



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Trabajo final de Grado
para la obtención del título en Licenciatura en
Ciencias Biológicas**

Título:

**MEJORAMIENTO DE LA EFICACIA DE
FAVPIRAVIR MEDIANTE
FUNCIONALIZACIÓN QUÍMICA**

Bach. Valeria Elizalde

Orientadores: Dr. Angel Romero y Dr. Santiago Mirazo

**Montevideo, Uruguay
2022**

ÍNDICE

1. RESUMEN	Pág. 5
2. INTRODUCCIÓN	Pág. 6
2.1 Antecedentes	Pág. 6
2.2 Descripción del virus de familia <i>Coronaviridae</i>	Pág. 9
2.2.1 Características generales	Pág. 9
2.2.2 Estructura	Pág. 10
2.2.3 Ciclo de multiplicación	Pág. 11
2.2.3.1 Adsorción y penetración	Pág. 12
2.2.3.2 Expresión de genes virales y síntesis de ARN	Pág. 12
2.2.3.3 Ensamblaje y egreso	Pág. 13
2.3 Estrategias para combatir las infecciones virales	Pág. 14
2.3.1 Vacunas aprobadas	Pág. 14
2.3.1.1 Vacunas virales clásicas	Pág. 14
2.3.1.2 Vacunas basadas en proteínas	Pág. 14
2.3.1.3 Vacunas basadas ácidos nucleicos	Pág. 15
2.3.1.4 Vacunas en base a vectores virales	Pág. 15
2.3.2 Antivirales de reposicionamiento	Pág. 16
2.3.2.1 Tratamiento antiviral para SARS-COV- 2	Pág. 16
2.3.2.1.1 Inhibidores de proteasas	Pág. 18
2.3.2.1.2 Fármacos inmunomoduladores	Pág. 18
2.3.2.1.3 Inhibidores de la transcripción	Pág. 19
2.4 Favipiravir	Pág. 21
2.4.1 Mecanismo de acción	Pág. 21
2.4.2 Usos terapéuticos	Pág. 22
2.4.3 Estudios clínicos	Pág. 23

2.4.4 Farmacocinética y biodisponibilidad	Pág. 24
2.4.5 Importancia del tautomerismo	Pág. 25
2.5 Importancia de la lipofilicidad para el diseño de agentes terapéuticos	Pág. 27
2.6 Funcionalización química con grupos removibles	Pág. 29
2.7 Justificación	Pág. 31
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	Pág. 34
4. OBJETIVOS	Pág. 34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 35
5.1 Aspectos Químicos	Pág. 35
5.1.1 Generalidades	Pág. 35
5.1.2 Procedimientos de síntesis	Pág. 36
5.1.2.1 Síntesis de derivados 6-halógenados de 3-hidroxi-2-piracincaboxamida	Pág. 36
5.1.2.1.1 Síntesis de 3-hidroxi-2-piracincaboxamida 1e	Pág. 36
5.1.2.1.2 Síntesis de 6-iodo-3-hidroxi-2-piracincaboxamida 1d	Pág. 37
5.1.2.2 Síntesis de derivados funcionalizados de favipiravir a nivel del hidroxilo	Pág. 37
5.1.2.2.1 Reacción de 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincaboxamida con anhídrido tríflico	Pág. 37
5.1.2.2.2 Síntesis de 3-(metilsulfonilo)-6-fluoro-2-piracincaboxamida 2c	Pág. 39
5.1.2.2.3 Acetilación de 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincaboxamida 2d	Pág. 40
5.1.2.2.4 Síntesis de 3-(benciloxi)-6-fluoro-2-piracincaboxamida 2e	Pág. 41
5.1.2.2.5 Intentos de reacción con azido trimetilsililo	Pág. 42
5.2. Aspectos Biológicos	Pág. 43
5.2.1 Células	Pág. 43
5.2.2 Citotoxicidad	Pág. 43
5.2.2.1 Preparación de células	Pág. 43
5.2.2.2 Sembrado del compuesto	Pág. 43
5.2.2.3 Ensayo de bromuro de 3-(4,5 - dimetiltiazol -2-il)-2,5- difeniltetrazolio (MTT) para evaluar citotoxicidad	Pág. 44
5.3 Virus	Pág. 44
5.3.1 Titulación viral	Pág. 44

5.3.2 Evaluación efecto antiviral de los compuestos	Pág. 45
5.4 Cálculo del Índice de selectividad (IS)	Pág. 46
6. RESULTADOS	Pág. 46
6.1 Aspectos químicos	Pág. 46
6.2 Aspectos biológicos	Pág. 50
6.2.1 Determinación de la CC ₅₀	Pág. 50
6.2.2 Determinación de la CI ₅₀ e Índice de selectividad	Pág. 54
6.2.3 Cálculo teórico del coeficiente de partición (Log P)	Pág. 57
7. DISCUSIÓN	Pág. 58
7.1 Aspectos químicos	Pág. 58
7.1.1 Síntesis y caracterización de las 3-hidroxi-2-piracincarboxamidas 1d y 1e	Pág. 59
7.1.2 Síntesis y caracterización de los derivados de favipiravir funcionalizados a nivel de grupo hidroxilo 2a-e	Pág. 61
7.2 Aspectos biológicos	Pág. 69
8. CONCLUSIÓN	Pág. 74
9. BIBLIOGRAFÍA	Pág. 75
10. ANEXOS	Pág. 80

1. RESUMEN

A partir del 13 de marzo del 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado el inicio de la pandemia por el nuevo Coronavirus (SARS- COV-2). Este virus pertenece a la familia *Coronaviridae*, siendo un virus de genoma ARN, envuelto, de polaridad positiva del género Betacoronavirus distribuido en aves, seres humanos y otros mamíferos. Actualmente hay confirmados más de 500 millones de casos y más de 6 millones de muertes desde su inicio. Esto ha significado un problema de salud pública global generando la primera pandemia del siglo XXI. Dicha pandemia ha agilizado los esfuerzos desde la ciencia en la búsqueda de herramientas para un control efectivo de la infección, el cual ha estado focalizado en el desarrollo de vacunas y/o diseño o reposicionamiento de fármacos antivirales. Actualmente favipiravir está aprobado para el tratamiento del virus Influenza y ha mostrado resultados alentadores en cuanto a la capacidad antiviral en estudios clínicos contra SARS- COV-2. Favipiravir es un profármaco que actúa como un análogo de nucleótido de guanina y su respectiva fosforribosilación genera el metabolito de favipiravir-ribofuranosil-5B-trifosfato (favipiravir-RTP) que es el principio activo capaz de bloquear la replicación de ARN del virus. No obstante, la eficiencia antiviral del favipiravir esta limitada por una desfavorable farmacocinética y su baja tasa de conversión al metabolito activo. En orden de contrarrestar estas problemáticas, en el presente trabajo se planteó el diseño y síntesis química de nuevos análogos de favipiravir basados en la funcionalización química. Modificaciones a nivel del grupo hidroxilo para obtener un profármaco con una mayor lipofilia, y a nivel de posición seis del anillo de piracina. Entonces, el objetivo central de este trabajo fue identificar una funcionalidad química que permita obtener un sistema que mantenga o mejore la actividad antiviral *in vitro* respecto al favipiravir utilizando un modelo de coronavirus. A los derivados de favipiravir se les determinó la concentración citotóxica 50% (CC₅₀) en dos líneas celulares (HRT-18 y HEp-2) y ensayos antivirales para determinar la concentración inhibitoria 50% (CI₅₀) en dos modelos de Coronavirus (CovBo-cepa mebus y h-coronavirus 229E). Se encontró derivados con actividad antiviral en el mismo rango de la del favipiravir, identificando que el derivado acetilado es un interesante candidato con una baja toxicidad contra las dos líneas celulares y con una significativa actividad antiviral, siendo incluso superior a la actividad activiral del favipiravir contra ambos modelos de coronavirus.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes

En diciembre de 2019 fue informado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) un brote de neumonía por coronavirus en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China. En los siguientes meses, se descubrió que éste nuevo coronavirus era altamente contagioso y se propagó rápidamente en un lapso corto de tiempo. La enfermedad causada por este virus fue denominada COVID-19 y el 13 de marzo de 2020 fue declarada pandemia por la OMS. Esto se debió a que el número de casos y muertes relacionados por COVID-19 aumentó exponencialmente fuera de China y se extendió por varios países desde fines de marzo de 2020 (Elfiky., 2020).

Posteriormente, se identificó que el agente infeccioso causante de esta enfermedad era el virus SARS-CoV-2. Este pertenece a la familia *Coronaviridae*, siendo un virus de genoma ARN envuelto del género Betacoronavirus distribuido en aves, seres humanos y otros mamíferos (Casella., *et al.*, 2020)

En este caso, el foco de infección generado en el mercado de Wuhan proporcionó la evidencia de algún vínculo entre la transmisión de un animal a un ser humano (Zhou & Yang., 2020). Para SARS-CoV-2 en principio se ha propuesto la existencia de una especie animal como reservorio intermediario entre murciélagos y humanos. Estudios genómicos han demostrado la existencia de gran similitud de secuencias entre coronavirus que infectan murciélagos y este nuevo coronavirus que originó la pandemia. Asimismo, estudios posteriores mostraron que los coronavirus que infectan a los pangolines de la especie *Manis javanica* poseen una gran similitud de secuencia en su genoma con el coronavirus responsable de la pandemia. Algunos estudios sugieren a esta especie como reservorio intermediario pero aún no está claro el origen de este nuevo virus (Zhou., *et al.*, 2020).

A partir del episodio generado en el mercado de Wuhan, se observó un aumento considerable en el número de infectados fuera del foco inicial sugiriendo una transmisión directa entre las personas. La sintomatología más frecuente de esta enfermedad presenta gran similitud con la gripe tradicional causada por el virus influenza. Entre los síntomas más habituales se destaca la presencia de fiebre, tos, dolores musculares y pérdida del gusto/olfato. Otros síntomas menos frecuentes pueden incluir dolor de garganta, cefalea, mareos, etc. Al tratarse de una patología

respiratoria casos más complejos pueden llegar a desarrollar complicaciones respiratorias y requerir de atención médica especializada (Cascella., *et al.*, 2020).

Al 31 de marzo del 2020 se habían registrado 60.816 casos nuevos y 3.638 muertes por coronavirus en todo el mundo. Esta tendencia siguió creciendo aún más hasta llegar a duplicar el número de muertes por día y los casos diarios se cuadruplicaron entre abril y mayo del 2020. Para diciembre del 2020, los casos nuevos eran alrededor de 650.000 y las muertes diarias alcanzaron valores de 7.000 y 16.000 entre diciembre del 2020 y enero del 2021 (**Figura 1**). Este fue uno de los momentos más críticos de la pandemia. En el periodo comprendido entre finales de abril y julio del 2021, las muertes y casos diarios comienzan a bajar notoriamente, registrándose alrededor de 300.000 casos diarios y 6.000 defunciones. El pico máximo de la pandemia se alcanzó entre finales de diciembre del 2021 y enero de 2022. Para el 26 de enero de 2022 se habían detectado 3.655.114 casos diarios y las defunciones estaban en el entorno de 10.000 diarias. En abril de 2022, la OMS tiene registrado un total de 533.816.957 millones de casos y de 6.309.633 muertes acumulados en el mundo, habiendo el mayor número de casos por habitantes (10.000 por cada 100.000) en Norte-América, toda Europa, Australia y gran parte de Sur-América (**Figura 2**) (OMS., 2022).



Figura 1. Mapa de distribución de casos totales en DICIEMBRE de 2020. (Figura tomada de www.dsn.gob.es).

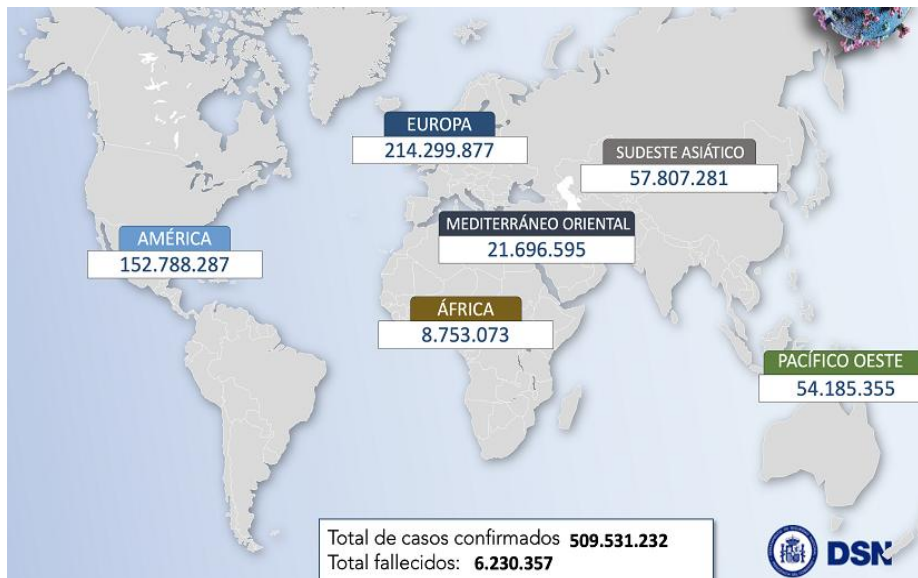


Figura 2. Distribución de casos totales en ABRIL 2022 (Figura tomada de www.dsn.gob.es).

En Uruguay, se registró una tendencia más lenta en relación al aumento de número de casos diarios y muertes. En junio-julio del 2020 ocurrió el primer pico de la pandemia, registrándose alrededor de 230 casos diarios en un total de 1.243 casos y 35 fallecidos desde el inicio de la pandemia (Coronavirus uy, 2020). Para fines de marzo del 2021, los casos comenzaron a aumentar considerablemente registrándose alrededor de 1500 casos positivos diarios hasta llegar a 3500 casos diarios para fines del mes de junio de ese mismo año. El 30 de junio se registraron 15.268 casos activos, los fallecidos hasta ese momento eran 5.593 en todo el territorio nacional (aplicación CoronavirusUY, 2021, Ministerio de Salud Pública, Uruguay). El pico máximo de la pandemia en Uruguay se alcanzó entre finales de diciembre de 2021 y febrero de 2022. El 1 de febrero de 2022 se habían registrado 11.472 casos nuevos en total de 66.523 casos activos totales. El número de fallecidos totales hasta abril 2022) ha sido de 6.513 y el número de personas afectadas por la enfermedad que se recuperaron ha quedado en 606.842.

Actualmente, el número de muertes por coronavirus en el mundo se encuentra en su punto más bajo en comparación con los momentos críticos de la pandemia, mientras que los casos se mantienen en alrededor de 500.000 casos diarios y los casos totales están por encima de 500 millones en todo el mundo (**Figura 2**).

2.2 Descripción del virus de familia *Coronaviridae*

2.2.1 Características generales

Los coronavirus son virus de ARN de polaridad positiva, monocatenario, envueltos que pertenecen a la familia *Coronaviridae*. Ellos fueron identificados y descritos en 1960 y se pueden dividir en 4 subgrupos: alfa, beta, delta y gamma. El nombre de esta familia es atribuido a la presencia de estructuras del tipo corona que presentan en su superficie. Estos son virus de origen zoonótico que han emergido en las poblaciones humanas durante las dos últimas décadas. Principalmente, se caracterizan por causar infecciones del tracto respiratorio, que se transmiten vía aérea, por el contacto entre personas. Esto tiene como consecuencia una alta tasa de morbilidad y mortalidad que es causada por progresión del síndrome de dificultad respiratoria aguda (Totura & Bavari., 2019). La estructura de los coronavirus es generalmente esférica de entre 120- 150 nm de diámetro (Vassilara., et al., 2018). Dentro de la familia *Coronaviridae* se encuentran dos tipos de coronavirus altamente patógenos; coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (Totura & Bavari., 2019). Actualmente, se conocen siete tipos relacionadas con síndromes respiratorios humanos, de las cuales cuatro se reconocen como endémicas; Human Coronavirus 229E (HCoV-229E), Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63), HCoV-OC43 y HCoV-HKU. Por otro lado, las tres restantes; SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 causan síndromes respiratorios severos (Benavides., *et al.*, 2020). La tasa de mortalidad en el caso de SARS-CoV fue del 10% y en el caso de MERS-CoV del 37 % (Ena & Wenzel., 2020).

Durante estos años desde el inicio de la pandemia, la OMS ha hecho con mayor énfasis un seguimiento de las nuevas variantes de SARS-CoV-2 que han aparecido. Se clasifican en tres grupos; variantes preocupantes, variantes de interés y variantes bajo vigilancia. Para la asignación de una variante al grupo de variantes preocupantes tiene que cumplir los siguientes criterios: aumento significativo de la transmisibilidad, o aumento de la virulencia, o disminución de las medidas sociales y/o salud pública, las vacunas y tratamientos. Dentro de este grupo se encuentran las variantes delta y omicron. Estas variantes han sido las que han generado las mayores olas de contagios (OMS, 2022).

2.2.2 Estructura

El material genético del virus se encuentra asociado a proteínas que conforman la nucleocápside. Por fuera está rodeado por una envoltura lipídica derivada del retículo endoplásmico rugoso y de las membranas de Golgi de las células que infecta. En la estructura del virus existen un grupo de proteínas esenciales incluyendo:

Glicoproteína de espiga (S): Esta proteína es fundamental en los primeros pasos del ciclo de infección del virus, siendo responsable del reconocimiento y fusión entre la membrana viral y la celular. Se le atribuye el nombre a la familia por esta proteína saliente de la superficie de la envoltura que le da el aspecto de corona (Figura 3) (Wedrowska., *et al.*, 2020). Esta proteína cuenta con dos subunidades funcionales, S1 y S2. La subunidad S1 es la que permite la unión al receptor celular ACE II a través de sus residuos aminoacídicos (lisina y fenilalanina) del dominio RBD. Además, presenta un dominio N- terminal y otro C- terminal. La subunidad S2 es la responsable de la fusión entre las membranas viral y celular gracias a que en su estructura cuenta con un dominio de péptido de fusión. Asimismo, cuenta con un dominio transmembrana. S2 forma el tallo de la glicoproteína de espiga (S) (Wedrowska., *et al.*, 2020).

Proteínas de envoltura pequeña (E): Es la proteína más pequeña de las proteínas estructurales presentando 76 aminoácidos. Presenta 3 dominios, un N-terminal, otro C- terminal y por último uno transmembrana. Este último actúa como canal iónico siendo importante para el ensamblaje y liberación de los viriones (Hassan., *et al.*, 2020).

Proteínas de membrana/matriz (M): Proteína más abundante en la estructura y es la que le da el aspecto característico al virión. Presenta 3 dominios transmembranales. Uno de estos dominios puede ser glicosilado y esto afecta el tropismo celular y la capacidad de producir interferón. En las últimas etapas del ciclo de infección ayuda a estabilizar a la proteína N (Satarker & Nampoothiri., 2020).

Proteínas de la nucleocápside (N): Están conformadas por dos dominios separados: C- terminal y N- terminal. Se unen al ARN viral por diferentes mecanismos proporcionándole estabilidad (Chang., *et al.*, 2014)

ARN polimerasa (RdRp): Es la enzima esencial para la replicación y transcripción viral, se encuentra codificada en el genoma viral. El sitio activo de la enzima esta conformado por 13 residuos aminoácidos (Helmy., et al., 2020).

Proteasas: En su genoma el virus codifica para varios tipos de proteasas tales como Mpro (proteasa principal), PLpro (similar a papaína), CLpro (similar a quimiotripsina) y CTSB, CTSL (catepsina B y L endosomal/lisosomal) estas se encuentran en el extremo 5' de su ORF y constituyen al grupo de proteínas no estructurales junto con la ARN polimerasa. Las proteasas son esenciales para generar a las proteínas efectoras funcionales luego de la transcripción (Helmy et al., 2020) Además, el virus codifica para una enzima helicasa/ trifosfatasa y la enzima exoribonucleasa responsables de reparar errores que puedan surgir en el proceso de replicación (Espín Sánchez., 2021).

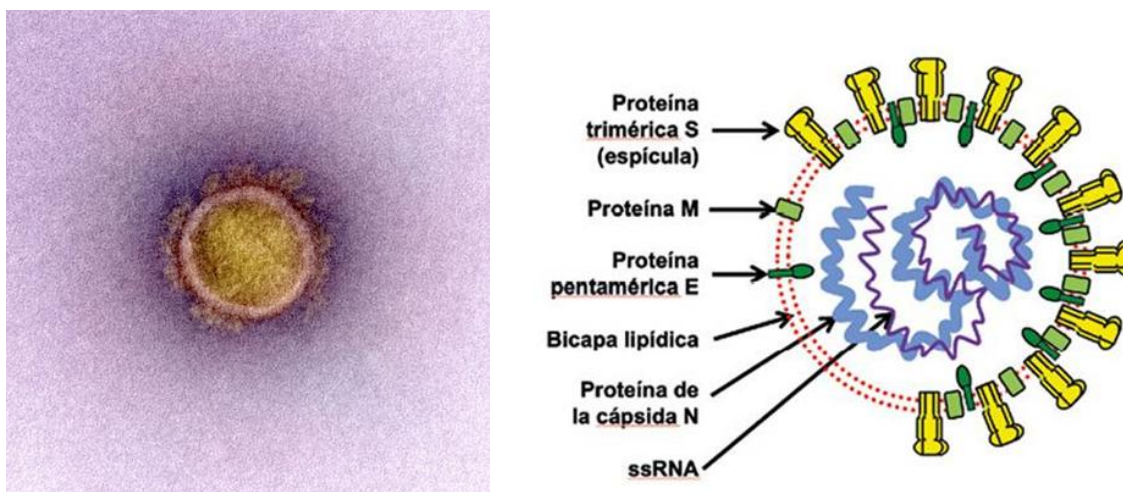


Figura 3. Micrografía electrónica y diagrama de la estructura de un virión de la familia *Coronaviridae* típico (Tomada de Niaid/Planet Pix via Zuma Press/ Cordon Press)

2.2.3 Ciclo de multiplicación

Los virus son parásitos intracelulares obligatorios por lo que necesitan de la maquinaria celular para realizar la replicación viral. El SARS-CoV-2 no es la excepción, introduce su material genético dentro de la célula y utiliza la maquinaria celular para producir múltiples copias de sí. El ciclo de multiplicación viral ocurre en los pasos que se detallan a continuación.

2.2.3.1 Adsorción y penetración

El primer paso es la entrada del virus a la célula mediante la interacción entre los receptores de la membrana celular con el dominio terminal S1-CTD de la proteína S que se encuentra en la cápside. El blanco principal para la entrada de este virus es el receptor de la enzima convertidora de la angiotensina II (ACE2) que se encuentra mayoritariamente en las células del pulmón (Gordon., et al., 2020). La unión entre el dominio terminal S1-CTD de la proteína S, el receptor ACE II y otros factores celulares (como la serina proteasa de superficie celular TMPRSS2) genera un cambio conformacional en la proteína S. Esto permite su entrada ya sea a nivel de la membrana celular o vía endosomal. Esto último se debe a la presencia de las cisteínas proteasas catepsina B y L endosomal/lisosomal (CTSB, CTSL) (Hoffmann., *et al.*, 2020).

2.2.3.2 Expresión de genes virales y síntesis de ARN

Después de la entrada, la liberación y el desprendimiento del ARN viral entrante ocurre la replicación del gen replicasa que dará lugar a proteínas no estructurales, genes estructurales y accesorios. Luego el gen replicasa se somete a la traducción inmediata de sus dos grandes marcos de lectura abiertos, ORF1a y ORF1b (V'kovski., *et al.*, 2021)

La maquinaria de traducción del huésped es secuestrada para la traducción de las poliproteínas virales esenciales codificadas en el gen replicasa. Dichas poliproteínas (pp1a y pp1ab) se dividen en 16 proteínas efectoras no estructurales, y a su vez mediante otros factores permiten la formación del complejo de replicación junto con la ARN polimerasa dependiente de ARN. De este modo el genoma de ARN polaridad positiva del virus se utiliza como plantilla para producir la cadena de polaridad negativa y generar nuevos ARNm virales (Fehr& Perlman., 2015).

2.2.3.3 Ensamblaje y egreso

Las proteínas estructurales traducidas se trasladan a las membranas del retículo endoplásmico (RE). La proteína N se une al genoma viral, mientras que la proteína M se adhiere a la membrana del RE. Luego el ARNm recién sintetizado se junta con las proteínas que conforman la nucleocápside para formar la partícula viral. Dichas partículas transitan a través del compartimento intermedio del RE al Golgi, donde la interacción con el ARN genómico recién producido y encapsulado da como resultado la gemación en la luz de los compartimentos vesiculares secretores. En este proceso, una parte de la membrana de la célula hospedera se

transforma en la envoltura viral de las partículas en reciente formación. Finalmente, los viriones son secretados por la célula infectada por exocitosis (Vukovski., *et al.*, 2021).

2.3 Estrategias para combatir las infecciones virales

Para combatir las infecciones virales existen, en general, tres modos: prevención mediante medidas de intervención no farmacológica (barbijos, distanciamiento), la aplicación de vacunas o el tratamiento farmacológico mediante la utilización de tres grandes grupos de herramientas; fármacos con actividad antiviral, anticuerpos monoclonales y suero hiperinmune y fármacos para el tratamiento sintomático.

Las vacunas, sin duda, son la forma más eficaz para controlar la propagación de la infección viral en una población, pero no siempre se encuentran disponibles para todos los virus. Dentro de las opciones para el tratamiento con anticuerpos monoclonales están las anti proteínas S y suero hiperinmune (derivado de personas convalescentes que cursaron la enfermedad). Estos han mostrado efectos beneficiosos en conjunto con la administración de vacunas. La ventaja del tratamiento con el suero hiperinmune es que dado que este contiene variantes de anticuerpos contra diferentes epitopos de la proteína S, su actividad antiviral no es afectada por mutaciones puntuales a diferencia de los anticuerpos monoclonales anti S, que están diseñados contra una variante antigénica determinada (Kantor., *et al.*, 2021). Sin embargo, recientemente un estudio del hospital Methodist de Houston (EE.UU) publicó una serie de 25 casos graves de COVID-19 luego de la administración de suero hiperinmune desde el inicio de su aprobación para uso de emergencia (Salazar., *et al.*, 2020).

