

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Ciencias Farmacéuticas



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE
ALQUILPURINAS Y OTROS
SISTEMAS HETEROCÍCLICOS RELACIONADOS

TESIS DOCTORAL

ELENA VALLES MARTÍN

2016

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la
Universidad de Salamanca por:

Elena Valles Martín

Vº Bº

Profesor Dr. Manuel Medarde Agustín

Director del Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Los Doctores del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca Dña. M^a Ángeles Castro González, D. José M^a Miguel del Corral Santana y D. Pablo Anselmo García García

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**Síntesis y evaluación citotóxica de alquilpurinas y otros sistemas heterocíclicos relacionados**”, presentado por la Graduada en Farmacia **D^a Elena Valles Martín**, ha sido realizado bajo su dirección en el departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firman el presente certificado.

En Salamanca, Junio de 2016.

Fdo.: M^a Ángeles Castro

Fdo.: José M^a Miguel del Corral

Fdo.: Pablo A. García

La financiación de la investigación realizada en este trabajo de Tesis Doctoral ha procedido de los siguientes proyectos de investigación:

- Diseño de nuevas estrategias para el transporte y funcionalización de nuevos citotóxicos. Universidad de Salamanca, 2014 (18KAQD).
- Química para el diseño y desarrollo de nuevas estrategias de transporte y funcionalización de nuevos citotóxicos. Universidad de Salamanca, 2013 (KAS7).

Su realización ha sido posible gracias a la concesión de una Ayuda de Formación de Personal Investigador de reciente titulación universitaria de la Junta de Castilla y León cofinanciada por el Fondo Social Europeo (2011-2015).

*... We are made up of thousands of others.
Everyone who has ever done a kind deed for us,
or spoken one word of encouragement to us,
has entered into the make-up of our character and of our thoughts,
as well as our success.*

(George Matthew Adams)

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que han sustentado esa parte vital de una tesis que no llega a plasmarse en resultados, pero que considero imprescindible para llevar a cabo un trabajo de esta índole. Espero que estas palabras esbocen al menos el cariño que pretendo transmitir.

Esta aventura comenzó poco después de finalizar la carrera universitaria, perteneciendo a la primera promoción de Graduados en Farmacia de España, lo cual me permitió adentrarme en el mundo de la investigación y enlazar así con esta etapa difícil de olvidar. Muchas han sido las horas de dedicación y esfuerzo, a veces no fácil de entender, y las dificultades superadas para que todo el trabajo cristalice y llegue así a su punto álgido.

A la cabeza se encuentran mis directores, M^a Ángeles, Jose Mari y Pablo, sin los que esto no hubiera sido posible. Juntos me han enseñado una disciplina y me han guiado en el camino de la investigación y la docencia, imprimiendo su sello en mi trayectoria profesional y personal, especialmente cuando el final de esta etapa coincide a su vez con el final de la etapa universitaria para uno de ellos.

En la recta final de la investigación, he conocido a alguien que, por encima del currículum que le avala, es una persona cercana y que ha compartido conmigo su experiencia y su grupo de trabajo, la Dra. Isabel C. F. R. Ferreira. Me gustaría agradecerla a ella y a todo su equipo la acogida que tuve en tierras portuguesas y en especial al Dr. Ricardo Calhelha por ilustrarme en citotoxicidad. *Muito obrigado!*

Al resto de profesores del área de Química Farmacéutica, por su interés en el desarrollo de las distintas fases de este proyecto. A Ricardo por estar siempre dispuesto a ayudar y a Constan y Rosa por su servicialidad y escucha ante cualquier circunstancia.

A los Servicios Generales de RMN, Anna Lithgow, y de espectroscopía de masas, César A. Raposo, de la USAL por participar científicamente en este trabajo.

Una parte fundamental son mis compañeros de laboratorio, en especial Angie, con quien he compartido el grueso de este periodo, gracias por estar siempre conmigo en las batallas, ya sean químicas o no. A Laura y Younes por ser buenos compañeros, porque una

tesis una mucho y estos años siempre los recordaremos. A Carmen por los inicios tan dicharacheros y a Katarzyna (Kasia) por su contribución a que este trabajo merezca realmente una Mención Internacional.

A mis amigas de Salamanca Eva, Hinojal, Patri y Vane, por sus consejos y por entender mis ausencias. A Hinojal además, por las hazañas compartidas en terrenos doctorales. A mis extremeñas Mamen, Fati y Ana por hacer *cónclave* en los momentos necesarios y estar siempre pendientes para reír los buenos y realzar los malos.

A mis boticarias Salvia, Nuria, Isabel y Patricia por ayudarme a sobrellevar los momentos difíciles y mantenerme al día de la relación farmacéutico-paciente desde la botica.

A mis amigas de Valladolid María, Rocío, Raquel y Carmen por transmitirme siempre su confianza en mí desde las distintas localizaciones e impulsarme ante cualquier reto.

A Luis y M^a José, por su interés en la evolución de este período y por animarme a seguir adelante en todo momento.

De una manera especial a Jonatan, por permanecer en las luces y sombras y confiar en mí, siendo mi apoyo incondicional.

Y, como norte de cada una de las actividades de mi vida, mi familia. A mi hermano Alfonso y Margarita por estar conmigo en los momentos cumbre. Y a mis padres V. Fátima y José María, por apoyar todas y cada una de mis decisiones e ilusionarse conmigo en cada proyecto. Gracias a ellos he aprendido que la constancia y el esfuerzo siempre dan resultados satisfactorios. Porque a pesar de que las siguientes páginas resulten incomprensibles, habéis comprendido perfectamente todo lo que hay detrás de ellas.

*A los autores de mis días,
mis padres.*

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

	Pág.
ABREVIATURAS Y SIGLAS	13
RESUMEN Y ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	19
1. EL SISTEMA DE PURINA EN LA NATURALEZA	23
2. PURINAS ALQUILADAS CON GRUPOS METILO EN N-1, N-3, N-7 Y N-9	29
3. ADENINAS DIFERENTEMENTE ALQUILADAS	35
4. SÍNTESIS Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE ALQUILPURINAS	48
INTRODUCTION SUMMARY	57
OBJETIVOS	69
OBJECTIVES	75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
A. PREPARACIÓN DE ALQUILPURINAS	83
A.1. Obtención de 7/9-alkil-6-cloropurinas	84
A.2. Obtención de N ⁶ -alkiladeninas	93
B. OBTENCIÓN SELECTIVA DE 7-ALQUILPURINAS	99
B.1. Obtención de 5-alkilamino-4,6-dicloropirimidinas	99
B.2. Obtención de 5-alkilamino-4-amino-6-cloropirimidinas	102
B.3. Formación del sistema purínico	110
C. SÍNTESIS DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS RELACIONADOS CON PURINAS	112
C.1. Aproximación a la síntesis de diazepinopurinas	112
C.2. Obtención de otros sistemas heterocíclicos	121
D. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	130
RESULTS AND DISCUSSION: CYTOTOXICITY ASSAYS	141

PARTE EXPERIMENTAL	153
TÉCNICAS GENERALES	155
A. PREPARACIÓN DE ALQUILPURINAS	159
A.1. Obtención de 7/9-alkil-6-cloropurinas	159
A.2. Obtención de N ⁶ -alkiladeninas	168
B. OBTENCIÓN SELECTIVA DE 7-ALQUILPURINAS	176
B.1. Obtención de 5-alkilamino-4,6-dicloropirimidinas	176
B.2. Obtención de 5-alkilamino-4-amino-6-cloropirimidinas	178
B.3. Formación del sistema purínico	189
C. SÍNTESIS DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS RELACIONADOS CON PURINAS	193
C.1. Aproximación a la síntesis de diazepinopurinas	193
C.2. Obtención de otros sistemas heterocíclicos	200
D. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	210
EXPERIMENTAL PART: CYTOTOXICITY ASSAYS	217
CONCLUSIONES	225
CONCLUSIONS	229
ESPECTROSCOPIA	233
TABLAS	235
ESPECTROS	255
ESTRUCTURAS	299

ABREVIATURAS Y SIGLAS

Ac ₂ O:	anhídrido acético
AcOEt:	acetato de etilo
ADN/DNA:	ácido desoxirribonucleico
ARN/RNA:	ácido ribonucleico
<i>n</i> -BuOH:	<i>n</i> -butanol
CCP:	clorocromato de piridinio
CI ₅₀ :	concentración que inhibe el 50 % del crecimiento celular
<i>d</i> :	doblete
DBU:	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DIPEA:	diisopropiletilamina
DMAP:	4-dimetilaminopiridina
DMC:	carbonato de dimetilo
DMEM:	medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMF:	<i>N, N</i> -dimetilformamida
EtOH:	etanol
HMBC:	heteronuclear multiple bond connectivity
HMQC:	heteronuclear multiple quantum coherence
HRMS:	espectro de masas de alta resolución
<i>i</i> -PrOH:	isopropanol
IR:	infrarrojo
<i>J</i> :	constante de acoplamiento
<i>m</i> :	multiplete
m.c.:	mezcla compleja
MeOH:	metanol
MW:	microondas
Ph:	fenilo
Ph ₃ P:	trifenilfosfina
R:	radical
RMN ¹ H/ ¹³ C:	resonancia magnética nuclear de protón/ carbono 13
RPMI-1640:	medio de cultivo (Roswell Park Memorial Institute)
<i>s</i> :	singlete
<i>t</i> :	tiempo

t :	triplete
T^a :	temperatura
T.a.:	temperatura ambiente
t -BuMeO:	<i>tert</i> -butilmetil éter
TFA:	ácido trifluoroacético
THF:	tetrahidrofurano
TMSCHN ₂ :	trimetilsilildiazometano
UV:	ultravioleta
δ :	desplazamiento químico
λ :	longitud de onda
$\nu_{\text{máx}}$:	número de onda de máxima vibración
Δ :	temperatura de reflujo

RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN

La purina es uno de los sistemas heterocíclicos más conocidos de la naturaleza al formar parte de importantes metabolitos tanto primarios como secundarios. Entre ellos se pueden mencionar asmarinas y agelasiminas, productos naturales de origen marino con estructura de terpenilpurina que presentan propiedades citotóxicas muy interesantes, pero se aíslan en pequeñas cantidades de sus fuentes naturales, por lo que resulta de gran interés la preparación de análogos de origen sintético o semisintético. Estos metabolitos secundarios marinos han motivado una línea de investigación dedicada al diseño y preparación de nuevas terpenilpurinas como agentes anticancerosos.

En este trabajo de Tesis Doctoral se aborda la preparación de derivados purínicos alquilados en las posiciones N-9 y N-7. Así mismo, se ha optimizado la preparación selectiva de las 7-alkilpurinas a partir de pirimidinas, utilizando tanto procedimientos de alquilación con derivados halogenados como reacciones de aminación reductora de aldehídos α,β -insaturados. Ambos tipos de reactivos, derivados halogenados y aldehídos, pueden adquirirse comercialmente u obtenerse a partir de diterpenoides naturales como el ácido cuprésico (aislado y purificado a partir de las arcéstidas de *Cupressus sempervirens* L.). Las alquilpirimidinas obtenidas se han transformado en las correspondientes 7-alkilpurinas mediante ciclación con ortoformiato de trietilo. Además, se han obtenido purinas funcionalizadas tanto en N-7 como en N⁶ que son precursores adecuados para la preparación del sistema de diazepinopurina presente en asmarinas. Por otro lado, se ha llevado a cabo la preparación de otros sistemas heterocíclicos derivados de oxazepina por condensación en un solo paso de pirimidinas, alquil/arilaminas y aldehídos salicílicos.

La mayor parte de los compuestos han sido evaluados como citotóxicos frente a varias líneas celulares tumorales humanas (NCI-H460, HeLa, HepG2 y MCF-7) y frente a una línea no tumoral (PLP2). Esto ha permitido establecer conclusiones de relación estructura-actividad para determinar los fragmentos estructurales necesarios para la actividad biológica de estos compuestos, siendo los más potentes aquellos que presentan un grupo diterpenilo unido a la purina, de forma análoga a las diterpenilpurinas naturales de origen marino.

ABSTRACT

Purine is one of the best-known heterocyclic systems in Nature being part of many primary and secondary metabolites. Among them, it can be mentioned asmarines and agelasimines, which are marine natural products with a terpenylpurine structure and with very interesting cytotoxic properties, but they are isolated in small quantities from their natural sources, so the preparation of synthetic or semisynthetic analogues is of great interest. These marine secondary metabolites have motivated a research line dedicated to the design and development of new terpenylpurines as anticancer agents.

Thus, purine derivatives alkylated at the N-9 and N-7 positions have been prepared in this Thesis work. Likewise, selective preparation of 7-alkylpurines from pyrimidines has been optimized, using either alkylation procedures with halogenated derivatives or reductive amination reactions of α,β -unsaturated aldehydes. Both type of reagents, alkyl halides and aldehydes, were commercially available or obtained from natural diterpene derivatives as cupressic acid (isolated and purified from cones of *Cupressus sempervirens* L.). The alkylated pyrimidines obtained were converted into the corresponding 7-alkylpurines by cyclization with triethyl orthoformate. Both N-7 and N⁶ functionalized purines have also been obtained, which are suitable precursors for the preparation of the diazepinopurine system present in asmarines. Additionally, it has been carried out the preparation of other heterocyclic systems with an oxazepine ring by one pot condensation of pyrimidines, alkyl/arylamines and salicylic aldehydes.

Most of the compounds have been evaluated as cytotoxics against several human tumour cell lines (NCI-H460, HeLa, HepG2 and MCF-7) and against a non-tumour line (PLP2), allowing to draw conclusions of structure-activity relationship to determine the structural fragments needed for the biological activity of these compounds.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos naturales han sido una importante fuente de agentes útiles en el campo de la medicina y en el desarrollo de fármacos. Una elevada proporción de los fármacos que se comercializan tienen su origen en compuestos naturales aislados de plantas y organismos terrestres.¹

Sin embargo, el mar, que constituye las dos terceras partes de nuestro planeta, es una fuente de compuestos naturales relativamente inexplorada, que ofrece un potencial importante de moléculas de interés en diferentes áreas terapéuticas.²

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el porcentaje de moléculas activas que se encuentran en organismos marinos como esponjas, tunicados o algas, es superior al que se obtiene en muestras de origen terrestre. Además poseen estructuras muy variadas, relativamente poco frecuentes y con posibilidad de presentar nuevos mecanismos de acción para el descubrimiento de fármacos.³

El aumento de interés por los productos naturales de origen marino en las últimas décadas se debe no solo a la diversidad química de los compuestos aislados sino también a

¹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.

² Skropeta, D.; Wei, L. Recent advances in deep-sea natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 999-1025.

³ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 382-431.

la diversidad de sus fuentes donde se incluyen un gran número de especies vegetales, animales y microorganismos diferentes a los terrestres.³

De los numerosos compuestos que cada año se identifican procedentes del medio marino, hemos centrado nuestra atención en compuestos formados por una unidad de purina funcionalizada con diferentes cadenas alquílicas de distinto tamaño; quizá las más frecuentes en organismos marinos sean cadenas de naturaleza terpénica unidas a restos de adenina para los que se han descrito una gran variedad de propiedades biológicas, entre ellas citotóxicas.⁴ Son de particular interés para el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer ya que, a pesar de los avances en el campo de la medicina durante los últimos años, la búsqueda de nuevos tratamientos contra las enfermedades cancerosas continúa y es precisamente en la citotoxicidad, en la que nuestro grupo de trabajo tiene centrada su investigación desde hace varios años.

Estos terpeno-alcaloides son solo una pequeña parte de la gran cantidad de derivados purínicos que se han descrito como metabolitos primarios o secundarios en diferentes seres vivos, por lo que esta introducción está centrada en purinas principalmente de origen natural, sustituidas por cadenas alquílicas, realizándose una revisión sobre alquilpurinas bioactivas que no pretende ser exhaustiva pero sí indicativa de la importancia y variedad estructural que este tipo de compuestos puede presentar desde el punto de vista farmacológico.

³ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 382-431.

⁴ Gordaliza, M. Terpenyl-Purines from the Sea. *Mar. Drugs* **2009**, *7*, 833-849.

1. EL SISTEMA DE PURINA EN LA NATURALEZA

El anillo de purina quizá sea el sistema heterocíclico más conocido de la naturaleza, debido al papel destacado que las bases nitrogenadas derivadas de purina juegan en una gran variedad de procesos bioquímicos y funciones fisiológicas en los organismos vivos.⁵

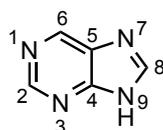


Figura 1: Purina.

Las bases nitrogenadas derivadas de purina más conocidas son sin duda adenina y guanina que se encuentran en los seres vivos en forma de nucleósidos y de nucleótidos formando parte de los ácidos nucleicos (ARN y ADN) y de cofactores enzimáticos, aunque no son las únicas. En el organismo también podemos encontrar una pequeña cantidad de derivados metilados de las bases principales, como epiguanina (7-metilguanina) y

⁵ Rosemeyer, H. The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 361-401.

N^6 -metiladenina formando parte de los ácidos nucleicos o también compuestos procedentes de su metabolismo y degradación como la hipoxantina o el ácido úrico.

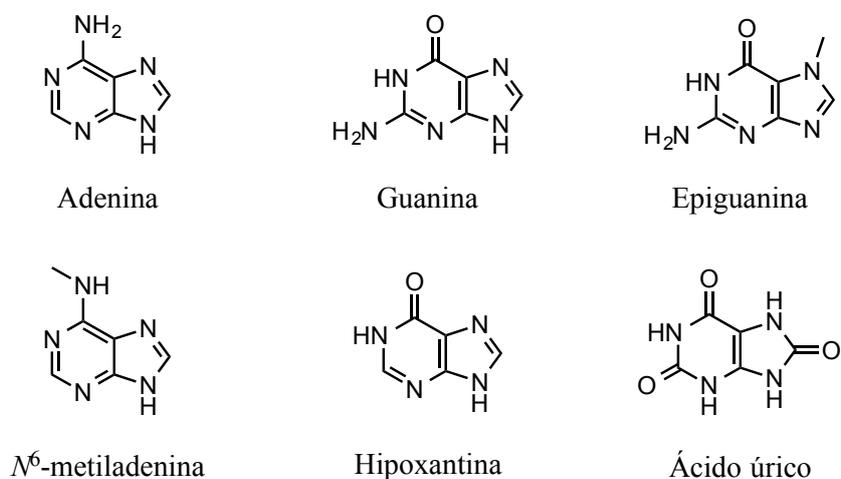


Figura 2: Algunos compuestos de estructura purínica relacionados con los ácidos nucleicos y su metabolismo.

Dada la importancia fisiológica de los procesos en los que participan, no es de extrañar que hayan sido un objetivo prioritario en la Química Farmacéutica de cara a modular su función. Un ejemplo de fármaco con estructura semejante a una base púrica es el alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa que impide el metabolismo de las purinas hasta ácido úrico y por ello es utilizado como antigotoso.^{6,7}

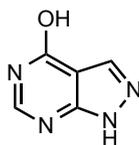


Figura 3: Alopurinol.

⁶ Lemke, T. L.; Williams, D. A.; Roche, V. F.; Zito, S. W. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2008.

⁷ Hansch, C. Comprehensive Medicinal Chemistry. Vol. 2. Pergamon Press. Oxford, 1990.

La estructura de purina sin sustituir no existe en la naturaleza, la forma más simple es el β -D-ribonucleósido nebularina, un nucleósido antibiótico aislado de la seta *Clitocybe nebularis*.⁸

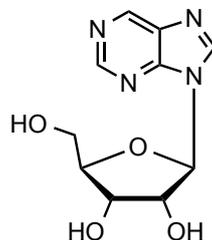


Figura 4: Nebularina.

En bibliografía se puede encontrar una gran variedad de compuestos purínicos di-, tri-, o tetrasustituidos mayoritariamente obtenidos por síntesis química, descritos como inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos, inductores del interferón, ligandos de los receptores de la hormona liberadora de corticotropina, inhibidores de HSP90, de proteínas quinasas (MAP, Src y Cdk), sulfotransferasas, fosfodiesterasas y agonistas y antagonistas de los receptores de adenosina.⁹ Este amplio rango de actividades biológicas mostrado por las purinas se debe a la naturaleza del sustituyente que presenten y que se puede encontrar tanto en los átomos de nitrógeno como de carbono de la estructura: N-1, C-2, N-3, C-6, N-7, C-8 y N-9, lo que hace del sistema purínico una atractiva diana para la modificación química.

Sin embargo, las investigaciones sobre análogos de bases púricas se han dirigido principalmente a la búsqueda de compuestos con propiedades anticancerosas, antimicrobianas o relacionadas con la respuesta que adenosina desencadena al actuar sobre los distintos subtipos de receptores de este mediador.¹⁰

⁸ Suhadolnik, R. J. *Nucleosides as Biological Probes*. John Wiley & Sons. New York, **1979**.

⁹ Legraverend, M.; Grierson, D. S. The purines: potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3987-4006.

¹⁰ Huryn, D. M.; Okabe, M. AIDS-driven nucleoside chemistry. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1745-1768.

Particularmente los receptores de adenosina se encuentran en todos los órganos del cuerpo humano.¹¹ Uno de los objetivos de la investigación en purinas es encontrar nuevos fármacos tanto agonistas como antagonistas para este tipo de receptores.

Se conocen cuatro subtipos de receptores de adenosina: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. Estos receptores son importantes en distintos procesos, como por ejemplo los receptores A₁ en la regulación de señales del dolor. Los receptores A₃ están sobreexpresados en ciertos tejidos tumorales y la aplicación de agonistas A₃ inhibe el crecimiento de células tumorales.

También en el tratamiento contra el asma, los nuevos agonistas A_{2A} son considerados como alternativos a la terapia con glucocorticoides.¹² En cuanto a la interacción con los receptores de adenosina, los agonistas son derivados de la estructura de este nucleósido, mientras que los antagonistas suelen derivarse de la 2,6-dioxipurina o xantina.¹³

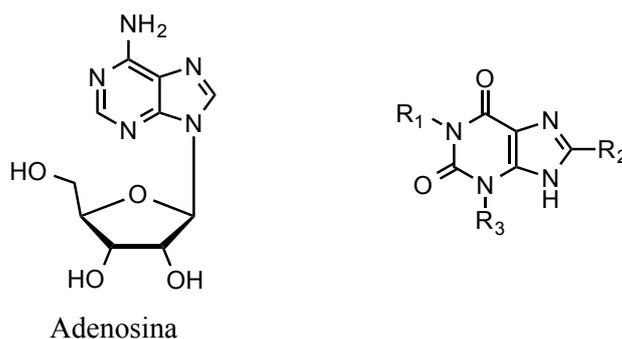


Figura 5: Adenosina y estructura general de antagonistas de adenosina.

El cribado de compuestos con estructura purínica frente a una amplia variedad de dianas biológicas, ha contribuido a la búsqueda de nuevos horizontes para el desarrollo de compuestos purínicos como herramienta bioquímica y como nuevos agentes terapéuticos.

¹¹ Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors-An Update. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1-34.

¹² Brown, R. A.; Spina, D.; Page, C. P. Adenosine receptors and asthma. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, S446-S456.

¹³ Jacobson, K. A.; van Galen, P. J. M.; Williams, M. Adenosine receptors: pharmacology, structure-activity relationships and therapeutic potential. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 407-422.

Existe un número importante de fármacos de estructura purínica que tienen aplicación en el tratamiento del cáncer (6-mercaptopurina, 6-tioguanina),^{14, 15} la mastocitosis sistémica (cladribina),^{14,16} infecciones virales como el herpes y el SIDA (aciclovir, ganciclovir, abacavir)^{17,18} y el rechazo de órganos (azatioprina).¹⁹

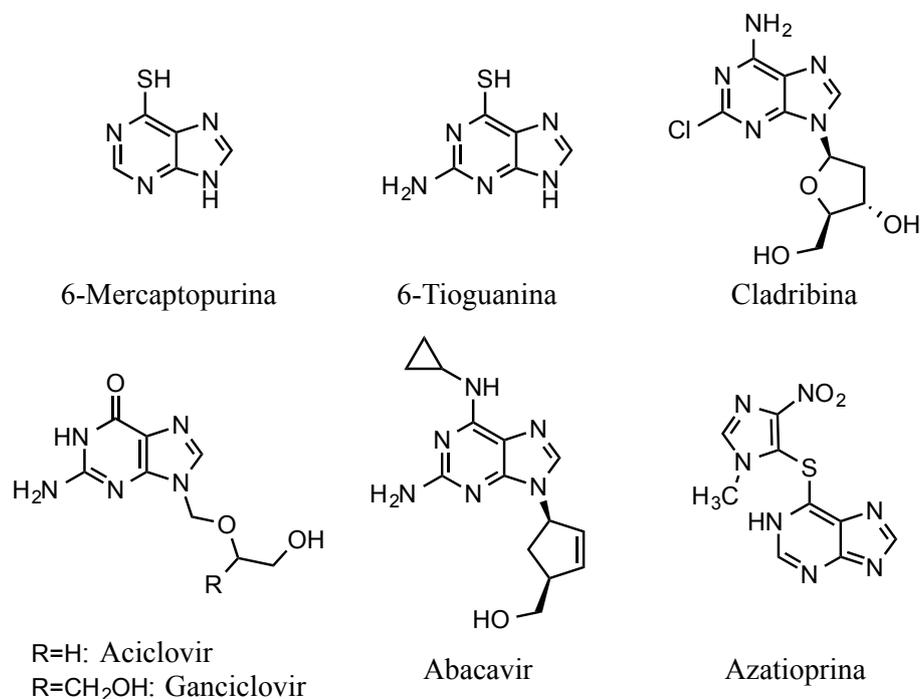


Figura 6: Fármacos de estructura purínica.

Dada la gran variedad de actividades biológicas descritas para los derivados de purina así como la variedad de sustituyentes presentes en las diferentes posiciones del

- ¹⁴ Johnson, S. A.; Thomas, W. Therapeutic potential of purine analogue combinations in the treatment of lymphoid malignancies. *Hematol. Oncol.* **2000**, *18*, 141-153.
- ¹⁵ Hoffmann, M.; Chrzanowska, M.; Hermann, T.; Rychlewski, J. Modeling of purine derivatives transport across cell membranes based on their partition coefficient determination and quantum chemical calculations. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4482-4486.
- ¹⁶ Mey, U.; Strehl, J.; Gorschlüter, M.; Ziske, C.; Glasmacher, A.; Pralle, H.; Schmidt-Wolf, I. Advances in the treatment of hairy-cell leukaemia. *Lancet Oncol.* **2003**, *4*, 86-94.
- ¹⁷ Balzarini, J.; Aquarob, S.; Hassan-Abdallah, A.; Daluge, S. M.; Perno, C.-F.; McGuigan, C. Improved antiviral activity of the aryloxymethoxyalaninyl phosphoramidate (APA) produg of abacavir (ABC) is due to the formation of markedly increased carbocvir 5-triphosphate metabolite levels. *FEBS Lett.* **2004**, *573*, 38-44.
- ¹⁸ De Clercq, E. In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clin. Microbiol. Rev.* **1997**, *10*, 674-693.
- ¹⁹ Drognitz, O.; Benz, S.; Pfeffer, F.; Fischer, C.; Makowiec, F.; Schareck, W.; Hopt, U. T. Long-term follow-up of 78 simultaneous pancreas-kidney transplants at a single-center institution in Europe. *Transplantation* **2004**, *78*, 1802-1808.

anillo, no es de extrañar que la bibliografía al respecto sea sumamente amplia y difícil de cubrir en su totalidad.

Por ello en esta introducción se presenta una revisión que, como se ha comentado anteriormente, no pretende ser exhaustiva pero sí representativa de un grupo reducido de purinas. En concreto aquellas de origen natural con sustituyentes alquilo en alguno de los átomos de nitrógeno presentes en el sistema, diferenciando purinas alquiladas solo con grupos metilo y purinas derivadas de adenina alquiladas con otros grupos alquilo. Purinas obtenidas por síntesis total o análogos de nucleósidos no han sido considerados, ni tampoco purinas alquiladas en los átomos de carbono del anillo. Aunque sí se recogen las distintas estrategias seguidas en la síntesis de alquilpurinas.

2. PURINAS ALQUILADAS CON GRUPOS METILO EN N-1, N-3, N-7 Y N-9

En la naturaleza existen derivados de purina que poseen un grupo metilo en alguno de los nitrógenos de su estructura, las denominadas *N*-metilpurinas, que son derivados mono- o polimetilados.

El derivado metilado de purina más común es 1-metilxantina, ya que es uno de los derivados de purina que se encuentra en mayor concentración en la orina humana además del ácido úrico.²⁰

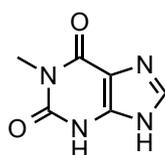


Figura 7: 1-Metilxantina.

Dentro de los compuestos naturales, las bases xánticas cafeína, teofilina y teobromina son las metilpurinas más conocidas por ser componentes activos del café, del té y del cacao. Presentan grupos metilo sobre los nitrógenos de las posiciones N-1, N-3 y/o N-7 y, entre otros mecanismos de acción, actúan como antagonistas de adenosina.⁶ Además del efecto estimulante del sistema nervioso central de cafeína, estas xantinas

²⁰ Rengelshausen, J.; Lindenmaier, H.; Cihlar, T. Walter-Sack, I.; Haefeli, W. E.; Weiss, J. Inhibition of the human organic anion transporter 1 by the caffeine metabolite 1-methylxanthine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 90-94.

⁶ Lemke, T. L.; Williams, D. A.; Roche, V. F.; Zito, S. W. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2008**.

presentan una serie de actividades farmacológicas complejas derivadas de su acción sobre cada uno de los subtipos de receptores de adenosina, algunas de las cuales se han aprovechado terapéuticamente. Concretamente, paraxantina (1,7-dimetilxantina) es el principal metabolito de cafeína en humanos y se cree que contribuye a los efectos fisiológicos producidos por cafeína como antagonista de los receptores de adenosina,²¹ también teofilina y sus derivados sintéticos difilina y emprofilina se utilizan como broncodilatadores en el tratamiento del asma.

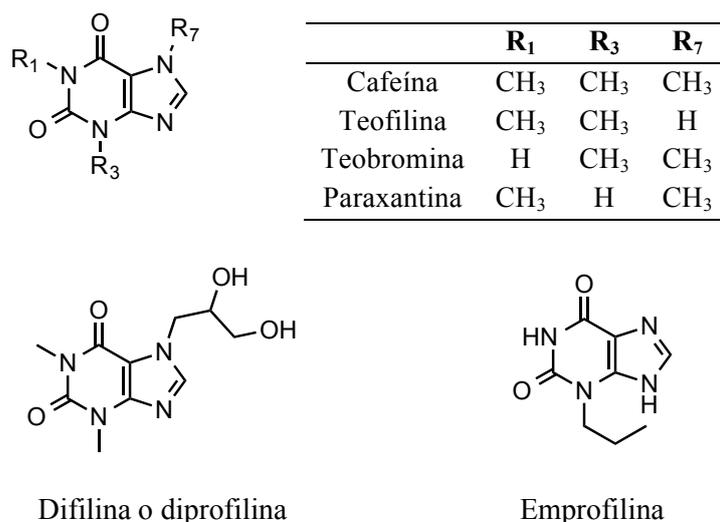


Figura 8: Bases xánticas y derivados sintéticos de teofilina.

Teacrina (ácido 1,3,7,9-tetrametilúrico), es un alcaloide de purina de estructura similar a cafeína, aislado de *Camellia assamica* var. *kucha*, en China, que ha demostrado ser beneficioso para el mantenimiento de varias funciones cerebrales. Un estudio realizado recientemente, sugiere que los efectos protectores de teacrina en daño hepático inducido por estrés, podrían estar relacionados con su actividad antioxidante.²²

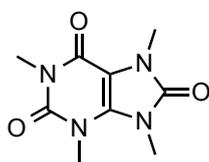


Figura 9: Teacrina.

²¹ Orrú, M.; Guitart, X.; Karcz-Kubicha, M.; Solinas, M.; Justinova, Z.; Barodia, S. K.; Zanoveli, J.; Cortes, A.; Lluís, C.; Casado, V.; Moeller, F. G.; Ferré, S. Psychostimulant pharmacological profile of paraxanthine, the main metabolite of caffeine in humans. *Neuropharm.* **2013**, *67*, 476-484.

²² Li, W.; Li, Y.; Zhai, Y.; Chen, W.; Kurihara, H.; He, R. Theacrine, a purine alkaloid obtained from *Camellia assamica* var. *kucha*, attenuates restraint stress-provoked liver damage in mice. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 6328-6335.

Otra fuente de alquilpurinas son los derivados metil-, dimetil- o trimetilpurínicos aislados de diferentes organismos marinos. Algunas purinas presentan varios grupos metilo en el anillo de imidazol. El primer derivado descrito de este tipo fue herbipolina, una 7,9-dimetilguanina aislada de la esponja gigante *Geodia gigans* (Geodiidae),²³ fue la primera de una serie de análogos de los que no se han definido beneficios evidentes para el organismo productor, sino que más bien se les asigna un papel como productos secundarios de su metabolismo. Otros derivados metilados de purina relativamente simples, aislados también de organismos marinos son: 3-metilxantina, aislada de la ascidia *Symplegma rubra* (Styelidae), en Brasil,²⁴ 1,3-dimetilguanina, aislada de la ascidia *Botrylloides leachi* (Styelidae), en Nueva Zelanda²⁵ y 3,7-dimetilguanina, aislada de la esponja *Zyzzya fuliginosa* (Arcanidae), en Filipinas.²⁶

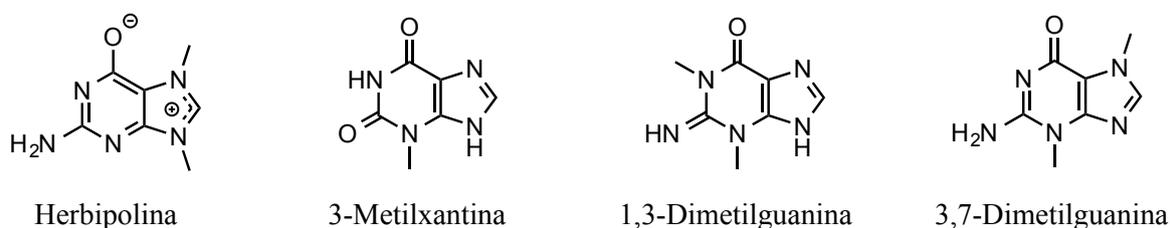


Figura 10: Estructura de herbipolina y otras metilpurinas marinas.

No obstante, para algunos de estos compuestos sí se han descrito diversas actividades farmacológicas: 1,3-dimetilisoguanina, aislada de la esponja *Amphimedon viridis* (Niphatidae), resultó ser citotóxica frente a células cancerosas humanas de ovario,²⁷ 3,7-dimetilisoguanina aislada de la esponja *Agelas longissima* (Agelasidae) y de la gorgonia *Paramuricea clavata* (Plexauridae), mostró propiedades

²³ Ackermann, D. Uber eine neue purinbase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1958**, *70*, 80-80.

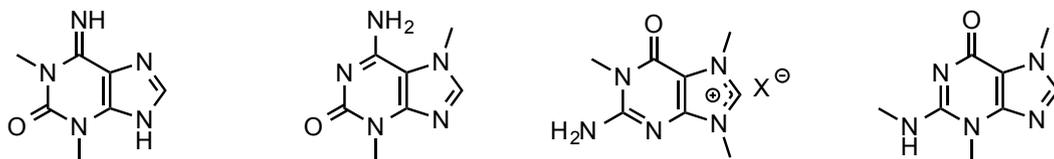
²⁴ Lindsay, B. S.; Almeida, A. M. P.; Smith, C. J.; Berlinck, R. G. S.; Da Rocha, R. M.; Ireland, C. M. 6-Methoxy-7-methyl-8-oxoguanine, an unusual purine from the ascidian *Symplegma rubra*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1573-1575.

²⁵ Lindsay, B. S.; Battershill, C. N.; Copp, B. R. 1,3-Dimethylguanine, a new purine from the New Zealand ascidian *Botrylloides leachi*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 638-639.

²⁶ Tasdemir, D.; Mangalindan, G. C.; Concepcion, G. P.; Harper, M. K.; Ireland, C. M. 3,7- Dimethylguanine, a new purine from a Philippine sponge *Zyzzya fuliginosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1628-1630.

²⁷ Mitchell, S. S.; Whitehill, A. B.; Trapido-Rosenthal, H.; Ireland, C. M. Isolation and characterization of 1,3-dimethylisoguanine from the bermudian sponge *Amphimedon viridis*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 727-728.

antibacterianas^{28, 29} y 1-metilherbipolina, aislada también de las esponjas *Agelas longissima*, *Jaspis* sp. (Coppatiidae)³⁰ y *Coscinoderma mathewsi* (Spongiidae), mostró actividad inhibidora de colagenasa.³¹ Un derivado purínico, 3,7,*N*²-trimetilguanina, aislado de una esponja del Mar Rojo *Petrosia* sp. (Petrosiidae), mostró citotoxicidad contra líneas celulares MCF-7 y HepG2.³²



1,3-Dimetilisoguanina 3,7-Dimetilisoguanina 1-Metilherbipolina 3,7,*N*²-trimetilguanina

Figura 11: Derivados metilpurínicos con actividad biológica.

Otros derivados de purina procedentes de organismos marinos son: 1,3,7-trimetilguanina, aislada de la esponja *Latrunculia brevis* (Latrunculiidae),³³ 1,3,7-trimetilisoguanina, aislada de la ascidia *Pseudodistoma cereum* (Pseudodistomidae) de Nueva Zelanda³⁴ y de *Paramuricea clavata*, que mostró actividad significativa frente a una cepa bacteriana²⁹ y 1,9-dimetilhipoxantina, aislada de la esponja marina *Spongosorites* sp. (Halichondriidae) del sur de Australia.³⁵

- ²⁸ Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatalata-Scafati, O. Longamide and 3,7-dimethylisoguanine, two novel alkaloids from the marine sponge *Agelas longissima*. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7893-7896.
- ²⁹ Pérez, N.; Culioli, G.; Pérez, T.; Briand, J. -F.; Thomas, O. P.; Blache, Y. Antifouling properties of simple indole and purine alkaloids from the mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2304-2308.
- ³⁰ Yagi, H.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. Isolation of 1-methylherbipoline, a purine base, from a marine sponge, *Jaspis* sp. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 837-838.
- ³¹ Kimura, J.; Ishizuka, E.; Nakao, Y.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J.; Kelly-Borges, M. Isolation of 1-methylherbipoline salts of halisulfate-1 and of suvanine as serine protease inhibitors from a marine sponge, *Coscinoderma mathewsi*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 248-250.
- ³² Abdel-Lateff, A.; Alarif, W. M.; Asfour, H. Z.; Ayyad, S. N.; Khedr, A.; Badria, F. A.; Al-lihaibi, S. S. Cytotoxic effects of three new metabolites from Red Sea marine sponge, *Petrosia* sp. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *37*, 928-935.
- ³³ Perry, N. B.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. 1,3,7-Trimethylguanine from the sponge *Latrunculia brevis*. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 307-308.
- ³⁴ Copp, B. R.; Wassvik, C. M.; Lambert, G.; Page, M. J. Isolation and characterization of the new purine 1,3,7-trimethylisoguanine from the New Zealand ascidian *Pseudodistoma cereum*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1168-1169.
- ³⁵ Capon, R. J.; Rooney, F.; Murray, L. M. 1,9-Dimethylhypoxanthine from a southern australian marine sponge *Spongosorites* species. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 261-262.

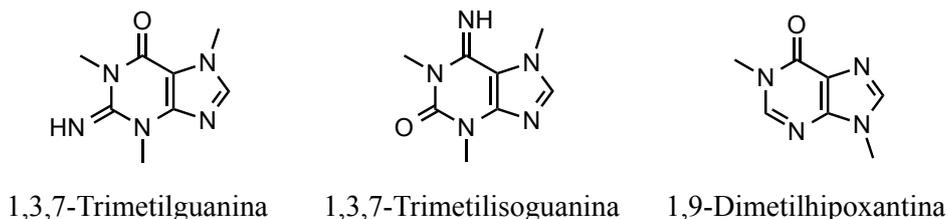


Figura 12: Otros derivados metilpurínicos de origen marino.

En 1996, de una planta trepadora originaria de China, *Heterostemma brownii* (Asclepiadaceae) usada en la medicina popular para el tratamiento de ciertos tumores, se aislaron tres compuestos con estructura de sal de purinio similar a herbipolina, las heterominas A, B y C. Heterominas A y B no mostraron actividad antibacteriana, pero sí parecen ser selectivas hacia líneas celulares de carcinoma de esófago (HCE-6), hepatoma (Huh-7), linfoma (Molt-4) y células de leucemia (HL-60).³⁶ Las heterominas D y E fueron aisladas posteriormente de la misma planta.³⁷

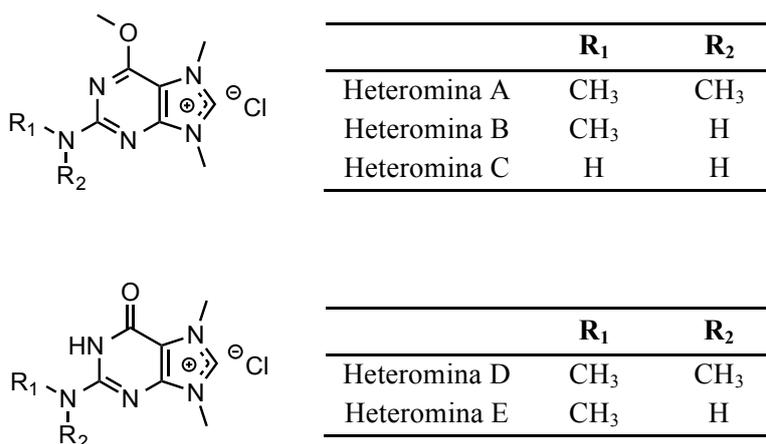


Figura 13: Heterominas A-E.

³⁶ Lin, Y. -L.; Lee, H. -P.; Ou, J. -C.; Kuo, Y. -H. Three new purinium derivates, heteromines A, B and C from *Heterostemma brownii*. *Heterocycles* **1996**, *43*, 781-786.

³⁷ Lin, Y. -L.; Huang, R. -L.; Chang, C. -M.; Kuo, Y. -H. Two new puriniums and three new pyrimidines from *Heterostemma brownii*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 982-985.

Además de 7-metilguanosina, que juega un papel importante en el ARN mensajero, doridosina (1-metilisoguanosina) es el único nucleósido de una alquilpurina encontrado en la naturaleza. Fue aislado de la esponja marina *Tedania digitata* (Tedaniidae) y del nudibranquio *Anisodoris nobilis* (Dioscorididae) y farmacológicamente, es un agonista del receptor de adenosina A₁ que se une también al receptor de benzodiazepinas. Entre los efectos que provoca, cabe destacar la reducción de la presión arterial, disminución de la frecuencia cardiaca, relajación muscular y efectos antiinflamatorios.^{38,39,40}

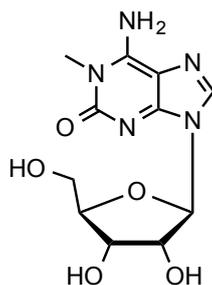


Figura 14: Doridosina.

Se han descrito otras metilpurinas derivadas de adenina que presentan en su estructura grupos alquilo adicionales más complejos que se recogen en el apartado siguiente de esta introducción.

³⁸ Baird-Lambert, J.; Marwood, J. F.; Davies, L. P.; Taylor, K. M. 1-Methylisoguanosine: an orally active marine natural product with skeletal muscle and cardiovascular effects. *Life Sci.* **1980**, *26*, 1069-1077.

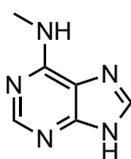
³⁹ Fuhrman, F. A.; Fuhrman, G. J.; Kim, Y. H.; Pavelki, L. A.; Mosher, H. S. Doridosine: a new hypotensive *N*-methylpurine riboside from the nudibranch *Anisodoris nobilis*. *Science* **1980**, *207*, 193-195.

⁴⁰ Tao, P. -L.; Yen, M. -H.; Shyu, W. -S.; Chern, J. -W. Doridosine derivatives: binding at adenosine receptors and *in vivo* effect. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *243*, 135-139.

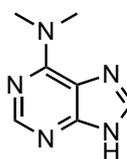
3. ADENINAS DIFERENTEMENTE ALQUILADAS

Dentro de las alquilpurinas, cabe destacar aquellas que poseen un grupo amino en la posición C-6 con estructura de adenina ($C_5H_5N_5$) y que a su vez, presentan sustituyentes alquilo en otras posiciones.

Los ejemplos más sencillos de alquiladeninas son *N*-metiladenina y *N,N*-dimetiladenina, constituyentes del RNA de transferencia.⁴¹



N-Metiladenina



N,N-Dimetiladenina

Figura 15: Alquiladeninas de estructura sencilla.

Dentro de las adeninas alquiladas también se encuentran las citoquininas, que son un grupo especial de fitohormonas que promueven el crecimiento y la diferenciación celular. Zeatina fue la primera fitohormona aislada del maíz, *Zea mays* (Poaceae)⁴² e isopenteniladenina aislada del actinomiceto *Rhodococcus fascians* (Nocardiaceae),⁴³ que presenta una fuerte actividad antimetabólica y antineoplásica ya que es capaz de inhibir

⁴¹ Isaksson, L. A.; Phillips, J. H. Studies on microbial RNA V. A comparison of the *in vivo* methylated components of ribosomal RNA from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *155*, 63-71.

⁴² Letham, D. S. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci.* **1963**, *8*, 569-573.

⁴³ Helgeson, J. P.; Leonard, N. L. Cytokinins: identification of compounds isolated from *Corynebacterium fascians*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1966**, *56*, 60-63.

quinasas de nucleósidos de purina en varios tumores. Una de las citoquininas más estudiadas es kinetina, que se usa en grandes cantidades para la producción de *Ginseng*.⁴⁴

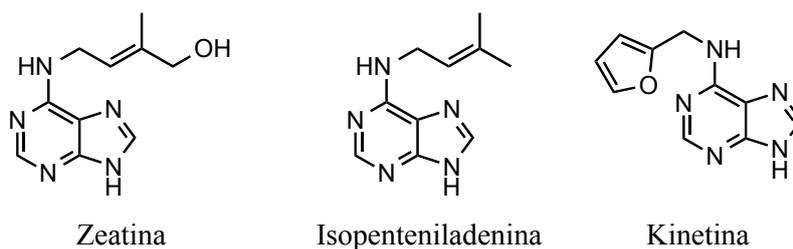


Figura 16: Estructura de algunas citoquininas.

También pertenecen a este grupo de citoquininas discadenina, aislada del protozoo *Dictyostelium discoideum* (Dictyosteliidae) y su derivado sintético que carece del grupo alquilo sobre la amina en C-6. Son 3-alquiladeninas con propiedades inhibitoras de la germinación de esporas fúngicas.^{45,46}

Triacantina es un alcaloide natural con estructura de 3-alquiladenina que se aisló de las hojas de un árbol norteamericano, *Gleditsia triacanthos* (Fabaceae), a las cuales se le atribuyen efectos alucinógenos. Se han llevado a cabo estudios que demuestran que ni triacantina ni el cloruro de pirotriacantina que se obtiene por calentamiento a partir de ésta, son los responsables de dicha acción.⁴⁷

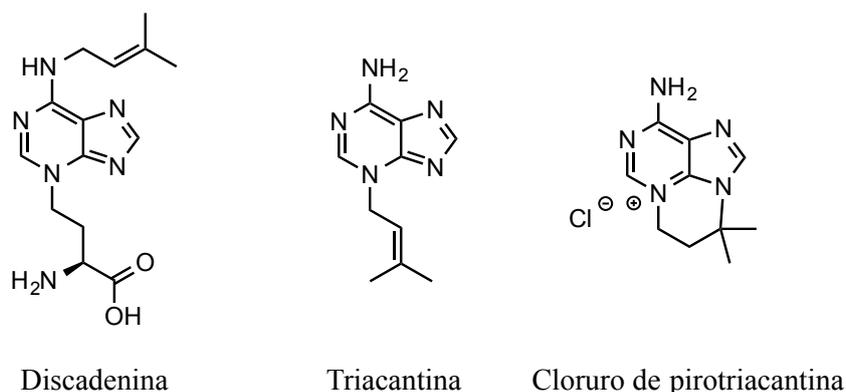


Figura 17: Estructura de 3-alquiladeninas.

⁴⁴ Barciszewski, J.; Massino, F.; Clark, B. F. C. Kinetin-A multiactive molecule. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *40*, 182-192.

⁴⁵ Obata, Y.; Abe, H.; Tanaka, Y.; Yanagisawa, K.; Uchiyama, M. Isolation of a spore germination inhibitor from a cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Agric. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 1989-1990.

⁴⁶ Abe, H.; Uchiyama, M.; Tanaka, Y.; Saito, H. Structure of discadenine, a spore germination inhibitor from the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 3807-3810.

⁴⁷ Leonard, N. J.; Deyrup, J. A. The Chemistry of triacanthine. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 2148-2160.

Eritadenina es una de las 9-alkilpurinas aisladas de *Lentinula edodes* (Marasmiaceae). Esta es la segunda especie de seta más consumida en el mundo (shiitake) y la medicina popular asiática le ha atribuido propiedades de “elixir que promueve la vitalidad”. Este compuesto y algunos de los muchos derivados sintéticos desarrollados basándose en su estructura, presentan un efecto hipocolesterolémico muy significativo.^{48,49,50}

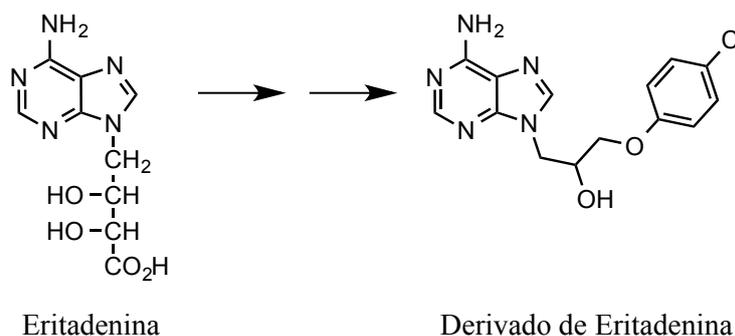


Figura 18: Eritadenina y su derivado.

Espicamicina, aislada de *Streptomyces alanosinicus* (Streptomycetaceae), se describió como un agente inductor de la diferenciación de células leucémicas mieloides.^{51, 52} Un derivado semisintético fue evaluado inicialmente en ensayos oncológicos y no mostró actividad antineoplásica, sin embargo, sí que se le ha encontrado utilidad en el tratamiento del dolor.⁵³

⁴⁸ Tokuda, S.; Kaneda, T. Effect of dried mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., on cholesterol metabolism in rats (II) Fraction of the cholesterol-reducing fraction (1). *J. Jpn. Soc. Food Nutr.* **1964**, *17*, 297-300.

⁴⁹ Tokuda, S.; Kano, E.; Kaneda, T. Effect of mushrooms on cholesterol metabolism in rats. (VIII). Reducing mechanism of plasma cholesterol by mushroom (II). *J. Jpn. Soc. Food Nutr.* **1972**, *25*, 609-613.

⁵⁰ DiMenna, W.S.; Piantadosi, C.; Lamb, R. G. Synthesis of potential hypolipidemic agents. Reaction of substituted phenyl 2,3-epoxypropyl ethers with adenine, uracil, and thymine. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1073-1076.

⁵¹ Hayakawa, Y.; Nakagawa, M.; Kawai, H.; Tanabe, K.; Nakayama, H.; Shimazu, A.; Seto, H.; Otake, N. Studies on the differentiation inducers of myeloid leukemic cells. III. Spicamycin, a new inducer of differentiation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 934-937.

⁵² Hayakawa, Y.; Nakagawa, M.; Kawai, H.; Tanabe, K.; Nakayama, H.; Shimazu, A.; Seto, H.; Otake, N. Spicamycin, a new differentiation inducer of mouse myeloid leukemia cells (M1) and human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2685-2691.

⁵³ Borsook, D.; Edwards, A. D. Antineuropathic effects of the antibiotic derivative spicamycin KRN5500. *Pain Med.* **2004**, *5*, 104-108.

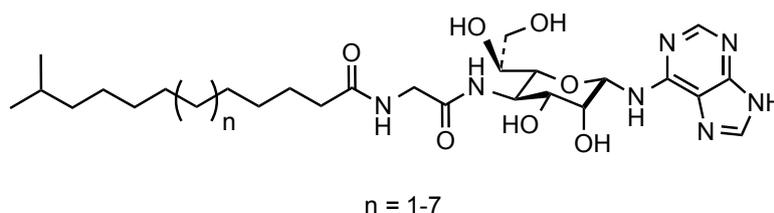


Figura 19: Espicamicina.

Entre las alquilpurinas de origen marino no solo se han descrito metilpurinas, ciertas esponjas poseen la capacidad de producir metabolitos bioactivos que pueden ser considerados híbridos entre un terpeno y un derivado de adenina.⁵⁴

Las agelasinas, aisladas de la esponja marina *Agelas dispar*, se describieron por primera vez en el año 1975 por Cullen y Devlin.⁵⁵ Las agelasinas, agelinas y agelasiminas, comprenden una familia de compuestos que presentan un núcleo cromóforo alquilado de 9-metiladenina cuaternaria unido por el nitrógeno de la posición N-7 a la posición C-15 de un esqueleto diterpénico.

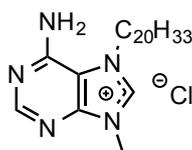


Figura 20: Núcleo general de agelasinas.

Las primeras en identificarse fueron las agelasinas A, B, C y D aisladas de *Agelas* sp. por Nakamura en 1984.⁵⁶ Los mismos autores aislaron de *Agelas nakamurai* otros dos diterpenoides monocíclicos con la misma unidad de 9-metiladenina, a las que denominaron agelasinas E y F.⁵⁷

⁵⁴ Gundersen, L. -L. Synthesis and biological activities of marine terpene-adenine hybrids and synthetic analogs. *Phytochem. Rev.* **2013**, *12*, 467-486.

⁵⁵ Cullen, E.; Devlin, J. P. Agelasine, a novel quaternary 9-methyladenine from the sponge *Agelas dispar*. *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 1690-1691.

⁵⁶ Nakamura, H.; Wu, H.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. Agelasine-A, -B, -C and -D, novel bicyclic diterpenoids with a 9-methyladeninium unit possessing inhibitory effects on Na,K-ATPase from the okinawan sea sponge *Agelas* sp. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2989-2992.

⁵⁷ Wu, H.; Nakamura, H.; Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. Agelasine-E and -F, novel monocyclic diterpenoids with 9-methyladeninium unit possessing inhibitory effects on Na,K-ATPase isolated from the Okinawan sea sponge *Agelas nakamurai* Hoshino. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3719-3722.

Cabe destacar la actividad de agelasina F frente a *Mycobacterium tuberculosis*.⁶² Además se han descrito para agelasinas propiedades antimicrobianas^{58,63} e inhibitoras de la Na⁺/K⁺-ATPasa.⁶⁴

Agelasina D presenta buena actividad frente a *Plasmodium falciparum* (malaria), *Leishmania infantum* (leishmaniosis), *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas)⁶⁵ y *Trypanosoma brucei* (enfermedad del sueño africana).⁶⁶ Las agelasinas están asociadas en general con actividad antineoplásica, concretamente agelasina D tiene buena actividad frente a linfoma, mieloma y células de leucemia.⁶⁷

Relacionada estructuralmente con agelina B está agelasina G, que presenta un átomo de bromo sobre el anillo de pirrol. Agelasina G mostró citotoxicidad frente a células de linfoma de ratón L1210 (CI₅₀=3,1 µg/mL ≈ 4,8 µM).^{68,69}

Entre los miembros más recientes de esta familia de compuestos se encuentran las primeras agelasinas que contienen un grupo hidroxilo libre, agelasina H y agelasina I, aisladas junto con otras agelasinas ya descritas de extractos de una especie de *Agelas* sp.

⁶² Mangalindan, G. C.; Talaue, M. T.; Cruz, L. J.; Franzblau, S. G.; Adams, L. B.; Richardson, A. D.; Ireland, C. M.; Concepcion, G. P. Agelasine F from a Philippine *Agelas* sp. sponge exhibits *in vitro* antituberculosis activity. *Planta Med.* **2000**, *66*, 364-365.

⁵⁸ Capon, R. J.; Faulkner, D. J. Antimicrobial metabolites from a pacific sponge, *Agelas* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1819-1822.

⁶³ Vik, A.; Hedner, E.; Charnock, C.; Tangen, L. W.; Samuelsen, O.; Larsson, R.; Bohlin, L.; Gundersen, L.-L. Antimicrobial and cytotoxic activity of agelasine and agelasimine analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4016-4037.

⁶⁴ Kobayashi, M.; Nakamura, H.; Wu, H.; Kobayashi, J.; Ohizumi, Y. Mode of inhibition of brain Na⁺, K⁺-ATPase by agelasidines and agelasines from a sea sponge. *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *259*, 179-184.

⁶⁵ Vik, A.; Proszenyak, A.; Vermeersch, M.; Cos, P.; Maes, L.; Gundersen, L.-L. Screening of agelasine D and analogs for inhibitory activity against pathogenic protozoa; identification of hits for treatment of visceral leishmaniasis and Chagas disease. *Molecules.* **2009**, *14*, 279-288.

⁶⁶ Calcul, L.; Tenney, K.; Ratnam, J.; McKerrow, J. H.; Crews, P. Structural variations to the 9-*N*-methyladeninium diterpenoid hybrid commonly isolated from *Agelas* sponges. *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 915-921.

⁶⁷ Vik, A.; Hedner, E.; Charnock, C.; Samuelsen, O.; Larsson, R.; Gundersen, L. -L.; Bohlin, L. (+)-Agelasine D: improved synthesis and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 381-386.

⁶⁸ Ishida, K.; Ishibashi, M.; Shigemori, H.; Sasaki, T.; Kobayashi, J. Agelasine G, a new antileukemic alkaloid from the Okinawan marine sponge *Agelas* sp. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 766-767.

⁶⁹ Fujii, T.; Itaya, T. The 11 positional isomers of N-x, N-y-dimethyladenine: Their chemistry, physicochemical properties, and biological activities. *Heterocycles* **1999**, *51*, 393-454.

recolectada en una isla de la Micronesia, compuestos que presentaron actividad antibacteriana.⁷⁰

De la esponja *Agelas nakamurai* originaria de Papúa-Nueva Guinea, se aisló un nuevo diterpeno-alcaloide con un esqueleto diterpénico muy inusual de telepogano (solo se conocen dos derivados), unido a la misma metiladenina cuaternaria (Compuesto I).⁷¹ Otros miembros más recientes de esta misma familia son agelasinas J, K y L, aisladas de *Agelas cf. mauritiana*.⁷²

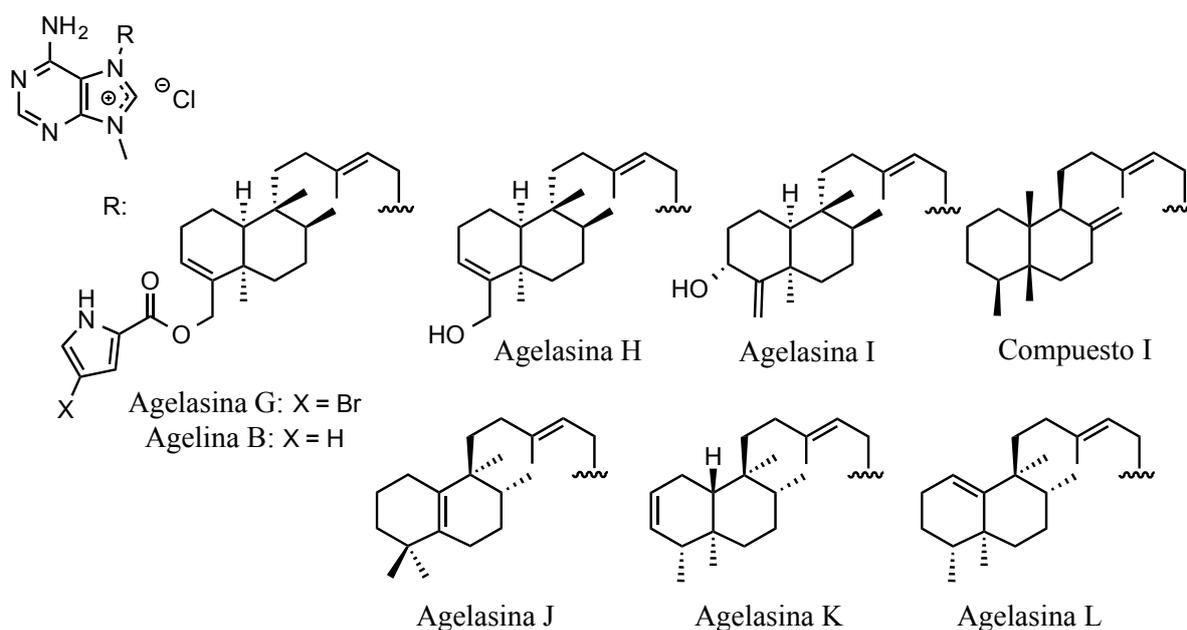


Figura 22: Agelasinas G-L.

⁷⁰ Fu, X.; Schmitz, F. J.; Tanner, R. S.; Kelly-Borges, M. Agelasines H and I, 9-methyladenine-containing diterpenoids from an *Agelas* sponge. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 548-550.

⁷¹ Iwagawa, T.; Kaneko, M.; Okamura, H.; Nakatani, M.; Van Soest, R. W. M. New alkaloids from the Papua New Guinean sponge *Agelas nakamurai*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1310-1312.

⁷² Appenzeller, J.; Mihci, G.; Martin, M.; Gallard, J.; Menou, J.; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.; Petek, S.; Chevalley, S.; Valentin, A. Agelasines J, K, and L from the Solomon Islands marine sponge *Agelas cf. mauritiana*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1451-1454.

En agelasina M, de *Agelas* sp., se encontró un grupo formilo en la parte terpenoide por primera vez y una función cetona en 2-oxoagelasina B.⁶⁶ Agelasina N se aisló de la esponja del Caribe *Agelas citrina* y presenta un grupo hidroxilo libre, al igual que agelasinas H e I (Fig. 22).⁷³

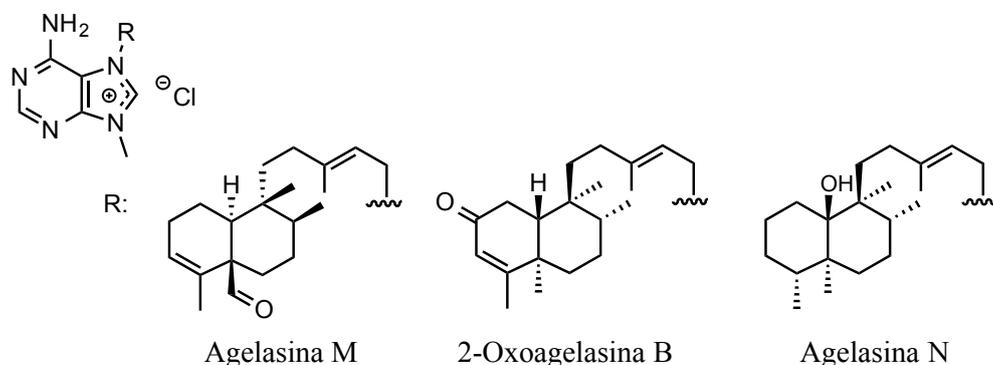


Figura 23: Agelasinas M y N y 2-oxoagelasina B.

Tres nuevos compuestos 2-oxoagelasinas A y F y 10-hidro-9-hidroxiagelasina F, se aislaron de la esponja de Okinawa *Agelas nakamurai*.⁷⁴

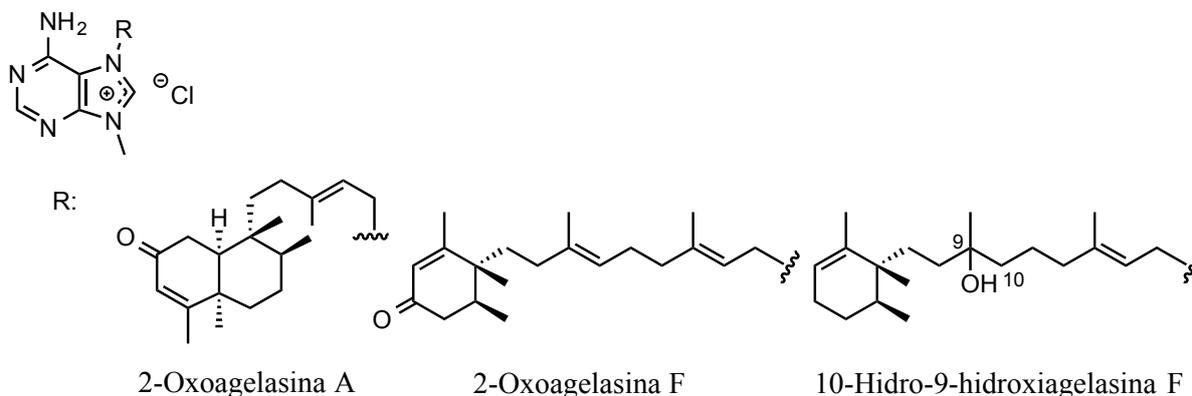


Figura 24: Estructura de 2-oxoagelasinas A y F y 10-hidro-9-hidroxiagelasina F.

⁶⁶ Calcul, L.; Tenney, K.; Ratnam, J.; McKerrow, J. H.; Crews, P. Structural variations to the 9-N-methyladeninium diterpenoid hybrid commonly isolated from *Agelas* sponges. *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 915-921.

⁷³ Stout, E. P.; Yu, L. C.; Molinski, T. F. Antifungal diterpene alkaloids from the caribbean sponge *Agelas citrina*: unified configurational assignments of agelasidines and agelasines. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *27*, 5131-5135.

⁷⁴ Abdjul, D. B.; Yamazaki, H.; Kanno, S.; Takahashi, O.; Kirikoshi, R.; Ukai, K.; Namikoshi, M. Structures and Biological Evaluations of Agelasines isolated from the Okinawan marine Sponge *Agelas nakamurai*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1428-1433.

Otros dos compuestos aislados del género *Agelas* sp. son gelasinas A y B, ambos son norditerpenoides que carecen del grupo metilo en la posición C-19 de la estructura clerodánica.⁶⁶

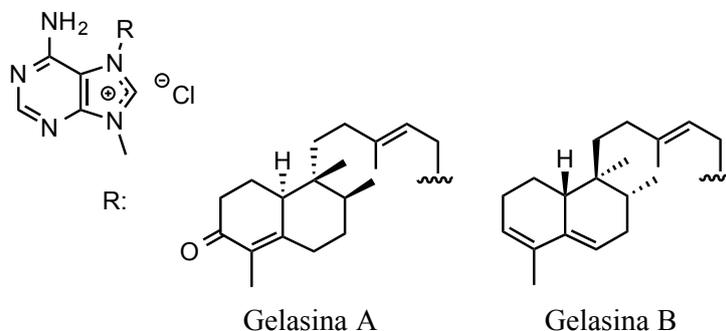


Figura 25: Gelasinas A y B.

En relación a la estructura de agelasinas, cabe destacar la existencia de ageloxima D, aislada también de esponjas del género *Agelas*.⁷⁵

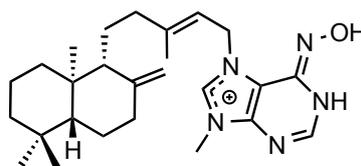


Figura 26: Ageloxima D.

En compuestos de estructura análoga a agelasina, se han realizado modificaciones en la posición 2 de la purina que indican que la introducción de un grupo metilo sería beneficioso para la actividad antimicrobiana y antiprotozoaria, y que grupos amino podrían mejorar la actividad frente a varias líneas celulares de cáncer.⁷⁶

⁶⁶ Calcul, L.; Tenney, K.; Ratnam, J.; McKerrow, J. H.; Crews, P. Structural variations to the 9-*N*-methyladeninium diterpenoid hybrid commonly isolated from *Agelas* sponges. *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 915-921.

⁷⁵ Hertiani, T.; Edrada-Ebel, R.; Ortlepp, S.; Van Soest, R. W. M.; de Voogd, N. J.; Wray, V.; Hentschel, U.; Kozytska, S.; Müller, W. E. G.; Proksch, P. From anti-fouling to biofilm inhibition: new cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1297-1311.

⁷⁶ Roggen, H.; Charnock, C.; Burman, R.; Felth, J.; Larsson, R.; Bohlin, L.; Gundersen, L.-L. Antimicrobial and antineoplastic activities of agelasine analogs modified in the purine 2-position. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2011**, *344*, 50-55.

De *Agelas mauritiana*, siguiendo las fracciones más citotóxicas del extracto de cloroformo, se han aislado otros derivados no cuaternarios de adenina unidos a un diterpeno bicíclico, son agelasiminas A y B⁷⁷ cuya configuración absoluta ha sido comprobada por síntesis total, tanto de los compuestos racémicos (±)-agelasimina A y B⁷⁸ como de los compuestos enantioméricamente puros (+)-agelasimina A y B.⁷⁹ Ambas agelasiminas tienen idéntica parte terpenoide, con esqueleto de *ent*-halimano.

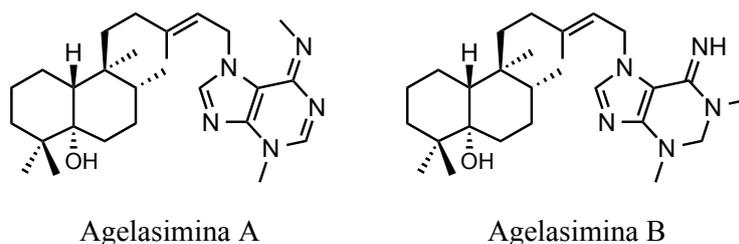


Figura 27: Agelasiminas A y B.

Las agelasiminas fueron evaluadas frente a una variedad de actividades farmacológicas. Ambas mostraron citotoxicidad *in vitro* frente a células L1210 con valores de $CI_{50}=2-4 \mu\text{g/mL} \approx 3,1-6,2 \mu\text{M}$.⁸⁰ También presentaron efecto relajante sobre músculo liso de intestino de conejo y arteria coronaria bovina. Así mismo, son capaces de inhibir el transporte de nucleósidos en los eritrocitos de conejo y pueden actuar como antagonistas de canales de Ca^{2+} y como bloqueantes adrenérgicos α_1 .

⁷⁷ Fathi-Afshar, R.; Allen, T. M. Biological active metabolites from *Agelas mauritiana*. *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 45-50.

⁷⁸ Ohba, M.; Kawase, N.; Fujii, T. Total syntheses of (±)-agelasimine-A, (±)-agelasimine-B, and (±)-purino-diterpene and the structure of diacetyl agelasimine-A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8250-8257.

⁷⁹ Ohba, M.; Iizuka, K.; Ishibashi, H.; Fujii, T. Syntheses and absolute configurations of the marine sponge purines (+)-agelasimine-A and (+)-agelasimine-B. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 16977-16986.

⁸⁰ Fathi-Afshar, R.; Allen, T. M.; Krueger, C. A.; Cook, D. A.; Clanachan, A. S.; Vriend, R.; Baer, H. P.; Cass, C. E. Some pharmacological activities of novel adenine-related compounds isolated from a marine sponge *Agelas mauritiana*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1989**, *67*, 276-281.

Otro grupo de metabolitos secundarios activos aislados más recientemente de esponjas del Mar Rojo del género *Raspailia* (Raspailiidae) son las asmarinas.^{81,82} Se trata de compuestos formados también por la unión de un diterpeno y un resto de adenina, pero a diferencia de los metabolitos aislados del género *Agelas*, la adenina forma parte de un nuevo sistema heterocíclico de estructura diazepínica y no son sales cuaternarias.

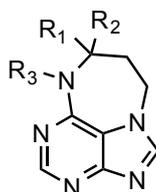


Figura 28: Núcleo estructural de asmarinas.

El resto terpénico presenta esqueleto de *ent*-clerodano, con diferencias en la unión de los anillos de la decalina, bien *cis* o *trans*. El anillo de adenina se encuentra unido al diterpeno por las posiciones C-15 y C-13. Las diferencias entre las asmarinas están relacionadas con la presencia o no de sustituyentes sobre el anillo de purina.

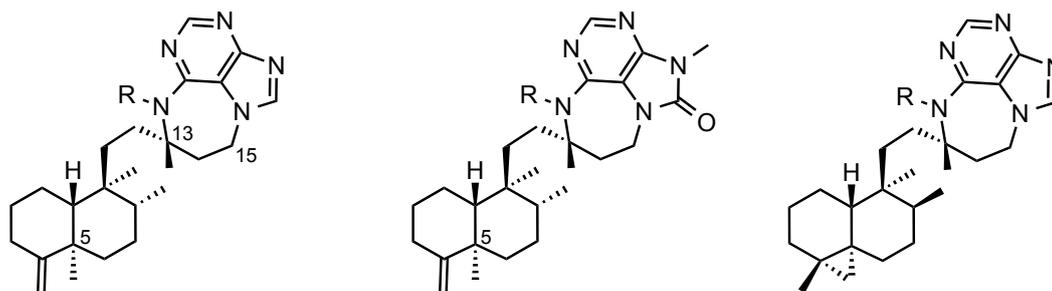
En primer lugar se describieron las asmarinas A-C,⁸¹ un par de años más tarde se describieron asmarinas D-F y las estructuras revisadas de asmarinas B y C.⁸² Posteriormente, el mismo grupo describió las asmarinas G y H de una *Raspailia* del Océano Índico en Kenia⁸³ y las asmarinas I, J y K de una especie del mismo género recolectada en Madagascar.⁸⁴

⁸¹ Yosief, T.; Rudi, A.; Stein, Z.; Goldberg, I.; García Gravalos, M. D.; Schleyer, M.; Kashman, Y. Asmarines A-C; Three novel cytotoxic metabolites from the marine sponge *Raspailia* sp. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3323-3326.

⁸² Yosief, T.; Rudi, A.; Kashman, Y. Asmarines A-F, novel cytotoxic compounds from the marine sponge *Raspailia* species. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 299-304.

⁸³ Rudi, A.; Shalom, H.; Schleyer, M.; Benayahu, Y.; Kashman, Y. Asmarines G and H and barekol, three new compounds from the marine sponge *Raspailia* sp. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 106-109.

⁸⁴ Rudi, A.; Akin, M.; Gaydou, E.; Kashman, Y. Asmarines I, J, and K and nosyberkol: four new compounds from the marine sponge *Raspailia* sp. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1932-1935.



Asmarina A: R = OH
 Asmarina B: R = OH, 5-*epi*
 Asmarina G: R = OCH₃
 Asmarina H: R = H
 Asmarina K: R = H, 5-*epi*

Asmarina C: R = H, 5-*epi*
 Asmarina D: R = H
 Asmarina E: R = OCH₃
 Asmarina F: R = OCH₃, 5-*epi*

Asmarina I: R = OH
 Asmarina J: R = H

Figura 29: Estructura de asmarinas A-K.

Asmarinas A y B, que son los componentes mayoritarios, han sido evaluados como citotóxicos frente a varias líneas celulares (leucemia murina P-388, carcinoma de pulmón humano A-549, carcinoma de colon humano HT-29 y melanoma humano MEL-28).^{81,85} Asmarina B (CI₅₀=0,12-0,24 μM) resultó ser más potente que asmarina A (CI₅₀=1,18 μM) y presentó una mayor actividad frente a carcinoma de pulmón (A-549) y colon humano (HT-29).⁸¹ Todas las demás asmarinas descritas y sus análogos, son menos citotóxicos que asmarina A o B.⁸⁵

Recientemente se ha publicado una ruta de obtención de nitrosopurinas que da origen a potentes análogos de asmarinas con una citotoxicidad en el intervalo nanomolar que exceden la potencia de asmarina A y que pone de manifiesto que para la actividad son imprescindibles el enlace N-O del nitrógeno diazepínico y el anillo de siete miembros, ya que un análogo sin grupo hidroxilo resultó inactivo y variantes acíclicos no mostraron citotoxicidad.⁸⁶

⁸¹ Yosief, T.; Rudi, A.; Stein, Z.; Goldberg, I.; García Gravalos, M. D.; Schleyer, M.; Kashman, Y. Asmarines A-C; Three novel cytotoxic metabolites from the marine sponge *Raspailia* sp. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3323-3326.

⁸⁵ Pappo, D.; Shimony, S.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines: studies toward the total synthesis of asmarines. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 199-206.

⁸⁶ Wan, K. K.; Iwasaki, K.; Umotoy, J. C.; Wolan, D. W.; Shenvi, R. A. Nitrosopurines en route to potently cytotoxic asmarines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2410-2415.

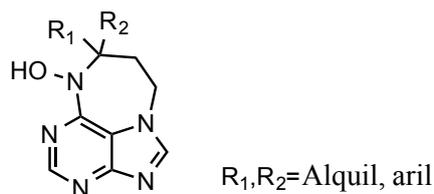


Figura 30: Estructura de análogos de asmarinas.

La amplia gama de actividades biológicas hace que estos compuestos sean un atractivo objetivo de síntesis. Se han llevado a cabo diferentes métodos para conseguir sintetizar análogos de asmarina,^{85,87,88,89} pero hasta la fecha la síntesis total de asmarina no se ha publicado y, un gran desafío en la síntesis de estos productos, es la construcción del anillo tetrahidrodiazepínico.

⁸⁵ Pappo, D.; Shimony, S.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines: studies toward the total synthesis of asmarines. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 199-206.

⁸⁷ Pappo, D.; Rudi, A.; Kashman, Y. A synthetic approach towards the synthesis of asmarine analogues. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5941-5943.

⁸⁸ Pappo, D.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines-asmarine A analogues. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6493-6501.

⁸⁹ Vik, A.; Gundersen, L.-L. Synthetic studies directed towards asmarines; construction of the tetrahydrodiazepinopurine moiety by ring closing metathesis. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1931-1934.

4. SÍNTESIS Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE ALQUILPURINAS

Como ha quedado reflejado en los apartados anteriores, las alquilpurinas han sido una de las familias objetivo en la búsqueda de compuestos bioactivos.¹⁰ siendo la mayoría de ellos derivados alquilados en el nitrógeno N-9 del anillo de purina de forma análoga a los nucleósidos y nucleótidos naturales que se obtienen por síntesis total con facilidad.

Sin embargo, los derivados sustituidos en el nitrógeno N-7 son menos frecuentes, pero no por ello menos interesantes, como ocurre con los metabolitos secundarios de origen marino, agelasinas, agelasiminas o asmarinas citados previamente. Estos compuestos han mostrado interesantes propiedades biológicas,^{56,58,77,81,82} por lo que se han tomado como modelo para planificar este trabajo de Tesis Doctoral.

¹⁰ Huryn, D. M.; Okabe, M. AIDS-driven nucleoside chemistry. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1745-1768.

⁵⁶ Nakamura, H.; Wu, H.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. Agelasine-A, -B, -C and -D, novel bicyclic diterpenoids with a 9-methyladeninium unit possessing inhibitory effects on NA,K-ATPase from the okinawan sea sponge *Agelas* sp. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2989-2992.

⁵⁸ Capon, R. J.; Faulkner, D. J. Antimicrobial metabolites from a pacific sponge, *Agelas* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1819-1822.

⁷⁷ Fathi-Afshar, R.; Allen, T. M. Biological active metabolites from *Agelas mauritania*. *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 45-50.

⁸¹ Yosief, T.; Rudi, A.; Stein, Z.; Goldberg, I.; García Gravalos, M. D.; Schleyer, M.; Kashman, Y. Asmarines A-C; Three novel cytotoxic metabolites from the marine sponge *Raspailia* sp. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3323-3326.

⁸² Yosief, T.; Rudi, A.; Kashman, Y. Asmarines A-F, novel cytotoxic compounds from the marine sponge *Raspailia* species. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 299-304.

La mayoría de los procesos de síntesis desarrollados conducen a purinas alquiladas en la posición N-9 o a mezclas de productos alquilados en N-9 y N-7, siendo estos últimos minoritarios, por lo que resulta interesante desarrollar una metodología sintética encaminada a obtener selectivamente purinas alquiladas en la posición N-7.

La obtención de diferentes 7-alkilpurinas de interés como compuestos bioactivos se ha planteado desde hace años. Ya en 1957, Prasad y Robins, ante la dificultad de separar las mezclas de regioisómeros en posiciones N-7 y N-9 procedentes de la metilación de la 6-cloropurina y por su potencial como compuestos antitumorales, plantearon la síntesis selectiva de 7-metilpurinas diferentemente sustituidas en las posiciones C-2 y/o C-6.⁹⁰

Se han obtenido numerosos derivados por sustitución de las posiciones C-2 y C-6 de la 7-metilpurina utilizando como sustrato de partida teobromina, que ya presenta el grupo metilo sobre la posición N-7 de la purina.^{91,92} Lógicamente esta metodología se restringe a preparar 7-metilderivados, sin que se pueda generalizar para otros grupos alquilo o arilo.

El problema de la síntesis selectiva de los distintos isómeros de alquilación, y en concreto de las 7-alkilpurinas, se ha abordado desde diferentes aproximaciones sintéticas en función de que los compuestos de partida presenten ya el anillo de purina o que éste se construya con posterioridad a la introducción de los correspondientes grupos alquilo.

