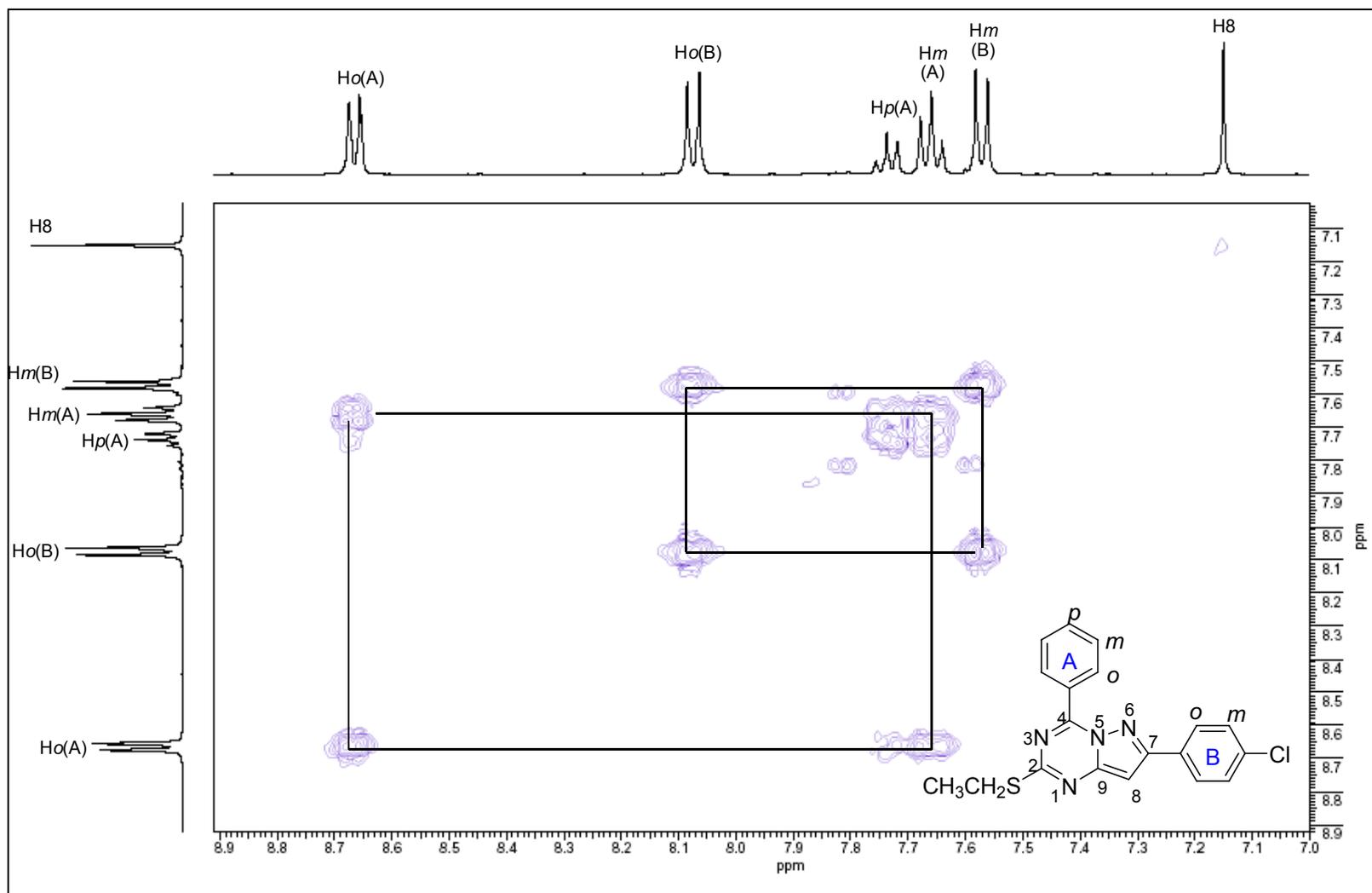


Figura 15. Numeración de los Productos Objetivo 59a-l.

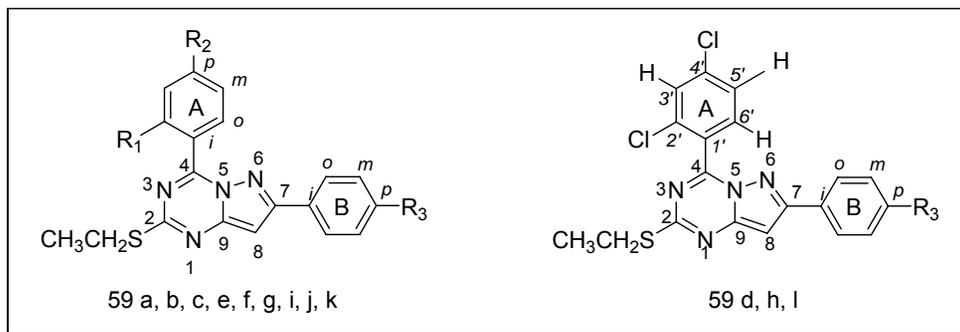


Tabla 5. Datos de RMN ^1H (δ ppm) de los compuestos 59a-l. DMSO- d_6 , 400 MHz (TMS-estándar interno).

Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	Grupo Tioetilo		8-H (s)	Anillo aromático A				Anillo aromático B			
				CH ₃ (t)	CH ₂ (c)		Ho (d)	Hm	Hp	CH ₃	Ho (d)	Hm	Hp	CH ₃
59a	H	H	H	1.43	3.25	6.96	8.73	7.64	7.71	----	8.02	7.46	7.49	----
59b	H	CH ₃	H	1.42	3.21	6.95	8.66	7.44	---	2.45	8.03	7.47	7.50	---
59c	H	Cl	H	1.40	3.21	7.13	8.75	7.74	---	---	8.07	7.51	7.52	---
* 59d	Cl	Cl	H	1.41	3.20	7.21	(H3') 7.93	(H5') 7.73	(H6') 7.94	---	7.95	7.45	7.49	---
59e	H	H	CH ₃	1.38	3.24	7.08	8.68	7.66	7.75	---	7.95	7.31	---	2.35
59f	H	CH ₃	CH ₃	1.40	3.19	7.02	8.64	7.45	---	2.45	7.94	7.31	---	2.37
59g	H	Cl	CH ₃	1.40	3.18	7.04	8.72	7.71	---	---	7.93	7.30	---	2.37
* 59h	Cl	Cl	CH ₃	1.40	3.20	7.16	(H3') 7.92	(H5') 7.73	(H6') 7.95	---	7.83	7.28	--	2.34
59i	H	H	Cl	1.41	3.21	7.17	8.68	7.68	7.91	---	8.09	7.59	---	----
59j	H	CH ₃	Cl	1.42	3.23	6.93	8.63	7.43	---	2.45	8.01	7.51	---	---
59k	H	Cl	Cl	1.39	3.15	7.03	8.66	7.66	---	---	7.99	7.51	---	---
* 59l	Cl	Cl	Cl	1.41	3.22	7.01	(H3') 7.79	(H5') 7.64	(H6') 7.79	---	7.89	7.47	---	---

s (singlete) d (doblete) t (triplete) c (cuartete)

* En estos compuestos el anillo A, se numera de una forma diferente cuando poseen el sustituyente 2,4 diclorofenilo.

Una vez asignadas las señales del espectro RMN ^1H , se procedió a asignar las señales del espectro RMN ^{13}C .

El espectro RMN ^{13}C del compuesto 59i (figura 16a) presenta las 15 señales esperadas para esta pirazolotriazina, distribuidas de la siguiente manera: siete señales para los carbonos cuaternarios (C2, C4, C7, C9, *Ci* de A, *Ci* de B y *Cp* de B), seis señales para los =CH aromáticos (*Co*, *Cm* y *Cp* de A, *Co* y *Cm* de B y el carbono 8 del sistema pirazolotriazínico) y dos señales en la región alifática correspondientes al grupo metilo (CH_3) y metileno (CH_2) del fragmento tioetilo.

Además, al comparar el espectro RMN ^{13}C (figura 16a) con el espectro DEPT-135 (figura 16b) se pudo inferir que el sistema formado es el pirazolotriazínico por la presencia a 91.6 ppm de un =CH aromático adicional a los anillos A y B, correspondiente al carbono en posición ocho (C8) de este sistema. Si se hubiera formado el sistema pirazolopirimidínico, en lugar del =CH aromático (C8), se observaría la señal de un carbono cuaternario. Además, este experimento permitió asignar las señales de los carbonos del grupo tioetilo, porque en la región alifática del espectro el grupo metilo aparece en fase positiva y el grupo metileno en fase inversa.

Con base en el experimento HSQC, que permite observar la correlación directa de los carbonos con sus hidrógenos, se asignaron fácilmente las señales de los seis =CH aromáticos y se corroboraron las del CH_2 y del CH_3 , debido a que se habían identificado plenamente los protones en el espectro RMN ^1H y por lo tanto, fue fácil correlacionar estas señales con sus respectivos carbonos como se muestra en el espectro HSQC del compuesto 59i (figura 17).

La asignación de las señales de los siete carbonos cuaternarios fue posible gracias a la información suministrada por la técnica bidimensional HMBC (figura 18). Esta técnica permitió establecer las principales correlaciones carbono protón a dos y a tres enlaces (2J y 3J), con las cuales, se asignaron correctamente los siguientes carbonos cuaternarios: C2, C4, C7 y C9 del sistema pirazolotriazínico, el *Ci* del anillo aromático A y los carbonos *Ci* y *Cp* del anillo aromático B.

La asignación de estos carbonos, se facilitó porque se conocían todos los hidrógenos del compuesto, que sirvieron de referencia en la interpretación del espectro.

El carbono de la posición dos (C2) fue asignado fácilmente, en el espectro HMBC porque es el único que presenta una interacción a tres enlaces (3J) con los protones del grupo metileno del sustituyente tioetilo (pico cruzado a). El carbono cuatro (C4), se asignó por su correlación a tres enlaces (3J) con los hidrógenos *orto* del grupo fenilo (pico cruzado b).

El carbono siete (C7), se asignó por sus dos correlaciones importantes. Una de ellas, a dos enlaces (2J) con el hidrógeno en posición 8 (pico cruzado c) y otra a tres enlaces (3J) con los hidrógenos *orto* del grupo *p*-clorofenilo (pico cruzado d). Además, esta última correlación sirvió para diferenciar entre los carbonos siete y nueve (C7 y C9), porque el C9 no tiene correlación con los hidrógenos *orto* del anillo B, pero sí, una correlación a dos enlaces (2J) con el protón ocho (pico cruzado e).