En el caso de los fármacos para el tratamiento sintomático se encuentran los antiinflamatorios como dexametasona, anticuerpo anti interleucina 6 (IL-6). Para la dexametasona aún no está clara su efectividad, incluso parece no ser conveniente su administración en etapas tempranas de la infección por SARS-CoV-2 (Rubio., *et al.*, 2021). En cuanto a la utilización de inhibidores de la IL-6 para el tratamiento de SARS-CoV-2 parece tener buenos resultados para los casos graves de esta infección viral pero su uso prolongado puede generar efectos adversos en la salud de los pacientes. Un gran porcentaje de estos pacientes tratados con corticoides padecieron dolores en las articulaciones y anomalías en la médula ósea (Liu., *et al.*, 2020).

En el campo de los fármacos con acción antiviral se encuentran Molnupiravir Paxlovid, Remdesivir, Ribavirina y Favipiravir los cuales se desarrollaron posteriormente. Por último, es

importante mencionar que los fármacos antivirales proporcionan un papel secundario de protección a corto plazo o terapéutico una vez que se ha establecido la infección viral. La ventaja de los antivirales es que se pueden reducir los tiempos del curso de las infecciones virales.

2.3.1 Vacunas aprobadas

El desarrollo y aprobación de vacunas, por lo general, es un proceso largo que toma entre 5 a 10 años. Durante la actual pandemia estos tiempos han tenido que acortarse para poder dar respuesta a una emergencia de salud pública. Existen diferentes estrategias para el desarrollo de vacunas; vacunas virales, vacunas basadas en proteínas recombinantes, vacunas en base a ácidos nucleicos, vacunas en base a vectores virales, etc (Ibáñez-Guelfenbein., *et al .*, 2021).

2.3.1.1 Vacunas virales clásicas

En estas vacunas se utiliza como plataforma el virus mismo de manera atenuada o inactivada. Las vacunas atenuadas requieren de sucesivos pasajes en líneas celulares *in vitro*, hasta acumular mutaciones que disminuyen la capacidad de desarrollar la enfermedad, pero no así la replicación viral. Mientras que la estrategia para el desarrollo de vacunas inactivadas, se basa en el uso de agentes químicos para obtener una partícula viral no infecciosa. Esta pierde su capacidad de replicarse. De esta forma, se genera la respuesta inmune ya que la partícula conserva su estructura pero no se produce la enfermedad (León-Lara & Otero- Mendoza., 2020). Actualmente en este grupo se encuentra Coronavac (virus inactivado) desarrollada por Sinovac (China) aprobada el 21 de junio de 2021 para su uso de emergencia presentando una eficacia del 51% contra la infección sintomática por el SARS-CoV-2 y una efectividad del 100% para prevenir casos graves y hospitalizaciones luego de los 14 días de la segunda dosis (Mallapaty., 2021)

2.3.1.2 Vacunas basadas en proteínas recombinantes

En estas vacunas utiliza como plataforma un sistema procariota o eucariota de producción de proteínas virales individuales que forman parte de la estructura del virus. Durante la administración de esta vacuna, la proteína es reconocida como extraña por el sistema inmune del huésped y genera anticuerpos naturales contra el virus. En particular, para el desarrollo de estas

vacunas contra SARS- CoV- 2 se utilizó la secuencia de la proteína S de la cápside (Mallapaty., 2021).

Un ejemplo con esta metodología es la vacuna Novavax (Nuvaxovid) aprobada por la FDA para su uso de emergencia el 20 de diciembre de 2021. En los ensayos en fase III se comprobó una efectividad del 90 % tanto para casos leves, moderados y graves (Sacks., *et al.*, 2021).

2.3.1.3 Vacunas en base a ácidos nucleicos

En estas vacunas se utiliza como plataforma el material genético del virus. En este caso, como estamos frente a un virus con genoma ARN se utiliza la secuencia del ARNm de la proteína S de la cápside viral. Este ARNm se transcribe y traduce utilizando la maquinaria celular del huésped produciendo la proteína S al egresar de la célula produce la respuesta inmune. (Sterin-Prync., 2020). La vacuna de Pfizer-BioNTech ha sido aprobada el 31 de diciembre del 2020 por la OMS para su uso de emergencia y presenta una efectividad del 95% contra la infección sintomática por SARS-CoV-2 (Polack., *et al.*, 2020).

La vacuna de Moderna contra COVID-19 fue aprobada el 30 de abril de 2021 por la FDA con una efectividad del 94,1% luego de los 14 días de la primera dosis teniendo en cuenta la cepa original (Baden., *et al.*, 2020).

2.3.1.4 Vacunas en base a vectores virales

En estas vacunas los vectores virales son utilizados como vehículos para introducir el material genético del agente infeccioso. Por otra parte, los vectores virales pueden ser diseñados con virus replicantes o no replicantes. En este tipo de vacunas se utilizan como plataformas adenovirus que se modifican genéticamente de manera que no pueden replicarse. En este caso, se generan constructos con la secuencia de la proteína S de SARS-CoV-2 y se la incorpora en el genoma del adenovirus (Sterin-Prync., 2020)

La vacuna Oxford/AstraZeneca (ChAdOx1-S [recombinante]) fue aprobada por la FDA para su uso de emergencia el 16 de febrero de 2021, presentando una efectividad del 76% luego de 15 días de la segunda dosis. La vacuna Ad26.CoV2.S de Janssen aprobada el 12 de marzo de 2021 presenta una efectividad del 85,4% para casos graves y del 93% para prevenir hospitalizaciones, 28 días posteriores a la inoculación (Borobia., *et al.*, 2021).

2.3.2 Antivirales de reposicionamiento

Un antiviral es aquel compuesto cuyo blanco es una macromolécula que puede encontrarse tanto en la célula huésped o en el virus y, tiene un papel fundamental en el ciclo de replicación viral (Roner., et al., 2007). El índice de selectividad es usado como una herramienta para establecer la relación entre la actividad antiviral y el efecto citotóxico en la célula. Compuestos con índices de selectividad mayores a 10 presentan mayor actividad antiviral *in vitro* (Indrayanto., et al., 2021). Los antivirales se pueden clasificar según su mecanismo de acción. Pueden actuar inhibiendo o neutralizando la entrada del virus, bloqueando las enzimas fundamentales implicadas en la replicación viral, ensamblaje del virión y/o egreso de la célula infectada. Asimismo, se pueden clasificar según su estructura como: análogos de receptores o moléculas que interfieren en el reconocimiento del receptor celular, análogos de nucleósidos, inhibidores de proteasas, inhibidores de integrasas, etc (Li., et al., 2021).

2.3.2.1 Tratamiento antiviral para SARS-COV- 2

Los coronavirus presentan una alta tasa de mutación en su genoma, situación que se vuelve problemática cuando se generan nuevas cepas emergentes que dificultan la respuesta al tratamiento antiviral. Es crucial la búsqueda constante de nuevos fármacos que puedan ser eficaces para el control de la infección de estas cepas emergentes.

En marzo 2020, se identificaron centenares de trabajos describiendo moléculas con potencia antiviral, la mayoría de estos con un abordaje teórico-computacional y de reposicionamiento de fármacos (Elfiky., 2020) & (Zhou., et al., 2020)

En cuanto a los estudios clínicos de reposicionamiento, se identificaron más de 24 ensayos clínicos relacionados con más de 20 medicamentos, como inmunoglobulina humana, interferones, cloroquina/ hidroxiclороquina, arbidol, remdesivir, favipiravir, lopinavir, ritonavir, oseltamivir, metilprednisolona, bevacizumab y medicina tradicional china (**Figuras 4, 5 y 6**) (Harrison., 2020)

Aunque el reposicionamiento de medicamentos tiene algunas limitaciones, el reposicionamiento de los ensayos clínicos (especialmente en relación con las fases I) puede representar una estrategia atractiva porque facilita el descubrimiento de nuevas clases de medicamentos. Esto tiene un menor costo y permite el descubrimiento de agentes potenciales para llevar al mercado. Es importante mencionar que esta estrategia es una importante ventaja respecto al

descubrimiento de un fármaco específico, que generalmente, requiere de un largo proceso entre 10 a 15 años para el desarrollo racional desde primera etapas. Por tanto, resulta en una alternativa inmediata para abordar la problemática (Keykavous & Tiwari., 2020).

Tabla 1. Resumen de los fármacos más utilizados en estudios clínicos para la **COVID19**. (Lythgoe., & Middleton., 2020).

Fármaco	Dosis	Administración	Duración del tratamiento
IFN- α	5 millón U o dosis equivalente cada 12 hs	Inhalación de vapor	No más de 10 días
Lopinavir/ ritonavir	Un comprimido de 200 mg/ 50 mg cada 12 hs	Oral	No más de 10 días
Ribavirina	Un comprimido de 500 mg ada 8 o 12 hs en combinación con IFN-a o lopinavir.	Intravenosa	No más de 10 días
Cloroquina	Un comprimido de 300 mg cada 12 hs	Oral	No más de 10 días
Arbidol	Un comprimido de 200 mg cada 8 hs	Oral	No más de 10 días

2.3.2.1.1 Inhibidores de proteasas

Un inhibidor de proteasa es un compuesto que bloquea a la proteasa, que es una enzima esencial del virus responsable de catalizar la hidrólisis de enlaces peptídicos de otras proteínas. Para SARS- CoV-2, se ha propuesto el uso de Lopinavir/ritonavir (LPV/RTV) y darunavir como inhibidores de proteasas (**Figura 4**). Lopinavir/ritonavir es un fármaco antirretroviral ampliamente usado para controlar la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). El tratamiento con LPV/RTV en pacientes con coronavirus, no logró demostrar una disminución en la carga viral luego de su administración (400 mg/cada 12 hs vía oral por 14 días) comparado con el tratamiento control (Jean & Hsueh., 2020). Por otro lado, darunavir presenta un buen perfil antiviral *in vitro* pero debido a su farmacocinética y resultados desfavorables en estudios clínicos. El Instituto Nacional de Salud (NIH) de EE. UU no recomienda su uso contra el COVID-19, al menos en forma de monoterapia farmacológica (Jean & Hsueh., 2020)

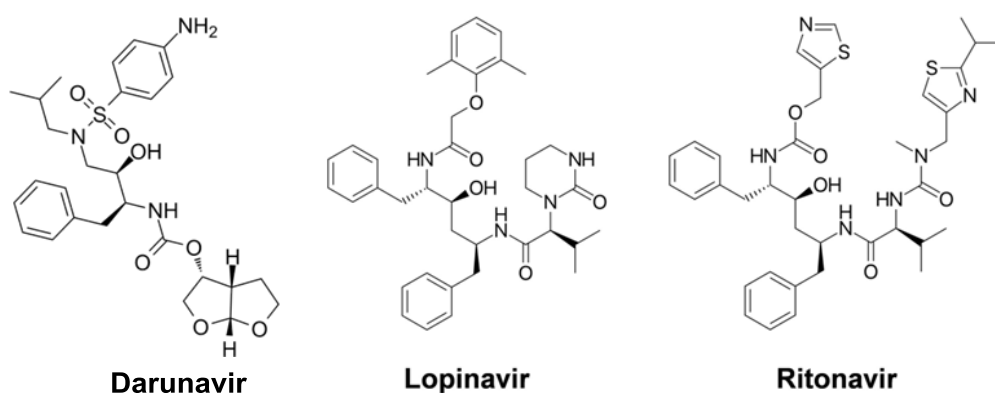


Figura 4. Estructura de antivirales inhibidores de proteasas

2.3.2.1.2 Fármacos inmunomoduladores

En este apartado se encuentran cloroquina, hidroxicloroquina y azitromicina (**Figura 5**). La cloroquina/hidroxicloroquina es un fármaco antipalúdico que ha sido eficaz para tratar las infecciones por el nuevo coronavirus (aprobado para el tratamiento de malaria y enfermedades autoinmune). Este fármaco no permite el ingreso del virus mediante la unión al receptor celular o alterando su estructura, ya que presenta mayor afinidad por este receptor que la proteína S viral. La hidroxicloroquina tiene potencial para combatir la tormenta de citoquinas que se producen en

los casos graves y reducir los tiempos de infección. Mientras que la cloroquina tiene la propiedad de aumentar el PH endosomal, desbloqueando una una de las vías de entrada del virus. Se ha descubierto que la hidroxicloroquina presenta una CI_{50} menor que la cloroquina siendo 0,72 y 5,47 μM respectivamente (Jean & Hsueh., 2020). Es importante mencionar que la cloroquina presenta propiedad antiinflamatoria y se recomienda para potenciar sus efecto combinar con otras moléculas como antibióticos. El 28 de marzo de 2020 se aprobó el uso de emergencia de hidroxicloroquina con una dosis de 200 mg dos veces al día por 5 días. La azitromicina es un antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos usado para diferentes tipos de infecciones bacterianas. Se ha visto que la combinación de este antibiótico (500 mg el primer día, 250 mg del día 2-5) + hidroxicloroquina reduce significativamente la carga viral. Posteriormente, se demostró que esta combinación aumenta el riesgo mortalidad por problemas cardiovasculares y el Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos no aconsejó su uso (Jean & Hsueh., 2020).

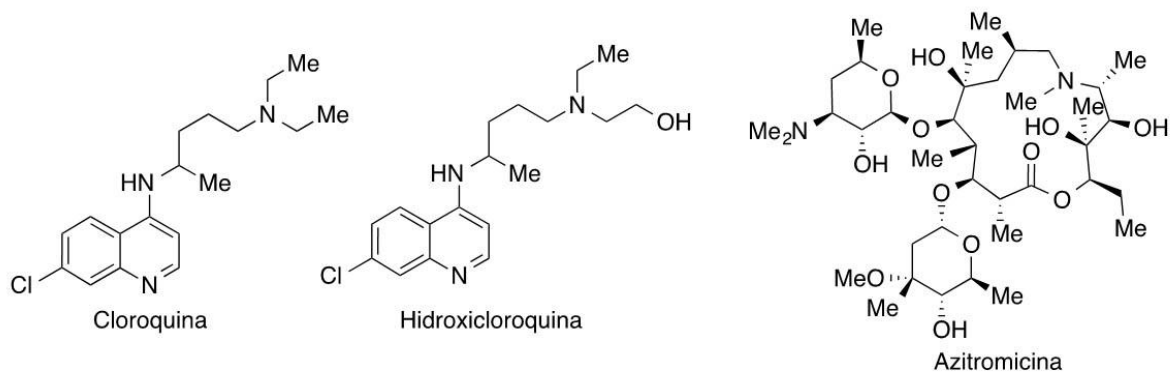


Figura 5. Estructura de los fármacos inmunomoduladores.

2.3.2.1.3 Inhibidores de la transcripción

Dentro de este grupo destacan el remdesivir, ribavirina y favipiravir (**Figura 6**). El remdesivir es un fármaco antiviral usado para tratar la infección por el virus Ébola (Keykavous & Tiwari., 2020). Es un inhibidor de la transcripción que pertenece al grupo análogo de nucleótidos. Este inhibe a la ARN polimerasa dependiente de ARN e induce la terminación temprana del ARN viral. Además, es un profármaco, es decir, deben ser modificados metabólicamente para actuar como inhibidores del ARN polimerasa del virus (Frediansyah., *et al.*, 2021). En julio del 2020 este fármaco fue aprobado para su uso de emergencia contra SARS-CoV-2 en pacientes graves

mayores de 12 años. Remdesivir presenta una CI_{50} de 0.07-5.00 μM *in vitro* y mostró en los estudios clínicos una reducción de la carga viral a lo largo del tiempo con respecto a los individuos no tratados. Este fármaco se administra vía intravenosa con una dosis de 200 mg al primer día y luego 100 mg por 9 días. Actualmente hay más de 7 estudios clínicos en curso con este fármaco ya que ha demostrado ser el más prometedor para el tratamiento de este nuevo coronavirus (Frediansyah., *et al.*, 2021).

Por su parte, la ribavirina se ha usado frente a infecciones del virus de la hepatitis C y el virus respiratorio sincitial (VRS). Actúa como análogo de la guanósina incorporándose al ARN viral y deteniendo su transcripción (Ramírez-Olivencia., *et al.*, 2019). Se ha probado su eficacia *in vitro* en tejidos celulares y se han iniciado estudios clínicos pero aún no se han publicado los resultados para el tratamiento de COVID-19 (Gómez Tejada., *et al.*, 2020).

Finalmente, favipiravir es un fármaco ampliamente usado para tratar infecciones virales de diferentes tipos de virus ARN, aprobado en 2014 para el tratamiento de Influenza en Japón. Además se ha probado su eficacia *in vitro* frente a *Flavivirus*, *Arenavirus*, *Bunyavirus*, *Alphavirus* y coronavirus, emergiendo como un potencial antiviral contra COVID-19 con resultados a nivel clínico positivos. Mayores detalles relativos a su mecanismo de acción, perfil como antiviral, farmacocinética, biodisponibilidad y otros aspectos de carácter químico son descritos en la siguiente sección.

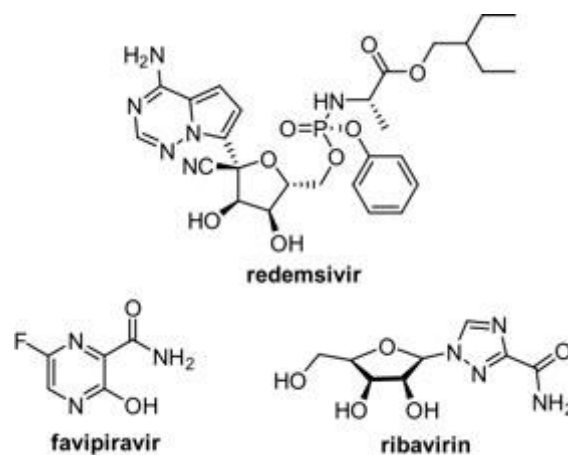


Figura 6. Estructura de inhibidores de la transcripción.

2.4 Favipiravir

Es una 3-hidroxi-2-piracina-carboxamida (nombre IUPAC: 6-flúor-3-hidroxi-2-piracina-carboxamida) que presenta un átomo de flúor en la posición 6 del anillo (**Figura 7**). También es denominado bajo el código T-705 y se distribuye comercialmente con el nombre de Avigan. El fármaco fue desarrollado sintéticamente por Toyama Chemicals y se descubrió por cribado fenotípico utilizando un ensayo de reducción de placa frente al virus de la influenza de una colección de compuestos de la compañía (Joshi & Parkar., 2021). En la industria, el desarrollo de este fármaco estuvo a cargo de FUJIFILM y MediVector (Joshi & Parkar., 2021). En 2014 en Japón, fue aprobado para el tratamiento de infecciones por el virus de la influenza pandémica reemergentes. Su forma de administración es por vía oral, como profármaco y su peso molecular es de 157,10 g/mol. Presenta un amplio espectro de actividad, debido a que la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) existe en varios tipos de virus de ARN (Joshi & Parkar., 2021).

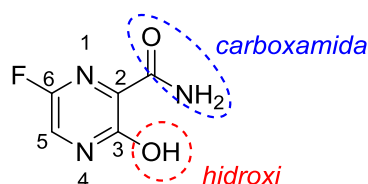


Figura 7. Estructura, numeración y funcionalidades en la molécula de favipiravir.

2.4.1 Mecanismo de acción

Favipiravir es un profármaco y actúa como un análogo de nucleótido de purina, guanina en este caso, compitiendo con los nucleótidos de guanina durante la replicación viral, convirtiendo al favipiravir en el metabolito de favipiravir-ribofuranosil-5B-trifosfato (favipiravir-RTP) mediante fosforribosilación intracelular (**Figura 8**). Este metabolito del favipiravir es el principio activo. Favipiravir presenta varios metabolitos intermedios dependientes de fosforilación, derivados de ribofuranosil-5B-monofosfato (RMP) y ribofuranosil-5B-difosfato (RDP), hasta llegar a su forma activa RTP (Huchting., *et al.*, 2019). Los principales mecanismos mediante los cuales este fármaco inhibe la replicación viral se basan en que este actúa como sustrato de la ARN polimerasa dependiente de ARN. La enzima lo incorpora a la cadena sintetizada, ya que lo confunde con guanina y así interfiere en la síntesis de proteínas virales. La hebra de ARN viral

no se puede seguir extendiendo y se generan proteínas truncas con pérdida de función (Agrawal, U., *et al.*, 2020) & (Joshi& Parkar., 2021).

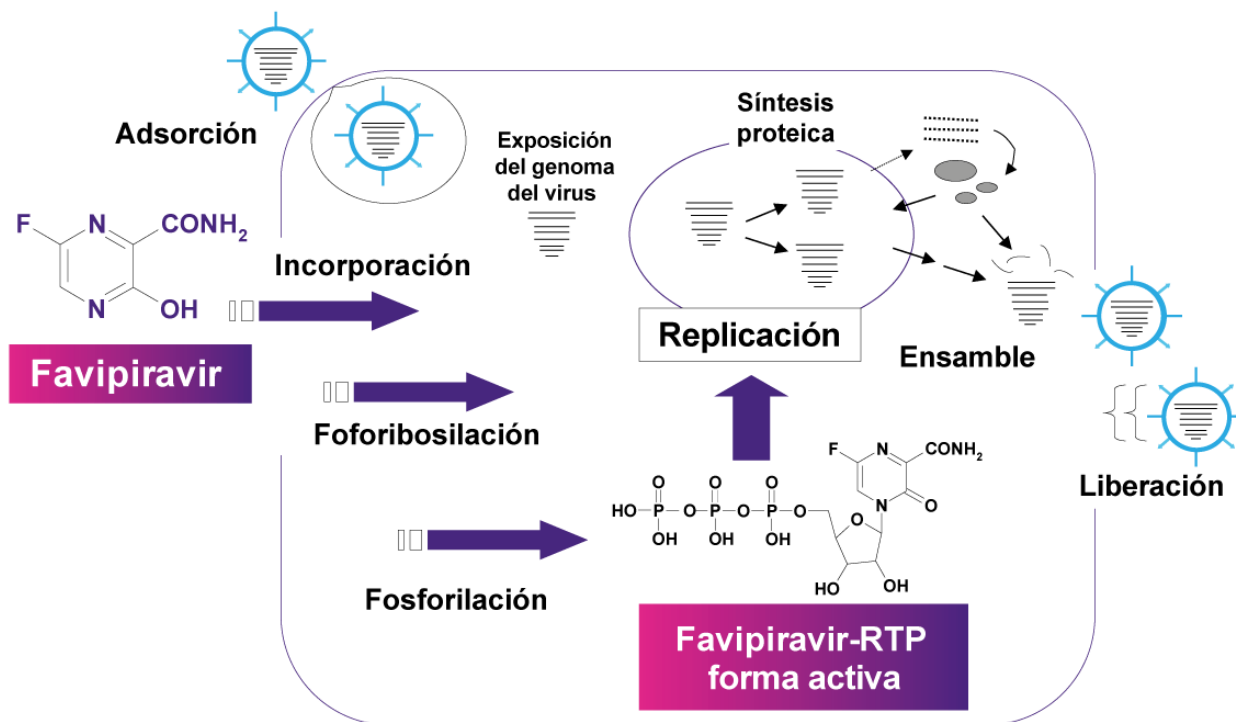


Figura 8. Mecanismo de acción del Favipiravir a partir del tautómero ceto del favipiravir. (Agrawal., *et al.*, 2020)

2.4.2 Usos terapéuticos

Favipiravir es un fármaco antiviral de amplio espectro, siendo utilizado para el tratamiento de infecciones incluyendo influenza, ébola, la fiebre amarilla, el chikungunya, norovirus y enterovirus (Ghasemnejad-Berenji., & Pashapour., 2021). Actualmente, se reposicionó su uso para tratar infección de este nuevo coronavirus en Japón y China, ya que estudios preliminares demostraron que este fármaco reducía la replicación viral. Para 2020, fue aprobado para su uso en Rusia (Özlüşen., *et al.*, 2021).

Se estudió la citotoxicidad *in vitro* en la línea celular Vero E6 y se obtuvo que su CC_{50} en células no infectadas fue mayor a 400 μM mientras que su CI_{50} fue de 61,88 μM para células infectadas con SARS-CoV-2. Derivando de este estudio una selectividad para este compuesto mayor a 6 (Ghasemnejad-Berenji., & Pashapour., 2021).

2.4.3 Estudios clínicos

Actualmente, hay al menos 7 estudios clínicos en humanos en curso con favipiravir como candidato antiviral en varios países como India, Japón, China y Egipto. Los estudios clínicos GETAFIX, FLARE, COVERAGE y VIRCO se centran en la eficacia de los medicamentos en las primeras etapas del tratamiento por COVID-19. COVERAGE se centra especialmente en pacientes de edades avanzadas. Las dosis probadas están en el rango de 1600-2200 mg para el primer día de administración y 600-800 mg para los restantes días del tratamiento. La duración del tratamiento varía según cada estudio clínico y está en el rango de 7 a 14 días totales de tratamiento. En la mayoría de estos estudios clínicos se prueba favipiravir en combinación con otras moléculas como la hidroxiclороquina, tocilizumab, interferon beta 1b. Además se incluyen diferentes tratamientos control como el uso de umifenovir, darunavir, lopinavir/ritonavir, etc. (Srinivasan & Rao., 2021).

El estudio de Chen *et al* informó que el tratamiento con favipiravir no tuvo mejoras significativas al cabo del día 7, en comparación con el control de umifenovir realizado en China. Por otro lado Zhao *et al.* informó una diferencia significativa en la disminución de la lesión pulmonar al día 14 entre el grupo en combinación con favipiravir y el que no, siendo mayor para este último. Otros estudios encontraron que favipiravir mostró efectos de tratamiento significativamente mejores en COVID-19 en términos de progresión de la enfermedad y eliminación viral, en comparación con el tratamiento control. También se han registrado resultados moderadamente positivos para pacientes en las etapas tempranas de la enfermedad así como sobre personas mayores de 60 en estudios independientes (Srinivasan & Rao., 2021).

Si bien algunos estudios clínicos han arrojado resultados benéficos para la utilización de favipiravir en combinación con otras moléculas, más investigaciones son requeridas desde experimentos en fase preclínicas y clínicas para determinar el potencial real de este fármaco como antiviral (Ghasemnejad-Berenji & Pashapour., 2021). Otros aspectos a tener en cuenta sobre su uso es obtener la dosis adecuada, el momento de administración y los tiempos de tratamiento.