⁹⁰ Prasad, R. N.; Robins, R. K. Potential purine antagonists. VIII. The preparation of some 7-methylpurines. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6401-6407.

⁹¹ Fischer, E. Synthese des heteroxanthins und paraxanthins. *Ber. Detsch. Chem. Ges.* **1897**, *30*, 2400.

⁹² Adams, R. R.; Whitmore, F. C. Heterocyclic basic compounds. VI. Dialkylaminoalkylamino-purines. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 1271-1273.

4.1. Por alquilación de purinas:

Los métodos de alquilación directa de bases púricas están basados generalmente en una reacción de sustitución nucleofílica de un átomo de nitrógeno purínico sobre un derivado alquílico que presente un grupo saliente adecuado, como es el caso de derivados halogenados,⁹³ alcoholes,⁹⁴ tosilatos⁹⁵ o epóxidos.⁵⁰

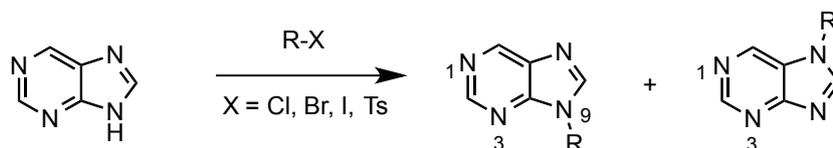


Figura 31: Alquilación directa de purina.

Aunque normalmente esta metodología proporciona mezclas de productos derivados de la alquilación de los distintos nitrógenos de la purina sustrato de la reacción, se observa una regioselectividad hacia la obtención de 9-alkilpurinas, debida al mayor carácter nucleofílico que el nitrógeno de la posición N-9 presenta generalmente frente al resto de nitrógenos purínicos (N-7, N-3, N-1). Las proporciones de los diferentes productos que se forman en la reacción de alquilación dependen de las purinas de partida, del agente alquilante, de los catalizadores, del disolvente y de la temperatura de reacción.⁹⁶

Además, en las reacciones de alquilación hay que tener en cuenta la presencia de otros centros nucleofílicos sobre la base púrica, como podrían ser los sustituyentes amino, hidroxilo o sulfanilo que habitualmente suelen estar presentes sobre los átomos de carbono de las posiciones C-2, C-6 o C-8 de la purina.

⁹³ Montgomery, J. A.; Hewson, K. 7-Substituted 7H-Purines. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 4469-4472.

⁹⁴ Mitsunobu, O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. *Synthesis* **1981**, *1*, 1-28.

⁹⁵ Česnek, M.; Holý A.; Masojídková, M. 6-Guanidinopurine nucleosides and their analogues. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2985-2996.

⁵⁰ DiMenna, W.S.; Piantadosi, C.; Lamb, R. G. Synthesis of potential hypolipidemic agents. Reaction of substituted phenyl 2,3-epoxypropyl ethers with adenine, uracil, and thymine. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1073-1076.

⁹⁶ Geen, G. R.; Grinter, T. J.; Kincey, P. M.; Jarvest, R. L. The effect of the C-6 substituent on the regioselectivity of N-alkylation of 2-aminopurines. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6903-6914.

Por ello, es uno de los métodos más utilizados para preparar compuestos que tienen un sustituyente sobre la posición N-9, de forma semejante a los nucleósidos naturales. Solamente algunas purinas que, por presentar determinados sustituyentes sobre el anillo de pirimidina ven modificada la densidad electrónica y la nucleofilia de los nitrógenos imidazólicos, invierten la selectividad de la posición que sufre la alquilación estando favorecida la posición N-7 sobre la N-9. Es el caso de teofilina y algunos análogos^{97,98} o de *N*⁶-dimetilaminometilenadenina.⁹⁹

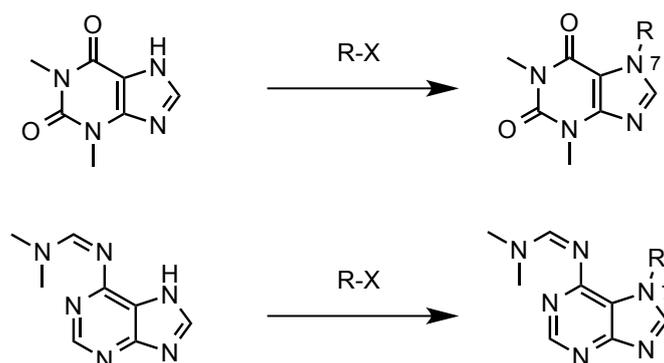


Figura 32: 7-Alquilación selectiva de purinas.

Otra estrategia descrita en la bibliografía para obtener selectivamente purinas alquiladas en posición N-7,^{88,100} consiste en proteger la posición N-9 como paso previo a la alquilación en N-7, de forma que la eliminación del grupo protector suele transcurrir simultáneamente a la alquilación de N-7; a veces y, dependiendo del grupo protector utilizado, se aísla el ion imidazolio intermedio que libera fácilmente la purina en medio

⁹⁷ Roth, H. J. Aminolysis of epoxides. III. The preparation of beta-hydroxyalkylpurines. Reaction of theophylline and theobromine with 1,2 epoxides. *Arch. Pharm.* **1959**, 292, 234-238.

⁹⁸ Kjellberg, J.; Johansson, N. G. Regioselective alkylation of guanine via diacyloxyglyoxal-*N*²-acetylguanine adduct to obtain 7-alkylguanine derivatives. Studies on alkylation of guanine I. *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, 23, 625-627.

⁹⁹ Hocková, D.; Buděšínský, M.; Marek, R.; Marek, J.; Holý, A. Regioselective preparation of *N*⁷- and *N*⁹-alkyl derivatives of *N*⁶-[(Dimethylamino)methylene]adenine bearing an active methylene group and their further derivatization leading to α -branched acyclic nucleoside analogues. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2675-2682.

⁸⁸ Pappo, D.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines-asmarine A analogues. *Tetrahedron* **2003**, 59, 6493-6501.

¹⁰⁰ Singh, D.; Wani, M. J.; Kumar, A. A simple solution to the age old problem of regioselective functionalization of guanine: first practical synthesis of acyclic *N*⁹- and/or *N*⁷-guanine nucleosides starting from *N*²,*N*⁹-diacetylguanine. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 4665-4668.

ácido.¹⁰¹ De los diferentes grupos protectores estudiados, difenilmetilo y trifenilmetilo (tritilo) fueron los que dieron mejores resultados de selectividad.

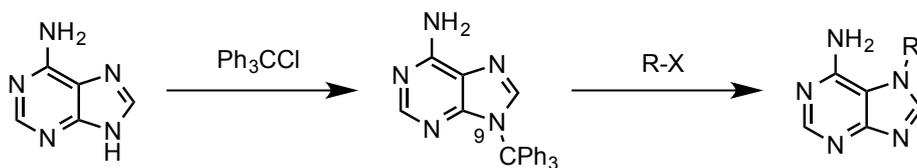


Figura 33: Obtención de 7-alkilpurinas previa protección de la posición N-9.

También puede efectuarse la N-7 alquilación sobre un análogo nucleosídico que ya presente el glicósido sobre la posición N-9 y que en cierto modo funcione como un grupo protector. Si el objetivo fuera la 7-alkilpurina desglicosilada, solo quedaría eliminar el glicósido en medio ácido.¹⁰²

Más interesante resulta el procedimiento de Birkofer, en el que 7-trimetilsililpurinas sufren la alquilación selectiva sobre la misma posición en la que está el grupo trimetilsililo.¹⁰³

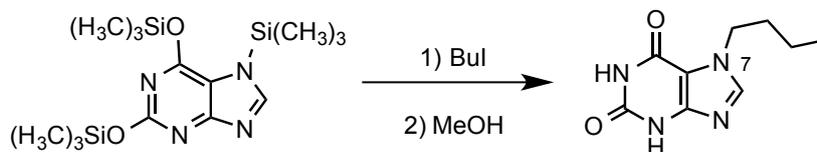


Figura 34: Obtención de 7-alkilpurinas mediante el procedimiento de Birkofer.

¹⁰¹ Hakimelahi, G. H.; Ly, T. W.; Moosavi-Movahedi, A.; Jain, M. L.; Zakerinia, M.; Davari, H.; Mei, H.; Sambaiah, T.; Moshfegh, A.; Hakimelahi, S. Design, synthesis, and biological evaluation of novel nucleoside and nucleotide analogues as agents against DNA viruses and/or retroviruses. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3710-3720.

¹⁰² Izawa, K.; Shiragami, H. Practical syntheses of antiviral nucleosides. *Pure & Appl. Chem.* **1998**, *70*, 313-318.

¹⁰³ Birkofer, L.; Ritter, A. Kühhlthau, H. -P. Alkylierungen und glykosidierungen über silyl-derivate. *Chem. Ber.* **1964**, *97*, 934-945.

4.2. Por alquilación previa a la formación de la purina:

4.2.1. A partir de precursores acíclicos:

La construcción del sistema purínico o de las purinas naturales como adenina a partir de precursores acíclicos como ácido cianhídrico, formamida o compuestos derivados de ellos, ha sido objetivo de muchos trabajos que pretenden explicar su formación en las condiciones existentes antes de que la vida apareciera sobre La Tierra. La molécula de purina se puede preparar a partir de 5 moléculas de formamida en una única etapa con un 71 % de rendimiento.¹⁰⁴

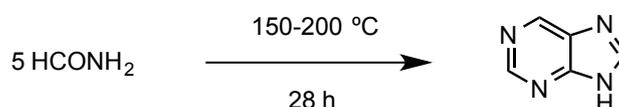


Figura 35: Síntesis de purina a partir de formamida.

Aplicando una metodología similar basada en precursores acíclicos, se ha desarrollado un procedimiento sencillo para preparar en una única etapa purinas sustituidas en N-7 a partir de alquil o arilaminoacetonitrilos con sales de formamidinio.¹⁰⁵

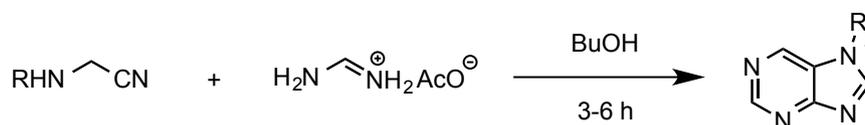


Figura 36: Síntesis de 7-alquilpurinas a partir de precursores acíclicos.

4.2.2. A partir de imidazoles:

Otro importante principio sintético es la conocida como síntesis de Sarasin-Wegmann, a partir de un anillo de imidazol con grupos funcionales en C-4 y C-5, en este caso el anillo de pirimidina se cierra por reacción con un compuesto monocarbonado que aporta el carbono C-2 de la purina. Esta alternativa se llevó a cabo por primera vez utilizando el intermedio 4-amino-1-metil-1*H*-imidazol-5-carboxamida para dar lugar a la

¹⁰⁴ Yamada, H.; Okamoto, T. Policyclic *N*-heterocompounds XVI. Reactions of methylpyridines with formamide. *Chem. Pharm. Bull.* **1972**, *20*, 623-624.

¹⁰⁵ Bredereck, H.; Effenberger, F.; Rainer, G. Säureamidreaktionen, XXXIV. 7-Substituierte purine und ihre aufspaltung zu 4.5-diamino-pyrimidinen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1964**, *673*, 82-87.

7-metilxantina.¹⁰⁶ Esta síntesis tiene especial importancia para la preparación de nucleósidos de purina.^{107,108}

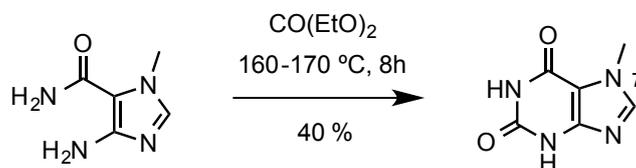


Figura 37: Ejemplo de síntesis de purinas de Sarasin-Wegmann.

4.2.3. A partir de pirimidinas:

Es el método sintético más generalizado de preparación de purinas y se conoce como la síntesis de Traube.¹⁰⁹ El anillo de imidazol se forma a partir de una 4,5-diaminopirimidina apropiadamente funcionalizada por condensación con un reactivo que aporta el carbono C-8 de la purina.

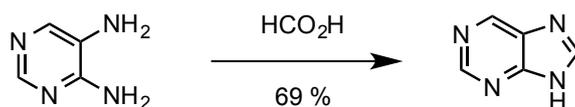


Figura 38: Síntesis de Traube.

Existen varias versiones de este procedimiento que, generalmente, utiliza como producto de partida la 4,5-diaminopirimidina o algún derivado de ella convenientemente funcionalizado.

Para obtener las 7-alkilpurinas, lo habitual ha sido acilar selectivamente el grupo amino de la posición C-5 de la pirimidina, alquilar posteriormente el nitrógeno de la amida obtenida y finalmente llevar a cabo la condensación con el grupo amino de la posición C-4 de la pirimidina.⁹³

¹⁰⁶ Sarasin, J.; Wegmann, E. Synthèse de l'hétéroxanthine à partir d'un dérivé de l'imidazol. *Helv. Chim. Acta* **1924**, *7*, 713-719.

¹⁰⁷ Yamazaki, A.; Kumashiro, I.; Takenishi, T. A simple method for the synthesis of inosine, 2-alkylinosine, and xanthosine from 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-4-imidazolecarboxamide. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3258-3260.

¹⁰⁸ Lister, J. H.; Fenn, M. D. "Purines Syntheses from Imidazoles and Other Precursors (H91)", in *Chemistry of Heterocyclic Compounds: The Purines*, Supplement 1, Vol. 54. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ (USA), **1996**.

¹⁰⁹ Traube, W. Über eine neue synthese des guanins und xanthins. *Ber. Detsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 1371-1383.

⁹³ Montgomery, J. A.; Hewson, K. 7-Substituted 7H-Purines. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 4469-4472.

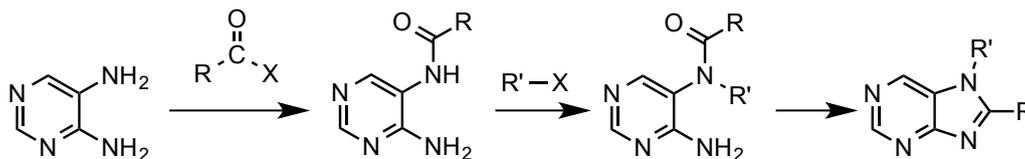


Figura 39: Obtención de 7-alkilpurinas por síntesis de Traube.

Así, como ha quedado reflejado en este apartado introductorio, las interesantes actividades biológicas que presentan algunas alquilpurinas y, en concreto 7-alkilpurinas, hace que esta familia de derivados purínicos sea objetivo sintético de numerosas investigaciones y haya motivado el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

INTRODUCTION SUMMARY

*Natural products play a highly significant role in the drug discovery and development processes. A high proportion of commercial drugs are obtained from natural compounds isolated from plants and terrestrial organisms.¹

The sea is a relatively unexplored source of natural products, which offers a significant potential of interesting molecules in different therapeutic areas. Marine natural compounds present varied structures and are isolated from many different sources.^{2,3}

Our research group has focused on marine secondary metabolites formed by a unit of purine functionalized with different alkyl chains of different sizes; perhaps the most common chains are of terpenoid type attached to adenine residues for which a variety of biological properties have been described including cytotoxicity.⁴ It is precisely at the cytotoxicity in which our group has focused its research for several years.

* References including in this introduction summary keep the numbering from the spanish document.

¹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.

² Skropeta, D.; Wei, L. Recent advances in deep-sea natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 999-1025.

³ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 382-431.

⁴ Gordaliza, M. Terpenyl-Purines from the Sea. *Mar. Drugs* **2009**, *7*, 833-849.

1. PURINE SYSTEM IN NATURE

The best-known nitrogenous bases derived from purine are certainly adenine and guanine, which are found in living organisms as nucleosides and nucleotides forming part of the nucleic acids (RNA and DNA) and enzyme cofactors, but they are not the only ones. In the organism we can find a small amount of methylated derivatives of these main bases, as epiguanine (7-methylguanine) and *N*⁶-methyladenine, being part of nucleic acids or also compounds from metabolism as hypoxanthine or uric acid.

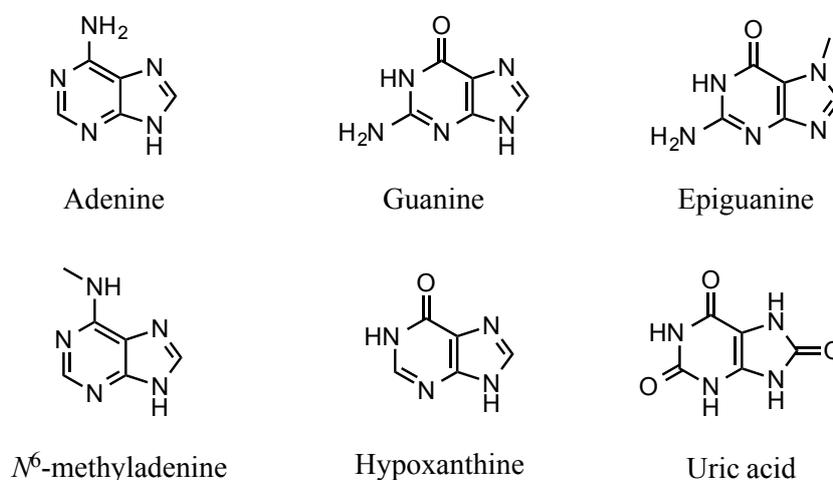


Figure 1: Purine derivatives related with nucleic acids and its metabolism.

In scientific literature you can find a variety of di-, tri-, or tetrasubstituted purine compounds mainly obtained by chemical synthesis, with a wide range of biological activities.⁹ The substituents can be found both at nitrogen and carbon atoms of its structure: N-1, C-2, N-3, C-6, N-7, C-8 and N-9.

⁹ Legrauerend, M.; Grierson, D. S. The purines: potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3987-4006.

A significant number of purine-based drugs have application in the treatment of cancer (6-mercaptopurine, 6-thioguanine),^{14,15} systemic mastocytosis (cladribine),^{14,16} viral infections such as herpes and AIDS (acyclovir, ganciclovir, abacavir),^{17,18} and organ rejection (azathioprine).¹⁹

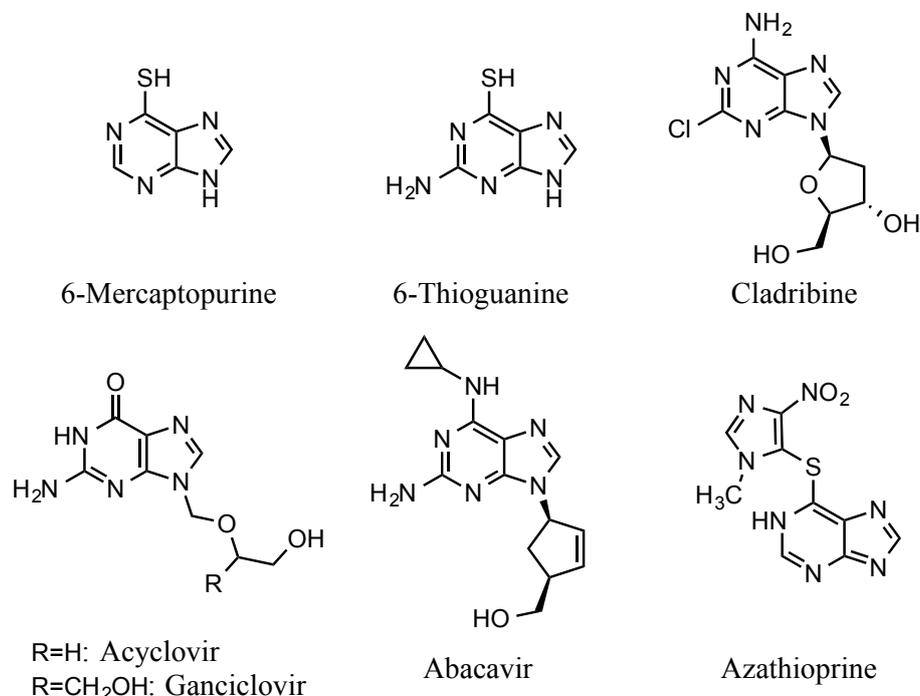


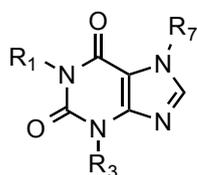
Figure 2: Drugs with purine structure.

- ¹⁴ Johnson, S. A.; Thomas, W. Therapeutic potential of purine analogue combinations in the treatment of lymphoid malignancies. *Hematol. Oncol.* **2000**, *18*, 141-153.
- ¹⁵ Hoffmann, M.; Chrzanowska, M.; Hermann, T.; Rychlewski, J. Modeling of purine derivatives transport across cell membranes based on their partition coefficient determination and quantum chemical calculations. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4482-4486.
- ¹⁶ Mey, U.; Strehl, J.; Gorschlüter, M.; Ziske, C.; Glasmacher, A.; Pralle, H.; Schmidt-Wolf, I. Advances in the treatment of hairy-cell leukaemia. *Lancet Oncol.* **2003**, *4*, 86-94.
- ¹⁷ Balzarini, J.; Aquarob, S.; Hassan-Abdallah, A.; Daluge, S. M.; Perno, C.-F.; McGuigan, C. Improved antiviral activity of the aryloxymethoxyalaninyl phosphoramidate (APA) produg of abacavir (ABC) is due to the formation of markedly increased carbovir 5-triphosphate metabolite levels. *FEBS Lett.* **2004**, *573*, 38-44.
- ¹⁸ De Clercq, E. In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clin. Microbiol. Rev.* **1997**, *10*, 674-693.
- ¹⁹ Drognitz, O.; Benz, S.; Pfeffer, F.; Fischer, C.; Makowiec, F.; Schareck, W.; Hopt, U. T. Long-term follow-up of 78 simultaneous pancreas-kidney transplants at a single-center institution in Europe. *Transplantation* **2004**, *78*, 1802-1808.

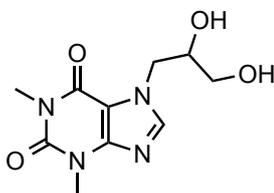
2. ALKYLATED PURINES WITH METHYL GROUPS AT N-1, N-3, N-7 AND N-9

In Nature there are purine derivatives having methyl groups at any of the ring nitrogen atoms, called *N*-methylpurines, which can be mono- or polymethylated derivatives.

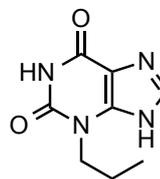
Among natural compounds maybe the xanthine bases caffeine, theophylline and theobromine are the best-known methylpurines, which are the active components of coffee, tea and cocoa. Methyl groups are present on the nitrogens at the positions N-1, N-3 and/or N-7 and these methylpurines, among other mechanisms of action, act as adenosine antagonists.⁶ Specifically, paraxanthine (1,7-dimethylxanthine) it is the major metabolite of caffeine in humans and it is believed to contribute to the physiological effects of caffeine as an antagonist of adenosine receptors.²¹ Furthermore, theophylline and its synthetic derivatives diphylline and enprofylline are used as bronchodilators in the treatment of asthma.



	R ₁	R ₃	R ₇
Caffeine	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Theophylline	CH ₃	CH ₃	H
Theobromine	H	CH ₃	CH ₃
Paraxanthine	CH ₃	H	CH ₃



Diphylline or diprophylline



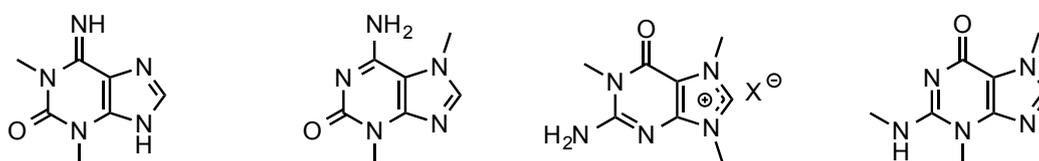
Enprofylline

Figure 3: Xanthine bases and synthetic derivatives of theophylline.

⁶ Lemke, T. L.; Williams, D. A.; Roche, V. F.; Zito, S. W. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, **2008**.

²¹ Orrú, M.; Guitart, X.; Karcz-Kubicha, M.; Solinas, M.; Justinova, Z.; Barodia, S. K.; Zanoveli, J.; Cortes, A.; Lluís, C.; Casado, V.; Moeller, F. G.; Ferré, S. Psychostimulant pharmacological profile of paraxanthine, the main metabolite of caffeine in humans. *Neuropharm.* **2013**, *67*, 476-484.

Other methyl purines have been isolated from different marine organisms and various pharmacological activities have been described for them. Some examples are 1,3-dimethylisoguanine, isolated from the sponge *Amphimedon viridis* (Niphatidae), proved to be cytotoxic against human ovarian cancer cells,²⁷ 3,7-dimethylisoguanine, isolated from the sponge *Agelas longissima* (Agelasidae) and from the gorgonian *Paramuricea clavata* (Plexauridae), showed antibacterial properties^{28,29} and 1-methylherbipoline, also isolated from the sponges *Agelas longissima*, *Jaspis* sp. (Coppatiidae)³⁰ and *Coscinoderma mathewsi* (Spongiidae), showed inhibitory activity of collagenase.³¹ Another purine derivative, 3,7,*N*²-trimethylguanane, isolated from the Red Sea sponge *Petrosia* sp. (Petrosiidae), showed cytotoxicity against cell lines MCF-7 and HepG2.³²



1,3-Dimethylisoguanine 3,7-Dimethylisoguanine 1-Methylherbipoline 3,7,*N*²-trimethylguanane

Figure 4: Methylpurine derivatives from marine origin with biological activity.

- ²⁷ Mitchell, S. S.; Whitehill, A. B.; Trapido-Rosenthal, H.; Ireland, C. M. Isolation and characterization of 1,3-dimethylisoguanine from the bermudian sponge *Amphimedon viridis*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 727-728.
- ²⁸ Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatalata-Scafati, O. Longamide and 3,7-dimethylisoguanine, two novel alkaloids from the marine sponge *Agelas longissima*. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7893-7896.
- ²⁹ Pérez, N.; Culioli, G.; Pérez, T.; Briand, J. -F.; Thomas, O. P.; Blache, Y. Antifouling properties of simple indole and purine alkaloids from the mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2304-2308.
- ³⁰ Yagi, H.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. Isolation of 1-methylherbipoline, a purine base, from a marine sponge, *Jaspis* sp. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 837-838.
- ³¹ Kimura, J.; Ishizuka, E.; Nakao, Y.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J.; Kelly-Borges, M. Isolation of 1-methylherbipoline salts of halisulfate-1 and of suvanine as serine protease inhibitors from a marine sponge, *Coscinoderma mathewsi*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 248-250.
- ³² Abdel-Lateff, A.; Alarif, W. M.; Asfour, H. Z.; Ayyad, S. N.; Khedr, A.; Badria, F. A.; Al-lihaibi, S. S. Cytotoxic effects of three new metabolites from Red Sea marine sponge, *Petrosia* sp. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *37*, 928-935.

In 1996, three herbipoline-like compounds, heteromines A, B and C were isolated from the chinese climber *Heterostemma brownii* (Asclepiadaceae), which is used in folk medicine for the treatment of certain tumours. Heteromines A and B showed no significant antibacterial activity, but appear to be selective toward cancer cell lines such as esophageal carcinoma (HCE-6), hepatoma (Huh-7), lymphoma (Molt-4) and leukemia cells (HL-60).³⁶ Heteromines D and E were isolated from the same plant.³⁷

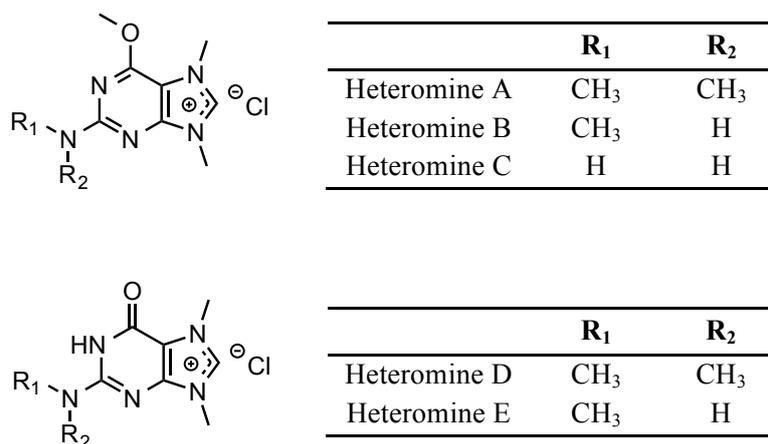


Figure 5: Heteromines A-E.

Other methylpurines are adenine derivatives bearing additional longer alkyl chains as those described in the following section.

³⁶ Lin, Y. -L.; Lee, H. -P.; Ou, J. -C.; Kuo, Y. -H. Three new purinium derivatives, heteromines A, B and C from *Heterostemma brownii*. *Heterocycles* **1996**, *43*, 781-786.

³⁷ Lin, Y. -L.; Huang, R. -L.; Chang, C. -M.; Kuo, Y. -H. Two new puriniums and three new pyrimidines from *Heterostemma brownii*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 982-985.

3. DIFFERENTLY ALKYLATED ADENINES

Besides methylated purines, there are a large number of higher alkylated adenine compounds. The cytokinines are substituted adenines that are a very special group of phytohormones that promote cell growth as well as cell differentiation. Zeatin was the first cytokinine isolated from *Zea mays* (Poaceae)⁴² and isopentenyladenine was isolated from the actinomycete *Rhodococcus fascians* (Nocardiaceae),⁴³ which has a strong antimetabolic and antineoplastic activity. One of the most studied cytokinine is kinetin, which is used in large amounts for the production of *Ginseng*.⁴⁴

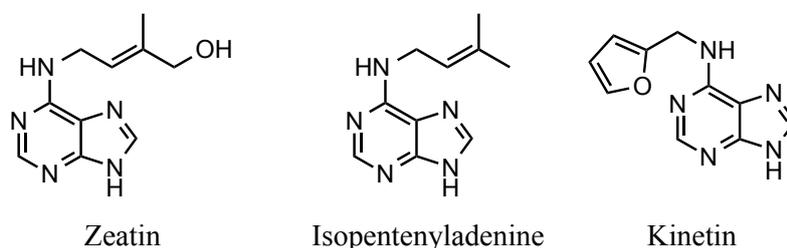


Figure 6: Structures of some cytokinines.

⁴² Letham, D. S. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci.* **1963**, *8*, 569-573.

⁴³ Helgeson, J. P.; Leonard, N. L. Cytokinins: identification of compounds isolated from *Corynebacterium fascians*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1966**, *56*, 60-63.

⁴⁴ Barciszewski, J.; Massino, F.; Clark, B. F. C. Kinetin- A multiactive molecule. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *40*, 182-192.

Agelasines, isolated from the marine sponge *Agelas* sp., are a family of compounds that present a quaternary alkylated chromophore core of 9-methyladenine with the 7-nitrogen attached to the C-15 position of a diterpene skeleton.

The first to be identified were the agelasines A, B, C and D isolated from *Agelas* sp. by Nakamura in 1984.⁵⁶ The same authors isolated from *Agelas nakamurai* two monocyclic diterpenoids with the same unit of 9-methyladenine that they called agelasines E and F.⁵⁷ Agelasines are generally associated with antineoplastic activity, specifically agelasine D has a good activity against lymphoma, myeloma and leukemia cells.⁶⁷

More members of this family have been described subsequently. The last one to be described until now is agelasine N.⁷⁴

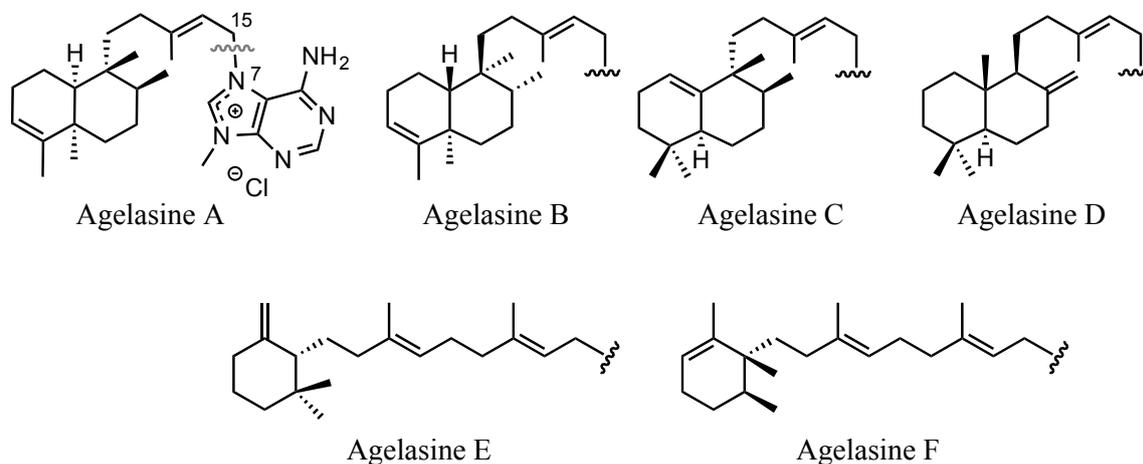


Figure 7: Agelasines A-F.

⁵⁶ Nakamura, H.; Wu, H.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. Agelasine-A, -B, -C and -D, novel bicyclic diterpenoids with a 9-methyladeninium unit possessing inhibitory effects on Na,K-ATPase from the okinawan sea sponge *Agelas* sp. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2989-2992.

⁵⁷ Wu, H.; Nakamura, H.; Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. Agelasine-E and -F, novel monocyclic diterpenoids with 9-methyladeninium unit possessing inhibitory effects on Na,K-ATPase isolated from the Okinawan sea sponge *Agelas nakamurai* Hoshino. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3719-3722.

⁶⁷ Vik, A.; Hedner, E.; Charnock, C.; Samuelsen, O.; Larsson, R.; Gundersen, L. -L.; Bohlin, L. (+)-Agelasine D: improved synthesis and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 381-386.

⁷⁴ Abdjul, D. B.; Yamazaki, H.; Kanno, S.; Takahashi, O.; Kirikoshi, R.; Ukai, K.; Namikoshi, M. Structures and Biological Evaluations of Agelasines isolated from the Okinawan marine Sponge *Agelas nakamurai*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1428-1433.

Other non quaternary adenine derivatives attached to a bicyclic diterpene have been isolated from *Agelas mauritiana*, they are Agelasimines A and B. Both agelasimines have identical diterpenoid part with skeleton of *ent*-halimane.⁷⁷

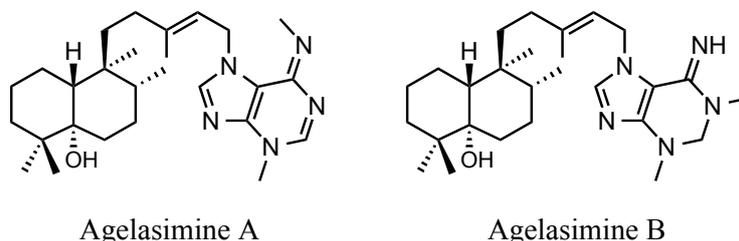


Figure 8: Agelasimines A and B.

Another group of most recently secondary metabolites isolated from a Red Sea sponge, *Raspailia* (Raspailiidae), are asmarines.^{81,82} They are also formed by the union of a diterpene and an adenine moieties, but they differ from agelasines in having the N⁶ adenine additionally connected to the diterpenoid part resulting in an extra 7-membered ring and they are not quaternary salts.

Asmarines A-C were reported first,⁸¹ asmarines D-F were described a couple of years later, together with revised structures of asmarines B and C.⁸² The same group reported other asmarines, being the last described asmarine K until now.^{83,84}

⁷⁷ Fathi-Afshar, R.; Allen, T. M. Biological active metabolites from *Agelas mauritiana*. *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 45-50.

⁸¹ Yosief, T.; Rudi, A.; Stein, Z.; Goldberg, I.; García Gravalos, M. D.; Schleyer, M.; Kashman, Y. Asmarines A-C; Three novel cytotoxic metabolites from the marine sponge *Raspailia* sp. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3323-3326.

⁸² Yosief, T.; Rudi, A.; Kashman, Y. Asmarines A-F, novel cytotoxic compounds from the marine sponge *Raspailia* species. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 299-304.

⁸³ Rudi, A.; Shalom, H.; Schleyer, M.; Benayahu, Y.; Kashman, Y. Asmarines G and H and barekol, three new compounds from the marine sponge *Raspailia* sp. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 106-109.

⁸⁴ Rudi, A.; Akin, M.; Gaydou, E.; Kashman, Y. Asmarines I, J, and K and nosyberkol: four new compounds from the marine sponge *Raspailia* sp. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1932-1935.

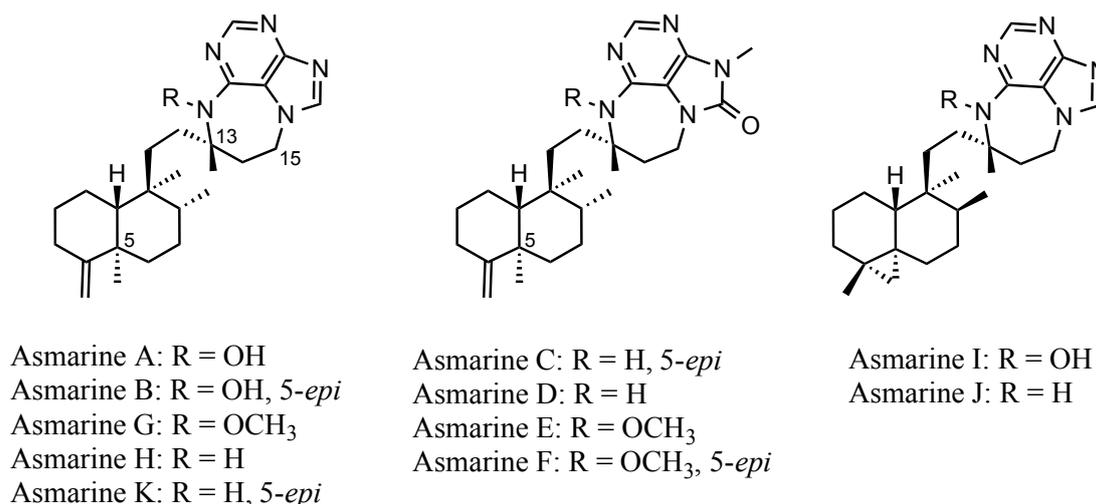


Figure 9: Asmarines A-K.

Asmarines A and B, which are the major components, have been evaluated as cytotoxic compounds against several cell lines (P-388 murine leukemia, A-549 human lung carcinoma, HT-29 human colon carcinoma and MEL-28 human melanoma)^{81,85} Asmarine B (GI₅₀= 0.12 to 0.24 μM) was more potent than asmarina A (GI₅₀=1.18 μM) and had a higher activity against the human lung and human colon carcinoma.⁸¹ All other asmarines described and its analogues, are less cytotoxic than asmarine A or B.⁸⁵

The wide range of biological activities makes these compounds an attractive target for synthesis. There has been carried out several approaches towards the synthesis of asmarine analogues^{85,87,88,89} but to date, the total synthesis of any asmarine has not been achieved yet.

⁸¹ Yosief, T.; Rudi, A.; Stein, Z.; Goldberg, I.; García Gravalos, M. D.; Schleyer, M.; Kashman, Y. Asmarines A-C; Three novel cytotoxic metabolites from the marine sponge *Raspailia* sp. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3323-3326.

⁸⁵ Pappo, D.; Shimony, S.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines: studies toward the total synthesis of asmarines. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 199-206.

⁸⁷ Pappo, D.; Rudi, A.; Kashman, Y. A synthetic approach towards the synthesis of asmarine analogues. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5941-5943.

⁸⁸ Pappo, D.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines-asmarine A analogues. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6493-6501.

⁸⁹ Vik, A.; Gundersen, L.-L. Synthetic studies directed towards asmarines; construction of the tetrahydrodiazepinopurine moiety by ring closing metathesis. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1931-1934.

OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación lleva algunos años trabajando en la preparación de análogos de terpenilpurinas relacionados con agelasiminas y asmarinas, productos naturales que, como se ha indicado anteriormente, están formados por la unión de un resto diterpénico sobre la posición N-7 de un anillo de purina. Estos productos naturales presentan propiedades citotóxicas muy interesantes, pero se aíslan en pequeñas cantidades de sus fuentes naturales, por lo que resulta de gran interés la preparación de análogos, de origen sintético o semisintético, que puedan ser evaluados biológicamente y que permitan establecer conclusiones de relación estructura-actividad para determinar los fragmentos estructurales necesarios para la actividad biológica de estos compuestos.

Así se inició el estudio de la alquilación de diferentes purinas con cadenas monoterpénicas¹¹⁰ y diterpénicas degradadas¹¹¹ obteniéndose, en esos primeros trabajos, los productos de alquilación en el nitrógeno N-9 del anillo de purina principalmente.

Pero para poder obtener análogos tanto de asmarinas como de agelasiminas, es necesario que el resto alquílico se sitúe en el nitrógeno N-7 de la purina, lo que llevó a plantear la puesta a punto de una síntesis selectiva de 7-alkilpurinas. Los procedimientos más habituales descritos en la bibliografía para obtener 7-alkilpurinas, como se ha detallado, pasan por la alquilación, en mayor o menor medida, del anillo de purina o por la construcción de dicho anillo a partir de la pirimidina convenientemente alquilada, ambos procedimientos se han utilizado en el presente trabajo.

¹¹⁰ Delgado Gómez, L. Aproximación a la síntesis de análogos de productos marinos citotóxicos. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2004**.

¹¹¹ Sánchez Rubio, R. Transformación de diterpenoides en derivados purínicos potencialmente citotóxicos. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2002**.

Por otro lado, aprovechando la experiencia del grupo de investigación en el aislamiento de terpenoides naturales con restos decalínicos semejantes a los que presentan los metabolitos secundarios marinos mencionados en el apartado de introducción,^{111,112} se decidió utilizar ácido cuprésico, aislable de las arcéstidas de *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae), como precursor de los sustituyentes alquílicos de naturaleza diterpénica sobre el anillo de purina. También se han elegido otros restos terpénicos (isoprenoides y monoterpenoides) disponibles comercialmente, lo que nos permitirá analizar la influencia del tamaño del terpenoide en la citotoxicidad de estos compuestos.

Continuando en la misma línea de los trabajos anteriores,^{112,113,114} el objetivo general del presente Trabajo de Tesis Doctoral es la obtención de nuevas alquilpurinas y otros sistemas heterocíclicos relacionados y/o análogos a los que presentan algunos metabolitos secundarios de origen marino como asmarinas, utilizando como precursores tanto la 6-cloropurina como la 5-amino-4,6-dicloropirimidina.

Este objetivo general se puede dividir en los objetivos específicos siguientes:

1. Preparación de 9- y 7-alquilpurinas a partir de 6-cloropurina.
2. Preparación selectiva de 7-alquil-6-cloropurinas.
3. Obtención de sistemas heterocíclicos de siete miembros fusionados al anillo de purina.
4. Evaluación citotóxica de compuestos intermedios y finales.

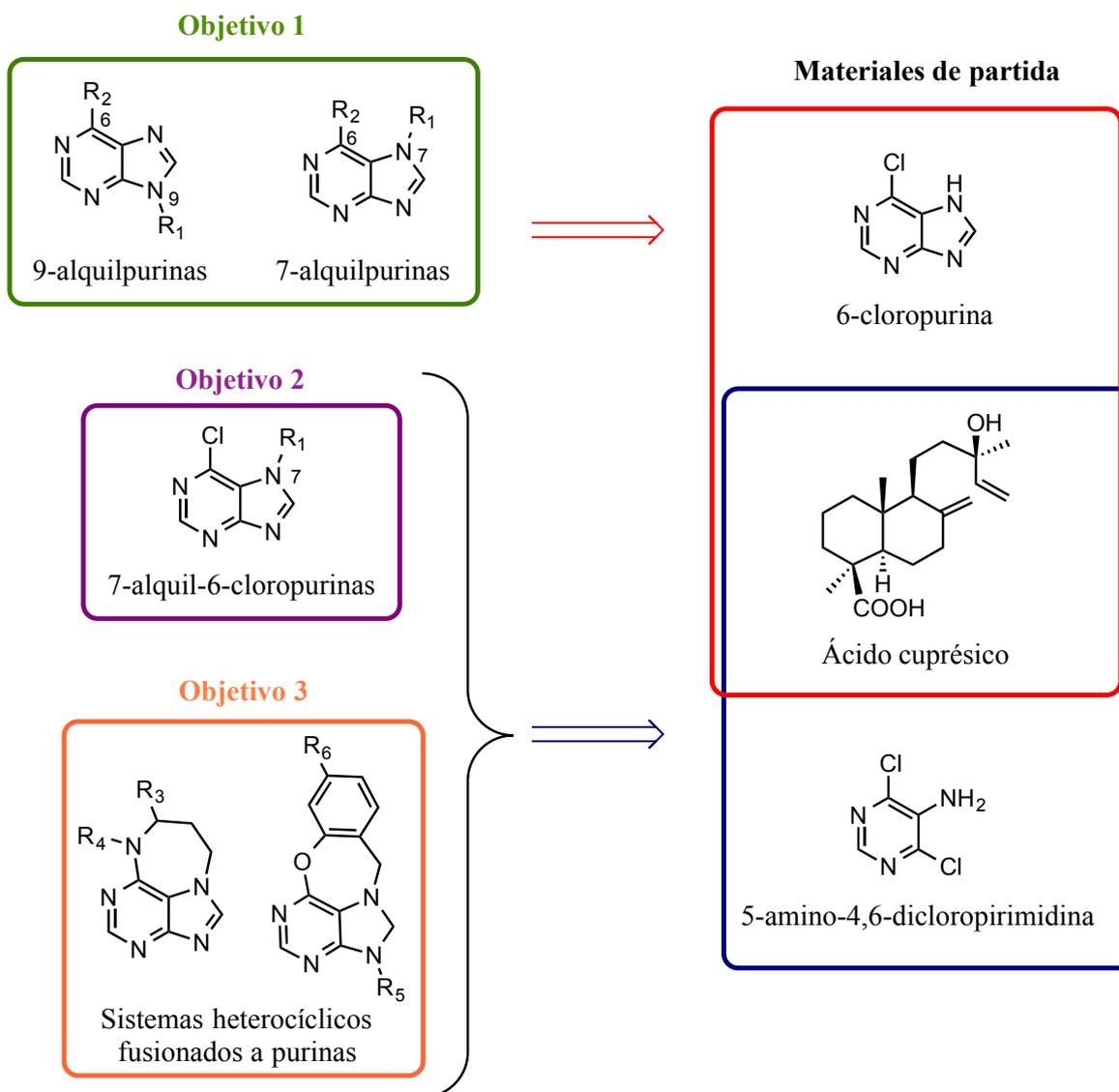
¹¹¹ Sánchez Rubio, R. Transformación de diterpenoides en derivados purínicos potencialmente citotóxicos. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2002**.

¹¹² Pérez Gómez, M. Síntesis de nuevas diterpenilpurinas a partir de ácido cuprésico. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2008**.

¹¹³ Sánchez Cornejo, M. Síntesis selectiva de 7-alquilpurinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2007**.

¹¹⁴ Valles Martín, E. Aproximación a la síntesis del sistema heterocíclico de asmarinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2012**.

Todos estos objetivos aparecen recogidos en el siguiente esquema retrosintético:



OBJECTIVES

*Our research group has been working for a few years on preparation of terpenylpurine analogues related with agelasines and asmarines, which are natural products formed by a diterpene moiety attached to the N-7 position of an adenine derivative, as it was stated above. These natural products show very interesting cytotoxic properties, but they are isolated in small quantities from their natural sources, so it is interesting the preparation of different analogues, which can be biologically evaluated and to draw conclusions on structure-activity relationship in order to determine the structural fragments needed for their biological activity.

Thus, previous alkylation studies of different purines with monoterpene¹¹⁰ and degraded diterpene¹¹¹ chains yielded purine derivatives mainly alkylated at the N-9 nitrogen of the purine ring.

However, in order to get asmarine and agelasimine analogues, it is necessary that the alkyl moiety would be placed at the N-7 nitrogen of purine. This has prompted us to propose a selective synthesis of 7-alkylpurines. The most common ways described in literature to synthesize 7-alkylpurines, as previously detailed in the introductory section are alkylation of purine ring or construction of the purine system from a conveniently alkylated pyrimidine, both ways have been used in this work.

* References including in this objectives keep the numbering from the spanish document.

¹¹⁰ Delgado Gómez, L. Aproximación a la síntesis de análogos de productos marinos citotóxicos. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2004**.

¹¹¹ Sánchez Rubio, R. Transformación de diterpenoides en derivados purínicos potencialmente citotóxicos. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2002**.

Additionally, taking in consideration the experience of our research group in isolation of natural terpenoids with similar decaline moieties to the marine secondary metabolites above mentioned,^{111,112} we decided to use cupressic acid, isolable from cones of *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae), as a precursor of alkyl substituents of diterpene nature in the purine ring. Furthermore, other terpenic cores (isoprenoid and monoterpenoides) commercially available have been chosen, enabling us to analyze the influence of the terpenoid size on the cytotoxicity of these alkylpurines.

Continuing with the research line of previous works,^{112,113,114} the general objective of this Doctoral Thesis is to obtain new alkylpurines and other related heterocyclic systems analogues to some marine secondary metabolites as asmarines, using as precursor of the purine systems both 6-chloropurine and 5-amino-4,6-dichloropyrimidine.

This general objective can be divided into the following specific objectives:

1. Preparation of 9- and 7-alkylpurines from 6-chloropurine.
2. Selective preparation of 7-alkyl-6-chloropurines.
3. Synthesis of seven membered heterocyclic systems fused to the purine ring.
4. Cytotoxic evaluation of intermediate and final compounds.

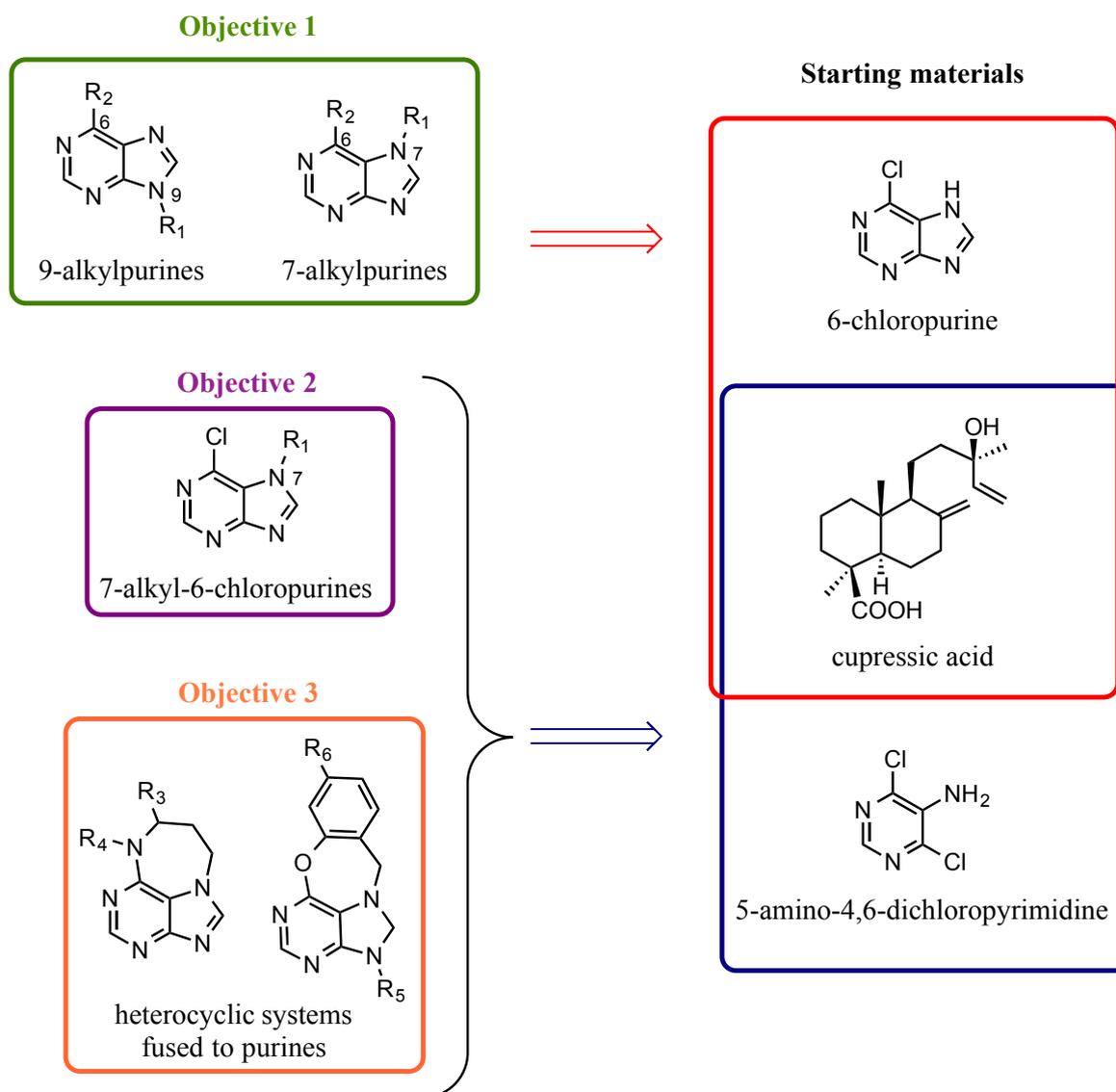
¹¹¹ Sánchez Rubio, R. Transformación de diterpenoides en derivados purínicos potencialmente citotóxicos. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2002**.

¹¹² Pérez Gómez, M. Síntesis de nuevas diterpenilpurinas a partir de ácido cuprésico. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2008**.

¹¹³ Sánchez Cornejo, M. Síntesis selectiva de 7-alkilpurinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2007**.

¹¹⁴ Valles Martín, E. Aproximación a la síntesis del sistema heterocíclico de asmarinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2012**.

All of these objectives are collected at the following retrosynthetic scheme:



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. PREPARACIÓN DE ALQUILPURINAS

El término alquilpurina puede resultar demasiado genérico al incluir anillos de purina con un grupo alquilo en cualquier posición del anillo, en nuestro caso nos centraremos, de acuerdo al primer objetivo planteado en este trabajo, en las purinas y/o adeninas con grupos alquilo en los nitrógenos N-7, N-9 y en el grupo NH₂ de la posición C-6.

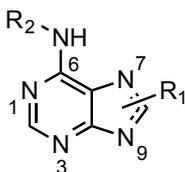


Figura 40: Estructura general de alquiladeninas.

El procedimiento más habitual para introducir estos sustituyentes como ya se ha mencionado, es la alquilación con derivados halogenados que conduce mayoritariamente a compuestos alquilados en el nitrógeno N-9 y en menor proporción en N-7. Está descrito que reacciones de alquilación de 6-cloropurina con derivados halogenados dan lugar a mezclas de N-9 y N-7-alquilpurinas, ambos isómeros pueden separarse posteriormente por cromatografía en columna, obteniendo una mayor proporción de los isómeros alquilados en N-9 (55 %) respecto a los alquilados en N-7 (21 %).¹¹⁵ Algunos autores han realizado la alquilación regioselectiva de guanina, utilizando ácidos como catalizadores para obtener selectivamente los isómeros alquilados en N-7 y sin catalizador para los alquilados en N-9, siendo éstos más estables termodinámicamente.¹⁰⁰

En trabajos anteriores realizados por nuestro grupo de investigación, se han obtenido purinas alquiladas en las posiciones N-9, N-7 y N-3 por reacción de purinas con derivados halogenados.¹¹² Según estos resultados previos y, como era previsible, los compuestos mayoritarios obtenidos fueron siempre las alquilpurinas con el sustituyente en el nitrógeno N-9, acompañadas en la mayoría de los casos del regioisómero alquilado en N-7 en menor

¹¹⁵ Tunçbilek, M.; Ateş-Alagöz, Z.; Altanlar, N.; Karayel, A.; Özbey, S. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new substituted purine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1693-1700.

¹⁰⁰ Singh, D.; Wani, M. J.; Kumar, A. A simple solution to the age old problem of regioselective functionalization of guanine: first practical synthesis of acyclic N⁹- and/or N⁷-guanine nucleosides starting from N²,N⁹-diacetylguanine. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4665-4668.

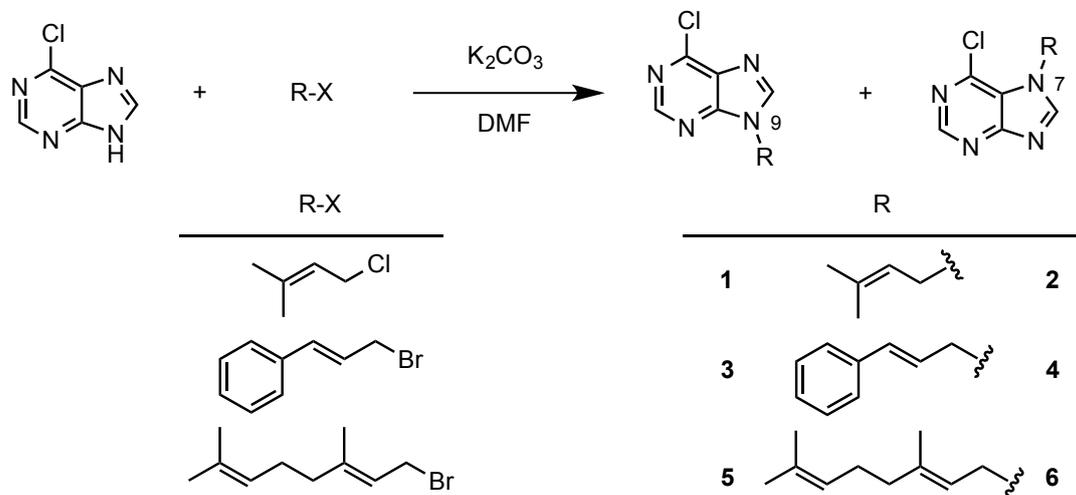
¹¹² Pérez Gómez, M. Síntesis de nuevas diterpenilpurinas a partir de ácido cuprésico. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2008**.

proporción y en algún caso incluso se consiguió aislar del producto de reacción una pequeña cantidad de las purinas alquiladas en N-3. Estos regioisómeros se pudieron separar por cromatografía sobre gel de sílice, observándose que siempre se eluían en primer lugar las correspondientes 9-alkilpurinas seguidas de las 7-alkilpurinas, siendo los isómeros alquilados en N-3 los más polares de todos.

De acuerdo con estos antecedentes, nos hemos planteado obtener purinas alquiladas en N-9 y N-7 con radicales alquilo de diferente tamaño utilizando derivados halogenados, bien disponibles comercialmente o bien procedentes de la transformación de derivados terpenoides obtenidos de sus fuentes naturales, así como purinas derivadas de adenina alquiladas en el grupo amino y observar cómo varía su citotoxicidad en función de las diferentes cadenas alquílicas introducidas.

A.1. OBTENCIÓN DE 7/9-ALQUIL-6-CLOROPURINAS

A.1.1. Alquilación de 6-cloropurina con derivados halogenados comerciales



La 6-cloropurina se hizo reaccionar con derivados halogenados comerciales: 1-cloro-3-metilbut-2-eno, bromuro de cinamilo y bromuro de geranilo. La reacción se llevó a cabo en presencia de base (K_2CO_3) y dimetilformamida (DMF) como disolvente, obteniéndose un producto de reacción en cada caso del que se aislaron, por cromatografía sobre gel de sílice, los compuestos **1-6** resultantes de la alquilación directa de la 6-cloropurina.

De acuerdo con la bibliografía¹⁰⁰ y las experiencias previas en nuestro grupo de investigación, los compuestos **1**, **3** y **5**, aislados en primer lugar por cromatografía en columna sobre gel de sílice, fueron en todos los casos los productos mayoritarios y se identificaron como purinas alquiladas en la posición N-9, y los compuestos **2**, **4** y **6**, aislados posteriormente y en menor proporción, se identificaron como purinas alquiladas en N-7. Todo ello se confirmó mediante el análisis de sus datos de RMN de ¹H y de ¹³C y experimentos de RMN bidimensional H/C realizados anteriormente con N-9 y N-7-butil-6-cloropurinas¹¹³ confirmando de forma inequívoca la posición del grupo alquilo en los derivados de la 6-cloropurina.

En los espectros de RMN de ¹³C de estos compuestos hay que mencionar que existen diferencias en los desplazamientos químicos de los carbonos C-4 y C-5 de las 6-cloropurinas en cada uno de los regioisómeros del orden de 10 ppm, datos que son suficientemente significativos para poder utilizarlos como criterio de identificación y caracterización de purinas alquiladas en N-9 y N-7.^{116,117}

Los valores de los desplazamientos químicos (δ) de RMN de ¹³C de dichos carbonos se recogen en la tabla siguiente:

	N-9/ δ en ppm	N-7/ δ en ppm
C-4	~ 152	~ 162
C-5	~ 131	~ 122

¹⁰⁰ Singh, D.; Wani, M. J.; Kumar, A. A simple solution to the age old problem of regioselective functionalization of guanine: first practical synthesis of acyclic N⁹- and/or N⁷-guanine nucleosides starting from N²,N⁹-diacetylguanine. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4665-4668.

¹¹³ Sánchez Cornejo, M. Síntesis selectiva de 7-alkilpurinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2007**.

¹¹⁶ Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, **1998**.

¹¹⁷ Kjellberg, J.; Johansson, N. G. Characterization of N-7 and N-9 alkylated purine analogues by ¹H and ¹³C NMR. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 6541-6544.

A.1.2. Alquilación de 6-cloropurina con 15-bromo-15-desoxiisocupresato de metilo obtenido a partir de ácido cuprésico

Para aproximarse a la síntesis de análogos de asmarinas y agelasimas, uno de los objetivos propuestos en este trabajo, es necesario disponer de derivados diterpénicos funcionalizados en la cadena lateral que lleven a la obtención de las correspondientes diterpenilpurinas.

Para la obtención de dichas diterpenilpurinas se necesitan en primer lugar derivados diterpénicos con funciones electrofílicas capaces de reaccionar con los nitrógenos nucleofílicos de 6-cloropurina. Para ello y, aprovechando la experiencia del grupo de investigación en el aislamiento y caracterización de compuestos naturales, se eligió el ácido cuprésico, que además de ser abundante en los extractos de *n*-hexano de las arcéstidas de *Cupressus sempervirens*, presenta un sistema decalínico similar al de los compuestos marinos asmarinas y agelasimas, y funcionalizaciones requeridas en la cadena lateral, fácilmente transformables en las funciones electrofílicas mencionadas.

Aislamiento del ácido cuprésico

El ácido cuprésico es un ácido diterpénico que nuestro grupo de investigación ha aislado con anterioridad de la fracción ácida de un extracto de *n*-hexano de arcéstidas de *C. sempervirens*,¹¹¹ dispone de un grupo hidroxilo terciario en la cadena lateral, fácilmente transformable tanto en derivados halogenados como en derivados carbonílicos útiles para obtener posteriormente las alquilpurinas.

Así, a partir de un extracto de *n*-hexano de arcéstidas de *C. sempervirens* y siguiendo el procedimiento esquematizado en la figura siguiente, se aisló un 63,5 % de ácido *trans*-comúnico y un 16,4 % de ácido cuprésico, **7**, respecto al peso de la fracción ácida, cuyos datos espectroscópicos de RMN de ¹H y ¹³C son coincidentes con los encontrados en bibliografía.¹¹⁸

¹¹¹ Sánchez Rubio, R. Transformación de diterpenoides en derivados purínicos potencialmente citotóxicos. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2002**.

¹¹⁸ Gough, L. J.; Mills, J. S. The occurrence of imbricatolic acid in *Cupressus* resins. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 1093-1096.

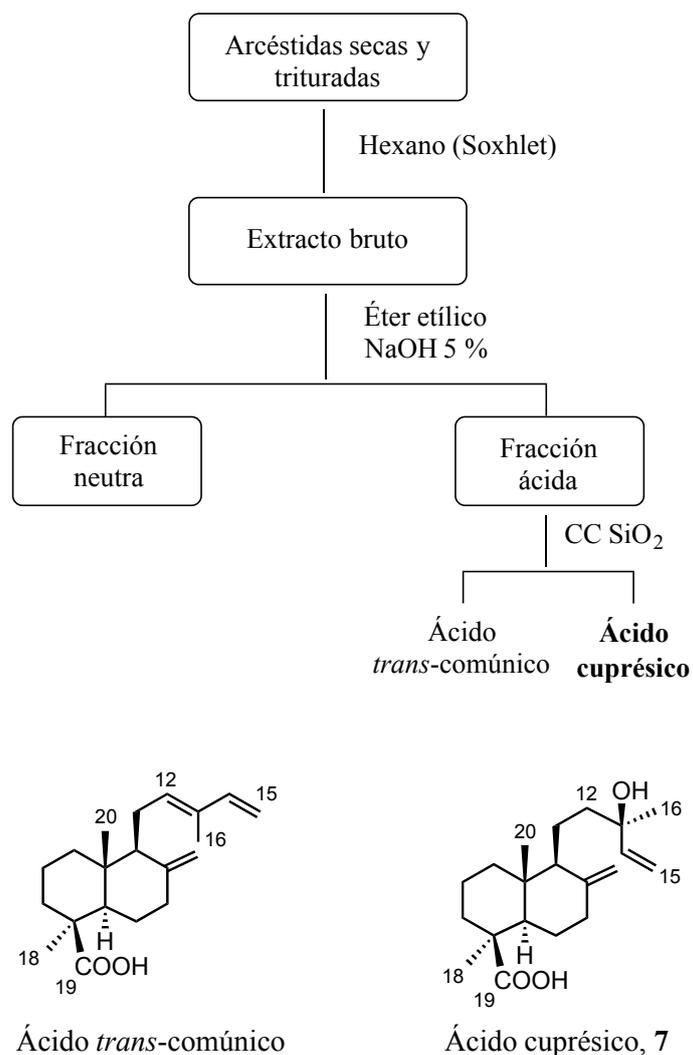


Figura 41: Esquema del aislamiento del ácido cuprésico.

Obtención de 15-bromo-15-desoxiisocupresato de metilo

En primer lugar se procedió a la transformación del ácido cuprésico, **7**, en éster metílico, **8**.

El procedimiento más utilizado para la obtención de ésteres metílicos es el tratamiento de los ácidos carboxílicos con una disolución etérea saturada de diazometano, pero el elevado coste que supone actualmente la adquisición de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida para obtener dicha disolución, nos llevó a buscar un procedimiento alternativo para la esterificación del ácido cuprésico, **7**, necesaria para llevar a cabo las posteriores transformaciones.

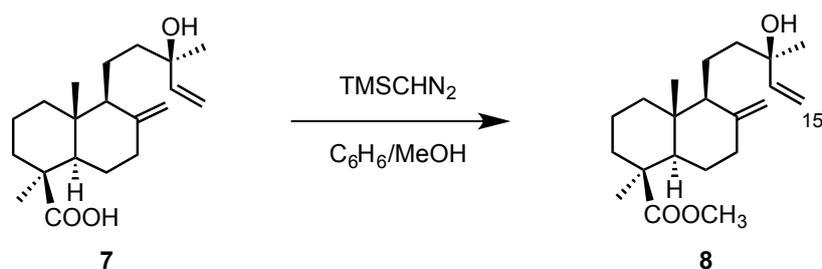
Así, cuando se esterificó el ácido cuprésico con una disolución etérea saturada de diazometano se obtuvo, como era de esperar, un elevado rendimiento del éster metílico, **8**, (96 %).

Cuando se emplearon otros procedimientos de esterificación alternativos, utilizando diferentes reactivos, disolventes y condiciones de reacción,^{119,120,121,122} se obtuvieron productos de reacción y rendimientos variables.

Reactivo	Disolvente	T ^a	t	Producto (%)
DMC/DBU	MeOH	Δ	8 d	8 (40 %)
CH ₃ I/K ₂ CO ₃	Acetona	T.a.	75 min	8 (89 %)
TMSCHN ₂	<i>t</i> -BuMeO	T.a.	1 h	7 (m. c.) [*]
TMSCHN ₂	CH ₂ Cl ₂	T.a.	1 h	7 (m. c.) [*]
TMSCHN ₂	C ₆ H ₆ /MeOH	T.a.	1 h	8 (98 %)

* Mezclas complejas (m. c.) cuyos espectros de RMN de ¹H mostraron la presencia mayoritaria del ácido cuprésico de partida, **7**.

A la vista de estos resultados, podemos decir que los agentes alquilantes alternativos a diazometano y que permitieron la formación del éster metílico, **8**, con rendimientos elevados son: el ioduro de metilo y el trimetilsilildiazometano, siendo este último el procedimiento alternativo con mejor rendimiento y que fue utilizado sucesivamente en este trabajo.



¹¹⁹ Shieh, W-C.; Dell, S.; Repič, O. Nucleophilic catalysis with 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) for the esterification of carboxylic acids with dimethyl carbonate. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2188-2191.

¹²⁰ Ram, R. N.; Charles, I. Selective esterification of aliphatic nonconjugated carboxylic acids in the presence of aromatic or conjugated carboxylic acids catalysed by NiCl₂·6H₂O. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 7335-7340.

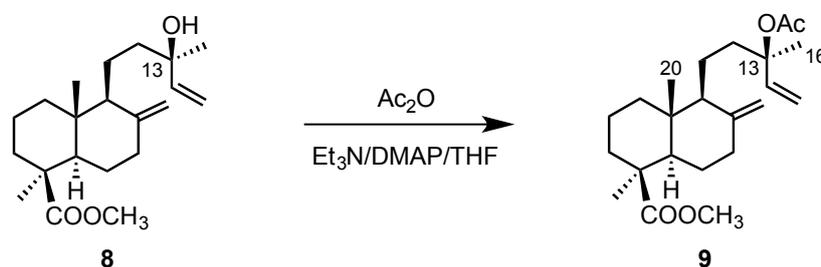
¹²¹ Rodríguez, A.; Nomen, M.; Spur, B. W.; Godfroid, J. J. A selective method for the preparation of aliphatic methyl esters in the presence of aromatic carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8563-8566.

¹²² Hashimoto, N.; Aoyawa, T.; Shioiri, T. New methods and reagents in organic synthesis. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 1475-1478.

Una vez obtenido el éster metílico **8**, se procedió a transformar su cadena lateral y funcionalizar el carbono C-15 como derivado halogenado, utilizando diferentes rutas sintéticas encaminadas a la isomerización y sustitución del grupo hidroxilo por un derivado halogenado, llevándolas a cabo con aislamiento de los compuestos intermedios o bien realizándolas en un solo paso.

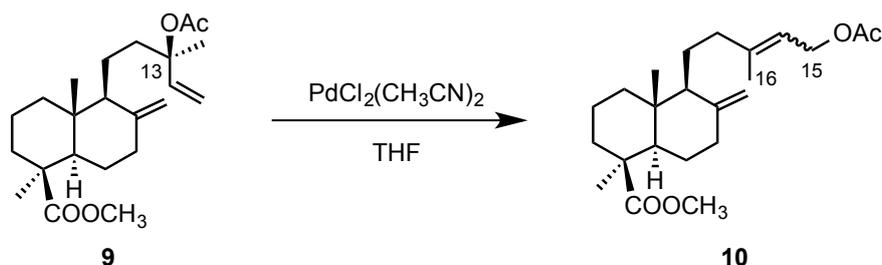
Así, la acetilación del alcohol terciario del cupresato de metilo, **8**, y su posterior isomerización condujo a la funcionalización del carbono C-15, que fácilmente se transformó en derivado bromado como se muestra a continuación.

La acetilación del alcohol terciario del cupresato de metilo, **8**, en C-13, se llevó a cabo en presencia de Ac_2O y 4-dimetilaminopiridina (DMAP), obteniendo el acetilcupresato de metilo, **9**, en cuyo espectro de RMN de ^1H se observó una nueva señal singlete a 1,87 ppm asignable a los protones del metilo del grupo aceto de la posición C-13. A su vez, se observó un desapantallamiento de la señal singlete que corresponde a los hidrógenos del metilo de la posición C-16 (de 1,25 a 1,40 ppm) y un apantallamiento de la señal singlete asignable al metilo de la posición C-20 (de 0,47 a 0,37 ppm).¹²³



Su posterior isomerización alílica por tratamiento con el complejo $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$, dio lugar al compuesto **10**, en cuyo espectro de RMN de ^1H se observó la desaparición de las señales del sistema ABX del grupo vinilo, la presencia de una nueva señal triplete a 5,26 ppm asignable al protón olefínico de C-14, que se encontraba acoplado con un doblete a 4,80 ppm asignable a los protones del metileno oxigenado en C-15, junto con un singlete a 2,00 ppm de los protones del grupo acetoxilo y otro singlete a 1,64 ppm perteneciente al metilo sobre doble enlace, lo que confirmó la isomerización del compuesto.¹²³

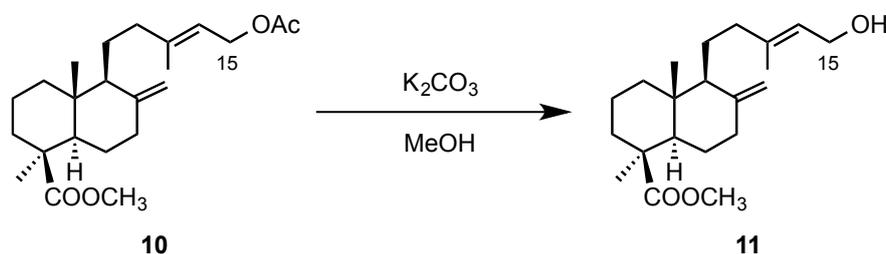
¹²³ Barrero, A. F.; Alvarez-Manzaneda, E. J.; Mar Herrador, M.; Alvarez-Manzaneda, R.; Quilez, J.; Chahboun, R.; Linares, P.; Rivas, A. The first route toward oxygenated monocarbocyclic terpenoids: synthesis of elegansidiol, a new sesquiterpene from *Santolina elegans*. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8273-8276.



El estudio detallado de los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C del compuesto **10** indica que se trata de una mezcla de isómeros *E/Z* aproximadamente en proporción 8:2 que no pudieron separarse por métodos cromatográficos, por lo que a lo largo de esta memoria se representará únicamente el isómero mayoritario *E*.

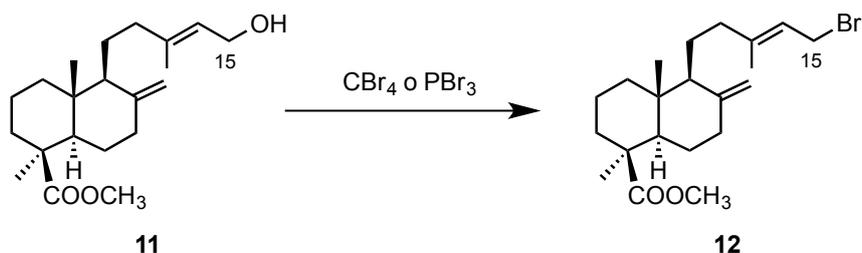
Las mezclas de isómeros *E/Z* en el doble enlace Δ^{13} se ponen claramente de manifiesto en los espectros de RMN de ^{13}C ,¹²⁴ donde la diferencia más significativa entre ambas parejas de isómeros se sitúa en el desplazamiento químico del grupo metilo C-16 situado sobre el doble enlace. Un desplazamiento químico hacia 16 ppm es característico de grupo metilo sobre un doble enlace con disposición *E*, mientras que un desplazamiento químico hacia 23 ppm es característico de una disposición *Z* del doble enlace. Ésto permite identificar el isómero mayoritario con el simple hecho de observar el desplazamiento químico de la señal del metilo C-16 en el espectro de RMN de ^{13}C .

Por saponificación del acetato alílico **10** en medio básico metanólico, se obtuvo el alcohol isocupresato de metilo, **11**, observando en el espectro de RMN de ^1H la ausencia del grupo acetilo y el apantallamiento de la señal doblete del metileno oxigenado en C-15 (de 4,80 a 4,14 ppm).

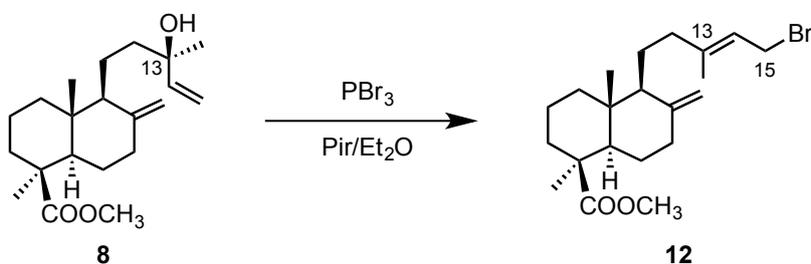


¹²⁴ Breitmaier, E.; Voelter W. "Carbon-13 NMR Spectroscopy", 3rd ed. VCH, Weinheim (Germany), 1987.

A partir del alcohol **11**, se procedió a la obtención del derivado bromado empleando dos procedimientos con dos agentes bromantes diferentes,¹²⁵ obteniendo un mejor rendimiento en el segundo procedimiento (80 %) y confirmando la estructura del compuesto bromado por RMN de ¹H, donde se observó un apantallamiento de la señal doblete asignable a los protones metilénicos de C-15 que pasaron de un valor de 4,14 a 3,95 ppm.



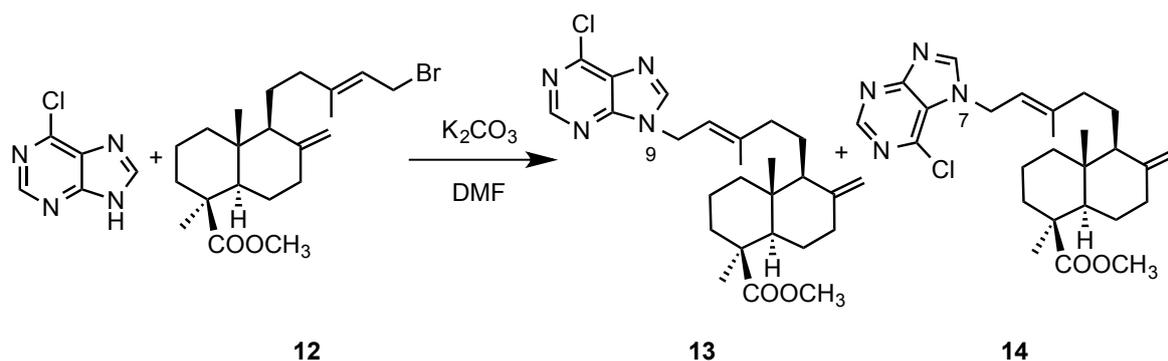
Otra ruta alternativa más directa, puesta a punto por nuestro grupo de investigación y encaminada a la obtención del derivado bromado **12**, consistió en el tratamiento del cupresato de metilo, **8**, con PBr₃, conduciendo directamente al derivado isomerizado y bromado **12**, con un rendimiento superior a los obtenidos en la ruta sintética anterior (82 % desde **8**).



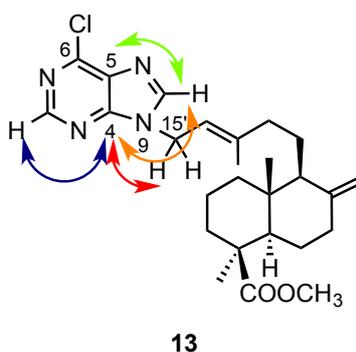
Obtención de diterpenilpurinas

Una vez obtenido el derivado bromado diterpénico **12**, se llevó a cabo la alquilación directa de la 6-cloropurina. Ambos compuestos se hicieron reaccionar en las mismas condiciones utilizadas para los derivados halogenados comerciales, obteniendo así un producto de reacción del que, después de cromatografiar sobre gel de sílice, se aislaron las diterpenil-6-cloropurinas **13** y **14**.

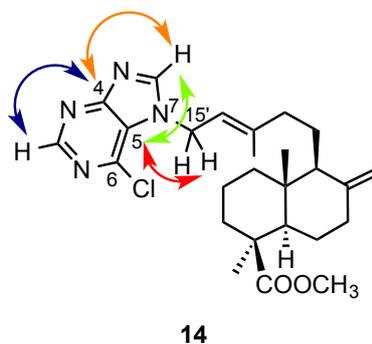
¹²⁵ Furuichi, N.; Hata, T.; Soetjijto, H.; Kato, M.; Katsumura, S. Common synthetic strategy for optically active cyclic terpenoids having a 1,1,5-trimethyl-*trans*-decalin nucleus: syntheses of (+)-acuminolide, (-)-spongianolide A, and (+)-scalarenial. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8425-8442.



El isómero mayoritario eluído en primer lugar resultó ser, como era de esperar, el **13**, donde el resto diterpénico se encontraba unido al nitrógeno N-9, como indicaban los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C y los experimentos de RMN bidimensionales H/C, observándose entre otras, una correlación a larga distancia entre el carbono C-4 (151,6 ppm) de la purina y los hidrógenos H-15' del resto diterpénico (4,87 ppm).