Finalmente, se asignaron las señales de los carbonos *Ci* de A, *Ci* de B y *Cp* de B. El pico cruzado f, en el espectro bidimensional HMBC, indica la correlación a tres enlaces (3J) de los protones *Hm* de A con el carbono *ipso* (*Ci*) de A. Los carbonos *Ci* de B y *Cp* de B no se pudieron asignar con la información espectroscópica suministrada por el compuesto, sus desplazamientos químicos se asignaron por comparación con la información espectroscópica suministrada por los demás compuestos.

Los compuestos 59a-l presentan resultados similares y los datos de RMN ^{13}C – DEPT-135 se resumen en la tabla 6.

Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 del compuesto 59i.

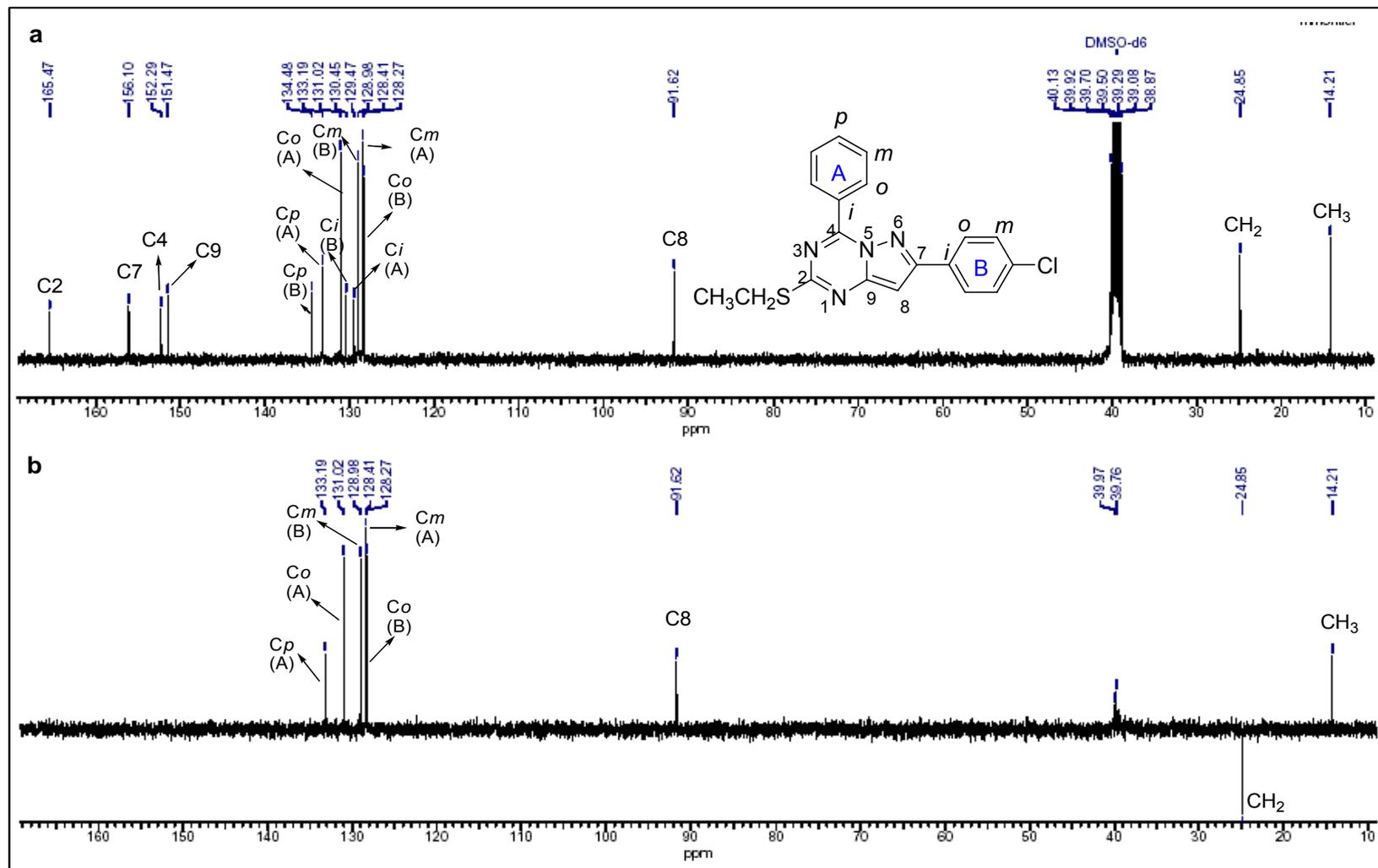


Figura 17. Espectro de HSQC del compuesto 59i.

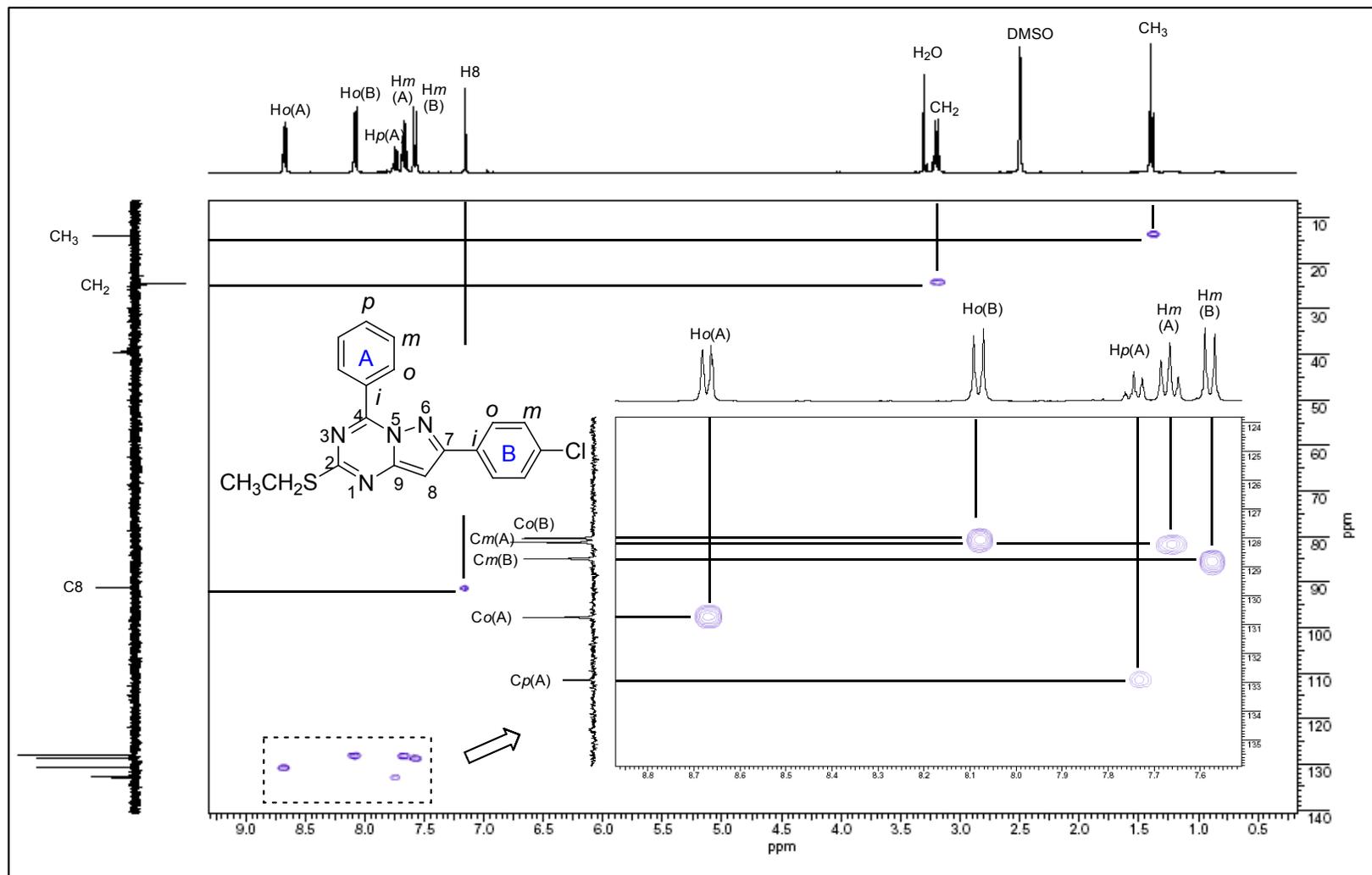


Figura 18. Espectro de HMBC del compuesto 59i.