2.4.4 Farmacocinética y biodisponibilidad

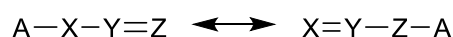
La farmacocinética es uno de los puntos críticos del favipiravir. Primeramente, el fármaco en humanos alcanza una concentración máxima (C_{max}) media de 51.5 $\mu\text{g/mL}$ luego de la primera administración de la dosis (día 1: 3200 mg; día 2-5: 1200 mg). Esto se logra después de 2 primeras horas de administración y posteriormente, comienza a decrecer rápidamente con un tiempo de vida media de 2.5-5.5 horas (Madelain., *et al.*, 2016). Datos obtenidos de 66 pacientes mostró un notable decrecimiento del favipiravir sobre el día 4 con una concentración máxima de 25.9 $\mu\text{g/mL}$ comparado a las concentraciones al día 2 de 46.1 $\mu\text{g/mL}$ y del día 1 de 51.5 $\mu\text{g/mL}$ (Nguyen., *et al.*, 2017). Más investigaciones farmacocinéticas del favipiravir en primates mostraron un comportamiento no lineal en el tiempo para un rango de dosis con una continua declinación en plasma después de los 7 días de administración (Madelain., *et al.*, 2017). Otras investigaciones han estudiado la dinámica de la biodistribución en modelos murinos utilizando favipiravir marcado con radioisótopos de ^{18}F mediante escaneo dinámico de emisión positrónica y conteo gamma. Del estudio se encontró una rápida acumulación del favipiravir marcado después de administración intravenosa en hígado, riñones e intestino. Interesantemente para animales pretratados con favipiravir, se encontró un decrecimiento de concentración de favipiravir en plasma por alrededor del 25-50% y un incremento de 2 a 5 veces en hígado, estómago, cerebro y tejido muscular. (Bocan., *et al.*, 2019). Es importante mencionar que favipiravir es modificado metabólicamente en hígado por la enzima aldehído oxidasa (AO) para mejorar su hidrosolubilidad, y parcialmente modificado por xantina oxidasa, generando un metabolito inerte T-705M1 excretado por riñones bajo la forma hidroxilada (Madelain., *et al.*, 2016) & (Joshi & Parkar., 2021). Todas estas evidencias permiten explicar el decrecimiento en la concentración en plasma y, esto obliga a que altas dosis del favipiravir sean administradas para lograr un efecto terapéutico óptimo.

Respecto a la administración en pacientes, el régimen de administración oral de favipiravir se encuentra en 3200 mg para el día 1 (1600 mg cada 12 horas), seguido por 600 mg dos veces al día sobre días 2-5 (Wang., *et al.*, 2020). Altas dosis de 1800 mg (2 veces por día) han sido reportada para experimentaciones de fase clínica II. Estas dosis garantizan una óptimo efecto terapéutico con un 54 % de acumulación en proteínas plasmáticas en humanos (Du & Chen., 2020).

En definitiva, la fácil metabolización del favipiravir por las reacciones a nivel del grupo hidroxilo, que favorece el mecanismo de eliminación y excreción, sugieren que la protección de ese grupo hidroxilo puede ser de gran importancia para el diseño de nuevos sistemas terapéuticos basados en favipiravir *O*-protegidos con grupos lábiles para favorecer sus propiedades farmacocinéticas y eludir la formación de metabolitos inactivos.

2.4.5 Importancia del tautomerismo

Uno de los últimos aspectos a describir del favipiravir es el tautomerismo de la molécula y su potencial rol en la actividad biológica del sistema. El tautomerismo es un mecanismo mediante el cual una determinada molécula puede adquirir dos formas diferenciadas por la posición de un grupo funcional y la posición del doble enlace, y ellas coexisten a través un equilibrio químico (McNaught & Wilkinson., 1997). En el equilibrio tautomérico un grupo o átomo migra a otra posición del sistema tal como se muestra a continuación:



Para el caso del favipiravir, este se encuentra bajo dos formas tautoméricas: (i) forma enólica y (ii) forma cetónica (**Figura 9**).

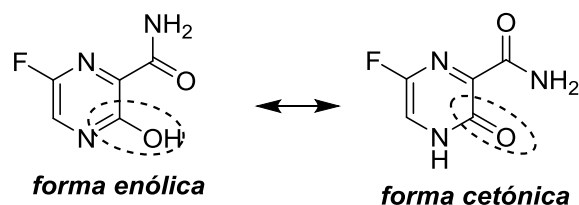


Figura 9. Equilibrio tautomérico entre la forma enólica y cetónica del favipiravir.

El tautomerismo es un concepto de gran importancia para la interpretación de diversos procesos biológicos. Por ejemplo, el residuo de histidina se encuentra habitualmente en los sitios activos de las enzimas debido a que la tentativa localización del protón entre los dos nitrógenos del anillo de imidazol favorece el tautomerismo que puede tener relevancia para completar pasos catalíticos. También la forma ceto-amino de la núcleo-bases del ADN juegan un rol relevante en la formación del par de bases de Watson-Crick (Singh., *et al.*, 2015). Este concepto ha sido ampliamente empleado para el diseño de agentes terapéuticos anticáncer y antivirales. (Katritzky., *et al.*, 2010). Muchos de ellos son basados en inducir una mutagenesis letal, donde el

nucleósido mutagénico al incorporarse en el genoma viral promueve una cierta tasa de mutación en la cadena de ARN viral que frena la replicación.

Respecto al favipiravir, algunos pocos estudios teóricos deducen que la forma enólica es la más estable termodinámicamente que la forma cetónica (Yasir., & Hanoon., 2020) & (Assis., *et al.*, 2021). Una comparativa del favipiravir con su análogo no halogenado, sustituido por hidrógeno en la posición 6, y sus análogos halogenados, reflejo que el halógeno tiene una influencia en el equilibrio tautomérico y este favorece el tautómero ceto en el siguiente orden: $6H > 6I > Br \approx 6Cl > 6F$. (Umar., 2020). Recientemente, en paralelo a esta investigación, nuestro grupo confirmó mediante un estudio en solución y en estado sólido el mencionado orden, encontrando que el derivado no halogenado se encuentra casi en un 100 % bajo la forma cetónica en solución acuosa, los derivados halogenados de cloro, bromo e iodo se encuentra bajo un mayor equilibrio, mientras el derivado fluorado (favipiravir) se encuentra mayoritariamente bajo la forma enólica. Aunque no existen evidencias sobre la relación entre la actividad antiviral de este tipo de 3-hidroxi-2-piracinarboxamida con el tautomerismo, es posible considerar que la forma tautomérica ceto puede favorecer la ruta de la *N*-ribosilización de la 3-hidroxi-2-piracinarboxamida al metabolito activo de favipiravir-RTP (Figura 8).

Muy recientemente, se encontró que el derivado no halogenado que tiene preferencia por la forma ceto en solución, llamado como T-1105, presentó una actividad antiviral *in vitro* comparable al favipiravir contra virus de influenza MDCK, A549, Vero y HEK293T, pero con un punto muy a favor que fue la detección de un alto porcentaje del metabolito activo de T-1105-RTP (Umar., 2020). La formación de los metabolitos de RTP tanto de T-705 como de T-1105 pasa previamente por la formación de sus correspondientes metabolitos de RMP y RDP, siendo el paso limitante la conversión del antiviral a su forma de RMP (Huchting., *et al.*, 2019). En un estudio particular se vio que cuando se incubaba el metabolito activo T-705-RTP a altas concentraciones frente al virus Influenza ocurre la terminación de la transcripción. Mientras que cuando esta presente a concentraciones bajas este metabolito genera partículas virales no infecciosas (Huchting., *et al.*, 2018). Esta reactividad relativa del derivado no fluorado, T-1105, respecto al favipiravir sugiere que el tautomerismo puede jugar un rol importante en la reactividad de estas piracinas hacia la *N*-ribosilización, siendo la forma tautomérica, que es la más conveniente para este mecanismo. Todos estos indicios teóricos y experimentales sobre tautomerismo y estos últimos hallazgos de evaluación antiviral para el derivado no halogenado

representan un estímulo para la preparación y evaluación contra especies de coronavirus de análogos del favipiravir halogenados y no halogenados, que puedan ser más activos que el favipiravir por su tendencia a favorecer el tautómero ceto.

2.5 Importancia de la lipofilicidad para el diseño de agentes terapéuticos

El descubrimiento y diseño de fármacos consiste en la identificación y caracterización de nuevas moléculas con actividad biológica *in vitro* e *in vivo* frente a una patología determinada. Este es un proceso largo, entre 12 a 15 años, hasta llegar al mercado farmacéutico y por último, a los pacientes. Solo un 10 % del total de las nuevas moléculas que se proponen llegan a culminar todo el proceso. Además, para que un fármaco tenga éxito se necesita que este llegue al sitio específico donde ejerce su acción y para ello debe atravesar varias membranas biológicas. Las propiedades de solubilidad, la estabilidad, la permeabilidad son de los primeros pasos para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. En este sentido, el concepto de lipofilia es un factor importante para el diseño de agentes terapéuticos. La lipofilia se define como una propiedad fisicoquímica que presentan las moléculas que tienen afinidad por los lípidos. La lipofilia determina la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de un compuesto en el organismo (ADMET). Existen ciertas limitaciones en cuanto a la lipofilia, donde valores altos promueven una mayor probabilidad de presentar promiscuidad con el receptor y suelen ser una limitante para ensayo *in vivo* debido a su pobre solubilidad en solución acuosa. Por otra parte, una baja lipofilicidad genera inconvenientes propiedades de ADMET debido a su baja permeabilidad a través de la membrana celular (Arnott., & Planey., 2012). & (Schnider., 2021). En ese sentido, las reglas de Lipinski establecen criterios moleculares que permiten diseñar un sistema ajustado a una farmacocinética conveniente y, estos criterios que debe cumplir la molécula para proveer ADMET convenientes destacan: (i) número de enlace de hidrógeno donantes inferior a 5; (ii) número de enlace de hidrógeno aceptores menores a 10; (iii) una masa molecular inferior a 500 Dalton; (iv) coeficiente de partición (Log P) octanol-agua menor a 5. Aunque este criterio no nos confirma si una molécula será activa, si representa un buen criterio para tener un sistema con propiedades ADMET apropiadas y el aspecto crucial es, que no se deben presentar más de dos incumplimientos de este postulado (Arnott., & ., 2012). Favipiravir es un compuesto antiviral con baja permeabilidad celular, una de los motivos es que sus donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno tienen potencial para formar cristales. Se sabe que

los fármacos amorfos suelen tener mayor solubilidad en comparación con las formas cristalinas. En estudios experimentales *in vitro* se han obtenido nuevas formulaciones de favipiravir que han mejorado la permeabilidad del compuesto y para ello se han utilizado una sal y tres cocrystalos; FPV-piperazine (FPV-PP), teofilina (FPV-TP), FPV-sacarina (FPV-SAC) y FPV-5-fluorouracilo (FPV-5FU) respectivamente. Estos son utilizados para mejorar las propiedades fisicoquímicas de los principios activos de los fármacos. (Wang., *et al.*, 2021)

La relativa solubilidad de favipiravir en solución acuosa así como la facilidad de este sistema a generar metabolitos inactivos fácilmente excretables, que afecta la concentración efectiva del fármaco en el organismo, sugieren que grupos lipofílicos y removibles pueden ser incorporados mediante funcionalización química sobre el grupo hidroxilo del favipiravir en orden de eludir estos mecanismo de eliminación y poder generar propiedades ADMET más convenientes. Entre los grupos lipofílicos y removibles ampliamente utilizados para el diseños de agentes terapéuticos se destacan el grupo acetilo ($\text{CH}_3\text{COO-}$), carbamato ($-\text{RN-COO-}$), metil (CH_3-), butoxy-carbonil (BOC), benzoloxo, triflato ($\text{CF}_3\text{-SO}_2-$), entre otros grupos (**Figura 10**) (El-Dakdouki., & Erhardt., 2012) & (Ghosh., & Brindisi., 2015). Estos sustituyentes incrementan la lipofilicidad de los precursores y actúan como profármacos que puede presentar un mejor biodisponibilidad, mejorar el transporte y puede liberar el principio activo no protegido progresivamente vía hidrólisis u otro tipo de mecanismo de cleavage.

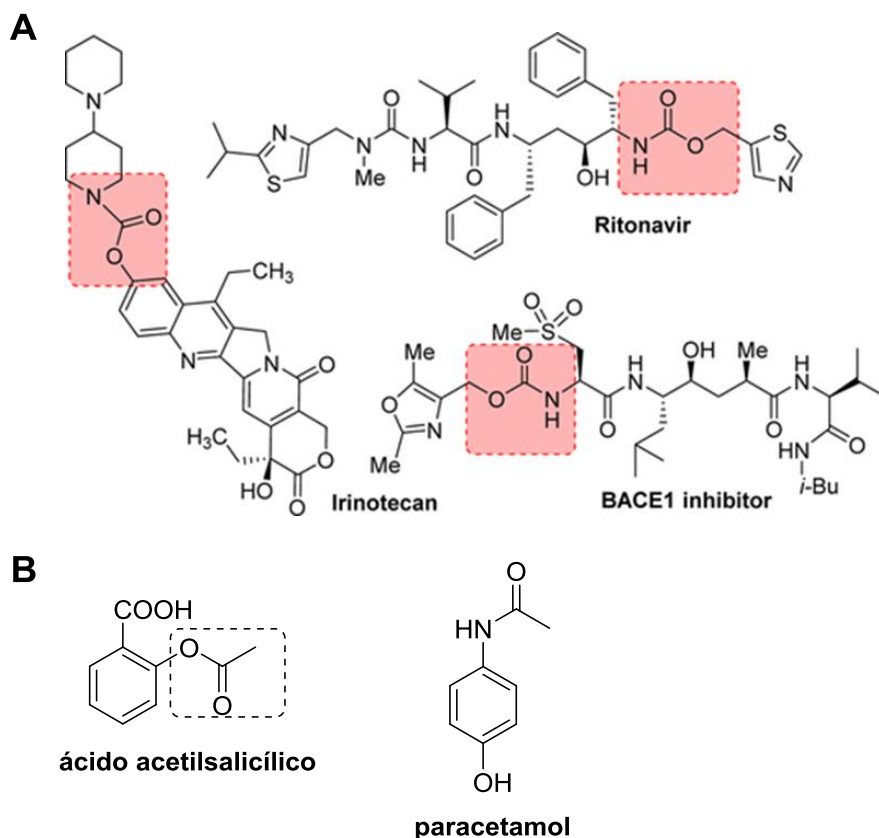


Figura 10. Ejemplo de grupos removibles de carbamato (**A**) y acetilo (**B**) en fármacos conocidos.

2.6 Funcionalización química con grupos removibles

Un grupo removible se define de acuerdo a la IUPAC, como un átomo o sustituyente que se remueve durante una reacción en un paso simple (Gold Book: leaving group., IUPAC., 2009). Entre los grupos removibles más comunes en la química destacan: acetilo (CH_3COO^-), triflato (CF_3COO^-), carbamato ($\text{RO-CO-N}(\text{R})_2$), tosilato (*p*-toluen-sulfonato), bencilo ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2^-$), metilo (CH_3^-), sililo [$(\text{CH}_3)_3\text{Si}^-$], benzoilo (ArCOO^-), metanosulfonate (CH_3SO_2^-). Para la presente investigación se trabajaron con 5 grupos removibles, dos de ellos de fácil remoción bajo condiciones suaves tales como el acetilo y triflato, otros dos de mayor rigidez tales como bencilo y metanosulfonato y uno de moderada remoción tal como el sililo. El grupo acetilo es de amplio uso no sólo como grupo protector en procesos químicos sino para el diseño de agentes terapéuticos con la idea de eludir algún mecanismo de metabolización o aumentar la lipofilicidad

del sistema de interés (Wuts., *et al.*, 2012). Para la incorporación de un grupo removible es necesario considerar la estrategia para formar la funcionalidad y, en segundo lugar evaluar su remoción.

En relación al grupo acetilo, este se incorpora a grupos hidroxilos de sistemas tipo fenoles con buenos rendimientos (~ 90%) mediante el uso de cloruro de acilo ó anhídrido acético como agente acilante a temperatura ambiente con cortos tiempos (menores a 1 hora) y con el uso de una base. Catalizadores especializados son necesarios para la acetilación de phenols impedidos estéricamente. El grupo acetilo es fácilmente removido bajo condiciones suaves con bases débiles en solución acuosa a temperatura ambiente en tiempos cortos, obteniendo el derivado desprotegido en altos porcentajes de rendimiento. Alternativamente el empleo de ácidos de Bronsted ó ácidos de Lewis son comúnmente usados para la desacetilación. Por su parte, el triflato fenólico es generalmente formado en presencia de base y anhídrido trifílico a temperatura ambiente sobre un solvente orgánico (DMF, THF ó CH₂Cl₂). Este puede ser cleavado con el uso de base fuerte ó moderada en solvente orgánico con rendimientos de 70-90%. Otro tipo de sulfonato tal como el metilsulfonato es un grupo estable, inclusive bajo condiciones extremas de temperatura, tiempo y bases fuertes. Generalmente, se obtienen de la reacción del grupo hidroxilo del fenol con cloruro de metanosulfónico en presencia de base en un solvente orgánico. El grupo protector es removido bajo calentamiento con el uso de base fuerte como NaOH u otras condiciones más suaves pero con uso de bases más fuertes como LDA (Litio diisopropilamida), LHMDs (litio bis(trimetilsilil)amida) o TMSOK (trimetilsilanolato de potassium)/CH₃CN. La funcionalización de fenoles con grupo sililo es realizada con el uso de cloruro de trimetilsilano con el uso de base como piridina a 30-35 °C con rendimientos satisfactorios. Este se puede remover en un reflujo en solución metanol acuoso. También el uso de ión flurouro, ácidos débiles o bases débiles. Finalmente, la funcionalización con grupo bencilo resulta en un grupo rígido ante la desprotección. En general, bencil-eter es preparado de un fenol tratado con un haluro de bencilo en presencia de base. La reacción es susceptible a efectos estéricos. La remoción del grupo bencilo de la naturaleza del anillo de bencilo, siendo grupos donadores aquellos que favorecen el proceso de desprotección mientras grupo electrón-atradores contrariamente decrecen la eficiencia en la desprotección. Para la desprotección algunas condiciones especiales son requeridas: (i) uso de ácido de Lewis tale como BF₃-Et₂O en combinación con EtSH a temperatura ambiente, (ii) ácido trifluoroacético en

presencia de $\text{CF}_3\text{OSO}_2\text{F}$ y PhSCH_3 a 0°C por 30 minutos. Bencilo conectado a fenoles con grupos ester o amido orto- respecto al hidroxilo son desprotegidos más rápidamente que los meta y mucho más que los para-sustituidos.

2.7 Justificación

Por todo lo descrito anteriormente, el favipiravir representa un agente antiviral muy importante para reposicionamiento, por su baja toxicidad, relativa alta solubilidad en solución acuosa y por su alta selectividad como inhibidor de la ARN polimerasa, una enzima clave en la replicación del coronavirus. Diversas investigaciones a nivel preclínico e inclusive clínicos indican el potencial de este antiviral contra diversas enfermedades virales provocadas por virus ARN incluyendo el COVID19. Sin embargo, la eficiencia terapéutica del favipiravir se encuentra bajo cuestionamiento y nuevas investigaciones son requeridas para su mejoramiento. La falta de eficacia de este antiviral puede estar determinada al menos por dos factores tales como lo son: (i) su desfavorable farmacocinética que compromete su efectiva acumulación en plasma y favorece su fácil eliminación y excreción por su alta acumulación en hígado y riñones y (ii) su menor relativa reactividad para formar el metabolito activo de T-705-RTP comparada al derivado no fluorado, lo cual compromete su eficacia terapéutica. Ambos factores pueden explicar las altas dosis que son requeridas de favipiravir para promover un efecto terapéutico óptimo.

Para abordar estos dos aspectos, en la presente investigación se planteó el diseño, síntesis química y evaluación antiviral *in vitro* contra dos modelos de coronavirus de nuevos análogos de favipiravir funcionalizados a nivel del grupo hidroxilo con grupos lipofílicos removibles (acetilo, triflato, metanosulfónico, bencilo y trimetilsilano) (**Figura 11A**) y otros derivados funcionalizados en la posición 6 del anillo de piracina con sustituyentes de halógenos (Cl, Br, I) e hidrógeno (**Figura 11B**). La primera funcionalización busca mejorar la lipofilidad del favipiravir y de favorecer la acumulación del fármaco en membrana, que es crucial para la fosforribosilación. Mientras el segundo grupo de derivados buscan un mejoramiento de la eficacia del favipiravir mediante la modulación del tautomerismo hacia la forma cetónica que es tentativamente preferida para la fosforribosilación. La forma ceto en solución es favorecida de acuerdo a la sustitución en posición 6 del anillo de piracina en el siguiente orden: 6H>> 6-I> 6-

Br > 6-Cl > 6-F. La incorporación de estos halógenos por el flúor es esperado que también incremente la lipofilidad del sistema, siendo otro punto a favor.

El presente estudio es completamente novedoso ya que los derivados *O*-funcionalizados son completamente nuevos y no existen reportes de los derivados halogenados **1b-d** contra coronavirus. Hasta el momento solo hay estudios *in vitro* para el derivado no halogenado (T-1105) pero basados en el virus Influenza. Estudios teóricos de dinámica molecular sobre ARN polimerasa del SARS-CoV-2 han mostrado que los derivados halogenados **1b-d** e hidrogenado **1e** presentan una interacción en el sitio activo de dicha ARN polimerasa comparable al favipiravir con una disposición espacial similar (Umar., 2020).

Con estos antecedentes, se planteó mejorar la eficacia del favipiravir *in vitro* en dos modelos de Coronavirus a partir de una investigación sobre el rol del halógeno, partiendo de una comparación con sus derivados halogenados y no halogenados. Asimismo, se propone evaluar cómo puede influir el aumento de la actividad antiviral acompañado de un aumento de la lipofilidad por la incorporación de grupos removibles de diferente labilidad tales como los grupos acetilo, triflato, metanosulfónico y bencilo. Con esto último no solo podemos ver la importancia relativa del grupo hidroxilo sino también el equilibrio tautomérico.

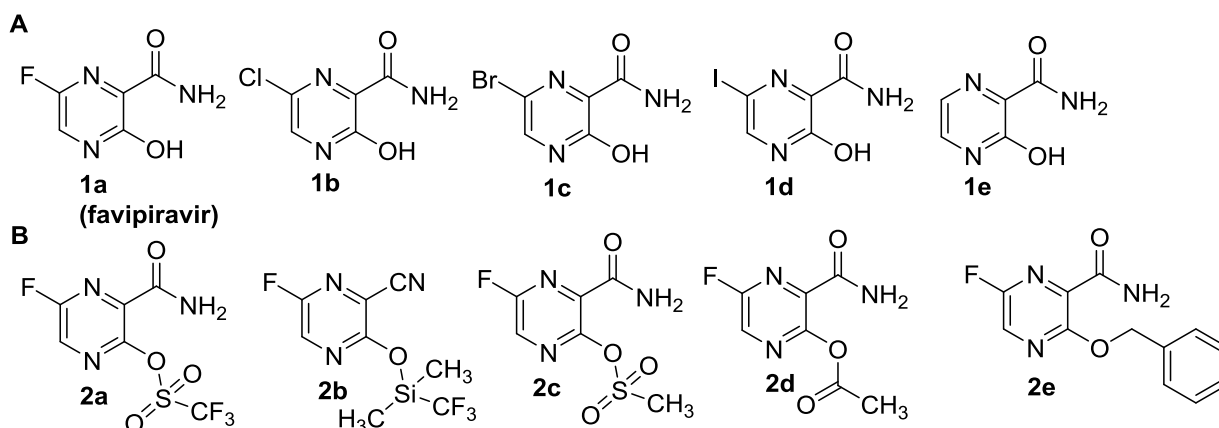


Figura 11. Compuestos diseñados para abordar el posible rol del tautomerismo (**A**) y la lipofilidad (**B**).

Concretamente esta investigación busca responder las siguientes preguntas:

¿Tiene el favipiravir y sus derivados funcionalizados actividad antiviral *in vitro* en dos modelos de Coronavirus?

¿Es posible mejorar la eficacia del favipiravir con el incremento de lipofilicidad incorporando grupos removibles con diferente labilidad?

¿Es posible mejorar la eficacia del favipiravir con la modulación del tautomerismo hacia tautómero ceto mediante funcionalización química en posición 6 del anillo de piracina con halógenos e hidrógeno?

¿Cuál será el rol del halógeno y demás funcionalizaciones (hidroxilo, acetamido) en la actividad antiviral del favipiravir en un modelo de Coronavirus?

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- El Favipiravir presenta actividad antiviral *in vitro* frente a un modelo de Coronavirus.
- El aumento de la lipofilia en la molécula de favipiravir aumenta la penetración de membranas biológicas con el concomitante aumento de la actividad antiviral.
- Derivado no halogenado presenta una actividad comparable al favipiravir contra virus de influenza con una mayor capacidad de formar el metabolito activo de RTP.
- Derivados halogenados (6-Cl, 6-Br y 6-I), análogos de favipiravir sustituidos en la posición 6 del anillo de piracina, presentan una inhibición comparable al favipiravir de estudios *in silico* utilizando la ARN polimerasa como blanco
- El tautomerismo hacia la forma cetónica es favorecido de acuerdo a la sustitución en la posición 6 del anillo de piracina en el siguiente orden: 6H>> 6-I> 6-Br > 6-Cl > 6-F.

4. OBJETIVOS

Identificar una funcionalidad química que permita obtener un sistema que no altere o mejore la actividad antiviral *in vitro* respecto al favipiravir en un modelo de Coronavirus.