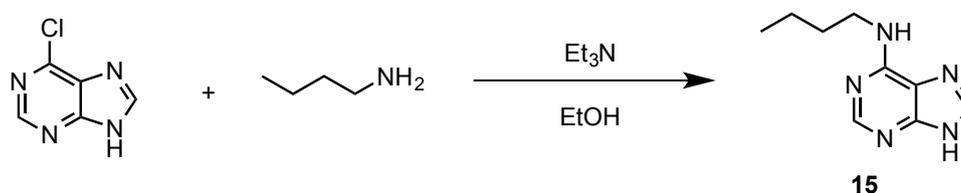
El isómero **14** aislado a continuación, resultó ser el alquilado en el nitrógeno N-7, según los experimentos de RMN bidimensionales H/C, donde se observó una correlación entre la señal del carbono de la posición C-5 de la purina (122,5 ppm) y la señal de los protones de la posición H-15' del resto diterpénico (5,07 ppm).



A.2. OBTENCIÓN DE *N*⁶-ALQUILADENINAS

Además de las 7-/9-alkilpurinas que se acaban de describir, nos planteamos obtener otras purinas con grupos alquilamino en la posición C-6 que puedan ser más similares al resto de adenina presente en asmarinas. Para ello se ha aprovechado la ventaja que presenta el átomo de cloro en posición C-6 para ser sustituido por diferentes nucleófilos,^{115,126} lo que permitiría aumentar el número de análogos sintetizados y analizar cómo influyen dichos sustituyentes en la citotoxicidad de este tipo de compuestos.

Con el fin de iniciar la síntesis de *N*⁶-alkiladeninas, en primer lugar se procedió a sustituir el átomo de cloro de 6-cloropurina por una amina con cadena lineal saturada de cuatro átomos de carbono y así poner a punto esta reacción.



Cuando la 6-cloropurina en presencia de butilamina se disolvió en etanol absoluto y Et₃N y se irradió con microondas,^{126,127} se obtuvo un producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice, aislándose la *N*⁶-butiladenina, **15**, en cuyo espectro de RMN de ¹H se observaron las señales correspondientes a la cadena del butilo y en el espectro de RMN de ¹³C se observó un apantallamiento significativo de la señal correspondiente al carbono C-5, respecto al desplazamiento del carbono C-5 de 6-cloropurina. Además en su espectro de masas de alta resolución, se encontró el ion 192,1247 *m/z*, lo que confirma una fórmula molecular de C₉H₁₃N₅ + H⁺ y con ello la estructura del compuesto **15**.

¹¹⁵ Tunçbilek, M.; Ateş-Alagöz, Z.; Altanlar, N.; Karayel, A.; Özbey, S. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new substituted purine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1693-1700.

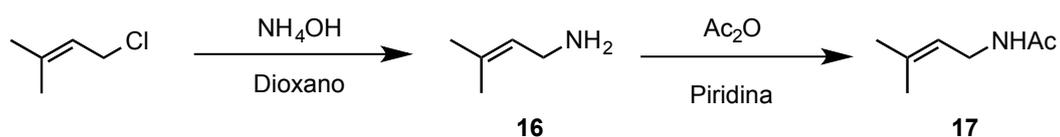
¹²⁶ Mik, V.; Szüčová, L.; Spichal, L.; Plíhal, O.; Nisler, J.; Zahajská, L.; Doležal, K.; Strnad, M. N⁹-substituted *N*⁶-(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]purine derivatives and their biological activity in selected cytokinin bioassays. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7244-7251.

¹²⁷ Elzein, E.; Palle, V.; Wu, Y.; Maa, T.; Zeng, D.; Zablocki, J. 2-Pyrazolyl-*N*⁶-substituted adenosine derivatives as high affinity and selective adenosine A₃ receptor agonists. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4766-4773.

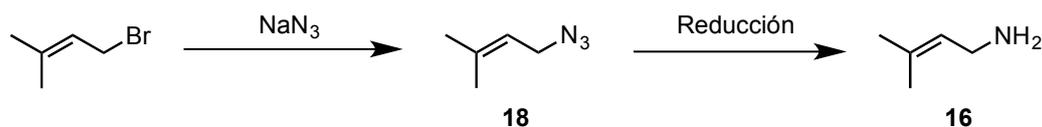
Una vez obtenida la *N*⁶-butiladenina, **15**, se procedió a sustituir la 6-cloropurina con otras aminas primarias. En primer lugar se trató de sintetizar la adenina sustituida con una cadena insaturada de cinco átomos de carbono de tipo isoprenoide, siendo el primer paso la obtención de la alquilamina 3-metilbut-2-enamina, no disponible comercialmente.

Así, a partir de los derivados halogenados 1-cloro-3-metilbut-2-eno y 1-bromo-3-metilbut-2-eno, se obtuvo la alquilamina correspondiente, utilizando diferentes procedimientos de reacción.

El tratamiento del derivado clorado 1-cloro-3-metilbut-2-eno con NH₄OH 30 %, condujo a una mezcla compleja en cuyo espectro de RMN de ¹H se observaron señales que ponían de manifiesto que contenía el producto de partida sin reaccionar junto con el producto esperado **16** en proporción 4:6. Esta mezcla se acetiló en presencia de anhídrido acético y piridina, identificando la amina acetilada **17**.



Otro procedimiento empleado consistió en utilizar un derivado halogenado más reactivo (1-bromo-3-metilbut-2-eno), su transformación en la azida y su posterior reducción a la alquilamina primaria.

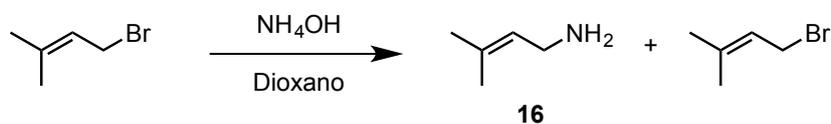


En la transformación del derivado bromado en azida y posterior reducción, se utilizaron diferentes procedimientos de reacción, como se muestra en la tabla.

	Disolvente	T ^a	t	Reducción	Producto
a ^{128,129}	Acetona	T.a.	5 d	NaI /FeCl ₃ /CH ₃ CN (25 min)	m.c.*
b ¹³⁰	Acetona:Agua (3:1)	T.a.	30 min	NaBH ₄ /MeOH (24 h)	m.c.*
c ¹³¹	DMF	T.a.	2 h	NaBH ₄ /MeOH (24 h)	m.c.*

* m.c. : mezcla compleja

Ninguno de estos procedimientos condujo a la formación de la alquilamina buscada, por lo que se recurrió a tratar el derivado bromado con NH₄OH 30 % en dioxano como se había realizado anteriormente con el derivado clorado. La reacción se llevó a cabo en dos condiciones diferentes, una fue a temperatura ambiente y otra por irradiación con microondas a 80 °C, obteniéndose de nuevo en ambos casos una mezcla de la alquilamina **16** y del producto de partida sin reaccionar en una proporción similar a la obtenida cuando se realizó con el derivado clorado (4:6), tal y como se observaba en el espectro de RMN de ¹H. Debido a la dificultad que presentaba la separación de dichos compuestos, la mezcla de reacción obtenida se utilizó para la sustitución nucleofílica de 6-cloropurina.



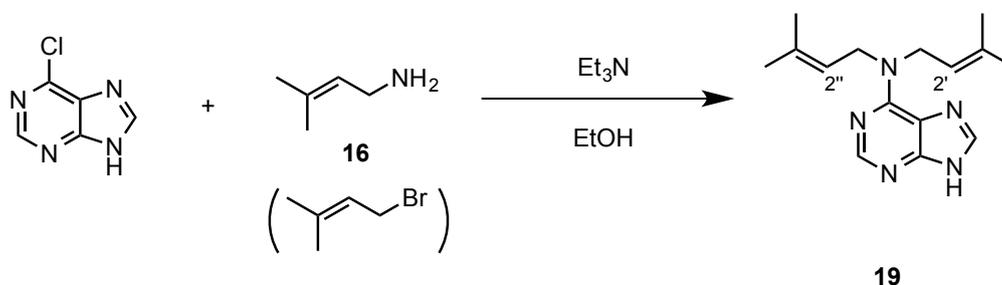
¹²⁸ Pei, Y.; Wickham, B. O. S. Regioselective syntheses of 3-aminomethyl-5-substituted isoxazoles: A facile and chemoselective reduction of azide to amine by sodium borohydride using 1,3-propanedithiol as a catalyst. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7509-7512.

¹²⁹ Kamal, A.; Ramana, K. V.; Ankati, H. B.; Ramana, A. V. Mild and efficient reduction of azides to amines: synthesis of fused [2,1-*b*]quinazolinones. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6861-6863.

¹³⁰ Sá, M. M.; Ramos, M. D.; Fernandes, L. Fast and efficient preparation of Baylis-Hillman-derived (*E*)-allylic azides and related compounds in aqueous medium. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11652-11656.

¹³¹ Patonay, T.; Dinya, Z.; Lévai, A.; Molnár, D. Reactivity of α -arylidene benzoheterocyclanone dibromides toward azide ion: an effective approach to 3-(α -substituted-benzyl)chromones and -1-thiochromones. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2895-2907.

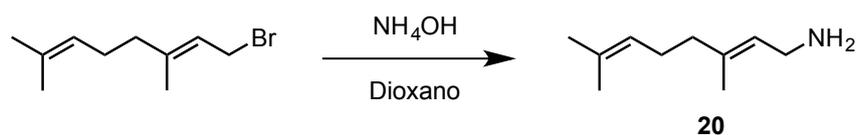
Una vez obtenida la alquilamina **16** impurificada con el derivado halogenado de partida, se procedió a la sustitución nucleofílica con 6-cloropurina en las condiciones anteriormente descritas, obteniéndose en este caso un producto de reacción del que se aisló, después de cromatografiar sobre gel de sílice, el compuesto **19**.



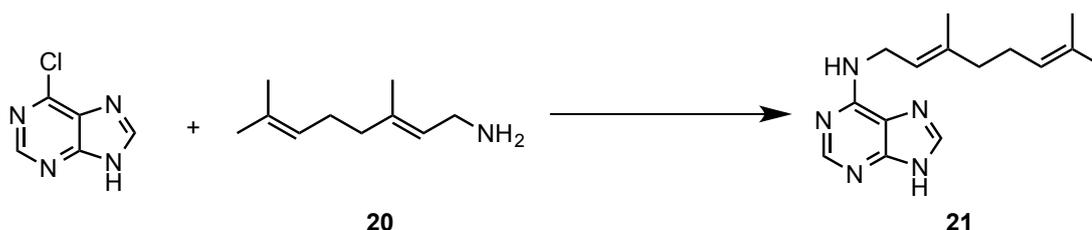
En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **19** se observaron dos señales triplete muy próximas a 5,24 y 5,31 ppm, asignables a los protones H-2' y H-2'', una señal doblete a 3,69 ppm equivalente a 4 hidrógenos asignable a los protones de los carbonos C-1' y C-1'' y una única señal singlete a 1,74 ppm asignable a cuatro metilos sobre doble enlace en los carbonos C-3' y C-3''. Estos datos, junto con los del espectro de RMN de ^{13}C , nos hicieron deducir que se trataba de un compuesto dialquilado con dos cadenas equivalentes en el nitrógeno de la posición C-6 de la adenina. También se comprobó su estructura por espectrometría de masas de alta resolución, que mostró un ión cuasimolecular $(\text{M}+\text{H})^+$ a 272,1872 m/z . No es de extrañar este resultado al haber utilizado para la sustitución de 6-cloropurina una mezcla de la amina **16** y el derivado bromado 1-bromo-3-metilbut-2-eno.

A continuación se llevó a cabo la obtención de geraniladenina. En este caso, la sustitución de 6-cloropurina se realizó tanto con la terpenilamina comercial, como con la obtenida a partir del bromuro de geranilo.

Así, cuando la 6-cloropurina y el bromuro de geranilo se trataron con NH_4OH 30 %, en las mismas condiciones de reacción, tanto a temperatura ambiente como por irradiación con microondas a 50 °C, se obtuvo un producto de reacción formado por una mezcla de geranilamina, **20**, y producto de partida, siendo menor la proporción del reactivo bromado presente que en el caso previo y, menor a su vez, en la reacción llevada a cabo a temperatura ambiente, tal y como se observó en sus espectros de RMN de ^1H . La mezcla de reacción al igual que en el caso anterior, se utilizó para realizar la sustitución nucleofílica de 6-cloropurina.



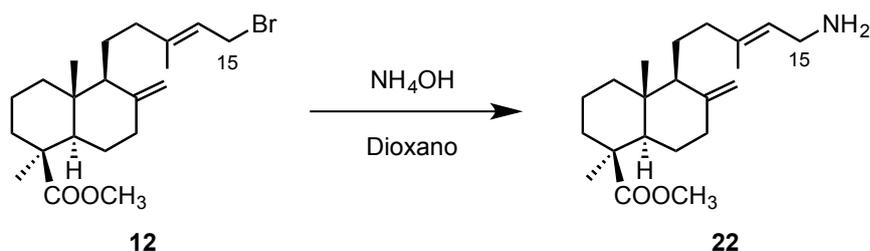
La sustitución nucleofílica de 6-cloropurina con la terpenilamina, **20**, tanto obtenida en las condiciones anteriormente descritas, como comercial (conseguida posteriormente), se llevó a cabo a reflujo y por irradiación con microondas a 100 °C. Solo cuando la reacción se llevó a cabo a reflujo se obtuvo un producto de reacción del que se consiguió aislar, después de cromatografiar sobre gel de sílice, el derivado de adenina **21**. No se observó en este caso, el compuesto de dialquilación en el nitrógeno en C-6, a diferencia del caso anterior, lo que pudo ser debido a una menor presencia de bromuro de geranilo en la mezcla utilizada y a los posibles impedimentos estéricos. Cuando la reacción se llevó a cabo por irradiación con microondas se obtuvo una mezcla compleja en la que se observó la presencia de la terpeniladenina **21**.



La estructura de la N^6 -terpeniladenina, **21**, fue confirmada por sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C y por espectrometría de masas de alta resolución, en cuyo espectro se observó un ión cuasimolecular a 272,1868 m/z , coincidente con la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5 + \text{H}^+$.

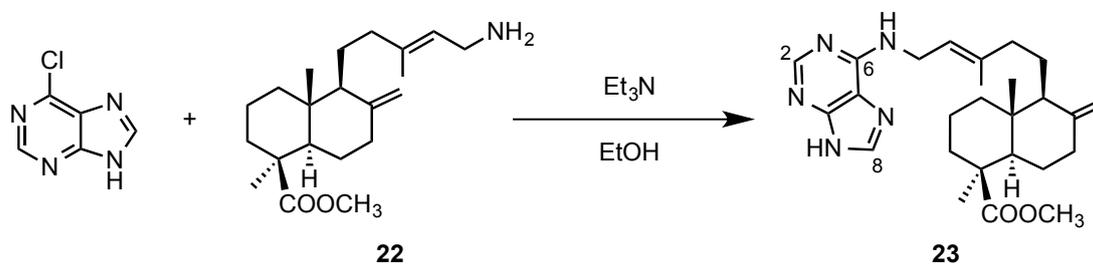
La obtención de la N^6 -diterpeniladenina se llevó a cabo por reacción de la 6-cloropurina con la amina diterpénica **22**, obtenida a partir del compuesto diterpénico bromado **12**, preparado a su vez a partir del ácido cuprésico, **7**, como ya se ha descrito en esta memoria, siguiendo la estrategia anterior, se obtuvo el derivado de adenina **23**.

La obtención de la diterpenilamina **22**, al igual que en los casos anteriores, se llevó a cabo con el compuesto diterpénico bromado, **12**, en presencia de NH_4OH 30 %, tanto a temperatura ambiente como por irradiación con microondas a 130 °C, obteniendo mejores resultados en este último caso con un rendimiento del 93 %.



Del estudio detallado de su espectro de RMN de ^1H , se observó un apantallamiento de la señal doblete asignable a los protones metilénicos de H-15, que pasa de 3,95 ppm en el compuesto bromado **12**, a 3,20 ppm en la diterpenilamina **22**. Esta es la señal más significativa que puso de manifiesto la formación de dicha amina.

La diterpenilamina **22** obtenida, se hizo reaccionar con 6-cloropurina en las mismas condiciones utilizadas anteriormente, obteniendo así un producto de reacción del que se aisló, por cromatografía sobre gel de sílice, la N^6 -diterpeniladenina **23**, en cuyo espectro de RMN de ^1H , se observaron dos señales singlete asignables a los hidrógenos H-2 y H-8 de la purina a 8,36 y 7,87 ppm respectivamente, así como el resto de señales pertenecientes a la estructura diterpénica, que junto con su espectro de masas de alta resolución permitió confirmar la estructura del compuesto **23**.



B. OBTENCIÓN SELECTIVA DE 7-ALQUILPURINAS

Para obtener análogos de asmarinas es necesario disponer de purinas alquiladas en el nitrógeno N-7. Como se ha visto en el capítulo anterior, por alquilación directa de purinas se obtienen mayoritariamente purinas alquiladas en N-9, por lo que para lograr nuestro objetivo se optó por un procedimiento alternativo construyendo el anillo de purina mediante la síntesis de Traube, es decir, a partir de una 4,5-diaminopirimidina convenientemente alquilada en el grupo amino de la posición C-5 (estructura II).

Entre los derivados de pirimidina disponibles comercialmente que se puedan adecuar al objetivo propuesto, elegimos la 5-amino-4,6-dicloropirimidina (I), precursor muy útil para obtener las pirimidinas intermedias mediante reacción de alquilación del grupo amino y sustitución de uno de los átomos de cloro. La condensación de la diaminopirimidina (II) con un agente acilante conduciría a los derivados purínicos alquilados en la posición N-7 (III). Esta ruta se recoge en el esquema retrosintético siguiente:



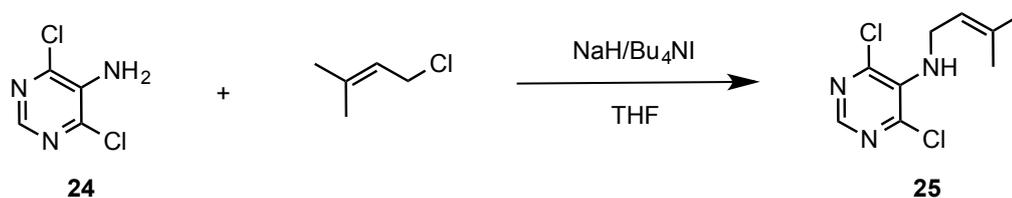
La reacción de sustitución de uno de los átomos de cloro podría llevarse a cabo previa o posteriormente a la alquilación del grupo amino de la posición C-5, ya que aunque existan dos grupos amino en la molécula, aquel en posición β respecto a los nitrógenos heterocíclicos presenta una mayor nucleofilia que el de la posición α , por lo que, en principio e independientemente del orden seguido en las reacciones, deberíamos obtener selectivamente 7-alkilpurinas en último término.

B.1. OBTENCIÓN DE 5-ALQUILAMINO-4,6-DICLOROPYRIMIDINAS

En primer lugar se optó por introducir el sustituyente alquilo sobre el nitrógeno de la posición C-5, para lo cual se utilizaron dos tipos de reacciones: reacciones de alquilación con un derivado halogenado y reacciones de aminación reductora con aldehídos.

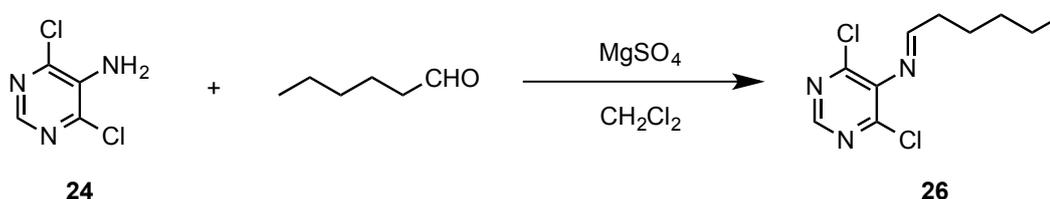
La obtención de 5-alkilamino-4,6-dicloropirimidinas por alquilación con derivados halogenados, se puso a punto partiendo de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, y el cloruro de isopentenilo utilizado previamente (1-cloro-3-metilbut-2-eno).

La alquilación del nitrógeno de la posición C-5 de la pirimidina **24**, con 1-cloro-3-metilbut-2-eno,¹³² dio lugar a un producto de reacción del que se aisló, por cromatografía sobre gel de sílice, la alquilpirimidina **25**, según confirman las señales que se pueden observar en sus espectros de RMN de ¹H y de ¹³C, así como su espectro de masas de alta resolución.



La introducción de un sustituyente alquilo sobre la función amina de la posición C-5 del compuesto de partida **24**, se planteó también a través de una reacción de aminación reductora entre dicha función amina y un aldehído alifático. Esta reacción se realizó por dos procedimientos: en un solo paso haciendo reaccionar la amina y el aldehído en presencia de un reductor sin aislar la imina intermedia¹³³ o bien confirmando por métodos espectroscópicos de RMN la formación de la imina, cuya posterior reducción conducirá a las 5-alkilamino-4,6-dicloropirimidinas deseadas.

En primer lugar se hizo reaccionar la pirimidina **24** con un aldehído saturado (hexanal), logrando detectar la presencia, en pequeñas cantidades, de la imina **26**.¹¹³



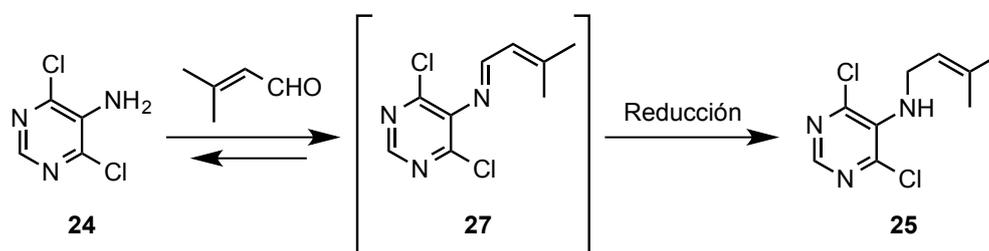
¹³² Gomtsyan, A.; Didomenico, S.; Lee, C-H.; Matulenko, M. A.; Kim, K.; Kowaluk, E. A.; Wismer, C. T.; Mikusa, J.; Yu, H.; Kohlhaas, K.; Jarvis, M. F.; Bhagwat, S. S. Design, synthesis, and structure-activity relationship of 6-alkynylpyrimidines as potent adenosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3639-3648.

¹³³ Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897-2904.

¹¹³ Sánchez Cornejo, M. Síntesis selectiva de 7-alkilpurinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2007**.

A continuación se llevó a cabo la aminación reductora con el aldehído insaturado 3-metilbut-2-enal, de estructura semejante al derivado halogenado utilizado para la alquilación directa de la pirimidina **24**, probando distintas condiciones de reacción, lo que daría lugar al mismo compuesto **25** obtenido anteriormente, utilizando una estrategia sintética diferente.

La reacción se llevó a cabo por diferentes procedimientos: en fase sólida homogeneizando los reactivos en un mortero a temperatura ambiente¹³⁴ o en un tubo cerrado en presencia de 1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridinadicarboxilato de dietilo y calor,¹³⁵ obteniendo en ambos casos la pirimidina **24** de partida sin reaccionar.



Cuando se utilizó $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ como catalizador de la reacción¹³⁶ en tricloroetano a temperatura ambiente, se obtuvo un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H se observó mayoritariamente el producto de partida **24** sin reaccionar y la presencia de la 5-alquilamino-4,6-dicloropirimidina **25**, y en alguna ocasión se detectó la presencia de la imina **27**.

Debido posiblemente a que el carácter nucleofílico del grupo amino en C-5 esté disminuido por el efecto atractor de electrones de los dos átomos de cloro en posición *orto*, se planteó invertir el orden de las reacciones conducentes a la obtención de la alquildiaminopirimidina correspondiente.

¹³⁴ Cho, B. T.; Kang, S. K. Direct and indirect reductive amination of aldehydes and ketones with solid acid-activated sodium borohydride under solvent-free conditions. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5725-5734.

¹³⁵ Nguyen, Q. P. B.; Kim, T. H. Solvent- and catalyst-free direct reductive amination of aldehydes and ketones with Hantzsch ester: synthesis of secondary and tertiary amines. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 4938-4943.

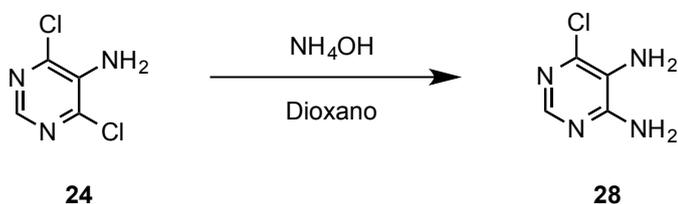
¹³⁶ Kumar, N. U.; Reddy, B. S.; Reddy, V. P.; Bandichhor, R. Iron triflate catalyzed reductive amination of aldehydes using sodium borohydride. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4354-4356.

B.2. OBTENCIÓN DE 5-ALQUILAMINO-4-AMINO-6-CLOROPIRIMIDINAS

En la ruta alternativa se utilizó como sustrato de partida la 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, obtenida a partir de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, por sustitución de un átomo de cloro por un grupo amino, lo que aumentaría el carácter nucleofílico del sustituyente amino en C-5 de la pirimidina, permitiendo así la preparación de 4,5-diamino-6-cloropirimidinas alquiladas en la posición C-5 y, por condensación con ortoformiato de trietilo, la obtención selectiva de 7-alquil-6-cloropurinas.

B.2.1. Preparación de 4,5-diamino-6-cloropirimidina

La sustitución nucleofílica de uno de los átomos de cloro de la 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, se llevó a cabo por tratamiento con NH_4OH 30 % en dioxano. Se realizó en condiciones de presión elevada tanto en un tubo cerrado^{113,114} como por irradiación con microondas, obteniéndose la 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, con buen rendimiento. En su espectro de RMN de ^1H se observó el apantallamiento de la señal singlete correspondiente al protón H-2 del derivado de pirimidina que pasó de resonar a 8,03 ppm en el compuesto de partida a 7,69 ppm en el compuesto **28**.¹³⁷



Una vez obtenida la 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, el paso siguiente fue realizar la alquilación de dicha amina. Al igual que en el apartado B.1. para obtener las pirimidinas alquiladas selectivamente en la posición C-5, partiendo en esta ocasión de la pirimidina **28**, se utilizaron las mismas estrategias sintéticas: por alquilación con derivados halogenados y por aminación reductora con aldehídos.

¹¹³ Sánchez Cornejo, M. Síntesis selectiva de 7-alquilpurinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2007**.

¹¹⁴ Valles Martín, E. Aproximación a la síntesis del sistema heterocíclico de asmarinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2012**.

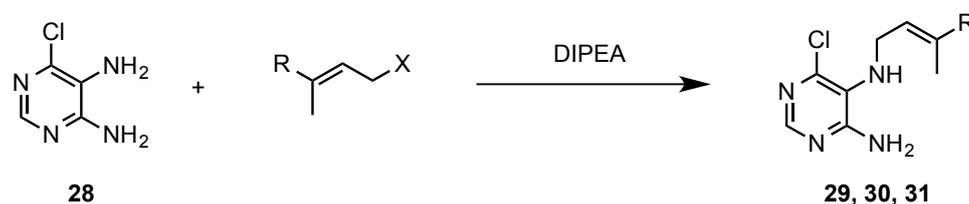
¹³⁷ Gerster, J. F.; Lindstrom, K. J.; Miller, R. L.; Tomai, M. A.; Birmachu, W.; Bomersine, S. N.; Gibson, S. J.; Imberston, L. M.; Jacobson, J. R.; Knafla, R. T. et al. Synthesis and structure-activity-relationships of 1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolines that induce interferon production. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3481-3491.

B.2.2. Por alquilación con derivados halogenados

Se llevó a cabo la alquilación de la 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, con derivados halogenados insaturados de cadenas de 5, 10 y 20 átomos de carbono, tanto comerciales como obtenidos a partir de fuentes naturales.

La pirimidina **28** presenta dos grupos amino susceptibles de alquilarse, sin embargo, como ya se ha comentado, la nucleofilia de ambos es diferente, siendo el grupo amino en posición β respecto a los nitrógenos de la pirimidina (en C-5) el de mayor carácter nucleofílico y por tanto, el más reactivo frente a electrófilos. Este hecho facilita la obtención posterior de purinas alquiladas selectivamente en N-7. En este caso, se utilizaron como electrófilos los mismos derivados halogenados alílicos de tipo hemiterpenoide, monoterpenoide y diterpenoide utilizados en el apartado A de este trabajo.

La reacción se llevó a cabo en todos los casos en presencia de base (diisopropiletilamina, DIPEA), bien en DMF a reflujo¹¹² o bien en dioxano por irradiación con microondas. Las condiciones de reacción y los productos obtenidos se recogen en la siguiente tabla.



Derivado halogenado	Disolvente	Condiciones	t	Producto
	DMF	Δ	24 h	 29
	Dioxano	MW	10 min	
	DMF	Δ	24 h	 30
	Dioxano	MW	10 min	
	DMF	Δ	24 h	 31
	Dioxano	MW	10 min	

¹¹² Pérez Gómez, M. Síntesis de nuevas diterpenilpurinas a partir de ácido cuprésico. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2008**.

La reacción de alquilación de la pirimidina **28** con los diferentes derivados halogenados se optimizó en ambas condiciones, obteniendo un mayor rendimiento en las reacciones llevadas a cabo por irradiación con microondas, reduciéndose además el tiempo de reacción.

En todos los casos el producto de reacción contenía mayoritariamente la pirimidina alquilada en el nitrógeno de la posición C-5, que fue purificada por cromatografía sobre gel de sílice o utilizada directamente para la preparación de las correspondientes purinas.

Los espectros de RMN de ^1H de los compuestos **29-31**, confirmaron la alquilación de la pirimidina **28** al observarse un desapantallamiento de la señal correspondiente al protón H-2 del anillo de pirimidina ($\sim 7,8-8,1$ ppm) y la aparición de una señal doblete ($\sim 3,5$ ppm) asignable a los protones del grupo metileno sobre nitrógeno, además del resto de señales esperables para el radical alquilo correspondiente.

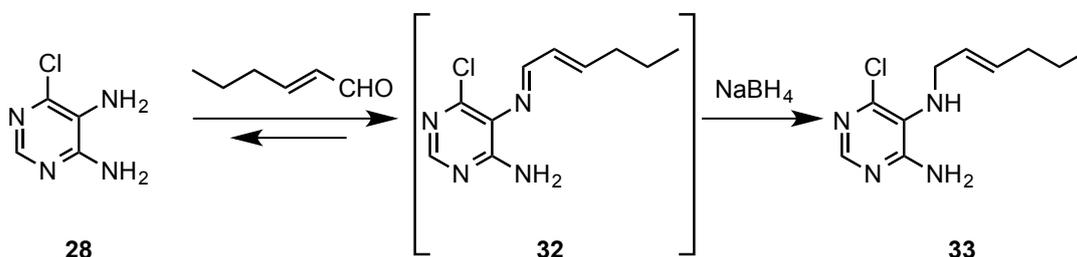
Como ya se comentó anteriormente, el derivado bromado **12** contenía mayoritariamente el isómero *E* en el doble enlace Δ^{13} de la cadena lateral del resto diterpénico, por lo que cabía esperar el mismo isómero en el compuesto **31**. Este hecho fue confirmado con el análisis de su espectro de RMN de ^{13}C , dado que el desplazamiento químico del grupo metilo C-16' presentaba un valor en torno a 16 ppm, característico de dicho isómero *E*.

B.2.3. Por aminación reductora

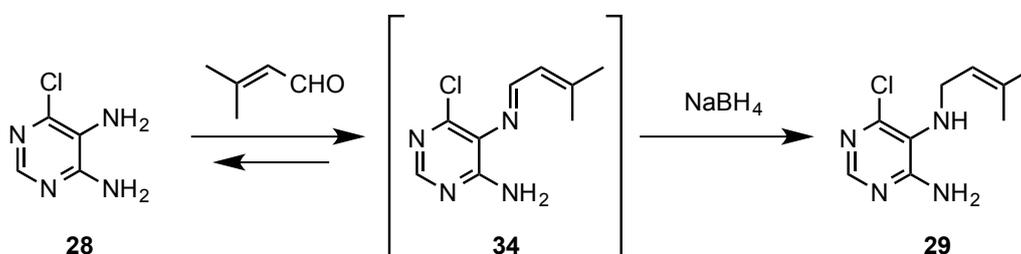
Las 4,5-diamino-6-cloropirimidinas alquiladas en el nitrógeno de la posición C-5 fueron obtenidas también por aminación reductora con aldehídos α,β -insaturados de cadenas de distinta longitud.

Cuando se hizo reaccionar la 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, con el aldehído hex-2*E*-enal a temperatura ambiente, se obtuvo un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H se pudo identificar la imina **32**.¹¹⁴

A continuación se llevó a cabo la reducción del compuesto con NaBH_4 obteniendo un producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice, aislándose la alquilpirimidina **33**. Este compuesto se pudo confirmar por su espectro de RMN de ^1H , en el cual no se observa la señal característica del protón imínico y sí podemos observar la presencia de una señal singlete a 7,78 ppm asignable al H-2 de la pirimidina, una señal doblete a 3,46 ppm asignable a los protones metilénicos de la alquilpirimidina, un multiplete comprendido entre 5,37 y 5,41 ppm asignable a los protones olefinicos del hexenilo y señales correspondientes al resto de la cadena alquílica.

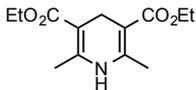


El siguiente aldehído utilizado en la aminación reductora fue 3-metilbut-2-enal, que permitió obtener la pirimidina **29** descrita en el apartado anterior.



¹¹⁴ Valles Martín, E. Aproximación a la síntesis del sistema heterocíclico de asmarinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, 2012.

Con el fin de optimizar la reacción se utilizaron diferentes condiciones^{114,135,136,138,139} de reacción que se recogen en la tabla siguiente:

	28:Aldehído	Disolvente	Condiciones	T ^a	t	Red.	Producto
<i>a</i>	1:3	EtOH	Tamiz 4 Å	T.a.	7 d	NaBH ₄	29 (39 %)
<i>b</i>	1,25:1	EtOH	MgSO ₄	80 °C	72 h	NaBH ₄	28
<i>c</i>	1:1	C ₂ H ₃ Cl ₃	Mg(ClO ₄) ₂	T.a.	24 h	NaBH ₄	28+29 (50 %)
<i>d</i>	1:3	-		150 °C	1 h	-	m.c. *
<i>e</i>	1:1,5	EtOH	Fe(OTf) ₃	T.a.	6 h	NaBH ₄	28+29 (50 %)
<i>f</i>	1:1,5	EtOH	Fe(OTf) ₃ , MW	200 °C	10 min (x2)	-	m.c. *
<i>g</i>	1:3	EtOH	Tubo cerrado	150 °C	5 min	NaBH ₄	29
<i>h</i>	1:2	EtOH	MW	200 °C	10 min	NaBH ₄	29
<i>i</i>	1:3	EtOH	MW	150 °C	10 min	NaBH ₄	29

* m.c.: mezcla compleja

En todos los casos se procedió a la formación inicial de la imina, añadiendo el reductor después de un tiempo. El seguimiento de la formación de la imina por cromatografía en capa fina no fue suficiente ya que se observaban los productos de hidrólisis de la misma durante la cromatografía, por lo que en los casos *a* y *b*, se recurrió al seguimiento por RMN de ¹H. Para ello se realizó la extracción de alícuotas de la mezcla de reacción en las que se siguió el desapantallamiento de la señal asignable a H-2 de la pirimidina **28** (7,69 ppm) hasta total desaparición dado que la pirimidina **28** fue el reactivo limitante en la mayoría de los casos.

¹¹⁴ Valles Martín, E. Aproximación a la síntesis del sistema heterocíclico de asmarinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2012**.

¹³⁵ Nguyen, Q. P. B.; Kim, T. H. Solvent- and catalyst-free direct reductive amination of aldehydes and ketones with Hantzsch ester: synthesis of secondary and tertiary amines. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 4938-4943.

¹³⁶ Kumar, N. U.; Reddy, B. S.; Reddy, V. P.; Bandichhor, R. Iron triflate catalyzed reductive amination of aldehydes using sodium borohydride. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4354-4356.

¹³⁸ Castro, M. A.; Miguel del Corral, J. M.; Gordaliza, M.; García, P. A.; Gómez-Zurita, M. A.; García-Grávalos, M. D.; de la Iglesia-Vicente, J.; Gajate, C.; An, F.; Mollinedo, F.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new selective cytotoxic cyclolignans derived from podophyllotoxin. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1214-1222.

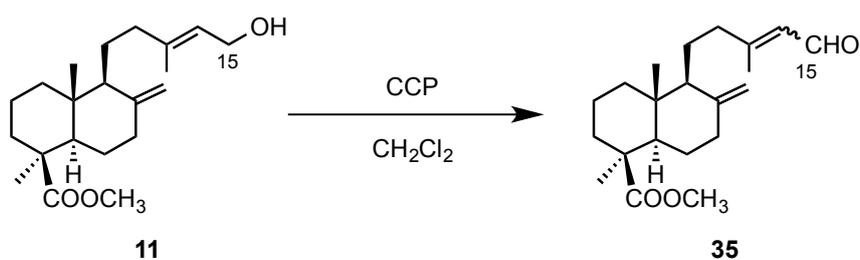
¹³⁹ Chakraborti, A. K.; Bhagat, S.; Rudrawar, S. Magnesium perchlorate as an efficient catalyst for the synthesis of imines and phenylhydrazones. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7641-7644.

Las mejores condiciones se obtuvieron cuando se llevó a cabo por irradiación con microondas, reduciendo así el tiempo de reacción a 10 min (*h e i*).

Si comparamos las dos rutas sintéticas planteadas para la obtención del compuesto **29**, tanto por alquilación directa con un derivado halogenado (clorado o bromado), como por aminación reductora con el aldehído 3-metilbut-2-enal, ambas rutas condujeron a la obtención del mismo compuesto **29**. La ruta más rápida fue la alquilación directa ya que permitió la obtención del compuesto en un tiempo de 10 min, llevando a cabo la reacción por irradiación con microondas, mientras que la aminación reductora requirió ese mismo tiempo para la obtención de la imina que posteriormente debía ser reducida para obtener la amina **29**.

Para la obtención de la alquilpirimidina **31** por aminación reductora, es necesario disponer del derivado diterpénico con la función aldehído en C-15, por ello el primer paso fue llevar a cabo su obtención a partir de los diterpenos naturales utilizados previamente: cupresato de metilo, **8**, e isocupresato de metilo, **11**.

La oxidación del isocupresato de metilo **11** con CCP^{140,141} condujo a la mezcla *E/Z* del aldehído **35** con un 70 % de rendimiento, como se pudo comprobar en su espectro de RMN de ¹H al aparecer una señal doblete ~ 9,9 ppm característica de la función aldehído α,β -insaturado.

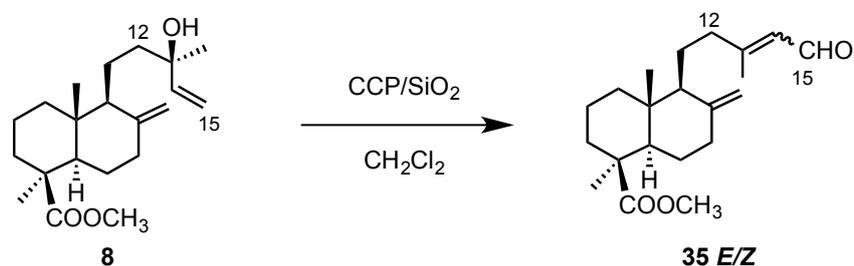


El aldehído **35** se obtuvo como mezcla de isómeros *E/Z* aproximadamente en proporción 7:3, con un 86 % de rendimiento cuando se trató directamente el cupresato de

¹⁴⁰ Lee, H-J.; Ravn, M. M.; Coates, R. M. Synthesis and characterization of abietadiene, levopimaradiene, palustradiene, and neoabietadiene: hydrocarbon precursors of the abietane diterpene resin acids. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6155-6167.

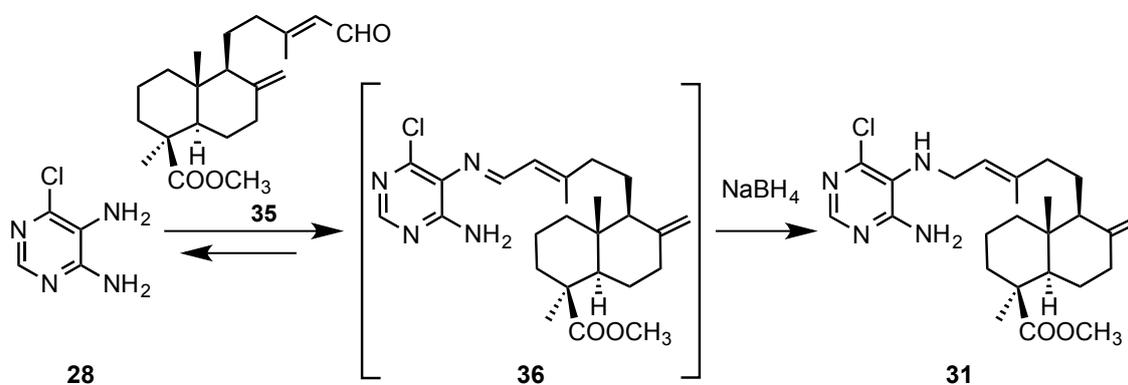
¹⁴¹ Zhao, Y.; Hao, X.; Lu, W.; Cai, J.; Yu, H.; Sévénet, T.; Guéritte, F. Syntheses of two cytotoxic sinapyl alcohol derivatives and isolation of four new related compounds from *Ligularia nelumbifolia*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 902-908.

metilo **8** con CCP en presencia de sílice.¹⁴² En este caso el rendimiento global desde el producto natural es superior, por lo que resulta un procedimiento más adecuado para obtener el aldehído buscado.



Del producto de reacción, por cromatografía sobre gel de sílice impregnada en un 20 % de AgNO_3 , se logró aislar una pequeña cantidad de cada isómero que permitió confirmar que el isómero mayoritario, eluido en primer lugar, correspondía al isómero *E*, como era de esperar.

Una vez que se dispuso de cantidad suficiente del aldehído diterpénico **35**, se procedió a realizar la aminación reductora con la pirimidina **28**.



¹⁴² Mena, M.; Bonjoch, J. Model studies in the lepadin series: synthesis of enantiopure decahydroquinolines by aminocyclization of 2-(3-aminoalkyl)cyclohexenones. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8264-8270.

Las condiciones de reacción empleadas se recogen en la siguiente tabla:

	28:35	Disolvente	Condiciones	T ^a	t	Reducción	Producto
<i>a</i> ¹⁴³	1:1	Tolueno	-	Δ	24 h	NaBH ₄	m.c. [*]
<i>b</i> ¹³⁴	1:1	-	Mortero	T.a.	30 min	NaBH ₄ y H ₃ BO ₃	m.c. [*]
<i>c</i>	1:3	EtOH	MW	50 °C	10 min	NaBH ₄	31 (24 %)
<i>d</i> ¹¹⁴	1:1,5	EtOH	Tamiz 4 Å	T.a.	7 d	NaBH ₄	31 (86 %)

^{*}m.c.: mezcla compleja

En unos casos el agente reductor estuvo presente desde el principio de la reacción (*b*) y en otros se procedió a la formación inicial de la imina, añadiendo el reductor después de un tiempo (*a*, *c* y *d*). En el caso *d*, al igual que en la obtención de la amina **29**, se realizó el seguimiento de la formación de la imina por RMN de ¹H. Los mejores resultados se obtuvieron con la formación de la imina en presencia de tamiz molecular durante 7 días seguido de reducción con NaBH₄.

En algunos casos pudo identificarse la imina **36** en el producto intermedio previamente a la reducción (casos *c* y *d*). El compuesto **31** obtenido por este procedimiento, fue idéntico al obtenido por alquilación de la 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, con el derivado bromado **12**, siendo mayor el rendimiento de la reacción por aminación reductora (86 % vs 23 %) y por tanto, la ruta más eficaz.

¹¹⁴ Valles Martín, E. Aproximación a la síntesis del sistema heterocíclico de asmarinas. Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca, **2012**.

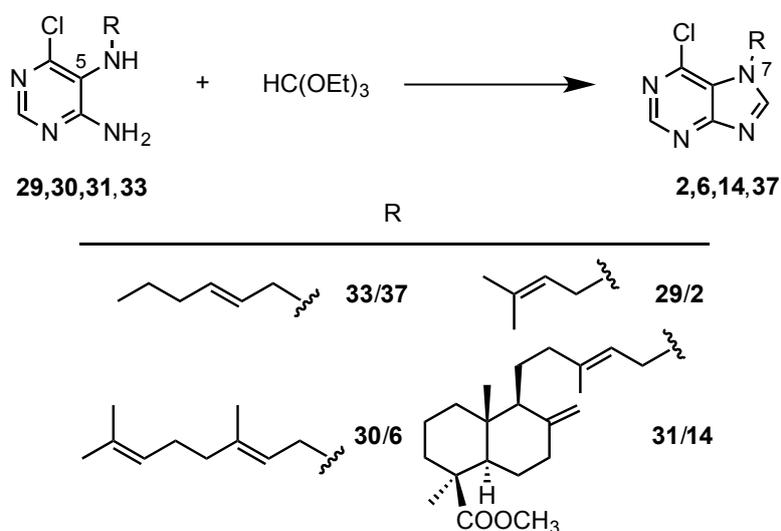
¹³⁴ Cho, B. T.; Kang, S. K. Direct and indirect reductive amination of aldehydes and ketones with solid acid-activated sodium borohydride under solvent-free conditions. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5725-5734.

¹⁴³ Umkehrer, M.; Ross, G.; Jäger, N.; Burdack, C.; Kolb, J.; Hu, H.; Alvim-Gaston, M.; Hulme, C. Expedient synthesis of imidazo[1,2-*c*]pyrimidines via a [4+1]-cycloaddition. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2213-2216.

B.3. FORMACIÓN DEL SISTEMA PURÍNICO

Una vez obtenidas las pirimidinas alquiladas en el grupo amino de la posición C-5, el siguiente paso fue la condensación del compuesto con ortoformiato de trietilo para obtener las purinas alquiladas selectivamente en la posición N-7.

Las pirimidinas **29**, **30**, **31** y **33** se trataron con ortoformiato de trietilo para obtener las correspondientes purinas. La tabla siguiente recoge las diferentes condiciones^{144,145} empleadas en la reacción de condensación:



Pirimidina	Condiciones	T ^a	t	Producto
29	Ac ₂ O	Δ	4 h	m.c.*
29, 30, 31, 33	HCl	Δ	24 h	2, 6, 14, 37
29, 30, 31	MW	120 °C	10-15 min	2, 6, 14

* m.c.: mezcla compleja

Los productos de reacción se cromatografiaron sobre gel de sílice aislándose así las 7-alkil-6-cloropurinas: **2**, **6**, **14** y **37**, respectivamente. Las purinas **2**, **6** y **14** fueron idénticas a los productos minoritarios de la alquilación directa de 6-cloropurina descritas previamente en este trabajo.

¹⁴⁴ Van der Westhuyzen, C.; Rousseau, A. L.; Parkinson, C.J. Effect of substituent structure on pyrimidine electrophilic substitution. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5394-5405.

¹⁴⁵ Vince, R.; Hua, M. Synthesis and anti-HIV activity of carbocyclic 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy 2,6-disubstituted purine nucleosides. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 17-21.

Las condiciones que presentaron mejores resultados fueron aquellas en las que se irradió con microondas para llevar a cabo la obtención de los compuestos **2** y **6** con un rendimiento del 91 y 93 % respectivamente, mientras que en el caso de la alquilpurina **14** se obtuvo un mayor rendimiento (41 %) empleando condiciones de reflujo en medio ácido, las mismas que permitieron la obtención del compuesto **37**.

El estudio detallado del espectro de RMN de ^1H del compuesto **37** permitió asignar su estructura, destacando además de las señales propias de la cadena alquílica, dos señales singlete asignables a los protones H-2 y H-8 de purina (8,72 y 8,67 ppm), que se confirma en el espectro de RMN de ^{13}C al observarse las señales asignables a los dos carbonos metínicos de dicho sistema heterocíclico (153,0 y 151,8 ppm).^{116,117} La presencia de dos señales a 162,7 y 123,7 ppm asignables a los carbonos no protonados C-4 y C-5 están de acuerdo con la estructura de purina alquilada en N-7 tal y como se discutió en el apartado A.1.

¹¹⁶ Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, **1998**.

¹¹⁷ Kjellberg, J.; Johansson, N. G. Characterization of N-7 and N-9 alkylated purine analogues by ^1H and ^{13}C NMR. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 6541-6544.

C. SÍNTESIS DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS RELACIONADOS CON PURINAS

C.1. APROXIMACIÓN A LA SÍNTESIS DE DIAZEPINOPURINAS

Otro de los objetivos planteados en este trabajo fue la aproximación a la síntesis de sistemas heterocíclicos como los presentes en asmarinas de tipo diazepinopurinas.

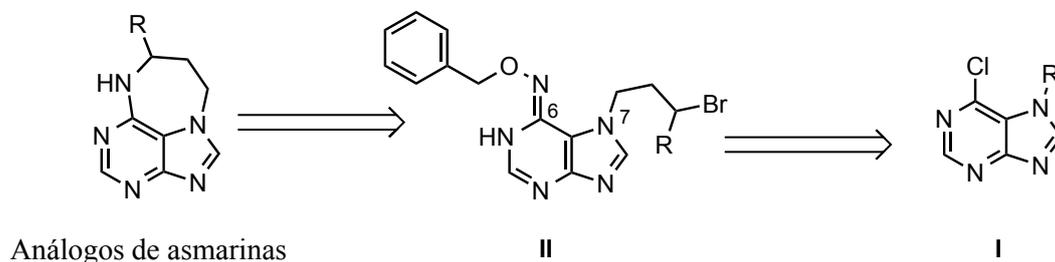
Como se ha mencionado en la introducción, las asmarinas son compuestos naturales de origen marino muy interesantes por sus propiedades citotóxicas pero de los que hay pocos estudios de relación estructura-actividad (REA). Ello puede ser debido a la baja proporción en la que se encuentran en sus fuentes naturales y también a las dificultades encontradas en la construcción del sistema heterocíclico de diazepinopurina que incluye una purina alquilada en N-7. En bibliografía, existen diferentes aproximaciones a la síntesis de estos sistemas.^{85,88} Uno de ellos es la protección de las posiciones N-9 y N⁶ del sistema de adenina previa a la introducción de un sustituyente en la posición N-7, posterior eliminación del grupo protector en N-9, formación del sistema de diazepinopurina y eliminación del grupo protector del nitrógeno de la posición C-6. Otro procedimiento parte del sistema de purina protegido en el nitrógeno de la posición C-6 en forma de hidroxilamina, igual que el anterior, realizando una amidación y reacción de Michael. Otra ruta parte de adenina con un grupo protector en N-3, continúa con una alquilación dirigida a N-7, la formación del sistema de diazepinopurina y finalmente la eliminación del grupo protector de N-3. En estos casos la síntesis parte de una agrupación de tipo hidroxilamina o tipo amina en el nitrógeno de la posición C-6 del anillo de adenina.

En nuestro caso hemos optado por llevar a cabo la alquilación tanto de oximas como de aminas en el nitrógeno de la posición C-6, partiendo de las 7-alkilpurinas obtenidas, para posteriormente construir el anillo de diazepinopurina buscado.

⁸⁵ Pappo, D.; Shimony, S.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines: studies toward the total synthesis of asmarines. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 199-206.

⁸⁸ Pappo, D.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines-asmarine A analogues. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6493-6501.

El análisis retrosintético se recoge en el esquema siguiente, de forma que planteamos la obtención del sistema tricíclico a través del intermedio II que se podría obtener a partir de las 7-alkil-6-cloropurinas obtenidas en este trabajo.



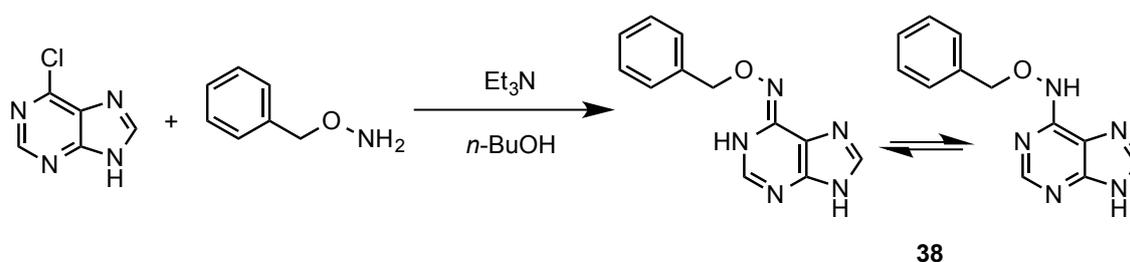
Análogos de asmarinas

II

I

C.1.1. A través de oximas en C-6

En primer lugar y con el fin de poner a punto la formación de la oxima en C-6, se hizo reaccionar la 6-cloropurina con *O*-bencilhidroxilamina.



38

La siguiente tabla recoge las diferentes condiciones⁶⁷ en que se llevó a cabo la reacción.

Purina:R-O-NH ₂	Disolvente	Condiciones	T ^a	t	Producto
1: 3,5	<i>n</i> -BuOH	Et ₃ N	Δ	48 h	38 (16 %)
1: 4	<i>n</i> -BuOH	Et ₃ N/MW	150 °C	10 min	38 (45 %)

En ambos casos se obtuvo un producto de reacción que, una vez cromatografiado sobre gel de sílice, permitió el aislamiento de la oxima **38**, obteniéndose un mayor rendimiento en el procedimiento en el que se irradió con microondas.

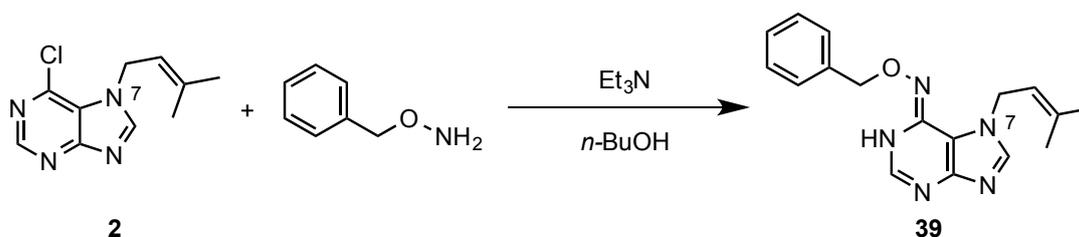
El espectro de RMN de ¹H del compuesto **38** permitió confirmar la formación de la oxima donde se pueden observar dos señales singlete a 7,67 y 7,84 ppm asignables a los

⁶⁷ Vik, A.; Hedner, E.; Charnock, C.; Samuelsen, O.; Larsson, R.; Gundersen, L. -L.; Bohlin, L. (+)-Agelasine D: improved synthesis and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 381-386.

protones H-2 y H-8 de la purina, una señal singlete a 5,03 ppm asignable al metileno bencílico y una señal multiplete 7,22-7,40 ppm asignable a los protones aromáticos del grupo fenilo.

Respecto a la representación de la oxima **38**, según estudios publicados en los que utilizan RMN de ^{15}N como herramienta para la determinación estructural, el tautómero más abundante sería el representado en primer lugar en el que el nitrógeno de la posición C-6 sería una agrupación del tipo $=\text{N-O-R}$, siendo R el grupo bencílico en este caso.⁸⁸

En base a los resultados obtenidos en la reacción anterior, la 7-alkil-6-cloropurina **2** se hizo reaccionar con *O*-bencilhidroxilamina por irradiación con microondas, variando la temperatura, el tiempo y el número de veces de irradiación, obteniendo en todos los casos una mezcla compleja de producto de reacción donde no fue posible identificar la oxima **39**.



Ante la complejidad de los productos obtenidos en microondas, la 7-alkil-6-cloropurina **2** se hizo reaccionar con *O*-bencilhidroxilamina en las mismas condiciones de reflujo descritas anteriormente,⁶⁷ obteniéndose un producto de reacción cuya cromatografía sobre gel de sílice permitió el aislamiento de la oxima **39** con un rendimiento del 36 %.

Los espectros de RMN del compuesto **39** confirmaron, al igual que en el caso anterior, la formación de la oxima. Así, en el espectro de RMN de ^1H se observaron dos señales singlete asignables a los protones H-2 y H-8 del sistema de purina (7,55 y 7,75 ppm), las señales asignables al sustituyente 3-metilbut-2-enil y cabe destacar la presencia de una señal singlete a 5,05 ppm asignable a los protones bencílicos, así como una señal multiplete (7,28-7,53 ppm) correspondiente a los protones aromáticos del grupo fenilo.

⁸⁸ Pappo, D.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines-asmarine A analogues. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6493-6501.

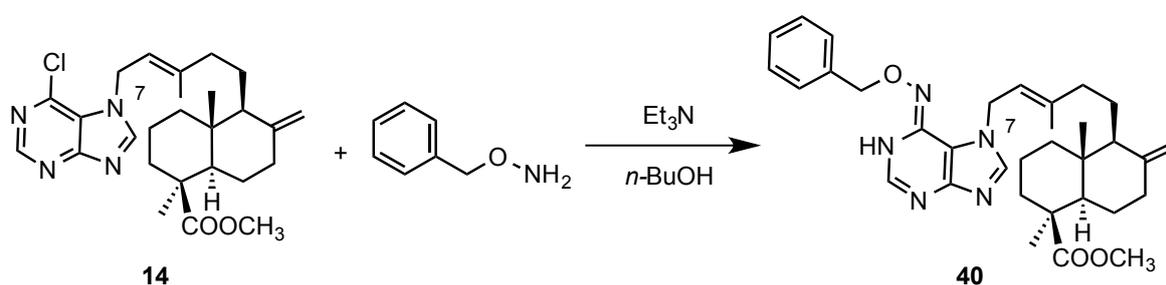
⁶⁷ Vik, A.; Hedner, E.; Charnock, C.; Samuelsen, O.; Larsson, R.; Gundersen, L. -L.; Bohlin, L. (+)-Agelasine D: improved synthesis and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 381-386.

Experimentos de RMN bidimensionales H/C (HMQC y HMBC) del compuesto **39**, permitieron asignar inequívocamente el desplazamiento químico de todos los protones y carbonos del compuesto.

En su espectro de RMN de ^{13}C se observó un apantallamiento de las señales correspondientes a los carbonos C-4 y C-5 respecto a las señales asignadas a esos carbonos en la 7-alkil-6-cloropurina **2**, que pasaron de un desplazamiento de 162,7 a 150,3 ppm en el caso de C-4 y de 123,8 a 111,5 ppm en el caso de C-5. En el carbono C-6 se observó también un apantallamiento de la señal asignada respecto al compuesto **2** (de 144,6 a 141,0 ppm).

Así mismo, se confirmó la fórmula molecular de la oxima **39** por espectrometría de masas de alta resolución.

Siguiendo la estrategia de preparación de oximas como paso intermedio hacia la formación del sistema tricíclico presente en asmarinas, se hizo reaccionar la 7-diterpenil-6-cloropurina **14** con *O*-bencilhidroxilamina.

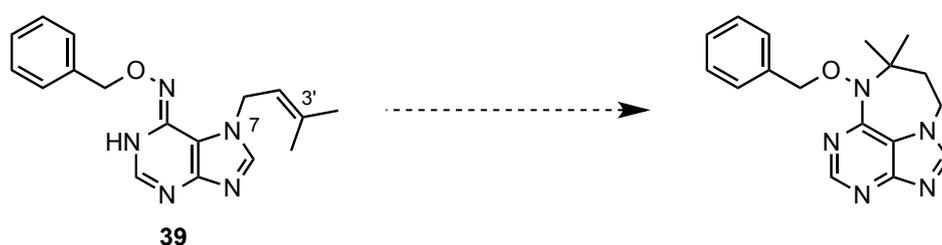


La reacción se llevo a cabo en las mismas condiciones de reflujo que dieron buenos resultados en el caso anterior, obteniendo así un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H se observó la presencia del compuesto **40**. Destacaron dos señales singlete asignables a los protones del sistema de purina (7,50 y 8,05 ppm), las señales asignables a la cadena del resto diterpénico, así como la presencia de una señal singlete a 5,13 ppm asignable al metileno bencílico y una señal multiplete (7,19-7,33 ppm) correspondiente a los protones aromáticos del grupo fenilo.

Ambas oximas, **39** y **40**, son precursoras adecuadas para la obtención del sistema de diazepinopurina presente en asmarinas.

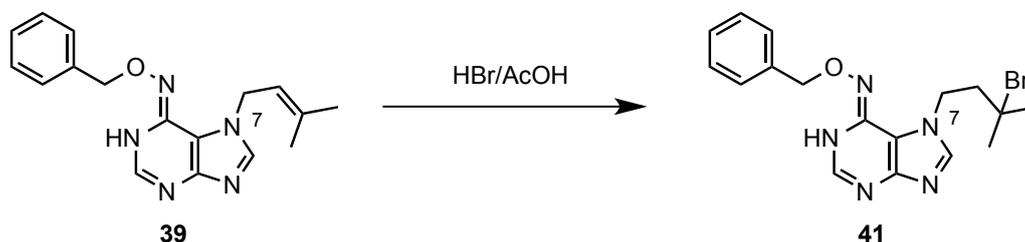
Según la bibliografía, la síntesis de análogos de asmarinas, a partir de este tipo de oximas, se puede realizar por diferentes métodos de ciclación para la preparación del sistema de diazepinopurina: aminomercuriación de alquenilpurinas usando acetato de mercurio (II), yodociclación de alquenos con yodo o ciclación catalizada por ácido con HBr en AcOH al 30 %, aplicados sobre bromuros, alcoholes terciarios o alquenos.⁸⁵

Así, basándonos en lo encontrado en bibliografía y en obtener directamente el sistema tricíclico, la oxima **39** que cuenta con un alqueno en el sustituyente de la posición N-7 se trató con acetato de mercurio (II) y se obtuvo una mezcla compleja que estaba formada mayoritariamente por la oxima de partida **39** sin reaccionar.



Ante la dificultad encontrada para llevar a cabo la formación del anillo de siete miembros presente en asmarinas desde el alqueno, se planteó la introducción previa de un derivado halogenado en la posición C-3' de la cadena alquílica de la oxima **39**, lo que facilitaría posteriormente la formación del sistema de diazepinopurina por reacción del derivado halogenado con la oxima formada.

Aprovechando la reactividad del doble enlace de la cadena lateral, se llevó a cabo su bromación para obtener el compuesto bromado **41**.



Así, se hizo reaccionar el compuesto **39** con HBr en AcOH al 30 % en diferentes condiciones de reacción, tanto a temperatura ambiente, como por irradiación con

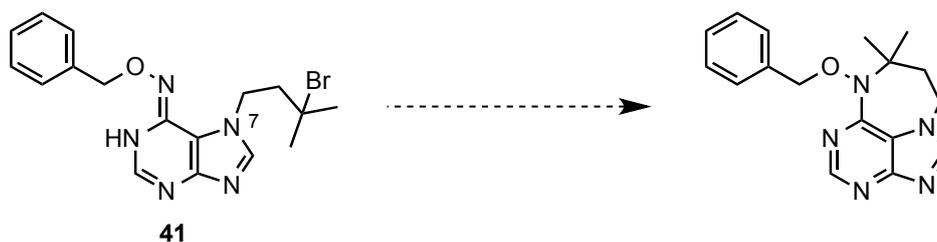
⁸⁵ Pappo, D.; Shimony, S.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines: studies toward the total synthesis of asmarines. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 199-206.

microondas, obteniendo en ambos casos un producto de reacción en el que se identificó por métodos espectroscópicos el compuesto bromado **41**, obteniendo un mayor rendimiento cuando se mantuvo a temperatura ambiente.

Las señales más significativas del compuesto bromado **41** en su espectro de RMN de ^1H , además de los protones del sistema purínico (7,58 y 7,88 ppm), fueron una señal multiplete (7,24-7,38 ppm) asignable a los protones aromáticos del grupo fenilo, una señal singlete a 4,85 ppm asignable a los protones bencílicos, así como la presencia de dos señales multiplete (2,17-2,23 ppm) y (4,41-4,43 ppm) asignables a los protones metilénicos de la cadena alquílica que, junto con la desaparición de la señal triplete a 5,34 ppm del protón olefínico del compuesto **39**, pone de manifiesto la ausencia del doble enlace en dicha cadena. Así mismo, destaca la presencia de un único singlete a 1,66 ppm asignable a los dos metilos geminales a un átomo de bromo.

Además en su espectro de masas de alta resolución se pueden observar dos iones isotópicos separados por dos unidades y en proporciones semejantes, de masas 390,0926 y 392,0923 m/z , patrón isotópico que corresponde con la presencia en la molécula de un átomo de bromo, siendo la masa calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{OBr} + \text{H}^+$ 390,0924 u, confirmando la presencia de un átomo de bromo en la molécula.

Una vez obtenido el derivado bromado **41**, el siguiente paso sería la formación del anillo de siete miembros por reacción del derivado bromado con el nitrógeno de la oxima dando lugar a la formación de la diazepinopurina.



El derivado bromado **41**, se hizo reaccionar en diferentes condiciones de reacción,^{85,87} como se observa en la siguiente tabla:

Entrada	Disolvente	Condiciones	T ^a	t	Producto
<i>a</i>	-	HBr/AcOH	100 °C	3 h	41
<i>b</i>	EtOH	MW	150 °C	10 min	m.c.*
<i>c</i>	DMF	K ₂ CO ₃	60 °C	72 h	-

* m.c.: mezcla compleja

En la entrada *a*, tras el tratamiento con HBr en AcOH al 30 % a 100 °C, se obtuvo el compuesto **41** sin reaccionar.

En la entrada *c*, se obtuvo un producto de reacción cuyo espectro de RMN de ¹H era muy similar al de la oxima **39** aunque con ligeras diferencias en el desplazamiento de algunas de las señales. Así las dos señales singlete a 1,60 y 1,64 ppm asignables al gem-dimetilo, presentaban un apantallamiento respecto a los valores asignados a los metilos sobre doble enlace de la cadena lateral en la oxima **39** previamente (1,70 y 1,74 ppm), observándose también una mayor distancia (0,35 ppm) entre las dos señales singlete del sistema de purina, respecto a la oxima **39** (0,20 ppm) y al derivado bromado **41** (0,30 ppm). Todo ello nos hizo pensar en la formación del anillo de diazepinopurina, pero debido a que el compuesto obtenido era escaso y no lo suficientemente puro, no pudo ser confirmada su formación.

C.1.2. A través de aminas en C-6

Una alternativa para la formación del sistema de diazepinopurina, consistiría en la alquilación del grupo amino de la posición C-6 de 7-alqueniladeninas, su posterior halogenación y cierre del sistema diazepínico.

Algunos autores han llevado a cabo la formación de N⁶-alquiladeninas y posteriormente la alquilación del compuesto, lo que dio lugar a adeninas alquiladas en las posiciones N⁶ y N-9.¹²⁶ Para construir el anillo de diazepinopurina objetivo de nuestra

⁸⁵ Pappo, D.; Shimony, S.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines: studies toward the total synthesis of asmarines. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 199-206.

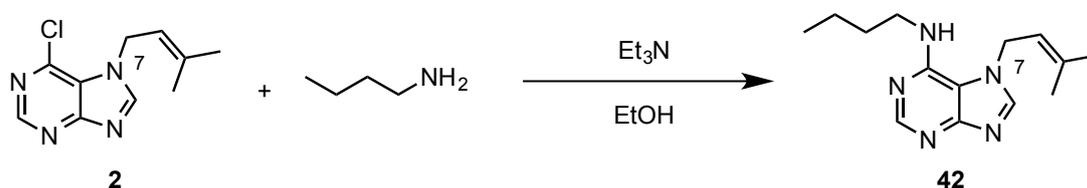
⁸⁷ Pappo, D.; Rudi, A.; Kashman, Y. A synthetic approach towards the synthesis of asmarine analogues. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5941-5943.

¹²⁶ Mik, V.; Szüčová, L.; Spíchal, L.; Plihal, O.; Nisler, J.; Zahajská, L.; Doležal, K.; Strnad, M. N⁹-substituted N⁶-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]purine derivatives and their biological activity in selected cytokinin bioassays. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7244-7251.

síntesis, sería necesario introducir un grupo alquílico en la posición N-7, previo a la formación de dicho anillo. En nuestro caso optamos por partir de las purinas alquiladas en el nitrógeno N-7 ya obtenidas en este trabajo.

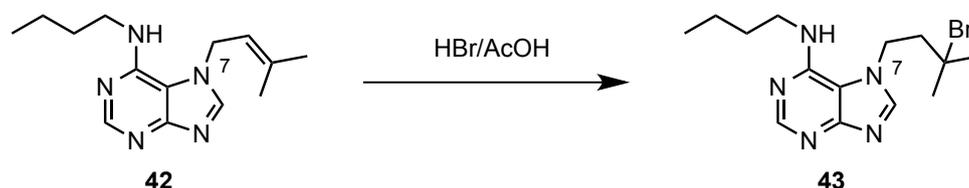
Así, se planteó la obtención de purinas con un sistema de adenina similar al presente en asmarinas, alquiladas tanto en el nitrógeno N-7 de la purina como en el grupo NH₂ de la adenina. Para ello se partió de una de las 7-alkil-6-cloropurinas sintetizadas anteriormente y se llevó a cabo la formación de la amina en la posición C-6.

La 7-alkil-6-cloropurina **2** se hizo reaccionar con butilamina, en presencia de Et₃N en etanol por irradiación con microondas.



Se obtuvo así un producto de reacción del que se aisló, por cromatografía sobre gel de sílice, el compuesto **42**. Su estructura se confirmó por su espectro de RMN de ¹H, en el que se pudieron observar además de las señales de los protones del sistema de purina (8,24 y 8,09 ppm), las señales asignables a la cadena de 3-metilbut-2-enilo, la presencia de una señal triplete a 3,52 ppm, dos señales multiplete (1,36-1,42 ppm y 1,57-1,63 ppm) y un triplete a 0,94 ppm, todo ello asignable a la cadena de butilamina en posición C-6.

La bromación del doble enlace del sustituyente en N-7 del compuesto **42**, se llevó a cabo por tratamiento con HBr en AcOH en diferentes condiciones de reacción, como en el caso anterior.

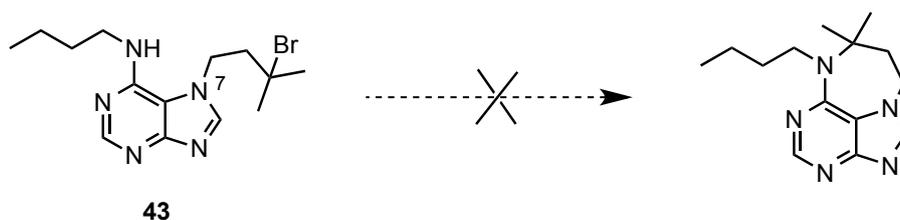


Cuando la reacción se mantuvo a temperatura ambiente en períodos de 24-96 h, se obtuvo el compuesto de partida **42** sin reaccionar. Por otro lado, cuando la mezcla se irradió con microondas, se obtuvo un producto de reacción en el que se identificó el compuesto bromado **43**.

Las señales más significativas que se pudieron observar en el espectro de RMN de ^1H del compuesto **43** fueron, además de los protones aromáticos H-2 y H-8 del sistema purínico (8,50 y 8,32 ppm) y las señales asignables a la cadena de butilamina de la posición C-6, la desaparición de la señal triplete a 5,38 ppm del protón olefínico del compuesto **42**, lo que puso de manifiesto la ausencia del doble enlace en la cadena lateral, destacando a su vez la presencia de un único singlete a 1,84 ppm, asignable a los dos metilos geminales al grupo bromo.

Además en su espectro de masas de alta resolución se pueden observar dos iones isotópicos separados por dos unidades y en proporciones semejantes, de masas 340,1118 y 342,1107 m/z , siendo la masa calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{Br} + \text{H}^+$ 340,1131 u, lo que pone de manifiesto de nuevo la presencia de un átomo de bromo en la molécula.

Una vez obtenido el derivado bromado **43**, el siguiente paso sería la ciclación del anillo de 7 miembros para dar lugar al sistema de diazepinopurina.



Cuando el compuesto **43** en EtOH se irradió con microondas, se obtuvo una mezcla compleja de producto de reacción, en cuyo espectro de RMN de ^1H pudieron identificarse señales asignables a una mezcla de los compuestos **42** y **43** que no pudo ser resuelta por métodos cromatográficos.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede considerar que esta metodología resulta adecuada para la preparación selectiva de 7-alkilpurinas y su transformación en el derivado bromado precursor del sistema heterocíclico de diazepinopurina presente en asmarinas, aunque se necesita una mayor cantidad de sustancia y un mayor número de experimentos para poder generalizar este procedimiento, siendo ésta una posible ruta en la obtención de análogos de asmarina.

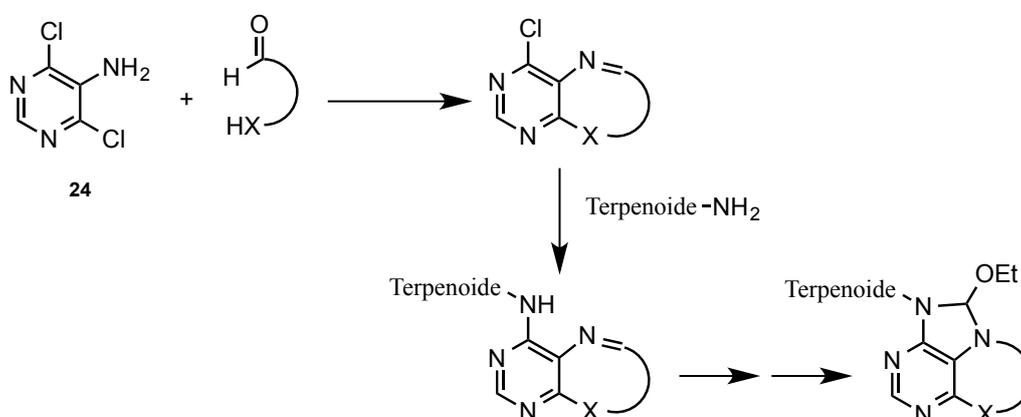
C.2. OBTENCIÓN DE OTROS SISTEMAS HETEROCÍCLICOS

Ante las dificultades encontradas para obtener los sistemas de diazepinopurinas, nos planteamos explorar otros sistemas heterocíclicos de siete miembros con dos heteroátomos fusionados a pirimidinas en lugar de purinas, utilizando la 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, como punto de partida.

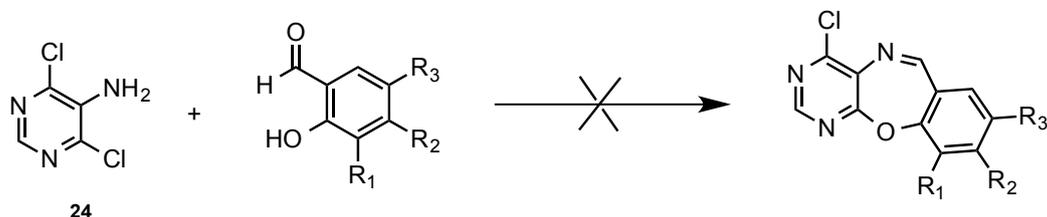
La pirimidina **24**, como ya se ha mencionado previamente, presenta dos átomos de cloro susceptibles de ser sustituidos por nucleófilos y un grupo amino que podría reaccionar con carbonos electrófilos como los de un grupo aldehído. Si el electrófilo y el nucleófilo forman parte de la misma molécula, se pueden obtener sistemas cíclicos de diferente tamaño; en este sentido, aldehídos salicílicos diferentemente funcionalizados cumplen con estas características: presentan un grupo aldehído que podría reaccionar con el grupo amino y un grupo fenol que puede ser capaz de desplazar a uno de los átomos de cloro permitiendo la formación de anillos de oxazepina fusionados a la pirimidina.

En estos sistemas queda todavía un átomo de cloro que podría sustituirse por otros nucleófilos como por ejemplo las aminas: geranilamina, **20**, y diterpenilamina **22**, obtenidas previamente en este trabajo que presentan un resto terpenoide, por lo que los compuestos resultantes se pueden considerar análogos de terpeno-alcaloides y en un futuro comparar la citotoxicidad de ambos sistemas.

Además la reducción del enlace imino y posterior condensación con ortoformiato de trietilo podría conducir a sistemas de tipo purina fusionados con los sistemas azepínicos, tal y como se ilustra a continuación.



Así cuando se llevó a cabo la condensación de la 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, con diferentes aldehídos salicílicos utilizando diferentes condiciones de reacción,^{146,147,148} no se consiguió aislar en ningún caso compuestos con anillos de oxazepina, obteniéndose siempre mezclas complejas de reacción.



R ₁	R ₂	R ₃
H	OH	H
H	OCH ₃	H
OCH ₃	H	H
H	H	NO ₂

Entrada	Disolvente	Condiciones	T ^a	t	Producto
<i>a</i>	<i>i</i> -PrOH	Cs ₂ CO ₃ , MW	150 °C	10 min	m.c. *
<i>b</i>	DMF	K ₂ CO ₃ , MW	120 °C	5 min	m.c. *
<i>c</i>	DMF	K ₂ CO ₃	65 °C	7 h	m.c. *
<i>d</i>	DMF	-	130 °C	5 h	m.c. *

*m.c.: mezcla compleja

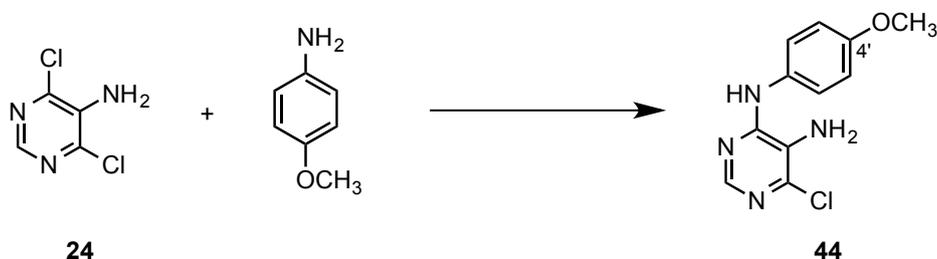
En ningún caso se consiguió identificar el compuesto buscado, quizá debido a la baja nucleofilia del grupo amino de la pirimidina **24** como ya se ha mencionado previamente, por lo que se planteó de nuevo la sustitución de uno de los átomos de cloro por un grupo amino, previa a la condensación con los aldehídos salicílicos.

¹⁴⁶ Hudson, C.; Srinivasa Murthy, V.; Estep, K. G.; Gustafson, G. Microwave-assisted three component one-pot synthesis of pyrimido-oxazepines. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1489-1492.

¹⁴⁷ Duncton, M. A., J.; Smith II, L. M.; Burdzovic-Wizeman, S.; Burns, A. Liu, H.; Mao, Y.; Wong, W. C.; Kiselyov, A. S. Preparation of substituted pyrimido[4,5-*b*]-1,4-benzoxazepines, thiazepines, and diazepines via a Pictet-Spengler cyclization. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9629-9631.

¹⁴⁸ Smith II, L.; Wong, W. C.; Kiselyov, A. S.; Burdzovic-Wizemann, S.; Mao, Y.; Xu, Y.; Duncton, M. A. J.; Kim, K.; Piatnitski, E. L.; Doody, J. F.; Wang, Y.; Rosler, R. L.; Milligan, D.; Columbus, J.; Balagtas, C.; Lee, S. P.; Kononov, A.; Hadari, Y. R. Novel tricyclic azepine derivatives: Biological evaluation of pyrimido[4,5-*b*]-1,4-benzoxazepines, thiazepines, and diazepines as inhibitors of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5102-5106.

Así, para la sustitución nucleofílica de uno de los átomos de cloro de la 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, con *p*-metoxianilina se utilizaron diferentes condiciones de reacción^{146,149,150} que se recogen en la siguiente tabla, obteniéndose el compuesto **44** esperado.



Entrada	Disolvente	Condiciones	T ^a	t	Producto
<i>a</i>	<i>i</i> -PrOH	HCl,MW	150 °C	10 min	m.c.*
<i>b</i>	<i>n</i> -BuOH	Et ₃ N,MW	150 °C	10+20 min	m.c.*
<i>c</i>	<i>n</i> -BuOH	HCl,MW	150 °C	10 min	44 (37 %)
<i>d</i>	<i>n</i> -BuOH	Et ₃ N	150 °C	52 h	44 (43 %)
<i>e</i>	DMF	-	180 °C	15 h	44 (61 %)

* m.c.: mezcla compleja

A pesar de que el uso de microondas acorta los tiempos de reacción, los mejores resultados se obtuvieron al llevar a cabo la reacción en DMF a 180 °C, obteniendo así un producto de reacción del que se pudo aislar, por cromatografía sobre gel de sílice, el compuesto **44** con un 61 % de rendimiento. En su espectro de RMN de ¹H se observó el apantallamiento de la señal singlete correspondiente al protón H-2 del derivado de pirimidina que se desplaza de 8,20 ppm en el compuesto de partida **24** a 8,07 ppm en el compuesto **44**, la presencia de dos señales doblete a 6,85 y 7,32 ppm asignables al anillo aromático 1,4-disustituido y una señal singlete a 3,74 ppm asignable al grupo metoxilo de la posición C-4'.