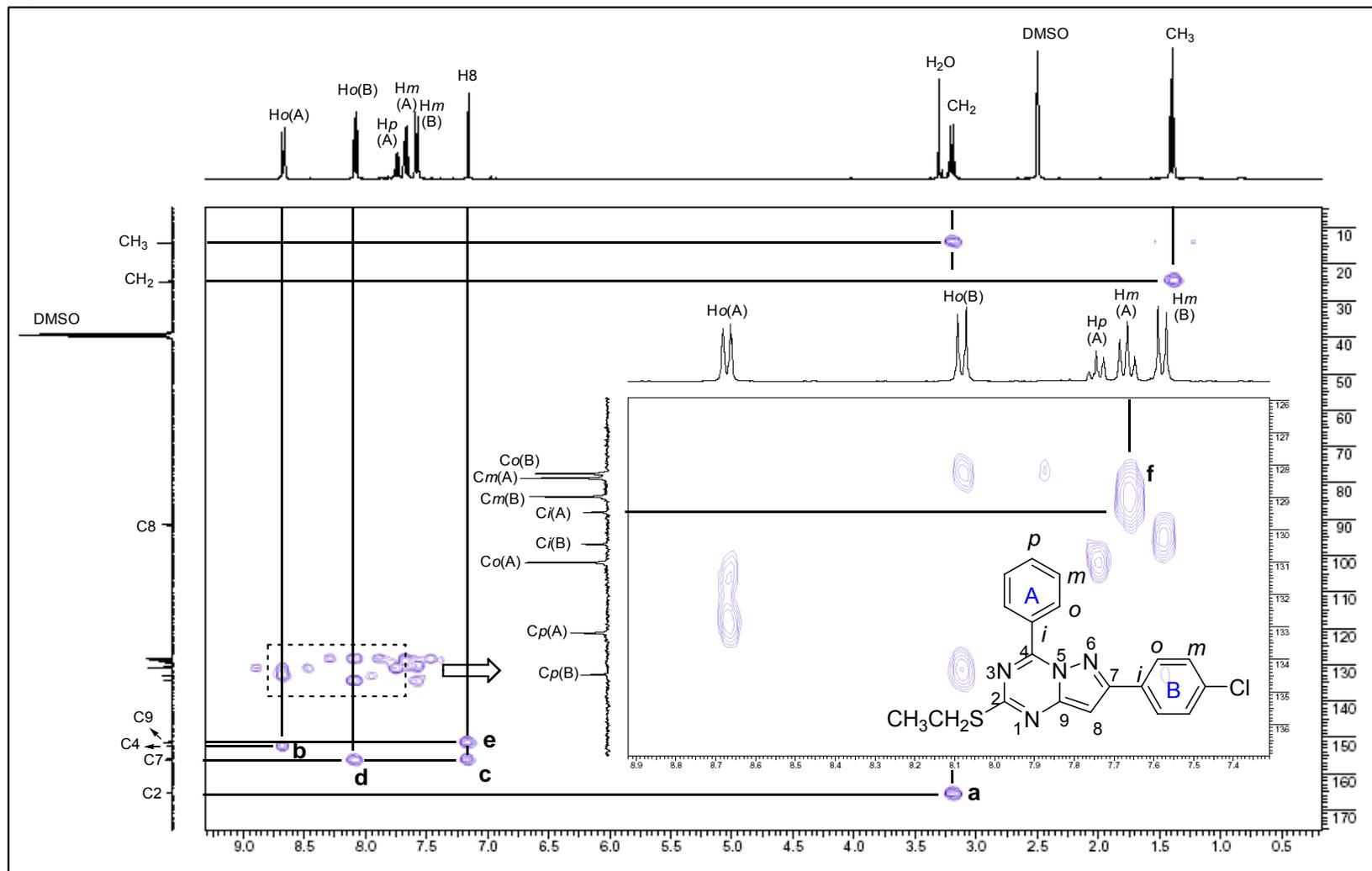


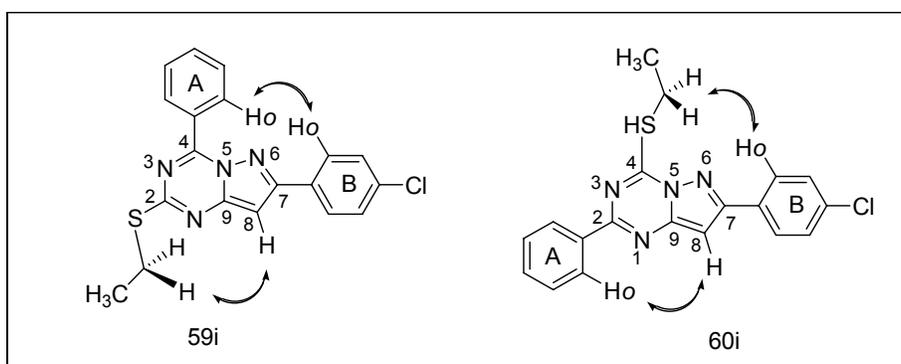
Tabla 6. Datos RMN ^{13}C (δ ppm) de los compuestos 59a-l, DMSO- d_6 , 400 MHz (TMS-estándar interno).

Carbono		Compuesto											
		59a	59b	59c	*59d	59e	59f	59g	*59h	59i	59j	59k	*59l
Grupo Tioetilo	CH ₃	13.4	13.6	14.1	14.1	14.2	14.2	14.2	14.1	14.2	13.3	14.0	13.2
	CH ₂	24.3	24.4	24.8	24.9	24.8	24.8	24.8	24.9	24.9	24.3	24.9	24.4
Sistema pirazolotriazínico	C-2	165.0	165.0	165.2	165.5	165.2	165.1	165.0	165.4	165.5	165.2	165.2	165.4
	C-4	151.7	151.7	151.1	152.0	152.2	151.8	150.9	151.9	152.3	151.6	150.8	151.4
	C-7	157.2	157.1	157.4	157.8	157.4	157.2	157.4	157.9	156.1	155.8	156.0	156.4
	C-8	90.7	90.7	91.5	92.1	91.2	91.0	91.2	91.8	91.6	90.7	91.5	91.4
	C-9	150.9	151.1	151.4	150.0	151.4	151.3	151.3	150.0	151.5	151.1	151.3	149.7
Anillo aromático A	<i>Ci</i>	129.1	126.3	128.3	(C1') 128.6	129.6	126.6	128.3	(C1') 128.6	129.5	126.2	128.3	(C1') 128.0
	<i>Co</i>	130.3	130.5	132.8	(C2') 133.2	131.0	131.0	132.8	(C2') 133.2	131.0	130.4	132.7	(C2') 132.8
	<i>Cm</i>	127.6	128.4	128.5	(C3') 132.8	128.4	128.9	128.5	(C3') 132.8	128.4	128.2	128.4	(C3') 132.0
	<i>Cp</i>	132.3	143.2	138.1	(C4') 136.8	133.1	143.7	138.1	(C4') 136.8	133.2	143.1	138.2	(C4') 136.4
	CH ₃	----	20.5	----	----	----	21.2	----	----	----	20.4	----	----
		----	----	----	(C5') 127.7	----	----	----	(C5') 127.7	----	----	----	(C5') 126.9
		----	----	----	(C6') 129.4	----	----	----	(C6') 129.4	----	----	----	(C6') 128.8
Anillo aromático B	<i>Ci</i>	131.3	131.4	131.4	131.3	128.8	128.8	128.6	128.5	130.5	130.2	130.2	129.9
	<i>Co</i>	126.1	126.1	126.6	126.6	126.5	126.4	126.5	126.5	128.3	127.7	128.1	127.7
	<i>Cm</i>	128.1	128.2	128.8	128.9	129.5	129.4	129.4	129.4	129.0	128.3	128.8	128.2
	<i>Cp</i>	128.9	129.0	129.8	129.9	139.5	139.4	139.5	139.6	134.5	134.0	134.5	134.1
	CH ₃	----	----	----	----	21.0	20.9	21.0	20.9	----	----	----	----

* En estos compuestos el anillo A, se numera de una forma diferente cuando poseen el sustituyente 2,4 diclorofenilo. (Mirar figura 15).

Las técnicas empleadas anteriormente, permitieron identificar que los productos obtenidos pertenecen al sistema pirazolotriazínico. Sin embargo, se debía establecer la posición que ocupan en la molécula el grupo tioetilo y el grupo fenilo, los cuales, pueden estar sobre los carbonos 2 y 4 de dos formas diferentes (regioisómeros 59i y 60i, Figura 19) y presentarían espectros similares en RMN ^1H y RMN ^{13}C . Para cumplir este objetivo fue necesario apoyarse en el experimento NOESY que indica la correlación entre hidrógenos que están cercanos, espacialmente, en la molécula.

Figura 19. Posibles regioisómeros de las pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas.

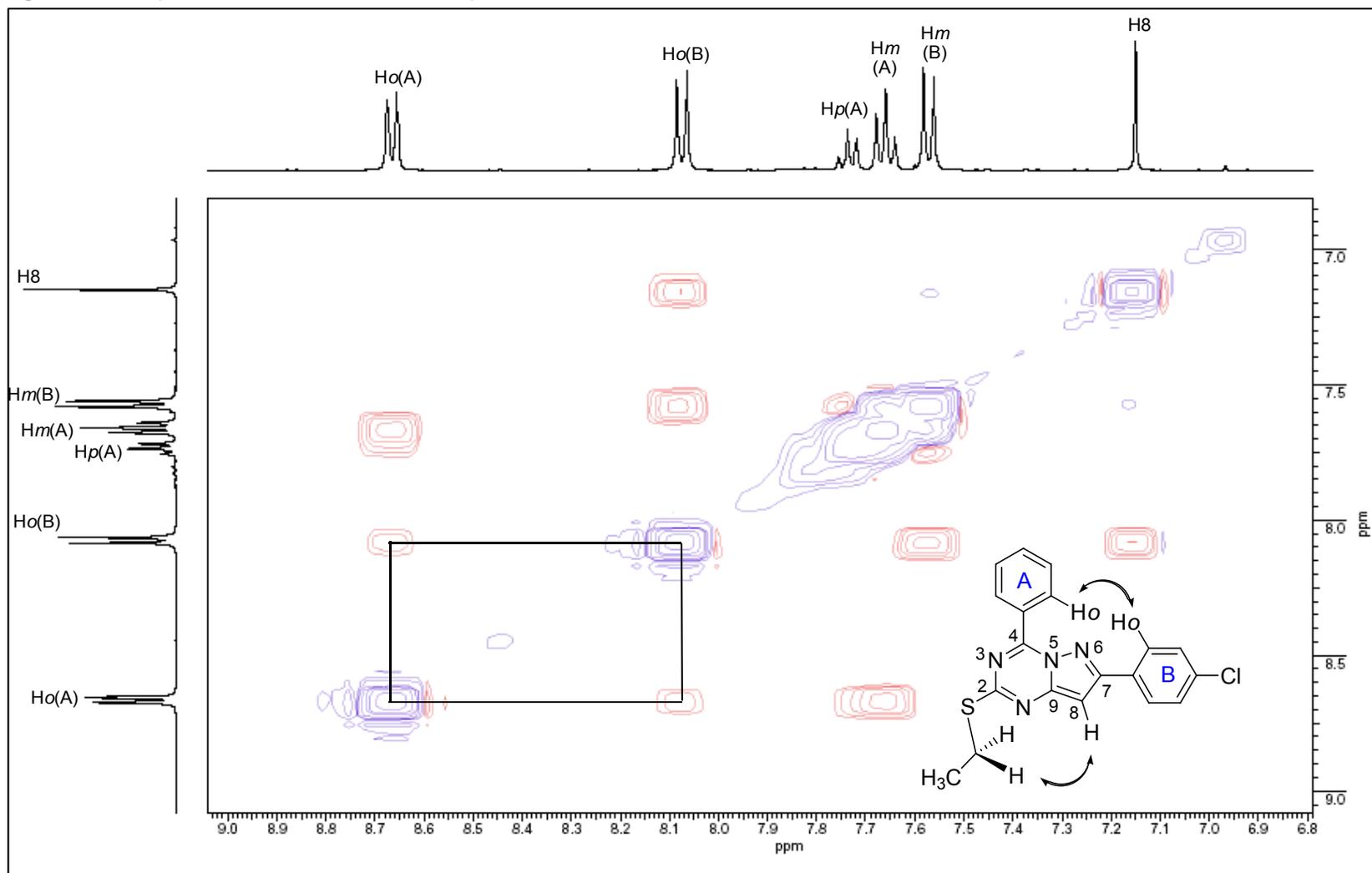


Las correlaciones esperadas en el experimento NOESY para el regioisómero 59i, serían dos. Una de ellas, entre los hidrógenos en posición *orto* del grupo fenilo (anillo A) y los hidrógenos en posición *orto* del grupo *p*-clorofenilo (anillo B) y otra, entre los hidrógenos del grupo tioetilo y el hidrógeno en posición ocho (H8).