4.1 Específicos

- Sintetizar y caracterizar los derivados de favipiravir funcionalizado con grupos removible a nivel del grupo hidroxilo
- Sintetizar y caracterizar los derivados de favipiravir funcionalizado con halógenos en la posición seis
- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de favipiravir y sus derivados funcionalizados en dos líneas celulares de mamíferos
- Evaluar la actividad antiviral *in vitro* de favipiravir y sus derivados funcionalizados contra dos modelos virales de la familia *Coronaviridae*
- Evaluar si la actividad antiviral puede ser mejorada con la incorporación de grupos lábiles
- Identificar el rol de las diferentes funcionalidades (flúor, hidroxilo y amido) en la actividad antiviral del favipiravir
- Identificar un profármaco potencial agente activo de baja toxicidad y buena actividad antiviral.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Aspectos Químicos

5.1.1 Generalidades

Para llevar a cabo la síntesis y caracterización de los compuestos orgánicos presentados en este trabajo, se dispuso de los siguientes materiales y equipos:

- Material de vidrio presente en el Laboratorio de Química Orgánica Medicinal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Evaporación de solventes a presión reducida (puntos de ebullición bajos y medios). La destilación de solventes tales como CH_2Cl_2 , CHCl_3 , *n*-hexano y acetato de etilo fueron realizados en un rotaevaporador marca BUCHI, modelo R-114, conectado a un baño de calentamiento marca BUCHI, modelo B-180, y a una bomba de vacío de marca Welch.
- Puntos de fusión: los puntos de fusión fueron medidos en un fusiómetro marca Fisher-John con un termómetro de 300 °C (± 1), y no están corregidos.
- Resonancia Magnética Nuclear (RMN): los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ^{19}F -RMN, $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC y $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC fueron realizados en un espectrómetro marca BRUKER Avance DPX-400 (400 MHz para los experimentos de ^1H -RMN; 100 MHz para ^{13}C -RMN), tomados en solventes deuterados como CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$.
- El avance de las reacciones y la pureza de los productos obtenidos se controlaron por cromatografía en capa fina con fase estacionaria sílica-gel (Kieselgel 60 F254) de la firma Merck y disolventes adecuados como fase móvil. Los métodos empleados para revelar las placas de TLC fueron: exposición a luz ultravioleta y exposición a vapores de yodo.

Los siguientes reactivos fueron empleados sin previo tratamiento: Ácido clorhídrico (35%), ácido sulfúrico (95%), ácido fosfórico (80 %), acetato de cerio (III), persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), yoduro de potasio (KI), trietilamina, piridina, bromuro de 4-nitrobencilo y cloruro de acilo (Merck); hidróxido de sodio; fosfato de potasio tribásico, anhídrido triflico (anhídrido

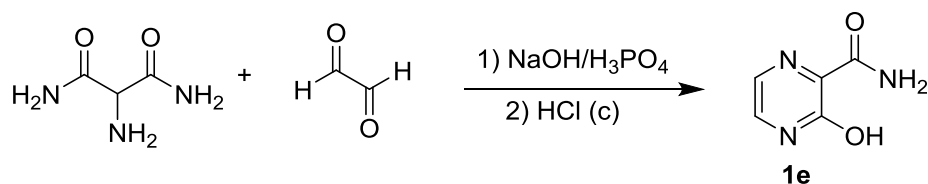
trifluorometanosulfónico), anhídrido acético, cloruro de metanosulfonilo, azida de trimetilsililo, cloruro de bencilo y ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich Co); 2-amino malondiamida y glioxal 40%, 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincaboxamida (favipiravir), 6-cloro-3-hidroxi-2-piracincaboxamida (PharmaChemm).

Respecto a los solventes, Diclorometano (Merck), acetato de etilo (Droguería Uruguaya), *n*-hexano (Droguería Uruguaya y Merck), THF (Sigma-Aldrich Co) y acetonitrilo (Merck) fueron previamente purificados según un procedimiento de tratamiento y posterior destilación de acuerdo a técnica descrita en literatura (Vogel, A., 1956). Tolueno (Merck) y Dicloroetano (Sigma-Aldrich Co) fue utilizado sin previa purificación.

5.1.2 Procedimientos de síntesis

5.1.2.1 Síntesis de derivados 6-halógenados de 3-hidroxi-2-piracincaboxamida

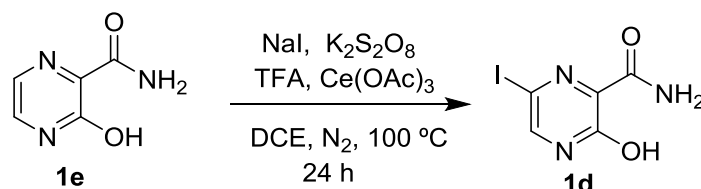
5.1.2.1.1 Síntesis de 3-hidroxi-2-piracincaboxamida **1e**



Para la preparación del derivado **1e**, se tomó como base un procedimiento reportado con algunas modificaciones (Nro. Patente *JP 5739618B2*). En un balón fondo redondo (250 mL) de dos bocas provisto de un condensador y un embudo de adición, se adicionaron 2-amino malondiamida (2,00 g; 17.1 mmol; 1 equiv.) y 12 mL de buffer fosfato constituido por los siguientes reactivos: 0.3 g de NaOH (7.5 mmol, 0.44 eq), 0.4 g de H₃PO₄ 85 % (4.1 mmol, 0.24 eq). Se adicionó simultáneamente desde 2 ecualizadores, gota a gota, 0.76 g de NaOH (19 mmol, 1.1 eq) disueltos en 2 mL de H₂O y 2.64 g de glioxal 40% (45.5 mmol, 2.7 eq). Se mantuvo el sistema bajo agitación durante una hora a temperatura ambiente, luego se adicionan 0.5 mL de HCl concentrado, se calentó a 80 °C y se adiciono 1.2 mL de HCl concentrado. La solución resultante se enfrió hasta temperatura ambiente y el sólido resultante se filtró al vacío,

obteniendo un sólido de color beige. Rf.: 0.2 (AcOEt). Rendimiento: (1.9 g, 80.2 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, δ ppm, J Hz, $\text{DMSO-}d_6$): 7.80-8.30 (m, 3H); 8.71 (s, 1H); 13.36 (s, 1H). P.f.: 247-250 °C (descomposición).

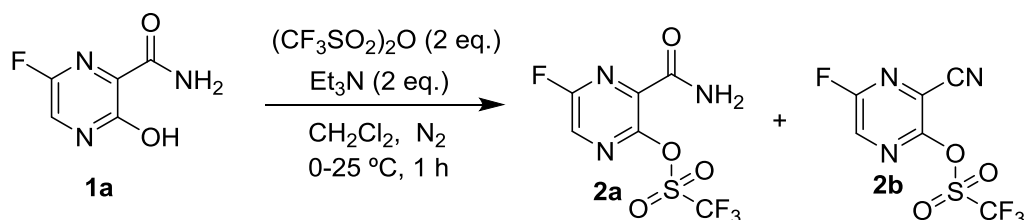
5.1.2.1.2 Síntesis de 6-iodo-3-hidroxi-2-piracincaboxamida **1d**



Para la síntesis química del derivado **1d**, se tomó como base un procedimiento anteriormente reportado para la yodación de sistemas heterocíclicos análogos tales como quinolinas, piridonas y uracilos (Dutta., *et al.*, 2015). En un balón de dos bocas equipado con condensador y bajo atmósfera de nitrógeno, se adicionó 3-hidroxi-2-piracincaboxamida **1e** (0.05 g; 0.36 mmol; 1 equiv.), NaI (0.16 g, 1.08 mmol, 3 equiv.), $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0.19 g, 0.72 mmol, 2 equiv.), TFA (0.041 g, 0.36 mmol; 1 equiv.), Ce(OAc)_3 (0.31 g, 0.72 mmol, 2 equiv.) 3 mL de diclorometano. Se calentó el sistema a 100 °C bajo agitación por 18 horas. La reacción se sigue por TLC. El crudo fue purificado mediante cromatografía en columna utilizando SiO_2 como fase estacionaria y una mezcla AcOEt/*n*-hexano (1:9) como fase móvil y, se obtuvo un sólido amarillo. Rf.: 0.6 (AcOEt). Rendimiento: (0.0211 g, 22 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, δ ppm, J Hz, $\text{DMSO-}d_6$): 8.38 (s, 1H); 8.62 (s, 2H); 13.44 (s, 1H). P.f.: 207-209 °C.

5.1.2.2 Síntesis de derivados funcionalizados de favipiravir

5.1.2.2.1 Reacción de 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincaboxamida con anhídrido trifílico



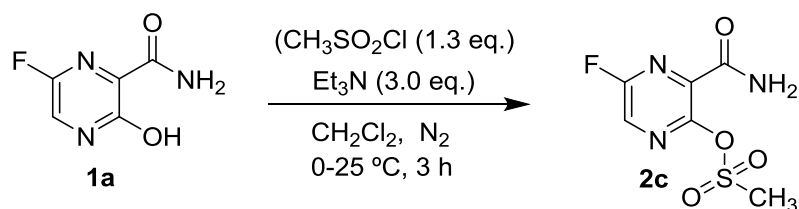
El procedimiento experimental fue diseñado en el presente trabajo, tomando como base procedimiento de esterificación de alcoholes (Sakakura., *et al.*, 1968). En un balón de dos bocas

equipado bajo atmósfera de nitrógeno, se introdujo 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincarboxamida **1a** (0.100 g; 0.64 mmol; 1 equiv.) disuelto en 3 mL de diclorometano. La mezcla se enfrió a 0 °C, se adicionó lentamente trietilamina (0.12 g; 1.27 mmol; 2 equiv.), seguido de anhídrido tríflico (0.36 g; 1.27 mmol; 2 equiv.) bajo agitación constante. La mezcla se dejó en agitación por 15 minutos a 0 °C, pasado este tiempo se llevó a temperatura y se dejó bajo agitación por 1 hora. La reacción se siguió por TLC. Terminada la reacción, se evaporó el solvente por destilación al vacío y el crudo fue purificado mediante cromatografía en columna utilizando SiO₂ como fase estacionaria y una mezcla *n*-hexano/AcOEt. De la reacción, dos productos con distinguibles R_fs fueron obtenidos y, diferentes proporciones *n*-hexano/AcOEt fueron empleadas para separar ambos productos tal como describimos a continuación: *n*-hexano/AcOEt (9:1) para aislamiento de producto **2b** y *n*-hexano/AcOEt (8:2) para obtener el producto **2a**.

3-(trifluorometilsulfonilo)-6-fluoropiracina-2-carboxamida 2a: sólido blanco. R_f: 0.8 (AcOEt). Rendimiento: (0.062 g, 33.7 %). ¹H-RMN (400 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): 8.82-8.84 (d, 1H, *J*_{H-F} = 8.0); 8.43 (s, 1H, NH); 8.14 (s, 1H, NH). ¹³C-RMN (100 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): 162.27; 158.99-156.46 (d, *J*_{C-F} = 254.0); 147.40; 136.04-135.61 (d, *J*_{C-C-F} = 43.0); 136.00-135.90 (d, *J*_{C-C-C-F} = 10.0); 123.20-120.06-116.86-113.67 (c). ¹⁹F-RMN (500 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): -75.97 (C_{Ar}-F); -72.04 (CF₃). P.f: 163-164°C (Descomposición).

3-(trifluorometilsulfonilo)-6-fluoropiracina-2-carbonitrilo 2b: aceite amarillo. R_f: 0.9 (AcOEt). Rendimiento: (0.006 g, 3.45 %). ¹H-RMN (400 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): 8.49-8.47 (d, 1H, *J*_{H-F} = 8.0). ¹³C-RMN (100 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): 159.11-156.50 (d, *J*_{C-F} = 261.0); 151.08-151.11 (d, *J*_{C-C-C-C-F} = 3.0); 135.87-135.47 (d, *J*_{H-F} = 40.0); 123.19-119.99-116.80-113.61 (c); 119.20-119.08 (d, *J*_{C-C-C-F} = 12.0); 110.33 (s, CN). ¹⁹F-RMN (500 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): -75.97 (C_{Ar}-F); -72.04 (CF₃).

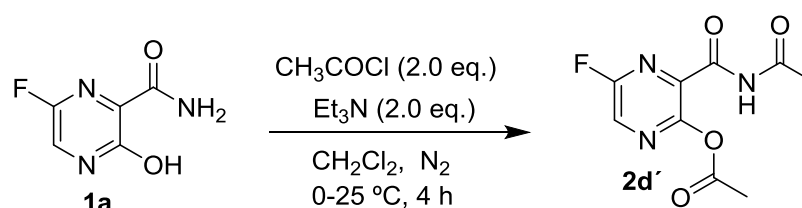
5.1.2.2.2 Síntesis de 3-(metilsulfoniloxi)-6-fluoropiracin-2-carboxamida **2c**



El procedimiento experimental fue diseñado en el presente trabajo, tomando como base algunos protocolos para la metanosulfonación de fenoles (Bonner., & McNamara., 1968) & (Sakakura., *et al.*, 2007). En un balón de dos bocas de 25 ml bajo atmósfera de nitrógeno, se añadieron 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincarboxamida **1a** (0, 100 g; 0, 64 mmol; 1 equiv.) disueltos en 2.5 ml de diclorometano. Dicha mezcla se enfrió a 0 °C, se adicionó bajo agitación trietilamina (0.20 g; 1,9 mmol; 3 equiv.) lentamente, seguidamente por clorometano-sulfónico (0,10 g; 0,83 mmol; 1,3 equiv) en pequeñas porciones. La mezcla se dejó en agitación por 10 minutos y luego se llevó a temperatura ambiente por 1 hora. La reacción se monitoreó por TLC. Transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó el solvente y el producto (**2c**) se purificó mediante una recrystalización en acetonitrilo obteniendo un sólido fino de color blanco. Acetonitrilo resultó el mejor solvente de recrystalización comparado con THF, AcOEt y CH₂Cl.

3-(metilsulfoniloxi)-6-fluoropiracin-2-carboxamida **2c**: Sólido blanco, R_f: 0,9 (AcOEt). Rendimiento: (0,037 g, 24,60 %). ¹H-RMN (400 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): 8.69-8.71 (d, 1H, *J*_{H-F} = 8.0); 8.22 (s, 1H); 7.99 (s, 1H); 3.64 (s, 3H). ¹³C-RMN (100 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): 163.11; 158.10-155.60 (d, *J*_{C-F} = 250.0); 148.44-148.41 (d, *J*_{C-C-C-F} = 3.0); 137.17-137.09 (d, *J*_{C-C-C-F} = 8.0); 133.93-133.51 (d, *J*_{C-C-F} = 42.0). ¹⁹F-RMN (500 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): -84.03. P.f: 175-176°C.

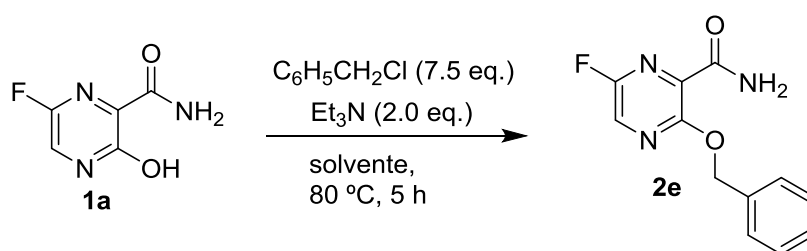
5.1.2.2.3 Acetilación de 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincarboxamida **1a**



El procedimiento experimental fue diseñado en el presente trabajo, tomando como base procedimiento de esterificación de alcoholes (Bonner., & McNamara., 1968) & (Sakakura., *et al.*, 2007). En un balon de una boca y dispuesto de atmósfera de nitrógeno, se añadieron 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincarboxamida (0,200 g; 1,28 mmol; 1 equiv.) disueltos en 2.5 ml de diclorometano. La mezcla se llevó a 0 °C, se adicionó trietilamina (0.25 g; 2.54 mmol; 2 equiv), seguidamente de una solución de cloruro de acilo (0.20 g, 2.54 mmol, 2 equiv.) disuelto en 2 ml de diclorometano. La mezcla se dejó a 0°C por 10 minutos y posteriormente, se lleva a temperatura ambiente. La reacción se monitoreo por TLC. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente, se evaporó el solvente y se procedió a hacer para la mezcla resultante la cromatografía en columna utilizando SiO_2 como fase estacionaria y una mezcla *n*-hexano/AcOEt. La cromatografía procedió con el uso de *n*-hexano (100%) para remover restos de cloruro de acilo y luego *n*-hexano/AcOEt (95:5- 90:10) para el aislamiento del producto diacetilado **2d**.

Acetato de 3-(acetilcarbamoil)-5-fluoropiracina-2-il 2d': Sólido amarillo, R_f (0,7) (AcOEt). Rendimiento: (0.0621 g , 21 %). ^1H -RMN (400 MHz, δ ppm, J Hz, $\text{DMSO-}d_6$): 8.14-8.12 (d, 1H, $J_{\text{H-F}} = 8.0$); 7.49 (d, 2H, $J_{\text{H-F}} = 8.0$); 7.41-7.32 (m, 4H); 6.20 (s, 1H). ^{13}C -RMN (100 MHz, δ ppm, J Hz, $\text{DMSO-}d_6$): 162.07; 155.09-155.07 (d, $J_{\text{C-C-C-F}} = 2.0$); 154.10-151.70 (d, $J_{\text{C-F}} = 240.0$); 134.41; 131.03-130.62 (d, $J_{\text{C-C-F}} = 40.0$); 128.47; 127.58 (2C); 127.29; 126.82 (2C); 68.75. ^{19}F -RMN (500 MHz, δ ppm, J Hz, $\text{DMSO-}d_6$): -91.74.

5.1.2.2.4 Síntesis de 3-(benciloxi)-6-fluoropiracin-2-carboxamida

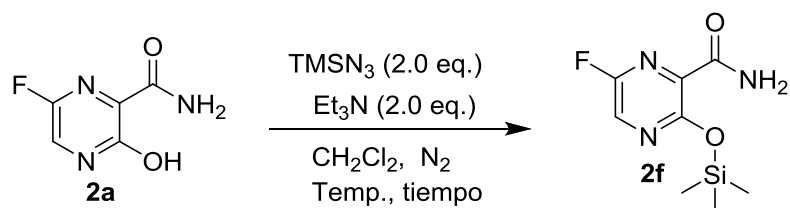


Para este procedimiento experimental, se tomó como base un procedimiento anteriormente reportado para la *N*-alquilación de hidroxipiridinas (Feng., *et al.*, 2018). En un balón pequeño (25 ml) equipado con condensador, se añadieron 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincarboxamida (0, 100 g; 0, 64 mmol; 1 equiv.) disueltos en 1 ml de diclorometano. Dicha mezcla se dejó en agitación por 5 minutos, se adicionó trietilamina (0.12 g; 1.27 mmol; 2 equiv.) lentamente, seguidamente por cloruro de bencilo (0,60 g; 4,7 mmol; 7.5 equiv). La mezcla se dejó en agitación a 100 °C por un tiempo de 5 horas. Dicha reacción se monitoreo por TLC, encontrando similar resultados entre 5 y 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó el solvente y se realizaron 3 lavados con *n*-hexano para remover el exceso de bencilo. La mezcla resultante se preparó para realizar una cromatografía de columna utilizando SiO₂ como fase estacionaria y una mezcla *n*-hexano/AcOEt utilizando diferentes proporciones para separar los diferentes productos como sigue: *n*-hexano (100%) para remover la porción restante de bencilo, *n*-hexano/AcOEt (95:5-90:10) para aislar residuo de la sal de trietilamin-amonio (Et₃NH⁺) y finalmente, una mezcla *n*-hexano/AcOEt (8:2) para el aislamiento del producto **2e**.

3-(benciloxi)-6-fluoropiracina-2-carboxamida 2e: Sólido amarillo, Rf: 0,58 (AcOEt). Rendimiento: (0,016 g, 9,4 %). ¹H-RMN (400 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): 8.14-8.12 (d, 1H, *J*_{H-F} = 8.0); 7.49 (d, 2H, *J*_{H-F} = 8.0); 7.41-7.32 (m, 4H); 6.20 (s, 1H). ¹³C-RMN (100 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): 162.07; 155.09-155.07 (d, *J*_{C-C-C-F} = 2.0); 154.10-151.70 (d, *J*_{C-F} = 240.0); 134.41; 131.03-130.62 (d, *J*_{C-C-F} = 40.0); 128.47; 127.58 (2C); 127.29; 126.82 (2C); 68.75. ¹⁹F-RMN (500 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): -91.74. P.f: 106-108°C (primera descomposición), 146-147°C (fusión definitiva).

5.1.2.2.5 Intentos de reacción con azida de trimetilsililo

Para este procedimiento experimental se siguió un procedimiento previamente reportado de *O*-trimetilsilación de alcoholes y fenoles. (Amantini., *et al.*, 2001).



En un balón pequeño, se introdujo 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincarboxamida disuelto en 2 mL de solvente. Luego se adicionó lentamente la base, seguido de azida de trimetilsililo disuelto en 2 mL de solvente. La mezcla se dejó en agitación por 15 minutos a temperatura ambiente, pasado este tiempo se llevó a temperatura y se dejó bajo agitación por 1 hora. La reacción se siguió por TLC y en la misma se pudo verificar ausencia en todo momento del producto deseado y presencia notable del material de partida.

5.2 Aspectos Biológicos

5.2.1 Células

Se utilizaron dos líneas celulares para la realización de este trabajo experimental. Para su crecimiento en monocapa se utilizó medio de crecimiento DMEM (CAPRICORN, Scientific) 90%, suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% y penicilina/estreptomicina 1% final (LifeTechnologies). Se incuban a 37°C y atmósfera 5% en CO₂. Tanto la línea celular HRT-18 como HEp-2 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC)

5.2.2 Citotoxicidad

Para determinar la toxicidad de los compuestos en las células se realizaron ensayos con los compuestos en diluciones seriadas y por triplicado.

5.2.2.1 Preparación de células

A partir de una monocapa celular crecida en placa de 6 cm³ se retiró el medio de crecimiento. Se lavó la monocapa con 2 mL de tripsina, se descartó y se añadió nuevamente un 1 mL. Se llevó la placa a la estufa a 37°C por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se agregó un 1 mL de medio de crecimiento y se procedió a hacer el recuento de células totales en Cámara de Neubauer. En el caso de HRT-18 se agregaron 50.000 células por pocillo y en HEp-2, 40.000 por pocillo, en placa de 96 pocillos y para esto se hizo las diluciones correspondientes.

5.2.2.2 Sembrado del compuesto

A las 24 horas de incubación se verificoconfluencia en la monocapa de células, se realizaron las diluciones en base 2 de los compuestos a ensayar. Se partió de una solución madre de concentración 50 mM. Se incubaron las células con el compuesto en su dilución correspondiente en medio de crecimiento entre 24 a 48 horas a 37°C con una atmósfera de 5 % de CO₂. Se incluyeron controles de células sin tratar en cada placa (medio de crecimiento sin compuestos) en 2% de DMSO.

5.2.2.3 Ensayo de bromuro de 3-(4,5 - dimetiltiazol -2-il)-2,5- difeniltetrazolio (MTT) para evaluar citotoxicidad

Transcurridas las 24-48 hs de incubación con los compuestos se observó la placa al microscopio óptico para determinar la máxima concentración no citotóxica (MCNC). Dicho término corresponde a la máxima concentración del compuesto que no altera las características morfológicas de las células. Luego de ello se descartó el medio con el tratamiento, se colocó 100 μL de medio y se añadió 20 μL de MTT (5 mg/mL). Se realizó un blanco para absorbancia; con 100 μL de medio y 20 μL de MTT. La placa se colocó en la estufa a 37° C por 3 hs. Cumplido el tiempo, se retiró de la estufa y se observaron los cristales de formazan (*N'*-amino-*N*-iminometanimidamida) al microscopio óptico. Se agregaron 200 μL de solución DMSO y H₂O (9:1) en cada pocillo. Se observó la formación del gradiente de color. Se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro TECAN Infinite® M1000/M1000 PRO (Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas, Facultad de Ciencias).

Una vez que se obtuvieron las medidas de absorbancia, se calculó el promedio entre las réplicas de cada concentración. Luego se realizó el promedio de los controles celulares y el blanco de absorbancia. A partir de los datos se realizó una gráfica utilizando el software Microsoft Excel donde en el eje de las *y* se expresó el porcentaje (%) de viabilidad celular mientras que en el eje de las *x* se expresó las concentraciones ensayadas. Este % se obtiene utilizando el promedio de los datos de los controles celulares como el 100% de viabilidad. Del gráfico se pudo obtener la ecuación que mejor se ajusta a los datos y de ella calcular la CC₅₀ (concentración a la cual la mitad de las células son viables).

5.3 Virus

Para la evaluación del efecto antiviral se emplean dos modelos de Coronavirus. El modelo de Coronavirus bovino (BoCov), cepa Mebus cortesía de la Dra. Mabel Berois y el modelo de Coronavirus humano, 229E cortesía de la Universidad de Buenos Aires-Argentina.

5.3.1 Titulación viral

La titulación viral se realizó en placa de 96 pocillos con la respectiva línea celular y crecimiento confluyente- como se describió en 5.2.2.1. Se realizaron diluciones seriadas en base log 10 del virus a evaluar partiendo de una solución madre de concentración desconocida. Se colocaron 50

μL de la dilución correspondiente en cada pocillo por cuadruplicado. En los pocillos de control se agregaron 50 μL de DMEM (CAPRICORN, Scientific). Se llevó a la estufa por 1 h y al término de la incubación se retiró el inóculo y se agregó 200 μL de DMEM (CAPRICORN, Scientific) 5 % SFB en cada pocillo. Se colocó la placa nuevamente en la estufa por 48-72 hs. Al término de este tiempo se visualizó el efecto citopático característico del virus mediante microscopía óptica. A partir de esto se utilizó el método de Reed y Muench (Reed & Muench., 1938) para determinar el título viral expresado en dosis infectantes de cultivos celulares 50% (DICT₅₀) basándose en la siguiente ecuación para obtener la distancia proporcional:

$$\frac{(\% \text{ infectividad en dilución inmediata superior a } 50\%) - 50\%}{\% \text{ infectividad en dilución superior a } 50\% - \% \text{ infectividad inmediata inferior a } 50\%}$$

Finalmente la DICT₅₀ se calcula de la siguiente manera:

$\log \text{ dilución superior a } 50\% + (\text{distancia proporcional} \times \log \text{ factor de dilución})$

El valor resultante se divide entre el inóculo. Para estos ensayos el inóculo viral fue de 50 μL.

5.3.2 Evaluación efecto antiviral de los compuestos

En esta sección se evaluó el potencial antiviral de los compuestos frente a los dos modelos virales que se plantearon. La concentración del virus a utilizar fue la definida en el punto 5.3.1. Con este objetivo se prepararon monocapas celulares en placas de 96 pocillos y se infectaron con los respectivos virus con una concentración de $6,32 \times 10^{-4}$ partículas virales para el modelo del coronavirus bovino y de $6,32 \times 10^{-6}$ para el modelo de coronavirus humano. Una vez transcurrida la adsorción (1 hora a 37°C) las células fueron incubadas con los respectivos compuestos diluidos en medio de crecimiento en base log 2 partiendo de la MCNC. Cada dilución se evaluó por cuadruplicado y en cada ensayo se realizaron controles celulares (CC) y controles virales (CV).