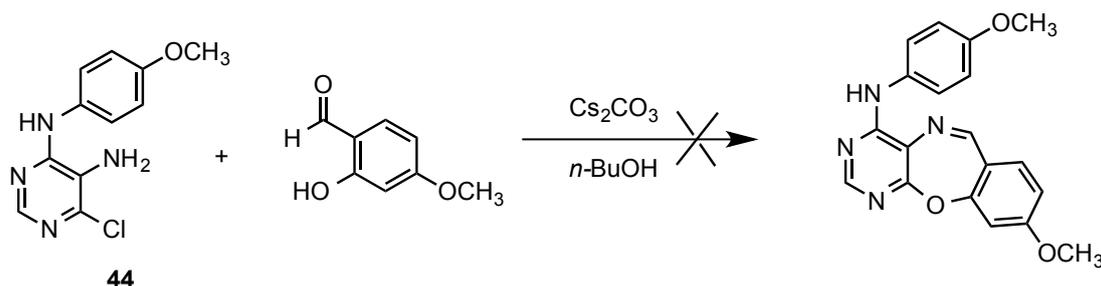
¹⁴⁶ Hudson, C.; Srinivasa Murthy, V.; Estep, K. G.; Gustafson, G. Microwave-assisted three component one-pot synthesis of pyrimido-oxazepines. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1489-1492.

¹⁴⁹ Biamonte, M. A.; Shi, J.; Hong, K.; Hurst, D. C.; Zhang, L.; Fan, J.; Busch, D. J.; Karjian, P. L.; Maldonado, A. A.; Sensintaffar, J. L.; Yang, Y-C. Kamal, A.; Lough, R. E.; Lundgren, K.; Burrows, F. J.; Timony, G. A.; Boehm, M. F.; Kasibhatla, S. R. Orally active purine-based inhibitors of the Heat Shock Protein 90. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 817-828.

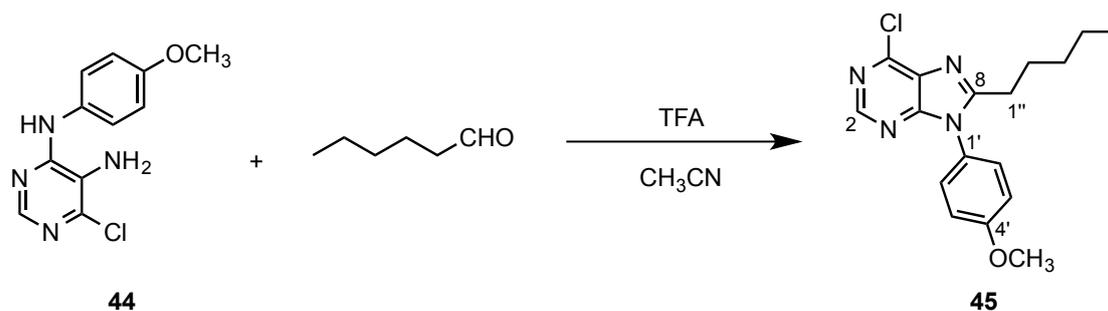
¹⁵⁰ Smith II, L.; Piatnitski, E. L.; Kiselyov, A. S.; Ouyang, X.; Chen, X.; Burdzovic-Wizemann, S.; Xu, Y.; Wang, Y.; Rosler, R. L.; Patel, S. N.; Chiang, H-H.; Milligan, D. L.; Columbus, J.; Wong, W. C.; Doody, J. F.; Hadari, Y. R. Tricyclic azepine derivatives: Pyrimido[4,5-*b*]-1,4-benzoxazepines as a novel class of epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1643-1646.

Una vez obtenida la pirimidina **44** sustituida por un grupo amino en C-6, el siguiente paso fue hacerla reaccionar con un derivado de aldehído salicílico con el fin de obtener, por condensación, el sistema de pirimidobenzoxazepina.

Para ello se hizo reaccionar la diaminocloropirimidina **44** con 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído por irradiación con microondas en las mismas condiciones empleadas previamente, obteniendo un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H no se observaron las señales del producto esperado.



Tratando de comprobar que el grupo amino de la pirimidina **44** tenía la nucleofilia suficiente para reaccionar con aldehídos, se optó por hacerla reaccionar en las mismas condiciones de reacción con un aldehído alifático más sencillo y con menos impedimento estérico como el hexanal.¹⁵¹ En este caso, del producto de reacción obtenido se aisló, por cromatografía sobre gel de sílice, la purina **45**.



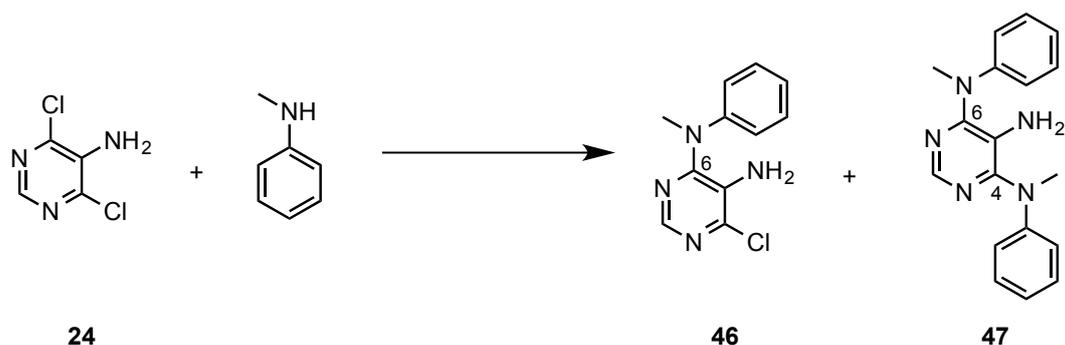
Se confirmó la estructura del compuesto **45** por su espectro de RMN de ^1H en el que se observó una señal singlete a 8,08 ppm asignable al protón H-2 de la purina, dos señales doblete asignables a los protones del anillo aromático 1,4-disustituido a 7,08 y 7,28 ppm, una señal singlete a 3,88 ppm asignable al grupo metoxilo de la posición C-4' del grupo

¹⁵¹ Che, X.; Zheng, L.; Dang, Q.; Bai, X. Synthesis of novel tricyclic pyrimidine-fused 5,6-dihydrobenzodiazepines via a Pictet-Spengler-like cyclization. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2563-2568.

fenilo, una señal triplete a 2,76 ppm perteneciente a los protones H-1'' y señales multiplete correspondientes al resto de los protones de la cadena alquílica.

Estos resultados indicaron que el grupo amino del compuesto **44** sí era capaz de reaccionar con aldehídos, por lo que se replanteó de nuevo la reacción con derivados de aldehídos salicílicos. Sin embargo, ante la posibilidad observada de que se pudieran formar purinas alquiladas en la posición C-8 que competirían con la formación del sistema de oxazepinopirimidina buscado, se decidió evitar la presencia de la amina secundaria en C-6, utilizando *N*-metilanilina para realizar la sustitución del átomo de cloro en la pirimidina **24**.

Así, el tratamiento de la pirimidina **24** con *N*-metilanilina se realizó en diferentes condiciones de reacción que se recogen en la siguiente tabla, obteniéndose el compuesto **46** esperado, junto con la pirimidina disustituida **47**.



Entrada	24:PhNHMe	Disolvente	Condiciones	T ^a	t	Producto
<i>a</i> ^{152,153}	1:2	<i>n</i> -BuOH	Et ₃ N	Δ	9 h	m.c.*
<i>b</i> ¹⁴⁶	1:1	<i>i</i> -PrOH	HCl, MW	150 °C	20 min	m.c.* (46 ^{**})
<i>c</i> ¹⁵⁴	1:1,2	EtOH:H ₂ O	HCl	100 °C	48 h	46 (50 %) + 47 (16 %)

* m.c.: mezcla compleja de los reactivos

** señales características identificadas en el espectro de RMN de ¹H

¹⁴⁶ Hudson, C.; Srinivasa Murthy, V.; Estep, K. G.; Gustafson, G. Microwave-assisted three component one-pot synthesis of pyrimido-oxazepines. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1489-1492.

¹⁵² Yang, J.; Dang, Q.; Liu, J.; Wei, Z.; Wu, J.; Bai, X. Preparation of a fully substituted purine library. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 474-482.

¹⁵³ Liu, J.; Dang, Q.; Wei, Z.; Zhang, H.; Bai, X. Parallel solution-phase synthesis of a 2,6,8,9-tetrasubstituted purine library via a sulfur intermediate. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 627-636.

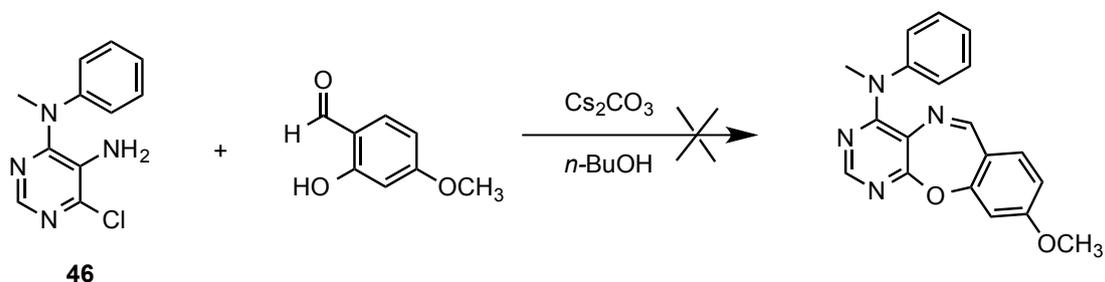
¹⁵⁴ Xu, D.; Sun, L-P.; You, Q-D. Facile synthesis of 2,5,7-trisubstituted oxazolo[5,4-*d*]pyrimidines via copper-catalyzed intramolecular C-O bond formation. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4248-4251.

A pesar de detectarse el compuesto **46** en un período corto de tiempo (20 min) cuando se irradió con microondas, las mejores condiciones de reacción se dieron cuando la reacción se llevó a cabo en EtOH:H₂O y medio ácido (HCl), obteniéndose así un producto de reacción del que se pudo aislar, por cromatografía sobre gel de sílice, el compuesto monosustituido **46** esperado y el disustituido **47**.

El compuesto mayoritario eluido en primer lugar, fue el compuesto monosustituido **46**, en cuyo espectro de RMN de ¹H se observó una señal singlete a 8,15 ppm asignable al protón H-2 de la pirimidina, otra señal singlete a 3,46 ppm asignable al metilo sobre el nitrógeno de la posición C-6 y tres señales multiplete correspondientes a los protones del anillo bencénico (6,99-7,34 ppm).

El compuesto minoritario, eluido en segundo lugar, corresponde a la pirimidina disustituida **47**, en cuyo espectro de RMN de ¹H se observó una señal singlete a 8,38 ppm asignable al protón H-2 de la pirimidina, otra señal singlete a 3,49 ppm asignable a los dos metilos sobre nitrógeno y tres señales multiplete correspondientes a los protones de los anillos bencénicos (6,88-7,29 ppm). Se confirmó la estructura de la pirimidina disustituida **47** por su espectro de masas de alta resolución, que coincidía con la fórmula molecular del compuesto propuesto **47**.

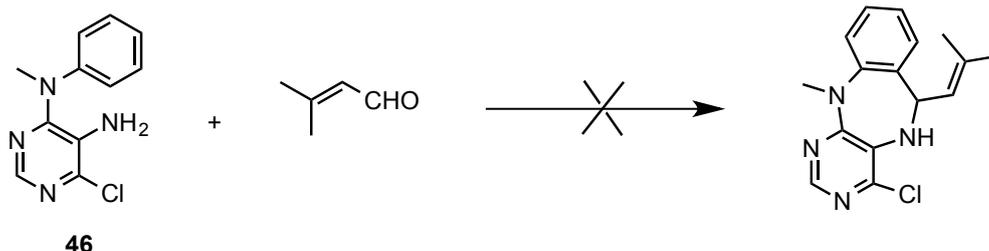
Una vez obtenida la diaminocloropirimidina **46**, que contenía una amina terciaria en C-6, se la hizo reaccionar con un derivado del aldehído salicílico (2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído) por irradiación con microondas en las mismas condiciones empleadas previamente, obteniendo un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H no se observaron las señales del producto esperado.



Habiendo comprobado previamente que el grupo amino de la pirimidina **44** tenía la nucleofilia suficiente para reaccionar con aldehídos, se hizo reaccionar la pirimidina **46**

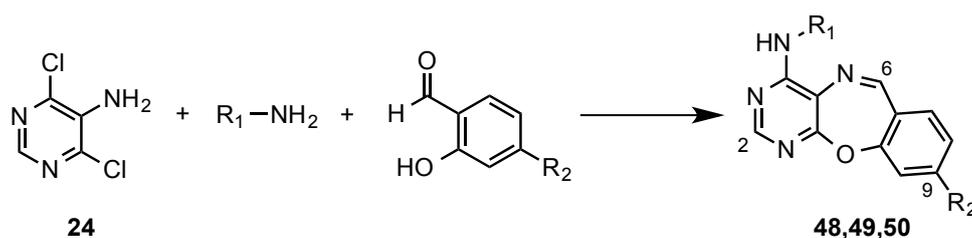
con un aldehído más sencillo utilizado anteriormente, 3-metilbut-2-enal, para llevar a cabo la formación del anillo de diazepinopurina.

Dicha reacción se llevó a cabo en las mismas condiciones previamente utilizadas con hexanal,¹⁵¹ y también en presencia de un catalizador por irradiación con microondas, obteniendo en ambos casos un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H no se observó ninguna señal del compuesto esperado.



Como la formación del sistema de oxazepinopirimidina utilizando una ruta sintética en dos pasos no dio los resultados esperados, se optó por realizar dicha síntesis en un solo paso, siguiendo la estrategia descrita en bibliografía por otros autores.¹⁴⁶

Así, cuando se hizo reaccionar la 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, con diferentes aminas primarias y derivados del aldehído salicílico en medio básico, se obtuvieron sistemas poliheterocíclicos con la estructura de oxazepinopirimidina representada en el siguiente esquema:

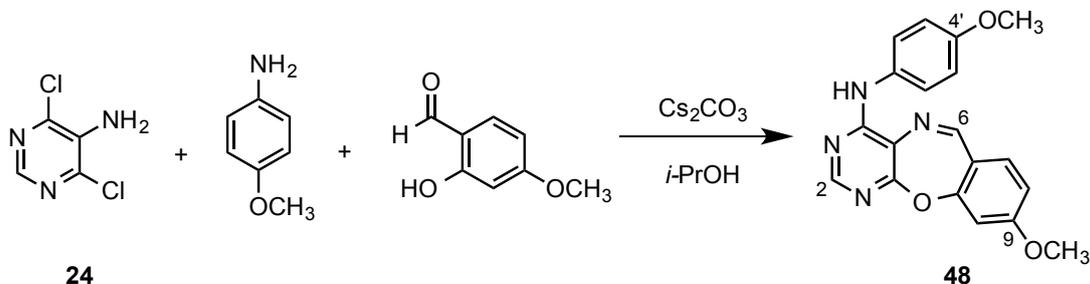


Cuando la pirimidina **24** se hizo reaccionar con *p*-metoxianilina y 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído se obtuvo el compuesto **48**, en cuyo espectro de RMN de ¹H se pueden observar como características principales, una señal singlete a 8,18 ppm asignable al protón H-2 del sistema tricíclico y otra señal singlete a 8,21 ppm asignable al protón

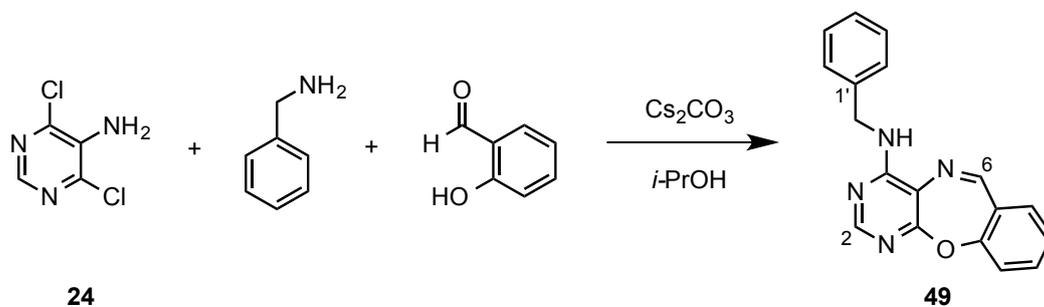
¹⁵¹ Che, X.; Zheng, L.; Dang, Q.; Bai, X. Synthesis of novel tricyclic pyrimidine-fused 5,6-dihydrobenzodiazepines via a Pictet-Spengler-like cyclization. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2563-2568.

¹⁴⁶ Hudson, C.; Srinivasa Murthy, V.; Estep, K. G.; Gustafson, G. Microwave-assisted three component one-pot synthesis of pyrimido-oxazepines. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1489-1492.

imínico H-6. Aparecen dos señales singlete a 3,74 y 3,76 ppm asignables a los grupos metoxilo de las posiciones C-9 y C-4', que se corrobora con su espectro de RMN de ^{13}C con valores de 55,4 y 55,8 ppm, y también señales multiplete en la región de protones aromáticos asignables a los protones bencénicos de la estructura. Además, su espectro de masas de alta resolución confirmó dicha estructura.

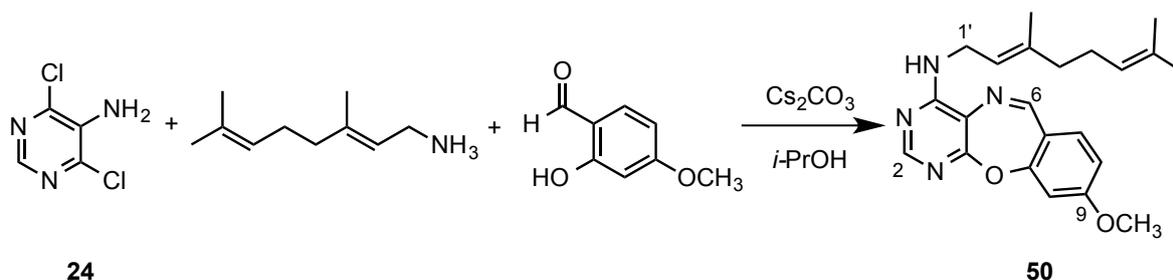


De la reacción de la pirimidina **24** con bencilamina y salicilaldehído se obtuvo el compuesto **49** en cuyo espectro de RMN de ^1H se pudieron observar señales características de los protones H-2 y H-6 (8,19 y 8,23 ppm respectivamente), del metileno bencílico (4,65 ppm) y del resto de señales multiplete asignables a los protones aromáticos. Por otro lado, en su espectro de masas de alta resolución se puede observar un ión cuasimolecular a 303,1241 m/z , concordante con dicha estructura.

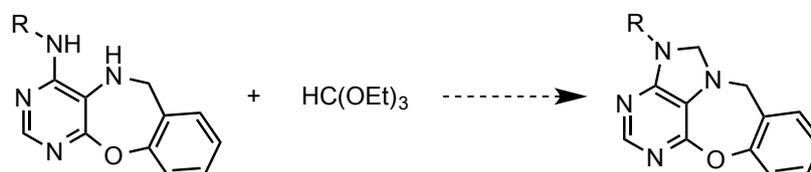


Una parte del producto de reacción no fue cromatografiada y se trató en las condiciones previamente utilizadas para llevar a cabo la reducción del doble enlace imínico de la posición N-5/C-6, obteniendo así un producto de reacción complejo en cuyo espectro de RMN de ^1H pudo observarse la aparición de una nueva señal singlete a 4,25 ppm asignable a los protones H-6 resultantes de la desaparición del doble enlace oxazepínico, que junto con la desaparición de la señal singlete a 8,23 ppm, nos hizo pensar que se produjo la reducción de dicho enlace, a pesar de no disponer de mayor cantidad de este compuesto para haber podido llevar a cabo una purificación y caracterización del mismo.

La reacción de la pirimidina **24** con geranilamina y 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído condujo al compuesto **50**, pudiendo observar en su espectro de RMN de ^1H al igual que en los dos casos anteriores, señales asignables a los protones H-2 y H-6 (8,19 y 8,22 ppm), al grupo metoxilo (3,82 ppm) y a los protones aromáticos. Cabe destacar una señal doblete a 4,08 ppm asignable al metileno H-1' y el resto de señales de la cadena del geranilo, confirmado su estructura también, por su espectro de masas de alta resolución.



Una vez obtenidas las oxazepinopirimidinas, queda pendiente confirmar la reducción del doble enlace imínico de la posición N-5/C-6 del anillo de oxazepina y posterior condensación con $\text{HC}(\text{OEt})_3$, que podría conducir a sistemas poliheterocíclicos como el representado a continuación, que incluyeran un sistema de purina fusionado al sistema oxazepínico, de acuerdo al tercer objetivo propuesto en este trabajo.



D. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

La mayor parte de las sustancias obtenidas durante este trabajo fueron evaluadas como citotóxicas en el Instituto Politécnico de Bragança (Portugal), durante una estancia de investigación realizada por la Doctoranda en el grupo de investigación de la Dra. Isabel C. F. R. Ferreira (BioChemCore).

Se llevaron a cabo ensayos de actividad en cultivos de líneas celulares neoplásicas, determinándose paralelamente su toxicidad frente a una línea celular no tumoral, concretamente en células primarias hepáticas de cerdo (PLP2). Las distintas líneas celulares neoplásicas humanas utilizadas en los ensayos de citotoxicidad fueron:

- NCI-H460: carcinoma de pulmón no microcítico
- HeLa: carcinoma cervical
- HepG2: carcinoma de hígado/hepatocarcinoma
- MCF-7: adenocarcinoma de mama

La viabilidad celular *in vitro* se determinó por el ensayo de sulforodamina B (SRB), que fue desarrollado en 1990 y sigue siendo uno de los métodos más utilizados.^{155,156} Este ensayo ha sido ampliamente utilizado para las pruebas de toxicidad de compuestos frente a diferentes tipos de líneas celulares cancerosas y no cancerosas.¹⁵⁷

El ensayo se basa en la capacidad de sulforodamina B para unirse a los componentes proteicos de células de tejidos viables que han sido fijados en placas de cultivo por el ácido tricloroacético (ATC). Sulforodamina B es un tinte de color rosa brillante, un aminoxantano con dos grupos sulfónicos que se une a residuos básicos de aminoácidos en condiciones ácidas suaves y se disocia en condiciones básicas.¹⁵⁸ Como la cantidad de sulforodamina B que se une es proporcional al número de células viables, cuanto menor sea la coloración, mayor será la inhibición de crecimiento celular. La medición de la

¹⁵⁵ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

¹⁵⁶ Vichai, V. Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112-1116.

¹⁵⁷ Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vitisca, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766.

¹⁵⁸ Lillie, R. D.; Conn, H. J *Conn's Biological Stains* 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore. **1977**.

densidad óptica se realizó en un lector de microplacas a 515 nm, (aunque la máxima absorbancia de SRB puede observarse a 564 nm, se recomiendan longitudes de onda de 490-530 nm).¹⁵⁵

Una vez adicionada la solución de sulforodamina B y tras incubación, a simple vista se pudo apreciar que aquellos pocillos en los que apenas había coloración eran los más interesantes del estudio, porque el compuesto había sido capaz de inhibir el crecimiento celular. A través de las medidas de densidad óptica, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento celular de los distintos compuestos y se determinó la CI_{50} , siendo ésta la concentración (en μM) a la cual el compuesto inhibe el 50 % del crecimiento celular.

Los compuestos evaluados fueron un total de 32 incluyendo, además de los compuestos heterocíclicos sintetizados en este trabajo, sustancias de partida como 6-cloropurina, adenina y 5-amino-4,6-dicloropirimidina, y también sustancias de referencia con citotoxicidad conocida como 6-mercaptopurina¹⁵ y elipticina como controles positivos.

Para determinar la CI_{50} se llevó a cabo un estudio preliminar de citotoxicidad con todos los compuestos a ensayar, seleccionando aquellos que mostraron una inhibición del crecimiento celular igual o superior al 50 % a la concentración de 125 μM en alguna de las líneas tumorales ensayadas. Los compuestos **15**, **28**, **38**, **39**, **44**, **49**, 6-cloropurina y adenina no mostraron citotoxicidad a esa concentración en ninguna de las líneas celulares, por lo que fueron excluidos de los ensayos posteriores para determinar su valor de CI_{50} en cada línea celular (Tabla I).

Tras este cribado inicial, el resto de compuestos fueron evaluados frente a todas las líneas celulares disponibles a 5 concentraciones diferentes preparadas a partir de la disolución madre por diluciones seriadas de $\frac{1}{4}$, obteniéndose concentraciones finales en el ensayo que van desde 250 μM hasta 0,98 μM . Todo ello permitió la determinación de los valores de CI_{50} (μM) para cada uno de los compuestos en cada línea celular, los cuales se recogen en la tabla siguiente (Tabla I).

¹⁵⁵ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

¹⁵ Hoffmann, M.; Chrzanowska, M.; Hermann, T.; Rychlewski, J. Modeling of purine derivatives transport across cell membranes based on their partition coefficient determination and quantum chemical calculations. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4482-4486.

Tabla I: Actividad inhibidora del crecimiento de los compuestos ensayados frente a diferentes líneas celulares (CI₅₀ μM±SD).

Nº	NCI-H460	HeLa	HepG2	MCF-7	PLP2
1	118±3	91±9	>125	>125	>125
2	96±10	40±4	>125	14±1	>125
3	38±3	22±2	64±6	60±1	44±3
4	33±0	32±0	38±3	15±1	>125
5	32±1	29±1	32±1	40±3	71±4
6	27±0	29±1	39±1	36±3	75±5
13	4,0±0,4	13±1	11±0	14±0	30±2
14	7,6±0,9	3,3±0,2	11±0	11±1	56±1
15	>125	>125	>125	>125	>125
19	>125	117±11	>125	77±4	>125
21	34±2	37±2	32±2	40±1	75±2
23	18±2	54±4	25±2	44±3	81±1
24	>125	>125	>125	59±1	>125
25	82±2	35±2	43±1	51±5	>125
28	>125	>125	>125	>125	>125
29	>125	36±3	81±8	67±5	>125
30	99±4	81±6	60±0	>125	73±1
31	>125	115±7	90±1	>125	>125
38	>125	>125	>125	>125	>125
39	>125	>125	>125	>125	>125
41	54±4	64±6	43±3	76±5	63±4
42	>125	96±7	8,3±0,7	36±3	>125
44	>125	>125	>125	>125	>125
46	35±3	50±1	53±4	49±2	52±2
47	41±3	25±3	52±3	52±3	64±4
48	65±4	83±8	47±2	50±5	71±2
49	>125	>125	>125	>125	>125
50	21±2	29±0	60±5	>125	>125
6-cloropurina	>125	>125	>125	>125	>125
adenina	>125	>125	>125	>125	>125
6-mercaptipurina	>125	>125	28±2	>125	>125
elipticina	8,0±0,2	4,7±0,5	13±1	3,7±0,2	8,6±0,1

De forma general, aquellos compuestos con un valor de CI_{50} para las 4 líneas celulares tumorales menor de $20 \mu\text{M}$ se consideraron bastante citotóxicos y con valores por encima de $70 \mu\text{M}$ se consideraron poco citotóxicos. En el caso de la línea no tumoral PLP2, son interesantes valores altos de CI_{50} que indican poca o nula toxicidad. Los mejores compuestos serán por tanto, aquellos que presenten valores bajos de CI_{50} para todas o alguna de las cuatro líneas tumorales y siempre inferiores a los de la línea no tumoral PLP2, ya que una de las propiedades que se busca en un compuesto antitumoral es que sea capaz de ejercer su acción citotóxica a una concentración a la que las células normales no se vean afectadas, es decir, que tenga selectividad en su acción frente a las células tumorales.

A la vista de los datos mostrados en la Tabla I, se pueden sacar algunas consideraciones más o menos generales de relación estructura-actividad. En primer lugar, se puede decir que la presencia de grupos alquilo más o menos voluminosos sobre un sistema de purina favorece la citotoxicidad en comparación con análogos simples como 6-cloropurina y adenina que resultaron inactivos en los ensayos, e incluso mejores que 6-mercaptapurina que sólo resultó activa en la línea celular HepG2.

Para facilitar una comparación y discusión de los resultados más detallada en términos de relación estructura-actividad, los compuestos evaluados se han agrupado en varios subtipos estructurales que se presentan en las tablas siguientes: 7-/9-alkil-6-cloropurinas (Tabla II), N^6 -alkiladeninas (Tabla III), pirimidinas (Tabla IV) y sistemas tricíclicos (Tabla V).

Tabla II: Valores de CI_{50} (μM) de los derivados 7-/9-alkuil-6-cloropurinas.

Compuesto	NCI-H460	HeLa	HepG2	MCF-7	PLP2
1 	118±3	91±9	>125	>125	>125
2 	96±10	40±4	>125	14±1	>125
3 	38±3	22±2	64±6	60±1	44±3
4 	33±0	32± 0	38±3	15±1	>125
5 	32±1	29±1	32±1	40±3	71±4
6 	27±0	29±1	39±1	36±3	75±5
13 	4,0±0,4	13±1	11±0	14±0	30±2
14 	7,6±0,9	3,3± 0,2	11±0	11±1	56±1

Los compuestos de este grupo se diferencian en el tamaño del resto alquílico y en la posición del mismo en el anillo de purina y todos ellos fueron más citotóxicos que 6-mercaptopurina en la mayoría de las líneas tumorales ensayadas.

De forma general y como se puede observar en los datos recogidos en esta tabla II, al aumentar el tamaño de la cadena aumenta la citotoxicidad. Así las 9- y 7-isoprenilpurinas, **1** y **2**, no presentaron actividad inhibitoria del crecimiento significativa contra ninguna de las cuatro líneas celulares tumorales estudiadas, presentando valores altos de CI_{50} , únicamente la purina **2** mostró una citotoxicidad interesante en la línea MCF-7 (14 μM).

La presencia de grupos más grandes como cinamilo o geranilo mejora la citotoxicidad respecto a los anteriores, con valores de CI_{50} similares entre las diferentes líneas tumorales, sobre todo en las geranilpurinas **5** y **6** (27-40 μM). Sí es de destacar la mayor actividad de la purina **4** frente a la línea MCF-7 (15 μM) sin mostrar toxicidad en la línea primaria PLP2.

Por último, las diterpenilpurinas **13** y **14** resultaron ser las más citotóxicas de todos los compuestos ensayados en las diferentes líneas de células tumorales (3,3-14 μM), siendo varias veces más potentes frente a las líneas tumorales que frente a la línea no tumoral PLP2. En concreto, el compuesto **13** fue el más potente frente a la línea NCI-H460 (4,0 μM) y el **14** presentó el mejor valor de citotoxicidad en la línea celular HeLa (3,3 μM). Ambos compuestos mejoraron los valores de citotoxicidad del patrón elipticina en una o varias de las líneas tumorales ensayadas y además con menor toxicidad frente a células no tumorales.

En cuanto a la posición de la cadena, se puede observar que aquellas purinas con el sustituyente alquilo en el nitrógeno N-7 fueron más potentes que sus análogos sustituidos en el nitrógeno N-9 y menos citotóxicas frente a PLP2, es decir, más selectivas (**2**, **4** y **14** vs **1**, **3** y **13**). Únicamente las purinas con un resto monoterpénico no mostraron diferencias significativas entre ambos regioisómeros (**5** vs **6**).

En general, aquellos compuestos con el sustituyente en el nitrógeno N-7 mostraron una mejor citotoxicidad y esa actividad mejoró a medida que el sustituyente era de mayor tamaño, es decir, más similar a los metabolitos de origen marino como agelasinas y asmarinas que motivaron este trabajo.

Tabla III: Valores de CI_{50} (μM) de los derivados N^6 -alquiladeninas.

Compuesto	NCI-H460	HeLa	HepG2	MCF-7	PLP2
19 	>125	117±11	>125	77±4	>125
21 	34±2	37±2	32±2	40±1	75±2
23 	18±2	54±4	25±2	44±3	81±1
41 	54±4	64±6	43±3	76±5	63±4
42 	>125	96±7	8,3±0,7	36±3	>125

En la tabla III se han incluido aquellas purinas que presentan un sustituyente de tipo alquilamino en la posición C-6, es decir, son derivados de adenina. Como se puede observar, todos mostraron una citotoxicidad moderada o baja con escasa selectividad frente a la línea PLP2, aunque sí fueron más citotóxicos que la propia adenina sin sustituir que resultó inactiva en todas las líneas celulares.

Analizando los diferentes sustituyentes, se puede decir que el cambio de posición de la cadena alquílica desde los nitrógenos N-7/9 al nitrógeno de la posición C-6, no mejora la potencia citotóxica, como ocurre cuando tenemos un resto geranilo (**21** vs **5/6**), e incluso conduce a una pérdida de actividad en la mayoría de las líneas ensayadas, como en el caso de un resto diterpenilo (**23** vs **13/14**), únicamente la línea NCI-H460 fue más sensible a la diterpenilpurina **23** hallándose una CI_{50} de 18 μM .

El compuesto resultante de la disustitución en el grupo amino de la adenina, compuesto **19**, condujo a uno de los menos potentes de todos los ensayados. De forma análoga, la disustitución tanto N-7 como en el nitrógeno de la posición C-6, tampoco mejoró la citotoxicidad de estos análogos como se puede ver para las purinas **41** y **42**, aunque sí es de destacar la selectividad de la isopreniladenina **42** frente a la línea celular HepG2 ($CI_{50} = 8,3 \mu\text{M}$). Comparando este compuesto **42**, con la 7-isoprenil-6-cloropurina, **2**, (Tabla II), la presencia de un grupo alquilamino en la posición C-6 aumenta significativamente la citotoxicidad frente a la línea celular HepG2.

Tabla IV: Valores de CI_{50} (μM) de los derivados de pirimidina.

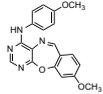
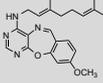
Compuesto		NCI-H460	HeLa	HepG2	MCF-7	PLP2
24		>125	>125	>125	59±1	>125
25		82±2	35±2	43±1	51±5	>125
29		>125	36±3	81±8	67±5	>125
30		99±4	81±6	60±0	>125	73±1
31		>125	115±7	90±1	>125	>125
46		35±3	50±1	53±4	49±2	52±2
47		41±3	25±3	52±3	52±3	64±4

Se han agrupado en la tabla IV los compuestos derivados de pirimidina precursores del sistema de purina, los cuales no presentaron actividad inhibitoria del crecimiento celular significativa frente a ninguna de las líneas tumorales estudiadas, siendo menos potentes que las correspondientes purinas a las que dan lugar (**29** vs **2**, **30** vs **6** y **31** vs **14**).

Dentro de los derivados de pirimidina, las alquilpirimidinas **25** y **29** presentaron mejores valores de CI_{50} para la línea HeLa (35 y 36 μM , respectivamente). Ambas se diferencian únicamente en el sustituyente de la posición C-4 siendo ligeramente más potente la pirimidina **25**, con un átomo de cloro sobre dicha posición, que la pirimidina **29** que lleva un grupo amino. De forma análoga a lo observado cuando se comparan las purinas agrupadas en las tablas II y III, la presencia de un átomo de cloro parece preferible a un grupo amino para la citotoxicidad, no afectando a la toxicidad sobre células no tumorales.

La presencia de sustituyentes aromáticos en las pirimidinas **46** y **47** indujo una cierta toxicidad tanto en las líneas celulares tumorales humanas como en las células no tumorales PLP2, ambas mostraron valores de CI_{50} similares para todas ellas.

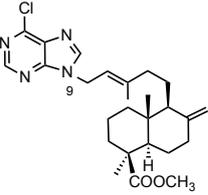
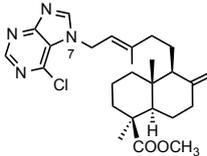
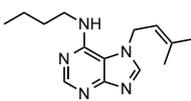
Tabla V: Valores de CI_{50} (μM) de sistemas tricíclicos derivados de pirimidina.

Compuesto	NCI-H460	HeLa	HepG2	MCF-7	PLP2
48 	65±4	83±8	47±2	50±5	71±2
50 	21±2	29±0	60±5	>125	>125

En este grupo sólo se han evaluado dos compuestos por lo que los resultados no son demasiados significativos. Cabe destacar que el compuesto **50** que presenta una cadena de geranilo, resultó más potente en las líneas NCI-H460 y HeLa (21 y 29 μM), siendo unas cinco veces más potente sobre estas líneas tumorales que sobre las células primarias PLP2.

A modo de resumen, se muestran a continuación los compuestos que presentaron el mejor valor de CI_{50} en cada una de las líneas celulares tumorales y se ha incluido el índice de selectividad (IS) calculado como el cociente entre la CI_{50} en la línea celular primaria PLP2 y la CI_{50} en la línea celular tumoral para la que mostró el menor valor

Tabla VI: Citotoxicidad y selectividad de los compuestos más destacados.

	NCI-H460	HeLa	MCF-7	HepG2
Estructura 				
N°	13	14		42
CI_{50} (μM)	4,0±0,4	3,3± 0,2	11±1	8,3±0,7
IS	7,5	17	5,1	>15

El compuesto más hepatotóxico del estudio fue el compuesto **13**, con un valor de CI_{50} en la línea celular primaria de 30±2 (μM).

El compuesto **14** que mostró los valores más bajos de CI_{50} en dos de las cuatro líneas celulares tumorales estudiadas (HeLa y MCF-7), resultó ser el compuesto con mejores resultados de todos los ensayos.

Los compuestos **13** y **14**, que mostraron los mejores resultados, presentan el sistema de purina en su estructura y un radical de tipo diterpenoide. Ambos son análogos semisintéticos de los compuestos naturales de origen marino recogidos en el apartado de introducción de este trabajo, lo que pone de manifiesto que la citotoxicidad de los compuestos de tipo alquilpurina mejora cuanto mayor es la similitud estructural con estos compuestos naturales.

Si comparamos estos resultados con los descritos en bibliografía para los productos naturales marinos mencionados anteriormente, se puede decir que algunos de nuestros compuestos mostraron valores de CI_{50} del mismo orden de magnitud que algunos de ellos. Esto sucede con agelasina D ($CI_{50}=3,7 \mu\text{M}$ en mieloma RPMI 8226/s),⁶⁷ agelasina G y agelasinas A y B ($CI_{50} \approx 4,8 \mu\text{M}$ y $CI_{50} \approx 3,1-6,2 \mu\text{M}$ en linfoma L1210, respectivamente).^{69,80} Sin embargo, nuestros compuestos no mejoraron los valores descritos para asmarinas A y B ($CI_{50} \approx 0,12-1,18 \mu\text{M}$ frente a carcinoma de pulmón A-549 y carcinoma de colon HT-29).⁸¹ Es importante tener en cuenta que estos datos recogidos de la bibliografía se refieren a diferentes líneas de células tumorales que las utilizadas en este trabajo y esto puede provocar diferencias significativas tal y como se ha mostrado en la discusión anterior. No obstante, esta comparación podría ser indicativa de la importancia de nuestros resultados.

Los compuestos más potentes **13** y **14**, resultan candidatos adecuados para continuar hacia la síntesis de análogos de asmarinas con sistemas de diazepinopurina y para estudiar otros aspectos relacionados con su mecanismo de acción, como su efecto sobre el perfil del ciclo celular y la muerte celular programada en alguna de las líneas celulares más sensibles como por ejemplo NCI-H460 o HeLa.

⁶⁷ Vik, A.; Hedner, E.; Charnock, C.; Samuelsen, O.; Larsson, R.; Gundersen, L. -L.; Bohlin, L. (+)-Agelasine D: improved synthesis and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 381-386.

⁶⁹ Fujii, T.; Itaya, T. The 11 positional isomers of N-x, N-y-dimethyladenine: Their chemistry, physicochemical properties, and biological activities. *Heterocycles* **1999**, *51*, 393-454.

⁸⁰ Fathi-Afshar, R.; Allen, T. M.; Krueger, C. A.; Cook, D. A.; Clanachan, A. S.; Vriend, R.; Baer, H. P.; Cass, C. E. Some pharmacological activities of novel adenine-related compounds isolated from a marine sponge *Agelas mauritania*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1989**, *67*, 276-281.

⁸¹ Yosief, T.; Rudi, A.; Stein, Z.; Goldberg, I.; García Gravalos, M. D.; Schleyer, M.; Kashman, Y. Asmarines A-C; Three novel cytotoxic metabolites from the marine sponge *Raspailia* sp. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3323-3326.

RESULTS AND DISCUSSION: CYTOTOXICITY ASSAYS

CYTOTOXICITY ASSAYS*

Most of the compounds prepared in this Thesis work have been evaluated as cytotoxic at the Polytechnic Institute of Bragança (Portugal), during a research stay by the PhD student in the research group of Dr. Isabel C. F. R. Ferreira (BioChemCore).

Cytotoxicity assays were carried out in cultured neoplastic cell lines and at the same time their toxicity versus a non tumour cell line was determine using a pocine liver primary cells, designed as PLP2.

Thus, the different human tumour cell lines used in the cytotoxic assays were:

- NCI-H460: non-small cell lung cancer
- HeLa: cervical carcinoma
- HepG2: hepatocellular carcinoma
- MCF-7: breast adenocarcinoma

Cell viability *in vitro* was determined by sulforhodamine B (SRB) assay, which was developed in 1990 and remains one of the most used methods for cytotoxicity screening.^{155,156} This assay has been widely used for drug-toxicity testing against different types of cancerous and non-cancerous cell lines.¹⁵⁷

The assay relies on the ability of sulforhodamine B to bind to proteic components of cells that have been fixed to tissue-cultured plates by trichloroacetic acid (TCA). Sulforhodamine B is a bright-pink aminoxanthene dye with two sulfonic groups that bind to basic amino-acid residues under mild acidic conditions, and dissociate under basic conditions.¹⁵⁸ As the amount of sulforhodamine B that binds is proportional to the number

* References including in this english part keep the numbering from the spanish document.

¹⁵⁵ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

¹⁵⁶ Vichai, V. Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112-1116.

¹⁵⁷ Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vitisca, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766.

¹⁵⁸ Lillie, R. D.; Conn, H. J *Conn's Biological Stains* 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, **1977**.

of viable cells, less coloration means greater inhibition of cell growth. Measures of the optical density was performed in a microplate reader at 515 nm (although the maximum absorbance of SRB can be achieved at 564 nm, wavelengths of 490-530 nm are recommended).¹⁵⁵

Once added the solution of sulforhodamine B and after incubation, at first sight it could be noted that those wells that had little colour, were the most interesting of the study, because the compound had been able to inhibit cell growth. By the optical density measurements, the percentage of cell growth inhibition of the compounds was calculated and GI₅₀ was determined, which is drug concentration (in μM) causing a 50 % cell growth inhibition.

The compounds tested were a total of 32 including, in addition to the heterocyclic compounds synthesized in this work, starting materials as 6-chloropurine, adenine and 5-amino-4,6-dichloropyrimidine, and also reference substances with known cytotoxicity as 6-mercaptopurine¹⁵ and ellipticine as positive controls.

A preliminary cytotoxicity study was carried out with all compounds. Those that showed an inhibition of cell growth equal or more than 50 % at concentration of 125 μM in some tested tumour lines, were selected for further studies. Compounds **15**, **28**, **38**, **39**, **44**, **49**, 6-chloropurine and adenine showed no cytotoxicity at this concentration in any of the cell lines, so they were excluded from further testing to determine their GI₅₀ value on each cell line (Table I).

After this initial screening, the remaining compounds were evaluated against all available cell lines at 5 different concentrations that were prepared from the stock solution by serial dilutions of $\frac{1}{4}$. The final concentrations in the assay ranged from 250 μM to 0.98 μM . This allowed determining the GI₅₀ values (μM) for each compound on each cell line, which are collected in the following table (Table I).

¹⁵⁵ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

¹⁵ Hoffmann, M.; Chrzanowska, M.; Hermann, T.; Rychlewski, J. Modeling of purine derivatives transport across cell membranes based on their partition coefficient determination and quantum chemical calculations. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4482-4486.

Table I: Growth inhibitory activity of compounds against different cell lines
(GI₅₀ μM±SD).

Compound	NCI-H460	HeLa	HepG2	MCF-7	PLP2
1	118±3	91±9	>125	>125	>125
2	96±10	40±4	>125	14±1	>125
3	38±3	22±2	64±6	60±1	44±3
4	33±0	32±0	38±3	15±1	>125
5	32±1	29±1	32±1	40±3	71±4
6	27±0	29±1	39±1	36±3	75±5
13	4.0±0.4	13±1	11±0	14±0	30±2
14	7.6±0.9	3.3±0.2	11±0	11±1	56±1
15	>125	>125	>125	>125	>125
19	>125	117±11	>125	77±4	>125
21	34±2	37±2	32±2	40±1	75±2
23	18±2	54±4	25±2	44±3	81±1
24	>125	>125	>125	59±1	>125
25	82±2	35±2	43±1	51±5	>125
28	>125	>125	>125	>125	>125
29	>125	36±3	81±8	67±5	>125
30	99±4	81±6	60±0	>125	73±1
31	>125	115±7	90±1	>125	>125
38	>125	>125	>125	>125	>125
39	>125	>125	>125	>125	>125
41	54±4	64±6	43±3	76±5	63±4
42	>125	96±7	8.3±0.7	36±3	>125
44	>125	>125	>125	>125	>125
46	35±3	50±1	53±4	49±2	52±2
47	41±3	25±3	52±3	52±3	64±4
48	65±4	83±8	47±2	50±5	71±2
49	>125	>125	>125	>125	>125
50	21±2	29±0	60±5	>125	>125
6-chloropurine	>125	>125	>125	>125	>125
adenine	>125	>125	>125	>125	>125
6- mercaptopurine	>125	>125	28±2	>125	>125
ellipticine	8.0±0.2	4.8±0.5	13±1	3.7±0.2	8.6±0.1

In general, those compounds with a GI₅₀ value under 20 μM were considered good cytotoxics, while values over 70 μM were considered slightly cytotoxics. In the case of non-tumour line PLP2, high GI₅₀ values are interesting, which indicates little or no toxicity. Best compounds are therefore, those that exhibiting low GI₅₀ values for some or all of the four tumour lines and always lower than values on non-tumour line PLP2, as one of the desired properties in an antitumour compound is to be able to exert its cytotoxic action at a concentration at which normal cells are not affected, that is, having selectivity in its action against tumour cells.

As it can be noted in Table I, it is possible to establish some general considerations of structure-activity relationship. First, it could be said that the presence of alkyl groups in a purine system promotes cytotoxicity compared to simple analogues as 6-chloropurine and adenine, which were inactive in the tests, and even better than 6-mercaptopurine which was only active in the HepG2 cell line.

In order to facilitate a more detailed comparison and discussion of the results in terms of structure-activity relationship, the compounds tested have been grouped into several subtypes that are presented in the following tables: 7-/9-alkyl-6-chloropurines (Table II), *N*⁶-alkyladenines (Table III), pyrimidines (Table IV) and tricyclic systems (Table V).

Table II: GI₅₀ values (μM) of the 7-/9-alkyl-6-chloropurines derivatives.

Compound		NCI-H460	HeLa	HepG2	MCF-7	PLP2
1		118±3	91±9	>125	>125	>125
2		96±10	40±4	>125	14±1	>125
3		38±3	22±2	64±6	60±1	44±3
4		33±0	32± 0	38±3	15±1	>125
5		32±1	29±1	32±1	40±3	71±4
6		27±0	29±1	39±1	36±3	75±5
13		4.0±0.4	13±1	11±0	14±0	30±2
14		7.6±0.9	3.3± 0.2	11±0	11±1	56±1

Compounds of this group differ in the alkyl moiety size and position at the purine ring. All of them were more cytotoxic than 6-mercaptopurine in most tumour cell lines tested.

As it can be seen in Table II, an increasing of chain size led to a better cytotoxicity. Thus, the 9- and 7-isoprenylpurines, **1** and **2**, did not show significant growth inhibitory activity against any of the four tumour cell lines tested, only the purine **2** showed an interesting cytotoxicity against MCF-7 cells (14 μM).

The presence of larger groups like cinnamyl or geranyl improved the cytotoxicity of the above mentioned groups, having similar GI₅₀ values for all the tumour cell lines, especially geranylpurines **5** and **6** (27-40 μM). It is interesting to note the activity of the purine **4** against MCF-7 line (15 μM) without showing toxicity in the primary line PLP2.

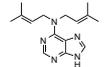
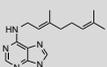
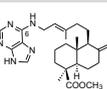
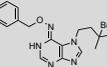
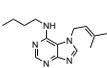
Finally, diterpenylpurines **13** and **14** were the most cytotoxic of all compounds tested on the different tumour cell lines (3.3-14 μM), being several times more potent against

tumour lines than against non-tumoral line PLP2. Particularly, compound **13** was the most potent against NCI-H460 line (4.0 μM) and **14** presented the best value cytotoxicity against HeLa cell line (3.3 μM). Both compounds improved cytotoxicity values of ellipticine in one or more of the tumour lines tested and besides showed less toxicity against non-tumour cells.

About the position of the chain, it could be noted that purines with the alkyl substituent at the N-7 nitrogen were more potent than their analogues substituted at the N-9 nitrogen and less cytotoxic against PLP2, that is, more selective (**2**, **4** and **14** vs **1**, **3** and **13**), only purines with a monoterpene core did not show significant difference between the two regioisomers (**5** vs **6**).

As a summary, it can be said that 7-substituted compounds showed better cytotoxicity than 9-substituted analogues and that activity improved as the substituent was larger, like those present in the marine metabolites agelasines and asmarines, which motivated this work.

Table III: GI₅₀ values (μM) of the N⁶-alkyladenines derivatives.

Compound	NCI-H460	HeLa	HepG2	MCF-7	PLP2
19 	>125	117±11	>125	77±4	>125
21 	34±2	37±2	32±2	40±1	75±2
23 	18±2	54±4	25±2	44±3	81±1
41 	54±4	64±6	43±3	76±5	63±4
42 	>125	96±7	8.3±0.7	36±3	>125

Purines having an alkylamino substituent at C-6 position, this is, adenine derivatives, are included in Table III. As it could be noted, all compounds showed moderate or low cytotoxicity with a poor selectivity against PLP2 line, however they were more cytotoxic than unsubstituted adenine, that was inactive in all cell lines.

Analyzing the different substituents, it could be said that the change of position of the alkyl chain from N-7/9 nitrogens to nitrogen at C-6 position, does not improve cytotoxic potency, as happens with a geranyl moiety (**21** vs **5/6**), and even leads to a loss of activity in most of lines tested, as in the case of a diterpenyl core (**23** vs **13/14**), only NCI-H460 was the most sensitive line to the diterpenylpurine **23**, with a GI₅₀ of 18 μM.

The resultant compound of disubstitution at the amino group of adenine, compound **19**, led to one of the less potent of all tested. Similarly, the disubstitution at N-7 and nitrogen C-6 position like purines **41** and **42** did not improve the cytotoxicity, although it is noteworthy the selectivity of isoprenyladenine **42** against HepG2 cell line (GI₅₀ = 8.3 μM). If we compare this compound **42** with 7-isoprenyl-6-chloropurine, **2**, (Table II) the presence of an alkylamino group at the C-6 position, significantly increased cytotoxicity against HepG2 cell line.

Table IV: GI₅₀ values (μM) of the pyrimidine derivatives.

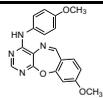
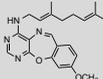
Compound		NCI-H460	HeLa	HepG2	MCF-7	PLP2
24		>125	>125	>125	59±1	>125
25		82±2	35±2	43±1	51±5	>125
29		>125	36±3	81±8	67±5	>125
30		99±4	81±6	60±0	>125	73±1
31		>125	115±7	90±1	>125	>125
46		35±3	50±1	53±4	49±2	52±2
47		41±3	25±3	52±3	52±3	64±4

Pyrimidine derivatives, precursors of purine system, have been grouped in Table IV. They did not show significant cell growth inhibitory activity against any of tumour lines studied, being less potent than the corresponding purines (**29** vs **2**, **30** vs **6** and **31** vs **14**).

Among the pyrimidine derivatives, the alkylpyrimidines **25** and **29** showed better GI₅₀ values for HeLa line (35 and 36 μM, respectively). Both of them differ only in the substituent at the C-4 position, being slightly more potent pyrimidine **25**, with a chlorine atom in that position, than pyrimidine **29**, which has an amino group. The same occurs when purines grouped in Tables II and III are compared, the presence of a chlorine atom seems preferable to an amino group for the cytotoxicity, and this does not affect the toxicity in non-tumour cells.

Aromatic substituents in pyrimidines **46** and **47** induced some toxicity both in human tumour cell lines as in non-tumour cells PLP2, both of them showed similar GI₅₀ values for all lines.

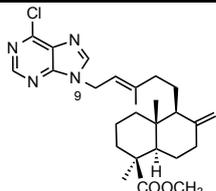
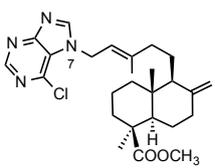
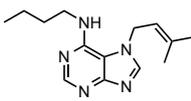
Table V: GI₅₀ values (μM) of the tricyclic pyrimidine derivatives systems.

Compound	NCI-H460	HeLa	HepG2	MCF-7	PLP2
48 	65±4	83±8	47±2	50±5	71±2
50 	21±2	29±0	60±5	>125	>125

In this group only two compounds have been evaluated so the results are not significant enough to draw conclusions. However, it should be noted that compound **50** bearing a geranyl chain, was more potent in NCI-H460 and HeLa lines (21 and 29 μM), being about five times more potent on these tumour lines than primary cells PLP2.

As a summary, we include here the compounds that presented the best GI₅₀ value in each of the tumour cell lines and their selectivity index (SI) calculated as the ratio between GI₅₀ for primary cell line PLP2 and GI₅₀ for the tumour cell line that showed the lowest value.

Table VI: Cytotoxicity and selectivity of the most important compounds.

Compound	NCI-H460	HeLa	MCF-7	HepG2
	13		14	
GI ₅₀ (μM)	4.0±0.4	3.3± 0.2	11±1	8.3±0.7
SI	7.5	17	5.1	>15

The most hepatotoxic compound of the study was the compound **13**, with a GI₅₀ value in primary cell line of 30±2 (μM).

Compound **14** showed the lowest GI₅₀ values in two of the four tumour cell lines tested (HeLa and MCF-7) and turned out to be the compound with the best results of all tested.

Compounds **13** and **14**, which showed the best results, presented a purine system in its structure and a substituent of diterpenoid type. Both of them can be considered semisynthetic analogues of marine natural metabolites as those presented in the introduction of this work, which indicates that the cytotoxicity of this type of alkylpurines improves with the structural similarity to those natural compounds.

If we compare our results with those describes in the literature for the above mentioned marine natural products, it can be said that several of our compounds showed GI₅₀ values in the same order of magnitude than some of them. This happens with agelasine D (GI₅₀=3.7 μM on myeloma RPMI 8226/s),⁶⁷ agelasine G and agelasimines A and B (GI₅₀ ≈ 4.8 μM and GI₅₀ ≈ 3.1-6.2 μM against lymphoma L1210, respectively).^{69,80} However our compounds did not improve the values described for asmarines A and B (0.12-1.18 μM against lung carcinoma A-549 and colon carcinoma HT-29).⁸¹ It is important to consider that these literature data refer to different tumour cell lines that those used in this work and this can be make significant differences as we have shown in the previous discussion. Nevertheless, this comparison can be indicative of the importance of our results.

The most potent compounds **13** and **14**, are suitable candidates to continue towards the synthesis of analogues of asmarines with diazepinopurine systems and to study other aspects related to its mechanism of action, such as its effect on cell cycle profile and death cell programmed in one of the most sensitive cell lines such as NCI-H460 or HeLa.

⁶⁷ Vik, A.; Hedner, E.; Charnock, C.; Samuelsen, O.; Larsson, R.; Gundersen, L. -L.; Bohlin, L. (+)-Agelasine D: improved synthesis and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 381-386.

⁶⁹ Fujii, T.; Itaya, T. The 11 positional isomers of N-x, N-y-dimethyladenine: Their chemistry, physicochemical properties, and biological activities. *Heterocycles* **1999**, *51*, 393-454.

⁸⁰ Fathi-Afshar, R.; Allen, T. M.; Krueger, C. A.; Cook, D. A.; Clanachan, A. S.; Vriend, R.; Baer, H. P.; Cass, C. E. Some pharmacological activities of novel adenine-related compounds isolated from a marine sponge *Agelas mauritania*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1989**, *67*, 276-281.

⁸¹ Yosief, T.; Rudi, A.; Stein, Z.; Goldberg, I.; García Gravalos, M. D.; Schleyer, M.; Kashman, Y. Asmarines A-C; Three novel cytotoxic metabolites from the marine sponge *Raspailia* sp. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3323-3326.

PARTE EXPERIMENTAL

TÉCNICAS GENERALES

INSTRUMENTACIÓN

Espectroscopía de IR

Los ensayos se realizaron en dos espectrofotómetros, algunos en Nicolet Impact 410 y otros en Spectrum BX (FT-IR System, PerkinElmer), todos ellos en película sobre cristales de NaCl. Los valores de número de onda de máxima vibración ($\nu_{\text{máx}}$) se expresan en cm^{-1} .

Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

Los espectros de masas de alta resolución se adquirieron en un espectrómetro QSTAR XL híbrido de cuadrupolo-tiempo de vuelo, modelo Applied Biosystems, empleando el electrospray como modo de ionización a 5500 V y un detector de tiempo de vuelo (ESI-Q-TOF), introduciendo las muestras a través de un cromatógrafo HPLC Agilent 1100. Los iones observados se expresan como m/z .

Espectroscopía de RMN

^1H y ^{13}C

Se emplearon varios espectrómetros para la realización de los ensayos: espectrómetro Bruker AC 200 MHz (200 MHz para ^1H y 50,3 MHz para ^{13}C), espectrómetro Bruker Advance 400 MHz DRX (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) y espectrómetro Varian Mercury Vx 400 MHz (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C), indicándose en las tablas y figuras del apartado de espectroscopía el uso del equipo Bruker AC 200 MHz. El disolvente utilizado fue CD_3OD , tomando como referencia la señal residual del disolvente sin deuterar, indicándose en las figuras el uso de CDCl_3 . Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

La multiplicidad de los carbonos se determina utilizando la secuencia de pulsos DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer). La secuencia distingue los carbonos protonados CH , CH_2 y CH_3 utilizando pulsos de protón a través del desacoplador a 90 y 135°.

HMQC

Los experimentos de correlación heteronuclear $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ a un enlace se adquirieron en el Bruker Advance 400 MHz DRX utilizando la secuencia Bruker *inv4gs*, que corresponde a una secuencia HMQC con la selección de la coherencia cero cuanto y doble cuanto con una serie de tres pulsos de gradientes sinusoidales, longitud del pulso de gradiente de 1,5 ms con una relación de 50:30:40 con respecto a la longitud total de pulso y un intervalo de recuperación del gradiente de 100 ms. En un experimento típico la modulación se sintoniza para $^1J_{\text{H,C}} = 145$ Hz, que corresponde a un intervalo de 3,45 ms y desacoplando con una secuencia *garp* en ^{13}C en el momento de la adquisición. La transformada de Fourier en ambas direcciones se realiza después de aplicar una función exponencial de 0,3 Hz en ^1H y una función sinusoidal en ^{13}C .

HMBC

Para las correlaciones a larga distancia, a dos o tres enlaces, se utilizó el Bruker Advance 400 MHz DRX utilizando la secuencia Bruker *inv4glplrnd*, que corresponde a una secuencia de HMBC que utiliza un filtro de paso bajo para la eliminación de la correlación directa en función de la constante de acoplamiento $^1J_{\text{H,C}} = 145$ Hz. La secuencia de pulsos de gradientes para la selección de la coherencia es la misma que en el caso anterior y se aplica un nuevo intervalo de evolución cuyos valores pueden ser 50 ms (10 Hz), 83 ms (6 Hz) y 110 ms (4,5 Hz) antes de la selección de la coherencia y no se desacopla durante la adquisición. La transformada de Fourier en ambas dimensiones se realiza con las mismas funciones que en el caso anterior.

Microondas

Para llevar a cabo reacciones por irradiación con microondas se emplearon dos equipos diferentes: CEM Discover SP (disponible temporalmente) y Anton Paar Monowave 300 reactor de microondas monomodo, siendo este último el utilizado en la mayoría de los casos.

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Cromatografía en capa fina

Para llevar a cabo el control de las reacciones se utilizaron láminas de aluminio DC-Fertigfolien ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄ de 0,20 mm de espesor de capa con recubrimiento de gel de sílice y con indicador fluorescente UV₂₅₄.

Las sustancias que presentaron fluorescencia se visualizaron por iluminación con luz UV de $\lambda = 254$ nm y $\lambda = 336$ nm antes de ser reveladas mediante pulverización con una disolución de ácido fosfomolibdico al 10 % en etanol seguido de calentamiento durante unos segundos.

Cromatografía en columna

Se utilizaron columnas de vidrio rellenas con gel de sílice MERCK 60 (0,063-0,200 mm), normalmente en proporción 50-60 g de fase estacionaria por cada gramo de sustancia a cromatografiar.

Cromatografía preparativa en capa fina

Se desarrollaron sobre capas de 1 mm de espesor de gel de sílice MERCK 60, F₂₅₄.

PREPARACIÓN DE DISOLVENTES Y REACTIVOS

Acetona: el disolvente comercial se secó sobre K_2CO_3 .

Benceno (C_6H_6): se almacenó sobre láminas de sodio.

Diazometano (CH_2N_2): se obtuvo el producto generado por hidrólisis al destilar la disolución etérea generada al hacer gotear desde un embudo de adición una disolución metanólica de hidróxido potásico (KOH) al 10 % sobre una suspensión de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida en dietil éter en un matraz de destilación. El destilado se recogió sobre éter seco y se conservó preservado de la luz en el frigorífico.

Diclorometano (DCM): el disolvente comercial se secó sobre K_2CO_3 .

Dimetilformamida (DMF): el disolvente comercial se secó sobre tamiz molecular de 4 Å.

1,4-Dioxano: el disolvente comercial se secó sobre tamiz molecular de 4 Å.

Etanol absoluto (EtOH): el disolvente comercial se secó sobre tamiz molecular de 4 Å.

Éter etílico (Et_2O): el disolvente comercial se secó sobre tamiz molecular de 4 Å.

Isopropanol: se utilizó el comercial que se secó sobre CaO.

***n*-Hexano (C_6H_{14}):** se destiló el hexano comercial en columna de rectificación, recogién dose sobre $CaCl_2$.

Metanol (MeOH): se utilizó el comercial que se secó sobre tamiz molecular de 4 Å cuando se requirieron condiciones anhidras.

Piridina (Pir): el disolvente comercial se secó sobre tamiz molecular de 4 Å.

Tetrahidrofurano (THF): se destiló el comercial inmediatamente antes de usarse sobre sodio laminado, bajo atmósfera inerte usando benzofenona como indicador.

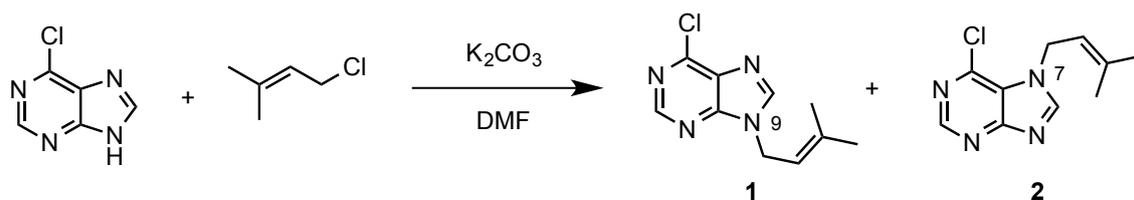
Tolueno: se almacenó sobre láminas de sodio.

A. PREPARACIÓN DE ALQUILPURINAS*

A.1. OBTENCIÓN DE 7/9-ALQUIL-6-CLOROPURINAS

A.1.1. Alquilación de 6-cloropurina con derivados halogenados comerciales

Con 1-cloro-3-metilbut-2-eno



Sobre una disolución de 220 μ L (1,94 mmol) de 1-cloro-3-metilbut-2-eno y 15 mL de dimetilformamida (DMF) se adicionaron 300 mg (1,94 mmol) de 6-cloropurina y 268 mg (1,94 mmol) de K_2CO_3 . La mezcla se calentó a 80 $^{\circ}C$ con agitación magnética en atmósfera inerte durante 20 h.

Transcurrido ese tiempo se adicionaron 20 mL de agua y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 251 mg de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de CH_2Cl_2 :EtOH 96 % (95:5):

- a) 60 mg (14 %) de la 9-alkil-6-cloropurina **1**.

RMN 1H : tabla 1, figura 1.

RMN ^{13}C : tabla 1, figura 1.

IR ($\nu_{m\acute{a}x}$): 3080, 2921, 1660, 1592, 1561, 1493, 843 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $C_{10}H_{11}N_4Cl + H^+$: 223,0745 u; encontrada: 223,0740 m/z .

- b) 22 mg (5 %) de la 7-alkil-6-cloropurina **2**.

RMN 1H : tabla 1, figura 2.

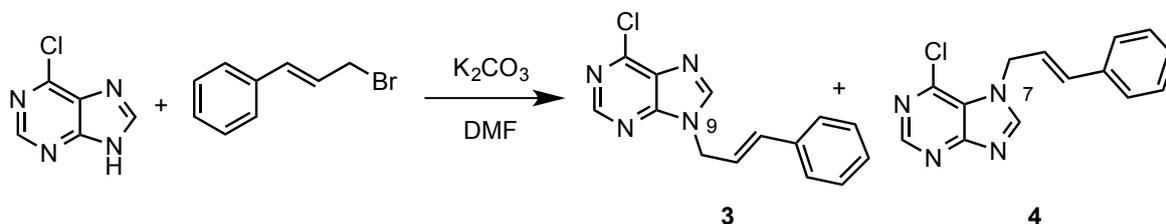
RMN ^{13}C : tabla 1, figura 2.

IR ($\nu_{m\acute{a}x}$): 3053, 2973, 1670, 1600, 1537, 1481, 840 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $C_{10}H_{11}N_4Cl + H^+$: 223,0745 u; encontrada: 223,0746 m/z .

* Las tablas y figuras indicadas en la parte experimental corresponden al apartado de espectroscopía.

Con bromuro de cinamilo



A una disolución de 395 mg (1,94 mmol) de bromuro de cinamilo en 20 mL de DMF se añadieron 300 mg (1,94 mmol) de 6-cloropurina y 268 mg (1,94 mmol) de K_2CO_3 , calentándose la mezcla a 80 °C con agitación magnética en atmósfera inerte durante 20 h.

Transcurrido este tiempo, se operó de la misma forma descrita en la reacción anterior, obteniéndose 310 mg de producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de CH_2Cl_2 :EtOH 96 % (97:3):

- a) 120 mg (23 %) de la 9-alkil-6-cloropurina **3**.

RMN 1H : tabla 2, figura 3.

RMN ^{13}C : tabla 2, figura 3.

IR ($\nu_{m\acute{a}x}$): 3053, 3013, 2920, 1592, 1561, 1495, 1436, 966, 853, 759, 692 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $C_{14}H_{11}N_4Cl + H^+$: 271,0745 u; encontrada: 271,0747 m/z .

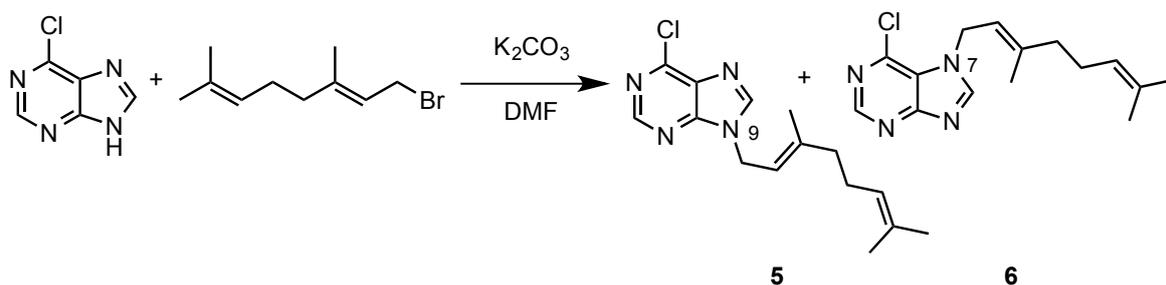
- b) 46 mg (9 %) de la 7-alkil-6-cloropurina **4**.

RMN 1H : tabla 2, figura 4.

RMN ^{13}C : tabla 2, figura 4.

IR ($\nu_{m\acute{a}x}$): 3060, 2920, 1600, 1537, 1480, 1449, 972, 836, 761, 693 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $C_{14}H_{11}N_4Cl + H^+$: 271,0745 u; encontrada: 271,0743 m/z .

Con bromuro de geranilo

256 μL (1,29 mmol) de bromuro de geranilo se disolvieron en 7 mL de DMF, se añadieron 200 mg (1,29 mmol) de 6-cloropurina y 178 mg (1,29 mmol) de K_2CO_3 . La mezcla se calentó a 80 $^\circ\text{C}$ con agitación magnética en atmósfera inerte durante 20 h.

Transcurrido este tiempo, se operó de la misma forma descrita anteriormente, obteniéndose 366 mg de producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de CH_2Cl_2 :EtOH 96 % (98:2):

- a) 157 mg (42 %) de la 9-terpenil-6-cloropurina **5**.

RMN ^1H : tabla 3, figura 5.

RMN ^{13}C : tabla 3, figura 5.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3050, 2973, 1592, 1563, 1490, 1440, 933, 856 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{Cl} + \text{H}^+$: 291,1371 u; encontrada: 291,1378 m/z .

- b) 50 mg (13 %) de la 7-terpenil-6-cloropurina **6**.

RMN ^1H : tabla 3, figura 6.

RMN ^{13}C : tabla 3, figura 6.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3050, 2980, 1599, 1536, 1476, 1446, 973, 840 cm^{-1} .

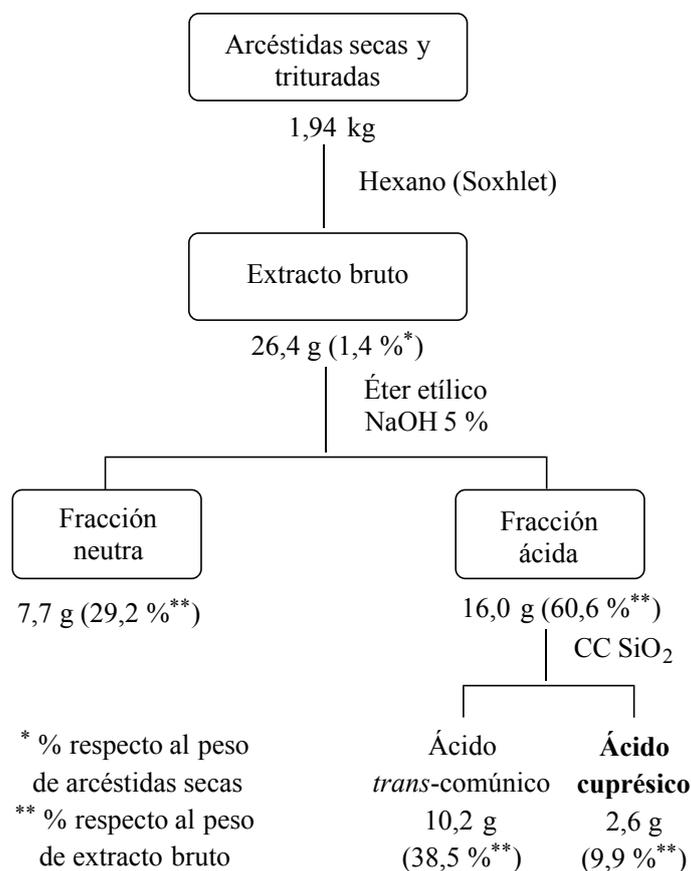
HRMS: calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{Cl} + \text{H}^+$: 291,1371 u; encontrada: 291,1369 m/z .

A.1.2. Alquilación de 6-cloropurina con 15-bromo-15-desoxiisocupresato de metilo obtenido a partir de ácido cuprésico

Aislamiento del ácido cuprésico

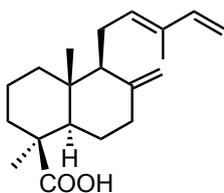
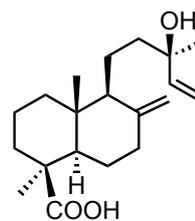
1,94 kg de arcéstidas secas y trituradas de *Cupressus sempervirens*, se extrajeron con *n*-hexano en un aparato Soxhlet durante 12 h. Tras la eliminación del disolvente se obtuvo el extracto bruto (26,4 g).

Este extracto se disolvió en éter etílico y se realizó un fraccionamiento ácido-base con una disolución acuosa de NaOH 5 %, que condujo a 16,0 g (60,6 %) de fracción ácida y 7,7 g (29,2 %) de fracción neutra, respecto al peso del extracto bruto, tal como se presenta en el siguiente esquema.



La fracción ácida obtenida, 16,0 g, se cromatografió en columna sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de Hex:AcOEt (8:2):

- 10,2 g de ácido *trans*-comunicico (63,5 % respecto al peso de la fracción ácida).
- 2,6 g de ácido cuprésico (16,4 % respecto al peso de la fracción ácida).

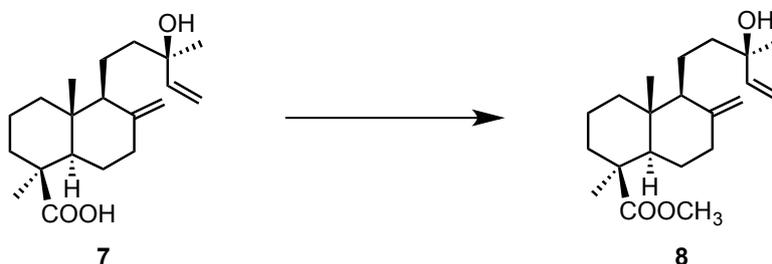
Ácido *trans*-comúnico

Ácido cuprésico

Obtención de 15-bromo-15-desoxiisocupresato de metilo

A) Por isomerización y bromación del acetilcupresato de metilo

Obtención del cupresato de metilo



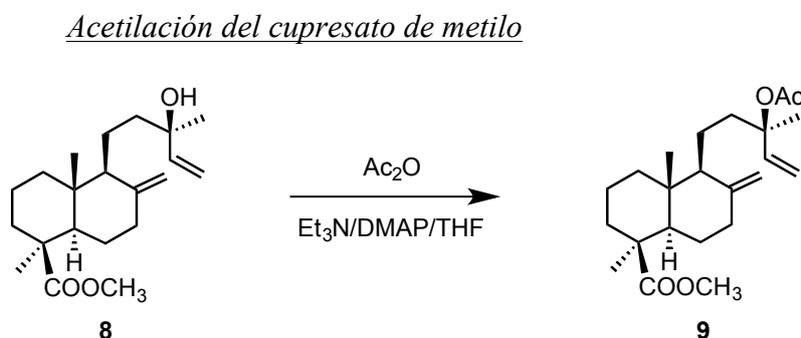
- a) 2,16 g (6,72 mmol) de ácido cuprésico, **7**, se trataron con una disolución etérea saturada de diazometano (15 mL) y se dejó actuar durante 24 h en completa oscuridad. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente obteniéndose 2,0 g (96 %) del éster metílico **8**.
- b) Sobre una disolución de 115 mg (0,36 mmol) de ácido cuprésico, **7**, en 5 ml de carbonato de dimetilo (DMC) se adicionaron 81 μ L (0,5 mmol) de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) y 3 mL de metanol. La mezcla resultante se mantuvo a reflujo, agitación magnética y atmósfera inerte durante 8 días. El producto de reacción, una vez eliminado el disolvente, se disolvió en AcOEt y se lavó con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ y de NaCl. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y por evaporación del disolvente se obtuvieron 48 mg (40 %) del cupresato de metilo, **8**.
- c) A una disolución de 1,4 g (4,4 mol) de ácido cuprésico, **7**, en 15 ml en acetona seca se le añadieron 2,4 g (17 mol) de K₂CO₃ y 6 ml de CH₃I. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente con agitación y atmósfera inerte durante 75 min. Finalizado el

tiempo, el producto de reacción se redisolvió en acetona y se evaporó el disolvente obteniéndose 1,3 g (89 %) del cupresato de metilo, **8**.

- d) A una disolución de 53 mg (0,2 mmol) de ácido cuprésico, **7**, en 10 mL de *t*-butilmetil éter se le adicionaron 100 μ L (0,20 mmol) de TMSCHN₂ 2M en hexano. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente con agitación y atmósfera inerte durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, en el espectro de RMN de ¹H se observó mayoritariamente el producto de partida.
- e) A 50 mg (0,2 mmol) de ácido cuprésico, **7**, disueltos en 10 mL de CH₂Cl₂ se añadió una disolución de 94 μ L (0,2 mmol) de TMSCHN₂ 2M en hexano. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente con agitación magnética y atmósfera inerte durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, en su espectro de RMN de ¹H se observó mayoritariamente el producto de partida.
- f) A una disolución de 360 mg (1,12 mmol) de ácido cuprésico, **7**, en benceno:metanol (6 mL, 1:1), se adicionaron 700 μ L (4,48 mmol) de TMSCHN₂ 2 M en hexano. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación y atmósfera inerte durante 1 h. Transcurrido el tiempo se evaporó el disolvente, obteniéndose 368 mg (98 %) del cupresato de metilo, **8**.

RMN ¹H: tabla 4, figura 8.

RMN ¹³C: tabla 4, figura 8.

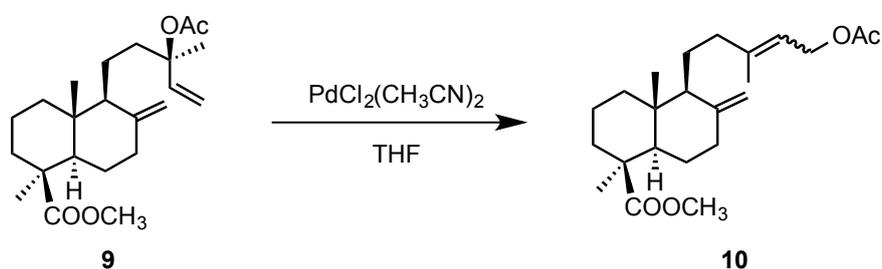


A una disolución de 1,04 g (3,11 mmol) de cupresato de metilo, **8**, en 15 mL de THF se adicionaron 1 mL de Et₃N, 1 mL de Ac₂O y 45 mg (0,36 mmol) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y se mantuvo a 85 °C en agitación durante 35 h. Se

evaporó el disolvente y el producto se redisolvió en éter etílico, se añadió hielo picado y, tras fundirse éste, la disolución etérea se lavó sucesivamente con HCl 2 N y disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ y de NaCl hasta pH neutro, y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 917 mg de producto de reacción que se cromatógrafió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de Hex:AcOEt (9:1), 671 mg (57 %) de acetilcupresato de metilo, **9**.

RMN ¹H: tabla 4, figura 9.

Isomerización del acetilcupresato de metilo

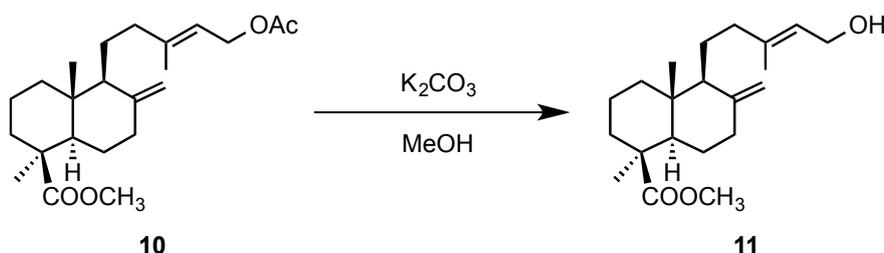


A 671 mg (1,78 mmol) del compuesto **9** disueltos en 15 mL de THF, se adicionaron 100 mg (0,387 mmol) del complejo PdCl₂(CH₃CN)₂ y se mantuvo a temperatura ambiente en agitación durante 1 h. Finalizado el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente y se disolvió el producto en AcOEt, lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl y secándola con Na₂SO₄ anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 640 mg (95 %) del compuesto **10**.

RMN ¹H: tabla 5, figura 10.

RMN ¹³C: tabla 5, figura 10.

Saponificación del acetilisocupresato de metilo

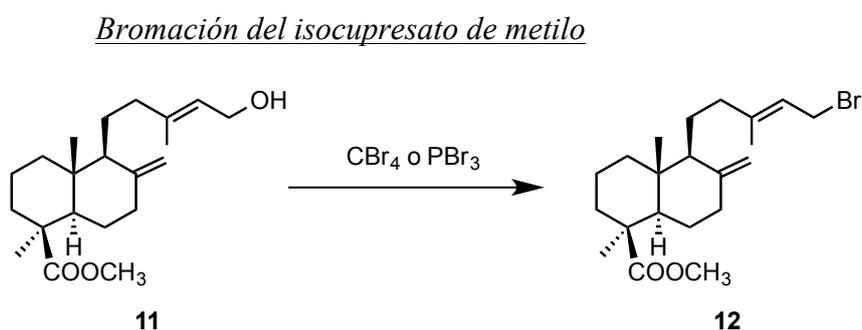


640 mg (1,70 mmol) del compuesto **10** se disolvieron en 20 mL de una disolución saturada de K₂CO₃ en metanol, manteniendo la disolución a temperatura ambiente en

agitación durante 15 h. Finalizada la reacción se eliminó el disolvente, se añadió agua y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y, por evaporación del disolvente, se obtuvieron 530 mg de producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla Hex:AcOEt (8:2), 326 mg (57 %) del compuesto **11**.