Por otra parte, para el regioisómero 60i se esperarían dos correlaciones diferentes. Una, entre los hidrógenos *orto* del anillo A con el hidrógeno en posición ocho (H8) y otra, entre los hidrógenos del grupo tioetilo con los hidrógenos *orto* del anillo B.

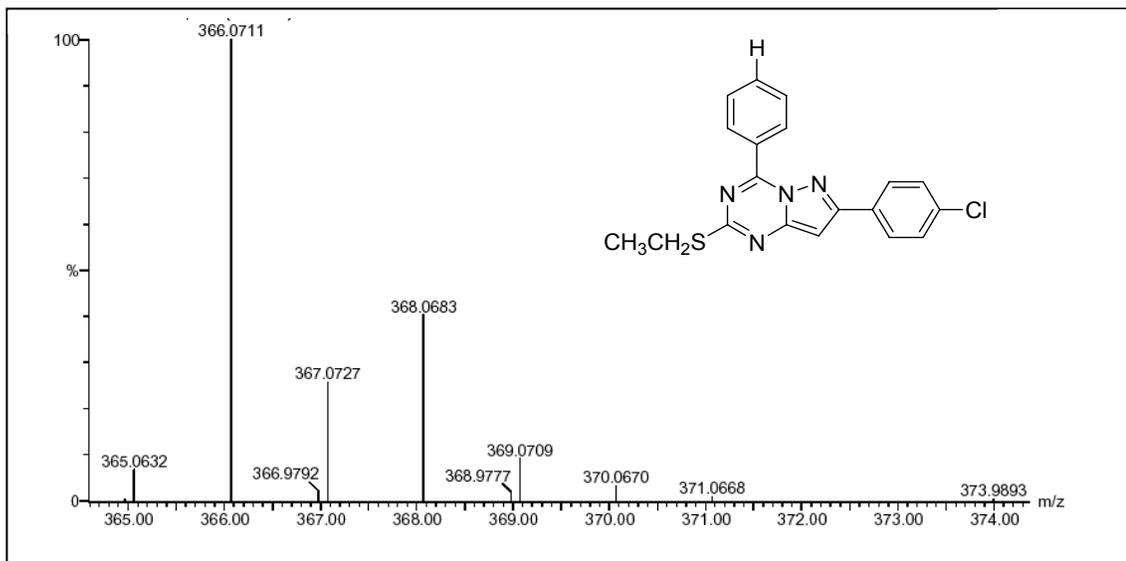
En el espectro NOESY (figura 20) se observa un pico cruzado entre los hidrógenos *orto* del anillo aromático A y los hidrógenos *orto* del anillo aromático B, correlación de gran importancia, que permitió concluir que el grupo fenilo (anillo A) se encuentra espacialmente cercano al grupo *p*-clorofenilo (anillo B), lo cuál, solo es posible en el regioisómero 59i, donde el grupo fenilo esta sobre el carbono cuatro (C4) y el grupo tioetilo sobre el carbono dos (C2). Las otras correlaciones esperadas tanto para 59i como para 60i no fueron observadas en el espectro NOESY.

Figura 20. Espectro de NOESY del compuesto 59i.



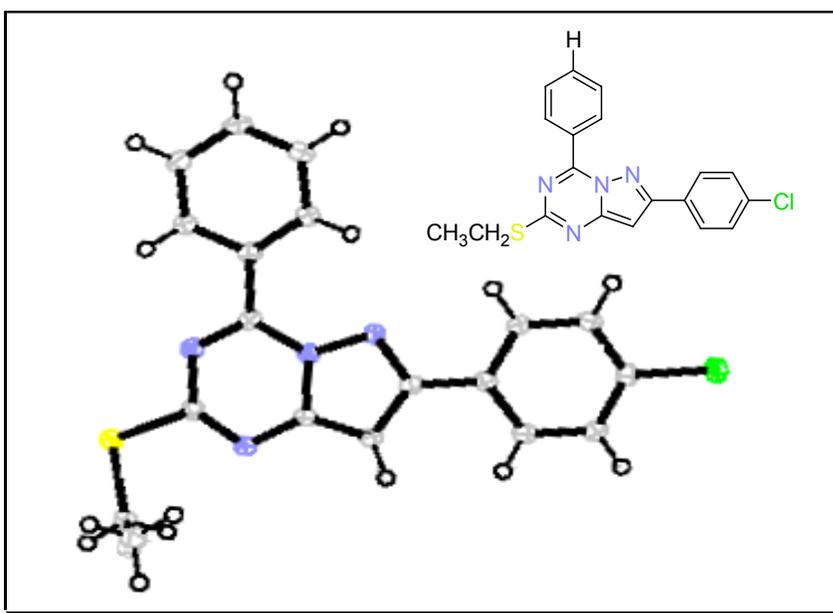
Además del análisis espectroscópico, la estructura del compuesto 59i se confirmó por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de masas (figura 21), se observa el ión molecular a $m/z = 366.07$, el cual concuerda con el peso molecular del compuesto.

Figura 21. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 59i.



Cabe resaltar que durante este estudio fue posible obtener cristales del producto 59i aptos para la DRX (figura 22), que corroboró la asignación de la estructura establecida con las técnicas anteriormente mencionadas.

Figura 22. Estructura molecular del producto 59i determinada por DRX.



Una vez determinada la estructura de las nuevas pirazolotriazinas se propuso aislar un intermedio no ciclado, que fuera estable, con el fin de caracterizarlo y así poseer evidencia experimental para postular la ruta de ciclación que condujo a los productos objetivo.

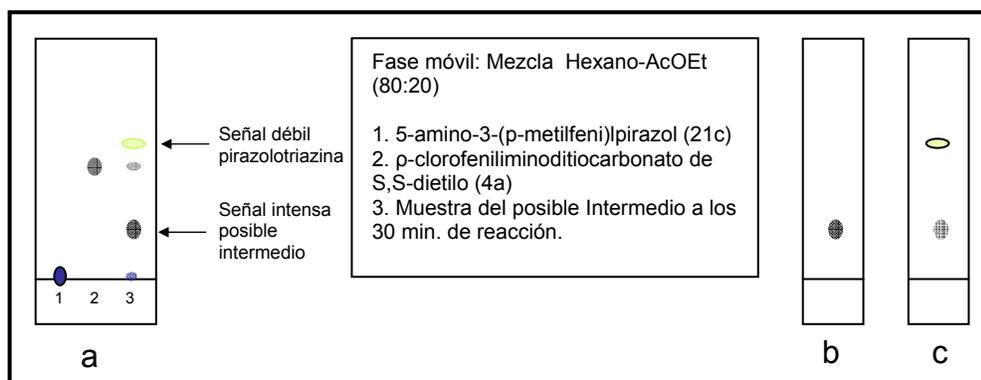
Para cumplir este fin, los materiales de partida se sometieron a diferentes condiciones de reacción como la irradiación con microondas, reduciendo la potencia y los tiempos de reacción. En este caso, la CCD, indicó que rápidamente se forma el producto luminiscente correspondiente al producto ciclado. Además, aparecen las señales de los precursores que no han reaccionado y una señal adicional muy débil que puede ser la de un intermedio, pero, debido a su baja proporción no se procedió a su aislamiento.

Por otra parte, se probaron condiciones en solución, tomando como precursores el carbonato 4a y el 5-aminopirazol 21c. Inicialmente, una mezcla de cantidades equimolares de estos compuestos se disolvieron en la mínima cantidad de DMF y se agitaron magnéticamente, a temperatura ambiente, durante 12 horas. La CCD indicó que los materiales de partida no reaccionaron.

Después, se realizaron otros ensayos usando acetonitrilo o etanol como solvente, pero esta vez, calentando la mezcla a la temperatura de ebullición del respectivo solvente. En los dos ensayos, se observó la formación de una señal nueva en la CCD, la cuál, está acompañada de otra de menor intensidad que corresponde al producto ciclado y dos señales más de los materiales de partida que no reaccionaron. La mezcla de reacción se calentó por treinta minutos, porque durante un tiempo más prolongado se intensificaba la señal luminiscente (producto ciclado) y disminuía la nueva señal no luminiscente, que probablemente es el intermedio de reacción (Figura 23a).

El nuevo producto se aisló por cromatografía de columna (Figura 23b) que corresponde a un sólido blanco, altamente reactivo porque en el transcurso de pocas horas este compuesto se tornó amarillo pálido y la CCD indicó que existen dos señales: la del supuesto intermedio y la del producto ciclado (Figura 23c), hecho que sumado a su baja solubilidad en CHCl_3 dificultó la caracterización por resonancia magnética nuclear.

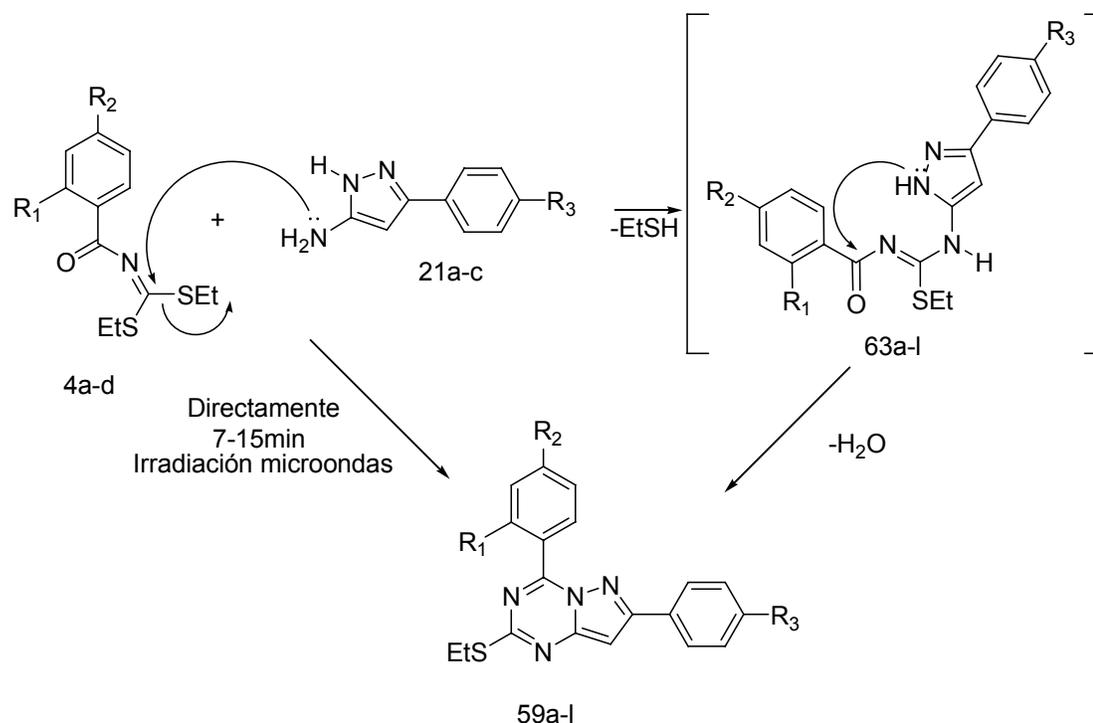
Figura 23. CCD. Comportamiento de la reacción y proceso de purificación del posible intermedio.