Una vez desarrollado el efecto citopático se procedió a determinar la CI₅₀ (definida como la concentración a la cual la mitad de las células están infectadas mediante el método de Reed y Muench como se explicó en el punto 5.3.1)

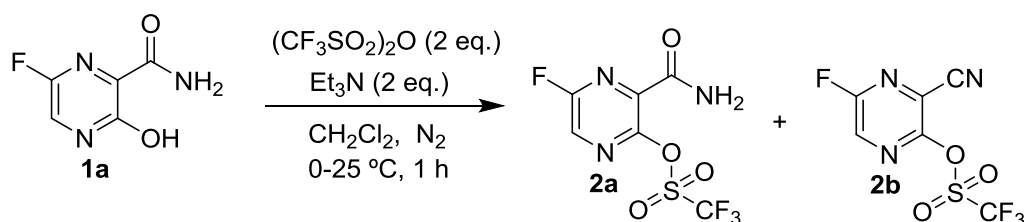
5.4 Cálculo del Índice de selectividad (IS)

Para calcular el índice de selectividad (IS) (definido como la relación que mide la ventana entre citotoxicidad y actividad antiviral), de forma tal que $IS = CC_{50}/CI_{50}$

6. RESULTADOS

6.1 Aspectos químicos

Tabla 2. Optimización de condiciones para la reacción de 6-flúor-3-hidroxi-2-piracincarcboxamida con anhídrido triflico



Entradas	$(CF_3SO_2)_2O$ (eq.)	Et_3N (eq.)	Solvente	Temp. (°C)	t (h)	% Conversión ^a
1	2.0	3	CH_3CN	0-25	4, N_2	No reacción
2	2.0	3	CH_3CN	0-25	2, N_2	No reacción
3	2.0	3	CH_2Cl_2	0-25	4, N_2	No reacción
4	2.0	2	CH_2Cl_2	0-25	2, N_2	Mezcla
5	2.0	2	CH_2Cl_2	0-25	2, N_2	37,15^b
6	2.0	3	CH_2Cl_2	60	2, N_2	No reacción

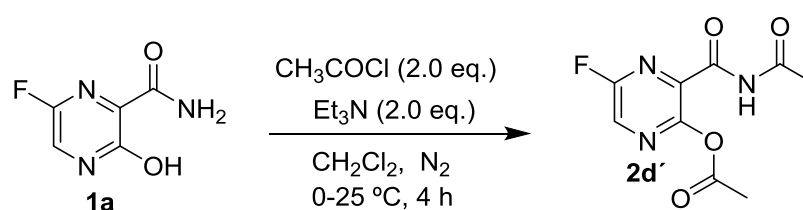
^aReacción fue monitoreada por TLC. Temp.: temperatura en °C; t: tiempo en horas. ^bProducto aislados (mezcla de productos: 33.7 en **2a** y 3.45 en **2b**). Casilla enmarcada en color rosa representó la mejor condición para la reacción.

Optimización de la reacción del favipiravir con anhídrido triflico envolvió probar el número de equivalentes mínimos del triflato, equivalentes de la trietilamina, tipo de solvente, efecto de temperatura y tiempo. De las condiciones probadas, 2 equivalentes de anhídrido triflico, 2 equivalentes de la base en diclorometano como solvente a temperatura ambiente permitió la mejor conversión del favipiravir. El tiempo fue esencial, tiempos superiores a 1 hora redujeron la cantidad de producto, siendo el tiempo óptimo de reacción de 1 hora. Importantemente, dos

productos de funcionalización fueron obtenidos de la reacción, uno funcionalizado a nivel del grupo hidroxilo **2a** y otro derivado que consiste de una doble funcionalización, una transformación a nivel del grupo amido a carbonitrilo y otra con la esperada funcionalización del hidroxilo para formar **2b**. Espectros confirmaron los productos, ver detalles de espectros en ANEXOS.

Estas condiciones fueron aplicadas para obtener el derivado **2c** con un rendimiento de 24.60%, a partir de la reacción entre favipiravir y cloruro de metanosulfónico. Espectros confirmaron los productos, ver detalles de espectros en ANEXOS.

Tabla 3. Optimización de condiciones para la acetilación de síntesis de 6-fluoro-2-piracincaboxamida **1a**



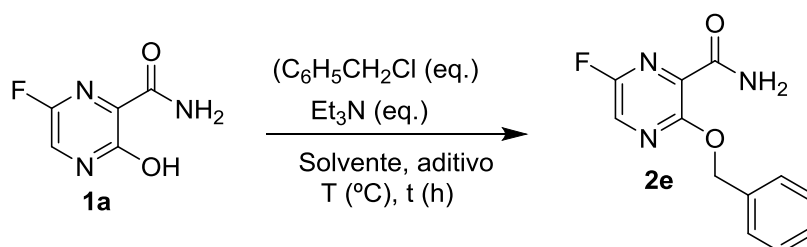
Entradas	CH ₃ COCl (eq.)	Aditivo	Base (eq.)	Solvente	Temp.(°C)	t (h)	R (%) ^a
1	1.2	-	Pyridina(1.2 eq.)	CH ₃ CN	25	2	No reacción
2	2	-	<i>t</i> -BuOK (1.2 eq.)	CH ₃ CN	25	2	No reacción
3	2	-	Et ₃ N (2 eq.)	CH ₂ Cl ₂	25	24	No reacción
4	2	-	Et ₃ N (2 eq.)	CH ₂ Cl ₂	25	1	21% ^b
5	2	-	Et ₃ N (2 eq.)	CH ₂ Cl ₂	25	2	Trazas
6	2	SOCl ₂	Et ₃ N (2 eq.)	CH ₂ Cl ₂	25	1	10%

^aReacción fue minotoreada TLC. ^bProducto **2d'** aislado. Casilla enmarcada en color rosa representó la mejor condición para la reacción.

Similarmente a la reacción anterior, optimización de la reacción de acetilación del favipiravir envolvió la prueba de número de equivalentes mínimos de cloruro de acetilo, equivalentes de la trietilamina, tipo de solvente, efecto de temperatura y tiempo. De las condiciones probadas, 2 equivalentes de cloruro de acetilo, 2 equivalentes de la base en diclorometano como solvente a temperatura ambiente permitió la mejor conversión del favipiravir. El tiempo fue esencial, tiempos superiores a 1 hora redujeron la cantidad de producto, siendo el tiempo óptimo de

reacción de 1 hora. Importantemente, de acuerdo a los espectros de RMN, el producto corresponde a una doble acetilación, una a nivel del grupo hidroxilo y otra a nivel del amino del grupo acetamido para dar **2d**. Espectros confirmaron los productos, ver detalles de espectros en ANEXOS.

Tabla 4. Optimización de condiciones para síntesis de 3-(benciloxi)-6-fluoro-2-piracina-carboxamida **2e**



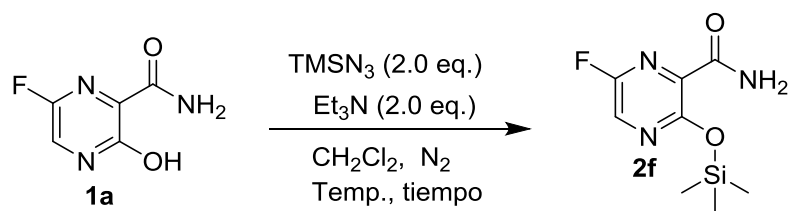
Entradas	C ₆ H ₅ CH ₂ Cl (eq.)	Et ₃ N (eq.)	Aditivo (eq.)	Solvente	t (h)	Temp. (°C)	R (%) ^a
1	2.0	2	-	Tolueno	72	100	Trazas
2	2.0	2	-	CH ₃ CN	5	100	Trazas
3	2.0	2	-	CH ₃ CN	24	100	Trazas
4	2.0			CH ₂ Cl ₂	24	100	No reacción
5	7.5	2	-	-	5	110	9.4 %^b
6	7.5	2	-	-	24	110	Trazas
7	7.5	2	-	-	24	120	Trazas
8	7.5	2	-	-	24	90	Trazas
9	7.5	2	-	-	24	80	Trazas
10	7.5	2	KI (1.1)	-	5	100	Mezcla

^aReacción fue monitoreada por TLC. ^bProducto **2e** aislado. Casilla enmarcada en color rosa representó la mejor condición para la reacción.

Optimización de la reacción del favipiravir con cloruro de bencilo envolvió probar la importancia del número de equivalentes mínimos del cloruro de bencilo, equivalentes de la trietilamina, tipo de solvente, efecto de aditivos, efecto de temperatura y tiempo. De las condiciones probadas, 7.5 equivalentes del cloruro de bencilo, en ausencia de base y solvente a 100 °C por 5 horas permitió la mejor conversión del favipiravir al producto **2e** con un

rendimiento de producto aislado de 9.4 %. Espectros confirmaron el producto 2e, ver detalles de espectros en ANEXOS.

Tabla 5. Intentos de la reacción con azido trimetilsililo



	TMSN ₃ (equiv.)	Base (eq.)	Solvente	Temp. (°C)	R (%) ^a
1	1.5	Et ₃ N (1.5 eq.)	CH ₃ CN	25°	No reacción
2	1.5	Et ₃ N (1.5 eq.)	CH ₃ CN	60°	No reacción
3	1.5	Et ₃ N (3.0 eq.)	CH ₃ CN	60°	No reacción
4	3.0	Et ₃ N (1.5 eq.)	CH ₃ CN	60°	No reacción
5	1.5	NaH (5.0 eq.)	THF	40°	No reacción
6	1.5	Na (5.0 eq.)	THF	40°	No reacción

^aReacción fue minotoreada a las 3 horas por TLC y se extendió a 24 horas.

La reacción del favipiravir con azido de trimetilsilano no derivó en producto alguno, se mantuvo inerte el favipiravir. Aislamiento de la mezcla de reacción demostró el favipiravir como único compuesto presente en solución. Espectro de ¹H-NMR para la mezcla de reacción: ¹H-RMN (400 MHz, δ ppm, J Hz, DMSO-*d*₆): 13.41(s, 1H); 8.74(s, 1H); 8.50-8.52(s, 2H). (Corresponde a Favipiravir).

6.2 Aspectos biológicos

6.2.1 Determinación de la CC₅₀

Se ensayaron un total de 10 compuestos en cada línea celular, pertenecientes a diferentes clases de moléculas. Por un lado, favipiravir y sus análogos halogenados y no halogenados (**1a**, **1b**, **1c**, **1d**, **1e**) y por otra parte los derivados funcionalizados a nivel del hidroxilo de Favipiravir (**2a**, **2b**, **2c**, **2d**, **2e**) (Ver **Figura 11**)

Todos los compuestos ensayados en la línea celular HRT-18 mostraron que su MCNC fue mayor a las concentraciones evaluadas. La CC₅₀ para los compuestos ensayados se muestran en la **Tabla 6**. Los compuestos favipiravir, 5, 9 y 10 presentaron CC₅₀ mayores a 500 µM mientras que los compuestos 1,2,3,6,7 y 8 presentaron CC50% menores a 500 µM.

Tabla 6. Determinación de la CC₅₀ en HRT-18

Compuestos	Concentración (µM)	Absorbancia	SD(+/-)	% viabilidad	CC ₅₀ (µM)
1a (favipiravir)	500	0,99	0,05	55	542
	250	1,11	0,06	61	
	125	1,12	0,06	62	
	62,5	1,27	0,2	70	
1b	500	0,97	0,08	54	354
	250	1,02	0,05	56	
	125	1,16	0,15	64	
	62,5	1,31	0,05	73	
1c	500	0,58	0,06	32	314
	250	1,09	0,2	60	
	125	1,66	0,3	92	
	62,5	1,72	0,1	95	
1d	500	1,32	0,05	95	896
	250	1,34	0,18	96	

	125	1,38	0,14	98	
	62,5	1,39	0,03	99	
1e	500	1,01	0,07	56	656
	250	1,03	0,03	57	
	125	1,21	0,02	67	
	62,5	1,22	0,02	67	
2a	500	0,86	0,05	48	366
	250	1,004	0,09	55	
	125	1,21	0,2	67	
	62,5	1,27	0,19	70	
2c	500	0,84	0,14	47	428
	250	1,05	0,16	58	
	125	1,19	0,2	66	
	62,5	1,19	0,2	66	
2d	500	1,5	0,03	80	967
	250	1,56	0,002	88	
	125	1,67	0,2	98	
	62,5	1,7	0,15	100	
2e	500	0,47	0,03	26	155
	250	0,57	0,005	31	
	125	0,8	0,16	44	
	62,5	1,05	0,2	58	
Control	-	1,7	0,002	100	-

Todos los compuestos ensayados en la línea celular HEP-2 mostraron que su MCNC) fue mayor a las concentraciones evaluadas. La CC₅₀ para los compuestos ensayados se muestran en la tabla a continuación. Todos los compuestos ensayados presentaron concentraciones citotóxicas 50% mayores a 500 μM , a excepción del compuesto 2. Este presentó una CC₅₀ de 440 μM .

Tabla 7. Determinación de la CC₅₀ en HEP-2

Compuestos	Concentración (μM)	Absorbancia	SD(+/-)	% viabilidad	CC ₅₀ (μM)
1a (favipiravir)	500	1,26	0,01	77	636
	250	1,56	0,02	96	
	125	1,59	0,05	97	
	62,5	1,59	0,06	97	
1b	500	1,28	0,14	79	1277
	250	1,41	0,08	86	
	125	1,52	0,13	93	
	62,5	1,54	0,12	94	
1c	500	1,29	0,05	79	500
	250	1,32	0,02	81	
	125	1,32	0,05	81	
	62,5	1,39	0,12	85	
1d	500	1,01	0,07	74	715
	250	1,25	0,02	92	
	125	1,28	0,04	94	
	62,5	1,33	0,2	98	
1e	500	1,34	0,07	82	1803
	250	1,4	0,11	86	

	125	1,4	0,12	86	
	62,5	1,42	0,11	87	
2a	500	1,36	0,09	83	836
	250	1,45	0,08	89	
	125	1,56	0,01	95	
	62,5	1,57	0,17	96	
2b	500	0,86	0,07	63	667
	250	1,12	0,04	83	
	125	1,32	0,05	97	
	62,5	1,32	0,006	97	
2c	500	1,53	0,04	94	1095
	250	1,69	0,08	99	
	125	1,73	0,06	100	
	62,5	1,75	0,01	100	
2d	500	0,85	0,04	63	608
	250	1,19	0,04	88	
	125	1,43	0,04	100	
	62,5	1,5	0,04	100	
2e	500	0,46	0,13	28	440
	250	1,32	0,01	81	
	125	1,37	0,02	84	
	62,5	1,49	0,04	92	
Control		1,5	0,05	100	

6.2.2 Determinación de la CI_{50} e Índice de selectividad

En este apartado se evaluó la capacidad antiviral de los compuestos anteriormente mencionados y su índice de selectividad en ambos sistemas biológicos; HRT-18/Coronavirus bovino (BoCo) cepa mebus y HEp-2/Coronavirus humano 229E. En el modelo HRT-18/BoCov cepa Mebus la CI_{50} estuvo en el rango de 125 a 15,6 μM . Los IS de los compuestos se detallan a continuación en la **Tabla 8**.

Tabla 8. CI_{50} e índice de selectividad para los compuestos antivirales ensayados contra el virus BoCov en HRT-18.

Compuesto	MCNC (μM)	CC ₅₀ (μM)	CI_{50} (μM)	IS
1a (favipiravir)	> 500	542	31,25	17
1b	> 500	354	62,5	5
1c	> 500	314	31,25	10
1d	> 500 ^a	896 ^a	62,5	14
1e	> 500 ^a	656 ^a	125-62,5*	7
2a	> 500	366	31,25	12
2c	> 500 ^a	428 ^a	125-62,5*	4
2d	> 500	967	31,25	31
2e	> 500	155	15,6	10

*Para estos compuestos se hizo un promedio entre las concentraciones en las cuales se encuentra la CI_{50} para determinar el índice de selectividad (IS). ^aEl tiempo de incubación con el compuesto fue 24 horas.

El compuesto que presentó mayor IS fue el **2d**, mientras que el que presentó menor IS fue el compuesto **2c**. El Favipiravir (**1a**) presentó un IS de 17, los compuestos **2a** y **1d** obtuvieron IS similares al compuesto de referencia. Se sabe que compuestos con índices de selectividad mayores a 10 son buenos candidatos como moléculas antivirales (Indrayanto., *et al.*, 2021). Los compuestos **2c**, **1e** y **1b** no son buenos candidatos como moléculas con potencial antiviral; **2e**, **2a**, **1c**, y **1d** presentaron potencial antiviral moderado; el favipiravir (**1a**) y el compuesto **2d** presentaron potencial antiviral elevado en este modelo. En el modelo HEp-2/hCov 229E la CI_{50} estuvo en el rango de 500 a 15,6 μM en los diferentes compuestos. Los IS de los compuestos se detallan a continuación en la **Tabla 9**.

Tabla 9. CI_{50} e índice de selectividad para los compuestos antivirales ensayados contra el virus hCov en HEp-2.

Compuesto	MCNC (μM)	CC ₅₀ (μM)	CI ₅₀ (μM)	IS
1a (favipiravir)	> 500	636	31,25	20
1b	> 500	1277	500	2
1c	> 500	500	500-250*	2
1d	> 500	715	125	6
1e	> 500	1803	125	14
2a	> 500	836	62,5	13
2b	> 500	667	62,5	11
2c	> 500	1095	125-62,5*	11
2d	> 500	608	15,6	39
2e	> 500	440	250	2

*Para estos compuestos se hizo un promedio entre las concentraciones en las cuales se encuentra la CI_{50} para determinar el índice de selectividad (IS).

El compuesto que presentó mayor IS fue el compuesto **2d** mientras que los compuestos que presentaron un IS menor fueron **2e**, **1b**, **1c** y **1d**. El favipiravir (**1a**) obtuvo un IS de 20, los compuestos que más se le acercaron fueron **2a** y **1e** con un IS de 13 y 14 respectivamente. Los compuestos **2e**, **1b**, **1c** y **1d** no son buenos candidatos como moléculas con potencial antiviral; **2c**, **2a**, **1e**, y **2b** presentaron potencial antiviral moderado; el favipiravir (**1a**) y el compuestos **2d** presentaron potencial antiviral elevado en este modelo.

A partir de los datos obtenidos en la actividad antiviral se realizaron unos estudios de densidad de carga (carga de Mulliken) en el oxígeno enólico y cetónico a través de estudios teóricos de DFT (density functional theory) utilizando el funcional B3LYP en combinación con la base 6-31G(d,p). Se encontró una buena correlación para 4 de los compuestos ensayados en el modelo HEp-2/hCov 229E (**Figura 12**).

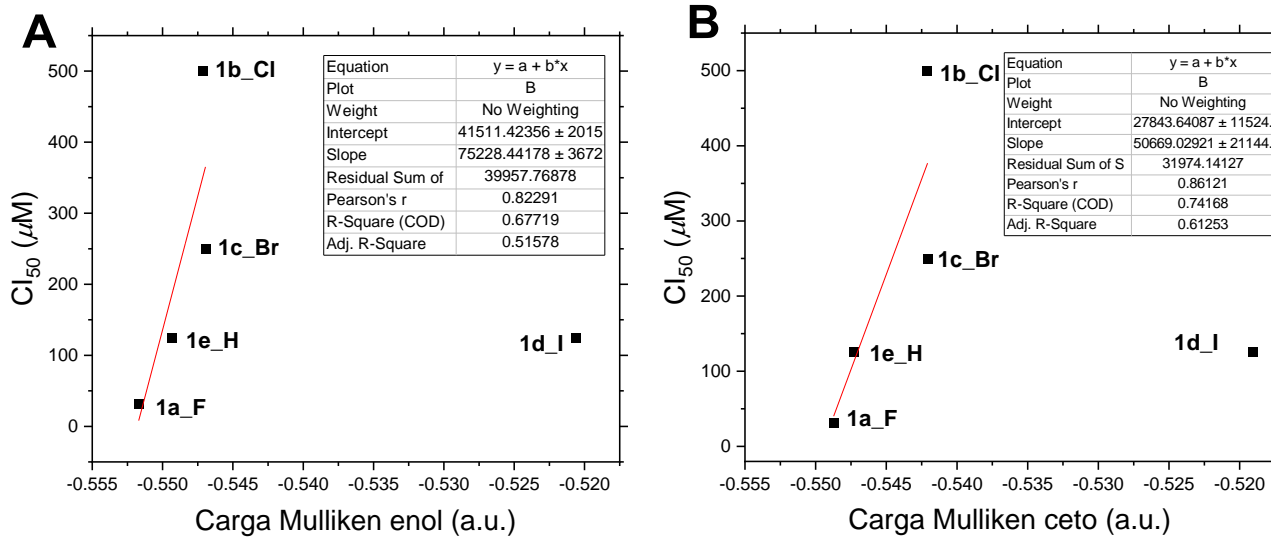


Figura 12. Relación entre la actividad antiviral en el modelo de HEp-2/ hCov 229E versus la carga de Mulliken del oxígeno enólico (A) y cetónico (B).

6.2.3 Cálculo teórico del coeficiente de partición (Log P).

El coeficiente de partición (*Log P*) fue determinado para los 10 derivados estudiados en el presente trabajo a través de la plataforma web de SwissADME.

Tabla 10. Valores de Log P para los compuestos ensayados

Compuestos	<i>Log P</i> (iLOGP)
1a (favipiravir)	0,7
1b	0,77
1c	0,91
1d	0,88
1e	0,4
2^a	0,94
2b	1,04
2c	0,14
2d	1,31
2e	1,81

En **Tabla 10** se puede observar que la incorporación de estos grupos de relativa labilidad aumenta el valor de *Log P* comparado a favipiravir desde 0,7 hasta 1,81.

Los derivados funcionalizados que presentaron *Log P* mas altos siguen el siguiente orden, derivado de bencilo(**2e**)>acetilo (**2d**)> triflato(**2b**)> triflato(**2a**)>metano-sulfónico(**2c**). Por su parte, los *Log P* de los derivados halogenados en la posición 6 del anillo de piracina entre 0.4 y 0.91. El derivado no halogenado (**1e**) mostró el menor valor de *Log P* dentro de este grupo con un valor de 0.4, mientras los derivados bromados y iodados presentaron los mayores valores entre los **1a-e** con valores de 0.91 y 0.88, respectivamente. El derivado clorado y fluorado (favipiravir) exhibieron valores intermedios de 0.77 y 0.70, respectivamente.

7. DISCUSIÓN

7.1 Aspectos químicos

Los compuestos estudiados biológicamente contra modelo de coronavirus en esta investigación se dividen en dos familias de compuestos: (i) **grupo A**: derivados halogenados y no halogenados del favipiravir funcionalizados a nivel de la posición seis (**Figura 13A**) y (ii) **grupo B**: derivados del favipiravir funcionalizados a nivel del grupo hidroxilo (**Figura 13B**). Del primer grupo de compuestos el derivado fluorado (favipiravir) (**1a**, **Figura 13A**) y el derivado clorado (**1b**, **Figura 13A**) fueron adquiridos de forma comercial, mientras el derivado bromado (**1c**, **Figura 13A**) fue previamente preparado por el grupo de Química Orgánica Medicinal. Por su parte, el derivado no halogenado (**1e**, **Figura 13A**) y aquel funcionalizado con yodo (**1d**, **Figura 13A**) fueron preparados en la presente investigación siguiendo protocolos reportados. Por otra parte, todos los derivados correspondientes al grupo B, funcionalizados a nivel del grupo hidroxilo (**2a-e**, **Figura 13A**), fueron preparados siguiendo procedimientos reportados típicos de alquilación ó acetilación de fenoles con pequeñas modificaciones (Johnstone, R. A., & Rose, M. E., 1979), (Comprehensive Organic Functional Group Transformations, 1995), (Chakraborti., & Gulhane, R., 2004) & (Feng., *et al.*, 2018).

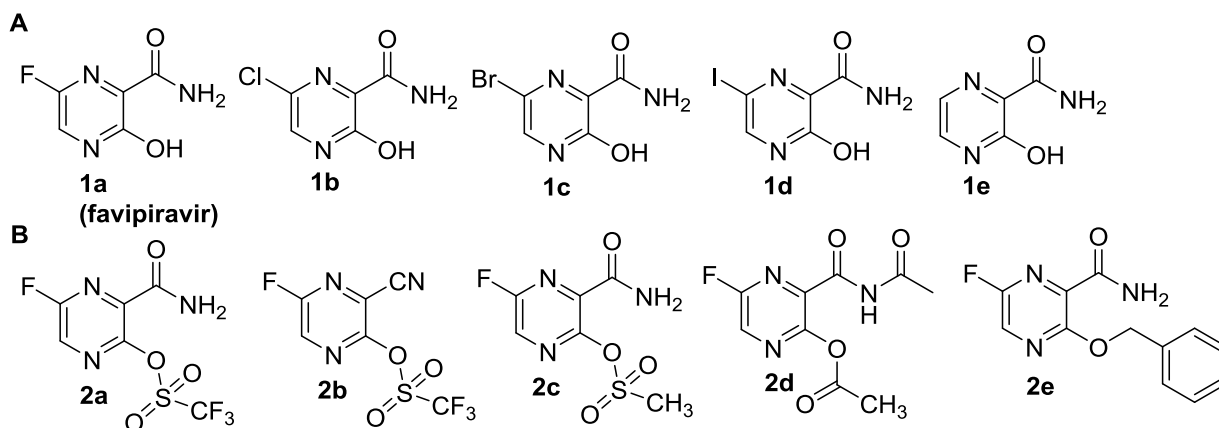


Figura 13. Derivados de 3-hidroxi-2-piracincarboxamida funcionalizados en posición 6 por halógenos (**A**) y derivados de favipiravir funcionalizados a nivel del grupo hidroxilo (**B**).

|

7.1.1 Síntesis y caracterización de las 3-hidroxi-2-piracincarboxamidas 1d y 1e

Para la síntesis del derivado no halogenado de 3-hidroxi-2-piracincarboxamida (**1e**), se partió de una estrategia sintética reportada (Nro. Patente *JP 5739618B2*), donde se hace reaccionar aminomalonamida y glioxal bajo condiciones básicas. La reacción requiere de condiciones básicas para la primeras etapas de la reacción, mientras condiciones ácidos son requeridas para obtener el derivado bajo su forma neutra. El primer paso de la reacción transcurre mediante una doble condensación entre los grupos carbonilos del glioxal con grupos aminos adyacentes de aminomalonamida para dar el intermedio cíclico (**A**) bajo condiciones básicas. Posteriormente, el intermedio (**A**) reacciona bajo una doble deshidratación para formar el intermedio (**B**), el cual tautomeriza bajo condiciones básicas para dar el derivado deseado bajo la forma iónica (**C**). Finalmente, bajo condiciones de acidez se obtiene la piracina bajo la forma neutra (**D**) (**Figura 13**). El producto se obtuvo en un buen rendimiento, alrededor del 80 %, el cual es bastante aceptable respecto a la metodología reportada (Nro. Patente *JP 5739618B2*). No fue necesaria estrategias extras para su purificación y la obtención del producto fue constatada a través EI-MS, espectroscopía de NMR y punto de fusión. Respecto a la fase de caracterización, el producto presentó un punto de fusión alrededor del 247-250 °C con descomposición, el cual se encuentra en el mismo rango reportado de 248 °C (Nro. Patente *JP 5739618B2*). De acuerdo al EI-MS, se identificó un único producto con una masa molecular de 139.10, lo cual corresponde a la 3-hidroxi-2-piracincarboxamida. Del RMN, se observaron un total de cinco señales únicas entre 7.95 y 13.36 ppm en el espectro de ¹H-RMN, una de ellas a 13.36 ppm se corresponde al protón hidroxilo, los picos ligeramente anchos en 8.12 y 7.95 ppm corresponden a los dos hidrógenos del grupo amino del grupo amido, mientras los hidrógenos aromáticos se encuentran desplazados en 8.12 (que integra para dos protones) y 8.71 ppm. Del espectro de ¹³C-RMN, se confirmó el producto con la identificación de cinco señales que corresponden a los cuatro carbonos del anillo de piracina y otra al carbono carbonílico del grupo amido que presentó una señal típica alrededor de 166 ppm.