RMN ¹H: tabla 5, figura 11.

RMN ¹³C: tabla 5, figura 11.



a) Con CBr₄

A una disolución de 158 mg (0,473 mmol) del alcohol **11** disueltos en 8 mL de CH₂Cl₂ se adicionaron 156 mg (0,470 mmol) de CBr₄. La mezcla se mantuvo a 0 °C y se añadieron 124 mg (0,473 mmol) de Ph₃P, manteniéndola en agitación y atmósfera inerte durante 90 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente y se obtuvieron 525 mg de producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de Hex:AcOEt (95:5), 98 mg (52 %) del derivado bromado **12**.

RMN ¹H: tabla 5, figura 12.

RMN ¹³C: tabla 5, figura 12.

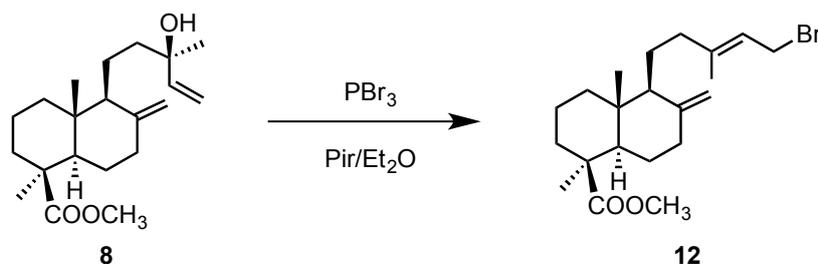
IR (ν_{máx}): 3051, 2932, 2849, 1726, 1644, 1154, 1228, 993, 881 cm⁻¹.

b) Con PBr₃

Una disolución de 997 mg (2,98 mmol) del alcohol **11** en 0,25 mL de piridina y 30 mL de éter etílico se mantuvo a 0 °C y se adicionaron 280 μL (2,95 mmol) de PBr₃. La mezcla se dejó evolucionar a temperatura ambiente en agitación durante 1 h. Finalizada la reacción se añadió hielo picado y la mezcla resultante se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó consecutivamente con disoluciones acuosas de HCl 2 N, saturadas de

NaHCO₃ y de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y, por evaporación del disolvente, se obtuvieron 1,05 g de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de Hex:AcOEt (9:1), 945 mg (80 %) del derivado bromado **12**.

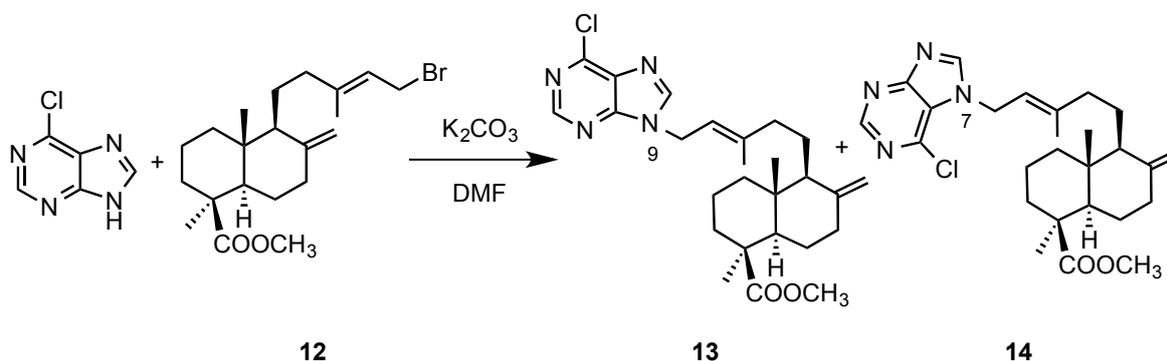
B) Por isomerización y bromación del cupresato de metilo



Sobre una disolución de 572 mg (1,71 mmol) de cupresato de metilo, **8**, disueltos en 9 mL de éter etílico y 140 μ L (1,71 mmol) de piridina enfriada a -35 °C, se añadieron 160 μ L de PBr₃ disueltos en 3 mL de éter etílico seco gota a gota mediante un embudo de adición. La mezcla de reacción se mantuvo a la misma temperatura, con agitación magnética y atmósfera inerte durante 1 h.

Finalizado el tiempo, la mezcla se diluyó con AcOEt y la fase orgánica se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de HCl 2 N, saturadas de NaHCO₃ y de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente obteniéndose 556 mg (82 %) del derivado bromado **12**.

Obtención de diterpenilpurinas



481 mg (1,21 mmol) del derivado bromado **12** se disolvieron en 40 mL de DMF. A dicha disolución se le añadieron 188 mg (1,21 mmol) de 6-cloropurina y 168 mg (1,21 mmol) de K₂CO₃, calentándose la mezcla a 80 °C con agitación magnética en atmósfera inerte durante 20 h.

Transcurrido este tiempo, se operó de la misma forma descrita anteriormente (apartado A.1.1.), obteniéndose 428 mg del producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de:

- a) CH₂Cl₂:EtOH 96 % (99:1): 65 mg (11 %) de la 9-diterpenil-6-cloropuina, **13**.

RMN ¹H: tabla 6, figura 13.

RMN ¹³C: tabla 6, figura 13.

HMQC y HMBC: tabla 7, figura 14.

IR (ν_{máx}): 3050, 2923, 1724, 1633, 1420, 878 cm⁻¹.

HRMS: calculada para C₂₆H₃₅N₄O₂Cl + H⁺: 471,2521 u; encontrada: 471,2524 m/z.

- b) CH₂Cl₂:EtOH 96 % (98:2): 10 mg (2 %) de la 7-diterpenil-6-cloropurina, **14**.

RMN ¹H: tabla 6, figura 15.

RMN ¹³C: tabla 6, figura 15.

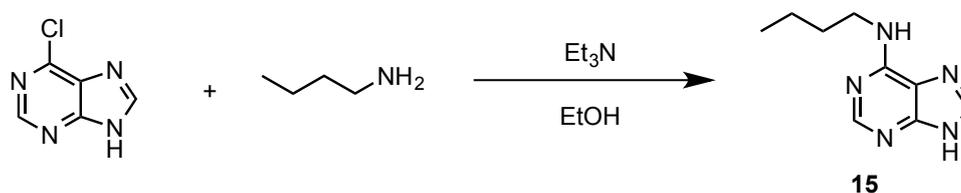
HMQC y HMBC: tabla 8, figura 16.

IR (ν_{máx}): 3081, 2935, 1722, 1642, 975 cm⁻¹.

HRMS: calculada para C₂₆H₃₅N₄O₂Cl + H⁺: 471,2521 u; encontrada: 471,2518 m/z.

A.2. OBTENCIÓN DE N⁶-ALQUILADENINAS

A.2.1. Reacción de 6-cloropurina con butilamina



Una disolución de 200 mg (1,30 mmol) de 6-cloropurina, 0,154 mL (1,56 mmol) de butilamina y 550 μL (3,98 mmol) de Et₃N en 4 mL de etanol absoluto seco, fue irradiada con microondas a 150 °C durante 10 minutos en agitación. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente y se obtuvieron 390 mg de un producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla CH₂Cl₂:EtOH 96 % (88:12), 164 mg (66 %) del compuesto **15**.

RMN ^1H : tabla 9, figura 17.

RMN ^{13}C : tabla 9.

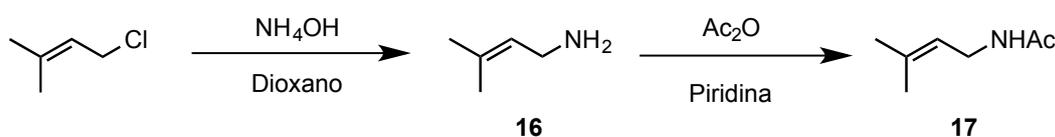
IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3302, 2926, 1624, 1560, 1453, 896 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_5 + \text{H}^+$: 192,1244 u; encontrada: 192,1247 m/z .

A.2.2. Reacción de 6-cloropurina con 3-metilbut-2-enamina

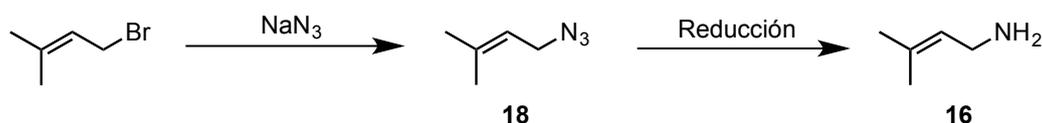
Obtención de 3-metilbut-2-enamina

A partir de 1-cloro-3-metilbut-2-eno con NH_4OH



300 μL (2,68 mmol) de 1-cloro-3-metilbut-2-eno se disolvieron en dioxano (3,70 mL), en un tubo con cierre hermético. A continuación se le añadió NH_4OH 30 % (5,56 mL) y se calentó a 150 $^\circ\text{C}$ durante 10 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad, se disolvió el residuo en AcOEt y se secó la disolución orgánica con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 54 mg del producto de reacción que contenía parte del producto de partida sin reaccionar. Este producto se hizo reaccionar con anhídrido acético (0,5 mL) en piridina (0,5 mL), dejándolo estar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Al cabo de ese tiempo se añadió hielo picado y tras fundirse éste, se extrajo con AcOEt . La fase orgánica se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de HCl 2 N y saturadas de NaHCO_3 y NaCl hasta pH neutro y se secó con Na_2SO_4 anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 14 mg del producto de reacción acetilado 17.

A partir de 1-bromo-3-metilbut-2-eno con NaN_3 y reducción



a) *En acetona y reducción con FeCl_3/NaI*

0,75 mL (0,43 mmol) de 1-bromo-3-metilbut-2-eno se disolvieron en 2 mL de acetona y se adicionaron 84 mg (1,3 mmol) de NaN_3 , la mezcla se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente y en atmósfera inerte durante 5 días. Transcurrido este

tiempo se evaporó el disolvente. El producto de reacción (77 mg) se disolvió en 5 mL de acetonitrilo, se adicionaron 931 mg (6,21 mmol) de NaI y 168 mg (1,03 mmol) de FeCl₃, dejando la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 25 min. Finalizado el tiempo, se evaporó el disolvente y se redisolvió el residuo en AcOEt, se lavó con una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ y posteriormente con otra saturada de NaHCO₃. Se secó la disolución orgánica con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 8 mg de un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H no se observaron las señales del producto buscado.

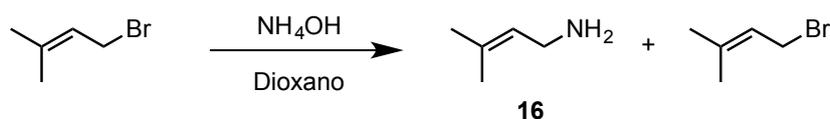
b) En acetona/agua y reducción con NaBH₄

30 µL (0,26 mmol) de 1-bromo-3-metilbut-2-eno se disolvieron en 4 mL de una mezcla de acetona:agua (3:1) y se adicionaron 34 mg (0,52 mmol) de NaN₃, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en agitación magnética durante 30 min. Transcurrido este tiempo, el producto se disolvió en AcOEt y se lavó la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl, secándola posteriormente con Na₂SO₄ anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvo un producto de reacción que se disolvió en 5 mL de MeOH seco y se trató con NaBH₄ (8 mg, 0,2 mmol), manteniendo la mezcla a temperatura ambiente en agitación durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 5 mL de agua, se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad y se redisolvió el producto en AcOEt, lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl y secándola posteriormente con Na₂SO₄ anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 27 mg de una mezcla en cuyo espectro de RMN de ¹H no aparecen las señales asignables al producto esperado.

c) En DMF y reducción con NaBH₄

30 µL (0,26 mmol) de 1-bromo-3-metilbut-2-eno se disolvieron en 5 mL de DMF y se adicionaron 56 mg (0,86 mmol) de NaN₃, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en agitación durante 2 h. Transcurrido este tiempo el producto se disolvió en AcOEt, se basificó con una disolución acuosa saturada de K₂CO₃ y se lavó con otra disolución saturada de NaCl, secándola posteriormente con Na₂SO₄ anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvo un producto de reacción que se disolvió en 5 mL de MeOH seco y se operó de la misma forma descrita en la reacción anterior, obteniendo una mezcla de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H no aparecen las señales asignables al compuesto buscado.

A partir de 1-bromo-3-metilbut-2-eno con NH_4OH



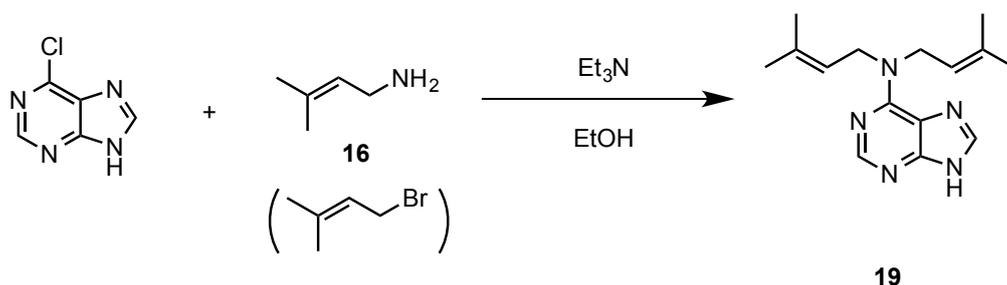
a) A temperatura ambiente

100 μL (0,870 mmol) de 1-bromo-3-metilbut-2-eno se disolvieron en dioxano (1,5 mL), en un tubo con cierre hermético. A continuación se añadió NH_4OH 30 % (2 mL) y se mantuvo a temperatura ambiente en agitación magnética durante 5 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad, se redisolvió el residuo en AcOEt y se secó la disolución orgánica con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 47 mg de un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H aparecen señales de una mezcla de la amina esperada **16** y el producto de partida, que no pudo ser resuelta por métodos cromatográficos.

b) Por irradiación con microondas

100 μL (0,870 mmol) de 1-bromo-3-metilbut-2-eno se disolvieron en dioxano (1,5 mL) y se añadió NH_4OH 30 % (2 mL), la mezcla se irradió con microondas a 80 $^\circ\text{C}$ durante 5 min en agitación. Finalizada la reacción se procedió de la misma manera descrita en la reacción anterior, obteniéndose 40 mg de una mezcla en cuyo espectro de RMN de ^1H aparecen señales asignables a la amina esperada **16** impurificada con reactivo.

Reacción con 6-cloropurina



A una disolución de 36 mg (0,23 mmol) de 6-cloropurina en 2,5 mL de etanol absoluto, se adicionaron 39 mg de 3-metilbut-2-enamina (sin purificar), **16**, y 0,3 mL (2 mmol) de Et_3N . La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo, en agitación magnética y atmósfera inerte durante 4 h. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente y el producto de reacción se disolvió en AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de

NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente obteniéndose 42 mg de producto de reacción, que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:EtOH 96 % (95:5), 9 mg (14 %) del compuesto **19**.

RMN ¹H: tabla 9, figura 18.

RMN ¹³C: tabla 9, figura 18.

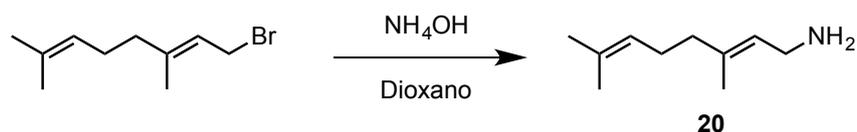
IR (ν_{máx}): 3080, 2973, 1670, 1580, 1444, 932, 840 cm⁻¹.

HRMS: calculada para C₁₅H₂₁N₅ + H⁺: 272,1870 u; encontrada: 272,1872 m/z.

A.2.3. Reacción de 6-cloropurina con geranilamina

Obtención de geranilamina

A partir de bromuro de geranilo con NH₄OH

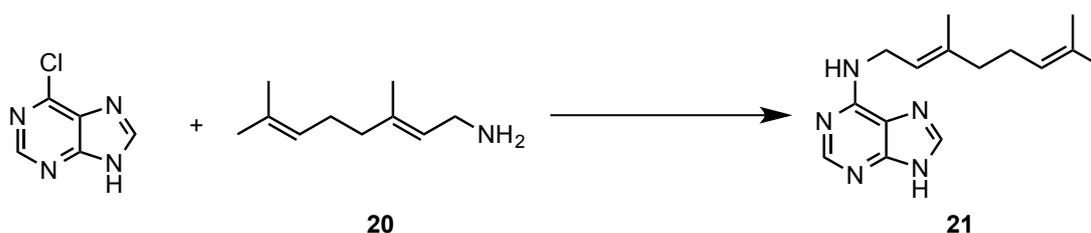


a) A temperatura ambiente

0,1 mL (0,5 mmol) de bromuro de geranilo se disolvieron en dioxano (1,5 mL), en un tubo con cierre hermético. A continuación se le añadió NH₄OH 30 % (2 mL) y se mantuvo a temperatura ambiente, en agitación magnética durante 5 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad, se disolvió el residuo en AcOEt y se secó la disolución orgánica con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 94 mg de un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H aparecen señales de geranilamina, **20**, impurificada con bromuro de geranilo.

b) Por irradiación con microondas

50 μL (0,25 mmol) de bromuro de geranilo se disolvieron en dioxano (1 mL) y se añadió NH₄OH 30 % (1 mL), la mezcla se irradió con microondas a 50 °C durante 5 min en agitación. Finalizada la reacción se procedió de la misma manera descrita en la reacción anterior, obteniéndose 45 mg de una mezcla en cuyo espectro de RMN de ¹H aparecen señales de geranilamina, **20**, impurificada con bromuro de geranilo.

Reacción con 6-cloropurina**a) Por irradiación con microondas**

Una disolución de 100 mg (0,649 mmol) de 6-cloropurina, 0,14 mL (0,76 mmol) de geranilamina, **20**, y 0,3 mL (2 mmol) de Et₃N, en 2,5 mL de etanol absoluto, se irradió con microondas a 100 °C, durante 5 min en agitación. Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente y se obtuvieron 218 mg de un producto de reacción **21** impurificado con 6-cloropurina.

b) En propanol a reflujo

Una disolución de 23 mg (0,14 mmol) de 6-cloropurina, 45 mg (0,29 mmol) de geranilamina, **20**, y 0,3 mL (2 mmol) de Et₃N, en 2 mL de propanol, se mantuvo a reflujo con agitación magnética y en atmósfera inerte, durante 6 h. Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente y el producto de reacción se extrajo con AcOEt lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl, secándola con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y, por evaporación del disolvente, se obtuvieron 49 mg de un producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:EtOH 96 % (9:1), 10 mg (26 %) de la N⁶-terpeniladenina **21**.

RMN ¹H: tabla 9, figura 19.

RMN ¹³C: tabla 9, figura 19.

IR (ν_{máx}): 3260, 3080, 2917, 1622, 1600, 1453, 930, 893 cm⁻¹.

HRMS: calculada para C₁₅H₂₁N₅ + H⁺: 272,1870 u; encontrada: 272,1868 *m/z*.

c) En etanol a reflujo

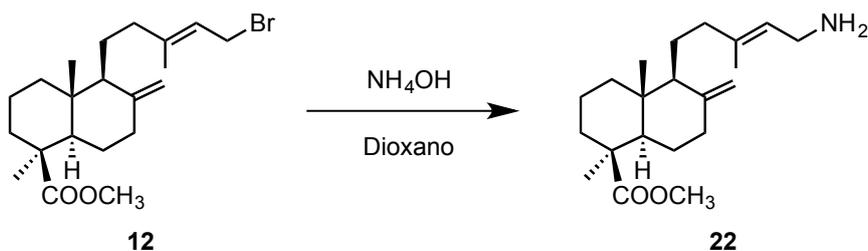
Una disolución de 100 mg (0,649 mmol) de 6-cloropurina, 0,14 mL (0,76 mmol) de geranilamina, **20**, y 0,3 mL (2 mmol) de Et₃N, en 2,5 mL de etanol absoluto, se mantuvo a reflujo con agitación magnética y en atmósfera inerte, durante 4 h. Transcurrido ese

tiempo, se extrajeron operando de la misma forma descrita en la reacción anterior y se obtuvieron 127 mg (72 %) de la N^6 -terpeniladenina **21**.

A.2.4. Reacción de 6-cloropurina con 15-amino-15-desoxiisocupresato de metilo

Obtención de la amina diterpénica

A partir del 15-bromo-15-desoxiisocupresato de metilo



a) A temperatura ambiente

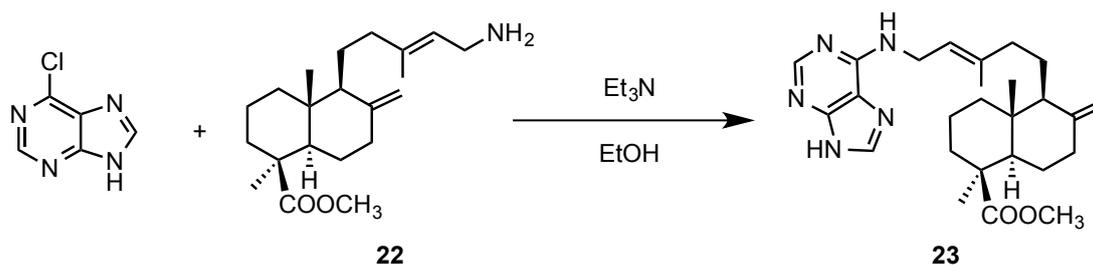
35 mg (0,088 mmol) del derivado bromado **12** se disolvieron en dioxano (1,8 mL), en un tubo con cierre hermético. A continuación se añadió NH_4OH 30 % (0,7 mL) y se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación magnética durante 5 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad, se disolvió el residuo en AcOEt y se secó la disolución orgánica con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 45 mg de una mezcla de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H se observaron señales asignables al compuesto bromado **12** y a la diterpenilamina **22**.

b) Por irradiación con microondas

153 mg (0,386 mmol) del derivado bromado **12** se disolvieron en dioxano (2 mL) y se adicionaron 2 mL de NH_4OH 30 %. La mezcla fue irradiada con microondas a 130 °C en agitación durante 10 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente, se disolvió el residuo en CH_2Cl_2 y se secó la disolución orgánica con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 118 mg (93 %) de la amina diterpénica **22**.

RMN ^1H : tabla 10, figura 20.

RMN ^{13}C : tabla 10.

Reacción con 6-cloropurina

Una disolución de 127 mg (0,381 mmol) de la amina diterpénica **22**, 51 mg (0,33 mmol) de 6-cloropurina y 0,3 mL (2 mmol) de Et₃N, en 3 mL de etanol absoluto, se mantuvo a reflujo con agitación magnética y atmósfera inerte, durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente y el producto de reacción se extrajo con AcOEt, lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl y secándola con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró y por evaporación del disolvente, se obtuvieron 136 mg de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:EtOH 96 % (95:5), 30 mg (20 %) de la N⁶-diterpeniladenina **23**.

RMN ¹H: tabla 10, figura 21.

IR (ν_{máx}): 3280, 2926, 1726, 1614, 1450, 886 cm⁻¹.

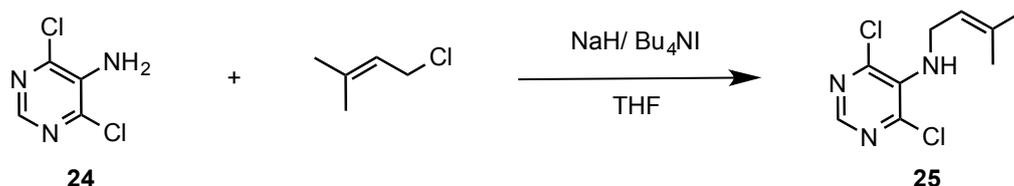
HRMS: calculada para C₂₆H₃₇N₅O₂ + H⁺: 452,3020 u; encontrada: 452,3026 m/z.

B. OBTENCIÓN SELECTIVA DE 7-ALQUILPURINAS

B.1. OBTENCIÓN DE 5-ALQUILAMINO-4,6-DICLOROPYRIMIDINAS

B.1.1. Por alquilación con derivados halogenados

Con 1-cloro-3-metilbut-2-eno



A una disolución de 100 mg (0,613 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 3 mL de THF a 0 °C, se adicionaron 18 mg (0,73 mmol) de NaH. La mezcla se dejó evolucionar a temperatura ambiente durante 10 min y se adicionaron 83 μ L (0,73 mmol) de 1-cloro-3-metilbut-2-eno y 271 mg (0,732 mmol) de yoduro de tetrabutilamonio (Bu_4NI), manteniéndola en agitación durante 2 h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el disolvente y se cromatógrafió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de Hex:AcOEt (8:2), 60 mg (46 %) del compuesto **25**.

RMN ^1H : tabla 11, figura 22.

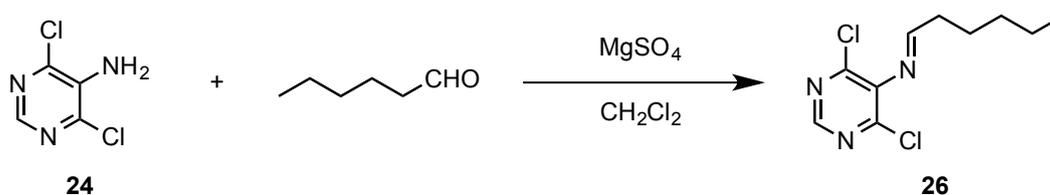
RMN ^{13}C : tabla 11, figura 22.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3387, 3050, 2929, 1666, 1524, 1466, 793 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{Cl}_2 + \text{H}^+$: 232,0403 u; encontrada: 232,0400 m/z .

B.1.2. Por aminación reductora con aldehídos

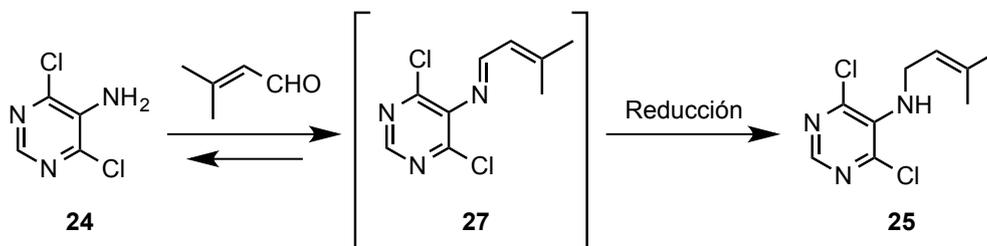
Con hexanal



A una disolución de 100 mg (0,613 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 10 mL de CH_2Cl_2 , se le adicionaron 150 mg (1,25 mmol) de MgSO_4 anhidro y 366 μ L (3,05 mmol) de hexanal. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación

durante 36 h. Transcurrido ese tiempo se le añadió CH_2Cl_2 y se filtró sobre celita, se evaporó el disolvente, obteniéndose 323 mg de una mezcla de reacción, en la que se detectó la imina **26**, además de los compuestos de partida.

Con 3-metilbut-2-enal



a) En ausencia de disolvente

50 mg (0,31 mmol) de 5-amino-4,6-dicloroaminopirimidina, **24**, y 30 μL (0,30 mmol) de 3-metilbut-2-enal se homogeneizaron en un mortero de ágata a temperatura ambiente, durante 15 min. A la mezcla se le añadió NaBH_4 (11 mg, 0,29 mmol) y H_3BO_3 (18 mg, 0,30 mmol) y se mezcló de nuevo en el mortero durante 15 min más.

Al producto de reacción se le adicionó una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y se extrajo con AcOEt , la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl , se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 44 mg del producto de partida, **24**.

b) Con 1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridinadicarboxilato de dietilo

100 mg (0,613 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, 0,17 mL (1,8 mmol) de 3-metilbut-2-enal y 155 mg (0,612 mmol) de 1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridinadicarboxilato de dietilo se mezclaron en un tubo con cierre hermético y se calentó a 150 $^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, el producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con CH_2Cl_2 y AcOEt , 280 mg de mezclas complejas en las que se observó la presencia del producto de partida sin reaccionar.

c) Con $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ a temperatura ambiente

A una disolución de 50 mg (0,31 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 5 mL de tricloroetano se adicionaron 11 mg (0,29 mmol) de NaBH_4 , 3 mg (2 % mmol) de $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ y 0,05 mL (0,9 mmol) de 3-metilbut-2-enal. La mezcla se mantuvo a temperatura

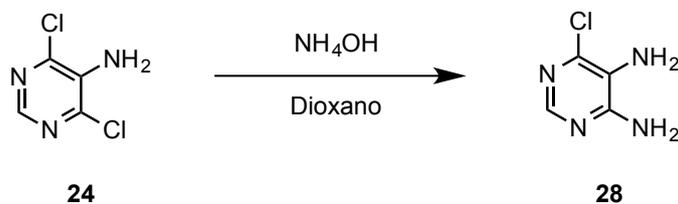
ambiente en agitación y atmósfera inerte durante 2 h. Finalizada la reacción, se añadió agua para destruir el NaBH_4 , se evaporó el disolvente, se adicionó una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y se extrajo con AcOEt . La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl , se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 93 mg de producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H se observaron mayoritariamente señales del producto de partida así como otras correspondientes a la amina esperada **25**.

d) Con $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ a reflujo

A una disolución de 75 mg (0,46 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 5 mL de tricloroetano se adicionaron 0,06 mL (0,7 mmol) de 3-metilbut-2-enal y 5 mg (2 % mmol) de $\text{Fe}(\text{OTf})_3$. La mezcla se mantuvo a reflujo en agitación y atmósfera inerte, durante 4 h. Transcurrido ese tiempo se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó NaBH_4 (183 mg, 4,81 mmol), manteniéndola a temperatura ambiente en agitación durante 15 h. Finalizada la reacción se añadió agua, se mantuvo en agitación 5 min y se evaporó el disolvente. A continuación se adicionó una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y se operó de la misma forma descrita anteriormente, obteniéndose 115 mg de producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H se observaron mayoritariamente señales del producto de partida, así como otras correspondientes a la imina **27**.

B.2. OBTENCIÓN DE 5-ALQUILAMINO-4AMINO-6-CLOROPIRIMIDINAS

B.2.1. Preparación de 4,5-diamino-6-cloropirimidina



a) En tubo cerrado

300 mg (1,83 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, se disolvieron en 4 mL de dioxano en un tubo con cierre hermético. Se añadieron 6 mL de NH_4OH 30 % y se

calentó a 150 °C durante 24 h. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad, se disolvió el residuo en acetona y se secó la disolución orgánica con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 252 mg (95 %) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**.

RMN ¹H: (H-2) 7,69 (s) ppm, figura 23.

RMN ¹³C: (C-2) 147,3 ppm; (C-4) 155,5 ppm; (C-5) 124,9 ppm; (C-6) 139,3 ppm, figura 23.

IR (ν_{máx}): 3320, 3133, 1630, 1574, 1553, 1423 cm⁻¹.

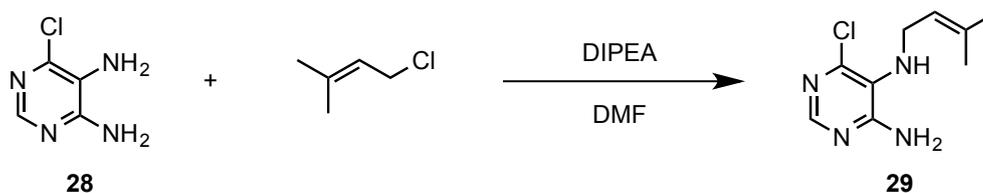
HRMS: calculada para C₄H₅N₄Cl + H⁺: 145,0275 u; encontrada: 145,0277 m/z.

b) Por irradiación con microondas

300 mg (1,83 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, se disolvieron en 4 mL de dioxano y se añadieron 6 mL de NH₄OH 30 %. La mezcla se irradió con microondas a 150 °C durante 20 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad, se disolvió el residuo en metanol y se secó la disolución orgánica con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 259 mg (98 %) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**.

B.2.2. Por alquilación con derivados halogenados

Con 1-cloro-3-metilbut-2-eno



Una disolución de 160 μL (1,37 mmol) de 1-cloro-3-metilbut-2-eno, 0,36 mL (2,0 mmol) de diisopropiletilamina (DIPEA) y 198 mg (1,37 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, en 6 mL de DMF, se mantuvo a reflujo y con agitación magnética durante 24 h. Transcurrido este tiempo se extrajo con AcOEt, lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl y secándola con Na₂SO₄ anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 127 mg de un producto de reacción que contenía la alquilpirimidina **29**.

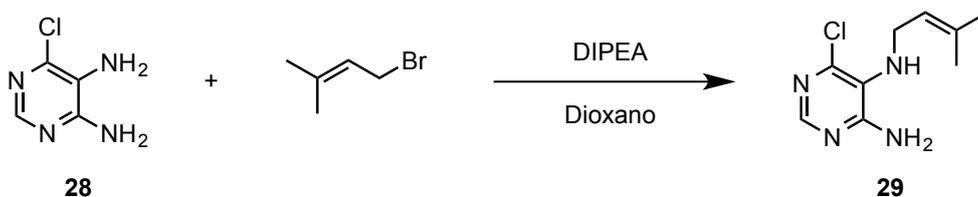
RMN ^1H : tabla 11, figura 24.

RMN ^{13}C : tabla 11, figura 24.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3306, 2973, 1616, 1557, 1446, 940, 793 cm^{-1} .

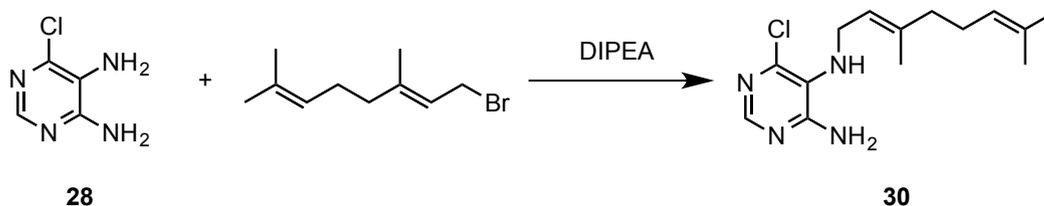
HRMS: calculada para $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_4\text{Cl} + \text{H}^+$: 213,0901 u; encontrada: 213,0902 m/z .

Con 1-bromo-3-metilbut-2-eno



200 mg (1,38 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, se disolvieron en 4 mL de dioxano, se añadieron 140 μL (1,38 mmol) de 1-bromo-3-metilbut-2-eno y 720 μL (4,14 mmol) de DIPEA. La mezcla fue irradiada con microondas a 150 $^{\circ}\text{C}$ en agitación, durante 10 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente y se operó de la misma manera descrita en la reacción anterior, obteniéndose 167 mg de la alquilpirimidina **29** ligeramente impurificada con el producto de partida, **28**.

Con bromuro de geranilo



a) A reflujo

Una disolución de 150 mg (1,04 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, 206 μL (1,04 mmol) de bromuro de geranilo y 542 μL (3,12 mmol) de DIPEA, en 3 mL de DMF, se mantuvo a reflujo en agitación magnética y atmósfera inerte, durante 24 h. Al cabo de ese tiempo, se extrajo con AcOEt, lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl y secándola con Na_2SO_4 anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 197 mg de una mezcla de la terpenilpirimidina **30** y 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, sin reaccionar.

b) Por irradiación con microondas

200 mg (1,38 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, se disolvieron en 5 mL de dioxano, se añadieron 274 μ L (1,38 mmol) de bromuro de geranilo y 720 μ L (4,14 mmol) de DIPEA. La mezcla fue irradiada con microondas a 150 °C en agitación, durante 10 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente, se operó de la misma forma descrita en el caso anterior, y se obtuvieron 267 mg de un producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH_2Cl_2 :EtOH 96 % (95:5), 136 mg (35 %) de la alquilpirimidina **30**.

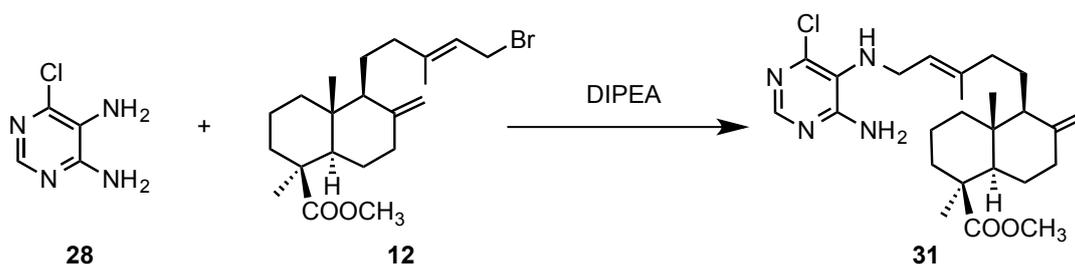
RMN ^1H : tabla 12, figura 25.

RMN ^{13}C : tabla 12, figura 25.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3301, 2973, 1627, 1566, 1442, 944, 816 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{Cl} + \text{H}^+$: 281,1527 u; encontrada: 281,1529 m/z .

Con 15-bromo-15-desoxiisocupresato de metilo



a) A reflujo

Una disolución de 170 mg (1,18 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, 303 mg (0,765 mmol) del derivado bromado diterpénico **12** y 310 μ L (1,77 mmol) de DIPEA en 2 mL de DMF, se mantuvo a reflujo en agitación magnética y atmósfera inerte, durante 24 h. Al cabo de ese tiempo, se procedió de la misma manera que en la reacción anterior y, por evaporación del disolvente, se obtuvieron 200 mg de una mezcla que contenía la diterpenilpirimidina **31** y la 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, sin reaccionar.

b) Por irradiación con microondas

55 mg (0,38 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, se disolvieron en 5 mL de dioxano, se añadieron 150 mg (0,379 mmol) del derivado bromado diterpénico **12** y 200 μ L (1,14 mmol) de DIPEA. La mezcla fue irradiada con microondas a 150 °C en

agitación, durante 10 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente, se procedió de la misma manera que en la reacción anterior y se obtuvieron 140 mg de un producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}$ 96 % (96:4), 40 mg (23 %) de la diterpenilpirimidina **31**.

RMN ^1H : tabla 13, figura 26.

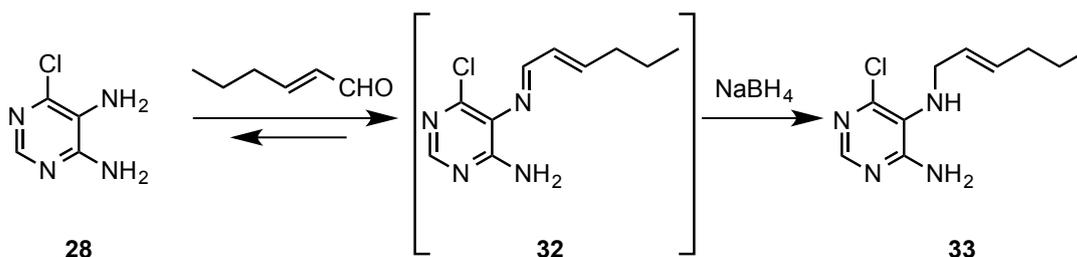
RMN ^{13}C : tabla 13, figura 26.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3344, 3050, 2945, 1723, 1614, 1553, 1453, 986, 886 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl} + \text{H}^+$: 461,2678 u; encontrada: 461,2678 m/z .

B.2.3. Por aminación reductora

Con hex-2E-enal



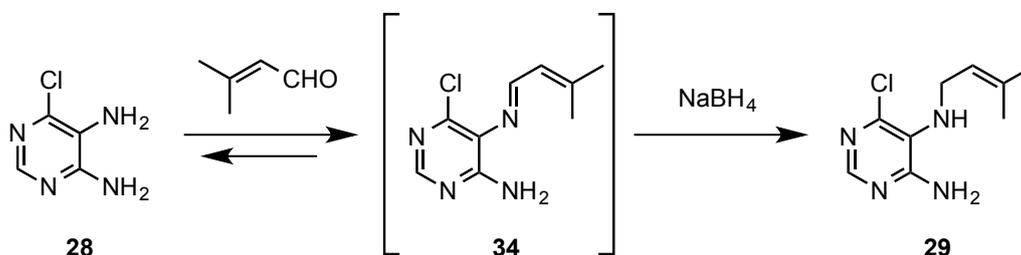
A 276 mg (1,91 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, disueltos en 15 mL de etanol absoluto, se añadieron 660 μL (5,73 mmol) de hex-2E-enal y tamiz molecular de 4 Å, manteniendo la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 7 días. Finalizada la reacción se filtró a vacío y se evaporó el disolvente, obteniéndose 270 mg de producto de reacción que contenía la imina **32**.

Al producto de reacción disuelto en 12 mL de metanol, se le adicionó NaBH_4 (385 mg, 10,1 mmol) y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h. Finalizada la reacción se adicionó agua (5 mL) y se mantuvo agitando durante 5 min, después se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad. El producto de reacción se disolvió en AcOEt, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 267 mg de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}$ 96 % (95:5), 85 mg (20 %) de la alquilpirimidina **33**.

RMN ^1H : tabla 12, figura 27.

RMN ^{13}C : tabla 12, figura 27.

Con 3-metilbut-2-enal



a) A temperatura ambiente

A 270 mg (1,87 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, disueltos en 15 mL de etanol absoluto, se añadieron 530 μL (5,61 mmol) de 3-metilbut-2-enal y tamiz molecular de 4 Å y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente en agitación durante 7 días. Finalizada la reacción, se filtró a vacío y se evaporó el disolvente, obteniéndose 260 mg de un producto de reacción que contenía la imina **34**.

Este producto de reacción se disolvió en 12 mL de metanol y se adicionó NaBH_4 (385 mg, 10,1 mmol), tratándose en las mismas condiciones que en la reacción anterior. Se obtuvieron 255 mg de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}$ 96 % (9:1), 153 mg (39 %) de la alquilpirimidina **29**.

b) Con MgSO_4 a reflujo

A una disolución de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, (253 mg, 1,75 mmol) en 10 mL de etanol absoluto, se le añadieron 200 mg (1,67 mmol) de MgSO_4 anhidro y 0,13 mL (1,4 mmol) de 3-metilbut-2-enal, manteniendo la mezcla a reflujo y con agitación magnética durante 72 h. Tras ello, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró el producto de reacción y se evaporó el disolvente.

El producto de reacción sin purificar se trató en las mismas condiciones descritas para la obtención del compuesto **33**, en 10 mL de metanol, con NaBH_4 (358 mg, 9,40 mmol). Se obtuvieron 296 mg de un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H se observaron mayoritariamente las señales del producto de partida.

c) Con $Mg(ClO_4)_2$

A una mezcla de 100 mg (0,694 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, y 8 mg (0,03 mmol, 5 mol %) de $Mg(ClO_4)_2$ en 3 mL de tricloroetano, se adicionaron 60 μ L (0,69 mmol) de 3-metilbut-2-enal y se mantuvo a temperatura ambiente en agitación durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se filtró el producto de reacción a través de Na_2SO_4 anhidro obteniendo, por evaporación del disolvente, 105 mg de producto de reacción, que se disolvieron en 5 mL de metanol y se les adicionó $NaBH_4$ (183 mg, 4,8 mmol), procediendo de la misma manera descrita para la obtención del compuesto **33**. Se obtuvieron 35 mg de producto de reacción, en cuyo espectro de RMN de 1H se observaron señales de la amina **29** acompañadas de las del producto de partida.

d) Con 1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridinadicarboxilato de dietilo

100 mg (0,694 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, 200 μ L (2,07 mmol) de 3-metilbut-2-enal y 175 mg (0,69 mmol) de 1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridinadicarboxilato de dietilo, se mezclaron en un tubo con cierre hermético y se calentó a 150 °C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, el producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose con AcOEt 132 mg de una mezcla compleja en cuyo espectro de RMN de 1H se observó una mezcla de señales asignables a la imina **34** así como a los productos de partida sin reaccionar.

e) Con $Fe(OTf)_3$ a temperatura ambiente

A una disolución de 91 mg (0,63 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, en 3 mL de etanol absoluto, se adicionaron 90 μ L (0,94 mmol) de 3-metilbut-2-enal y 6 mg (0,01 mmol, 2 % mmol) de $Fe(OTf)_3$, manteniendo la reacción a temperatura ambiente en agitación y atmósfera inerte, durante 6 h. Transcurrido ese tiempo, se adicionó $NaBH_4$ (110 mg, 2,89 mmol) y se mantuvo en agitación durante 2 h. Finalizado el tiempo, se le añadió agua para destruir el $NaBH_4$, se evaporó el disolvente y se adicionó una disolución acuosa saturada de $NaHCO_3$ y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de $NaCl$, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 78 mg de producto de reacción en cuyo espectro de RMN de 1H se observaron mayoritariamente señales de la amina **29** así como otras correspondientes a la 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, sin reaccionar.

f) Con Fe(OTf)₃ y microondas

A una disolución de 34 mg (0,23 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, en 2 mL de etanol absoluto se adicionaron 30 µL (0,34 mmol) de 3-metilbut-2-enal y 2 mg (4 µmol, 2 % mmol) de Fe(OTf)₃ y se irradió con microondas dos veces sucesivas a 200 °C durante 10 min. Finalizada la reacción, se evaporó el disolvente y se obtuvo un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H se observó una mezcla de señales de la imina **34** y del producto de partida 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**.

g) En tubo cerrado

A una disolución de 40 mg (0,28 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, en 3 mL de etanol absoluto se adicionaron 80 µL (0,84 mmol) de 3-metilbut-2-enal, la mezcla se calentó en un tubo con cierre hermético a 150 °C durante 5 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente y se obtuvieron 68 mg de producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H se observaron señales de la imina **34**. Este producto se disolvió en 5 mL de metanol y se trató con NaBH₄ (200 mg, 5,2 mmol), en las mismas condiciones descritas para la obtención del compuesto **33**, obteniendo 42 mg de producto de reacción que contenía la amina **29** impurificada con producto de partida.

h) Por irradiación con microondas a 200 °C

A una disolución de 65 mg (0,45 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, en 2 mL de etanol absoluto se adicionaron 86 µL (0,90 mmol) de 3-metilbut-2-enal, la mezcla se irradió con microondas a 200 °C durante 10 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente y se obtuvo un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H se observaron señales de la imina **34**. Este producto se disolvió en 10 mL de metanol, se trató con NaBH₄ (180 mg, 4,70 mmol) y se procedió de la misma manera detallada para la obtención del compuesto **33**, obteniendo 76 mg de producto de reacción que contenía mayoritariamente la amina **29** impurificada con 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, sin reaccionar.

i) Por irradiación con microondas a 150 °C

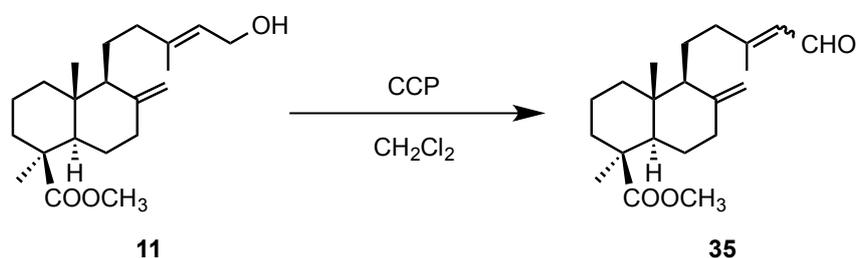
A una disolución de 200 mg (1,38 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, en 5 mL de etanol absoluto se adicionaron 400 µL (4,14 mmol) de 3-metilbut-2-enal, la

mezcla se irradió con microondas a 150 °C durante 10 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente y el residuo, en cuyo espectro de RMN de ^1H se observaron señales de la imina **34**, se disolvió en 12 mL de metanol y se le adicionó NaBH_4 (400 mg, 10,5 mmol), procediendo de la misma manera descrita para la obtención del compuesto **33**, obteniendo 272 mg de producto de reacción que contenía la amina **29**.

Con aldehído diterpénico

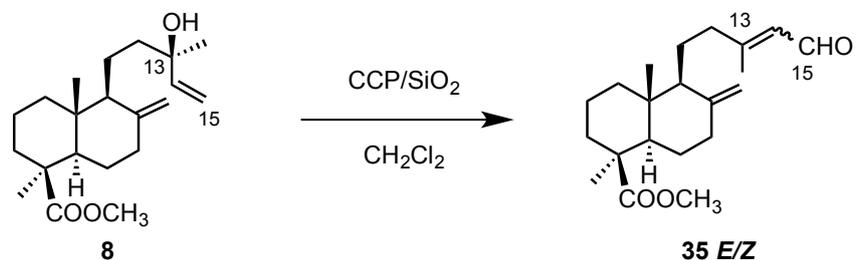
Obtención del aldehído diterpénico

A) Oxidación del alcohol diterpénico **11**



A una disolución de 90 mg (0,27 mmol) del alcohol **11** en 3 mL de CH_2Cl_2 se adicionaron 85 mg (0,39 mmol) de clorocromato de piridinio (CCP). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en agitación durante 6 h. Finalizada la reacción se extrajo con AcOEt , lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl , se secó con Na_2SO_4 anhidro y, por evaporación del disolvente, se obtuvieron 80 mg de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de Hex: AcOEt (8:2), 63 mg (70 %) del aldehído **35**.

B) Isomerización y oxidación del cupresato de metilo **8**



A una disolución de cupresato de metilo, **8**, en 8 mL de CH_2Cl_2 se adicionó CCP y gel de sílice en proporciones variables como se indica en la tabla siguiente. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en agitación y atmósfera inerte durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el disolvente y el residuo se cromatografió sobre gel

de sílice eluyéndose, con una mezcla de Hex:AcOEt (8:2), el aldehído **35** como mezcla de isómeros *E* y *Z* en proporción 7:3.

Cup. de metilo (8)	CCP	Gel de sílice	Producto
0,948 mmol	3,80 mmol	1 g	224 mg (71 %)
1,23 mmol	1,77 mmol	381 mg	350 mg (86 %)

Una mezcla de ambos isómeros **35** *E* y **35** *Z* del aldehído diterpénico (862 mg), se cromatografió sobre gel de sílice impregnada en un 20 % de AgNO₃, eluyéndose con una mezcla de Hex:AcOEt (8:2):

a) 374 mg del isómero **35** *E* (32 %).

RMN ¹H: tabla 13, figura 28.

RMN ¹³C: tabla 13, figura 28.

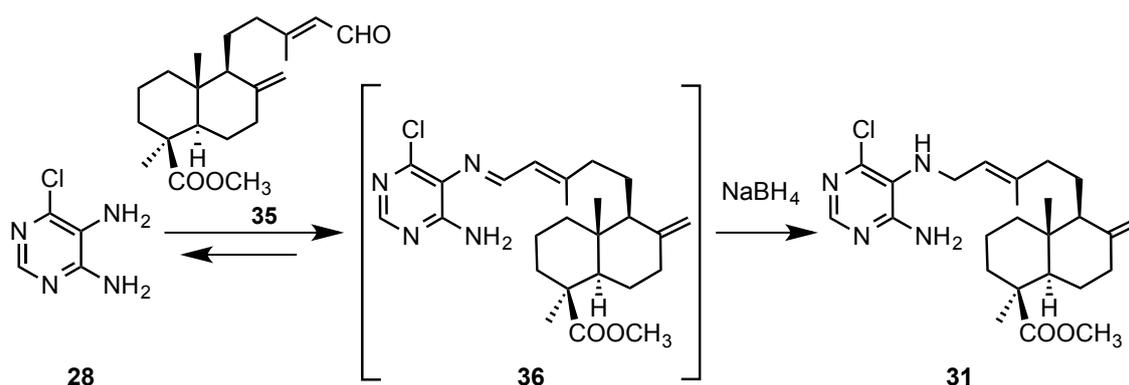
b) 550 mg de la mezcla de ambos isómeros **35** *E* y **35** *Z* (47 %).

c) 104 mg del isómero **35** *Z* (8 %).

RMN ¹H: tabla 13, figura 29.

RMN ¹³C: tabla 13, figura 29.

Reacción con 4,5-diamino-6-cloropirimidina



a) A reflujo

Una mezcla de 40 mg (0,28 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, y 92 mg (0,28 mmol) del aldehído diterpénico **35** disueltos en 5 mL de tolueno, se mantuvo a reflujo en agitación y atmósfera inerte durante 24 h. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente, obteniéndose 129 mg de producto de reacción. El producto sin purificar se

disolvió en 8 mL de metanol, se le adicionó NaBH₄ (191 mg, 5,0 mmol) y se operó de la misma manera descrita para la obtención del compuesto **33**, obteniéndose 97 mg de un producto de reacción complejo.

b) En ausencia de disolvente

52 mg (0,36 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, y 119 mg (0,358 mmol) del aldehído diterpénico **35** se homogeneizaron en un mortero de ágata a temperatura ambiente durante 30 min. A la mezcla se le añadió NaBH₄ (14 mg, 0,37 mmol) y H₃BO₃ (22 mg, 0,36 mmol), mezclándose en el mortero durante 20 min.

Al producto se adicionó una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 113 mg de un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H se observaron las señales de la amina **31** además de otras impurezas.

c) Por irradiación con microondas

A una disolución de 176 mg (0,53 mmol) del aldehído diterpénico **35** en 2 mL de etanol absoluto, se adicionaron 26 mg (0,2 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, la mezcla se irradió con microondas a 50 °C durante 10 min. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente y se obtuvo el residuo en cuyo espectro de RMN de ¹H se observaron señales asignables a la imina **36**. Este residuo se disolvió en 8 mL de metanol y se trató con NaBH₄ (266 mg, 7,0 mmol) en las mismas condiciones descritas para la obtención del compuesto **33**, obteniendo 140 mg de un producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:EtOH 96 % (97:3), 20 mg (24 %) de la diterpenilpirimidina **31**.

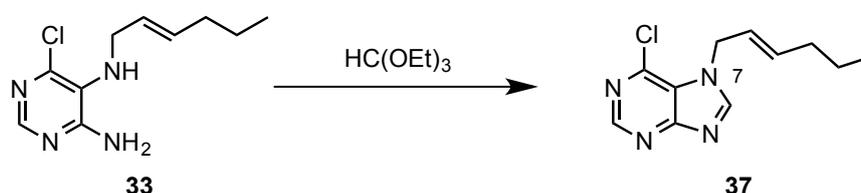
d) A temperatura ambiente

A 600 mg (1,81 mmol) del aldehído diterpénico **35** disueltos en 10 mL de etanol absoluto se adicionaron 175 mg (1,21 mmol) de 4,5-diamino-6-cloropirimidina, **28**, y tamiz molecular de 4 Å. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en agitación durante 7 días. Finalizada la reacción, se filtró a vacío y se evaporó el disolvente, obteniéndose un producto de reacción que contenía la imina **36**.

El producto de reacción sin purificar se trató, según se ha descrito previamente para la obtención del compuesto **33**, con NaBH₄ (264 mg, 6,9 mmol) en 8 mL metanol, obteniéndose 540 mg de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:EtOH 96 % (95:5), 479 mg (86 %) de la diterpenilpirimidina **31**.

B.3. FORMACIÓN DEL SISTEMA PURÍNICO

B.3.1. A partir de la pirimidina **33**

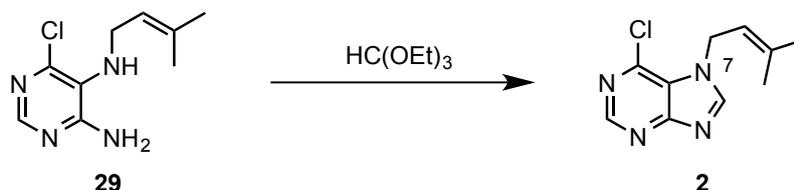


A 220 mg (0,97 mmol) de la pirimidina **33** se añadieron 3 mL de ortoformiato de trietilo HC(OEt)₃ y 0,3 mL de HCl al 37 % y se mantuvo la mezcla de reacción a reflujo en agitación y atmósfera inerte durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar, se añadieron 5 mL de HCl 2 N y se mantuvo en agitación magnética durante 1,5 h. A continuación se le añadió NaOH 2 N hasta pH≈8 y se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 166 mg de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:AcOEt:EtOH 96 % (5:4,5:0,5), 67 mg (29 %) de la 7-alkil-6-cloropurina **37**.

RMN ¹H: tabla 14, figura 30.

RMN ¹³C: tabla 14, figura 30.

B.3.2. A partir de la pirimidina **29**



a) Con Ac_2O a reflujo

A 600 mg (2,82 mmol) de la pirimidina **29** se le añadieron 3,5 mL de ortoformiato de trietilo y 3 mL de anhídrido acético (Ac_2O), la mezcla de reacción se mantuvo a reflujo en agitación y atmósfera inerte durante 4 h. Al cabo de ese tiempo, se evaporó el exceso de $HC(OEt)_3$, se añadió hielo picado y, tras fundirse éste, se extrajo con $AcOEt$. La fase orgánica se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas saturadas de $NaHCO_3$ y $NaCl$ hasta pH neutro y se secó con Na_2SO_4 anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvo un producto de reacción complejo en cuyo espectro de RMN de 1H no se observó ninguna de las señales características del producto esperado.

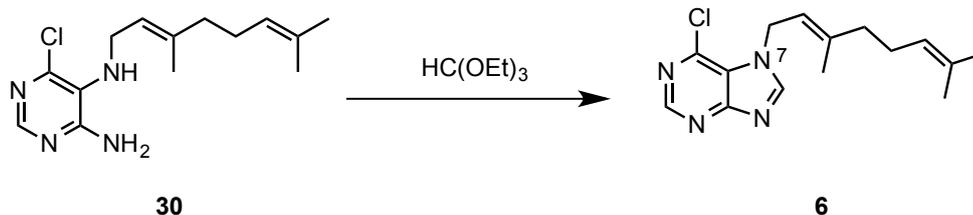
b) Con HCl a reflujo

A 196 mg (0,924 mmol) de la pirimidina **29** se añadieron 3 mL de ortoformiato de trietilo y 0,3 mL de HCl al 37 % y se mantuvo la mezcla de reacción a reflujo en agitación y atmósfera inerte durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar, se añadieron 5 mL de HCl 2 N y se procedió de la misma manera descrita para la obtención del compuesto **37**, obteniéndose 191 mg de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de $CH_2Cl_2:AcOEt:EtOH$ 96 % (4:5:1) y 1 % de Et_3N , 134 mg (66 %) de la 7-alkil-6-cloropurina **2**.

c) Por irradiación con microondas

A 300 mg (1,41 mmol) de la pirimidina **29** se le añadieron 4 mL de ortoformiato de trietilo y la mezcla se irradió con microondas a 120 °C durante 15 minutos. Finalizada la irradiación se evaporó el exceso de $HC(OEt)_3$ sin llegar a sequedad y se extrajo con $AcOEt$ lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de $NaCl$, secándola con Na_2SO_4 anhidro y obteniéndose, por evaporación del disolvente, 286 mg (91 %) de la 7-alkil-6-cloropurina **2**.

B.3.3. A partir de la pirimidina 30



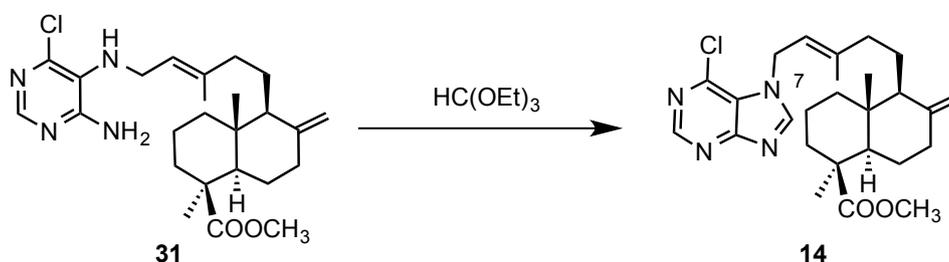
a) Con HCl a reflujo

A 293 mg (1,04 mmol) de la pirimidina **30** se le añadieron 4 mL de ortoformiato de trietilo y 0,4 mL de HCl al 37 % y se mantuvo la mezcla de reacción a reflujo en agitación y atmósfera inerte durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar, se añadieron 5 mL de HCl 2 N y se procedió de la misma manera descrita para la obtención del compuesto **37**, obteniéndose 174 mg (58 %) de la 7-terpenil-6-cloropurina **6** ligeramente impurificada.

b) Por irradiación con microondas

A 28 mg (0,099 mmol) de la pirimidina **30** se le añadió 1 mL de ortoformiato de trietilo y la mezcla se irradió con microondas a 120 °C durante 10 minutos. Finalizada la irradiación se evaporó el exceso de HC(OEt)₃ sin llegar a sequedad y se extrajo con AcOEt, lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl, secándola con Na₂SO₄ anhidro y obteniéndose, por evaporación del disolvente, 27 mg (93 %) de la 7-terpenil-6-cloropurina **6**.

B.3.4. A partir de la pirimidina 31



a) Con HCl a reflujo

A 225 mg (0,489 mmol) de la pirimidina **31** se le añadieron 3 mL de ortoformiato de trietilo y 0,3 mL de HCl al 37 % y se mantuvo la mezcla de reacción a reflujo en agitación

y atmósfera inerte durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar, se añadieron 5 mL de HCl 2 N y se mantuvo en agitación magnética durante 1,5 h. A continuación se procedió de la misma manera descrita para la obtención del compuesto **37**, obteniéndose 200 mg de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:EtOH 96 % (97:3), 94 mg (41 %) de la 7-diterpenil-6-cloropurina **14**.

b) Por irradiación con microondas

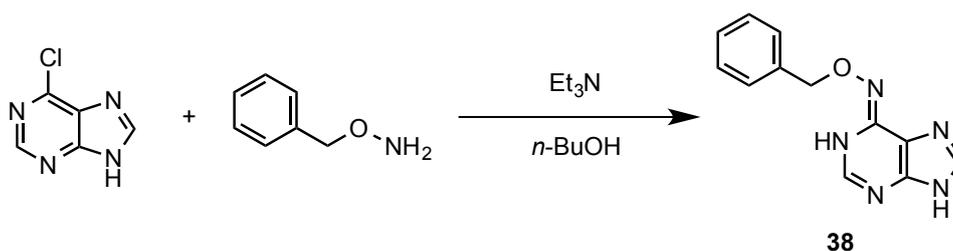
A 90 mg (0,19 mmol) de la pirimidina **31** se le añadieron 1,5 mL de ortoformiato de trietilo, irradiando la mezcla con microondas a 120 °C durante 10 minutos. Finalizada la irradiación, se evaporó el exceso de HC(OEt)₃ sin llegar a sequedad y se extrajo con AcOEt, lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl, secándola con Na₂SO₄ anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 73 mg de un producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:EtOH 96 % (97:3), 20 mg (21 %) de la 7-diterpenil-6-cloropurina **14**.

C. SÍNTESIS DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS RELACIONADOS CON PURINAS

C.1. APROXIMACIÓN A LA SÍNTESIS DE DIAZEPINOPURINAS

C.1.1. A través de oximas en C-6

Obtención de la oxima 38



a) A reflujo

A una disolución de 300 mg (1,95 mmol) de 6-cloropurina en 18 mL de *n*-butanol, se le adicionaron 843 mg (6,85 mmol) de *O*-bencilhidroxilamina y 2,5 mL (18 mmol) de Et₃N. La mezcla se mantuvo a reflujo en agitación magnética y atmósfera inerte durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se evaporó el disolvente, se redisolvió el producto en AcOEt y se lavó con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ y NaCl, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 560 mg de un producto de reacción que se cromatógrafió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH 96 % (95:5), 75 mg (16 %) de la oxima **38**.

RMN ¹H: tabla 15, figura 31.

IR (ν_{máx}): 3271, 2920, 1630, 1588, 1416, 1020 cm⁻¹.

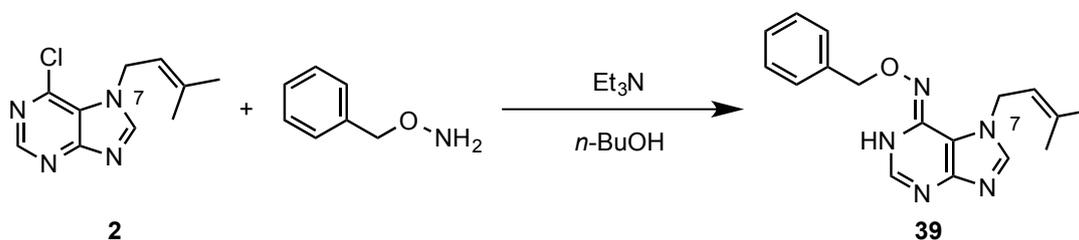
HRMS: calculada para C₁₂H₁₁N₅O + H⁺: 242,1036 u; encontrada: 242,1043 *m/z*.

b) Por irradiación con microondas

A una disolución de 50 mg (0,32 mmol) de 6-cloropurina en 2 mL de *n*-butanol se le adicionaron 153 mg (1,24 mmol) de *O*-bencilhidroxilamina y 0,4 mL (3 mmol) de Et₃N, irradiándose con microondas a 150 °C durante 10 min en agitación. Finalizada la irradiación se evaporó el disolvente, obteniendo 321 mg de un producto de reacción que se

cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla CH₂Cl₂:AcOEt:EtOH 96 % (5:4:1), 35 mg (45 %) de la oxima **38**.

Obtención de la oxima **39**



a) A reflujo

A una disolución de 129 mg (0,581 mmol) de 7-alkil-6-cloropurina **2** en 8 mL de *n*-butanol, se le adicionaron 277 mg (2,25 mmol) de *O*-bencilhidroxilamina y 0,8 mL (6 mmol) de Et₃N. La mezcla se mantuvo a reflujo en agitación magnética y atmósfera inerte durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, se operó de la misma manera descrita anteriormente para la obtención del compuesto **38** en el apartado *a*, obteniéndose 248 mg de producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:AcOEt:EtOH 96 % (5:4:1), 65 mg (36 %) de la oxima **39**.

RMN ¹H: tabla 15, figura 32.

RMN ¹³C: tabla 15, figura 32.

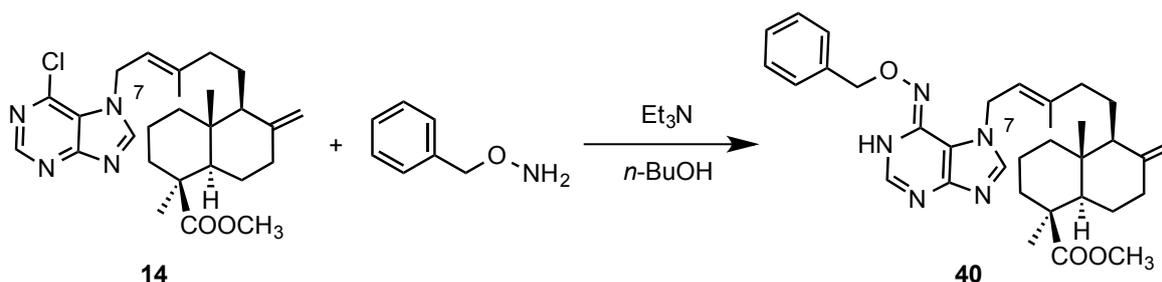
HMQC y HMBC: tabla 16, figura 33.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3050, 2927, 1656, 1590, 1451, 863, 736 cm⁻¹.

HRMS: calculada para C₁₇H₁₉N₅O + H⁺: 310,1662 u; encontrada: 310,1670 *m/z*.

b) Por irradiación con microondas

Una mezcla de la 7-alkil-6-cloropurina **2**, *O*-bencilhidroxilamina y Et₃N en *n*-butanol, fue irradiada con microondas a temperaturas entre 150 °C y 175 °C, durante tiempos entre 10 y 60 min, con una o varias irradiaciones sucesivas, obteniéndose en todos los casos mezclas complejas que no pudieron ser resueltas.

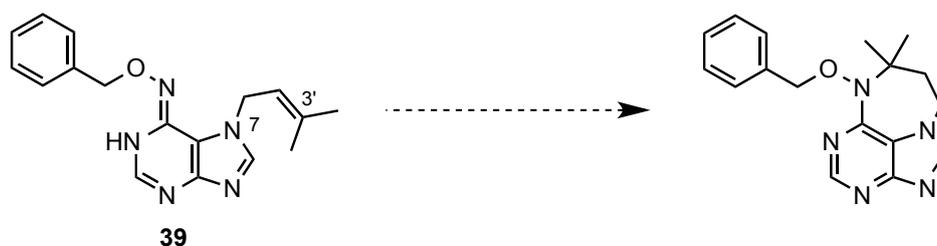
Obtención de la oxima 40

A 87 mg (0,18 mmol) de 7-diterpenil-6-cloropurina **14** en 3 mL de *n*-butanol, se adicionaron 84 mg (0,68 mmol) de *O*-bencilhidroxilamina y 0,3 mL (2 mmol) de Et₃N. La mezcla se mantuvo a reflujo en agitación magnética y atmósfera inerte durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, se operó de la misma manera anteriormente descrita para la obtención del compuesto **38** en el apartado *a*, obteniéndose 87 mg de un producto de reacción formado mayoritariamente por la oxima **40**.

RMN ¹H: tabla 14, figura 34.

RMN ¹³C: tabla 14, figura 34.

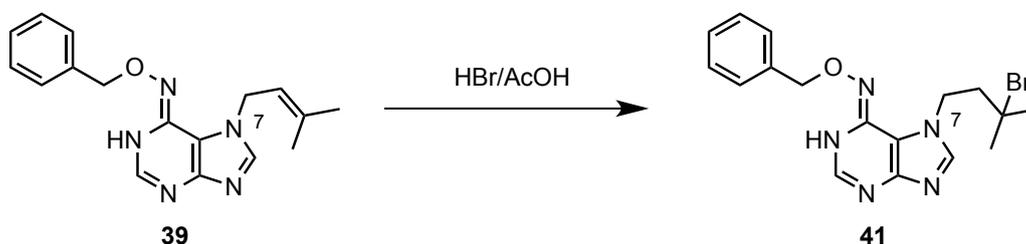
HRMS: calculada para C₃₃H₄₃N₅O₃ + H⁺: 558,3439 u; encontrada: 558,3436 *m/z*.

Ciclación de la oxima 39

A una disolución de 158 mg (0,511 mmol) de la oxima **39** en 6 mL de THF a 0 °C en atmósfera inerte, se le adicionaron 481 mg (1,51 mmol) de acetato de mercurio II (Hg(OAc)₂) y se mantuvo la mezcla a 40 °C durante 24 h. Finalizado el tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le adicionaron 38 mg (0,99 mmol) de NaBH₄ y 1 mL de NaOH 2,5 N y se mantuvo en agitación magnética durante 20 min. El precipitado se filtró a través de celita con AcOEt, se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 146 mg de un producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice

eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:AcOEt:EtOH 96 % (3:6:1), 45 mg de la oxima **39** sin reaccionar.

Reacción de la oxima **39 con HBr**



a) Por irradiación con microondas

A 11 mg (0,035 mmol) de la oxima **39** se le adicionó 1 mL de HBr en AcOH al 30 %, irradiándose con microondas a 100 °C durante 5 min en agitación. Transcurrido ese tiempo se evaporó el AcOH, el residuo se redisolvió en AcOEt y se basificó con una disolución acuosa saturada de K₂CO₃. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 8 mg del compuesto bromado **41** ligeramente impurificado.

b) A temperatura ambiente

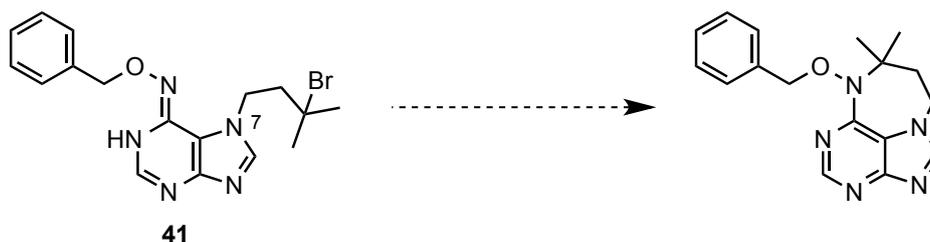
A 95 mg (0,31 mmol) de la oxima **39** se le adicionaron 4 mL de HBr en AcOH al 30 %, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en agitación magnética con tubo con NaHCO₃, durante 21 h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el AcOH, el residuo se redisolvió en AcOEt y se basificó con una disolución acuosa saturada de K₂CO₃. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 97 mg (80 %) del derivado bromado **41**.

RMN ¹H: tabla 15, figura 35.

RMN ¹³C: tabla 15, figura 35.

IR (ν_{máx}): 2920, 1656, 1593, 1450, 696 cm⁻¹.

HRMS: calculada para C₁₇H₂₀N₅OBr + H⁺: 390,0924 u; encontrada: 390,0926 m/z.

Ciclación del compuesto 41**a) Con HBr en AcOH**

A 22 mg (0,056 mmol) del derivado bromado **41** se adicionaron 1,7 mL de HBr en AcOH al 30 %, la mezcla se mantuvo a 100 °C en agitación magnética con tubo con NaHCO₃, durante 3 h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el AcOH, el residuo se disolvió en AcOEt y se basificó con una disolución acuosa saturada de K₂CO₃. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 12 mg de un producto complejo en el que pudo identificarse que el compuesto **41** no evolucionó.

b) Por irradiación con microondas

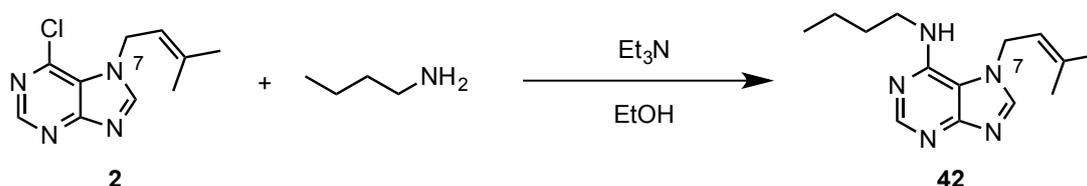
Una mezcla de 20 mg (0,051 mmol) del derivado bromado **41** en 2 mL de etanol absoluto fue irradiada con microondas a 150 °C durante 10 min en agitación. Finalizado el tiempo se evaporó el disolvente y se obtuvieron 14 mg de una mezcla compleja.

c) Con K₂CO₃ en DMF

35 mg (0,089 mmol) del compuesto bromado **41** se disolvieron en 1 mL de DMF y se adicionaron 10 mg (1 %) de K₂CO₃, manteniendo la mezcla a 60 °C en agitación y atmósfera inerte durante 72 h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el disolvente y el producto de reacción se extrajo con AcOEt lavando la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaCl, secándola con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró y, por evaporación del disolvente, se obtuvieron 30 mg de una mezcla donde se detectó la presencia de un producto de eliminación del bromo cuyo espectro de RMN de ¹H no coincide con el del alqueno **39**.

C.1.2. A través de aminas en C-6

Obtención de 7-isopentenil-*N*⁶-butiladenina



Una disolución de 232 mg (1,04 mmol) de la 7-isopentenil-6-cloropurina, **2**, 185 μ L (1,87 mmol) de butilamina y 0,4 mL (3 mmol) de Et₃N en 4 mL de etanol absoluto, fue irradiada con microondas a 150 °C durante 15 minutos en agitación. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente y se obtuvieron 244 mg de un producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla CH₂Cl₂:EtOH 96 % (95:5) y 1 % de Et₃N, 102 mg (38 %) del compuesto **42**.

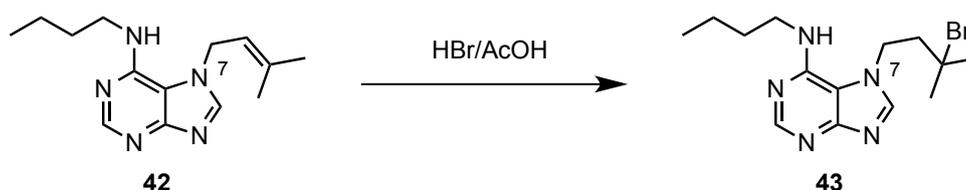
RMN ¹H: tabla 17, figura 36.

RMN ¹³C: tabla 17, figura 36.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3360, 3050, 2953, 1606, 1553, 1468, 886 cm⁻¹.

HRMS: calculada para C₁₄H₂₁N₅ + Na⁺: 282,1689 u; encontrada: 282,1688 *m/z*.

Reacción de 7-isopentenil-*N*⁶-butiladenina con HBr



a) A temperatura ambiente

A la amina **42** se adicionó HBr en AcOH al 30 %, se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente en agitación magnética con tubo con NaHCO₃, durante períodos de 24 a 96 h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el AcOH, el residuo se disolvió en AcOEt y se basificó con una disolución acuosa saturada de K₂CO₃. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose un producto de reacción en el que se identificó el compuesto **42** sin reaccionar.

b) Por irradiación con microondas

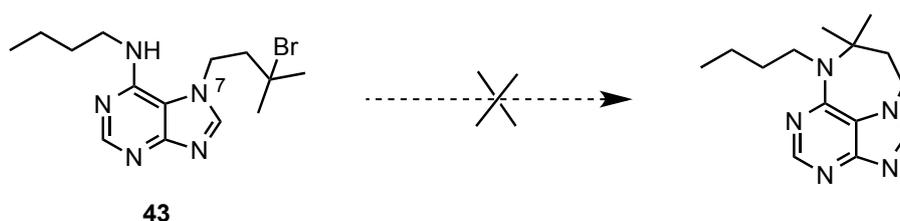
Una mezcla de 34 mg (0,13 mmol) del compuesto **42** y 2 mL de HBr en AcOH al 30 % fue irradiada con microondas a 100 °C durante 5 minutos en agitación. Finalizada la reacción se evaporó el AcOH, el producto se disolvió en AcOEt y se basificó con una disolución acuosa saturada de K₂CO₃. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 30 mg del compuesto **43** algo impurificado.

RMN ¹H: tabla 17, figura 37.

RMN ¹³C: tabla 17, figura 37.

IR (ν_{máx}): 3253, 3060, 2959, 1633, 1553, 1455, 700 cm⁻¹.

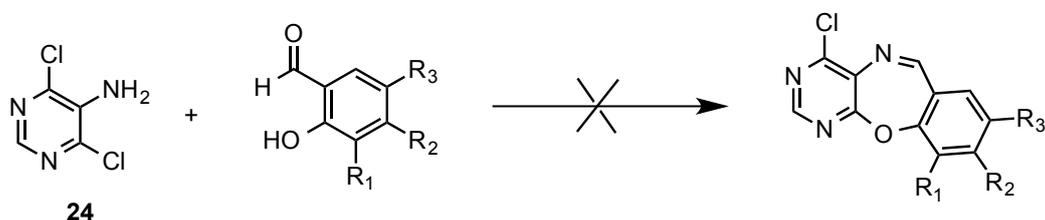
HRMS: calculada para C₁₄H₂₂N₅Br⁺ H⁺: 340,1131 u; encontrada: 340,1118 m/z.

Ciclación del compuesto 43

Una mezcla de 22 mg (0,065 mmol) del derivado bromado **43** en 2 mL de etanol absoluto fue irradiada con microondas a 150 °C durante 10 min en agitación. Finalizado el tiempo se evaporó el disolvente y se obtuvieron 18 mg de una mezcla compleja de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H se pudieron identificar tanto el producto de eliminación del bromo, el alqueno **42**, como el compuesto de partida **43**.

C.2. OBTENCIÓN DE OTROS SISTEMAS HETEROCÍCLICOS

C.2.1. Reacción de 5-amino-4,6-dicloropirimidina con aldehídos salicílicos



R ₁	R ₂	R ₃
H	OH	H
H	OCH ₃	H
OCH ₃	H	H
H	H	NO ₂

a) Con Cs₂CO₃ y microondas

A 50 mg (0,31 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 2 mL de isopropanol se adicionaron 0,31 mmol del correspondiente benzaldehído y 200 mg de Cs₂CO₃. La mezcla se irradió con microondas a 150 °C durante 10 min en agitación. Finalizada la reacción se filtró el producto y por evaporación del disolvente se obtuvo un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H no aparecen señales del compuesto buscado.

b) Con K₂CO₃ y microondas

A 100 mg (0,61 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 1,5 mL de DMF se adicionaron 111 mg (0,732 mmol) de 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído y 253 mg de K₂CO₃. La mezcla se irradió con microondas a 120 °C durante 5 min en agitación. Finalizada la reacción el producto se diluyó en AcOEt y agua, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y por evaporación del disolvente, se obtuvieron 151 mg de un producto de reacción formado por una mezcla compleja.

c) Con K₂CO₃ en DMF a 65 °C

A 100 mg (0,61 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 1,5 mL de DMF se adicionaron 111 mg (0,732 mmol) de 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído y 253 mg de K₂CO₃. La mezcla se mantuvo a 65 °C en agitación y atmósfera inerte durante 7 h.