A pesar, de no haber caracterizado los intermedios de reacción se propone una posible ruta de ciclación que condujo a la formación de las nuevas pirazolotriazinas. Esta propuesta se realizó con base en la información espectroscópica de los productos finales y por el comportamiento químico de los precursores reportado en otros trabajos de investigación del GICH-UN.^{20,21}

El proceso de ciclación inicia con el ataque nucleofílico del grupo amino en posición 5 de los pirazoles 21a-c sobre el carbono imínico de los carbonatos 4a-d, ocasionando la eliminación de uno de los grupos tioetilo, en forma de etanotiol, para generar los intermedios 63a-l, y termina, con la ciclación intramolecular entre el grupo amino en posición 1 y el carbono del grupo carbonilo, eliminando una molécula de agua para dar origen a las nuevas pirazolotriazinas 59a-l (esquema 18).

Esquema 18. Posible ruta de ciclación para la obtención de las nuevas pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas.



La anterior aseveración es la más razonable si se parte del hecho de que el sitio más electrofílico de los carbonatos es el carbono imínico, lo cual, está ampliamente demostrado por nuestro grupo^{20,21} (Esquemas 7 y 8) y por otros autores^{9, 11, 24, 25} (Esquemas 3, 4, 11 y 12).

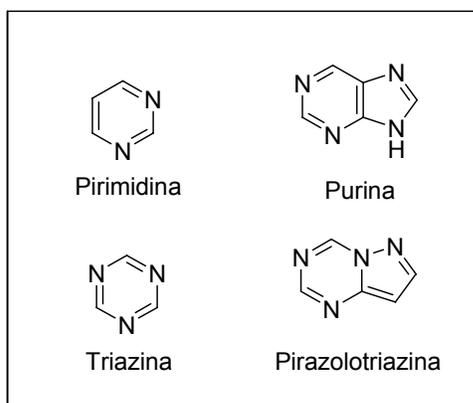
Esto indica que los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo son atacados por los 5-amino-3-arylpirazoles; inicialmente, a través del grupo amino en posición 5 (5-NH₂) y continuando su ataque por el grupo amino en posición 1 (1-NH). Dando lugar a la formación de los productos 59a-l, con la estructura establecida por las diferentes técnicas espectroscópicas y por DRX. En caso contrario, se formarían los productos 60a-l que fueron descartados durante el análisis espectroscópico.

4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y CITOTOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS OBJETIVO

Cabe resaltar, que las pruebas de actividad biológica, no se habían propuesto como uno de los objetivos del presente trabajo de grado. Pero, se incluyeron porque complementan el trabajo sintético propuesto originalmente. Además, hacen parte del continuo interés del Grupo de Investigación de Compuestos Heterocíclicos de la Universidad de Nariño, en probar la bioactividad de los compuestos sintetizados.

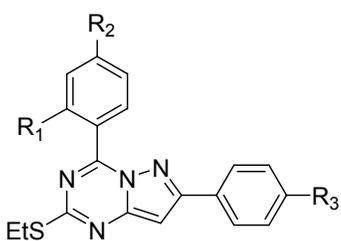
Se evaluó la actividad antiviral y citotoxicidad de ocho de los compuestos sintetizados (59c,e,f,h,i,j,k,l). Los cuales, se sometieron a ensayos *in vitro* con el fin de evaluar sus propiedades anti-VIH. Estos ensayos se realizaron debido a que muchos antivirales contienen anillos heterocíclicos como la pirimidina y la purina, análogos estructurales a las 1,3,5-triazinas y pirazolotriazinas (Figura 24).

Figura 24. Análogos estructurales. Las pirimidinas y purinas con las 1,3,5-triazinas y pirazolotriazinas.



Los análisis anti-VIH se realizaron en la Universidad de Kagoshima-Japón, en el Center for Chronic Viral Diseases, dirigido por el Dr. Masanori Baba, y los resultados se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de la actividad antiviral Anti-VIH y citotoxicidad.

					
COMPUESTO	R ₁	R ₂	R ₃	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
Control 1 (d4T)	---	---	---	0.0986	>10
Control 2 (Ed4T)	---	---	---	0.0354	>10
59c	H	Cl	H	>100	>100
59e	H	H	CH ₃	>100	>100
59f	H	CH ₃	CH ₃	>100	>100
59h	Cl	Cl	CH ₃	>100	>100
59i	H	H	Cl	>100	>100
59j	H	CH ₃	Cl	>100	>100
59k	H	Cl	Cl	>100	>100
59l	Cl	Cl	Cl	>100	>100

En estas pruebas se evaluaron los parámetros EC50 y CC50, utilizando células MT4, una línea celular linfoblástica, altamente susceptible a las cepas de VIH.

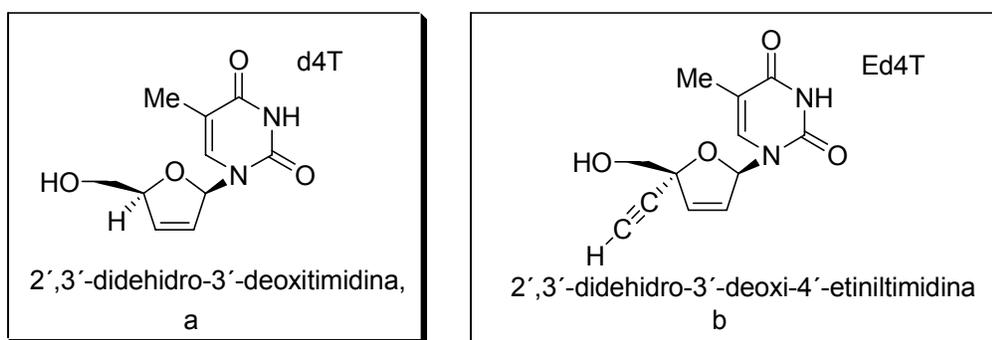
El CC50, representa la concentración del compuesto que resulta citotóxica para el 50% del número de células no tratadas, luego de 24 h de incubación a 37°C.

El EC50, representa la concentración del compuesto que induce una respuesta inhibitoria al 50%.

Un buen compuesto anti-VIH debe tener baja citotoxicidad y alta capacidad inhibitoria, es decir, un CC50 alto y un EC50 bajo. Por ejemplo, los compuestos d4T y Ed4T son buenos antivirales y por esta razón se emplearon como control en las pruebas. Sus valores de CC50 son mayores de 10 μM y de EC50 menores a 0.10 μM .

El compuesto d4T (2',3'-didehidro-3'-deoxitimidina, Figura 25a), se emplea actualmente en terapia antiviral de VIH-1, y el derivado de este compuesto, Ed4T (2',3'-didehidro-3'-deoxi-4'-etiniltimidina, Figura 25b), que es mucho más potente estará en el mercado en poco tiempo (este último, fue desarrollado en el Center for Chronic Viral Diseases, dirigido por el Dr. Masanori Baba³³).

Figura 25. Estructura de los compuestos control. d4T y Ed4T.



Las pirazolotriazinas probadas, mostraron un CC50 alto, mayor a 100 μM , por lo cual, se puede inferir que estos compuestos no son tóxicos para las células MT4 y por lo tanto, cumplen con una de las características de un buen antiviral.

Por otra parte, el valor de EC50 de las pirazolotriazinas es mayor a 100 μM . Este resultado muestra una actividad inhibitoria muy baja con relación a los compuestos control d4T y Ed4T. Esto implicaría que es necesario administrar altas dosis del compuesto en pacientes bajo terapia anti-VIH y lo que se busca es encontrar

³³ Haraguchi, K.; Takeda, S.; Tanaka, H.; Nitanda, T.; Baba, M.; Dutschman, G. E.; Cheng, Y.-C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003,13, 3775.

compuestos donde se minimice la dosis a administrar pero con el mismo o mejor efecto a los compuestos actualmente utilizados.

En conclusión, las pirazolotriazinas sintetizadas en el presente trabajo de investigación poseen una actividad anti-VIH muy baja.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 GENERALIDADES

Los materiales de partida de esta investigación, los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo y los 5-amino-3-arilpirazoles, fueron preparados en el laboratorio del GICH-UN, siguiendo metodologías ya reportadas en la literatura. Los reactivos y solventes necesarios para la obtención de los precursores fueron adquiridos comercialmente.

Las reacciones de los productos objetivo se llevaron a cabo fundiendo los materiales de partida en un horno microondas doméstico ELECTROLUX EME281-0-2SS con una potencia máxima del horno de 1400 W. El seguimiento de las mezclas de reacción se realizó mediante cromatografía de capa delgada (CCD) con placas de sílica gel con revelador UV-vis, empleando una lámpara manual UV-FISCHER con dos longitudes de onda, usando como fase móvil mezclas de acetato de etilo/hexano. Los productos finales son sólidos y su purificación se efectuó por cromatografía en columna usando sílica gel como fase estacionaria y mezclas de acetato de etilo/hexano como fase móvil. La concentración de las muestras se llevó a cabo en un equipo de evaporación a presión reducida, Rotaevaporador HEIDOLPH laborota 4001, y los puntos de fusión se determinaron mediante el método del tubo capilar (método del tubo de Thiele).

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) y de carbono trece (RMN ^{13}C) se tomaron a 25°C, usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y Dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, en un equipo BRUKER DPX operando a 400 MHz, del laboratorio de espectroscopía de la Universidad de Jaén-España.

Los espectros de masas se tomaron en un espectrómetro HEWLETT PACKARD HP ENGINE-5959 con introducción directa de la muestra en la cámara de ionización; en los laboratorios de espectroscopia de la Universidad Jaén-España.

La difracción de rayos X se realizó en un difractómetro *Kappa-CCD*, en los laboratorios de espectroscopia de las Universidades de Aberdeen y St Andrews-Escocia.

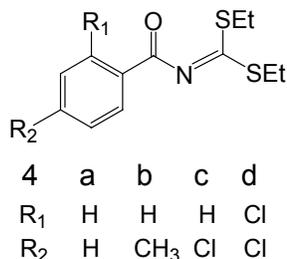
Las pruebas de actividad biológica se realizaron en la Universidad de Kagoshima-Japón, en el Center for Chronic Viral Diseases, dirigido por el Dr. Masanori Baba.