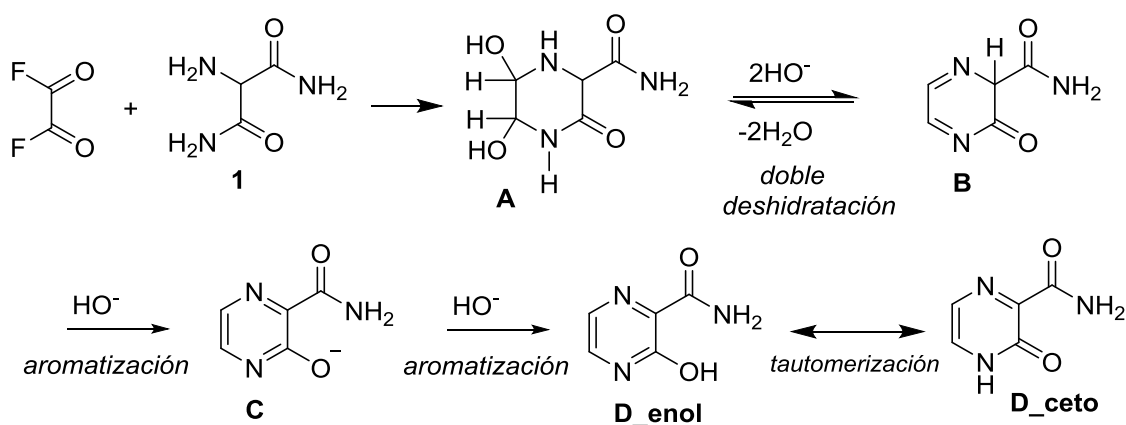


Figura 14. Mecanismo de síntesis 3-hidroxi-2-piracincarboxamida

Respecto a la síntesis del derivado yodado (**1d**), se partió de una estrategia reportada de iodación sobre anillo de piracina vía sustitución electrofílica aromática (SEAr) utilizando yodo molecular formado *in situ* (Dutta, U., *et al.*, 2015). Esta estrategia emplea una serie de reactivos tales como persulfato de sodio ($K_2S_2O_8$) como agente reductor, nitrato cérico ($Ce(NO_3)_3$) como un agente auxiliar y yoduro de sodio (NaI) como fuente de yodo. El ión persulfato, bajo la forma de ión radical persulfato $SO_4^{\cdot-}$, tiene como función oxidar el ión yoduro al radical de yodo (I^{\cdot}) con la transferencia de un electrón e inclusive tiene el potencial de llegar hasta su forma catiónica de I^+ con la transferencia de un electrón más desde ión persulfato sobre yodo radical liberando ion sulfato (SO_4^{2-}). La forma catiónica del yodo (I^+) es ideal para la SEAr. Por su parte, el ión de Ce^{3+} tiene como función regenerar el ión persulfato ($SO_4^{\cdot-}$) a partir de ión sulfato con transferencia de un electrón, liberando ión de Ce^{4+} . Estos detalles mecanísticos puede ser apreciados en la **Figura 14**. Con el ión catiónico de yodo se da una SEAr con la 3-hidroxi-2-piracincarboxamida sobre la posición seis del anillo, la más nucleofílica, dirigida por grupo hidroxilo de la posición 3 del anillo de piracina. Este mecanismo lleva a la formación del intermedio (E), el cual finalmente aromatiza al producto iodado mediante una reacción ácido-base (**Figura 15**). De la reacción, se obtuvo un producto de color amarillo con un rendimiento del 22 % después de una purificación por cromatografía en columna. El bajo rendimiento en comparación al 54 % obtenido con el sistema análogo de *N*-metilpiracina (Nro. Patente *JP 5739618B2*) se debe a la tentativa menor reactividad de nuestra piracina, no metilada, que lo convierte en un sistema aromático, más rígido hacia la iodación vía adición electrofílica que el

sistema no aromatizado. Mientras el sistema de *N*-metilpiracina, que es un sistema no aromático, es mucho más reactivo hacia la iodación por una adición electrofílica de un doble enlace. Otro de los factores que pudo influir en el bajo rendimiento de esta reacción es la pobre solubilidad del material de partida en dicloroetano. Asimismo, se probaron otros solventes como CH₃CN para mejorar el rendimiento, sin embargo, no se mejoró la solubilidad ni mejoras en el rendimiento final.. Es importante resaltar que el grupo de investigación recientemente desarrollo una metodología más conveniente para la obtención de este sistema con el uso *N*-iodosuccinimida como fuente electrofílica de iodo. Respecto a la identificación de este derivado, este se confirmó por espectroscopía de RMN. En el espectro de ¹H-RMN se encontró un conjunto de cuatros señales entre 7 y 13.44 ppm. Una de ella corresponden al hidrógeno del grupo hidroxilo a 13.44 ppm que se ve como un pico ancho, típico de este tipo de protones. Otra señal desplazada a 8.62 ppm corresponde al hidrógeno aromático, mientras dos picos ligeramente anchos corresponden a los dos hidrógenos del grupo amido con desplazamientos químicos en 8.38 y 8.56 ppm. El ¹³C-RMN también confirmó el compuesto con cinco carbonos, cuatro correspondientes al anillo de piracina y el restante al carbonilo del grupo amido alrededor de 166 ppm.

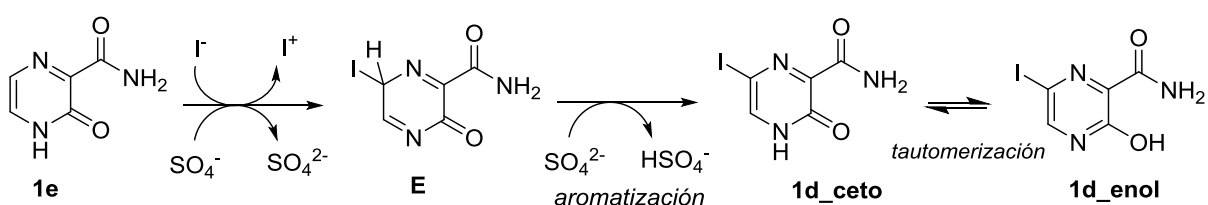


Figura 15. Posible mecanismo de reacción propuesto en el trabajo de referencia (Nro. Patente JP 5739618B2)

7.1.2 Síntesis y caracterización de los derivados de favipiravir funcionalizados a nivel de grupo hidroxilo 2a-e

La síntesis de estos derivados fue basada en dos tipos de mecanismos de reacción: uno de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) para las reacción de favipiravir con cloruro de bencilo y azido de trimetilsilano, mientras el resto de reacciones con anhídrido tríflico, cloruro de acetilo y cloruro metanosulfónico fue basada en un mecanismo de adición-eliminación. En esta fase de la investigación se busca la síntesis de diferentes derivados de favipiravir funcionalizados a nivel

del grupo hidroxilo con diferentes grupos removibles, unos de fácil remoción tales como acetilo o triflato y otros de difícil remoción tales como el bencilo y el metano-sulfónico y el trimetilsilano. Esto puede ser interesante desde dos puntos de vista, el primero que nos permite evaluar el rol de la lipofilia con un grupo removable fácilmente y en segundo lugar, el rol del grupo hidroxilo en la actividad con el uso de grupo de difícil remoción bajo condiciones fisiológicas.

Primeramente, para las reacciones vía S_N2 se inició con la desprotonación parcial del grupo hidroxilo con el uso de una base como trietilamina con la idea de formar un nucleófilo más conveniente para favorecer la S_N2 , el cual ataca al carbono electrofílico e induce de forma concertada la salida del grupo saliente (azido para TMS- N_3 y cloruro para el cloruro de bencilo) y formar el producto deseado de sustitución **2e** y **2f** (**Figura 16**).

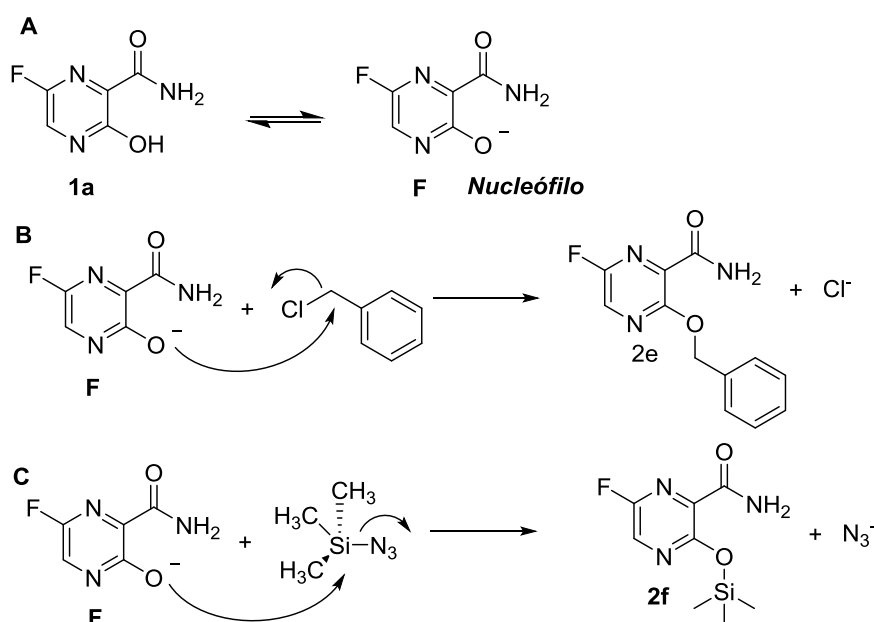


Figura 16. Posible mecanismo de S_N2 para las reacciones entre el grupo hidroxilo de favipiravir y los sustratos de cloruro de bencilo y azido de trimetilsilano.

Para la funcionalización con el grupo bencilo se trabajó inicialmente con diversas condiciones para una mayor optimización de la reacción (**Tabla 4**). Bajo condiciones estándares de 2 equivalentes de cloruro de bencilo y de trietilamina, no se lograron buenos resultados con el uso de solventes orgánicos (tolueno, acetonitrilo y diclorometano) (**entradas 1-4, Tabla 4**). Un exceso de cloruro de bencilo (7.5 eq.), actuando como reactivo y solvente, y en presencia de

trietilamina (2 eq.), se logró generar el producto con un discreto rendimiento de reacción (9,4 %) después de su aislamiento y purificación. La reacción fue ejecutada a 110 °C por un tiempo de 5 h (**entrada 5, Tabla 4**). Mayor tiempo de reacción (24 horas) y cambios de temperatura no generó mejoras (**entradas 6-9, Tabla 4**). Con el uso de un aditivo como el yoduro, que buscaba obtener in situ el yoduro de bencilo, que son más reactivos que los cloruros, no se logró mejoría en los resultados de la reacción (**entrada 10, Tabla 4**). El discreto rendimiento obtenido para esta reacción no es sorprendente debido a que el grupo hidroxilo se encuentra conectado a un anillo altamente deficiente en electrones con dos nitrógenos dentro del anillo y un grupo amido *orto* al grupo hidroxilo, lo cual reduce significativamente la capacidad nucleofílica de dicho grupo hidroxilo. El producto obtenido bajo la condición 5 (**Tabla 4**) fue aislado y purificado por cromatografía en columna.

Respecto a la identificación de este derivado, este se confirmó por espectroscopía de RMN. El ^1H -RMN confirmó la existencia de diez hidrógenos en la molécula. La señal definida cercana a 8.2 ppm integra para el hidrógeno del anillo aromático en la posición 5 cercano al flúor. El pico de baja amplitud en 6.2 ppm corresponde a uno de los hidrógenos del NH_2 . Mientras que la señal en 5.5 ppm integra para los dos hidrógenos del CH_2 . En la región entre 7,50 y 7,33 ppm se visualiza un multiplete, este integra para seis hidrógenos, uno de ellos corresponde al otro protón del grupo amido y el resto corresponde a los hidrógenos del anillo bencilo. Las correspondientes correlaciones entre los hidrógenos aromáticos ubicados en el rango de 7.33 a 7.50 ppm se puede verificar con el espectro de dos dimensiones ^1H - ^1H -COSY (ANEXOS). Es importante destacar que en el ^1H -RMN del material de partida se observa una señal ubicada en 13.40 ppm correspondiente al hidrógeno del grupo hidroxilo, esta señal ha desaparecido completamente en el producto deseado. Esto confirma la funcionalización de nuestro producto **2e**. Con respecto al ^{13}C -RMN, este confirmó las diez señales esperadas correspondientes a los diez tipos de carbonos de la molécula (ANEXOS). La señal en 162.07 ppm correspondiente al carbono del carbonilo presente en la molécula. El doblete registrado entre 155,09-155,07 ppm corresponde a un carbono con distancia de cuatro átomos de carbono. Las señales entre 154,10 y 151,70 ppm corresponden al C-F de la molécula.

Por su parte, para la reacción con trimetilsilano no se pudo apreciar conversión alguna del material de partida bajo ninguna de las condiciones ensayadas (**Tabla 5**), siendo el material de partida prácticamente inerte en la reacción. Esto se debe a dos factores: (i) baja capacidad

nucleofílica del grupo hidroxilo para una S_N2 y (ii) al efecto estérico que ejercen los grupos metilos conectados al carbono electrofílico así como el grupo amido en la piracina cuando se acercan en el tentativo estado de transición (**Figura 17**). La no formación del producto se confirmó mediante RMN, tanto por ^{13}C -RMN, ^1H -RMN y ^{19}F -RMN, donde las señales correspondieron al favipiravir de partida.

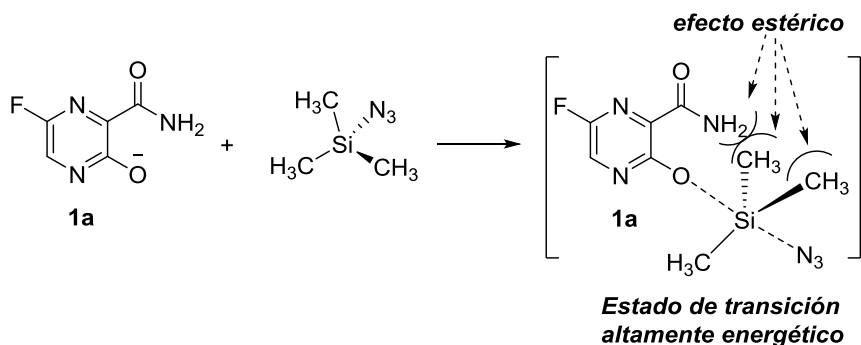


Figura 17. Dificultad energética para el acoplamiento entre favipiravir y azido trimetilsilo

Por otra parte, para la *O*-sulfonilación del grupo hidroxilo del favipiravir se utilizaron dos reactivos anhídrido triflico y cloruro de metanosulfónico. Estas reacciones operan bajo un mecanismo de adición/eliminación, donde inicialmente se adiciona el hidroxilo al azufre electrofílico y luego se elimina agua del fragmento de sulfonato para dar la *O*-sulfonilación con anhídrido triflico y cloruro de metanosulfónico (**Figura 18**). Inicialmente, se requiere de la desprotonación del favipiravir desprotonado para generar la especie nucleofílica que ataca al azufre electrofílico.

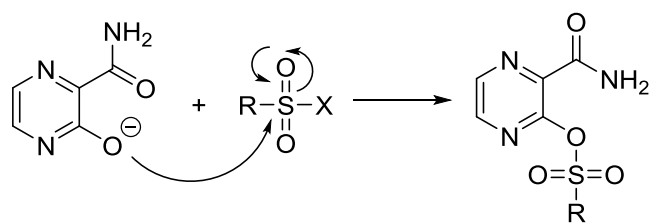


Figura 18. Mecanismo de adición-eliminación para la *O*-sulfonilación de grupo hidroxilo del favipiravir.

Para la funcionalización con anhídrido triflico se probaron varias condiciones para su optimización (**Tabla 2**). Las reacciones se ejecutaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno para

evitar hidrólisis parcial del anhídrido tríflico que es altamente hidrolizable. Con una cantidad fija de anhídrido tríflico (2 eq.) y trietilamina (2 eq.) a temperatura ambiente, el diclorometano fue seleccionado como un solvente más conveniente que el acetonitrilo (**entradas 1-5, Tabla 2**). El tiempo de reacción y temperatura también fueron otros factores importantes. En diclorometano, tiempos superior a dos horas mostró una conversión del favipiravir a productos durante la primera hora, pero al dejarse por 2 o 4 horas sólo se identificó el favipiravir de partida por TLC y $^1\text{H-NMR}$ (**entradas 3-4, Tabla 1**). Esto muestra la reversibilidad de la reacción promovida posiblemente por subproductos ácidos generados incluyendo como el agua. Con la reducción del tiempo a 1 hora y el uso de tamiz molecular, se logró una conversión global del 37.15, 33.7 en 1a y 3.34 % en 1b (**entrada 5, Tabla**). Incremento de la temperatura desde el inicio de la reacción no fue conveniente para el positivo progreso de la misma (**entrada 6, Tabla 1**). La mezcla de reacción de la condición 5 fue purificada por cromatografía en columna encontrando sorpresivamente dos productos, uno de ellos identificado como el producto deseado de *O*-sulfonilación y el otro un derivado *O*-sulfonilado pero con la transformación del grupo amido a grupo ciano, lo cual fue confirmado por espectroscopía de RMN de protones, carbono, flúor y 2D de $^1\text{H}/^1\text{H-COSY}$, $^1\text{H}/^{13}\text{C-HSQC}$ y $^1\text{H}/^{13}\text{C-HMBC}$.

Para el derivado *O*-sulfonilado (**2a**), se identificaron las 3 señales esperadas correspondientes a 3 tipos de protones de la molécula, que se encontraban en el rango entre 8.82 y 8.14 ppm. Los picos anchos en 8.82 y 8.84 ppm integran para el hidrógeno aromático y se aprecia como un doblete de $J=8$ Hz por su acoplamiento con flúor vecino. Las señales anchas entre 8.43 y 8.14 ppm corresponden a los hidrógenos del grupo amino. La supresión de señal típica en 13 ppm característica del grupo hidroxilo confirma la esperada conversión y funcionalización de dicho grupo. El $^{13}\text{C-RMN}$ también confirmó el compuesto con la identificación de seis carbonos, cuatro de ellos correspondientes al anillo de aromático, otro al carbono del grupo CF_3 y otro correspondiente al carbonilo del grupo amido. La señal en 162.22 ppm corresponde a este último. Mientras que las señales entre 123.24- 113.70 ppm forman un cuartete que corresponde a la integración de las señales entre el carbono unido a sus tres átomos de flúor. Las siguientes señales ubicadas en el rango entre 158.99- 135.61 ppm pertenecen a los carbonos aromáticos del derivado. Otros espectros tales como $^1\text{H}/^1\text{H-COSY}$, $^1\text{H}/^{13}\text{C-HSQC}$ y $^1\text{H}/^{13}\text{C-HMBC}$ confirman la obtención del compuesto **2a**.

Con respecto al ^1H -RMN del producto **2b** se observa una única señal entre 8.49 y 8.47 ppm correspondiente al único hidrógeno aromático de la molécula. Esto supone la desaparición del grupo amido o su transformación en otro grupo. Del espectro de ^{13}C -RMN, se detectó una señal en 110 ppm típica de carbonos de grupo ciano (CN) lo cual sugiere que el amido fue funcionalizado al grupo ciano. El cuartete que se observa entre 123 y 113 ppm corresponde al grupo CF_3 . Las restantes de las señales corresponden a los cuatro carbonos aromáticos que presenta el producto. Las señales entre 159,11 y 156,50 ppm integran para el C-F con un $J=261$ Hz característico de este grupo en la molécula. Mientras que las señales entre 151.08 y 151.11 pertenece al C-C-C-C-F con un $J=3$ Hz. Las señales en dobletes en 119,20 y 119.08 ppm y un $J=12$ Hz corresponden a un C-C-C-F.

Para la inesperada conversión de favipiravir al producto **2b**, se propuso un mecanismo tentativo tal como se muestra en figura 18. Inicialmente, la formación de los productos **2a** y **2b** envuelven la desprotonación del grupo hidroxilo del favipiravir para formar el correspondiente ion phenolato. Este posteriormente reacciona por un mecanismo adición-eliminación para formar el producto **1a** con liberación del ión triflato (ó **F** en **Figura 19**). Subsecuentemente, el producto **1a** puede sufrir una reacción de ciclación intramolecular para formar el intermedio **G**, que luego tautomeriza en **H**. Finalmente, intermedio **H** en presencia de base sufre una deshidratación del fragmento de imino para formar el inesperado producto **2b**.

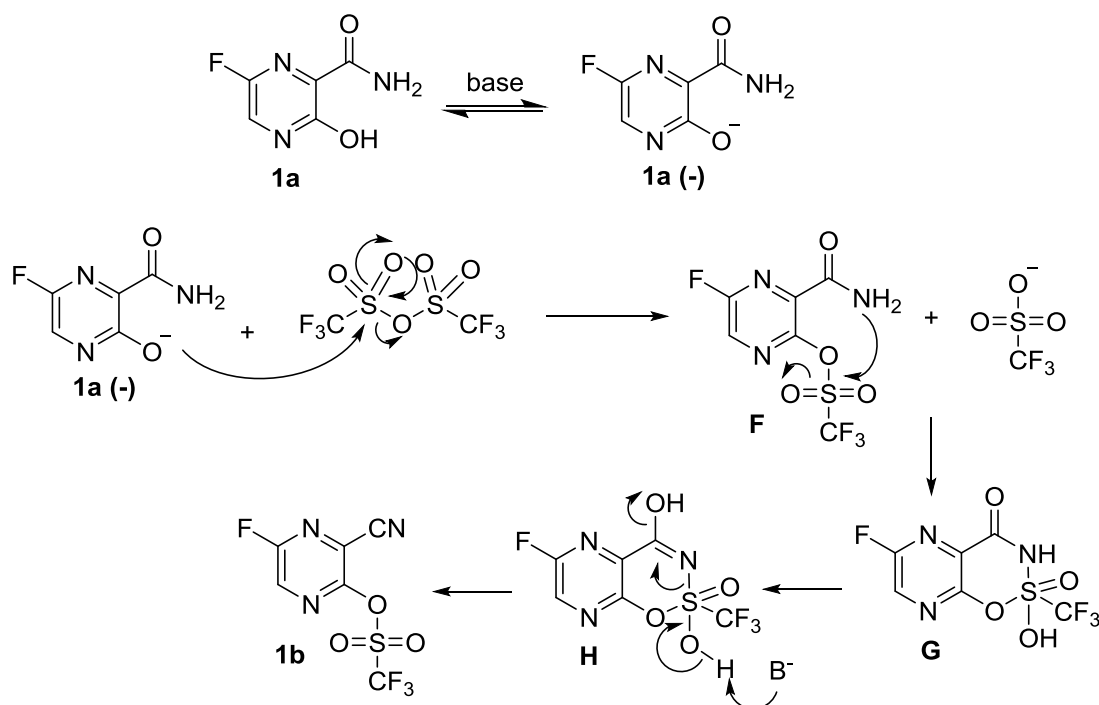


Figura 19. Mecanismo para conversión de favipiravir a los productos **2a** y **2b**.

Continuando con la síntesis de derivados funcionalizados a nivel del grupo hidroxilo, se tiene que la síntesis del derivado **1c** envuelve un mecanismo de adición-eliminación (**Figura 18**). El producto se obtuvo en un primer y único intento con un rendimiento del 24.60 % utilizando 2 eq. de trietilamina, 2 eq. de cloruro de metanosulfónico en diclorometano a temperatura ambiente por 3 horas. El producto fue aislado mediante una recristalización en acetonitrilo frío y el producto aislado fue caracterizado por confirmado por espectroscopía de RMN de protones, carbono, flúor y 2D de ¹H/¹H-COSY, ¹H/¹³C-HSQC y ¹H/¹³C-HMBC. Para el derivado *O*-sulfonilado (**1c**), se identificaron los tres tipos de señales correspondientes a 3 tipos de protones, protón aromático, protones de grupo amido y protones de grupo metilo del grupo sulfonilo. La primer señal correspondiente a los picos que se ubican entre 8.71 y 8.69 ppm con un J= 8 Hz corresponde al hidrógeno del anillo aromático. Mientras que las señales ubicadas en 8.22 y 7.99 ppm son picos anchos que corresponden a los hidrógenos del grupo amino (NH₂). Por último, la señal ubicada en 3.6 ppm corresponden a los hidrógenos del grupo metilo, lo cual en combinación con la desaparición del pico en 13 ppm confirma la *O*-sulfonilación. El ¹³C-RMN también confirmó el compuesto con cinco carbonos, cuatro correspondientes al anillo aromático

y el restante a un carbono alifático. Con respecto al ^{13}C -RMN se logran ver cinco señales en el rango entre 165 y 130 ppm, típico de carbonos aromáticos y el carbonilo para valores superiores a 160 ppm. La señal en 163.11 ppm corresponde al carbono del carbonilo presente en la molécula. Las siguientes dos señales en 158.30 y 156.60 ppm integran para el carbono aromático en posición ortho. Las señales en 148.41 y 148.44 ppm integran para el carbono aromático en posición meta. Las señales ubicadas entre 137.09 y 137.17 ppm integran para el C-F aromático. Y por último, las señales entre 133.51 y 133.93 ppm integran para el carbono aromático más lejano. La asignación a cada carbono se deduce de los acoplamientos carbono-flúor del espectro de ^{13}C -NMR (ANEXOS). La señal en 40.92 ppm correspondiente al carbono del grupo CH_3 . Otros espectros tales como $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC y $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC confirman la obtención del compuesto **2a**.