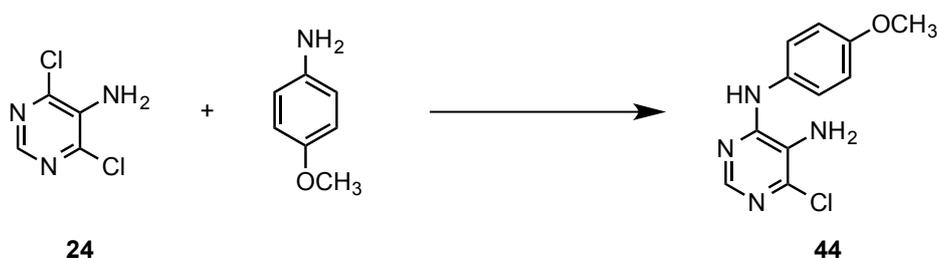
Finalizada la reacción se procedió de la misma manera descrita en el caso anterior, obteniéndose 134 mg de un producto de reacción formado por una mezcla compleja.

d) En DMF a 130 °C

A 150 mg (0,910 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 1 mL de DMF se adicionaron 138 mg (0,910 mmol) de 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. La mezcla se mantuvo a 130 °C en agitación y atmósfera inerte durante 5 h. Finalizada la reacción se procedió de la misma manera descrita en el caso *b* de este apartado y se obtuvo una mezcla de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H no aparecen señales del compuesto buscado.

C.2.2. Reacción de diaminocloropirimidinas con aldehídos

Obtención de diaminocloropirimidina 44



a) Con HCl en i-PrOH y microondas

50 mg (0,31 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, se disolvieron en 2 mL de isopropanol, se adicionaron 37 mg (0,30 mmol) de *p*-metoxianilina y 15 μL de HCl al 37 %. La mezcla se irradió a 150 °C durante 10 min en agitación. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente, se extrajo con AcOEt, lavando la fase orgánica sucesivamente con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO_3 y NaCl hasta pH neutro y la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 72 mg de un producto de reacción formado por una mezcla compleja.

*b) Con Et_3N en *n*-BuOH y microondas*

50 mg (0,31 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, se disolvieron en 2 mL de *n*-butanol, se adicionaron 37 mg (0,30 mmol) de *p*-metoxianilina y 15 μL (112,5 μmol) de Et_3N . La mezcla se irradió dos veces sucesivas a 150 °C durante 10 y 20 min en agitación. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 97 mg de una mezcla compleja formada mayoritariamente por los reactivos de partida.

c) Con HCl en *n*-BuOH y microondas

50 mg (0,31 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, se disolvieron en 2 mL de *n*-butanol, se adicionaron 37 mg (0,30 mmol) de *p*-metoxianilina y 15 μ L de HCl al 37 %. La mezcla se irradió a 150 °C durante 10 min en agitación. Finalizada la reacción se operó de la misma manera descrita en el caso *a* y se obtuvieron 66 mg de un producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:acetona (9:1), 28 mg (37 %) del compuesto **44**.

RMN ¹H: tabla 18, figura 38.

RMN ¹³C: tabla 18.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3358, 3260, 2920, 1660, 1605, 1562, 1508, 1463, 826 cm⁻¹.

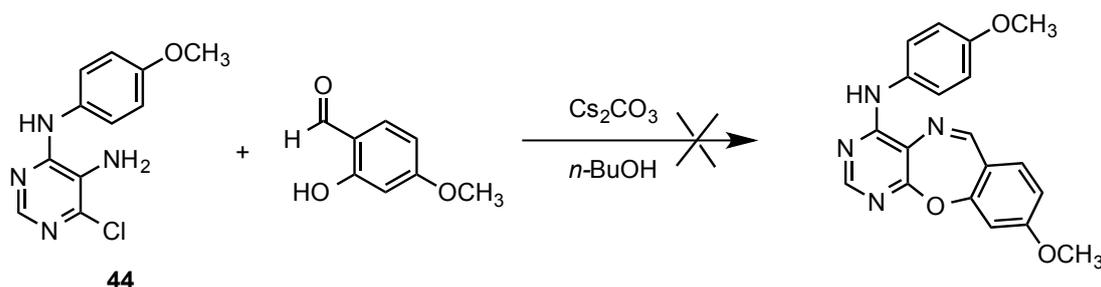
HRMS: calculada para C₁₁H₁₁N₄OCl⁺ H⁺: 251,0694 u; encontrada: 251,0692 *m/z*.

d) Con Et₃N en *n*-BuOH a 150 °C

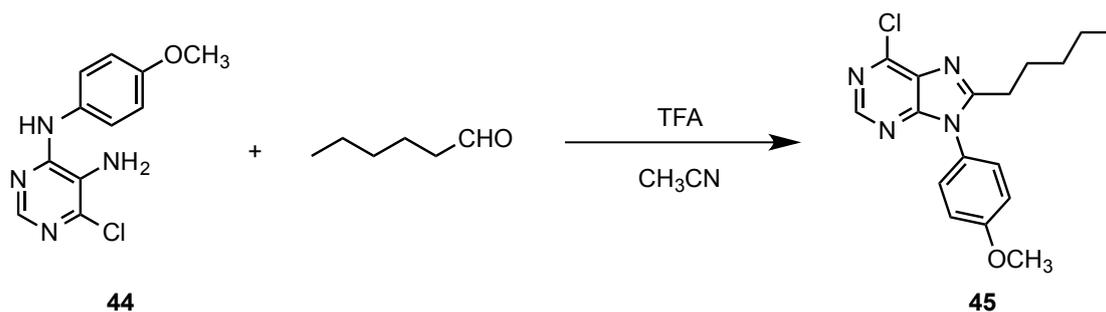
Una mezcla de 200 mg (1,23 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, 165 mg (1,34 mmol) de *p*-metoxianilina y 0,2 mL (1 mmol) de Et₃N, se disolvieron en 4 mL de *n*-butanol. La mezcla se mantuvo a 150 °C en agitación y atmósfera inerte durante 52 h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad y el producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de CH₂Cl₂:acetona (9:1), 130 mg (43 %) del compuesto **44**.

e) En DMF a 180 °C

100 mg (0,615 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, y 75 mg (0,61 mmol) de *p*-metoxianilina se disolvieron en 2 mL de DMF. La mezcla se mantuvo a 180 °C en agitación y atmósfera inerte durante 15 h. El producto de reacción se disolvió en AcOEt, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 143 mg de producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla de Hex:acetona (7:3), 93 mg (61 %) del compuesto **44**.

Reacción del compuesto 44 con aldehído salicílico

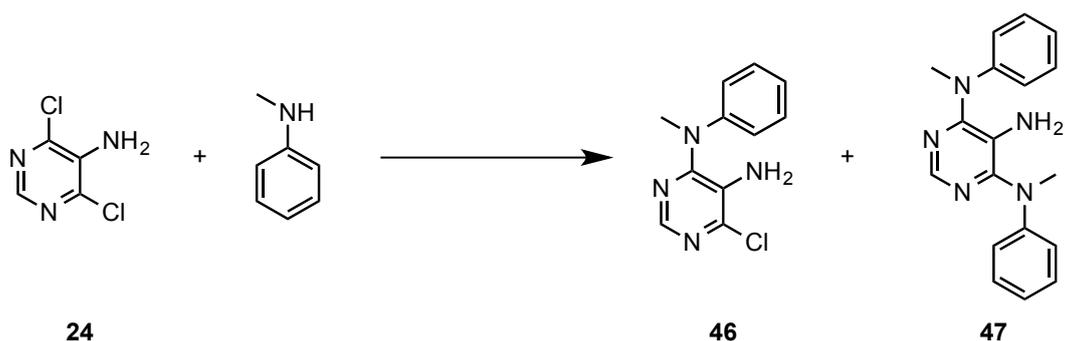
66 mg (0,26 mmol) del compuesto **44** se disolvieron en 2 mL de *n*-butanol y se adicionaron 40 mg (0,26 mmol) de 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído y 150 mg de Cs₂CO₃. La mezcla fue irradiada con microondas a 150 °C durante 10 min en agitación. Finalizada la reacción el producto se filtró y se evaporó el disolvente, obteniendo una mezcla compleja que no fue posible resolver.

Reacción del compuesto 44 con hexanal

Una mezcla de 254 mg (1,01 mmol) del compuesto **44**, 0,21 mL (1,8 mmol) de hexanal y 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) en 8 mL de CH₃CN se mantuvo a reflujo en agitación magnética y atmósfera inerte durante 22 h. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad, el producto se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ y NaCl hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y por evaporación del disolvente, se obtuvieron 326 mg de un producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla CH₂Cl₂:acetona (7:3), 80 mg (24 %) del compuesto **45**.

RMN ¹H: tabla 18, figura 39.

Obtención de la diaminocloropirimidina 46



a) Con Et₃N en n-BuOH a reflujo

A 100 mg (0,615 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, disueltos en 2,5 mL de *n*-butanol, se adicionaron 133 μ l (1,22 mmol) de *N*-metilanilina y 0,2 mL (1 mmol) de Et₃N. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo en agitación y atmósfera inerte durante 9 h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el disolvente y el producto de reacción se disolvió en AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 251 mg de una mezcla de los productos de partida sin reaccionar.

b) Con HCl en i-PrOH y microondas

71 mg (0,43 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, y 47 μ l (0,43 mmol) de *N*-metilanilina se disolvieron en 2 mL de isopropanol y se adicionaron 0,5 mL de HCl al 37 %. La mezcla fue irradiada con microondas a 150 °C durante 20 min en agitación. El producto de reacción se disolvió en AcOEt y se lavó con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ y NaCl sucesivamente, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y, por evaporación del disolvente, se obtuvieron 76 mg de un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ¹H aparecían señales del compuesto **46**, impurificadas con restos de reactivos.

c) Con HCl en EtOH:H₂O a reflujo

100 mg (0,615 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, y 80 μ L (0,732 mmol) de *N*-metilanilina se suspendieron en una mezcla de EtOH:H₂O (5 mL, 1:8) y se le adicionaron 63 μ L HCl al 37 %. La mezcla se mantuvo a reflujo en agitación y atmósfera inerte durante 48 h. Finalizada la reacción se extrajo operando de la misma manera descrita

anteriormente y se obtuvieron 130 mg de un producto de reacción que fue cromatografiado sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla CH_2Cl_2 : acetona (98:2):

a) 72 mg (50 %) de la diaminocloropirimidina **46**.

RMN ^1H : tabla 19, figura 40.

RMN ^{13}C : tabla 19, figura 40.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3303, 2913, 1620, 1551, 1528, 1475, 843 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{Cl} + \text{H}^+$: 235,0745 u; encontrada: 235,0748 m/z .

b) 30 mg (16 %) de **47**.

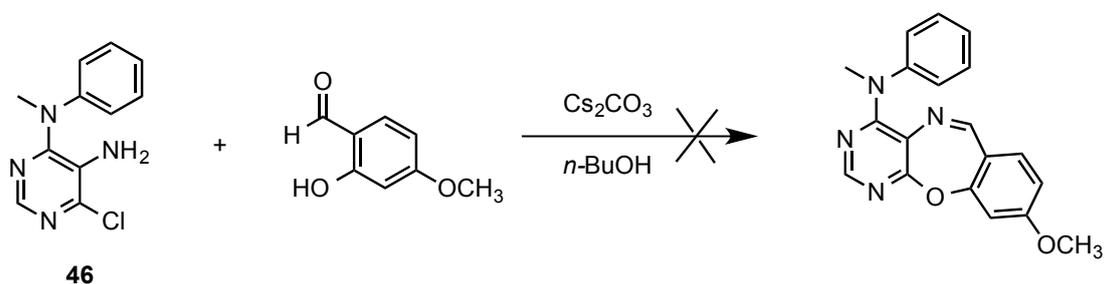
RMN ^1H : tabla 19, figura 41.

RMN ^{13}C : tabla 19, figura 41.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3360, 2913, 1600, 1553, 1440, 886 cm^{-1} .

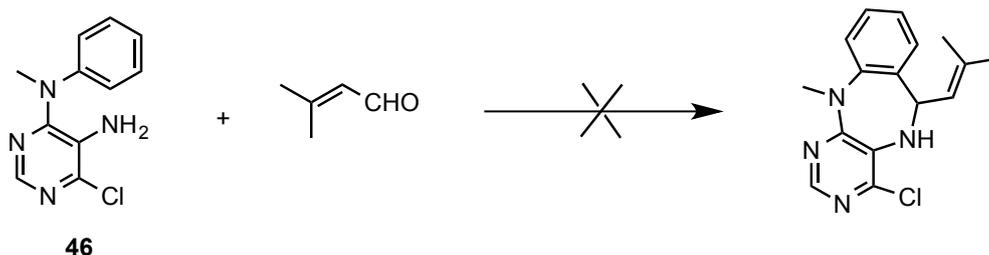
HRMS: calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_5 + \text{H}^+$: 306,1713 u; encontrada: 306,1716 m/z .

Reacción del compuesto **46** con aldehído salicílico



62 mg (0,26 mmol) del compuesto **46** se disolvieron en 2 mL de *n*-butanol y se adicionaron 40 mg (0,26 mmol) de 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído y 150 mg de Cs_2CO_3 . La mezcla fue irradiada con microondas a 150 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min en agitación. Finalizada la reacción se filtró el producto y se evaporó el disolvente, obteniendo una mezcla compleja en la que no se encontraba el compuesto buscado.

Reacción del compuesto 46 con 3-metilbut-2-enal



a) Con TFA en CH₃CN a reflujo

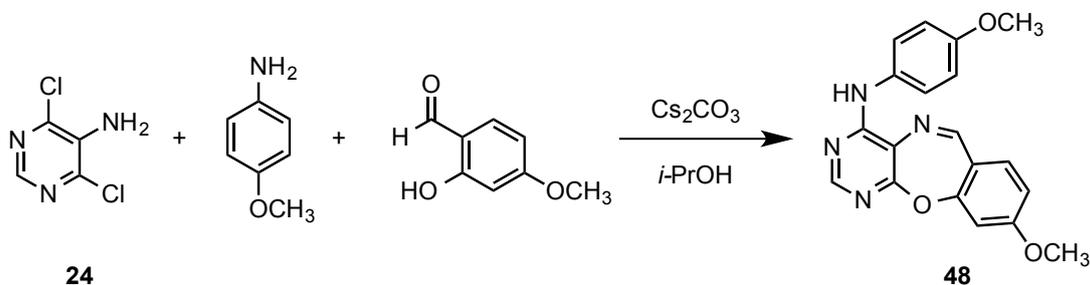
Una mezcla de 56 mg (0,24 mmol) de la diaminocloropirimidina **46**, 35 μ L (0,36 mmol) de 3-metilbut-2-enal y 0,2 mL de TFA en 4 mL de CH₃CN se mantuvo a reflujo en agitación magnética y atmósfera inerte durante 24 h. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente sin llegar a sequedad, el producto se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ y NaCl hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y por evaporación del disolvente, se obtuvieron 117 mg de una mezcla de reacción en la que no se pudo identificar el producto esperado.

b) Con Fe(OTf)₃ y microondas

8 mg (0,03 mmol) de la diaminocloropirimidina **46**, y 10 μ L (0,10 mmol) de 3-metilbut-2-enal se disolvieron en 2 mL de etanol absoluto y se adicionó un 2 % de Fe(OTf)₃. La mezcla fue irradiada con microondas a 150 °C durante 10 min en agitación dos veces sucesivas. Finalizada la irradiación se evaporó el disolvente, el residuo se disolvió en AcOEt y se lavó con agua saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 23 mg de un producto de reacción en el que no pudo identificarse el producto buscado.

C.2.3. Formación de sistemas tricíclicos por reacción de aminodicloropirimidina con aldehídos y aminas en un solo paso

Obtención del compuesto 48



A una disolución de 100 mg (0,615 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 1 mL de isopropanol, se le adicionaron 75 mg (0,61 mmol) de *p*-metoxianilina, 93 mg (0,61 mmol) de 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído y 350 mg de Cs₂CO₃. La mezcla se irradió con microondas a 150 °C durante 10 min en agitación. Finalizada la reacción se filtró el producto y se evaporó el disolvente. Se obtuvieron 497 mg de producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla CH₂Cl₂:acetona (95:5), 101 mg (48 %) del compuesto **48**.

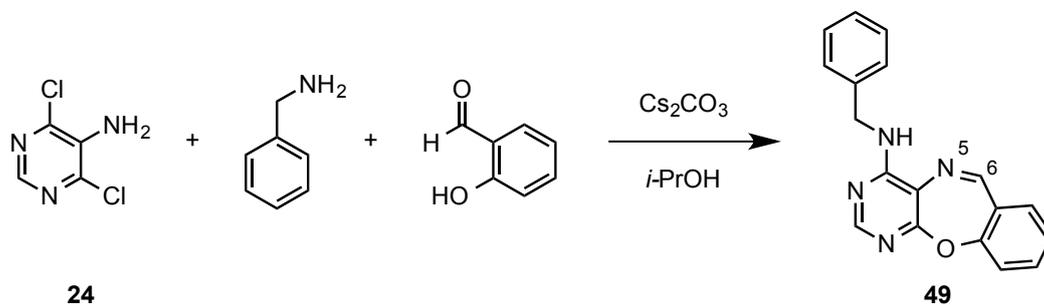
RMN ¹H: tabla 20, figura 42.

RMN ¹³C: tabla 20, figura 42.

IR (ν_{máx}): 3350, 2926, 1660, 1597, 1566, 1512, 1423 cm⁻¹.

HRMS: calculada para C₁₉H₁₆N₄O₃ + H⁺: 349,1306 u; encontrada: 349,1306 *m/z*.

Obtención del compuesto 49



A una disolución de 100 mg (0,615 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 1 mL de isopropanol, se le adicionaron 67 μL (0,61 mmol) de bencilamina, 65 μL (0,61 mmol) de salicilaldehído y 500 mg de Cs₂CO₃. La mezcla fue irradiada con microondas a 150 °C durante 10 min en agitación. Finalizada la reacción se filtró el

producto y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose, con una mezcla CH₂Cl₂:acetona (95:5), 45 mg (24 %) del compuesto **49**.

RMN ¹H: tabla 20, figura 43.

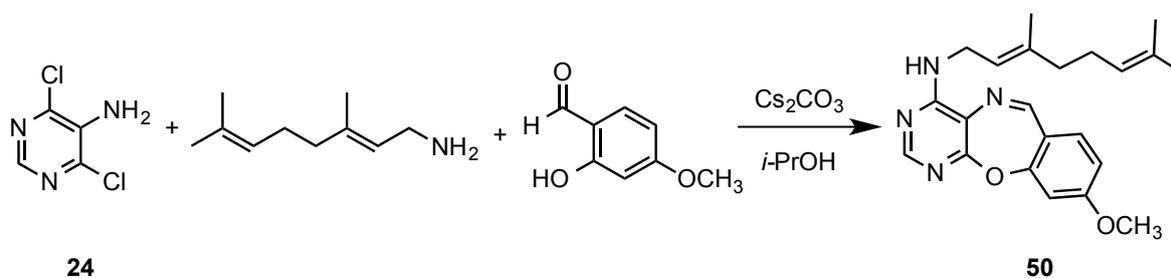
RMN ¹³C: tabla 20, figura 43.

IR (ν_{máx}): 3389, 3020, 2913, 1580, 1530, 1506, 1422 cm⁻¹.

HRMS: calculada para C₁₈H₁₄N₄O + H⁺: 303,1240 u; encontrada: 303,1241 m/z.

Una parte del producto de reacción (90 mg) se disolvió en 8 mL de MeOH y se le adicionaron NaBH₄ (165 mg, 4,30 mmol), manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h. Finalizada la reacción se adicionó agua (5 mL) y se mantuvo agitando durante 5 min, después se evaporó el disolvente sin llegar a residuo. El producto de reacción se disolvió en AcOEt, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 65 mg de una mezcla en cuyo espectro de RMN de ¹H aparecen señales asignables al producto de reducción del doble enlace N-5/C-6 del compuesto **49** que no pudo ser purificado por cromatografía.

Obtención del compuesto **50**



A una disolución de 54 mg (0,33 mmol) de 5-amino-4,6-dicloropirimidina, **24**, en 1 mL de isopropanol, se le adicionaron 61 μL (0,33 mmol) de geranilamina, 51 mg (0,33 mmol) de 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído y 350 mg de Cs₂CO₃. La mezcla fue irradiada con microondas a 150 °C durante 10 min en agitación. Finalizada la reacción se filtró el producto y se evaporó el disolvente. Se obtuvieron 369 mg de producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice en columna y posteriormente en capa fina preparativa, eluyéndose con una mezcla CH₂Cl₂:EtOH 96 % (96:4), 16 mg (13 %) del compuesto **50**.

RMN ^1H : tabla 20, figura 44.

RMN ^{13}C : tabla 20, figura 44.

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3346, 2913, 1653, 1600, 1580, 1413 cm^{-1} .

HRMS: calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2 + \text{H}^+$: 379,2128 u; encontrada: 379,2122 m/z .

D. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

REACTIVOS

Suero fetal bovino (FBS), L-glutamina, solución salina equilibrada de Hank (HBSS), tripsina-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), solución de penicilina/estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL, respectivamente), medio RPMI-1640 y DMEM, de Hyclone (Logan, Utah, EE.UU.)

Ácido acético, dimetilsulfóxido (DMSO), adenina, 6-mercaptopurina, elipticina, sulforodamina B (SRB), azul de tripano, ácido tricloroacético y Tris, de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO Estados Unidos).

INSTRUMENTACIÓN

- Placas de cultivo estériles de 96 pocillos
- Pipeta multicanal
- Frascos de cultivo Roux
- Hematocitómetro: Neubauer improved bright-line (0,1 mm)
- Cámara de Flujo laminar. Telstar, modelo: Av-30/70
- Incubadora CO₂. Heal Force, modelo: HF151
- Incubadora. VWR, modelo: Incu-line
- Microscopio invertido. Nikon, modelo: Eclipse TS 100
- Microscopio óptico. Leica, modelo: CME
- Centrífuga. Hettich, modelo: 30RF
- Espectrofotómetro lector de microplacas multipocillo. Biotek, modelo: ELx800
- Agitador de placas: Awareness Technology INC, modelo: Stat Fax-2100

Líneas celulares

Las cuatro líneas celulares utilizadas de carcinoma de pulmón no microcítico (NCI-H460), carcinoma cervical (HeLa), hepatocarcinoma (HepG2) de ECACC (European Collection of Cell Cultures) y adenocarcinoma de mama (MCF-7) de DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) estaban disponibles en el IPB y se mantuvieron en el medio adecuado en una incubadora de aire humidificado que contenía 5 % de CO₂ a 37 °C.

El medio utilizado para las líneas NCI-H460 y MCF-7 fue medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y glutamina 2 mM. Para las líneas HeLa y Hep G2 se usó medio DMEM suplementado con 10 % de FBS, glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.

Las células se mantuvieron como cultivos de células adherentes mediante sucesivos procesos de resiembra, requiriendo una tripsinización para desprender las células de la superficie de cultivo. Para ello, se lavó el frasco de cultivo (Roux) con una solución de tripsina-EDTA y se dejó incubar durante 3-4 minutos a 37 °C. En el caso de las células HepG2, esta incubación se realizó durante un tiempo más prolongado (7-9 minutos) debido a la morfología de crecimiento piramidal característica de esta línea celular. A las células tripsinizadas se adicionó medio de cultivo y se centrifugaron a 37 °C 1200 rpm durante 5 minutos, para precipitarlas. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en el medio de cultivo correspondiente. Se observaron al microscopio para ver su aspecto y realizar el recuento en un hematocitómetro, utilizando el test de azul de tripano para determinar su viabilidad.¹⁵⁹ Se ajustó la concentración celular con medio de crecimiento para obtener una densidad de células apropiada para la siembra: 7,5 x 10³ células/pocillo para NCI-H460 y MCF-7, y 1,0 x 10⁴ células/pocillo para HeLa y HepG2.

¹⁵⁹ Queiroz, M.-J.R.P.; Calhelha, R.C.; Vale-Silva, L.A.; Pinto, E.; Almeida, G.M.; Vasconcelos, M.H. Synthesis and evaluation of tumor cell growth inhibition of novel methyl 3-amino-6-[(hetero)arylethynyl]thieno[3,2-*b*]pyridine-2-carboxylates. Structure-activity relationships and effects on the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 236-240.

La línea celular no tumoral de hepatocitos de cerdo se obtuvo a partir de hígado de cerdo lechón de un matadero local de acuerdo con un procedimiento establecido previamente^{160,161} y que fue designada como PLP2.

Los tejidos de hígado de cerdo se enjuagaron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) que contenía 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina y se dividió en explantes de 1x1 mm³. Algunos de estos explantes se colocaron en frascos de cultivo de 25 cm² en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS, 2 mM de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con un 5 % de CO₂. Se realizó un seguimiento directo del cultivo celular cada dos o tres días utilizando un microscopio de contraste de fase, cambiando el medio cada dos días. Las células se subcultivaron y se ajustó la concentración celular con medio de crecimiento para obtener una densidad de 1,0 x 10⁴ células/pocillo.^{162,163}

Preparación de las disoluciones de los compuestos a ensayar

De cada uno de los compuestos a ensayar, se prepararon disoluciones madre de concentración 20 mM disolviendo cada muestra en el volumen adecuado de DMSO.

La disolución madre de cada compuesto se diluyó con agua para obtener disoluciones de concentración 10 mM realizando una dilución de ½ y, a partir de éstas, disoluciones de concentración 2,5 mM realizando una dilución de ¼. Así mismo, se preparó un “control negativo” de DMSO y agua en las mismas proporciones.

¹⁶⁰ Abreu, R.M.V.; Ferreira, I.C.F.R.; Calhelha, R.C.; Lima, R.T.; Vasconcelos, M.H.; Adegas, F.; Chaves, R.; Queiroz, M.-J.R.P. Anti-hepatocellular carcinoma activity using HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-*b*]pyridine-2-carboxylate derivatives: *in vitro* evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5800-5806.

¹⁶¹ Calhelha, R.C.; Ferreira, I.C.F.R.; Peixoto, D.; Abreu, R.M.V.; Vale-Silva, L.A.; Pinto, E.; Lima, R.T.; Alvelos, M.I.; Vasconcelos, M.H.; Queiroz, M.-J.R.P. Aminodi(hetero)arylamines in the thieno[3,2-*b*]pyridine series: synthesis, effects in human tumor cells growth, cell cycle analysis, apoptosis and evaluation of toxicity using non-tumor cells. *Molecules* **2012**, *17*, 3834-3843.

¹⁶² Dias, M. I.; Barros, L.; Dueñas, M.; Pereira, E.; Carvalho, A. M.; Alves, R. C.; Oliveira, M. B. P. P.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. F. R. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chem.* **2013**, *141*, 4152-4160.

¹⁶³ Stojković, D.; Reis, F. S.; Barros, L.; Glamočlija, J.; Ćirić, A.; van Griensven, L. J. I. D.; Soković, M.; Ferreira, I. C. F. R. Nutrients and no-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O. F. Müll.) Pers. *Food Chem. Tox.* **2013**, *59*, 289-296.

A partir de las disoluciones madre de concentración 20 mM de algunos compuestos seleccionados, se prepararon 5 concentraciones diferentes adicionales, realizando diluciones seriadas de $\frac{1}{4}$ para la obtención de nuevas disoluciones de concentración: 5 mM, 1,25 mM, 0,3125 mM, 0,0781 mM y 0,0195 mM.

Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad de los compuestos se determinó *in vitro*, midiendo la viabilidad de los cultivos celulares, tanto de líneas tumorales como no tumorales, en presencia de diferentes concentraciones de cada compuesto mediante el ensayo colorimétrico de Sulforodamina B de acuerdo con Vichai *et al.*,^{155,156} con algunas adaptaciones, según un procedimiento descrito previamente.¹⁶⁴

Los ensayos se realizaron en placas estériles de 96 pocillos, con un volumen final de 200 μ L por pocillo, sembrando en primer lugar los compuestos a ensayar (10 μ L) y a continuación la suspensión celular (190 μ L) de densidad apropiada y se dejó incubar durante 48 horas a 37 °C, con un 5 % de CO₂. Las concentraciones finales de cada compuesto en los ensayos, dependiendo de la disolución utilizada, fueron:

Concentración disolución	Concentración en ensayo
10 mM	500 μ M
5 mM	250 μ M
2,5 mM	125 μ M
1,25 mM	62,50 μ M
0,3125 mM	15,63 μ M
0,0781 mM	3,91 μ M
0,0195 mM	0,98 μ M

¹⁵⁵ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

¹⁵⁶ Vichai, V. Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112-1116.

¹⁶⁴ Queiroz, M.-J.R.P.; Dias, S.; Peixoto, D.; Rodrigues, A.R.O.; Oliveira, A.D.S.; Coutinho, P.J.G.; Vale-Silva, L.A.; Pinto, E.; Castanheira, E.M.S. New potential antitumoral di(hetero)arylether derivatives in the thieno[3,2-*b*]pyridine series: synthesis and fluorescence studies in solution and in nanoliposomes, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2012**, *238*, 71-80.

Transcurrido el período de incubación, se observó al microscopio que las células habían crecido convenientemente. Las células adherentes se fijaron mediante la adición de ácido tricloroacético frío al 10 % (ATC, 100 μ L) y se incubaron durante 60 min a 4 °C. A continuación se lavaron con agua y se secaron.

Se adicionó la solución de sulforodamina B (SRB) al 0,057 % en ácido acético al 1 % (100 μ L) y se incubaron las placas de cultivo durante 30 min a temperatura ambiente. La SRB no unida a proteínas se eliminó lavando con ácido acético al 1 % y se secaron las placas de cultivo. La SRB unida se solubilizó con una solución de base Tris 10 mM de pH 10,5 (200 μ L) y se agitaron las placas durante 5 min.

La densidad óptica (D.O.) se midió en un espectrofotómetro lector de microplacas automatizado a una longitud de onda de 515 nm, realizándose 3 lecturas de cada placa y obteniendo un valor de densidad óptica medio.

A partir de los datos obtenidos, se calculó un porcentaje de inhibición del crecimiento celular para cada ensayo de compuesto y línea celular, a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inh. crec.} = \left(1 - \left(\frac{\text{media D. O. muestra} - \text{media D. O. t} = 0}{\text{media D. O. control} - \text{media D. O. t} = 0} \right) * 100 \right)$$

- % inh. crec.: porcentaje de inhibición de crecimiento.
- 1: se considera el 100 % del crecimiento.
- media D.O. muestra: valor medio de la densidad óptica para un determinado compuesto a una determinada concentración.
- media D.O. t=0: valor medio de la densidad óptica de la suspensión celular medida a tiempo cero.
- media D.O. control: valor medio de la densidad óptica del blanco de DMSO/agua, que representa el 100 % del crecimiento.

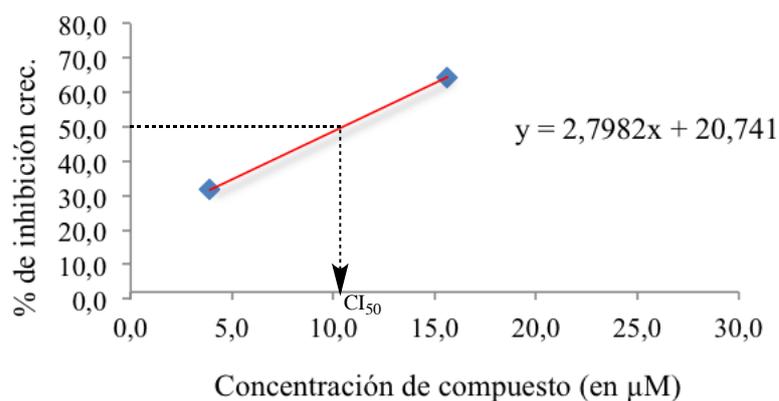


Figura 42: Recta para el cálculo de los valores de CI_{50} que relaciona la concentración del compuesto y el porcentaje de inhibición de crecimiento.

La concentración de los compuestos que inhibieron el 50 % del crecimiento celular, CI_{50} , se calculó mediante una recta entre la concentración del compuesto y el porcentaje de inhibición de crecimiento obtenido. Los valores de CI_{50} se obtuvieron usando el programa Microsoft Office Word Excel 2011.

Los resultados (valores de CI_{50}), se expresaron en μM como la media \pm desviación estándar (SD) de dos experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por duplicado. Se utilizó elipticina como control positivo.

EXPERIMENTAL PART: CYTOTOXICITY ASSAYS

CYTOTOXICITY ASSAYS*

Reagents

Foetal bovine serum (FBS), L-glutamine, hank's balanced salt solution (HBSS), trypsin-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), penicillin/streptomycin solution (100 U/mL and 100 µg/mL, respectively), RPMI-1640 and DMEM media were from Hyclone (Logan, Utah, USA)

Acetic acid, dimethylsulfoxide (DMSO), adenine, 6-mercaptopurine, ellipticine, sulforhodamine B (SRB), trypan blue, trichloroacetic acid (TCA) and Tris, were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO USA).

Equipment

- 96-well flat-bottom tissue-culture plates
- Multichannel pipette
- Culture flasks Roux
- Hemacytometer. Neubauer improved bright-line (0,1 mm)
- Laminar flow chamber. Telstar, model: Av-30/70
- Incubator CO₂. Heal Force, model: HF151
- Incubator. VWR, model: Incu-line
- Inverted microscope. Nikon, model: Eclipse TS 100
- Optical microscope. Leica, model: CME
- Centrifuges. Hettich, model: 30RF
- Spectrophotometer microplate reader multiwell. Biotek, model ELx800).
- Plate shaker. Awareness Technology INC, model: Stat Fax-2100

* References including in this english part keep the numbering from the spanish document.

Cell lines

Four human tumour cell lines were used: non-small cell lung carcinoma (NCI-H460), cervical carcinoma (HeLa), hepatocellular carcinoma (HepG2) from ECACC (European Collection of Cell Cultures) and breast adenocarcinoma (MCF-7) from DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) were available in the IPB and maintained in appropriate media at 37 °C, in a humidified air incubator containing 5 % CO₂.

Cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10 % heat-inactivated foetal bovine serum (FSB) and 2 mM glutamine, for the NCI-H460 and MCF-7 cell lines and DMEM supplemented with 10 % FBS, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, for HeLa and HepG2 cell lines.

Cells were maintained as adherent cell cultures by successive processes of reseeding, requiring trypsinization to detach cells from the culture surface. For it, the culture flask (Roux) was washed with a solution of trypsin-EDTA and incubated for 3-4 minutes at 37 °C. In the case of HepG2 cells, this incubation was for a longer time (7-9 minutes) due to the characteristic morphology of pyramidal growth of this cell line. At trypsinized cells was added culture medium and centrifuged at 1200 rpm 37 °C for 5 minutes to precipitate them. The supernatant was removed and cells were resuspended in the corresponding culture medium. They were observed under microscope to control their appearance and counted on a hemocytometer using the trypan blue test to determine their viability.¹⁵⁹ Cell concentration was adjusted with growth medium to obtain an appropriate density for plating: 7.5×10^3 cells/well for NCI-H460, MCF-7, and 1.0×10^4 cells/well for HeLa and HepG2.

For the evaluation of toxicity towards non-tumour cells, a primary cell culture was prepared from a freshly harvested porcine liver obtained from a local slaughterhouse,

¹⁵⁹ Queiroz, M.-J.R.P.; Calhelha, R.C.; Vale-Silva, L.A.; Pinto, E.; Almeida, G.M.; Vasconcelos, M.H. Synthesis and evaluation of tumor cell growth inhibition of novel methyl 3-amino-6-[(hetero)arylethynyl]thieno[3,2-*b*]pyridine-2-carboxylates. Structure-activity relationships and effects on the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 236-240.

according to a procedure previously established,^{160,161} these cells were designated as PLP2 cells.

Briefly, the liver tissues were rinsed in hank's balanced salt solution (HBSS) containing 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and divided into 1 x 1 mm³ explants. Some of these explants were placed in 25 cm² tissue flasks in DMEM medium supplemented with 10 % FBS, 2 mM nonessential amino acids and 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and incubated at 37 °C with a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. The medium was changed every two days. Cultivation of the cells was continued with direct monitoring every two to three days using a phase contrast microscope. Before confluence was reached, cells were subcultured and cell concentration was adjusted with growth medium to obtain a density of 1.0 x 10⁴ cells/well.^{162,163}

Preparation of solutions of tested compounds

20 mM mother solutions were prepared by dissolving each sample in the appropriate volume of DMSO.

Each of the mother solution was diluted with water to obtain solutions 10 mM concentration carrying out a ½ dilution and, from these, solutions 2.5 mM concentration carrying out a dilution of ¼. In the similar way, we prepared a "negative control" of DMSO and water in the same proportions.

¹⁶⁰ Abreu, R.M.V.; Ferreira, I.C.F.R.; Calhelha, R.C.; Lima, R.T.; Vasconcelos, M.H.; Adegas, F.; Chaves, R.; Queiroz, M.-J.R.P. Anti-hepatocellular carcinoma activity using HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-*b*]pyridine-2-carboxylate derivatives: *in vitro* evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5800-5806.

¹⁶¹ Calhelha, R.C.; Ferreira, I.C.F.R.; Peixoto, D.; Abreu, R.M.V.; Vale-Silva, L.A.; Pinto, E.; Lima, R.T.; Alvelos, M.I.; Vasconcelos, M.H.; Queiroz, M.-J.R.P. Aminodi(hetero)arylamines in the thieno[3,2-*b*]pyridine series: synthesis, effects in human tumor cells growth, cell cycle analysis, apoptosis and evaluation of toxicity using non-tumor cells. *Molecules* **2012**, *17*, 3834-3843.

¹⁶² Dias, M. I.; Barros, L.; Dueñas, M.; Pereira, E.; Carvalho, A. M.; Alves, R. C.; Oliveira, M. B. P. P.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. F. R. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chem.* **2013**, *141*, 4152-4160.

¹⁶³ Stojković, D.; Reis, F. S.; Barros, L.; Glamočlija, J.; Ćirić, A.; van Griensven, L. J. I. D.; Soković, M.; Ferreira, I. C. F. R. Nutrients and no-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O. F. Müll.) Pers. *Food Chem. Tox.* **2013**, *59*, 289-296.

From stock 20 mM solutions of some selected compounds, additional 5 different concentrations were prepared by carrying out serial dilutions of $\frac{1}{4}$ to obtain new solutions of concentration: 5 mM, 1.25 mM, 0.3125 mM, 0.0781 mM and 0.0195 mM.

Cytotoxicity assays

The cytotoxicity of the compounds was performing *in vitro* by measuring viability of cell cultures, both tumour and non-tumour lines, by the colorimetric Sulforhodamine B assay according to Vichai *et al.*,^{155,156} with some adaptations, according to a procedure previously described.¹⁶⁴

Assays were performed in sterile 96-well plates with a final volume of 200 μL /well, seeding first test compounds (10 μL) and then cell suspension (190 μL) of appropriate density, and allowed to attach and incubated for 48 hours at 37 °C with 5 % CO_2 . The final concentrations of each compound in the assays, depending on the solution used, were:

Concentration solution	Assay concentration
10 mM	500 μM
5 mM	250 μM
2.5 mM	125 μM
1.25 mM	62.50 μM
0.3125 mM	15.63 μM
0.0781 mM	3.91 μM
0.0195 mM	0.98 μM

¹⁵⁵ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

¹⁵⁶ Vichai, V. Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112-1116.

¹⁶⁴ Queiroz, M.-J.R.P.; Dias, S.; Peixoto, D.; Rodrigues, A.R.O.; Oliveira, A.D.S.; Coutinho, P.J.G.; Vale-Silva, L.A.; Pinto, E.; Castanheira, E.M.S. New potential antitumoral di(hetero)arylether derivatives in the thieno[3,2-*b*]pyridine series: synthesis and fluorescence studies in solution and in nanoliposomes, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2012**, *238*, 71-80.

Following this incubation period, it was observed under a microscope that the cells had grown conveniently. The adherent cells were fixed by adding cold 10 % trichloroacetic acid (TCA 100 μ L) and further incubated for 60 min at 4 °C. Plates were then washed with water and dried.

Sulforhodamine B (SRB) solution 0.057 % in acetic acid 1 % (100 μ L) was then added to each plate well and incubated for 30 min at room temperature. Unbound SRB was removed by washing with 1 % acetic acid and plates were air-dried. The bound SRB was solubilized with a solution of 10 mM Tris base pH 10.5 (200 μ L) and plates were shaken for 5 min.

Optical density (O.D.) was read on an automated spectrophotometer microplate reader at a single wavelength of 515 nm, performing three readings of each plate and obtaining a medium optical density value.

The percentage of cell growth inhibition for each test compound and cell line was calculated using the formulae below:

$$\% \text{ growth inhibition} = \left(1 - \frac{\text{mean O. D. sample} - \text{mean O. D. t} = 0}{\text{mean O. D. control} - \text{mean O. D. t} = 0} \right) * 100$$

- % growth inhibition: percentage of cell growth inhibition
- 1: it is considered 100 % growth.
- mean O.D. sample: average value of the optical density for a given compound at a specific concentration.
- mean O.D. t=0: average value of the optical density of the cell suspension measured at time zero.
- mean O.D. control: average value of the optical density of negative control DMSO/water, which represents 100 % of growth.

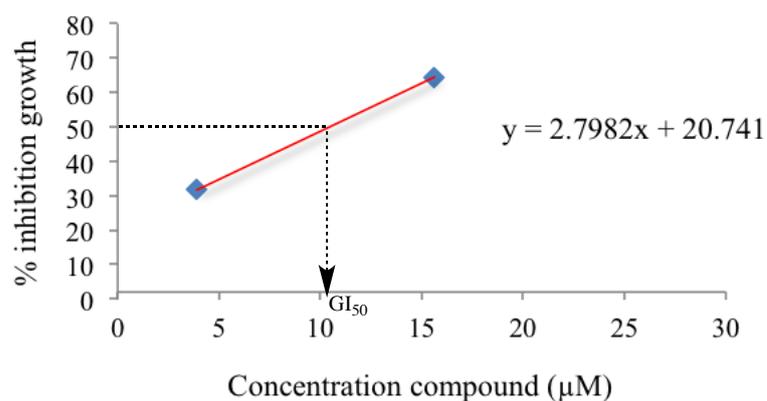


Figure 10: Straight to calculate GI_{50} values which relates the concentration of compound and the percentage of growth inhibition.

Straights were obtained for each tested compound and each cell line, and GI_{50} value, corresponding to the sample concentration that inhibited 50 % of the net cell growth, was calculated. GI_{50} values were obtained using Microsoft Office Excel 2011 program.

The results (GI_{50} values) were expressed as mean \pm standard deviation (SD) of two independent experiments, each was carried out in duplicate. Ellipticine was used as a positive control.

CONCLUSIONES

Del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral sobre la síntesis y evaluación citotóxica de alquilpurinas y otros sistemas heterocíclicos relacionados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La alquilación directa de 6-cloropurina con compuestos halogenados derivados de productos naturales condujo mayoritariamente a purinas alquiladas en N-9 acompañadas de los regioisómeros minoritarios alquilados en N-7.
2. El derivado bromado diterpénico utilizado en la alquilación fue obtenido a partir de ácido cuprésico, compuesto natural aislado de las arcéstidas de *Cupressus sempervirens* con buen rendimiento.
3. De los procedimientos utilizados para transformar el ácido cuprésico en el correspondiente derivado bromado, se obtuvieron mejores rendimientos cuando la isomerización y bromación se llevaron a cabo en un solo paso utilizando como reactivo tribromuro de fósforo a baja temperatura.
4. Se han sintetizado selectivamente las 7-alkilpurinas minoritarias a partir de pirimidinas, usando o procedimientos de alquilación con derivados halogenados o por aminación reductora de aldehídos, y su posterior ciclación con ortoformiato de trietilo.
5. El aldehído diterpénico utilizado en la aminación reductora de aminopirimidinas se obtuvo también a partir de ácido cuprésico empleando dos rutas alternativas, obteniéndose los mejores resultados cuando la transformación se realizó en un solo paso con clorocromato de piridinio y gel de sílice.

6. Se han obtenido purinas funcionalizadas tanto en N-7 como en N⁶ que son precursores adecuados para la preparación del sistema de diazepinopurina presente en asmarinas.
7. La condensación en un solo paso de pirimidinas, alquil/arilaminas y aldehídos salicílicos conduce a derivados de oxazepina y abre el camino hacia la síntesis de nuevos sistemas heterocíclicos análogos a los presentes en asmarinas.
8. Se han realizado ensayos de citotoxicidad de la mayor parte de los compuestos sintetizados sobre cuatro líneas celulares tumorales humanas y sobre una línea no tumoral de hepatocitos de cerdo, encontrándose en aproximadamente el 80 % de los compuestos evaluados valores de CI₅₀ que oscilan entre 100 y 3,3 μM, con toxicidad moderada o nula sobre células normales.
9. Del análisis de los resultados de citotoxicidad se puede concluir, de forma general, que la presencia de sustituyentes alquilo induce citotoxicidad respecto a 6-cloropurina y adenina sin sustituir. Por otro lado, las purinas con el sustituyente alquilo en N-7 fueron más potentes que sus análogos sustituidos en N-9 y esa actividad mejoró a medida que el sustituyente era de mayor tamaño. Los compuestos más potentes fueron aquellos que presentan un grupo diterpenilo unido a la purina, de forma análoga a las diterpenilpurinas naturales de origen marino.

CONCLUSIONS

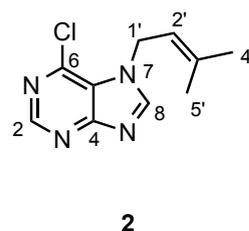
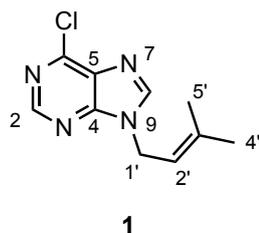
The following conclusions can be drawn from this Thesis work about the synthesis and evaluation of cytotoxic alkylpurines and other related heterocyclic systems:

1. Direct alkylation of 6-chloropurine with alkyl halides derived from natural products led mainly to alkylated purines at the N-9 accompanied by the minority alkylated regioisomers at the N-7.
2. The brominated diterpene derivative used for alkylation was obtained from cupressic acid, natural compound isolated from cones of *Cupressus sempervirens* in a good yield.
3. Two procedures were used to transform cupressic acid into the corresponding bromine derivative and the better yields were obtained when the isomerization and bromination were carried out in one step using phosphorus tribromide as reagent at low temperature.
4. The minor regioisomers 7-alkylpurines were selectively synthesized from pyrimidines, using either alkylation procedures with halogenated derivatives or reductive amination of aldehydes, and subsequent cyclization with triethyl orthoformate.
5. The diterpene aldehyde used in reductive amination of aminopyrimidines was also obtained from cupressic acid using two alternative routes, best results were obtained when the transformation was performed in one step with pyridinium chlorochromate and silica gel.

6. Both N-7 and N⁶ functionalized purines have been obtained, which are suitable precursors for the preparation of the diazepinopurine system present in asmarines.
7. Condensation in one step of pyrimidines, alkyl/arylamines and salicylic aldehydes derivatives leads to oxazepine derivatives and opens the way towards the synthesis of new analogues to those heterocyclic systems present in asmarines.
8. Cytotoxicity assays for most of the synthesized compounds have been carried out in four human tumour cell lines and in a non-tumour line of porcine hepatocytes, it was found that approximately 80 % of tested compounds showed GI₅₀ values ranging from 100 to 3,3 μM, with moderate or no toxicity to normal cells.
9. From the analysis of the cytotoxicity results, in general, it can be concluded that the presence of alkyl substituents induces cytotoxicity respect to unsubstituted 6-chloropurine and adenine. Furthermore, purines with alkyl substituent at the N-7 were more potent than its N-9 substituted analogues and that activity improved as the substituent was larger. The most potent compounds were those with one diterpenyl group attached to the purine ring, similarly to the natural diterpenylpurines from marine origin.

ESPECTROSCOPIA

TABLAS*

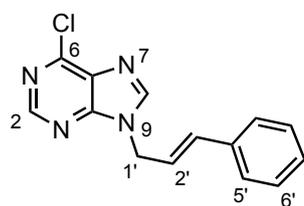
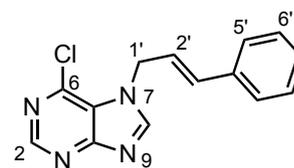


Nº	H	C	H	C
2	8,63 <i>s</i>	152,8	8,74 <i>s</i>	152,9
4		150,9		162,7
5		132,1		123,8
6		140,8		144,6
8	8,42 <i>s</i>	147,8	8,64 <i>s</i>	151,2
1'	4,84 <i>d</i> (7,2)	43,0	5,17 <i>d</i> (7,2)	46,6
2'	5,39 <i>t</i> (7,2)	118,6	5,45 <i>t</i> (7,2)	119,6
3'		119,5		-
4'	1,68 <i>s</i> *	18,2*	1,80 <i>s</i> *	18,5*
5'	1,78 <i>s</i> *	25,8*	1,86 <i>s</i> *	25,9*

Tabla 1: Datos de RMN de ^1H y de ^{13}C para los compuestos **1** y **2**. δ en ppm (J en Hz).

*: señales intercambiables.

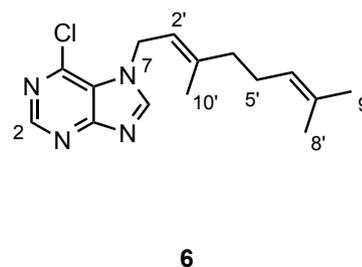
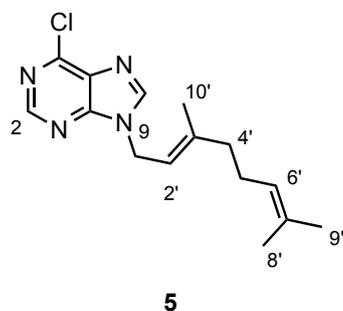
* Las tablas y figuras del apartado de espectroscopía presentan una numeración independiente al resto del documento.

**3****4**

Nº	H	C	H	C
2	8,75 <i>s</i>	152,9	8,79 <i>s</i>	153,1
4		151,1		-
5		132,1		123,2
6		137,1		144,8
8	8,62 <i>s</i>	148,0	8,75 <i>s</i>	151,7
1'	5,13 <i>d</i> (6,6)	47,1	5,35 <i>d</i> (5,6)	50,1
2'	6,45-6,52 <i>m</i>	123,4	6,48-6,62 <i>m</i>	124,7
3'	6,72 <i>d</i> (15,6)	135,9	6,48-6,62 <i>m</i>	135,4
4'		135,4		-
5', 9'	7,21-7,41 <i>m</i>	129,6*	7,21-7,41 <i>m</i>	129,7*
6', 8'	7,21-7,41 <i>m</i>	127,6*	7,21-7,41 <i>m</i>	127,7*
7	7,21-7,41 <i>m</i>	129,2	7,21-7,41 <i>m</i>	129,3

Tabla 2: Datos de RMN de ^1H y de ^{13}C para los compuestos **3** y **4**. δ en ppm (J en Hz).

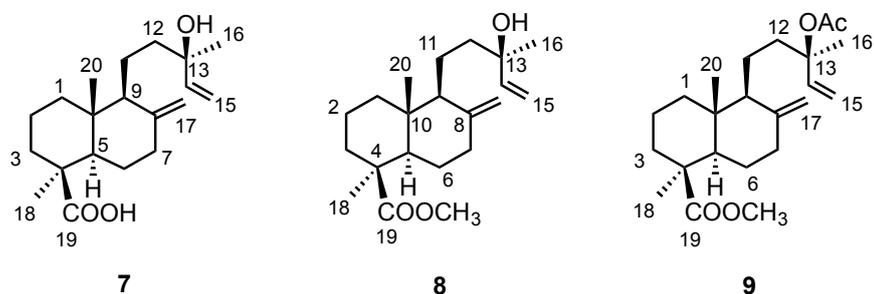
*: señales intercambiables.



N°	H	C	H	C
2	8,70 <i>s</i>	152,9	8,77 <i>s</i>	153,0
4		153,0		-
5		132,2		-
6		151,0		144,8
8	8,48 <i>s</i>	147,8	8,62 <i>s</i>	151,2
1'	4,94 <i>d</i> (7,2)	43,0	5,18 <i>d</i> (6,8)	46,5
2'	5,47 <i>t</i> (7,2)	118,7	5,44 <i>t</i> (6,8)	119,7
3'		144,3		143,9
4'	2,09-2,12 <i>m</i>	40,4	2,13-2,15 <i>m</i>	40,4
5'	2,09-2,12 <i>m</i>	27,1	2,13-2,15 <i>m</i>	27,1
6'	4,99-5,02 <i>m</i>	124,8	5,02-5,04 <i>m</i>	124,8
7'		132,8		132,9
8'	1,52 <i>s</i> *	16,6*	1,54 <i>s</i> *	16,7*
9'	1,57 <i>s</i> *	17,8*	1,58 <i>s</i> *	17,7*
10'	1,86 <i>s</i>	25,8	1,84 <i>s</i>	25,8

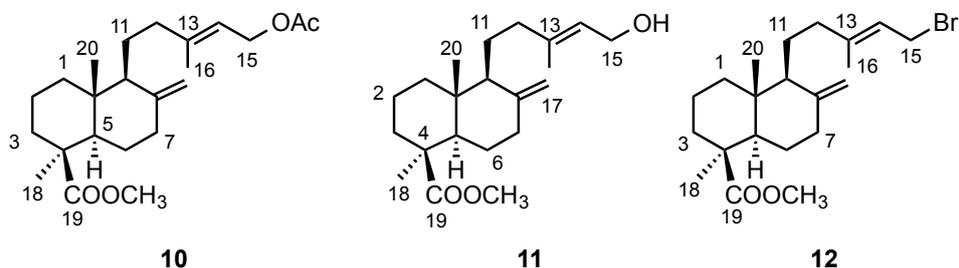
Tabla 3: Datos de RMN de ^1H y de ^{13}C para los compuestos **5** y **6**. δ en ppm (J en Hz).

*: señales intercambiables.



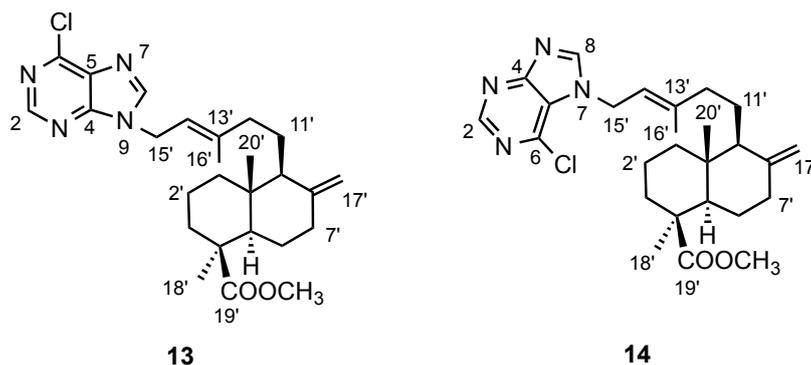
N°	H	H	C	H
1	-	-	39,0	-
2	-	-	19,8	-
3	-	-	38,1	-
4			44,2	
5	-	-	56,2	-
6	-	-	26,1	-
7	-	-	38,6	-
8			148,0	
9	-	-	56,3	-
10			40,3	
11	-	-	17,7	-
12	-	-	41,2	-
13			73,5	1,87 <i>s</i> -(OAc)
14	5,88 <i>dd</i> (17,4; 10,6)	5,88 <i>dd</i> (17,2; 10,7)	145,0	5,81 <i>dd</i> (10,52; 3,52)
15	5,18 <i>d</i> (17,4) 5,04 <i>d</i> (10,6)	5,19 <i>d</i> (17,2) 5,04 <i>d</i> (10,7)	111,5	5,02 <i>d</i> (10,52) 4,95 <i>d</i> (3,52)
16	1,25 <i>s</i>	1,25 <i>s</i>	27,9	1,40 <i>s</i>
17	4,81 <i>s</i> 4,46 <i>s</i>	4,81 <i>s</i> 4,46 <i>s</i>	106,3	4,70 <i>s</i> 4,37 <i>s</i>
18	1,20 <i>s</i>	1,16 <i>s</i>	28,7	1,05 <i>s</i>
19	11 <i>s</i>	3,59 <i>s</i> (OCH ₃)	177,6 51,0 (OCH ₃)	3,47 <i>s</i> (OCH ₃)
20	0,56 <i>s</i>	0,47 <i>s</i>	12,4	0,37 <i>s</i>

Tabla 4: Datos de RMN de ¹H para los compuestos **7**, **8** y **9**. δ en ppm (*J* en Hz).



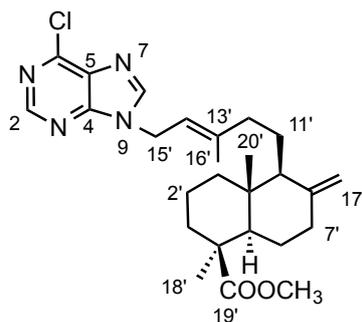
N°	H	C	H	C	H	C
1	-	39,1	-	39,2	-	38,9
2	-	19,9	-	19,9	-	19,8
3	-	38,2	-	38,2	-	38,5
4		44,2		44,3		44,1
5	-	56,3	-	56,3	-	56,0
6	-	26,2	-	26,3	-	26,1
7	-	38,7	-	38,4	-	38,0
8		147,9		148,0		147,6
9	-	55,3	-	55,5	-	54,8
10		40,2		40,2		40,0
11	-	21,8	-	21,9	-	21,5
12	-	38,3	-	38,7	-	29,4
13		142,8		140,4		143,8
14	5,26 <i>t</i> (7,2)	118,0	5,38 <i>t</i> (6,6)	123,1	5,42 <i>t</i> (8,4)	120,4
15	4,80 <i>d</i> (7,2)	61,3	4,14 <i>d</i> (6,6)	59,4	3,95 <i>d</i> (8,4)	42,5
15-(OAc)	2,00 <i>s</i>	171,0 (-OCOCH ₃) ₂ 21,0 (-OCOCH ₃) ₂				
16	1,64 <i>s</i>	16,4	1,66 <i>s</i>	16,3	1,65 <i>s</i>	15,7
17	4,54 <i>s</i> 4,46 <i>s</i>	106,3	4,85 <i>s</i> 4,52 <i>s</i>	106,4	4,78 <i>s</i> 4,43 <i>s</i>	106,2
18	1,13 <i>s</i>	28,7	1,18 <i>s</i>	28,8	1,11 <i>s</i>	28,6
19		177,7		177,8		177,4
19-(OCH ₃)	3,56 <i>s</i>	51,0	3,61 <i>s</i>	51,1	3,55 <i>s</i>	50,9
20	0,45 <i>s</i>	12,6	0,50 <i>s</i>	12,6	0,44 <i>s</i>	12,4

Tabla 5: Datos de RMN de ¹H y de ¹³C para los compuestos **10**, **11** y **12**. δ en ppm (*J* en Hz).



N°	H	C	H	C
2	8,75 <i>s</i>	151,8	8,87 <i>s</i>	152,3
4		151,6		162,1
5		131,6		122,5
6		150,9		143,1
8	8,10 <i>s</i>	144,7	8,24 <i>s</i>	148,3
1'	-	39,2	-	39,2
2'	-	19,9	-	19,9
3'	-	38,7	-	38,7
4'		44,2		44,3
5'	-	56,3	-	56,3
6'	-	26,2	-	26,2
7'	-	38,1	-	38,1
8'		147,7		147,7
9'	-	55,2	-	55,3
10'		40,2		40,3
11'	-	21,6	-	21,6
12'	-	30,1	-	30,5
13'		144,4		144,3
14'	5,40 <i>t</i> (7,0)	116,6	5,40 <i>t</i> (7,0)	117,1
15'	4,87 <i>m</i>	41,8	5,07 <i>d</i> (7,0)	45,2
16'	1,84 <i>s</i>	16,6	1,82 <i>s</i>	16,8
17'	4,85 <i>s</i> 4,46 <i>s</i>	106,5	4,85 <i>s</i> 4,48 <i>s</i>	106,4
18'	1,17 <i>s</i>	28,7	1,18 <i>s</i>	28,7
19'		177,6		177,6
19'-(OCH ₃)	3,59 <i>s</i>	51,1	3,62 <i>s</i>	51,1
20'	0,47 <i>s</i>	12,5	0,50 <i>s</i>	12,6

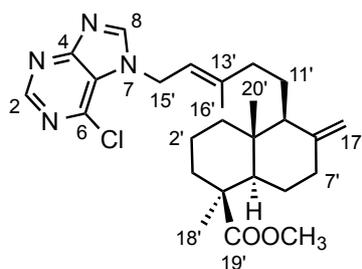
Tabla 6: Datos de RMN de ¹H y de ¹³C para los compuestos **13** y **14**. δ en ppm (*J* en Hz).



13

C	Tipo	^1H (δ) Acoplados a un enlace	^1H (δ) Acoplados a varios enlaces	Asignación
12,5	CH ₃	0,47 <i>s</i>	-	20'
16,6	CH ₃	1,84 <i>s</i>	5,40 <i>t</i>	16'
19,9	CH ₂	-	-	2'
21,6	CH ₂	-	1,84 <i>s</i>	11'
26,2	CH ₂	-	-	6'
28,7	CH ₃	1,17 <i>s</i>	-	18'
30,1	CH ₂	-	1,84 <i>s</i>	12'
38,1	CH ₂	-	4,46 <i>s</i> ; 4,85 <i>s</i>	7'
38,7	CH ₂	-	1,17 <i>s</i>	3'
39,2	CH ₂	-	0,47 <i>s</i>	1'
40,2	C		1,17 <i>s</i>	10'
41,8	CH ₂	4,87 <i>m</i>	5,40 <i>t</i>	15'
44,2	C		1,17 <i>s</i>	4'
51,1	CH ₃	3,59 <i>s</i>	-	19'-(OCH ₃)
55,2	CH	-	0,47 <i>s</i> ; 4,46 <i>s</i> ; 4,85 <i>s</i>	9'
56,3	C		1,17 <i>s</i>	5'
106,5	CH	4,46 <i>s</i> ; 4,85 <i>s</i>	-	17'
116,6	CH	5,40 <i>t</i>	1,84 <i>s</i> ; 4,87 <i>m</i>	14'
131,6	C		8,10 <i>s</i>	5
144,4	C		1,84 <i>s</i> ; 4,87 <i>m</i>	13'
144,7	CH	8,10 <i>s</i>	4,87 <i>m</i>	8
147,7	C		-	8'
150,9	C		8,75 <i>s</i>	6
151,6	C		4,87 <i>m</i> ; 8,10 <i>s</i> ; 8,75 <i>s</i>	4
151,8	CH	8,75 <i>s</i>		2
177,6	C		1,17 <i>s</i> ; 3,59 <i>s</i>	19'

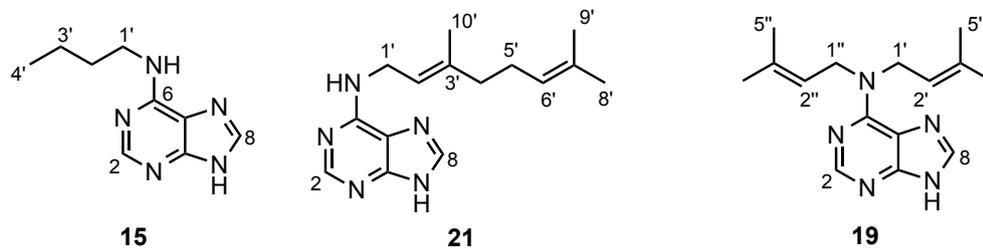
Tabla 7: Correlaciones y asignaciones de los carbonos del compuesto **13** en base a sus experimentos DEPT, HMQC y HMBC (δ en ppm).



14

C	Tipo	¹ H (δ) Acoplados a un enlace	¹ H (δ) Acoplados a varios enlaces	Asignación
12,6	CH ₃	0,50 <i>s</i>	-	20'
16,8	CH ₃	1,82 <i>s</i>	5,40 <i>t</i>	16'
19,9	CH ₂	-	-	2'
21,6	CH ₂	-	1,82 <i>s</i>	11'
26,2	CH ₂	-	-	6'
28,7	CH ₃	1,18 <i>s</i>	-	18'
30,5	CH ₂	-	1,82 <i>s</i>	12'
38,1	CH ₂	-	4,48 <i>s</i> ; 4,85 <i>s</i>	7'
38,7	CH ₂	-	1,18 <i>s</i>	3'
39,2	CH ₂	-	0,50 <i>s</i>	1'
40,3	C		1,18 <i>s</i>	10'
44,3	C		1,18 <i>s</i>	4'
45,2	CH ₂	5,07 <i>d</i>	5,40 <i>t</i>	15'
51,1	CH ₃	3,62 <i>s</i>	-	CH ₃ O-19'
55,3	CH	-	0,50 <i>s</i> ; 4,48 <i>s</i> ; 4,85 <i>s</i>	9'
56,3	C		1,18 <i>s</i>	5'
106,4	CH	4,48 <i>s</i> ; 4,85 <i>s</i>	-	17'
117,1	CH	5,40 <i>t</i>	1,82 <i>s</i> ; 5,07 <i>d</i>	14'
122,5	C		5,07 <i>d</i> ; 8,24 <i>s</i>	5
143,1	C		8,87 <i>s</i>	6
144,3	C		1,82 <i>s</i> ; 5,07 <i>d</i>	13'
147,7	C		-	8'
148,3	CH	8,24 <i>s</i>	5,07 <i>d</i>	8
152,3	CH	8,87 <i>s</i>		2
162,1	C		8,24 <i>s</i> ; 8,87 <i>s</i>	4
177,6	C		1,18 <i>s</i> ; 3,62 <i>s</i>	19'

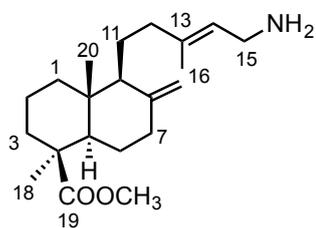
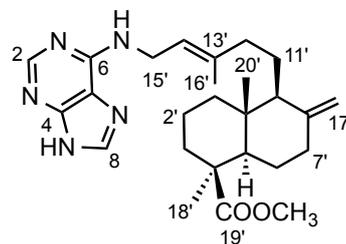
Tabla 8: Correlaciones y asignaciones de los carbonos del compuesto 14 en base a sus experimentos DEPT, HMQC y HMBC (δ en ppm).



N°	H	C	H	C	N°	H	C
2	8,21 <i>s</i>	152,3	8,22 <i>s</i>	153,8	2	8,16 <i>s</i>	153,1
4		-		-	4		138,9
5		110,0		-	5		109,6
6		-		-	6		145,7
8	8,05 <i>s</i>	139,0	8,05 <i>s</i>	141,0	8	7,94 <i>s</i>	121,8
1'	3,56 <i>t</i>	40,1	4,16 <i>d</i>	40,6	1', 1''	3,69 <i>d</i> (7,5)	46,1
2'	1,61-1,66 <i>m</i>	31,3	5,36 <i>t</i> (6,8)	121,0	2', 2''	5,24 <i>t</i> (7,5) [*] 5,31 <i>t</i> (7,5) [*]	114,0
3'	1,38-1,45 <i>m</i>	19,7		-	3', 3''		136,7
4'	0,94 <i>t</i> (7,4)	12,7	1,98-2,12 <i>m</i>	-	4', 4''	1,74 <i>s</i>	18,1 [*] 18,4 [*]
5'			1,98-2,12 <i>m</i>	27,5	5', 5''	1,74 <i>s</i>	26,0 [*] 26,2 [*]
6'			5,04 <i>t</i> (6,6)	125,1			
7'				-			
8'			1,54 <i>s</i> [*]	16,5 [*]			
9'			1,59 <i>s</i> [*]	17,8 [*]			
10'			1,72 <i>s</i>	25,9			

Tabla 9: Datos de RMN de ^1H y de ^{13}C para los compuestos **15**, **19** y **21**. δ en ppm (J en Hz).

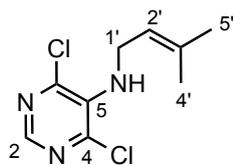
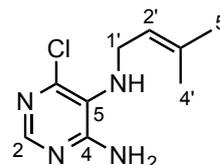
*: señales intercambiables.

**22****23**

N°	H	C
1	-	39,1
2	-	19,9
3	-	38,7
4		44,2
5	-	56,2
6	-	26,2
7	-	38,2
8		-
9	-	55,3
10		40,1
11	-	21,9
12	-	34,3
13		148,0
14	5,19 <i>t</i>	123,0
15	3,20 <i>d</i>	38,1
16	1,54 <i>s</i>	16,5
17	4,77 <i>s</i> 4,44 <i>s</i>	106,3
18	1,10 <i>s</i>	28,8
19		176,3
19-(OCH ₃)	3,54 <i>s</i>	51,1
20	0,42 <i>s</i>	12,6

N°	H
2	8,36 <i>s</i>
8	7,87 <i>s</i>
14'	5,30 <i>t</i>
15'	4,42 <i>d</i>
16'	1,68 <i>s</i>
17'	4,78 <i>s</i> 4,52 <i>s</i>
18'	1,10 <i>s</i>
19'-(OCH ₃)	3,54 <i>s</i>
20'	0,42 <i>s</i>

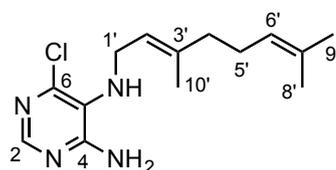
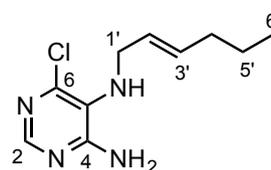
Tabla 10: Datos de RMN de ¹H y de ¹³C para los compuestos **22** y **23**. δ en ppm (*J* en Hz).

**25****29**

N°	H	C	H	C
2	8,10 <i>s</i>	147,0	7,81 <i>s</i>	152,5
4		149,1		161,9
5		138,2		124,8
6		156,7		151,0
1'	3,94 <i>d</i> (6,8)	43,5	3,44 <i>d</i> (7,2)	44,5
2'	5,14 <i>t</i> (6,8)	121,5	5,17 <i>t</i> (7,2)	123,0
3'		135,9		136,6
4'	1,57 <i>s</i> *	16,6*	1,44 <i>s</i> *	17,7*
5'	1,59 <i>s</i> *	24,4*	1,55 <i>s</i> *	25,9*

Tabla 11: Datos de RMN de ^1H y de ^{13}C para los compuestos **25** y **29**. δ en ppm (J en Hz).

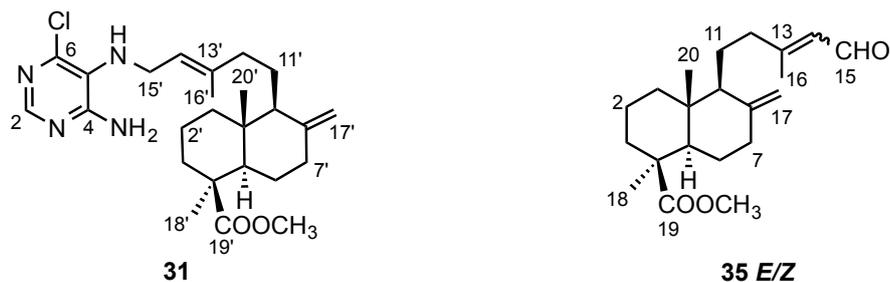
*: señales intercambiables.

**30****33**

Nº	H	C	H	C
2	7,89 <i>s</i>	151,5	7,78 <i>s</i>	152,4
4		160,7		-
5		131,2		-
6		149,9		-
1'	3,60 <i>d</i> (7,2)	43,2	3,46 <i>d</i> (7,2)	32,8
2'	5,28 <i>t</i> (7,2)	121,8	5,37-5,41 <i>m</i>	134,8
3'		143,3	5,37-5,41 <i>m</i>	128,6
4'	1,93-2,04 <i>m</i>	39,5	1,05-1,25 <i>m</i>	27,8
5'	1,93-2,04 <i>m</i>	26,4	1,05-1,25 <i>m</i>	23,6
6'	5,04 <i>t</i> (1,4)	123,9	0,78 <i>t</i> (3,2)	14,4
7'		139,2		
8'	1,54 <i>s</i> *	15,0*		
9'	1,57 <i>s</i> *	16,7*		
10'	1,65 <i>s</i>	24,8		

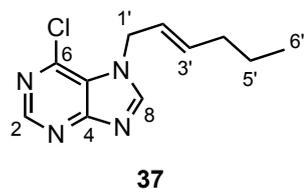
Tabla 12: Datos de RMN de ^1H y de ^{13}C para los compuestos **30** y **33**. δ en ppm (*J* en Hz).

*: señales intercambiables.

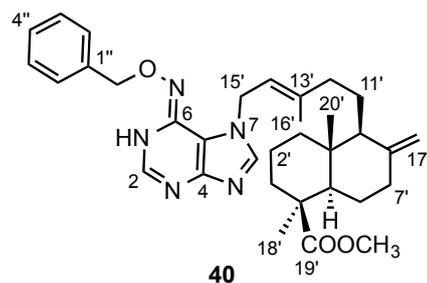


N°	H	C	N°	H (E)	C (E)	H (Z)	C (Z)
2	8,07 <i>s</i>	152,3	1	-	41,2	-	39,1
4		147,6	2	-	21,7	-	19,9
5		123,7	3	-	40,9	-	38,5
6		148,0	4		46,0		44,2
1'	-	39,1	5	-	58,0	-	56,1
2'	-	19,9	6	-	28,0	-	26,2
3'	-	38,7	7	-	40,4	-	38,1
4'		44,2	8		149,4		147,6
5'	-	56,2	9	-	57,1	-	54,9
6'	-	26,1	10		42,1		40,2
7'	-	38,2	11	-	23,2	-	22,3
8'		140,7	12		39,9		31,0
9'	-	55,4	13		166,5		164,7
10'		40,1	14	5,79 <i>d</i>	129,0	5,81 <i>d</i>	129,2
11'	-	21,7	15(CHO)	9,92 <i>d</i> (8,0)	193,2	9,76 <i>d</i> (8,0)	191,1
12'	-	30,4	16	2,09 <i>s</i>	19,4	1,91 <i>s</i>	24,8
13'		140,5	17	4,81 <i>s</i> 4,42 <i>s</i>	108,3	4,85 <i>s</i> 4,48 <i>s</i>	106,7
14'	5,46 <i>t</i> (7,1)	120,7	18	1,13 <i>s</i>	30,6	1,11 <i>s</i>	28,7
15'	3,51 <i>d</i> (7,1)	40,2	19		179,4		177,7
16'	1,59 <i>s</i>	16,6	19-(OCH ₃)	3,56 <i>s</i>	53,0	3,54 <i>s</i>	51,2
17'	4,84 <i>s</i> 4,50 <i>s</i>	106,4	20	0,44 <i>s</i>	14,3	0,44 <i>s</i>	12,7
18'	1,17 <i>s</i>	28,8					
19'		177,7					
19'-(OCH ₃)	3,60 <i>s</i>	51,1					
20	0,49 <i>s</i>	12,5					

Tabla 13: Datos de RMN de ¹H y de ¹³C para los compuestos **31** y **35 (E/Z)**. δ en ppm (*J* en Hz).

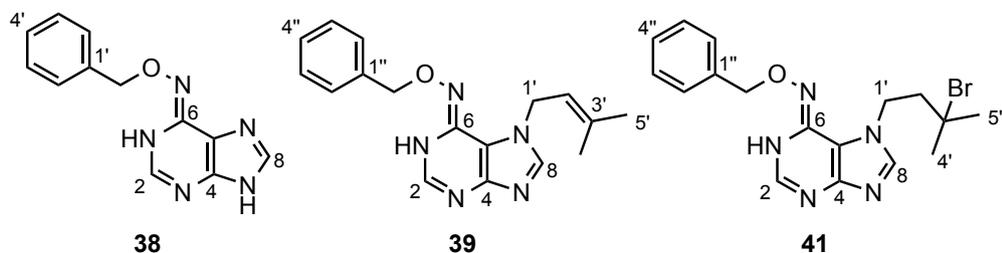


N°	H	C
2	8,72 <i>s</i>	153,0
4		162,7
5		123,7
6		144,5
8	8,67 <i>s</i>	151,8
1'	4,05 <i>d</i> (6,9)	32,7
2'	5,70-5,73 <i>m</i>	125,8
3'	5,70-5,73 <i>m</i>	137,2
4'	1,07-1,37 <i>m</i>	27,1
5'	1,07-1,37 <i>m</i>	23,5
6'	0,84 <i>t</i> (6,4)	14,3



N°	H	C
2	7,50 <i>s</i>	149,0
4		-
5		-
6		148,0
8	8,05 <i>s</i>	137,5
1'	-	38,7
2'	-	19,7
3'	-	38,5
4'		44,3
5'	-	56,3
6'	-	26,2
7'	-	38,3
8'		132,2
9'	-	55,2
10'		39,2
11'	-	19,9
12'	-	38,2
13'		131,0
14'	-	-
15'	-	40,3
16'	1,66 <i>s</i>	-
17'	-	106,4
18'	1,10 <i>s</i>	28,8
19'		177,8
19'-(OCH ₃)	3,53 <i>s</i>	51,1
20'	0,42 <i>s</i>	12,6
-CH ₂ -C ₆ H ₅	5,13 <i>s</i>	68,3
1''		-
2'', 6''	7,19-7,33 <i>m</i>	127,0
3'', 5''	7,19-7,33 <i>m</i>	128,6
4''	7,19-7,33 <i>m</i>	128,4

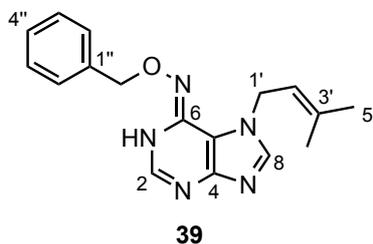
Tabla 14: Datos de RMN de ¹H y de ¹³C para los compuestos **37** y **40**. δ en ppm (*J* en Hz).



N°	H	N°	H	C	H	C
2	7,67 <i>s</i>	2	7,55 <i>s</i>	141,1	7,58 <i>s</i>	141,7
4		4		150,3		150,4
5		5		111,5		111,7
6		6		141,0		140,5
8	7,84 <i>s</i>	8	7,75 <i>s</i>	145,0	7,88 <i>s</i>	145,4
-CH ₂ -C ₆ H ₅	5,03 <i>s</i>	1'	4,84 <i>d</i> (6,2)	46,3	4,41-4,43 <i>m</i>	46,9
1'		2'	5,34 <i>t</i> (6,2)	120,4	2,17-2,23 <i>m</i>	-
2', 6'	7,22-7,40 <i>m</i>	3'		139,1		-
3', 5'	7,22-7,40 <i>m</i>	4'	1,74 <i>s</i> *	18,2*	1,66 <i>s</i>	34,8
4'	7,22-7,40 <i>m</i>	5'	1,70 <i>s</i> *	25,7*	1,66 <i>s</i>	34,8
		-CH ₂ -C ₆ H ₅	5,05 <i>s</i>	76,9	4,85 <i>s</i>	76,7
		1''		139,8		140,1
		2'', 6''	7,28-7,53 <i>m</i>	128,7	7,24-7,38 <i>m</i>	128,8
		3'', 5''	7,28-7,53 <i>m</i>	129,3	7,24-7,38 <i>m</i>	129,3
		4''	7,28-7,53 <i>m</i>	129,1	7,24-7,38 <i>m</i>	129,2

Tabla 15: Datos de RMN de ¹H y de ¹³C para los compuestos **38**, **39** y **41**. δ en ppm (*J* en Hz).

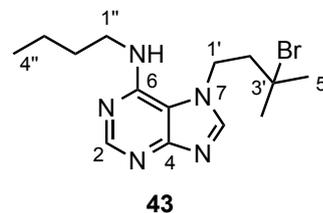
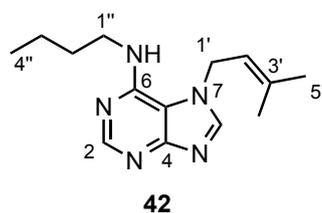
*: señales intercambiables.



C	Tipo	¹ H (δ) Acoplados a un enlace	¹ H (δ) Acoplados a varios enlaces	Asignación
18,2	CH ₃	1,74 <i>s</i> *	1,70 <i>s</i> *; 5,34 <i>t</i>	4'*
25,7	CH ₃	1,70 <i>s</i> *	1,74 <i>s</i> *; 5,34 <i>t</i>	5'*
46,3	CH ₂	4,84 <i>d</i>		1'
76,9	CH ₂	5,05 <i>s</i>	7,28-7,53 <i>m</i>	-CH ₂ -C ₆ H ₅
111,5	C		4,84 <i>d</i> ; 7,75 <i>s</i>	5
120,4	CH	5,34 <i>t</i>	1,70 <i>s</i> *; 1,74 <i>s</i> *; 4,84 <i>d</i>	2'
128,7	2xCH	7,28-7,53 <i>m</i>	5,05 <i>s</i> ; 7,28-7,53 <i>m</i>	2'', 6''
129,1	CH	7,28-7,53 <i>m</i>	5,05 <i>s</i> ; 7,28-7,53 <i>m</i>	4''
129,3	2xCH	7,28-7,53 <i>m</i>	5,05 <i>s</i> ; 7,28-7,53 <i>m</i>	3'', 5''
139,1	C		1,70 <i>s</i> *; 1,74 <i>s</i> *; 4,84 <i>d</i>	3'
139,8	C		5,05 <i>s</i> ; 7,28-7,53 <i>m</i>	1''
141,0	C		7,55 <i>s</i>	6
141,1	CH	7,75 <i>s</i>	4,84 <i>d</i>	8
145,0	CH	7,55 <i>s</i>		2
150,3	C		7,55 <i>s</i> ; 7,75 <i>s</i>	4

Tabla 16: Correlaciones y asignaciones de los carbonos del compuesto **39** en base a sus experimentos DEPT, HMQC y HMBC (δ en ppm).