Todos estos análisis fueron posibles por el convenio que tiene el Grupo de Investigación de Compuestos Heterocíclicos de la Universidad de Nariño (GICH-UN) con el Grupo de Investigación de Compuestos Heterocíclicos de la

Universidad del Valle (GICH-UV) y a través de ellos, con los Grupos Internacionales.

5.2 OBTENCIÓN DE LOS PRECURSORES.

5.2.2 Preparación de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo.

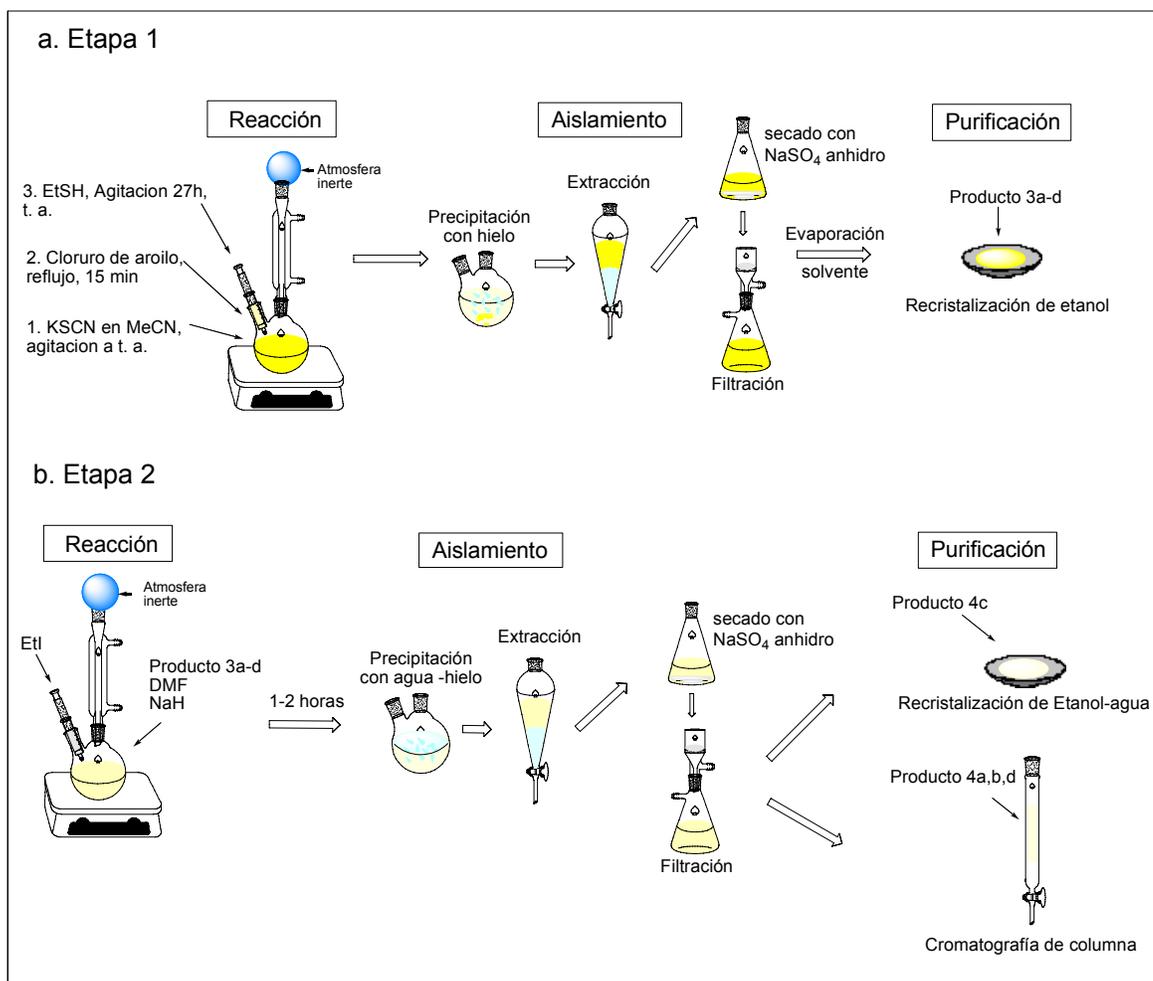


Los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo se prepararon en dos etapas, siguiendo la metodología estandarizada y reportada en otro trabajo de grado realizado en el Grupo de Investigación de Compuestos Heterocíclicos de la Universidad de Nariño.⁶

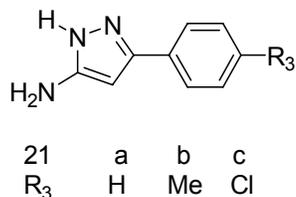
5.2.1.1 Etapa 1. Obtención de los aroiliminoditiocarbamatos de S-etilo (3a-d). A una solución de tiocianato de potasio seco (3.5 g, 0.036 mol) en acetonitrilo, (75 mL) se agregó gota a gota el respectivo cloruro de aroilo (1a-d) (0.43 mol), se calentó a reflujo en atmósfera inerte de gas propano durante 15 minutos, se dejó enfriar y se inyectó etanotiol (35 mL, 29.4 g, 0.47 mol) disuelto en acetonitrilo (20 mL). La mezcla de reacción se agitó magnéticamente a temperatura ambiente, durante 27 horas, tiempo después del cual se adicionó hielo triturado. El producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 mL), se secó con Na₂SO₄ y el solvente se evaporó a sequedad para obtener un sólido amarillo, que finalmente, se recrystalizó de etanol. Este proceso se ilustra en la figura 26a.

5.2.1.2 Etapa 2. Obtención de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-d). A una solución del correspondiente aroiliminoditiocarbamato de S-etilo (3a-d) (0.5 g, 2.2 x10⁻³ mol) en DMF (1 mL), se adicionó NaH (0.07 g, 2.9 x10⁻³ mol) con agitación constante durante 45 min, se agregó gota a gota yoduro de etilo (0.35 mL, 0.68g, 4,4x10⁻³ mol) y la mezcla se agitó por 1-2 horas. Luego, se adicionó agua-hielo a la mezcla de reacción y cada producto se extrajo con AcOEt (3 x 25 mL), se secó con Na₂SO₄ y finalmente, el solvente se evaporó a sequedad. Los productos 4a,b,d se purificaron por cromatografía de columna, usando silica gel como fase estacionaria y una mezcla de acetato de etilo-hexano (95:05) como fase móvil. El compuesto 4c se aisló adicionando agua fría al final de la reacción, luego se filtró y se recrystalizó de etanol-agua. La síntesis de 4a-d se ilustra en la figura Figura 26b.

Figura 26. Representación del proceso de preparación de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo (4a-d).



5.2.3 Preparación de los 5-amino-3-arilpirazoles.



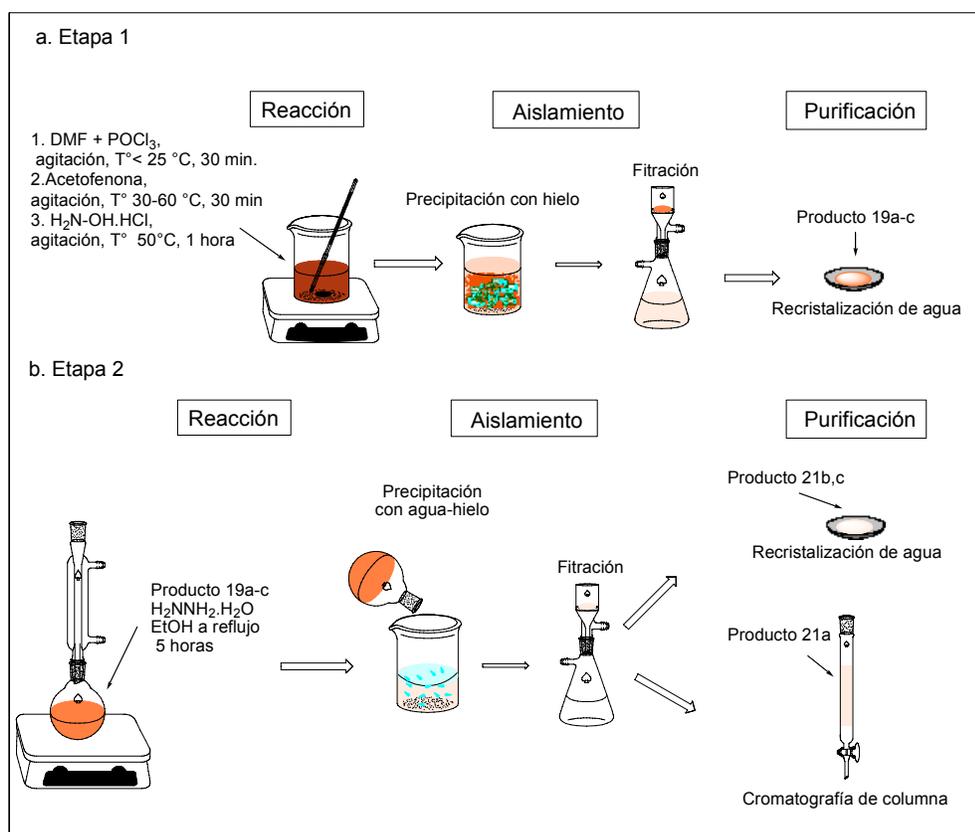
Los 5-amino-3-arilpirazoles se obtienen en dos etapas, siguiendo la metodología realizada por Hartmann y Liebscher.^{12,13}

5.2.2.1 Etapa 1. Obtención de los β-clorocinamonitrilos (19a-c). A 50 mL (0.6 mol) de dimetilformamida se adicionó gota a gota, con agitación y enfriamiento POCl₃ (20 mL, 0.2 mol), de tal manera que la temperatura de la mezcla no superó

los 25°C. Después de 30 minutos de reacción, se adicionó la respectiva acetofenona 16a-c (0.1 mol), manteniendo la temperatura entre 30-60°C. La mezcla se agitó por 30 minutos más y se agregó el hidrocloreto de hidroxilamina (3g, 0.04 mol). La mezcla se calentó a 50°C y manteniendo constante esta temperatura se adicionó, por porciones, más hidrocloreto de hidroxilamina (28 g, 0.4 mol) y se agitó durante una hora. Es importante mantener una buena agitación ya que en este punto la mezcla de reacción es muy densa. La solución resultante se vertió sobre hielo triturado y los nitrilos sólidos se filtraron y se recrystalizaron de agua. La síntesis de 19a-c, se ilustra en la figura 27a.