Finalmente, para la síntesis del derivado acetilado (**2d**) fue necesaria una fase de optimización (**Tabla 3**). Basado en las reacciones previas de adición-eliminación, la optimización de acetilación fue a temperatura ambiente. De las bases probadas (piridina, trietilamina, piridina), la trietilamina resultó como la mejor base con el uso de 2 equivalentes de cloruro de acetilo y 2 de la base a temperatura ambiente (**entradas 1-4, Tabla 3**). El tiempo resultó ser crucial, para tiempos superiores de 2 horas se observó una caída de la conversión del favipiravir, siendo una hora de reacción como el tiempo más conveniente para una apreciable conversión (**entradas 3-5, Tabla 3**). Uso de un aditivo para regenerar posible ácido acético a cloruro de acilo, no generó una mejoría en el rendimiento encontrado en entrada 4. El producto fue aislado y purificado por cromatografía en columna. De la fase de caracterización, se identificó al producto **2d** como un derivado de diacetilación, funcionalizado en el grupo hidroxilo y el grupo amido. Del espectro de protones se observan dos picos en 2.1 y 2.2 ppm que integran para tres cada uno, un doblete para un protón en 8.60 ppm así como una señal a 9.98 ppm que puede corresponder al restante NH. Esto observado en el ^1H -RMN en combinación con las dos señales encontradas en 168 y 170 ppm soportan la diacetilación del favipiravir. Otra señal en 159 ppm correspondiente al carbonilo de amido, picos en 157 ppm con J de 240 Hz, pico en 151.11, doblete a 136.42 ppm (J = 40 Hz) y un doblete 131 ppm de J pequeña confirman la estructura de **2d**. Otros espectros tales como ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC y ^1H - ^{13}C -HMBC confirman la obtención del compuesto **2d**. Respecto a la vía de formación del producto **2d**, ella inicia con un mecanismo de adición-eliminación con el ataque del grupo hidroxilo desprotonado al grupo carbonilo promoviendo la

salida del grupo saliente X del ión cloruro para formar el producto de *O*-acetilación **I**. Este producto no se encontró como producto y siguió reaccionando con el exceso de cloruro de acetilo para dar el producto **2d** mediante la segunda acetilación del amino del grupo amido tal como se ilustra en la Figura 20. Esta reacción tuvo un rendimiento relativamente bajo. Una de las posibles causas puede ser que el producto de la reacción parece ser mucho más reactivo que los derivados de sulfonilo, lo cual puede estar asociado a la reactividad del grupo carbonilo. El grupo sulfonil se encuentra bajo una forma tetraédrica haciéndolo un sistema más rígido. Mientras que el carbonilo que se encuentra bajo una configuración híbrida sp² siendo más sensible a posibles reacciones de sustitución.

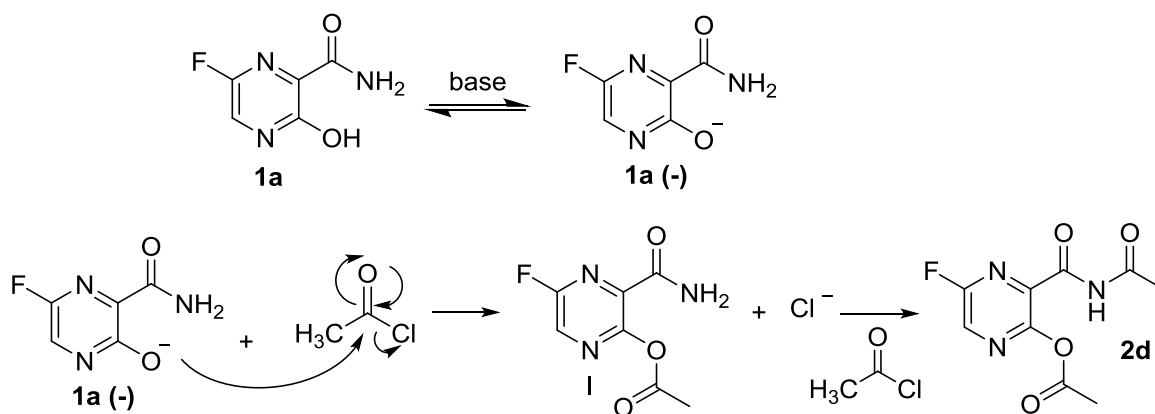


Figura 20. Mecanismo para conversión de favipiravir al producto **2d**.

7.2 Aspectos Biológicos

En esta sección se describen los resultados de citotoxicidad y actividad antiviral contra dos modelos de Coronavirus de una serie de derivados de favipiravir (**Figura 13**) así como un potencial análisis de la relación estructura propiedad para identificar el rol de la sustitución en la posición 6 del anillo de piracina, el rol de la lipoficidad, el rol del grupo hidroxilo y el grupo amido. Para cumplir este propósito, se cuenta con una serie de cinco compuestos funcionalizados **1a-e** en la posición con hidrógeno y diversos halógenos (F, Cl, Br y I), así como otros análogos **2a-e** funcionalizados a nivel del grupo hidroxilo que permitió evaluar el rol del grupo hidroxilo, lipofilicidad. El rol del grupo amido se pudo evaluar con el derivado **2b**.

En cuanto a los resultados obtenidos de citotoxicidad en la línea celular HRT-18 para los compuestos **1a-e**, se encontró que el cambio en el halógeno tiene un efecto sobre la citotoxicidad

de los compuestos, encontrándose el siguiente orden de CC_{50} de menor a mayor: **1c**, **1b**, **1a**, **1e**, **1d**. El compuesto que presento menor CC_{50} fue el derivado bromado (**1c**) con 314 μM , luego le siguió el derivado clorado (**1b**) con 354 μM . En el favipiravir (**1a**) fue de 542 μM . El derivado yodado (**1e**) y el derivado no halogenado (**1d**) presentaron concentraciones citotóxicas de 656 μM y 896 μM respectivamente. Los únicos compuestos que presentaron CC_{50} dentro del rango de las ensayadas a las ensayadas fueron los compuestos **1c** y **1b**.

Para los compuestos **2a-e** el orden de CC_{50} de menor a mayor en la línea celular HRT-18 fue el siguiente: **2e**, **2a**, **2c**, **2d**. El compuesto que presento menor CC_{50} fue el derivado con el grupo bencilo (**2e**) con 155 μM . Seguido por el derivado funcionalizado con el grupo triflato (**2a**) con 366 μM . El derivado metano-sulfónico (**2c**) presento una CC_{50} de 428 μM . Todos estos compuestos presentaron mayor citotoxicidad en comparación con el favipiravir (**1a**). Esto da cuenta de que las funcionalizaciones en el hidroxilo también afectan la citotoxicidad en las células, a excepción del derivado acetilado (**2d**). El compuesto **2b** no se pudo evaluar su CC_{50} debido a el MTT no se adhirió a las células con el compuesto.

En cuanto a los resultados obtenidos de CC_{50} en la línea celular HEP-2 para los compuestos **1a-e** siguió el siguiente orden de menor a mayor: **1a**, **1b**, **1d**, **1c**, **1e**. La CC_{50} para este grupo de compuestos fue mayor a las ensayadas. En esta línea celular los cambios en los halógenos disminuyó la citotoxicidad de los compuestos. Las diferencias encontradas entre las dos líneas celulares se pueden deber a los diferentes orígenes de los cuales derivan estas células, los cuales son explicados más adelante.

Para los compuestos **2a-e** el orden de menor a mayor para la CC_{50} fue el siguiente: **2e**, **2d**, **2b**, **2a**, **2c**. En este caso la incorporación de nuevos grupos como: bencilo, triflato y acetilo disminuyó la citotoxicidad de los compuestos.

Posteriormente, se evaluó el potencial antiviral de los compuestos contra dos modelos de coronavirus humano coronavirus bovino cepa Mebus y h-Coronavirus 229E. Comenzando con la serie de compuestos **1a-e**, se pudo ver que en ambos sistemas biológicos existe un patrón en los resultados obtenidos. El cambio del F por otro halógeno o por H no aumentó la actividad biológica del compuesto en ninguno de los dos modelos biológicos. En el modelo de HEP-2/h-coronavirus 229E los compuestos halogenados (6Br, 6Cl, 6I) y el compuesto no halogenado (6H) obtuvieron una CI_{50} alta (en el rango de 500 - 125 μM) lo que indica baja capacidad para inhibir la replicación del virus. Los índices de selectividad para estos compuestos **1b**, **1c** y **1d**

fueron menores a 10 con valores de 2, 2 y 6 respectivamente. El compuesto **1e** presentó un índice de selectividad de 14. El compuesto de referencia **1a** (favipiravir) en este modelo presentó una CI_{50} baja, en el entorno de 31.5 μM y un índice de selectividad mayor a 20. En el modelo de HRT-18/BoCov cepa Mebus los compuestos halogenados (6Br, 6Cl, 6I) y el compuesto no halogenado (6H) obtuvieron una CI_{50} intermedia (en el rango de 100-62 μM) pero al analizar su índice de selectividad no fueron tan buenos. Para los compuestos **1e**, **1b** y **1c** sus índices de selectividad fueron de 7, 5, y 10 respectivamente. Solo el compuesto **1d** presentó un índice de selectividad comparable con el Favipiravir. Dicho compuesto presentó un índice de selectividad de 17.

Estos resultados sugieren que el cambio del F por otro halógeno o H decrece significativamente la actividad biológica de los compuestos. El halógeno F es clave en la estructura del compuesto. Es bien sabido que la molécula de favipiravir se encuentra en equilibrio tautomérico en sus dos formas (enol y ceto). Estudios que se han hecho anteriormente han demostrado que la forma predominante y más estable es la enólica, mientras que la forma cetónica es la forma tautomérica de más baja proporción. Sin embargo, en medio acuoso el equilibrio tautomérico se desplaza hacia la forma ceto debido a que la interacción con el agua desplaza el equilibrio hacia su forma más polar (Umar., 2020). Favipiravir es un profármaco lo que significa que para la formación de su metabolito activo este tiene que ser transformado luego de ingresar a la célula y es necesaria la conformación ceto para esto. Entonces, para establecer una relación entre la naturaleza del sustituyente en posición 6 del anillo de piracina y la actividad biológica y su posible vinculación, aunque de manera indirecta, con el tautomerismo a través de una mediación dirigida por el sustituyente en 6, en la presente investigación se realizaron unos estudios de densidad de carga (carga de Mulliken) a través de estudios teóricos de DFT (density functional theory) (**Figura 12**). Este estudio nos puede dar una idea sobre la distribución en los átomos claves en la piracina para el tautomerismo tales como nitrógeno 4 y el oxígeno de grupo hidroxilo. De los cálculos se encontró que la densidad de carga sobre el átomo de oxígeno fue negativa, lo que muestra su carácter nucleofílico y la magnitud de la carga de Mulliken fue dependiente del sustituyente en 6 de acuerdo al siguiente orden: F>H>Cl>Br>I. Una mayor densidad de carga sobre el grupo hidroxilo implica que el sistema tiene un mayor carácter nucleofílico y esto mostró una correlación con actividad antiviral. Para clarificar este punto se graficó la actividad biológica con respecto a la densidad de carga sobre el N y se encontró una correlación lineal buena para al

menos cuatro de los cinco derivados (**1a-d**) con R^2 superiores a 0.7 entre los valores experimentales y teóricos, lo cual sugiere la importancia que puede tener un grupo hidroxilo con una alta densidad de carga. Esto puede favorecer la habilidad de la molécula para generar un nitrógeno N4 lo suficientemente nucleofílico para reaccionar mediante la ribosilación y formar el metabolito activo (Umar., 2020).

En cuanto a la importancia de la funcionalidad química de los compuestos pertenecientes al grupo B: derivados del Favipiravir funcionalizados a nivel del grupo hidroxilo también se observó un patrón entre las funcionalizaciones en los dos sistemas biológicos. En ambos modelos la tendencia fue mejor eficacia de acetilo seguido de favipiravir y luego triflato, esto es consistente con que son grupos removibles de labilidad relativa. En el caso de los compuestos bencilo y sulfónico son grupos más difíciles de remover con respecto a los anteriores como es el grupo acetilo y triflato. A su vez grupos de mayor tamaño pueden interferir a la hora del ensamblaje del profármaco necesario para ser activo.

En el modelo HRT-18/CoBo cepa Mebus los compuestos **2c** y **2a** presentaron una CI_{50} mayor o igual que el fármaco de referencia (Favipiravir- 31,25 μM), siendo 93 y 31,25 μM respectivamente. El índice de selectividad para el compuesto **2a** fue mejor que para el compuesto **2c** siendo 12 y 2 respectivamente. Por otra parte, el compuesto **2e** a pesar de mostrar una CI_{50} baja, incluso menor que Favipiravir, presentó un índice de selectividad bajo. Esto es debido a que su CC_{50} es baja indicando la toxicidad del compuesto en las células. La funcionalización del **2d** fue la que presentó significativamente mayor eficacia siendo su índice de selectividad de 31.

En el modelo de HEp-2/h-coronavirus 229E, todos los compuestos obtuvieron CI_{50} más altas que favipiravir. Esto indica que su capacidad antiviral no es tan buena en comparación con el compuesto de referencia. Solamente el acetilo presentó una CI_{50} menor al favipiravir y un alto IS de 39. Todas las funcionalizaciones restantes tuvieron índices de selectividad aceptables, a excepción del **2e** con un IS de 2

A diferencia del trabajo previo realizado por Huchting *et al.*, 2018 donde encontraron que el sistema no florado tenía una actividad comparable contra el virus influenza, nosotros encontramos que para el Coronavirus 229E el favipiravir es 1,42 veces más activo que el derivado no florado y en el modelo de coronavirus bovino cepa Mebus encontramos que el favipiravir es 2.42 veces más activo.

Para analizar el rol de la lipofilia se pasó a determinar el *Log P* de los derivados funcionalizados a nivel del OH y Favipiravir (ver **tabla 10**). Basándonos en los postulados de Lipinski establece que el *Log P* de los compuestos debe ser menor a 5. Malas características farmacológicas pueden estar asociadas a *Log P* muy altos, lo que indica poca solubilidad en solución acuosa. Por otra parte, *Log P* muy bajos nos está diciendo que son compuestos muy hidrofílicos.

Como se puede ver en la actividad antiviral estos compuestos presentan una relativa actividad biológica a pesar de estar funcionalizados a nivel del OH. En el modelo HRT-18-CoBov resulta tener bastante lógica con los resultados obtenidos en cuanto a actividad biológica de los compuestos en donde acetilo (**2d**)> triflato(**2a**)> bencilo(**2e**)> metanosulfónico(**2c**). En cambio, en el modelo de HEp-2 los resultados obtenidos muestran cierta desviación siendo acetilo (**2d**)> triflato(**2a**)> triflato(**2c**)> metano-sulfónico(**2c**)> bencilo(**2e**). Las diferencias encontradas en los dos sistemas biológicos puede deberse a los diferentes orígenes de las líneas celulares utilizadas y esto puede afectar la replicación viral. La línea celular HRT-18 es aislada del intestino grueso de un paciente de sexo masculino con adenocarcinoma. Mientras que, HEp-2 se origina mediante una manipulación cruzada en las primeras etapas del cultivo con la línea celular HeLa. Originalmente se creía que estas células provenían de un carcinoma epidermoide de la laringe y posteriormente mediante el análisis de isoenzimas se confirmó la presencia de cromosomas marcados para HeLa y la huella de su ADN (American Type Culture Collection, 2022).

Se puede notar que la actividad biológica presenta cierta relación con la labilidad del grupo removibles. Es bien conocido que los grupos acetilo y triflato son buenos grupos removibles en solución acuosa y esto puede llevar a su fácil ingreso a la célula, posterior liberación del favipiravir y finalmente la tentativa formación del metabolito activo.

Por otra parte los grupos no removibles como bencilo y metanosulfónico en solución acuosa mostraron actividad más baja entre esta familia de derivados, lo cual está asociado a la dificultad de remover estos grupos, complicando la formación del metabolito activo ya que es fundamental tener el N4 libre. Es posible la reacción directa del N4 de este sistema con una ribosa, sin embargo, la especie de pyridinium es inestable. De acuerdo a los resultados la incorporación de un grupo lipofílico altamente removibles puede ser interesante para diseñar potenciales agentes basados en favipiravir con una lipofilia apropiada y la factibilidad de alcanzar el equilibrio tautomérico requerido después de la desprotección en solución acuosa.

Finalmente los resultados obtenidos para el derivado **2b**, derivado funcionalizado que presenta un grupo ciano en sustitución del grupo amido en el favipiravir, hacen suponer que el grupo amido puede tener una relativa importancia en la actividad antiviral en el sistema debido a que en su contraparte el derivado **2c** fue 1,18 veces más activo en el sistema HEp-2/h coronavirus 229E.

8. CONCLUSIÓN

Se pudo identificar una funcionalidad química que permitió obtener un sistema biológico que mejoró la actividad antiviral *in vitro* respecto al favipiravir en ambos modelos de coronavirus utilizados. Se identificó al compuesto **2d** como potencial candidato antiviral ya que tiene una baja citotoxicidad y buena actividad antiviral frente a los dos modelos de coronavirus que se ensayaron en trabajo.

En general, las funcionalizaciones sobre el grupo hidroxilo afectaron negativamente la eficacia de los compuestos con respecto al favipiravir. Es importante el grupo hidroxilo libre. El cambio del F por otro halógeno o hidrogeno también afecto negativamente la eficacia biológica de los compuesto. Resulta clave el F en la estructura del favipiravir.

Por otra parte, la lipofilia parece ser un factor clave a la hora de mejorar la eficacia de los compuestos. El compuesto acetilo hace que aumente la lipofilia del sistema, ayudando a que éste atravesase las membranas biológicas con mayor facilidad y eso hizo que la eficacia del compuesto aumente. Otro factor que puede influir en la formación del metabolito activo es la labilidad relativa de los grupos removibles ya que se obtuvieron mejores resultados con los grupos acetilo y triflato. Los compuestos con grupos de difícil remoción tales como metano-sulfónico y bencilo no presentaron tan buena actividad biológica.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, U., Raju, R., & Udwardia, Z. F. (2020). Favipiravir: A new and emerging antiviral option in COVID-19. *Medical Journal Armed Forces India*, 76(4), 370-376.
- Amantini, D., Fringuelli, F., Pizzo, F., & Vaccaro, L. (2001). Efficient O-trimethylsilylation of alcohols and phenols with trimethylsilyl azide catalyzed by tetrabutylammonium bromide under neat conditions. *The Journal of Organic Chemistry*, 66(20), 6734-6737.
- Arnott, J. A., & Planey, S. L. (2012). The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert opinion on drug discovery*, 7(10), 863-875.
- Assis, L. C., de Castro, A. A., de Jesus, J. P. A., da Cunha, E. F. F., Nepovimova, E., Krejcar, O., & La Porta, F. D. A. (2021). Theoretical insights into the effect of halogenated substituent on the electronic structure and spectroscopic properties of the favipiravir tautomeric forms and its implications for the treatment of COVID-19. *RSC advances*, 11(56), 35228-35244
- Baden, L. R., El Sahly, H. M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., & Zaks, T. (2020). Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *New England journal of medicine*.
- Benavides, R. A. H., Peña, L. I. C., Hinojosa, L. A., Yzarra, J. M. R., Ramos, T. N. R., Pineda, N. E., & Bejarano, S. J. T. P. (2020). *Coronavirus: una extensa familia de virus*. *Revista Ciencia Norandina*, 3(1), 68-79.
- Bocan, T. M., Basuli, F., Stafford, R. G., Brown, J. L., Zhang, X., Duplantier, A. J., & Swenson, R. E. (2019). Synthesis of [18F] Favipiravir and biodistribution in C3H/HeN Mice as assessed by positron emission tomography. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Bonner, T. G., & McNamara, P. (1968). The pyridine-catalysed acetylation of phenols and alcohols by acetic anhydride. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, 795-797.
- Borobia, A. M., Carcas, A. J., Pérez-Olmeda, M., Castaño, L., Bertran, M. J., García-Pérez, J., & Navalpotro, A. B. (2021). Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S-primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet*, 398(10295), 121-130.
- Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, Dulebohn SC, Napoli RD. (2020). Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19). *StatPearls*
- Chakraborti, A. K., & Gulhane, R. (2004). Copper (II) tetrafluoroborate-catalyzed acetylation of phenols, thiols, alcohols, and amines. *Synthesis*, 2004(01), 111-115.
- Chang C, Hou M-H, Chang C-F, Hsiao C-D, Huang T. The SARS coronavirus nucleocapsid protein - Forms and functions. *Antiviral Res.* marzo de 2014; 103:39-50. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.antiviral.2013.12.009>
- Comprehensive Organic Functional Group Transformations, Volume 2, 1995, Pages 635-703, 2.13 - Alkenyl and Aryl Chalcogenides: Oxygen-based Functional Groups by Charles K.-F. Chiu
- Cortés, M. E. (2020). Coronavirus zoonótico SARS-CoV-2: La búsqueda del misterioso hospedero intermediario. *Revista Medica Herediana*, 31(2), 138-140.
- Du, Y. X., & Chen, X. P. (2020). Favipiravir: pharmacokinetics and concerns about clinical trials for 2019-nCoV infection. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 108(2), 242-247
- Dutta, U., Deb, A., Lupton, D. W., & Maiti, D. (2015). The regioselective iodination of quinolines, quinolones, pyridones, pyridines and uracil. *Chemical Communications*, 51(100), 17744-17747.

- El-Dakdouki, M. H., & Erhardt, P. W. (2012). Analogue-based drug discovery: Contributions to medicinal chemistry principles and drug design strategies. Microtubule stabilizers as a case in point (Special Topic Article). *Pure and Applied Chemistry*, 84(7), 1479-1542
- Elfiky, A., 2020. Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19. *Life Sci*. 248. doi:10.1016/j.lfs.2020.117477
- Ena, J., & Wenzel, R. P. (2020). *Un nuevo coronavirus emerge. Revista clinica espanola*, 220(2), 115.
- Espín Sánchez, D. D. L. (2021). *Cribado virtual de inhibidores de la enzima ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp) del virus SARS-CoV-2, empleando librerías de compuestos y homología estructural con ARN polimerasas virales* (tesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Ingeniería Bioquímica).
- Fehr, A.R. & Perlman, S. 2015. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* 1282, 1-23.
- Feng, B., Li, Y., Li, H., Zhang, X., Xie, H., Cao, H., & Xu, Q. (2018) Specific N-Alkylation of Hydroxypyridines Achieved by a Catalyst-and Base-Free Reaction with Organohalides. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(12), 6769-6775.
- Frediansyah, A., Tiwari, R., Sharun, K., Dhama, K., & Harapan, H. (2021). Antivirals for COVID-19: A critical review. *Clinical Epidemiology and global health*, 9, 90-98.
- Ghasemnejad-Berenji, M., & Pashapour, S. (2021). Favipiravir and COVID-19: a simplified summary. *Drug research*, 71(03), 166-170
- Ghosh, A. K., & Brindisi, M. (2015). Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry. *Journal of medicinal chemistry*, 58(7), 2895-2940.
- Gold Book: leaving group., IUPAC., 2009. doi:10.1351/goldbook.L03493.
- Gómez Tejada, J. J., Dieguez Guach, R. A., & Pérez Abreu, M. R. (2020). Alternativas terapéuticas para el manejo de la COVID-19. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 19
- Gordon, M., Patricio, M., Horne, L., Muston, A., Alston, S. R., Pammi, M., & Daniel, M. (2020). *Developments in medical education in response to the COVID-19 pandemic: a rapid BEME systematic review: BEME Guide No. 63. Medical teacher*, 42(11), 1202-1215.
- Kantor, I. N., Lüthy, I. A., & Ritacco, V. (2021). Las variantes de SARS-CoV-2 y la llamada resistencia a las vacunas. *Medicina (Buenos Aires)*, 81(3), 421-426.
- Katritzky, A. R., *et al.*, (2010). Tautomerism in drug discovery. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 24(6), 475-484
- Keykavous. P. & Tiwari, R.K., (2020). Comparative Antiviral Activity of Remdesivir and Anti-HIV Nucleoside Analogs against Human Coronavirus 229E (HCoV-229E)
- Harrison, C., 2020. Coronavirus puts drug repurposing on the fast track. *Nat. Biotechnol.* 38, 379–381. doi:10.1038/d41587-020-00003-1)
- Hassan SkS, Choudhury PP, Roy B. SARS-CoV2 envelope protein: non-synonymous mutations and its consequences. *Genomics* (Internet). noviembre de 2020;112(6):3890-2. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.ygeno.2020.07.001>
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020;8674(20):30229–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Huchting, J., Vanderlinden, E., Winkler, M., Nasser, H., Naesens, L., & Meier, C. (2018). Prodrugs of the phosphoribosylated forms of hydroxypyrazinecarboxamide pseudobase T-705 and its de-fluoro analogue T-1105 as potent influenza virus inhibitors. *Journal of*

Medicinal Chemistry, 61(14), 6193-6210.