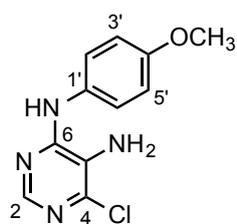
*: señales intercambiables.



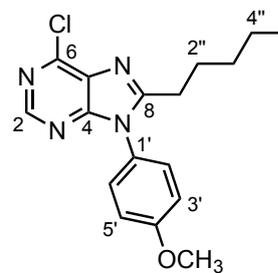
N°	H	C	H	C
2	8,24 <i>s</i>	153,7	8,50 <i>s</i>	148,0
4		159,7		151,4
5		112,9		111,5
6		152,6		146,7
8	8,09 <i>s</i>	145,8	8,32 <i>s</i>	145,6
1'	5,03 <i>d</i> (6,4)	46,6	4,66-4,77 <i>m</i>	45,4
2'	5,38 <i>t</i> (6,4)	120,4	2,52-2,54 <i>m</i>	45,5
3'		140,4		39,0
4'	1,79 <i>s</i> *	18,4*	1,84 <i>s</i>	31,0
5'	1,81 <i>s</i> *	25,9*	1,84 <i>s</i>	31,0
1''	3,52 <i>t</i> (7,1)	41,8	3,66-3,78 <i>m</i>	41,1
2''	1,57-1,63 <i>m</i>	32,6	1,66-1,78 <i>m</i>	24,4
3''	1,36-1,42 <i>m</i>	21,2	1,41-1,47 <i>m</i>	19,7
4''	0,94 <i>t</i> (7,4)	14,3	0,97-1,00 <i>m</i>	12,7

Tabla 17: Datos de RMN de ^1H y de ^{13}C para los compuestos **42** y **43**. δ en ppm (J en Hz).

*: señales intercambiables.



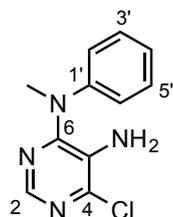
44



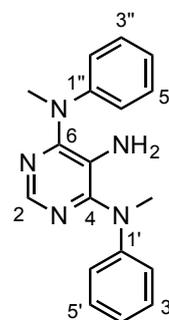
45

N°	H	C	N°	H
2	8,07 <i>s</i>	149,3	2	8,08 <i>s</i>
4		-	2', 6'	7,28 <i>d</i> (6,1)
5		-	3', 5'	7,08 <i>d</i> (6,1)
6		-	4'-OCH ₃	3,88 <i>s</i>
1'		130,2	1''	2,76 <i>t</i> (7,4)
2', 6'	7,32 <i>d</i> (6,6)	123,4	2''	1,70-1,81 <i>m</i>
4'		-	3'', 4''	1,23-1,34 <i>m</i>
3', 5'	6,85 <i>d</i> (6,6)	114,3	5''	0,82 <i>t</i>
4'-OCH ₃	3,74 <i>s</i>	55,5		

Tabla 18: Datos de RMN de ¹H y de ¹³C para los compuestos **44** y **45**. δ en ppm (*J* en Hz).



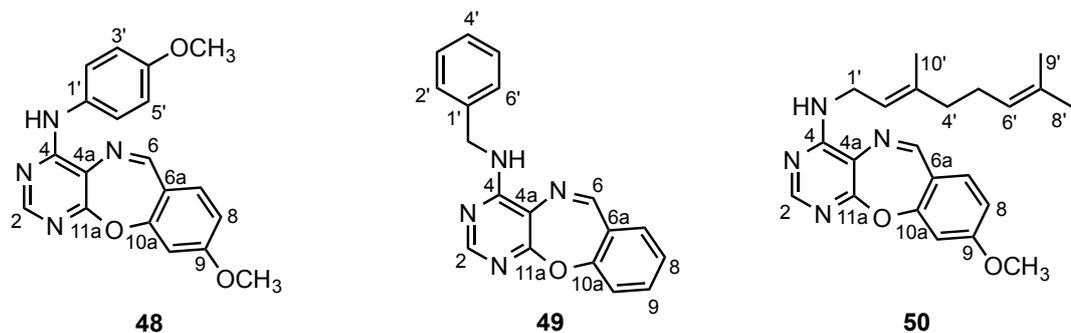
46



47

N°	H	C	N°	H	C
2	8,15 <i>s</i>	146,6	2	8,38 <i>s</i>	147,8
4		143,0	4		151,7
5		127,6	5		122,6
6		151,7	6		151,7
1'		144,6	1', 1''		145,5
2', 6'	7,14-7,16 <i>m</i>	125,2	2', 2'' 6', 6''	6,98-7,02 <i>m</i>	122,9
4'	6,99-7,02 <i>m</i>	122,9	4', 4''	6,88-6,90 <i>m</i>	120,1
3', 5'	7,30-7,34 <i>m</i>	129,6	3', 3'' 5', 5''	7,25-7,29 <i>m</i>	129,3
N-CH ₃	3,46 <i>s</i>	41,3	N-CH ₃ (x 2)	3,49 <i>s</i>	39,8

Tabla 19: Datos de RMN de ^1H y de ^{13}C para los compuestos **46** y **47**. δ en ppm (J en Hz).



N°	H	C	N°	H	C	N°	H	C
2	8,18 <i>s</i>	157,2	2	8,19 <i>s</i>	157,7	2	8,19 <i>s</i>	157,3
4		-	4		159,9	4		159,0
4a		-	4a		115,4	4a		115,4
6	8,21 <i>s</i>	160,7	6	8,23 <i>s</i>	160,8	6	8,22 <i>s</i>	160,3
6a		-	6a		126,7	6a		119,6
7	7,14-7,20	132,1	7	7,41-7,45 <i>m</i>	130,4	7	7,17-7,19 <i>m</i>	131,7
8	6,67-6,70	112,1	8	7,14-7,28 <i>m</i>	125,6	8	6,72-6,74 <i>m</i>	112,1
9		-	9	7,41-7,45 <i>m</i>	134,3	9		160,8
9-(OCH ₃)	3,76 <i>s</i> *	55,8*	10	7,14-7,28 <i>m</i>	122,0	9-(OCH ₃)	3,82 <i>s</i>	55,7
10	6,67-6,70	106,8	10a		157,5	10	6,72-6,74 <i>m</i>	106,6
10a		-	11a		160,9	10a		-
11a		-	-CH ₂ -C ₆ H ₅	4,65 <i>s</i>	45,1	11a		164,9
1'		-	1'		138,3	1'	4,08 <i>t</i>	39,5
2', 6'	7,43-7,46	122,9	2', 6'	7,14-7,28 <i>m</i>	127,6	2'	5,31 <i>t</i>	119,9
4'		-	4'	7,14-7,28 <i>m</i>	127,5	3'		140,0
4'-(OCH ₃)	3,74 <i>s</i> *	55,4*	5', 7'	7,14-7,28 <i>m</i>	128,7	4'	2,01-2,11 <i>m</i>	39,2
3', 5'	6,82-6,85	114,2				5'	2,01-2,11 <i>m</i>	26,3
						6'	5,09 <i>t</i>	123,8
						7'		-
						8'	1,60 <i>s</i> *	16,3*
						9'	1,68 <i>s</i> *	17,6*
						10'	1,71 <i>s</i>	25,6

Tabla 20: Datos de RMN de ¹H y de ¹³C para los compuestos **48**, **49** y **50**. δ en ppm (*J* en Hz).

*: señales intercambiables.

ESPECTROS*

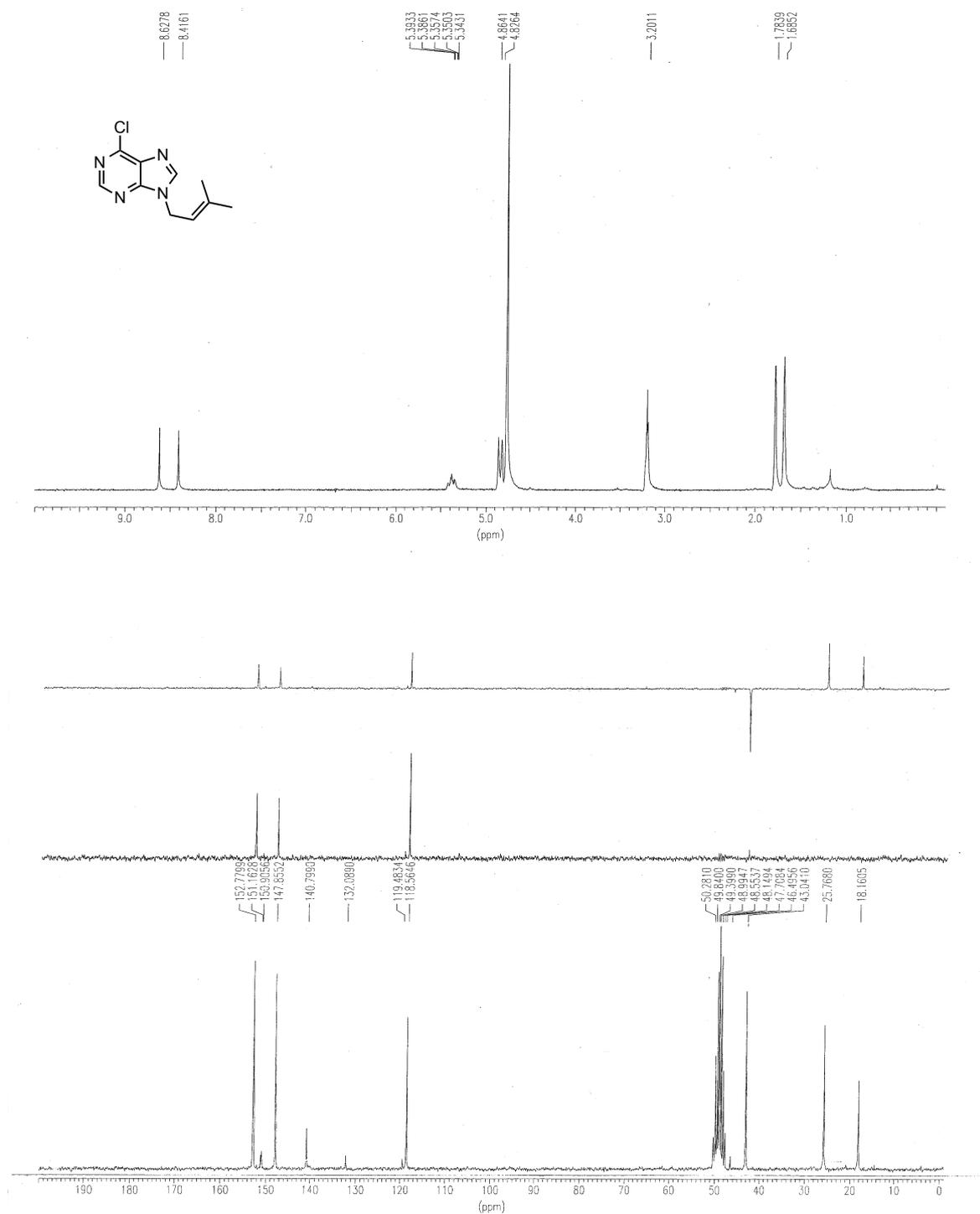


Figura 1: Espectros de RMN de ^1H (200 MHz) y ^{13}C (50,3 MHz) del compuesto 1.

* Se indica exclusivamente el uso del aparato Bruker AC 200 MHz y de CDCl_3 como disolvente, el resto de espectros fueron realizados en un aparato de 400 MHz en CD_3OD .

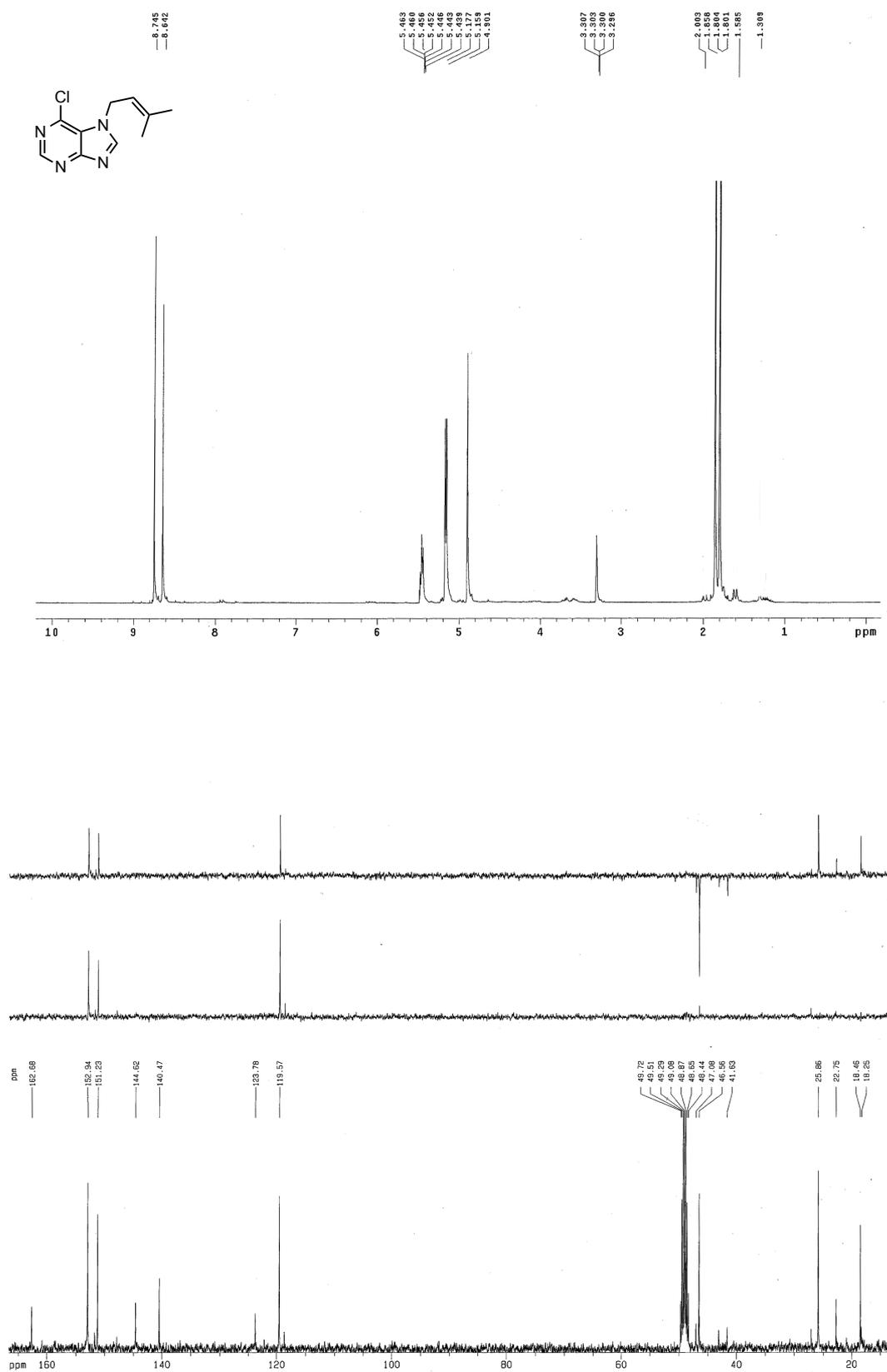


Figura 2: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 2.

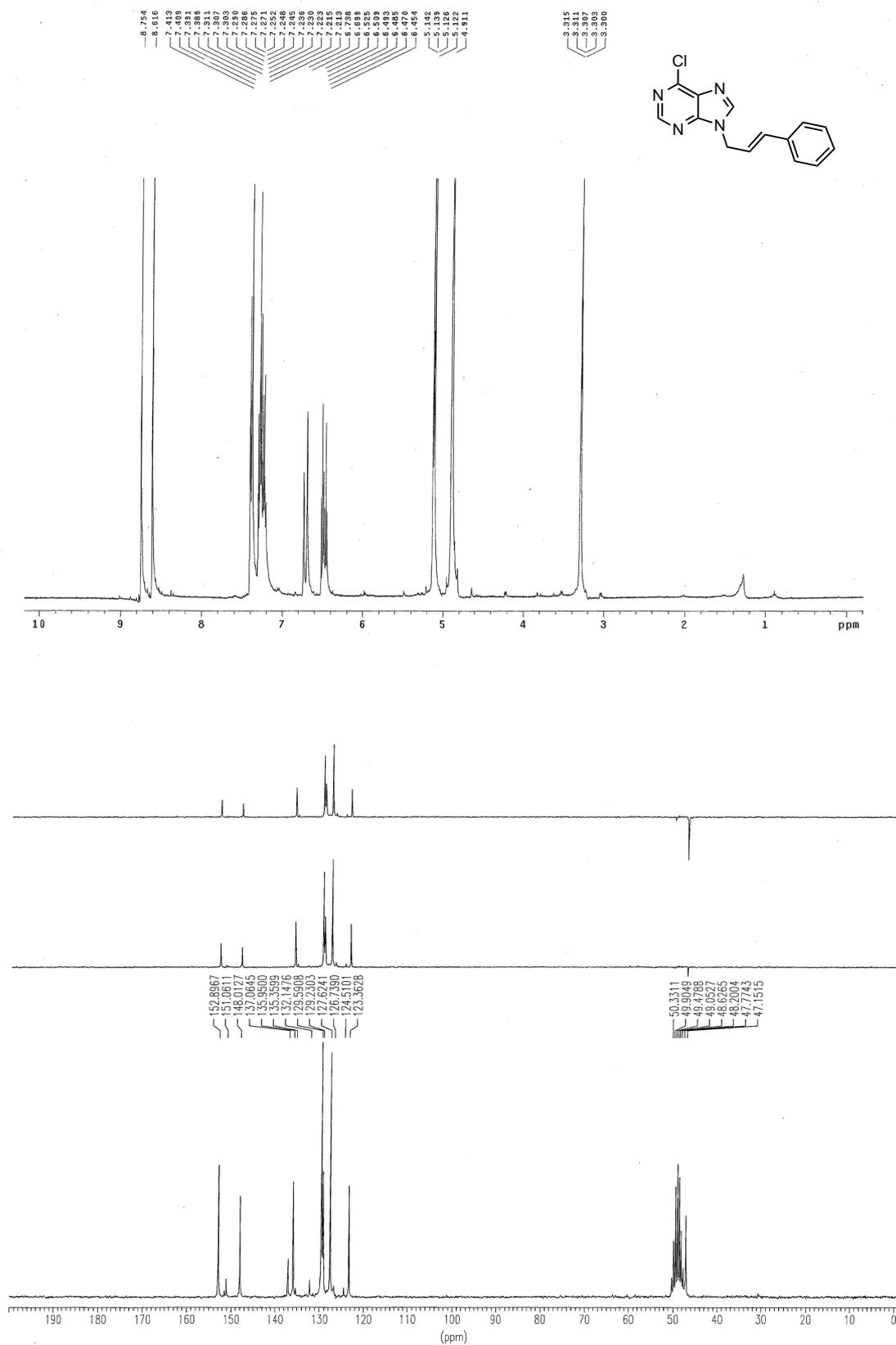


Figura 3: Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (50,3 MHz) del compuesto 3.

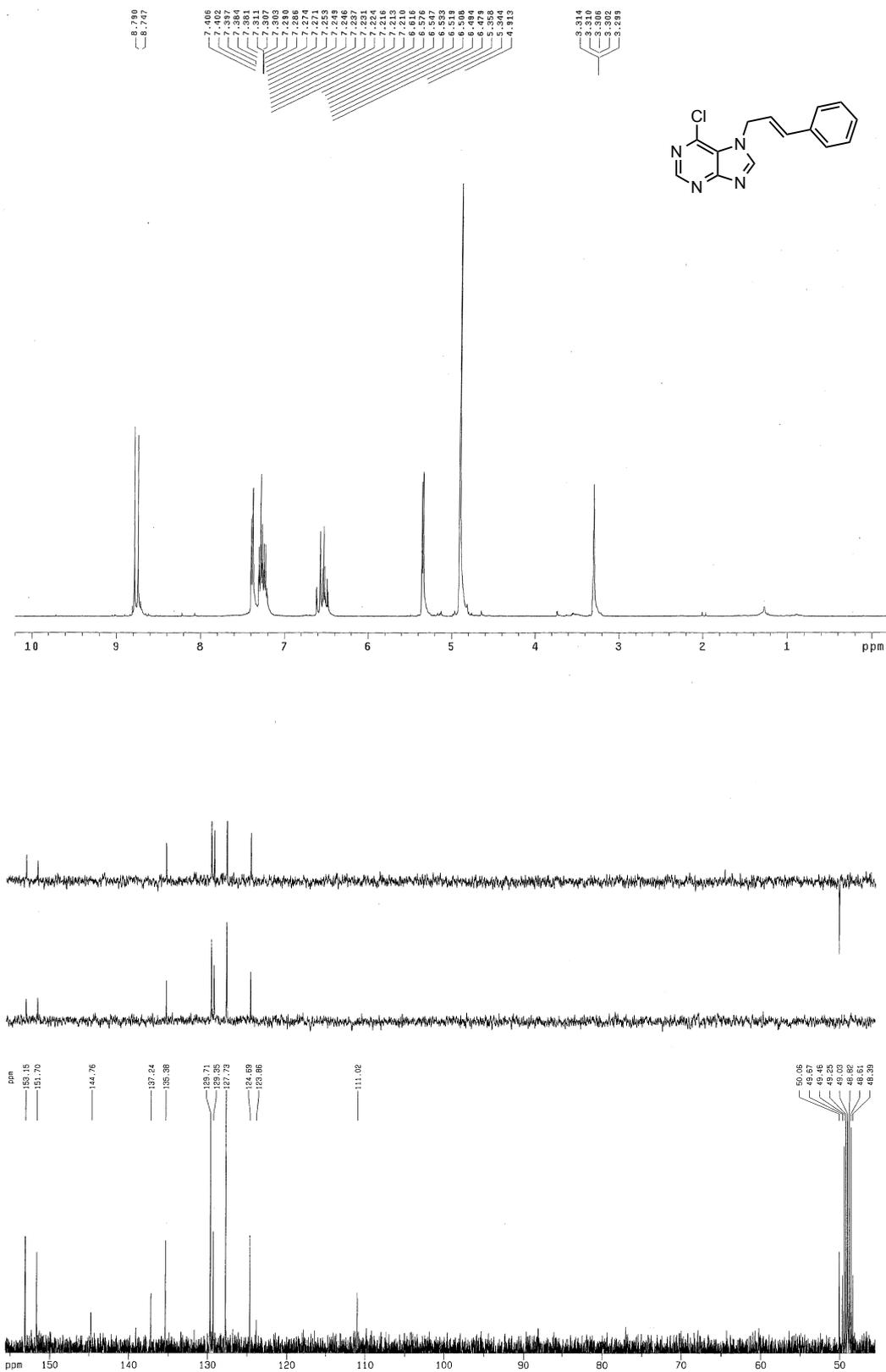


Figura 4: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 4.

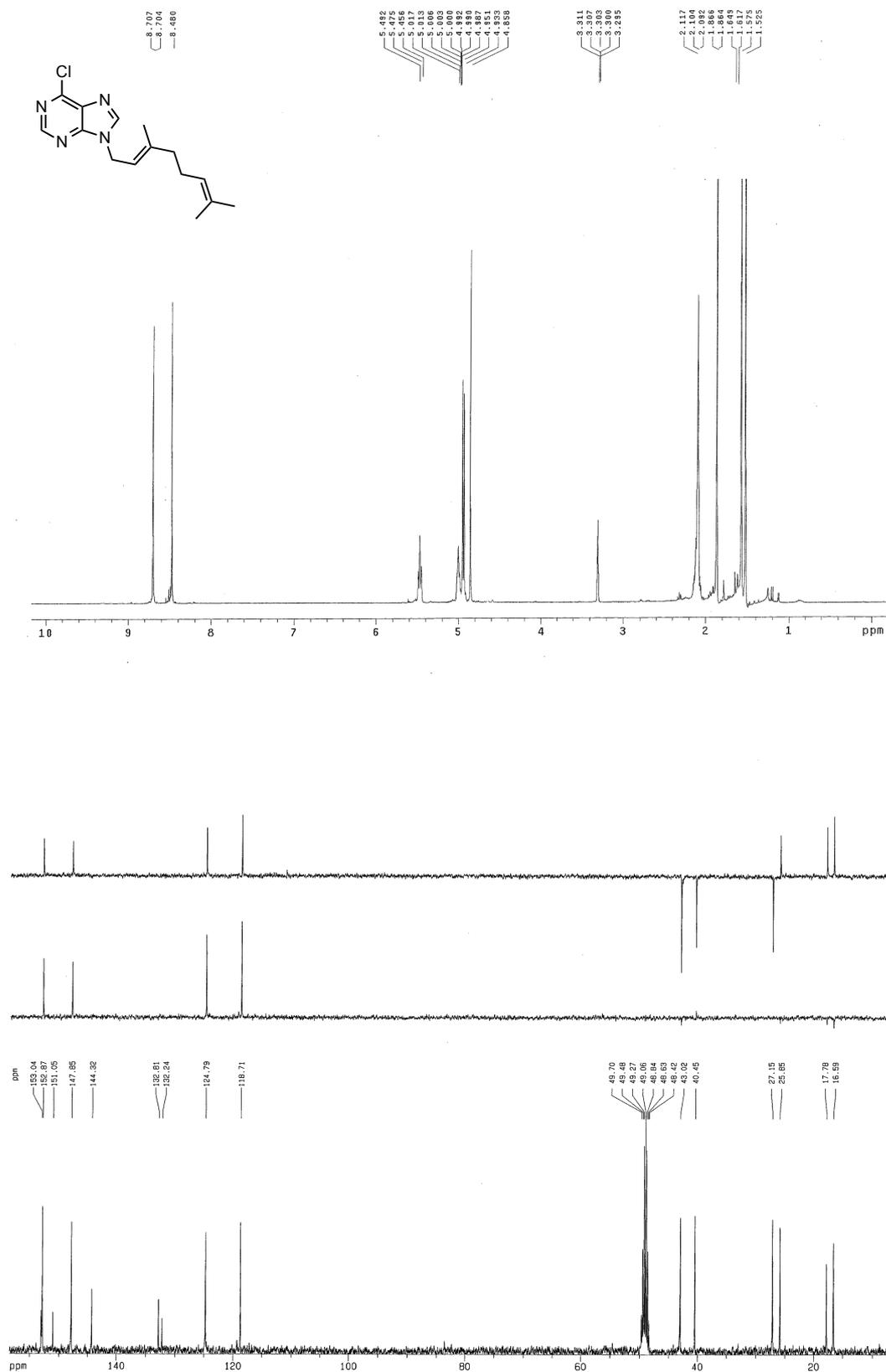


Figura 5: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 5.

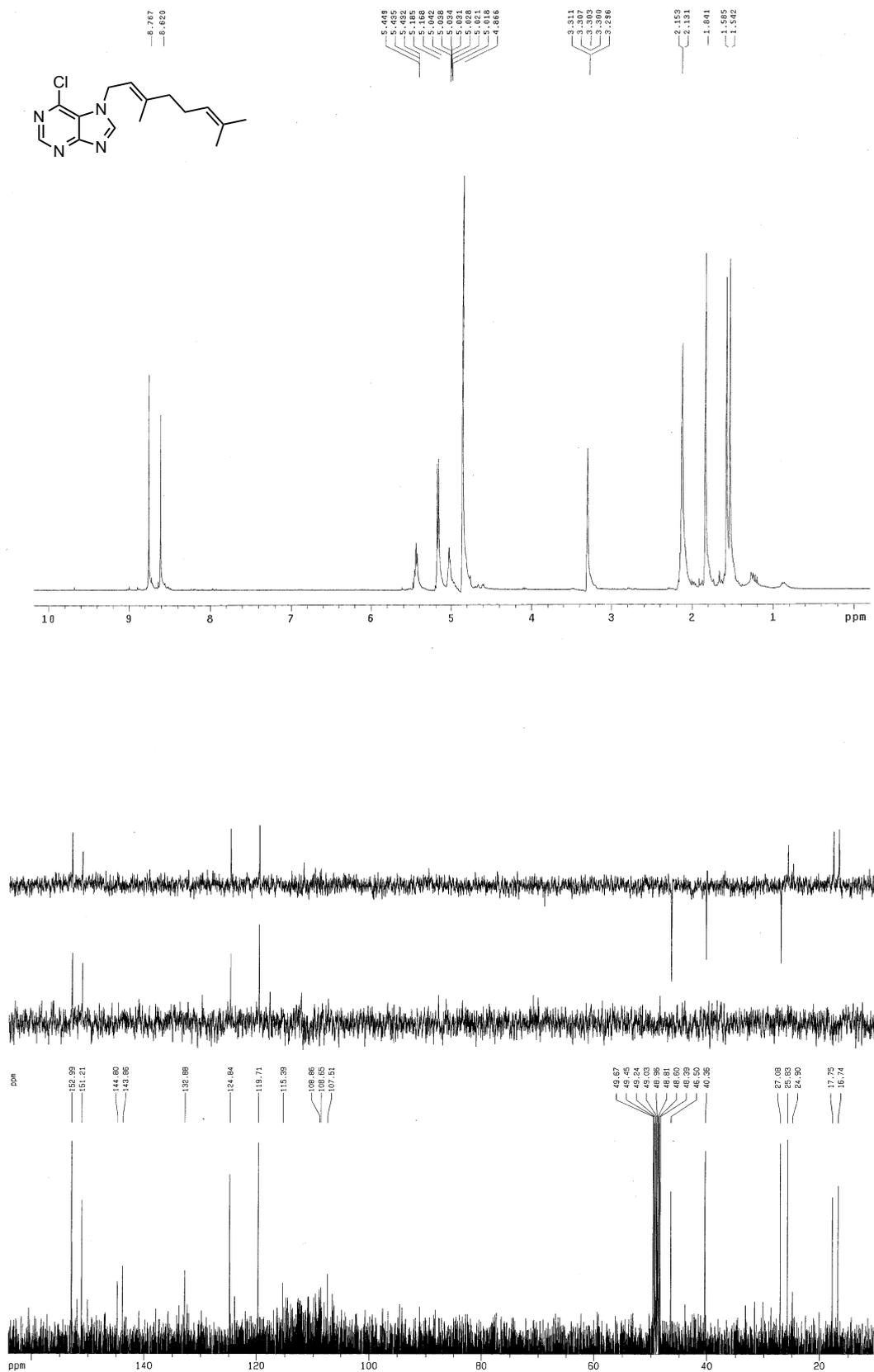


Figura 6: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 6.

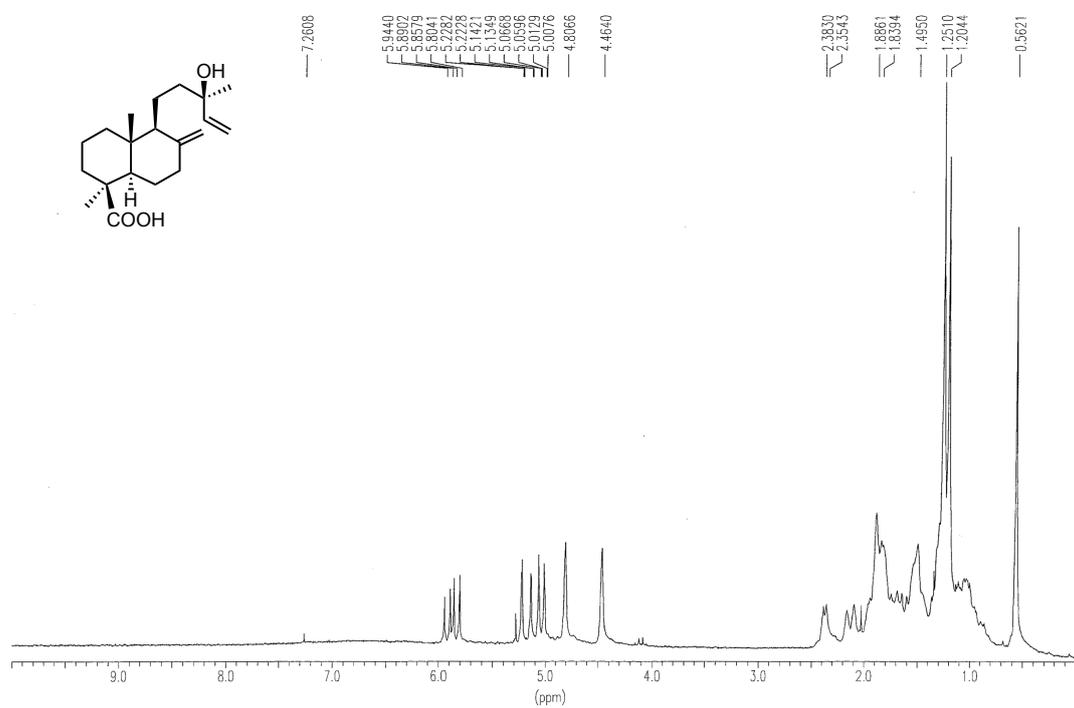


Figura 7: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) del compuesto 7. Realizado en CDCl_3 .

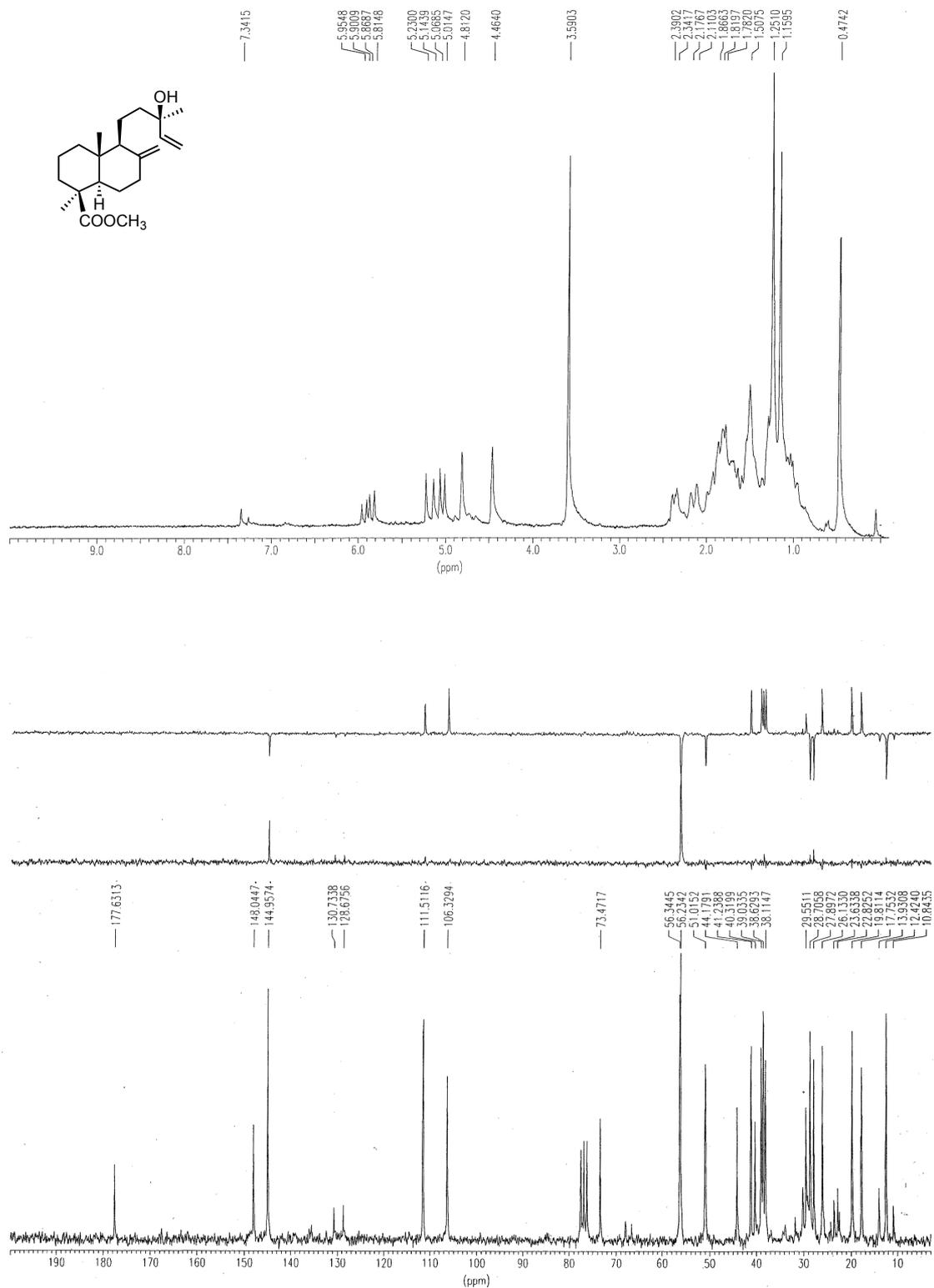


Figura 8: Espectros de RMN de ¹H (200 MHz) y ¹³C (50,3 MHz) del compuesto **8**.

Realizados en CDCl₃.

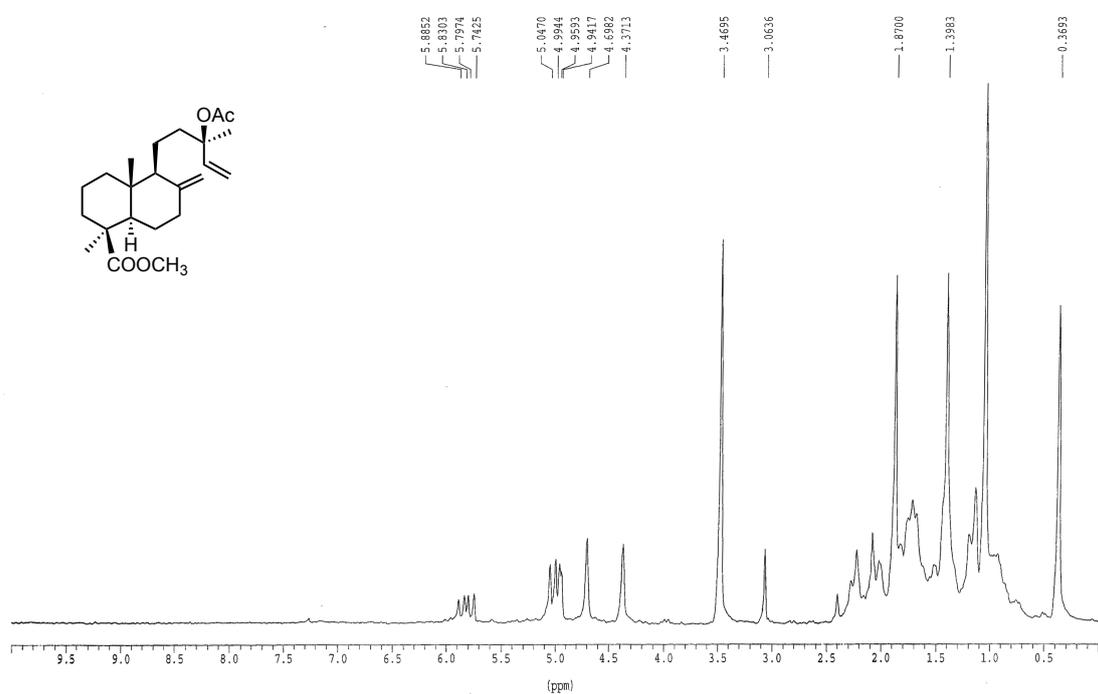


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) del compuesto **9**. Realizado en CDCl_3 .

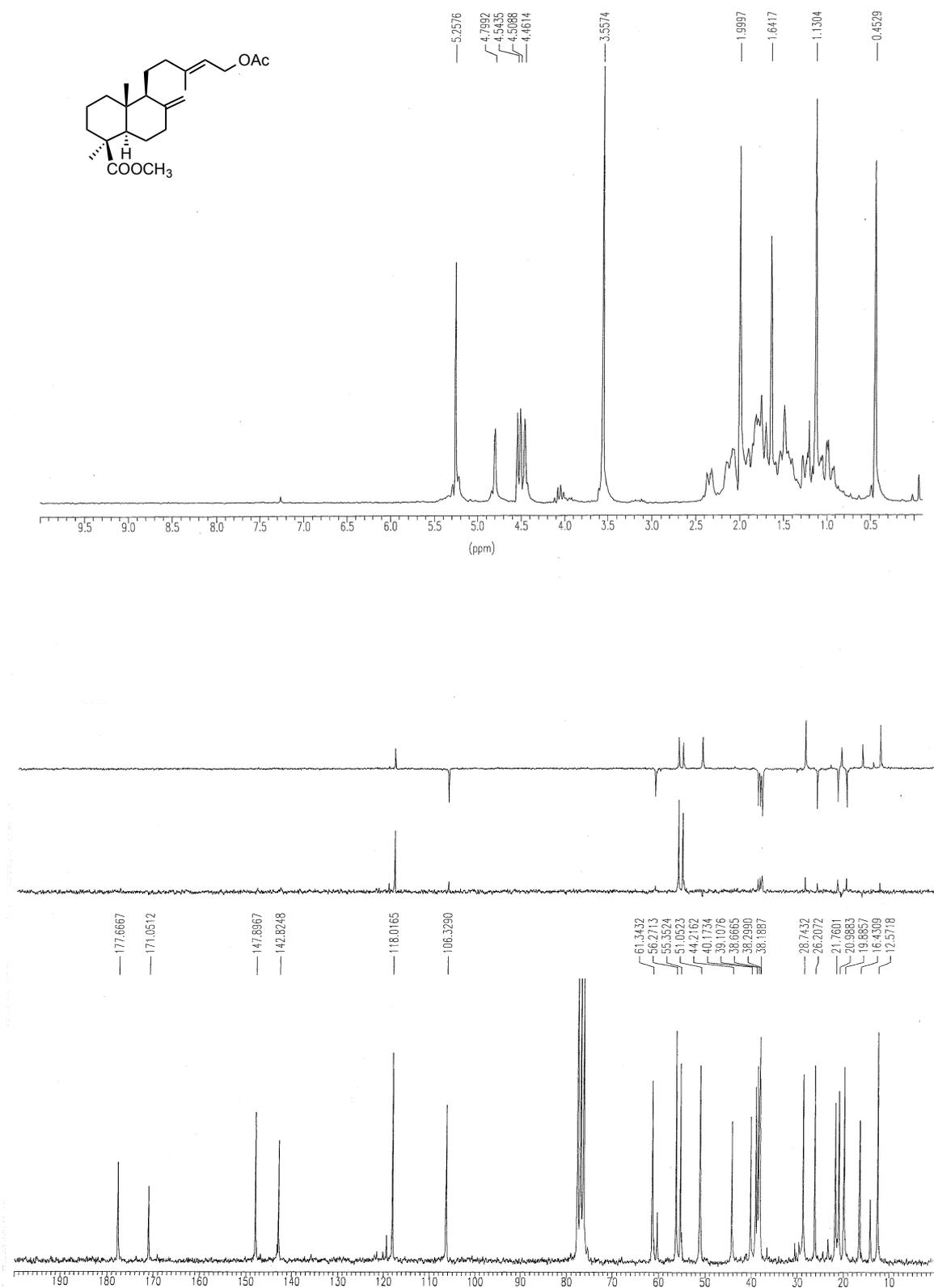


Figura 10: Espectros de RMN de ^1H (200 MHz) y ^{13}C (50,3 MHz) del compuesto **10**.
Realizados en CDCl_3 .

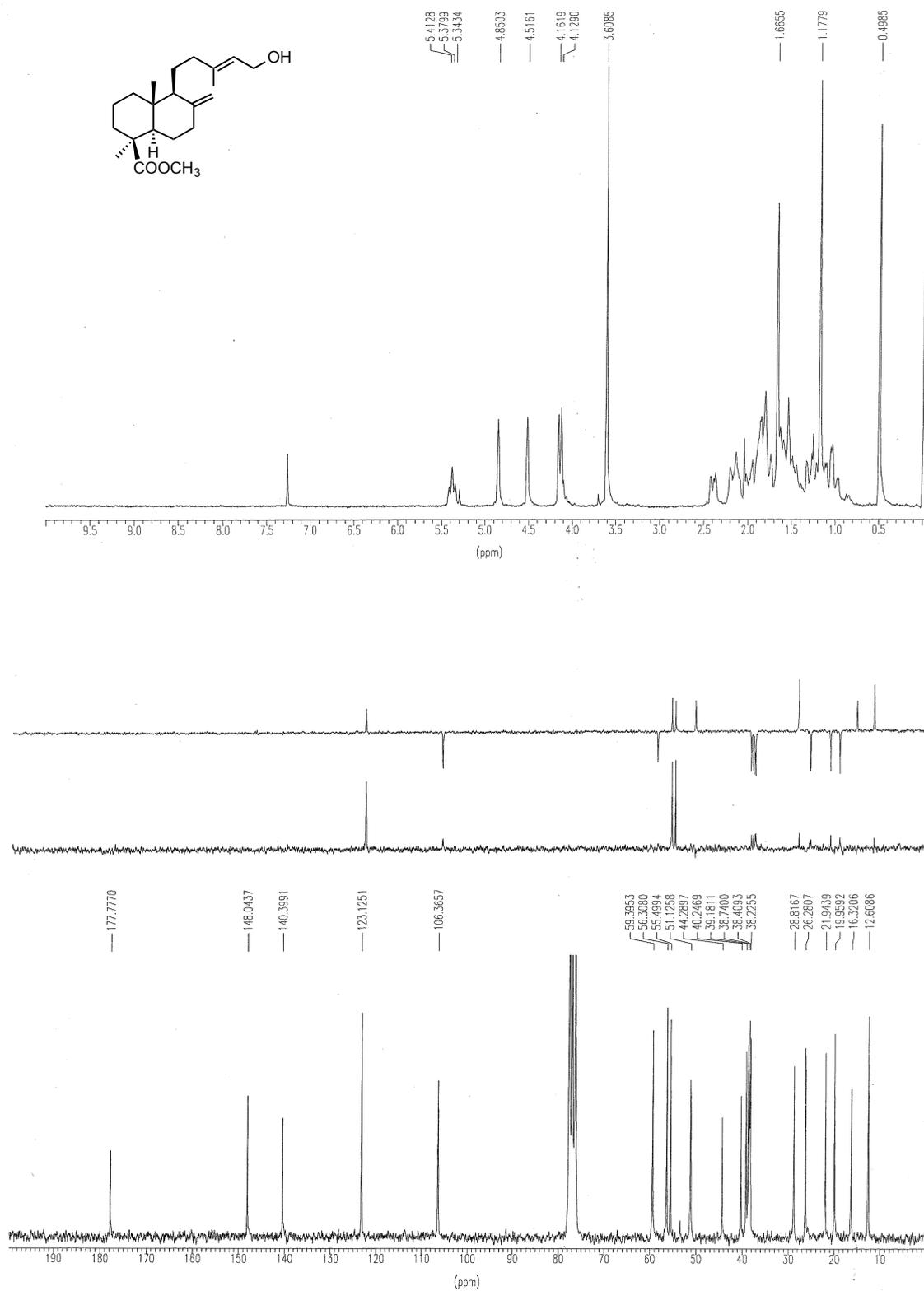


Figura 11: Espectros de RMN de ¹H (200 MHz) y ¹³C (50,3 MHz) del compuesto 11. Realizados en CDCl₃.

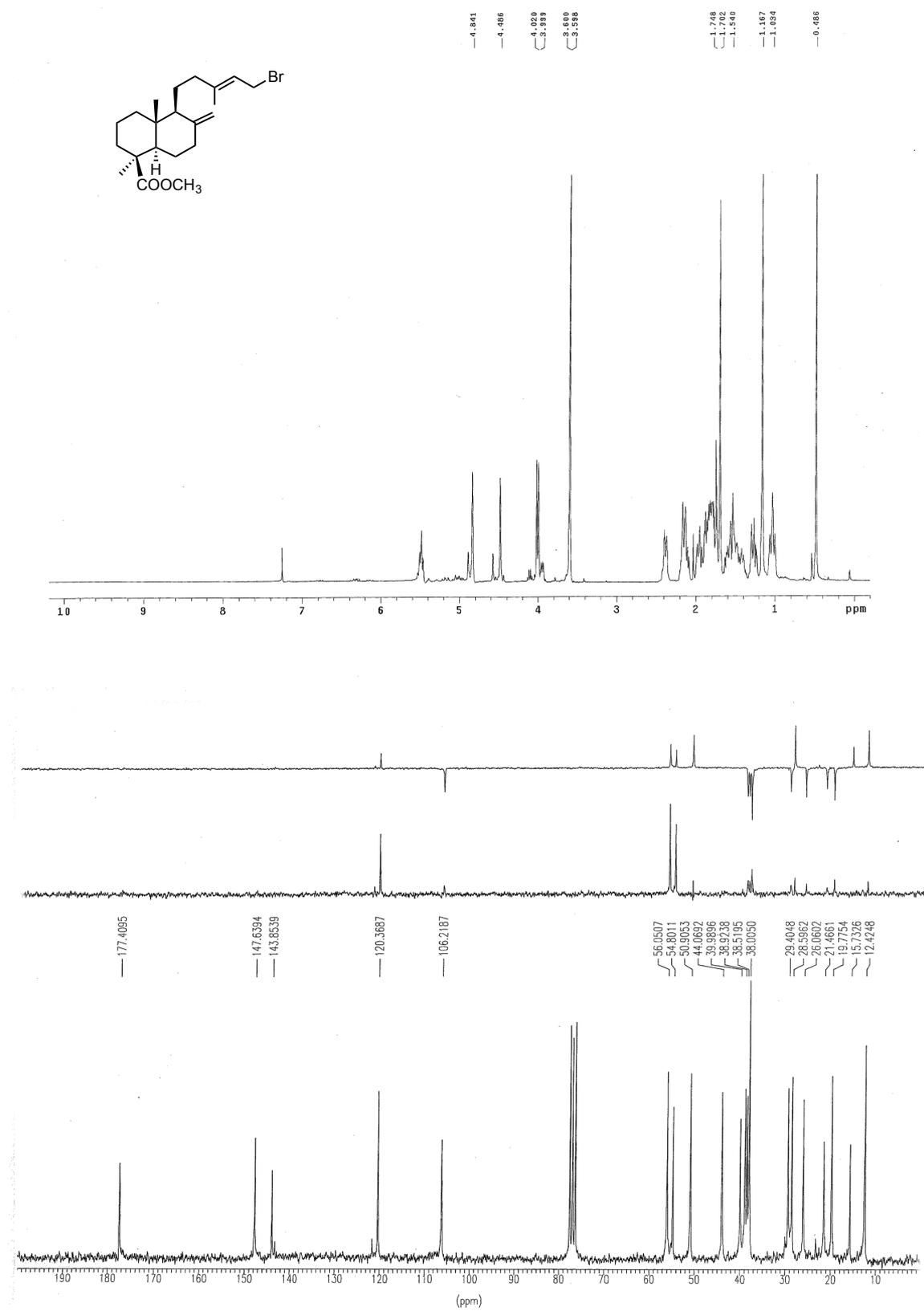


Figura 12: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C (50,3 MHz) del compuesto 12.

Realizados en CDCl₃.

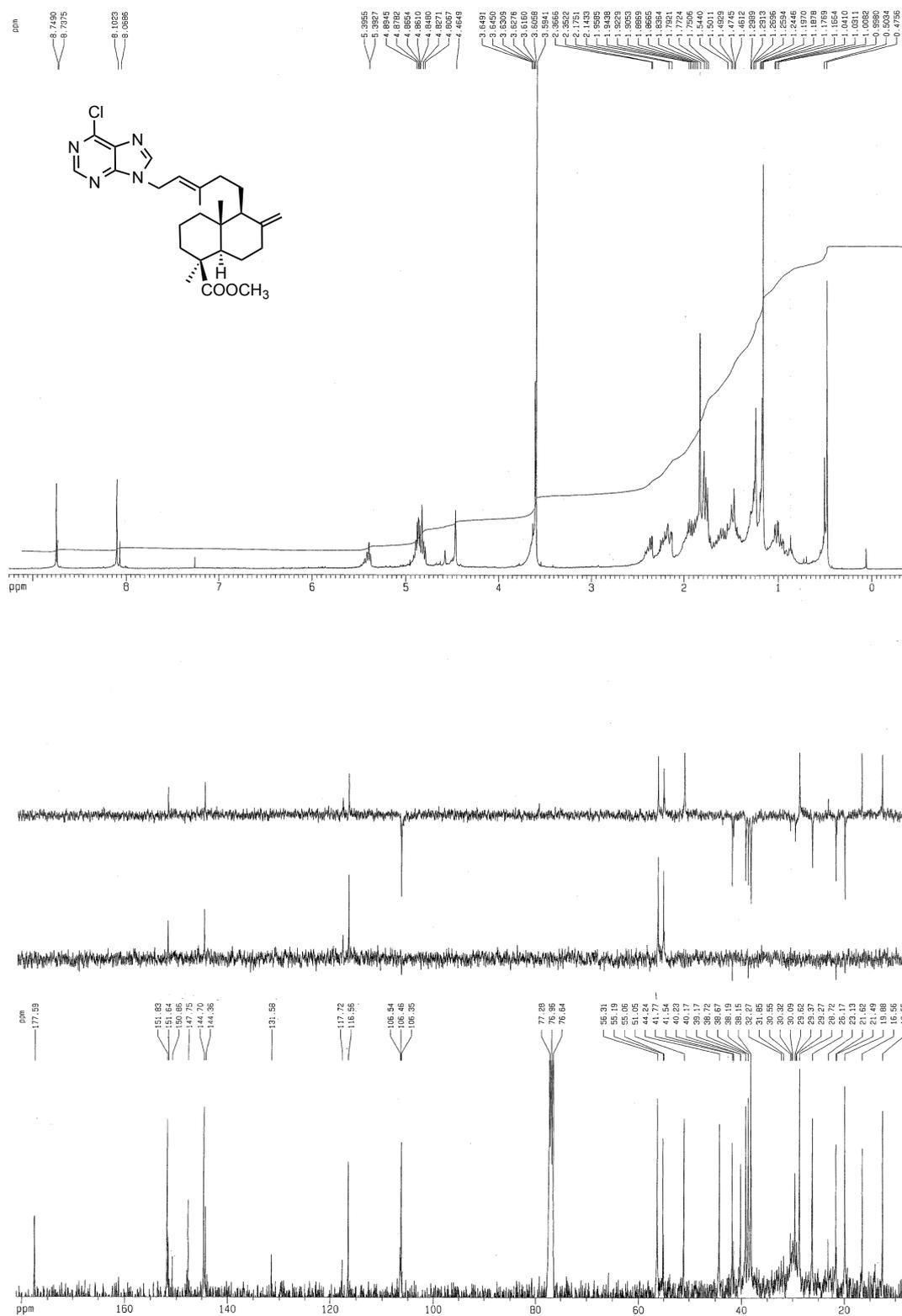


Figura 13: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 13. Realizados en CDCl₃.

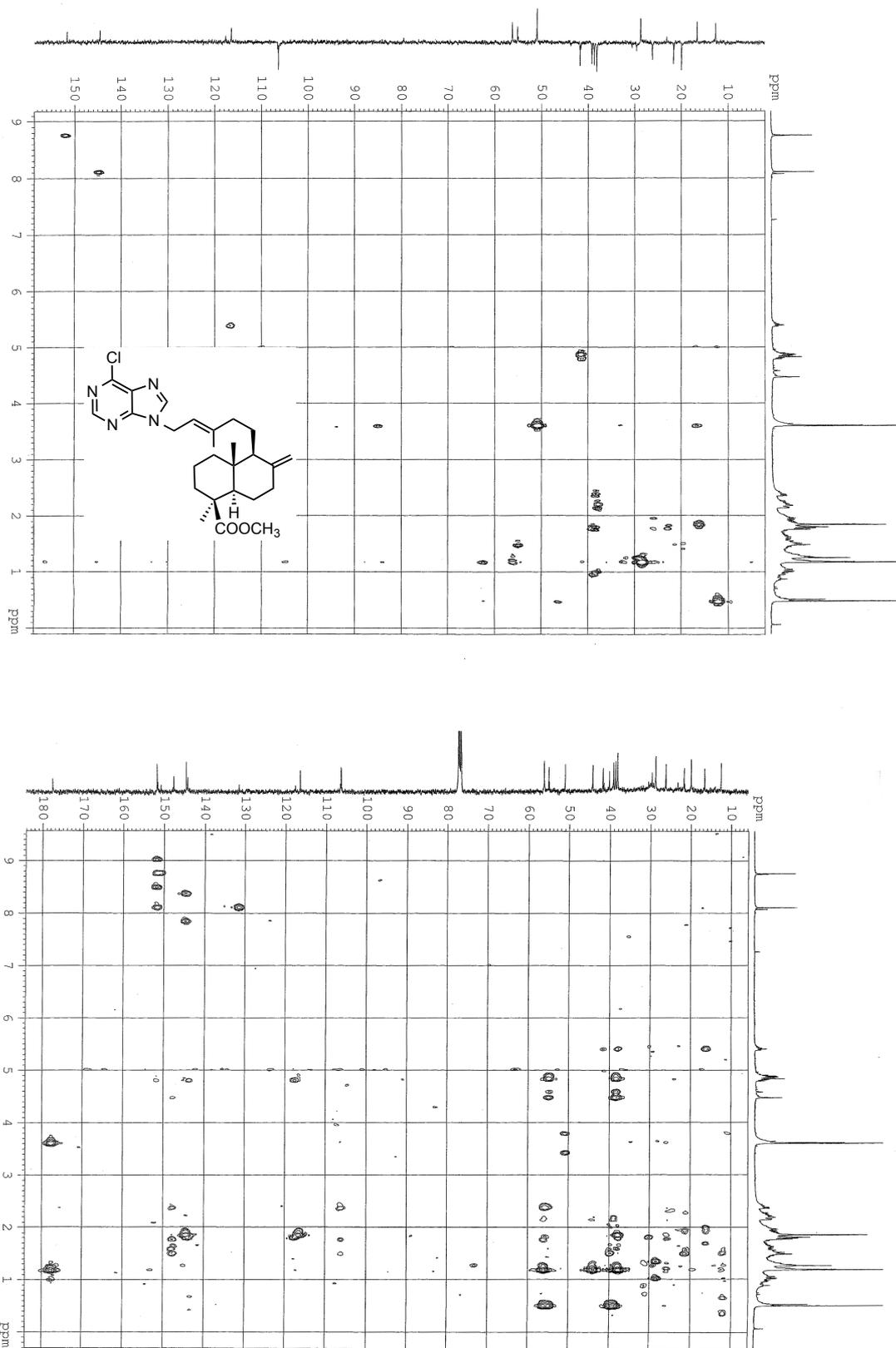


Figura 14: Espectros HMQC y HMBC del compuesto 13. Realizados en CDCl₃.

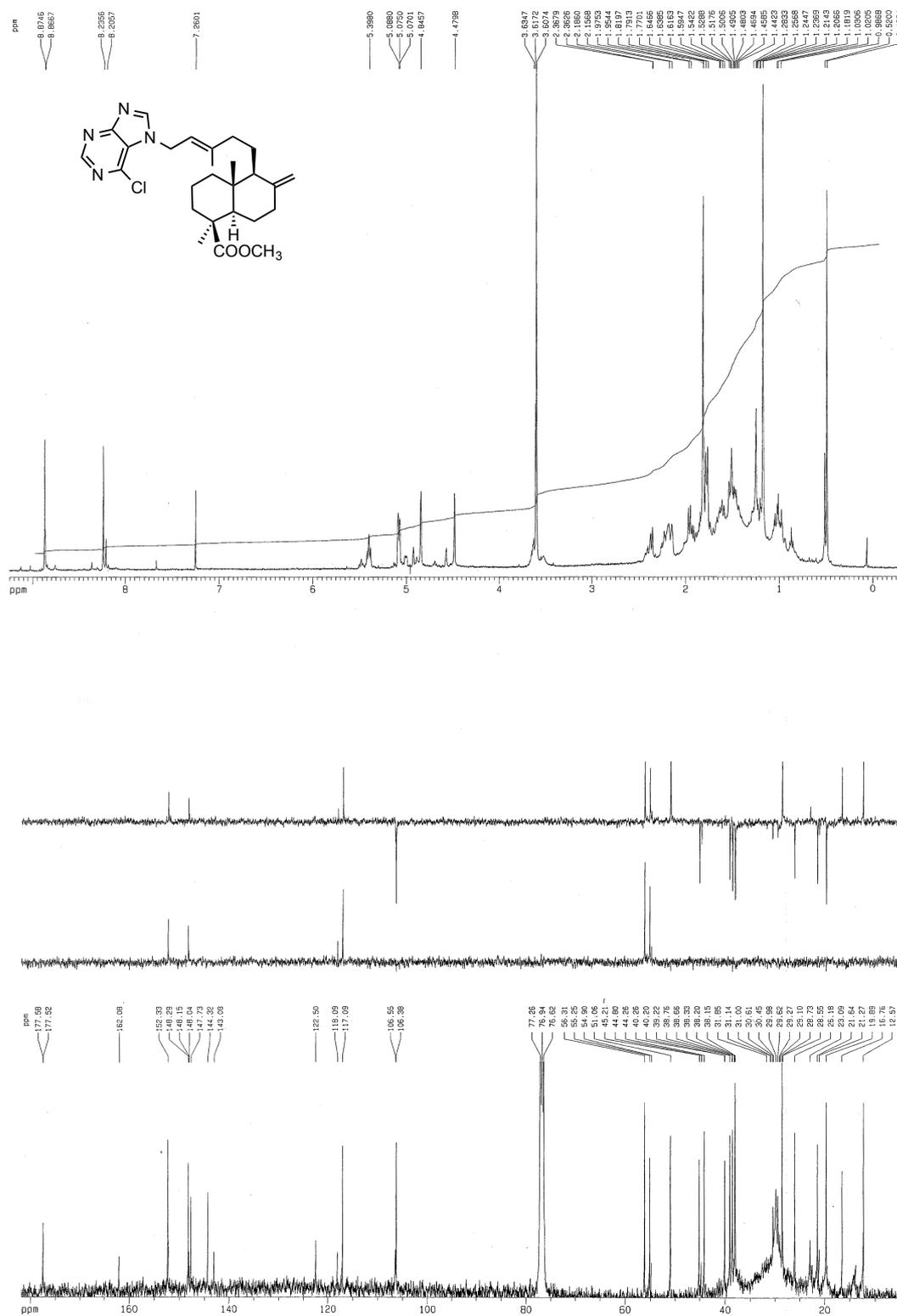


Figura 15: Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 14. Realizados en CDCl_3 .

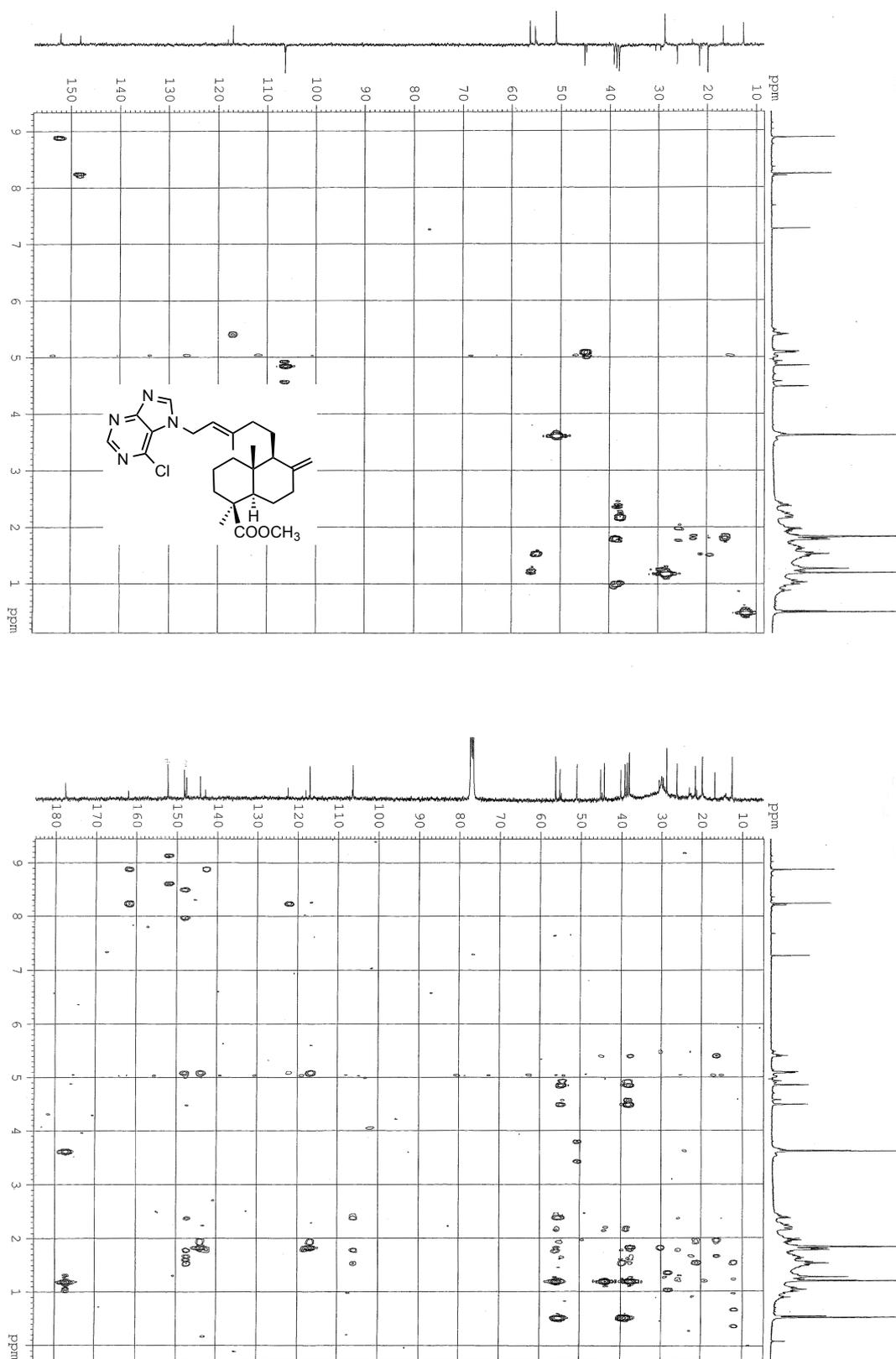


Figura 16: Espectros HMQC y HMBC del compuesto 14. Realizados en CDCl₃.

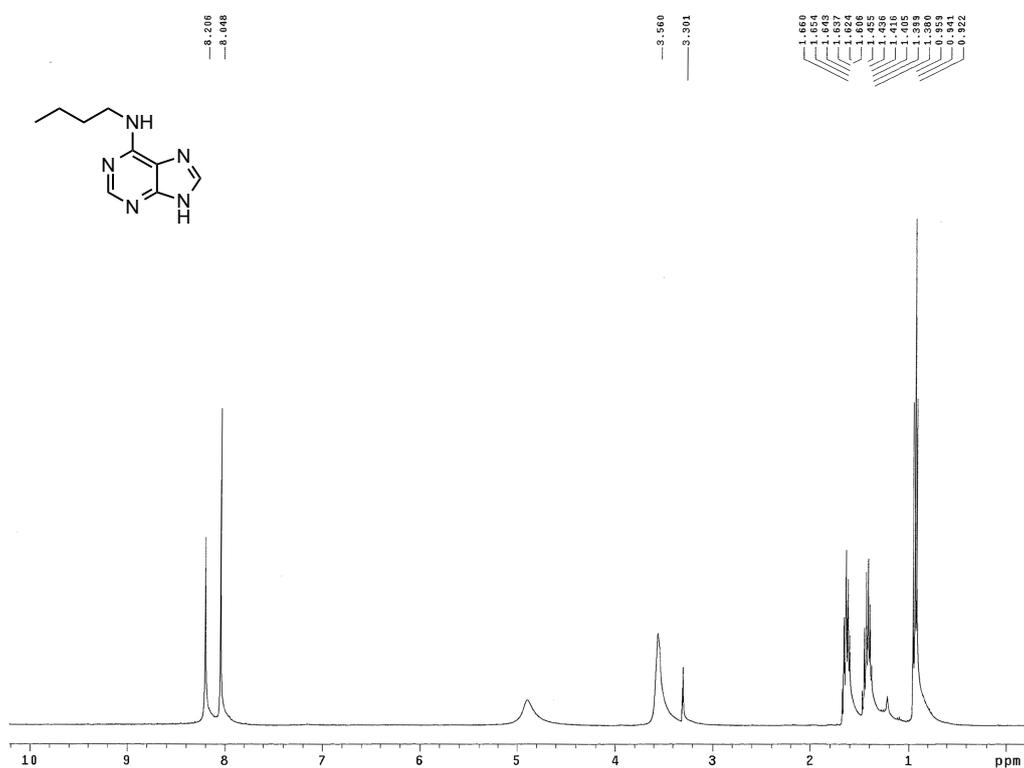


Figura 17: Espectro de RMN de ¹H del compuesto 15.

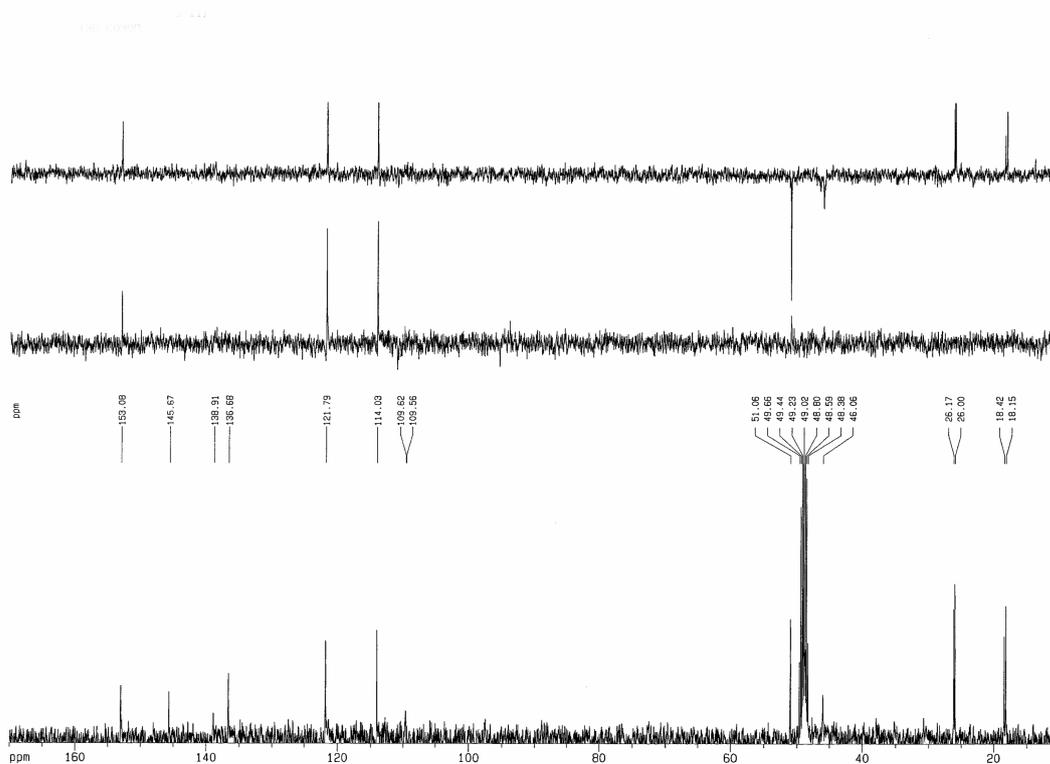
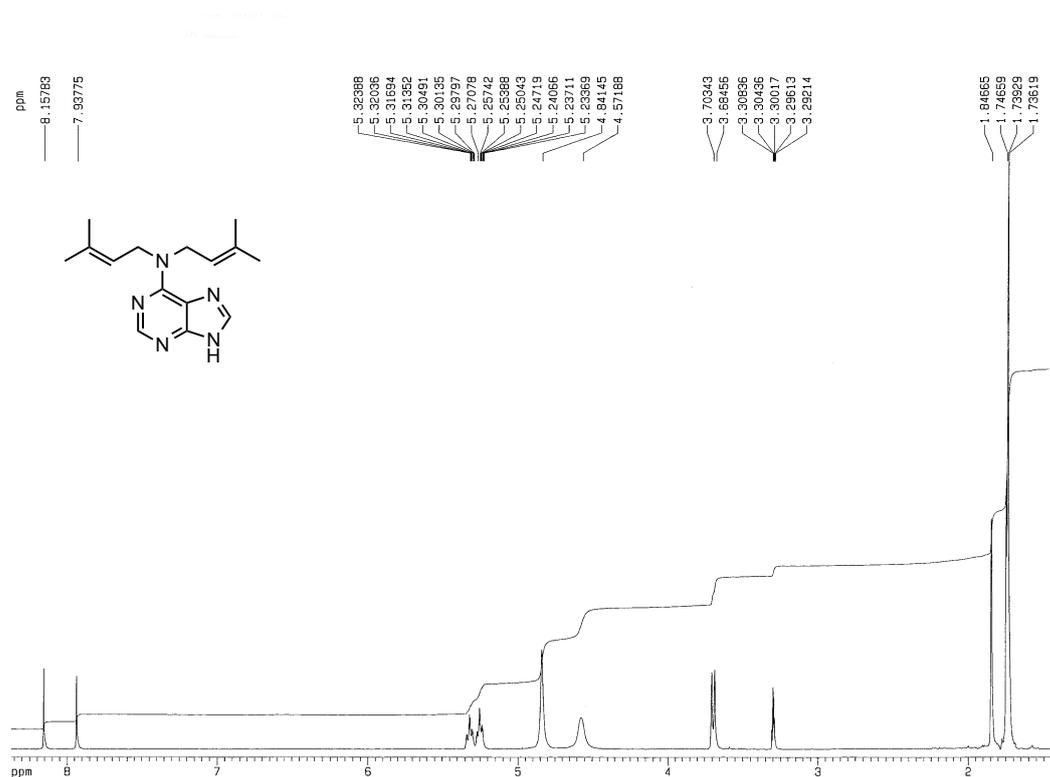


Figura 18: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 19.

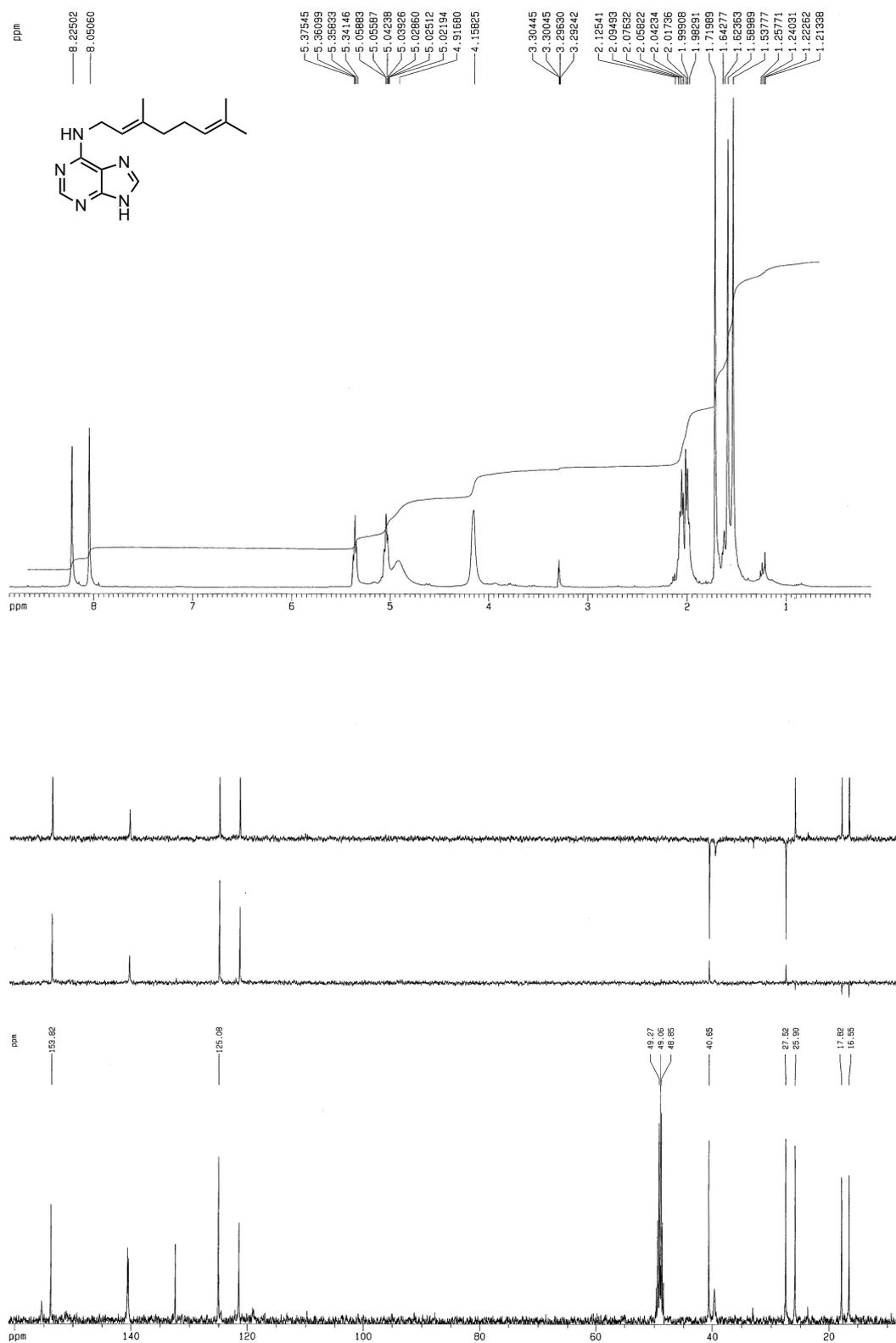


Figura 19: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 21.

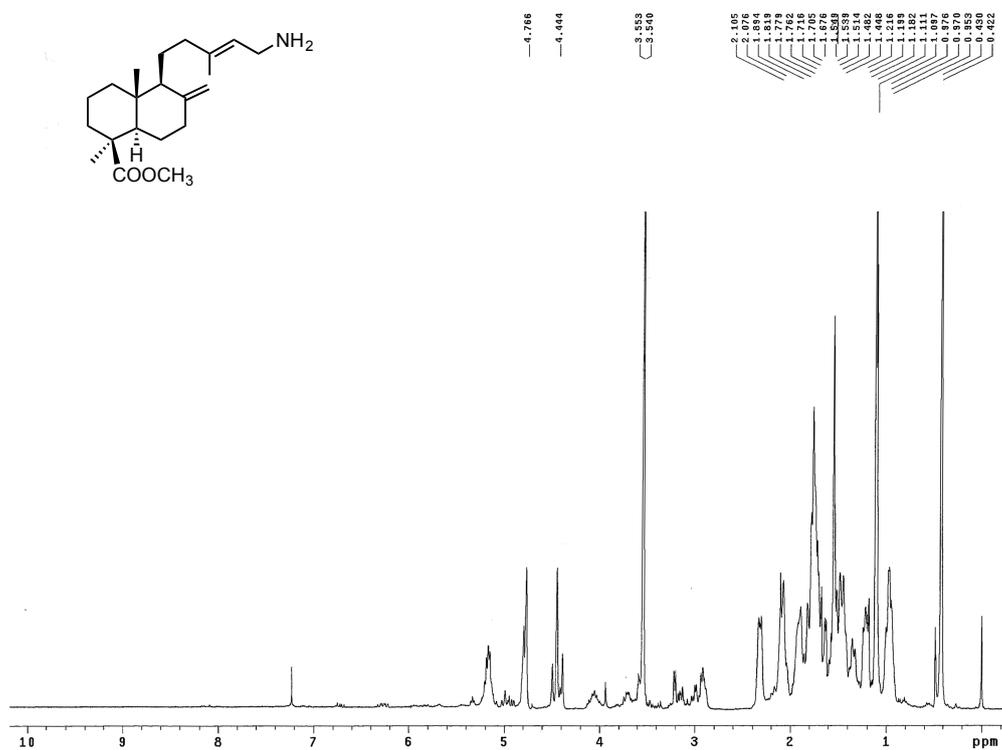


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H del compuesto 22. Realizado en CDCl_3 .