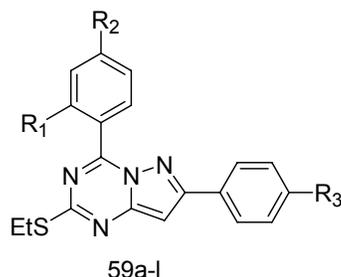
5.2.2.2 Etapa 2. Obtención de los 5-amino-3-arilpirazoles (21a-c). A una solución de hidrato de hidrazina (0.2 mol) se adicionó una mezcla del apropiado β-clorocinamonitrilo (19a-c) (0.1 mol) y etanol (50 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 5 horas. Luego, se enfrió y diluyó con agua-hielo (200 mL). El precipitado formado se filtró y se recrystalizó de agua para los productos 21b,c. El compuesto 21a se purificó por cromatografía de columna, utilizando silica gel como fase estacionaria y una mezcla de acetato de etilo-hexano (60:40) como fase móvil. La síntesis de 21a-c, se ilustra en la figura 27b.

Figura 27. Representación del proceso de preparación de los 5-amino-3-arilpirazoles (21a-c).



5.3 OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS OBJETIVO

5.3.1 Obtención de las pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas (59a-l) mediante irradiación con microondas.

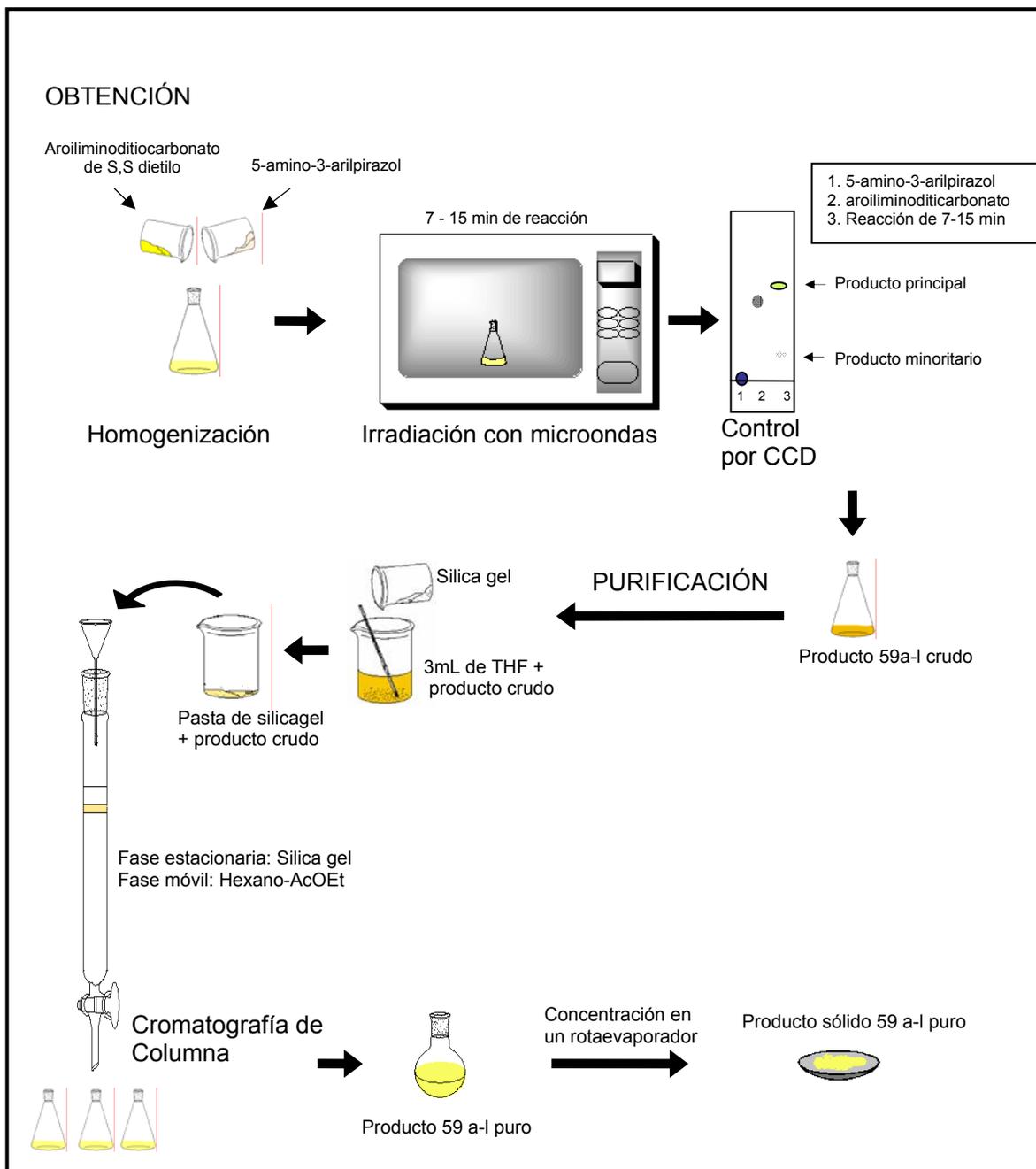


Cantidades equimolares del correspondiente 5-amino-3-arylpirazol 21a-c (0.0015 mol) y el apropiado aroiliminoditiocarbonato de S,S-dietilo 4a-d (0.0015 mol), se homogenizaron en un vial de vidrio pirex ó en un erlenmeyer de 25 mL y se sometieron a reacción entre 7-15 minutos, a la máxima potencia de un horno microondas casero (1400 W). La reacción se controló por CCD utilizando como fase móvil una mezcla de Hexano-AcOEt (95:05). El producto de cada reacción se purificó por cromatografía de columna de la siguiente manera: primero, se disolvió a temperatura ambiente en la mínima cantidad de THF (3 mL), se adicionó silica gel para formar una pasta, la cual se llevó a la columna cromatográfica (figura 28). La purificación de cada producto requirió una fase móvil diferente como se describe en la tabla 8.

Tabla 8. Fases móviles, empleadas en purificación de los productos 59a-l por CC.

Compuestos 59	Fase móvil. hexano:acetato de etilo V/V
a,b,c,d,f,g,j,l	95:05
e	90:10
h	75:25
i	80:20
k	70:30

Figura 28. Representación del proceso de obtención de las pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas (59a-l) mediante irradiación con microondas.



5.4 PRUEBAS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

- Compuestos de control. El compuesto d4T se adquirió comercialmente de Compañía SIGMA. El compuesto 4'-Ed4T fue sintetizado en la Universidad de Kagoshima-Japón, en el Center for Chronic Viral Diseases.³³ donde fueron realizadas las pruebas actividad biológica. Los pirazolotriazinas evaluadas, se disolvieron en DMSO a una concentración de 20 mM.

- Células y Virus. La línea celular MT-4 C8166 se mantuvo en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina G, y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células empleadas en todos los experimentos se encontraban en fase logarítmica de crecimiento. El virus VIH-1 (IIIB) es una cadena viral adaptada en el laboratorio y propagada en células MT-4.

- Procedimiento General para el ensayo de citotoxicidad (Ensayo MTT).³⁴ El ensayo MTT, es un procedimiento estándar empleado para determinar la citotoxicidad de potenciales agentes medicinales y otros materiales tóxicos. Consiste en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, un compuesto amarillo) a formazán (un compuesto violeta), por acción de la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial, proceso que se lleva a cabo en la mitocondria de las células vivas empleadas en el ensayo.

El ensayo MTT, permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (con un compuesto de prueba), midiendo la supervivencia y proliferación celular. Por lo tanto, La cantidad de células vivas, es proporcional a la cantidad de formazán producido, el cual, se determina de la siguiente forma. El producto reducido se disuelve en DMSO (dimetilsulfóxido) o en SDS (dodecil sulfato de sódico), para formar una solución coloreada, la cual, se lee en un espectrofotómetro, a una determinada longitud de onda (usualmente entre 500 y 600 nm).

Cuando la cantidad de formazan producido por las células tratadas con un compuesto de prueba, es comparada con la cantidad de formazan producido en células no tratadas (células de control), la efectividad del agente para causar muerte celular se puede deducir, a través de la producción de una curva de dosis-respuesta.

- Procedimiento General para el ensayo antiviral. La actividad anti-VIH de las pirazolotriazinas fue determinada por la inhibición de la citopatogenicidad inducida por el virus en las células MT4, siguiendo el método MTT. Las células MT4 (1×10^5 células/ml) fueron infectadas con VIH-1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.02 y fueron cultivadas en la presencia de varias concentraciones de los

³⁴ Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; De Clercq, E. *J. Virol. Methods*. 1988, 20, 309.

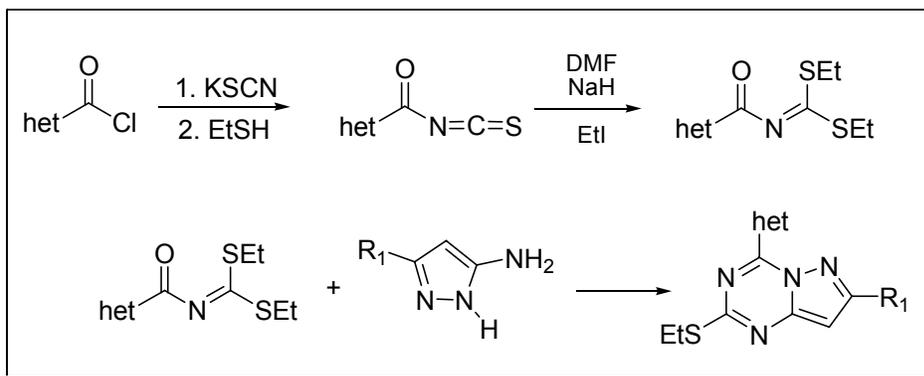
compuestos por duplicado (0, 0.16, 0.8, 4, 20 y 100 μ M). Después de 4 días de incubación a 37°C, en atmósfera húmeda al 5% de CO₂, el número de células viables (vivas) fue monitoreado por adición de 20 μ l del reactivo MTT (5 mg/ml en PBS), y luego incubadas a 37°C por 1 h. Las placas fueron leídas en un espectrofotómetro a 595 nm/630 nm (A595/630). La citotoxicidad de los compuestos fue evaluada en paralelo con la actividad antiviral, basada en la viabilidad de células mock-infectadas. La concentración citotóxica que causó la reducción de células viables al 50% (CC50) fue calculada de la curva de dosis-respuesta.