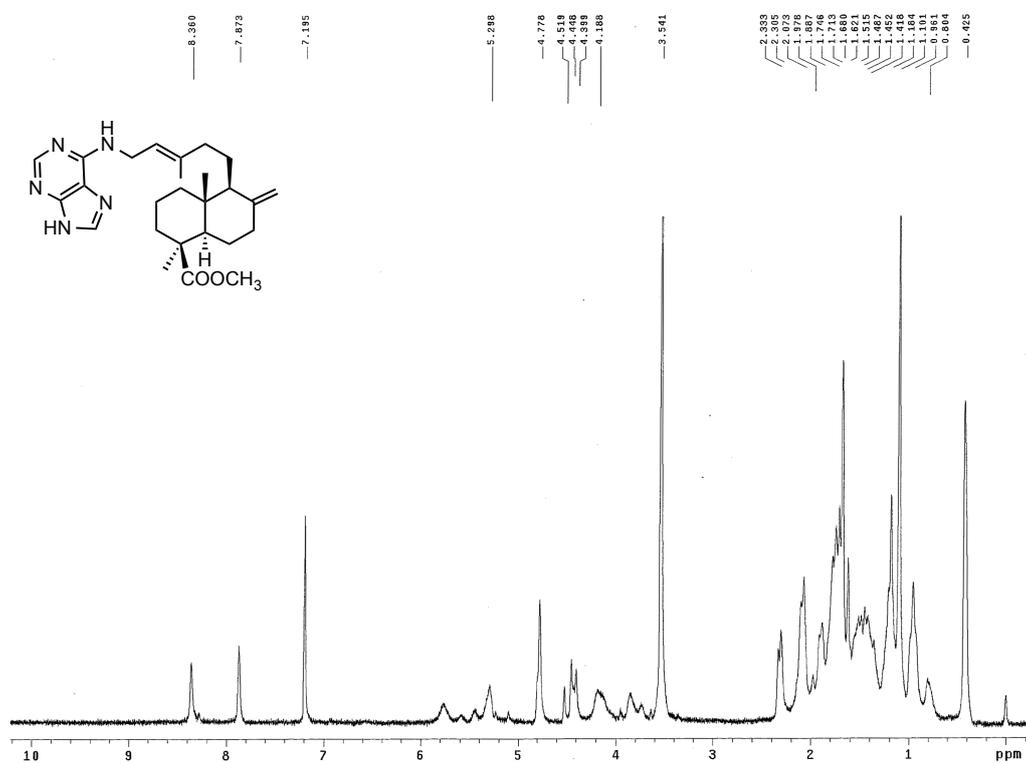


Figura 21: Espectro de RMN de ¹H del compuesto **23**. Realizado en CDCl₃.

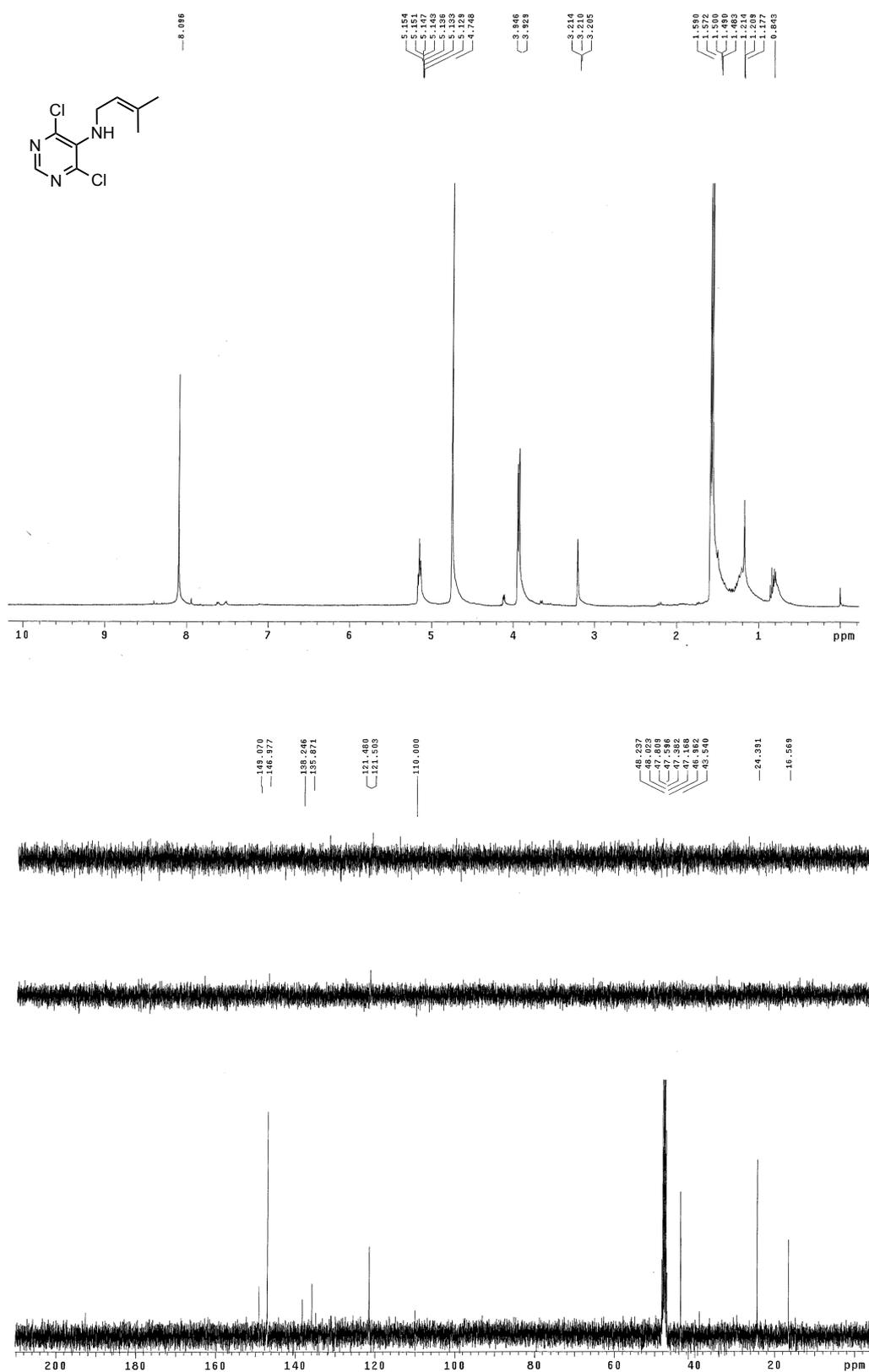


Figura 22: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 25.

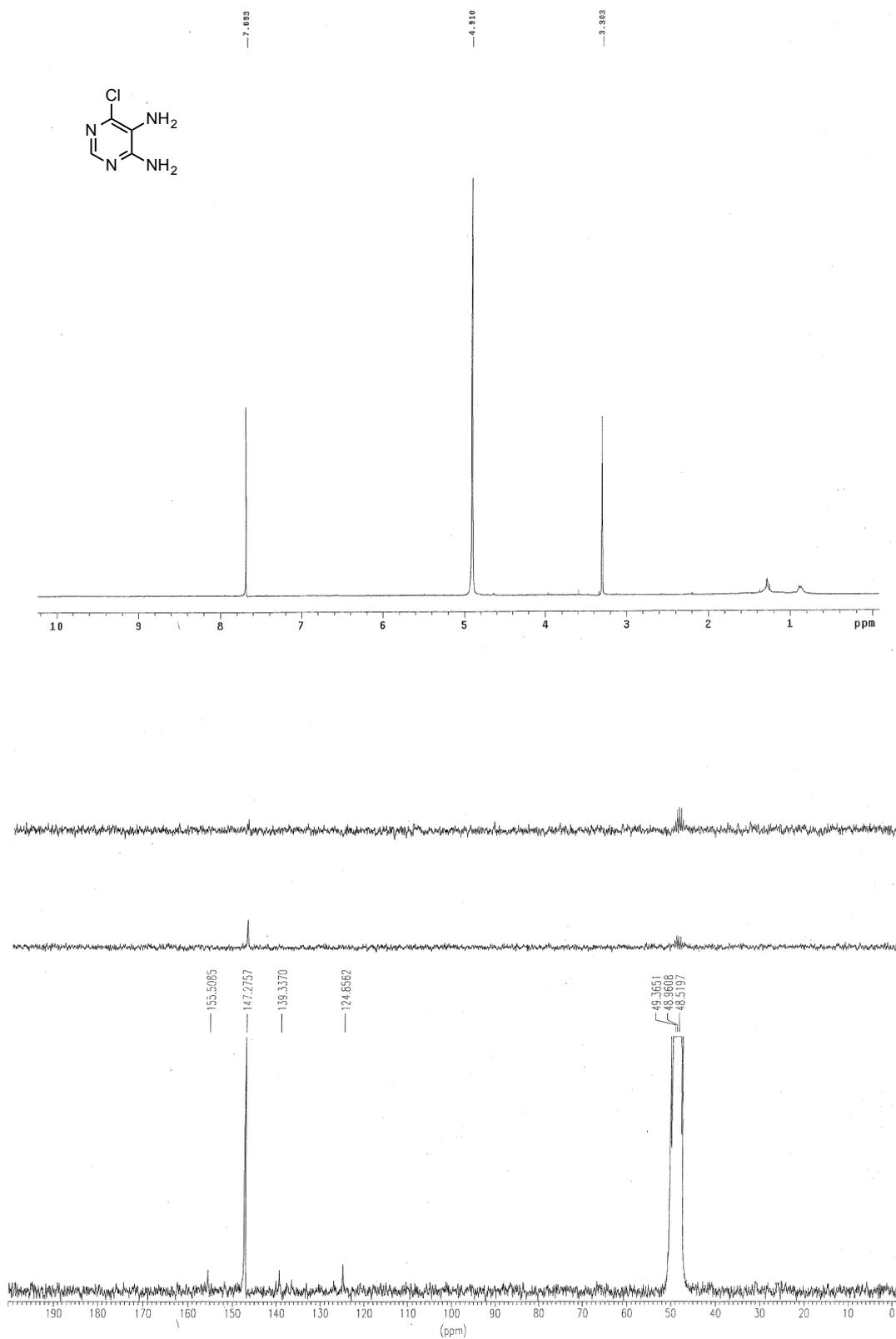


Figura 23: Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (50,3 MHz) del compuesto 28.

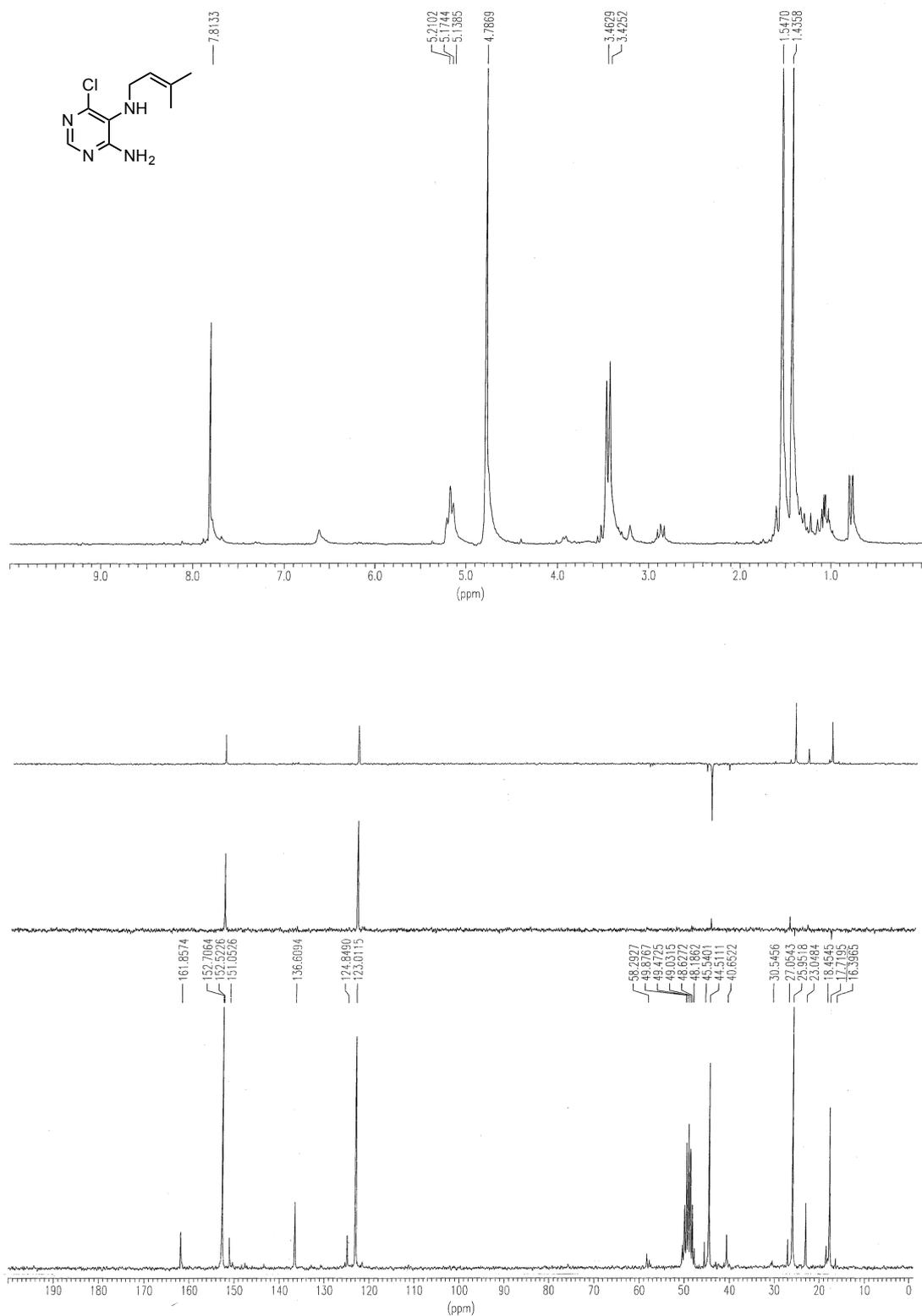
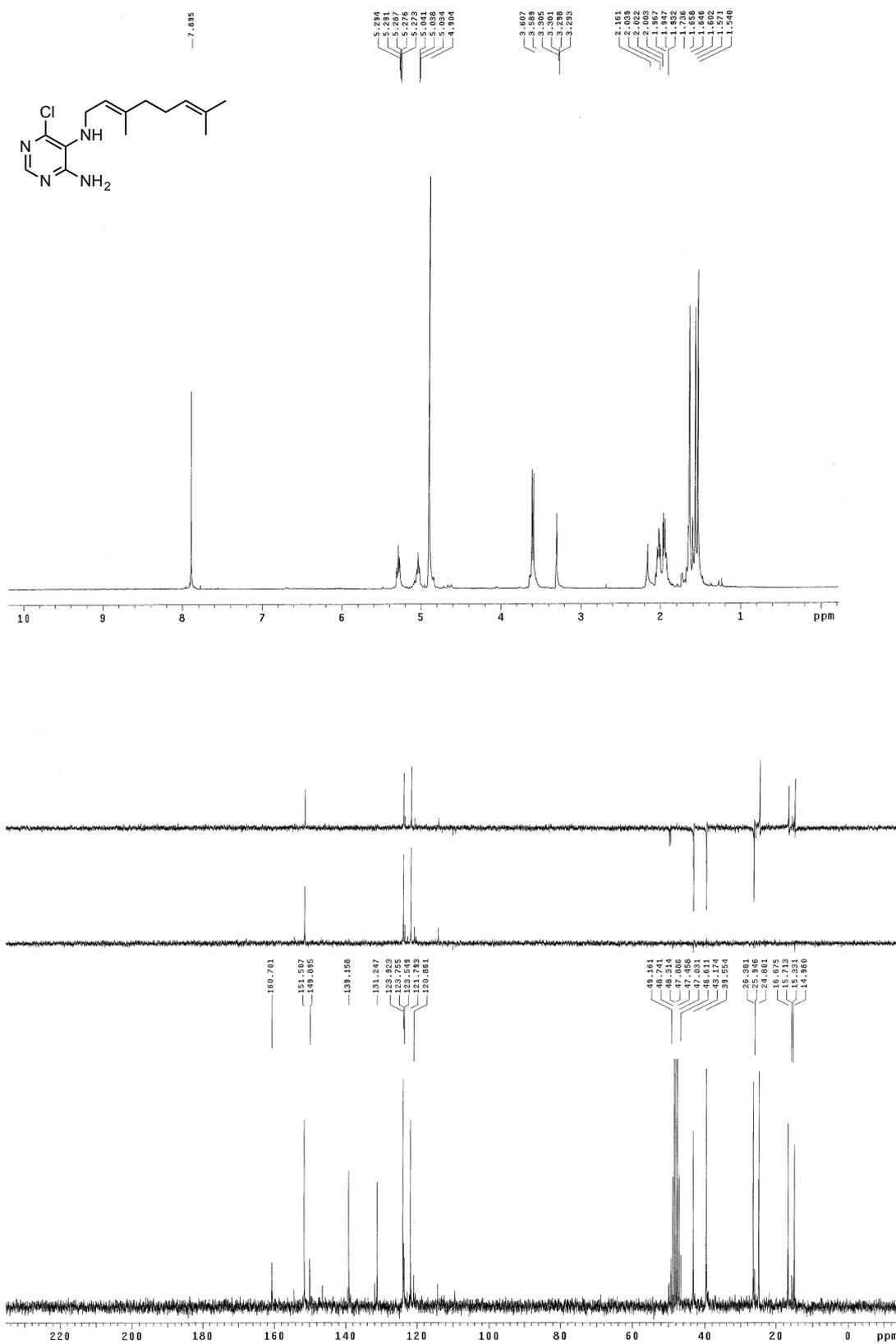


Figura 24: Espectros de RMN de ¹H (200 MHz) y ¹³C (50,3 MHz) del compuesto 29.



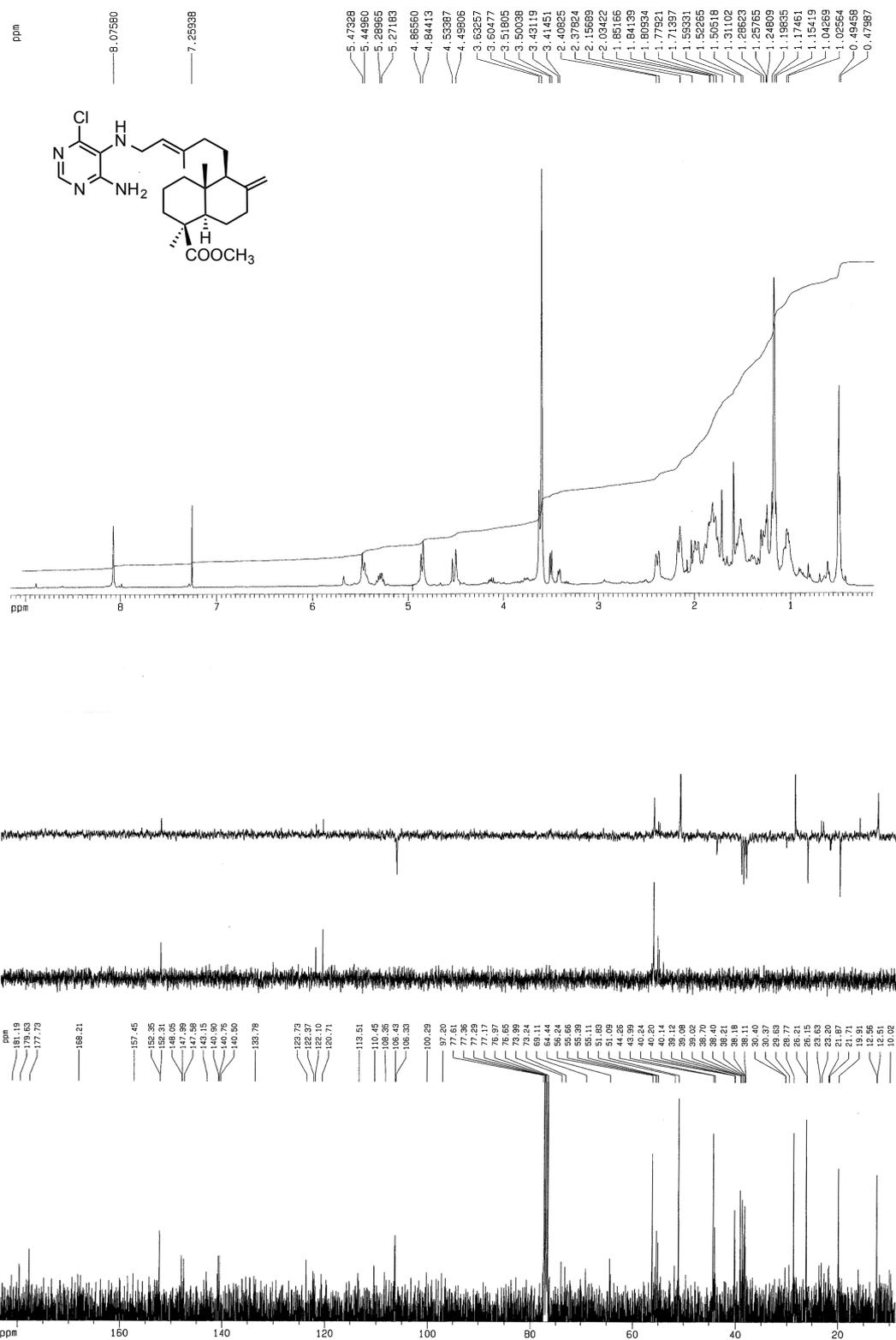


Figura 26: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 31. Realizados en CDCl₃.

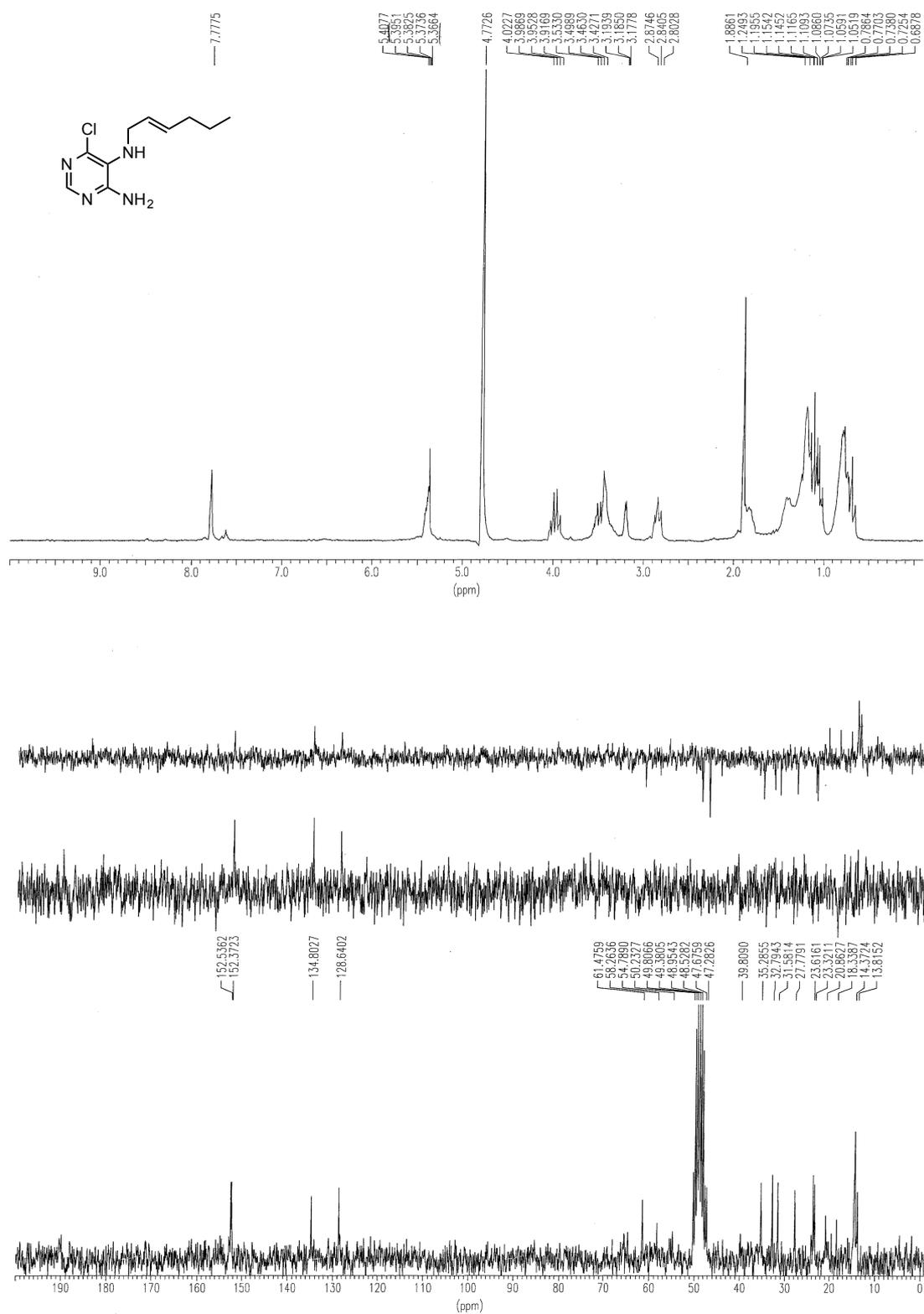


Figura 27: Espectros de RMN de ^1H (200 MHz) y ^{13}C (50,3 MHz) del compuesto 33.

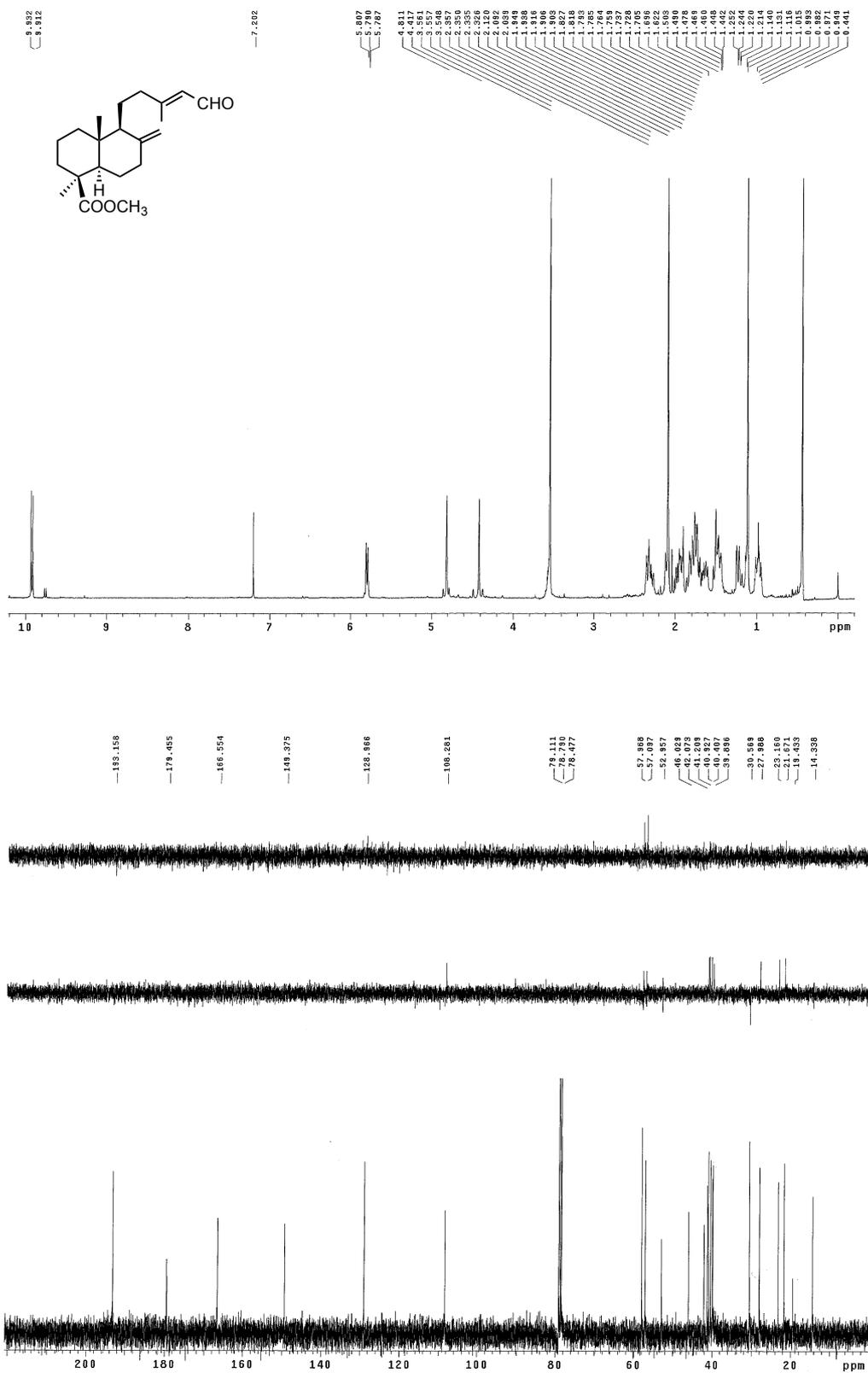


Figura 28: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 35 (E). Realizados en CDCl₃.

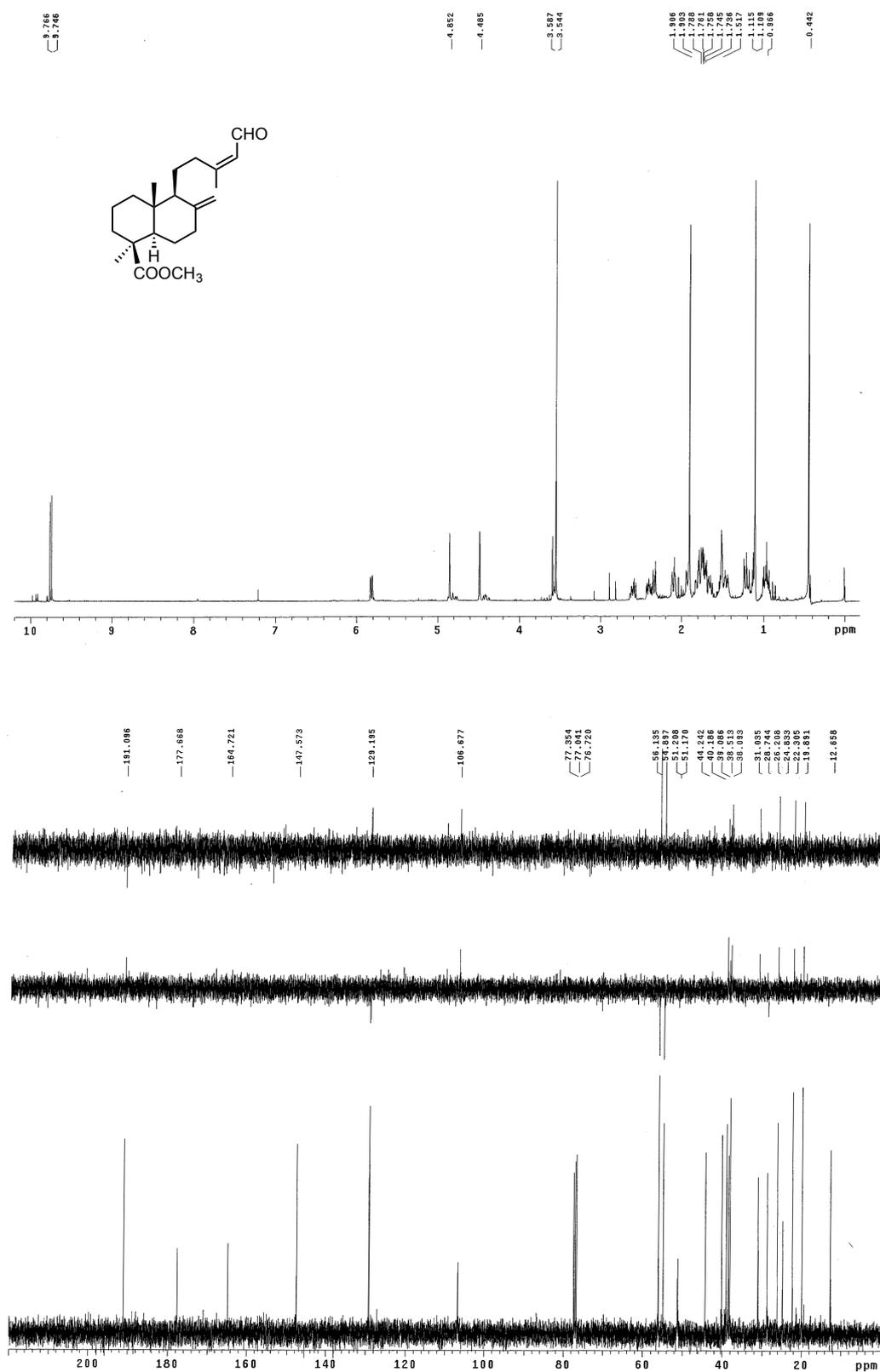


Figura 29: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 35 (Z). Realizados en CDCl₃.

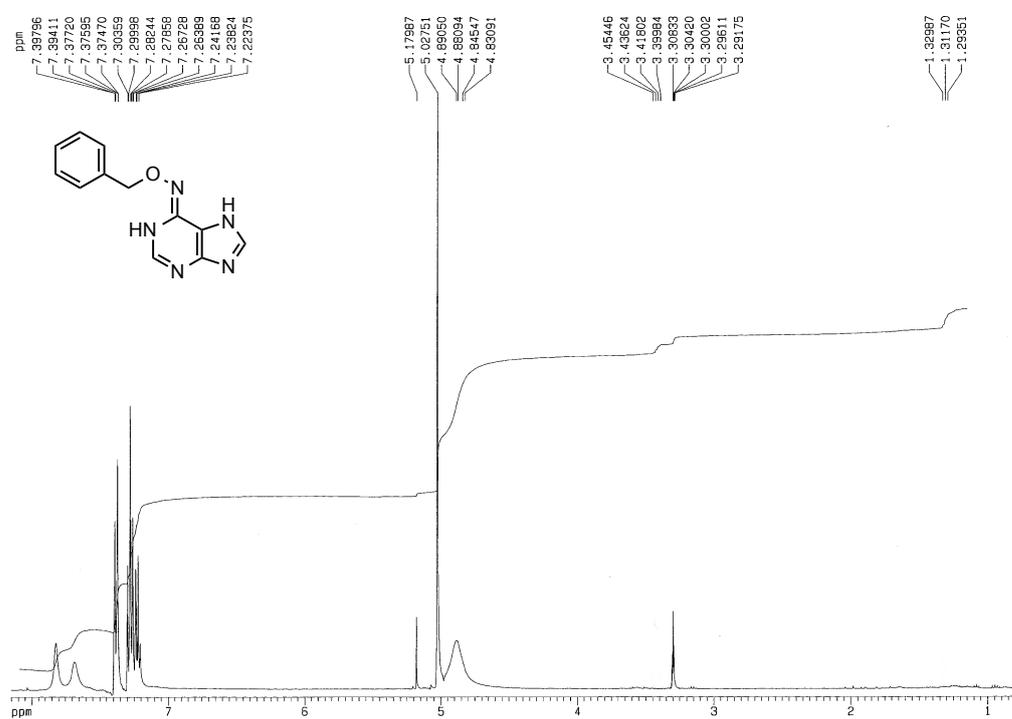


Figura 31: Espectro de RMN de ^1H del compuesto 38.

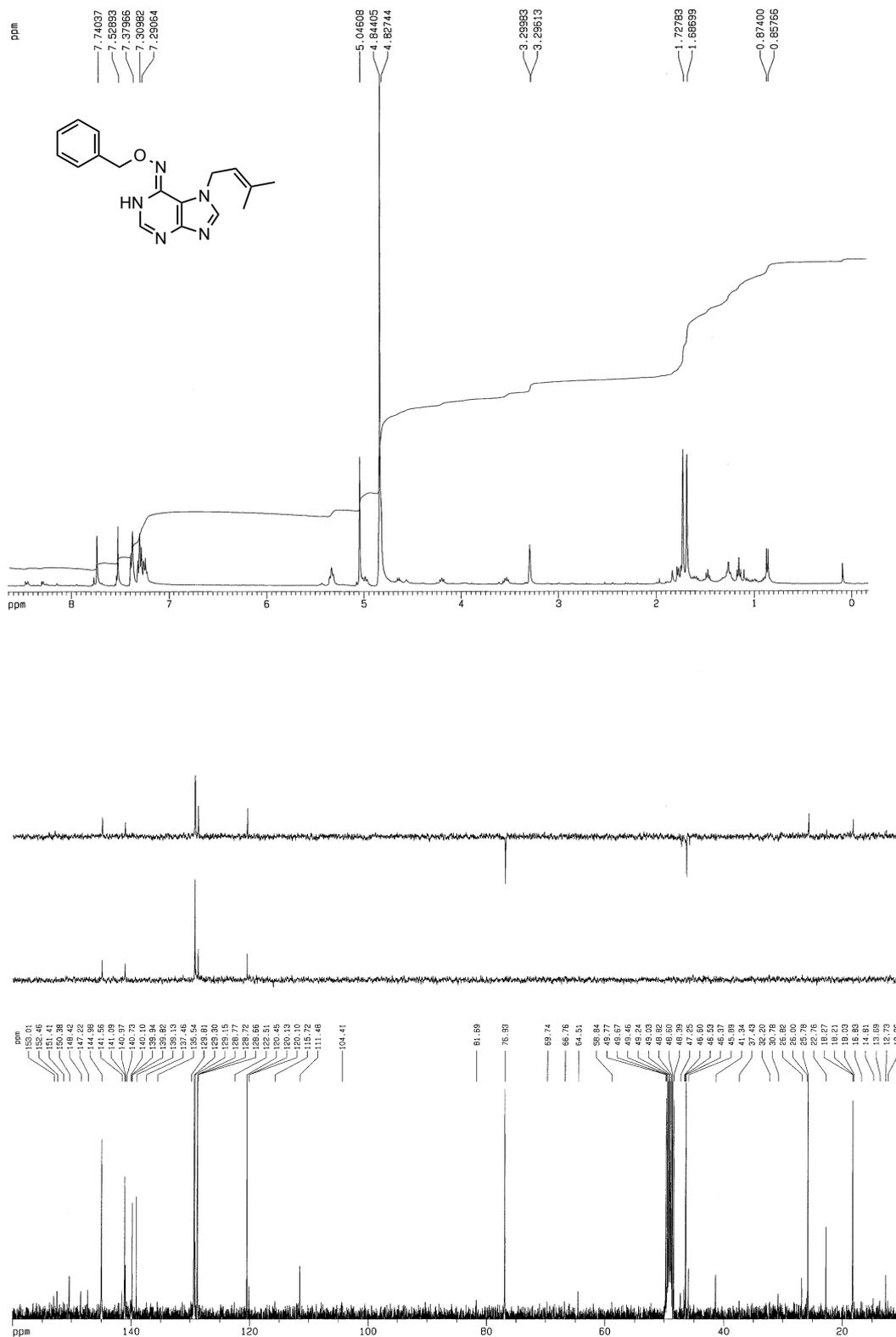


Figura 32: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 39

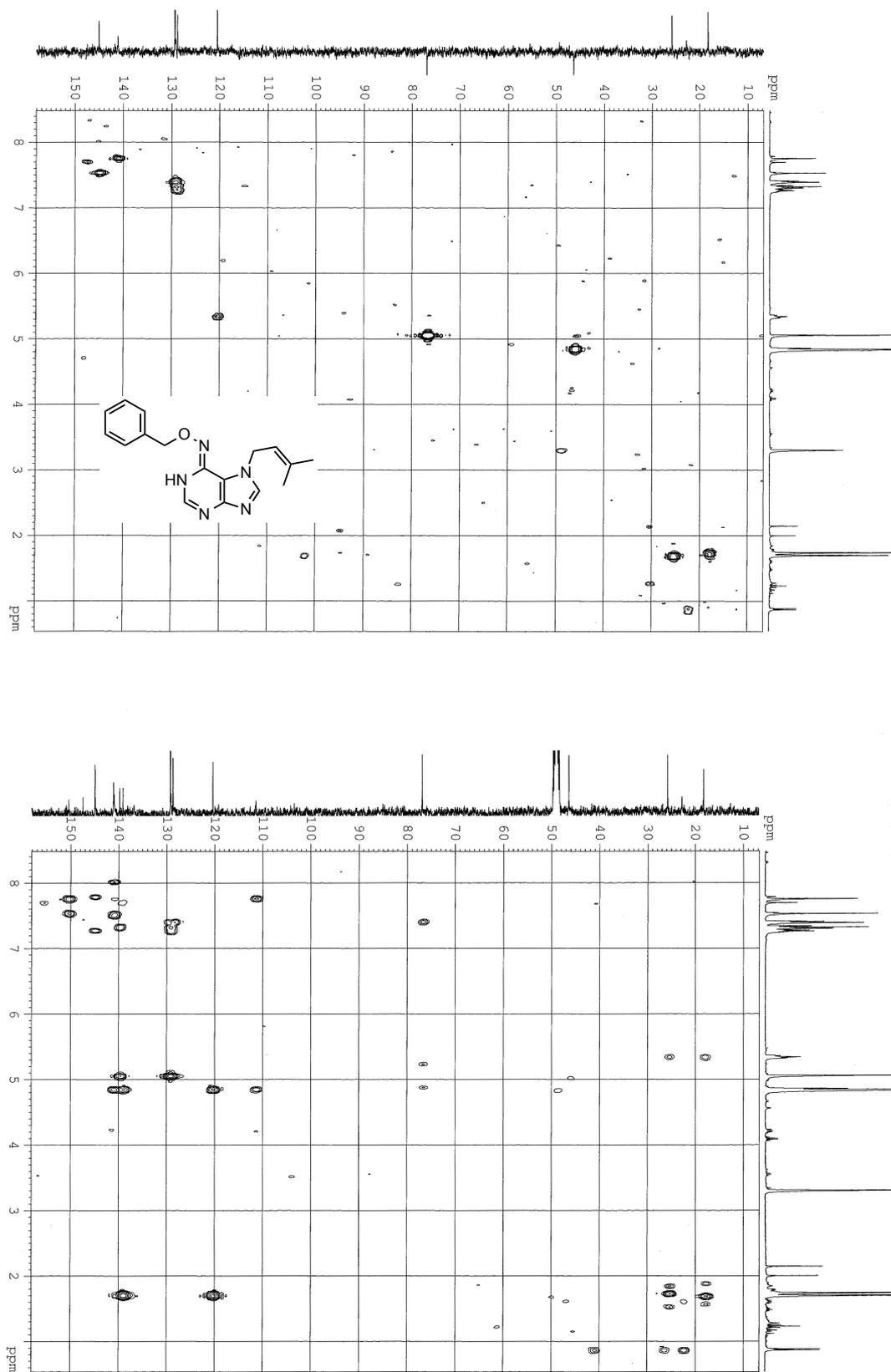


Figura 33: Espectros HMQC y HMBC del compuesto 39.

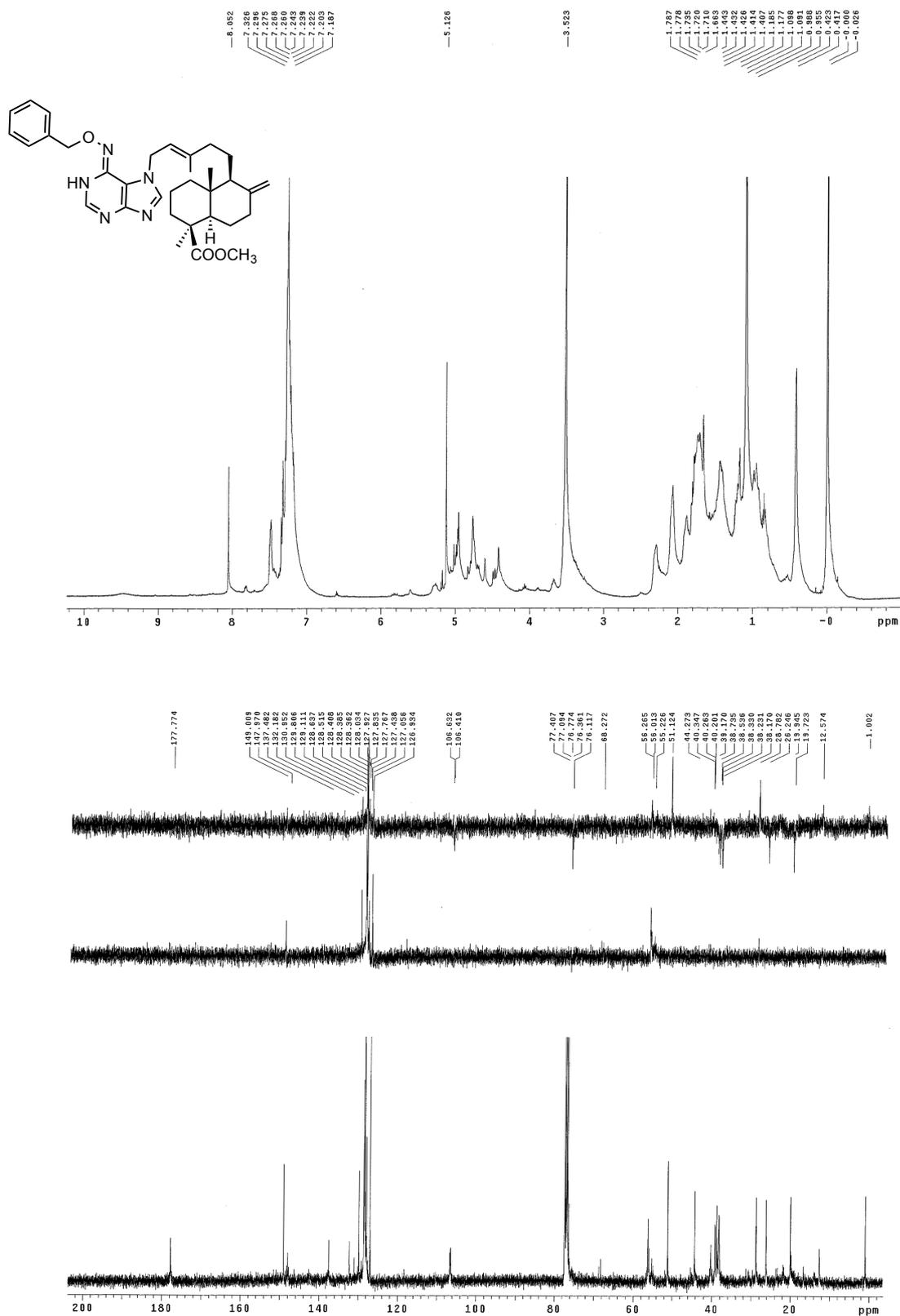


Figura 34: Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 40. Realizados en CDCl_3 .

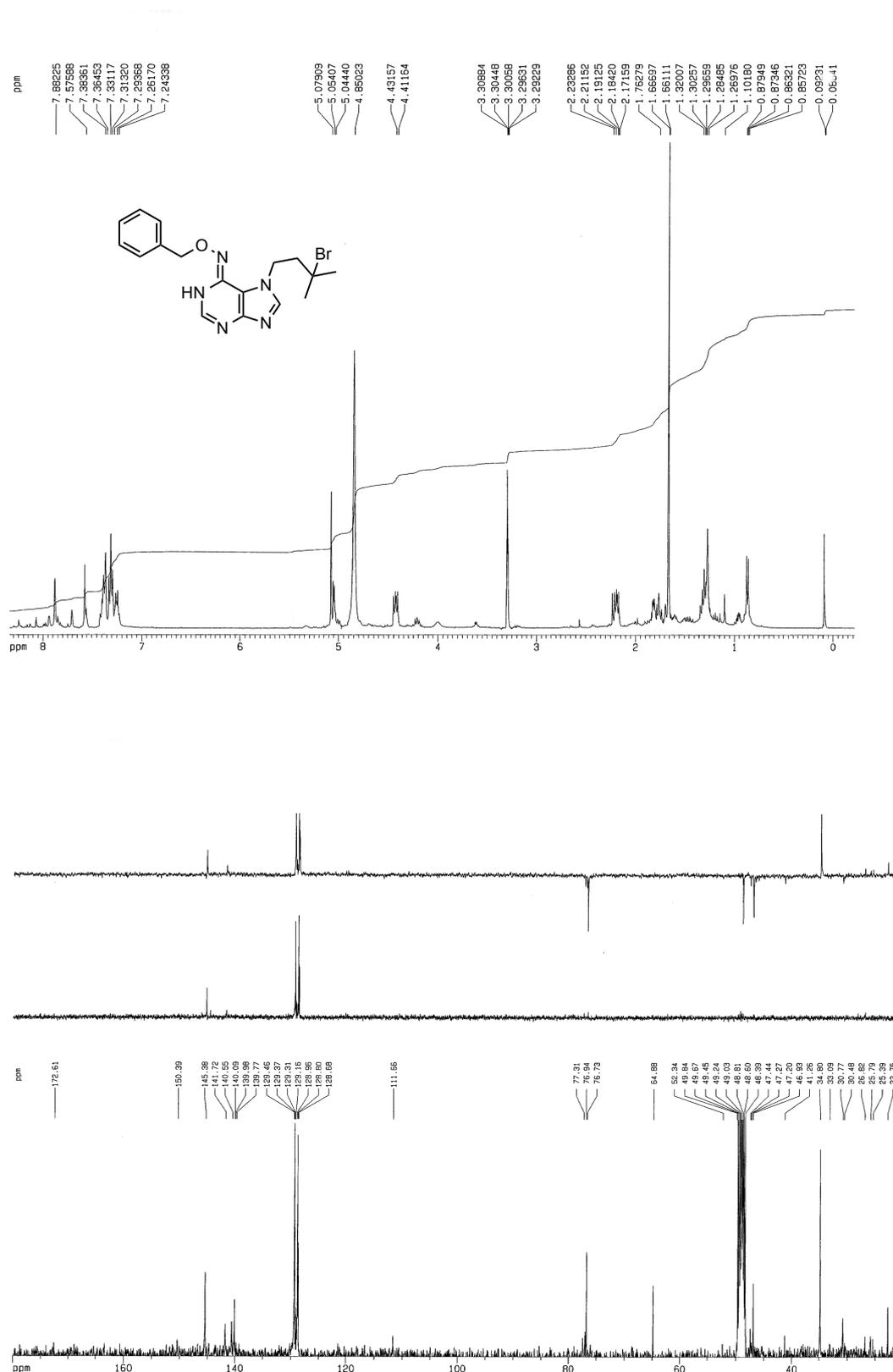


Figura 35: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 41.

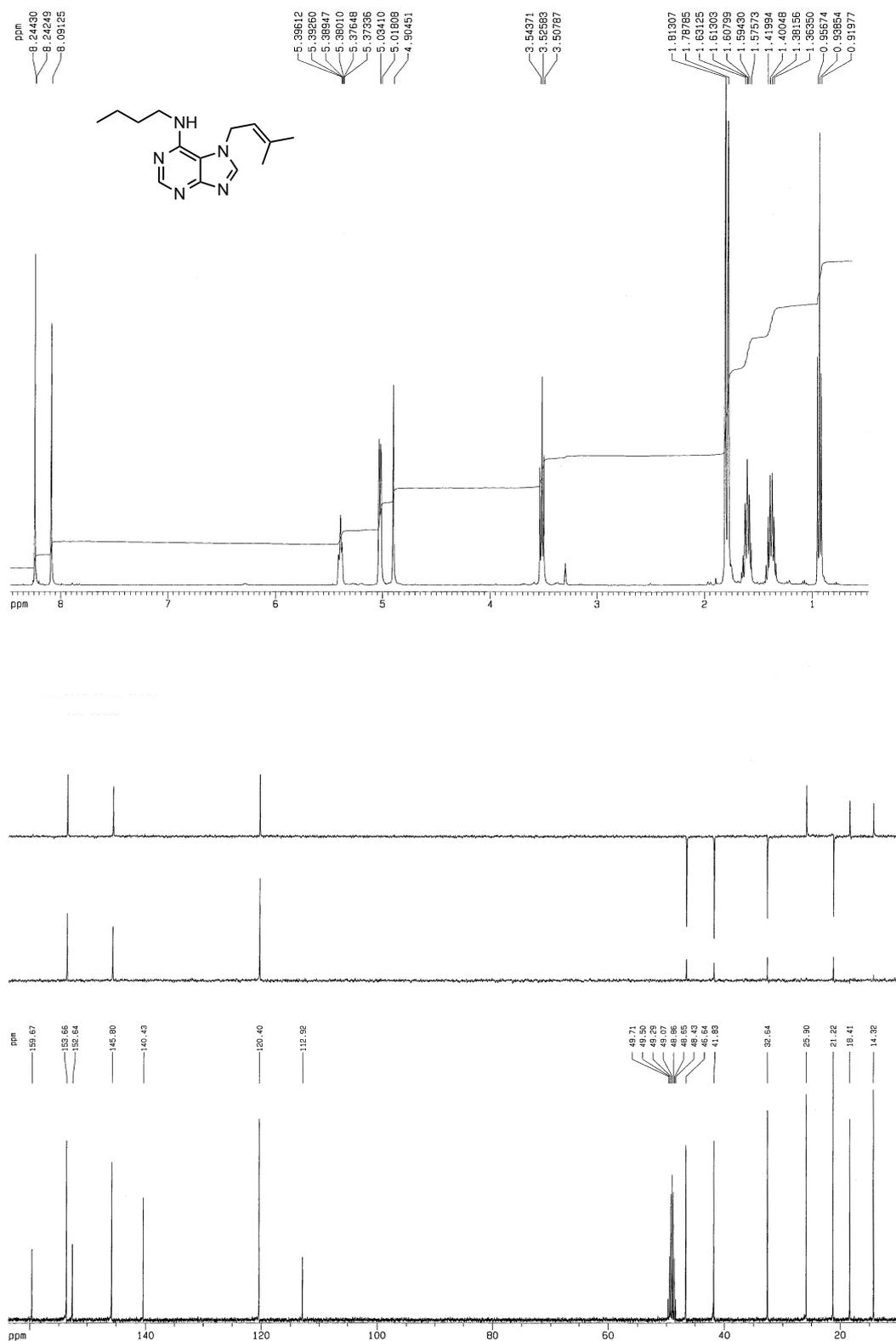


Figura 36: Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 42.

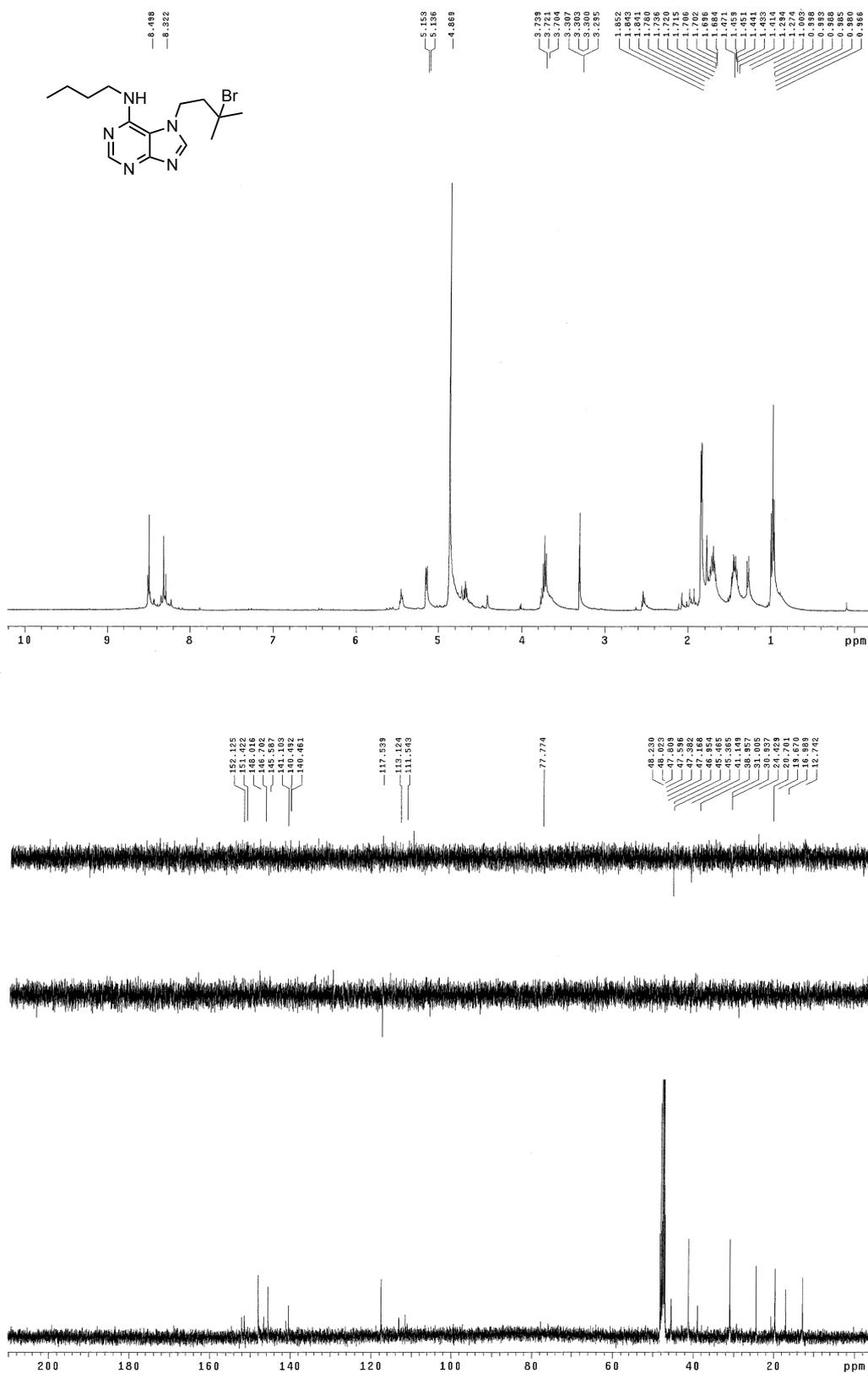


Figura 37: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 43.

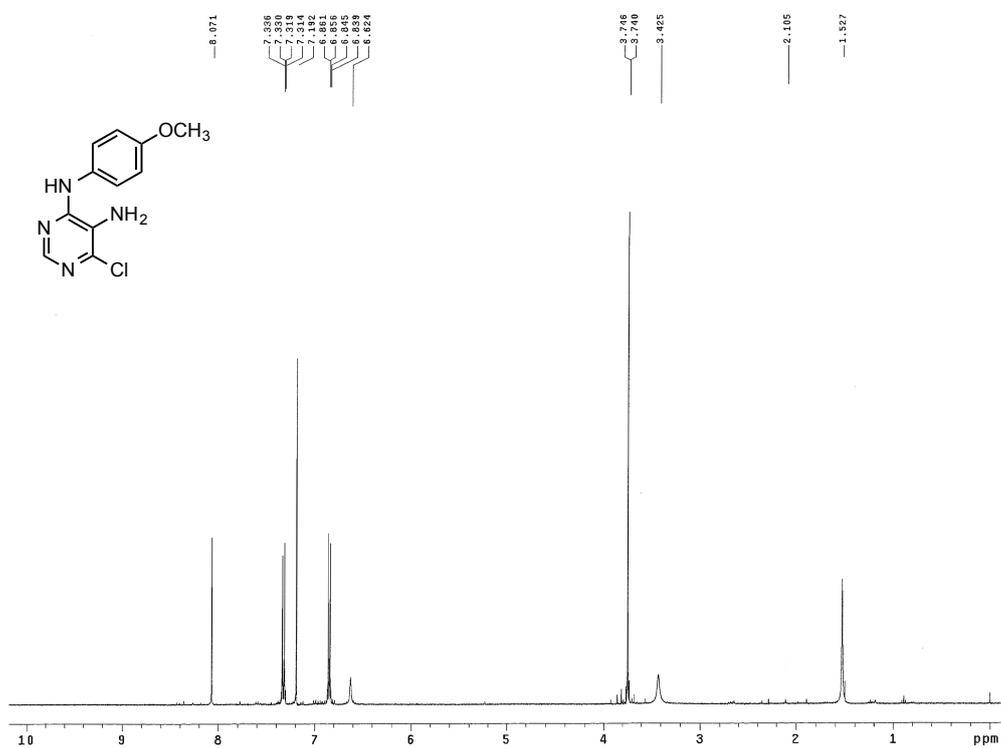


Figura 38: Espectro de RMN de ¹H del compuesto 44. Realizado en CDCl₃.

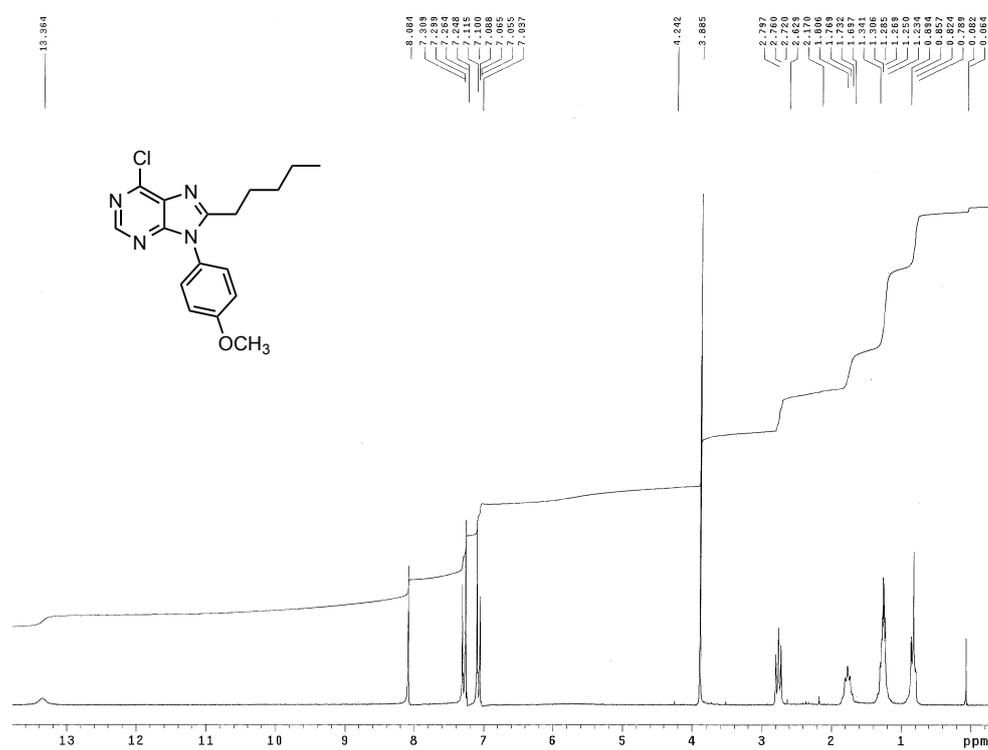


Figura 39: Espectro de RMN de ¹H del compuesto 45. Realizado en CDCl₃.

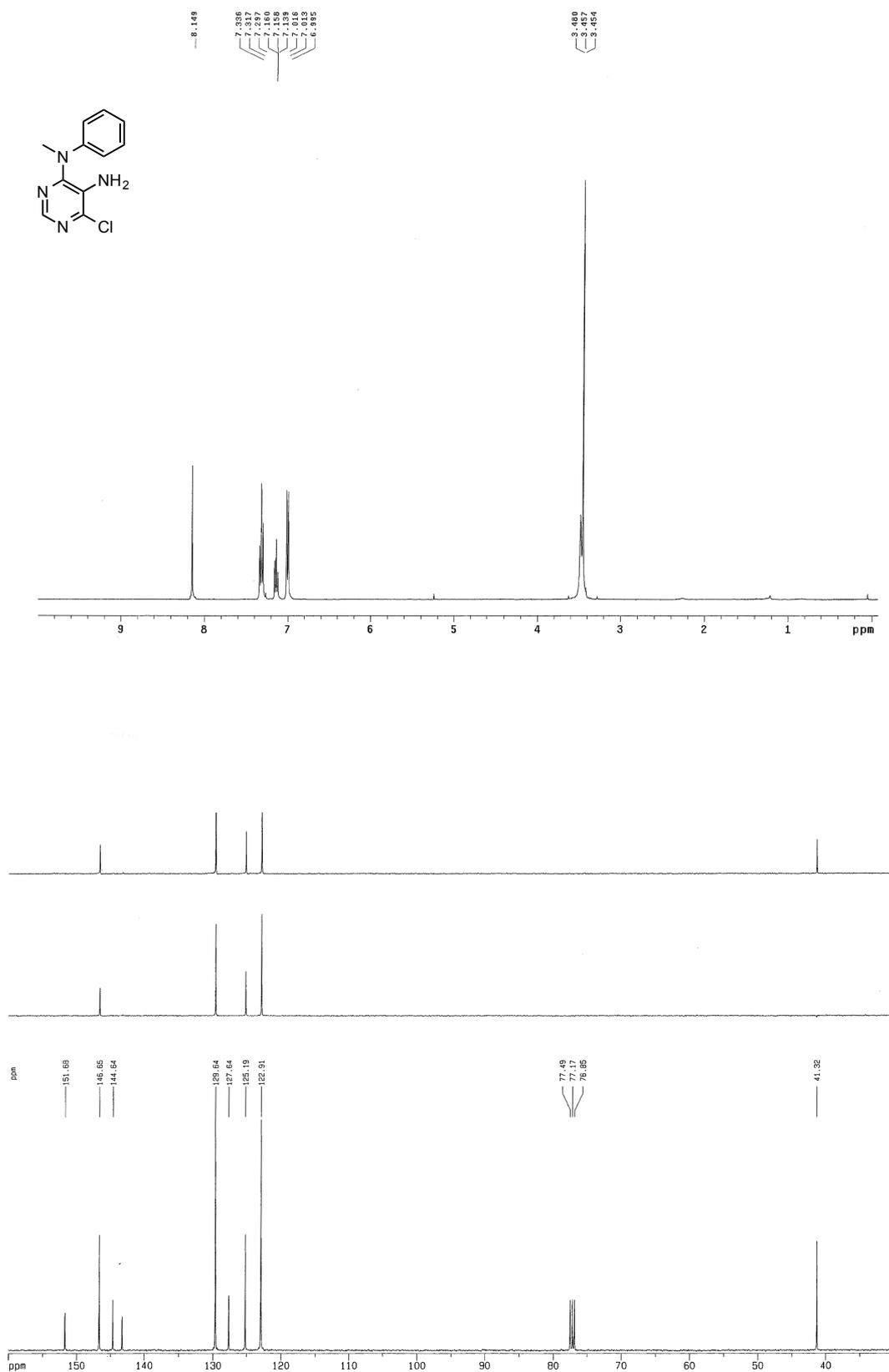


Figura 40: Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **46**. Realizados en CDCl_3 .

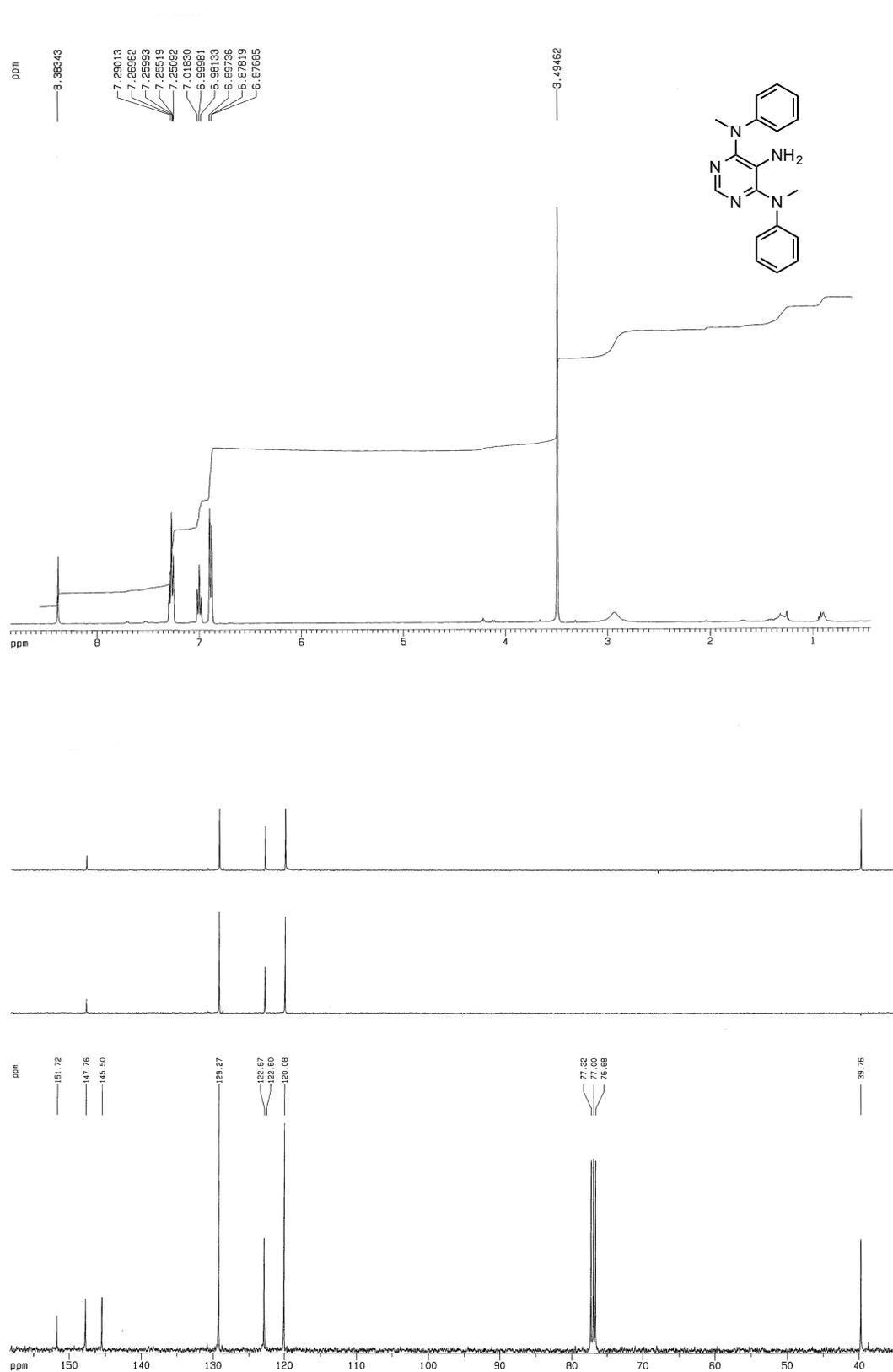


Figura 41: Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 47. Realizados en CDCl_3 .

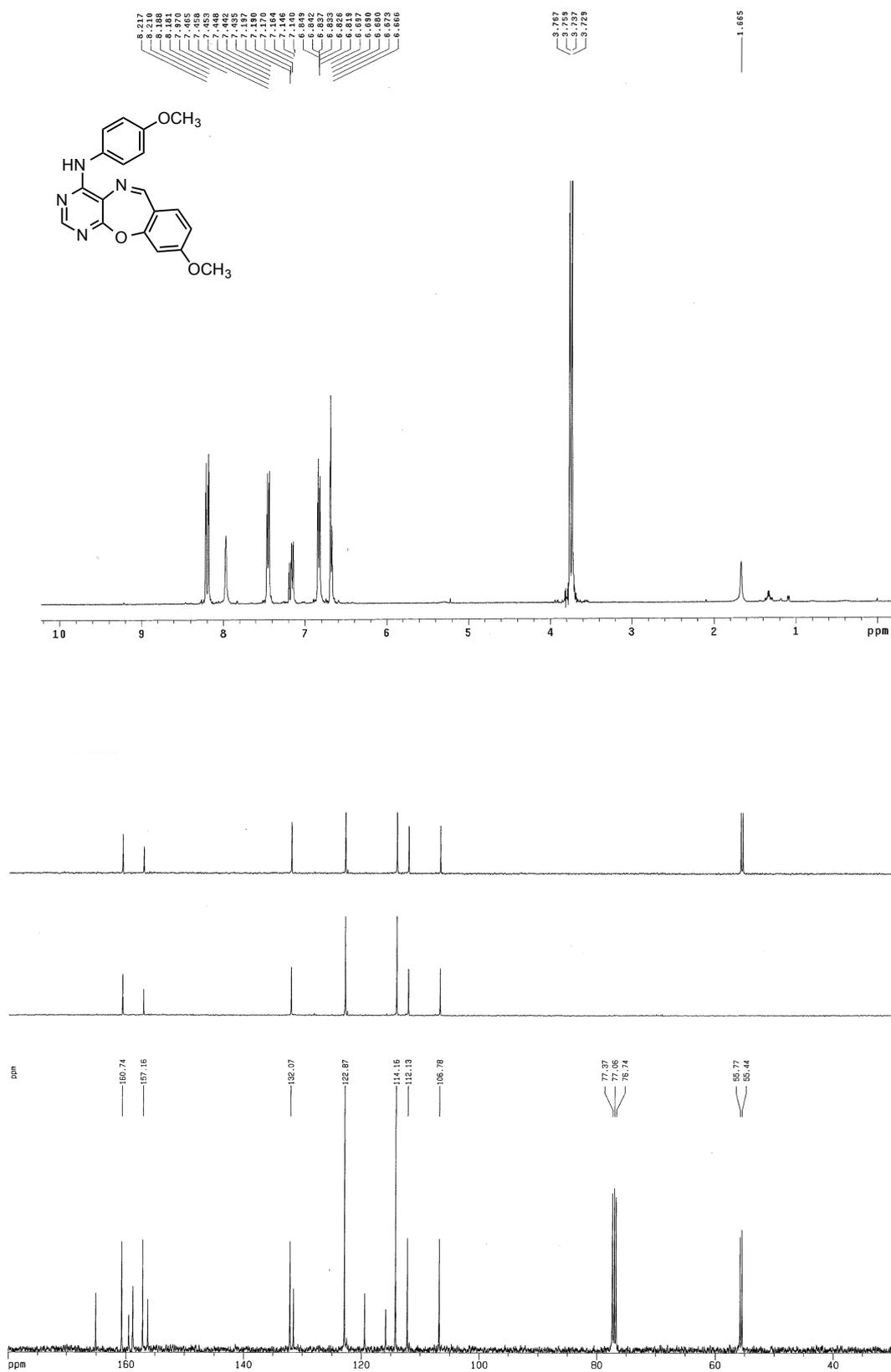


Figura 42: Espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 48. Realizados en CDCl₃.

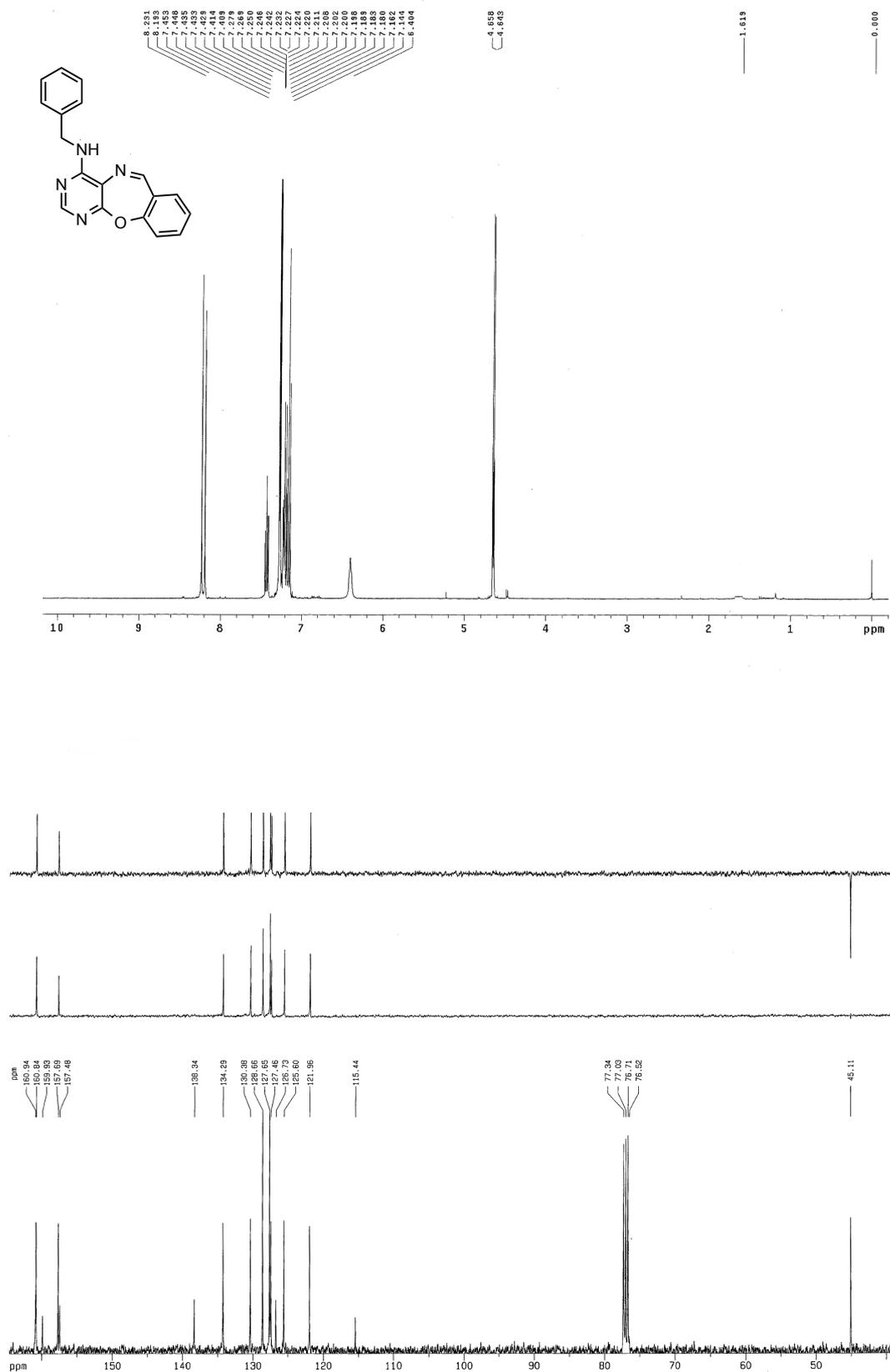


Figura 43: Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 49. Realizados en CDCl_3 .

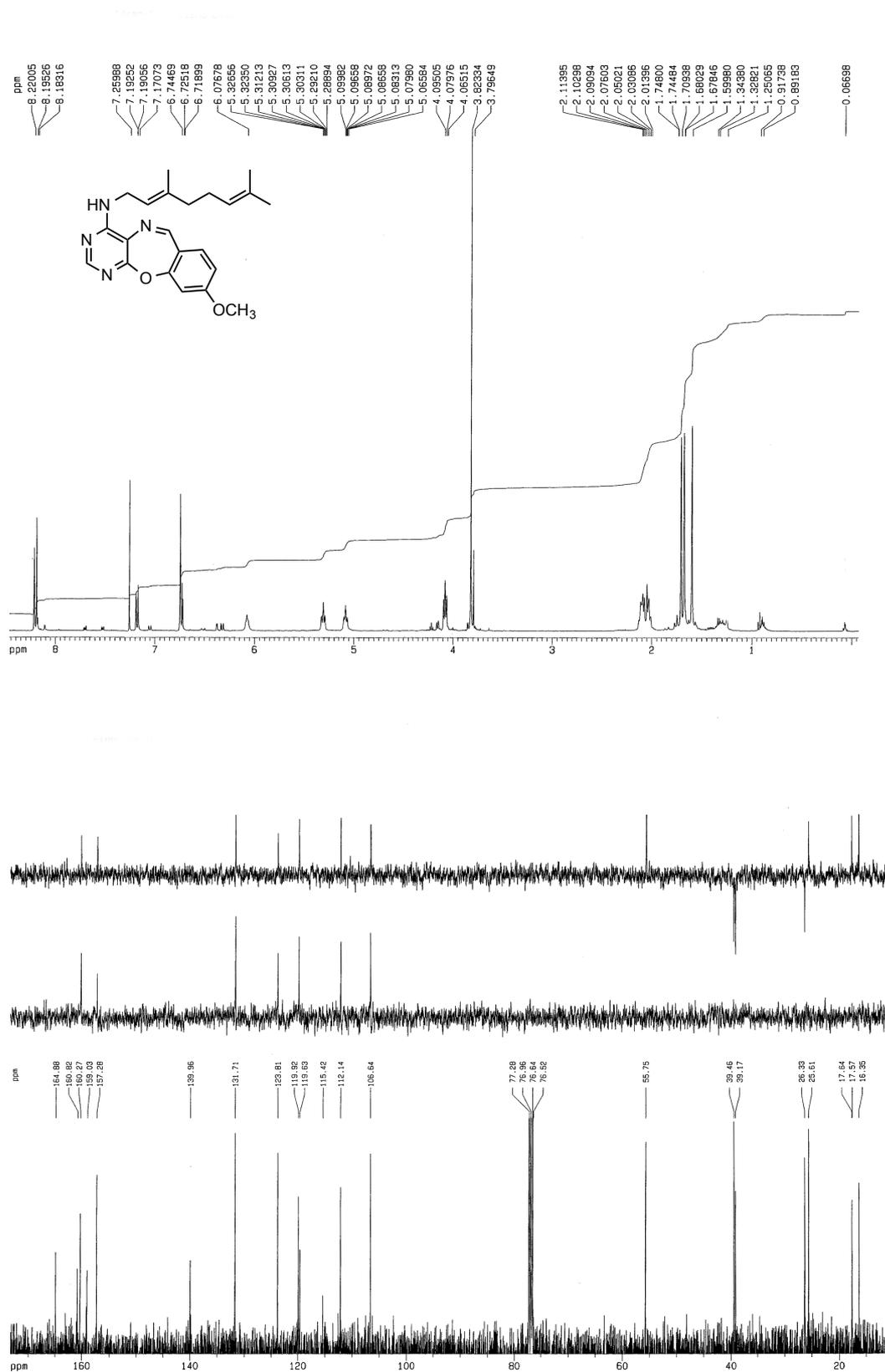


Figura 44: Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 50. Realizados en CDCl_3 .

ESTRUCTURAS