6. CONCLUSIONES

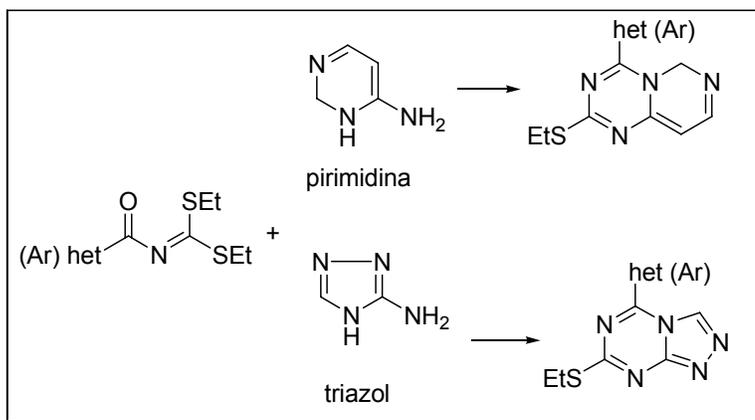
1. La reacción de ciclación entre los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo y los 5-amino-3-arilpirazoles usando irradiación con microondas, condujo a las nuevas 4,7-diaril-2-tioetilpirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas y no a sus posibles regioisómeros, las pirazolotriazinas 2,7-diarilsustituidas ó las pirazolo[3,4-d]pirimidinas.
2. Se demostró que la irradiación con microondas es una metodología eficiente, práctica y fácil para la síntesis de los nuevos derivados de las pirazolotriazinas, porque la interacción de los materiales de partida se lleva a cabo en pocos minutos, en un solo paso, con alta regioselectividad y con buenos rendimientos (58-73%).
3. Se estableció que la máxima potencia del horno microondas doméstico (1400 W) y tiempos de reacción de 7 a 15 minutos, son las condiciones óptimas de reacción para la obtención de los sistemas pirazolotriazinicos.
4. El análisis espectroscópico permitió establecer que la ruta de ciclación para la obtención de las nuevas pirazolotriazinas inicia con el ataque nucleofílico del grupo amino en posición 5 de los 5-amino-3-arilpirazoles sobre el carbono imínico de los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo, ocasionando la eliminación de uno de los grupos tioetilo, en forma de etanotiol, y termina, con la ciclación intramolecular entre el grupo amino en posición 1 y el carbono del grupo carbonilo, eliminando una molécula de agua para dar origen a las nuevas pirazolotriazinas.
5. Con base en los valores de los parámetros EC50 y CC50, obtenidos en la pruebas anti-VIH de ocho pirazolotriazinas, se estableció que estos compuestos poseen una baja actividad antiviral.
6. Se sintetizaron en total doce compuestos nuevos cuyas propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas se reportarán en un artículo que será sometido a publicación en la revista internacional *Tetrahedron Letters*.
7. La difracción de rayos X de tres compuestos de la serie, permitieron corroborar la estructura asignada a las nuevas pirazolotriazinas y estas propiedades cristalográficas originaron un manuscrito que fue aceptado para publicación en la Revista Internacional *Acta Crystallographica*, Sección E.

7. RECOMENDACIONES

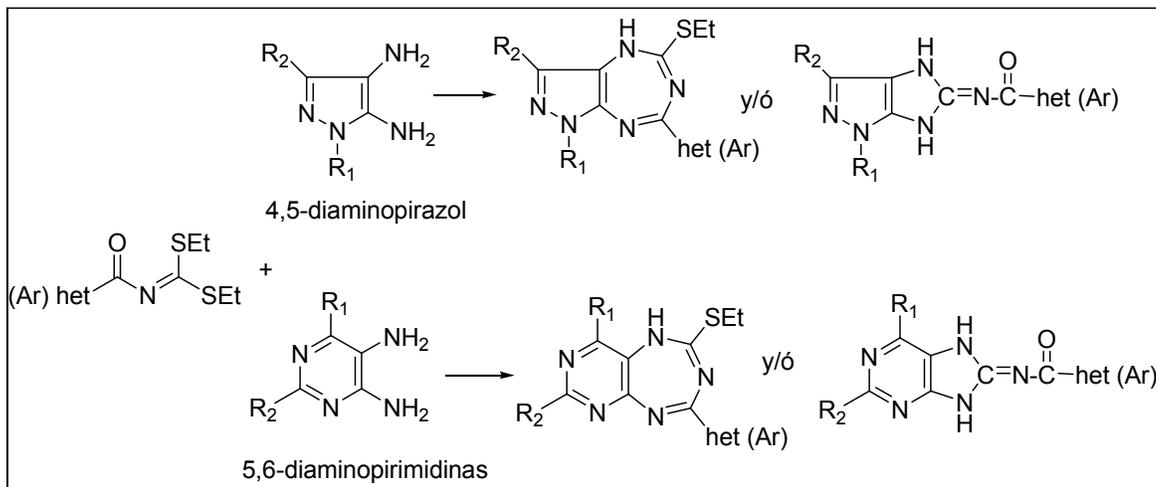
- Explorar la síntesis de otras pirazolotriazinas usando la metodología vía microondas, por interacción de ditiocarbonatos que contengan un anillo heterocíclico, en lugar de un anillo bencénico ó grupo arilo con 5-aminopirazoles, porque estos fragmentos pueden incrementar la bioactividad del sistema pirazolotriazínico.



- Aplicar este método para obtener otras 1,3,5-triazinas fusionadas a diferentes anillos heterocíclicos, reemplazando los 5-aminopirazoles por otras monoaminas como la 4-amino-2,3-dihidropirimidina o el 3-amino-4*H*-1,2,4-triazol.



- Explorar la síntesis de otros sistemas bicíclicos, por reacción de aroiliminoditiocarbonatos con orto-diaminas heterocíclicas, como el 4,5-diaminopirazol ó las 5,6-diaminopirimidinas.



BIBLIOGRAFIA

- AUGUSTÍN, M.; RICHTER, M.; SALAS, S. *J. Prakt. Chem.* 1980, 322, 55.
- BÖS, M.; RIEMER, C.; STADLER, H. *Patente Estadounidense*; 6,194,410 B1; 2001.
- BURBANO, V.; GARCÍA, N. Síntesis de nuevas pirazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinas amino-funcionalizadas, por reacción de con 5-amino-3-metilpirazol con las 1-(*p*-clorobenzoil)-2-etilisotiureas 3,3 disustituidas., San Juan de Pasto, 2006, 74 p. Trabajo de grado. Universidad de Nariño.
- CAPUANO, L.; SCHREPTER, H. J. *Chem. Ber.* 1971,104, 3039.
- CHECA, C.; LAGOS, Y. Evaluación de las interacciones del 5-amino-1-fenil-3-metilpirazol con los isotiocianatos de aroilo y con los aroiliminoditiocarbonatos de S,S-dietilo. San Juan de Pasto, 2005, 99 p. Trabajo de grado. Universidad de Nariño.
- CHECCHI, S.; RIDI, M. *Gazz. Chim. Ital.* 1957; 87, 597.
- DARROW, J. W.; DE LOMBAERT, S.; BLUM, C.; TRAN, J.; GIANGIORDANO, M.; GRIFFITH, D. A.; CARPINO, P. A. *Patente Estadounidense*; 6,476,038 B1; 2002.
- DIAZ, A.; CARRILLO, J.; COSSIO, F.; GOMEZ, M.; DE LA HOZ, A.; MORENO, A.; PRIETO, P. *Tetrahedron Lett.* 2000, 56, 1569.
- DIXON, A. *J. Chem. Soc.* 1899, 75, 375.
- ELGEMEIE, G. H.; EL-EZBAWY, S. R.; EL-AZIZ, H. A. *Synth. Commun.* 2001, 31, 3453.
- ELMORE, D. T.; OGLE, J. R.; FLETCHER, W.; TOSELAND, P. A. *J. Chem. Soc.* 1956, 4458.
- GEDYE, R.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, H.; BALDISERA, L.; LABERGE, L.; ROUSELL, J. *Tetrahedron Lett.* 1986, 27,279.
- H.E. BLACKWELL, *Org. Biomol. Chem.* 2003, 1, 1251.
- HARAGUCHI, K.; TAKEDA, S.; TANAKA, H.; NITANDA, T.; BABA, M.; DUTSCHMAN, G. E.; Cheng, Y.-C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003,13, 3775.

HARTMANN, H; LIEBSCHER, J. *Synthesis*, 1984, 276.

HERAVI, N.; RAJABZADEH, G.; BAMOHARRAM, F.; SEIFI, N. *J Mol. Catalysis*, 2006, 256, 238.

INSUASTY, H.; ESTRADA, M.; CORTES, E.; QUIROGA, J.; INSUASTY, B.; ABONIA, R.; NOGUERAS, M.; COBO, J. *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 5441.

KIM, S.H.; MOREAU, J. P. *Patente Estadounidense*; 4,565,815; 1986.

KOBE, J.; ROBINS, R. K.; O'BRIEN, D. E. *J. Heterocycl. Chem.* 1974, 11, 199.

KRISTIAN P.; KUTSCHY P.; DZURILLA M. *Collection Czechoslov Chem. Commun.* 1979, 44, 1324.

LANGA, F.; DE LA CRUZ, P.; DE LA HOZ, A.; DIAZ-ORTIZ, A.; DIEZ-BARRA, E. *Contemporary Org. Synth.*, 1997, 373.

LIEBSCHER, J; HARTMANN, H; NEUMANN, B. *J. Prakt. Chem.* 1983, 325, 915.

NASH, B. W.; NEWBERRY, R. A.; PICKLES, R.; WARBURTON, W. K. *J. Chem. Soc. (C)*, 1969, 2794.

PAUL, S.; GUPTA, M.; GUPTA, R.; LOUPY, A. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 3827.

PAUWELS, R.; BALZARINI, J.; BABA, M.; SNOECK, R.; SCHOLS, D.; HERDEWIJN, P.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ, E. *J. Virol. Methods.* 1988, 20, 309.

QUIROGA, J.; CRUZ, S.; INSUASTY, B.; ABONÍA, R. *Heterocyclic Commun.* 2000,6, 275.

RABOISSON, P.; SCHULTZ, D.; LUGNIER, C.; MATHIEU, R.; BOURGUIGNON, J.J.; *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 703.

RIED, W.; ABOUL-FETOUH, S. *Tetrahedron*; 1988; 44,7155.

ROONEY, S. S.; WILLIAMS, H.W.R. *Patente Estadounidense*; 3,995,039; 1976.

SATO, M.; FUKADA, N.; KURAUCHI, M.; TAKESHIMA, T. *Synthesis* 1981, 554.

WHEELER, H. L.; BEARDSLEY, A. P. *Am. Chem. J.* 1902, 27, 257.

WHEELER, H. L.; BEARDSLEY, A. P. *Am. Chem. J.* 1903, 29, 73.

WHEELER, H. L.; JOHNSON, T. B. *Am. Chem. J.* 1901, 26, 185.

WHEELER, H. L.; MERRIAM, H. F. *J. Am. Chem. Soc.* 1901, 23, 283.