- Huchting, J., Vanderlinden, E., Van Berwaer, R., Meier, C., & Naesens, L. (2019). Cell line-dependent activation and antiviral activity of T-1105, the non-fluorinated analogue of T-705 (favipiravir). *Antiviral Research*, 167, 1-5.
- Ibáñez Guelfenbein, C., Torres Torretti, J. P., & Santolaya de Pablo, M. E. (2021). Vacunas SARS CoV-2, estudios en fase III. *Revista chilena de infectología*, 38(1), 88-98.
- Indrayanto, G., Putra, G. S., & Suhud, F. (2021). Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 46, 273-307
- Jean, S. S., & Hsueh, P. R. (2020). Old and re-purposed drugs for the treatment of COVID-19. *Expert review of anti-infective therapy*, 18(9), 843-847.
- Johnstone, R. A., & Rose, M. E. (1979). A rapid, simple, and mild procedure for alkylation of phenols, alcohols, amides and acids. *Tetrahedron*, 35(18), 2169-2173.
- Joshi, S., Parkar, J., Ansari, A., Vora, A., Talwar, D., Tiwaskar, M., & Barkate, H. (2021). Role of favipiravir in the treatment of COVID-19. *International Journal of Infectious Diseases*, 102, 501-508.
- León-Lara, X., & Otero-Mendoza, F. (2020). Desarrollo de vacunas contra SARS-CoV-2. *Acta Pediatr Mex*, 41(1), 23-26.
- Li, G., Jing, X., Zhang, P., & De Clercq, E. (2021). Antiviral classification. *Encyclopedia of Virology*, 121.
- Liu, B., Li, M., Zhou, Z., Guan, X., & Xiang, Y. (2020). Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)?. *Journal of autoimmunity*, 111, 102452.
- Lythgoe, M. P., & Middleton, P. (2020). Ongoing clinical trials for the management of the COVID-19 pandemic. *Trends in pharmacological sciences*, 41(6), 363-382.
- Madelain, V., et al., (2016). Ebola virus infection: review of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs considered for testing in human efficacy trials. *Clin Pharmacokinet*. 55. 907-923.
- Madelain, V., Guedj, J., Mentré, F., Nguyen, T. H. T., Jacquot, F., Oestereich, L., & Raoul, H. (2017). Favipiravir pharmacokinetics in nonhuman primates and insights for future efficacy studies of hemorrhagic fever viruses. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(1)
- Mallapaty, S. (2021). China's COVID vaccines have been crucial now immunity is waning. *Nature*, 598(7881), 398-399.
- McNaught, A. D., & Wilkinson, A. (1997). Compendium of chemical terminology. IUPAC recommendations
- Nguyen, T. H. T., Guedj, J., Anglaret, X., Laouénan, C., Madelain, V., Taburet, A. M., ... & JIKI study group. (2017). Favipiravir pharmacokinetics in Ebola-Infected patients of the JIKI trial reveals concentrations lower than targeted. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(2)
- Nro. Patente JP 5739618B2., Method for producing 3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide
- Özlüsen, B., Kozan, Ş., Akcan, R. E., Kalender, M., Yaprak, D., Peltek, İ. B., & Ergönül, Ö. (2021). Effectiveness of favipiravir in COVID-19: a live systematic review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(12), 2575-2583)
- Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., & Gruber, W. C. (2020). Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *New England journal of medicine*.

- Ramírez-Olivencia, G., Estébanez, M., Membrillo, F. J., & del Carmen Ybarra, M. (2019). Uso de ribavirina en virus distintos de la hepatitis C. una revisión de la evidencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(9), 602-608.
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*, 27(3), 493-497.
- Roner M, Sprayberry J, Spinks M, Dhanji S. (2007). Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Molina). *J of Gral Virol* 88: 275-285.
- Rubio, J. C., Millan, I. A., Moreno-Higueras, M., Ripoll, L. M., Osorio, E. Y., & Ríos-Fernández, R. (2021). Caution with the use of dexamethasone in patients with COVID-19 in its initial phases. *Revista Clínica Española (English Edition)*, 221(10), 592-595.
- Sacks, H. S. (2021). The Novavax vaccine had 90% efficacy against COVID-19 ≥ 7 d after the second dose. *Annals of Internal Medicine*, 174(11), JC124.
- Sakakura, A., Kawajiri, K., Ohkubo, T., Kosugi, Y., & Ishihara, K. (2007). Widely useful DMAP-catalyzed esterification under auxiliary base- and solvent-free conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 129(47), 14775-14779.
- Salazar, E., Christensen, P. A., Graviss, E. A., Nguyen, D. T., Castillo, B., Chen, J. & Musser, J. M. (2020). Treatment of coronavirus disease 2019 patients with convalescent plasma reveals a signal of significantly decreased mortality. *The American journal of pathology*, 190(11), 2290-2303.
- Satarker S, Nampoothiri M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Arch Med Res (Internet)*. 25 de mayo de 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.arcmed.2020.05.012>
- Schnider, P. (2021). Overview of strategies for solving ADMET challenges. 1-15
- Singh, V., Fedeles, B. I., & Essigmann, J. M., (2015). Role of tautomerism in RNA biochemistry. *Rna*, 21(1), 1-13
- Srinivasan, K., & Rao, M. (2021). Understanding the clinical utility of favipiravir (T-705) in coronavirus disease of 2019: a review. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 8, 20499361211063016.
- Sterin Prync, A. E. (2020). Vacunas para SARS-CoV-2, diferentes estrategias de los desarrollos en curso. *Revista del hospital italiano de Buenos Aires*, 40(2), 63–69.
- Totura, A. L., & Bavari, S. (2019). *Broad-spectrum coronavirus antiviral drug discovery. Expert opinion on drug discovery*, 14(4), 397-412.)
- Umar, Y. (2020). Theoretical studies of the rotational and tautomeric states, electronic and spectroscopic properties of favipiravir and its structural analogues: a potential drug for the treatment of COVID-19. *Journal of Taibah University for Science*, 14(1), 1613-1625.
- Vassilara, F., Spyridaki, A., Pothitos, G., Deliveliotou, A., & Papadopoulos, A. (2018). A rare case of human coronavirus 229E associated with acute respiratory distress syndrome in a healthy adult. *Case reports in infectious diseases*, 2018.
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155-170.
- Vogel, A., (1956). *Practical Organic Chemistry*, Longman Group Limited, London, Gran Bretaña
- Wang, Y., Fan, G., Salam, A., Horby, P., Hayden, F. G., Chen, C., & Cao, B. (2020). Comparative effectiveness of combined favipiravir and oseltamivir therapy versus oseltamivir monotherapy in critically ill patients with influenza virus infection. *The Journal*

of infectious diseases, 221(10), 1688-1698

- Wang, X., Wang, L., Yao, C., Xie, G., Song, S., Li, H., & Tao, X. (2021). Novel Formulations of the Antiviral Drug Favipiravir: Improving Permeability and Tabletability. *Crystal Growth & Design*, 21(7), 3807-3817.

- Wedrowska E, Wandtke T, Senderek T, Piskorska E, Kopinski P. Coronaviruses fusion with the membrane and entry to the host cell. *Ann Agric Environ Med*. 19 de junio de 2020; 27(2):175-83. DOI: <https://doi.org/10.26444/aaem/122079>

- Wuts, P. G., & Greene, T. W. (2006). *Greene's protective groups in organic synthesis*. John Wiley & Sons

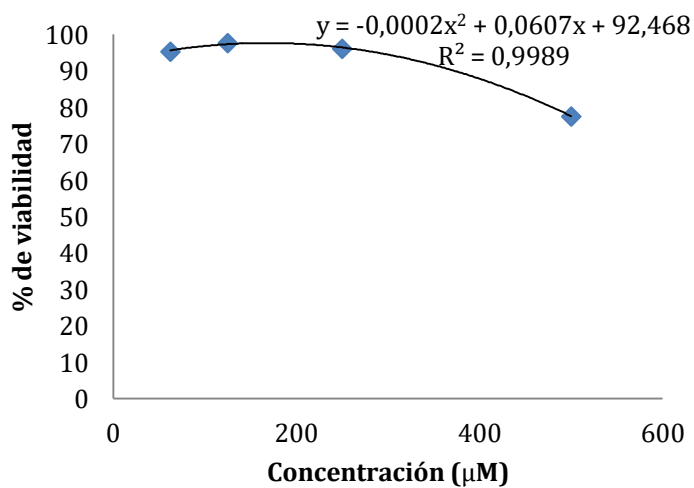
- Yasir, H. M., & Hanoon, F. H. (2020, November). DFT and TD-DFT study of favipiravir tautomerism as RNA polymerase inhibitors: COVID-19. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 928, No. 7, p. 072066). IOP Publishing

- Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, *et al.*, A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798):270–3. doi: 10.1038/ s41586-020-2012-7

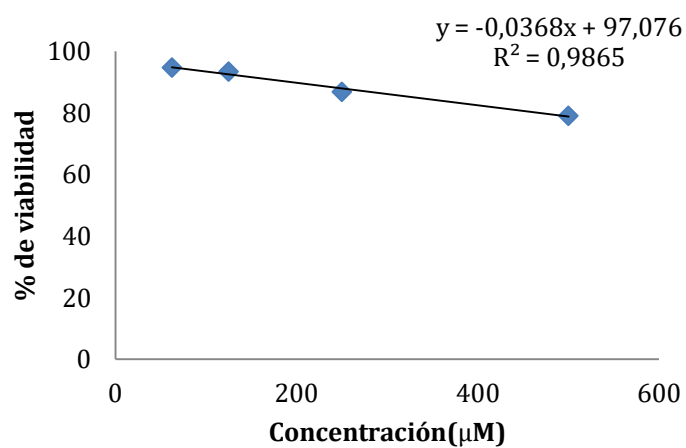
10. ANEXO

Gráficos de CC_{50} en los derivados del grupo A en Hep-2.

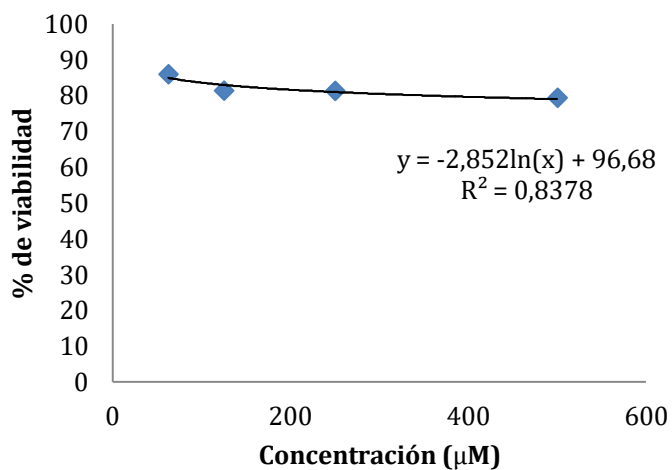
6-flúor-3-hidroxi-2-piracincarcboxamida (1a)



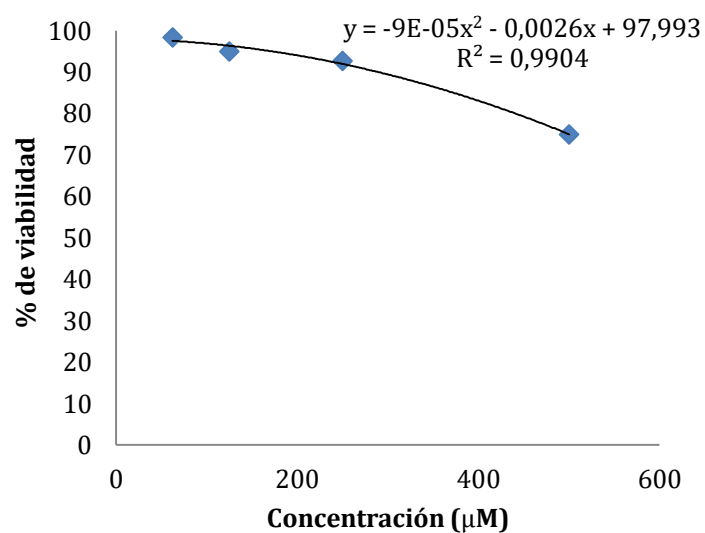
6-cloro-3-hidroxi-2-piracincarcboxamida (1b)

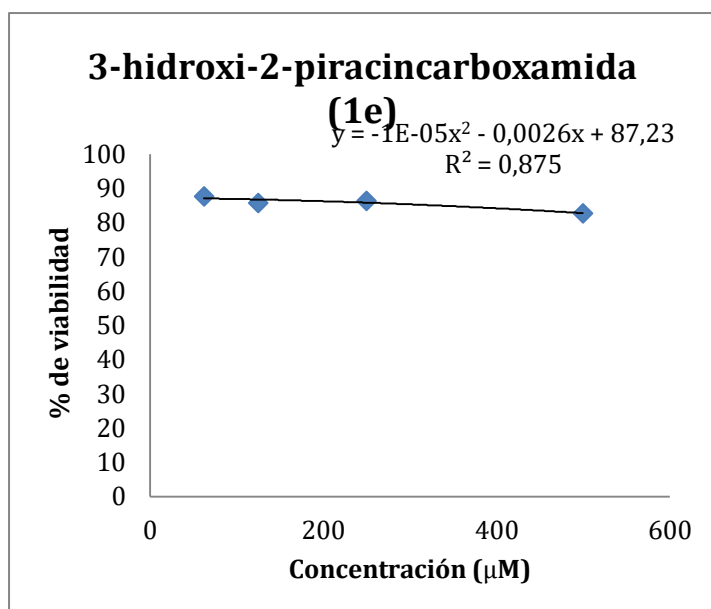


6-bromo-3-hidroxi-2-piracincarcboxamida (1c)

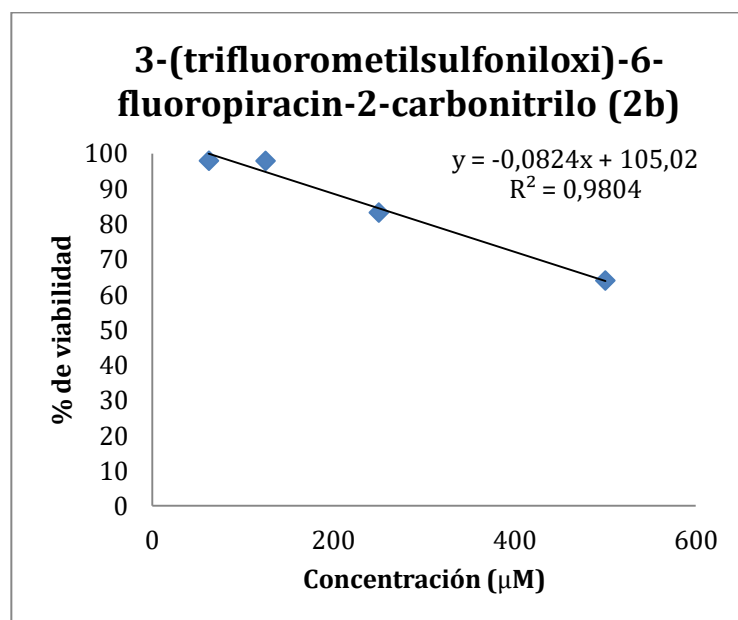
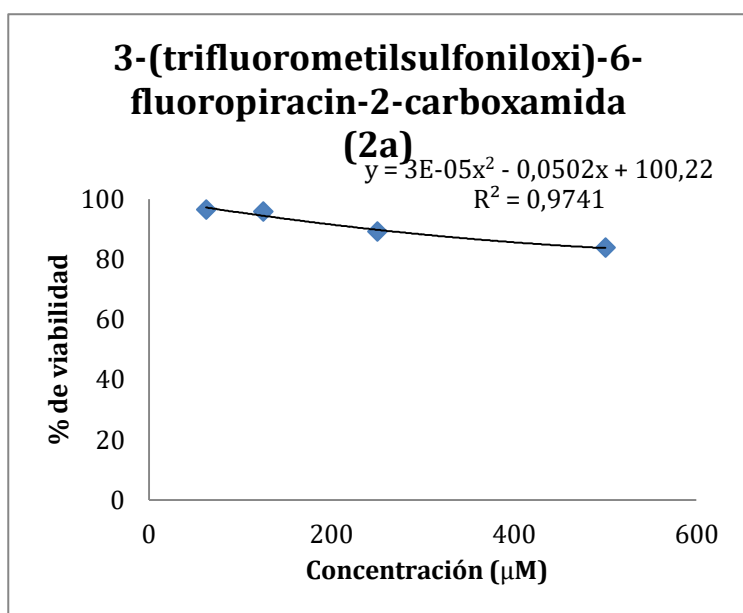


6-iodo-3-hidroxi-2-piracincarcboxamida (1d)

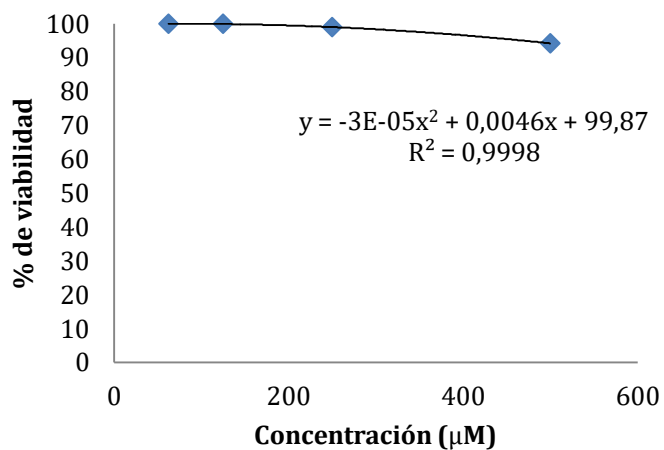




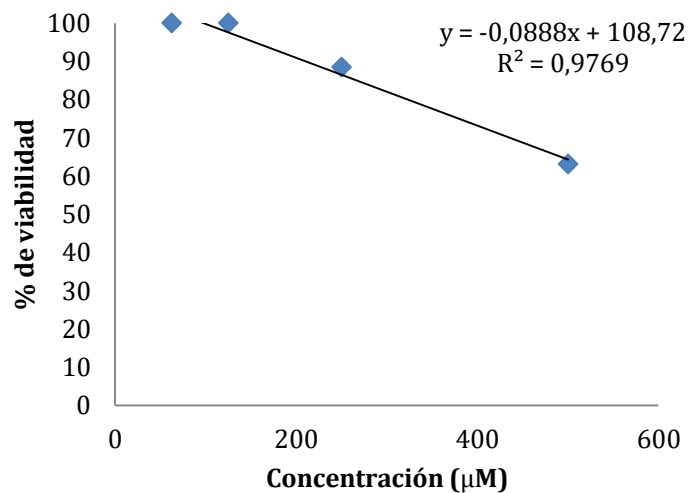
Gráficos de CC₅₀ en los derivados del grupo B en Hep-2.



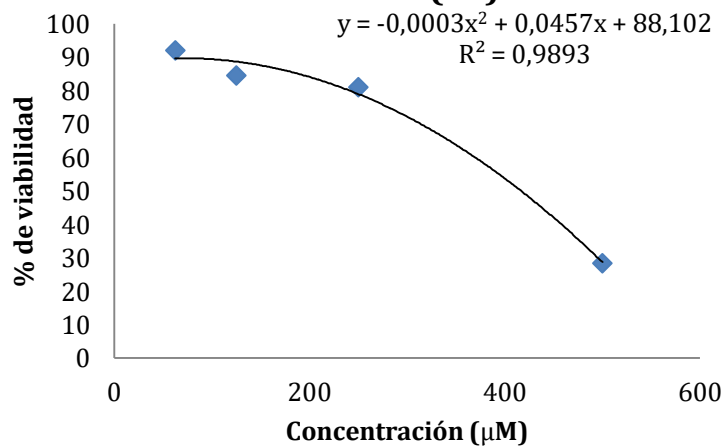
3-(metilsulfoniloxi)-6-fluoropiracin-2-carboxamida (2c)



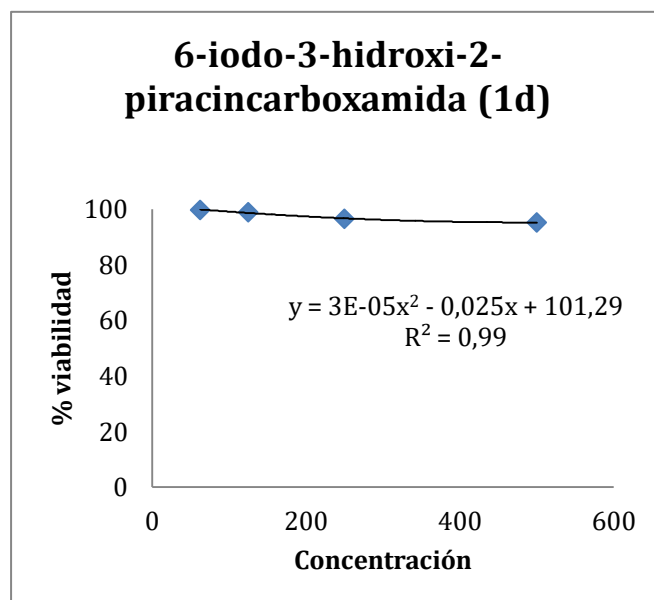
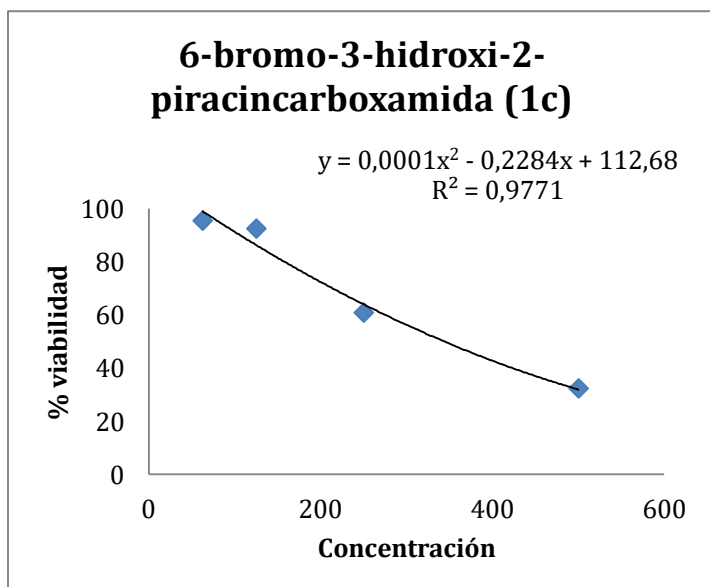
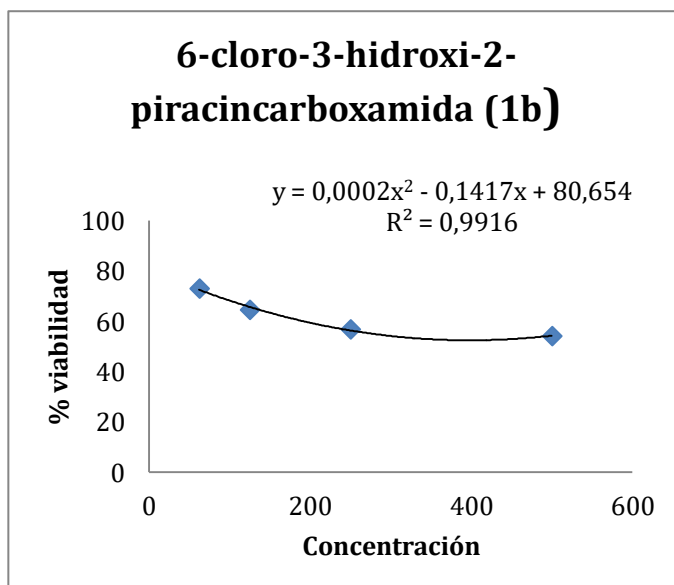
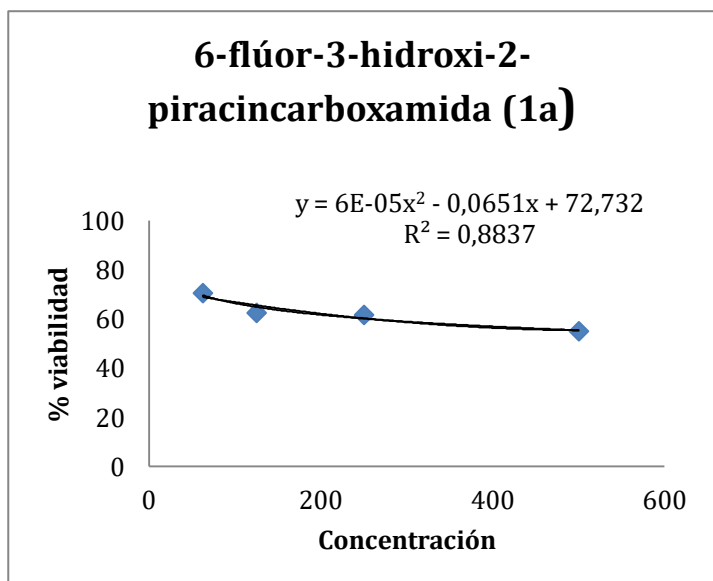
Acetato de 3-(acetilcarbamoil)-5-fluoropiracina-2-il (2d')

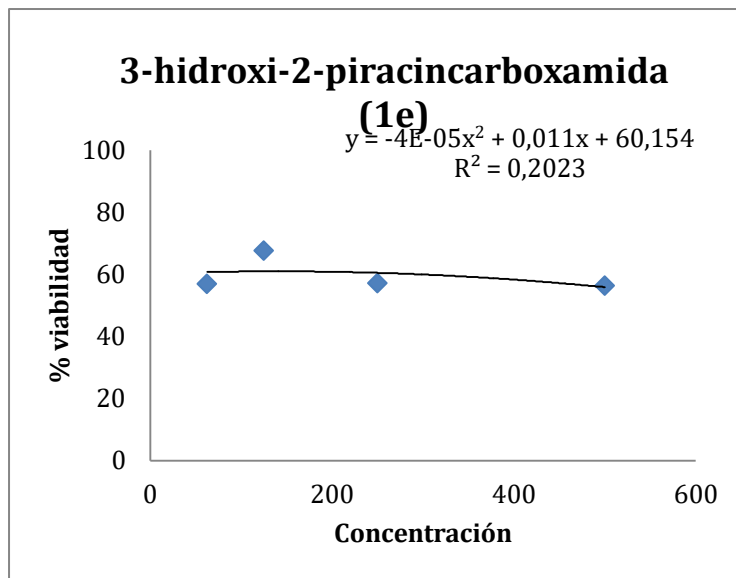


3-(benciloxi)-6-fluoropiracina-2-carboxamida (2e)

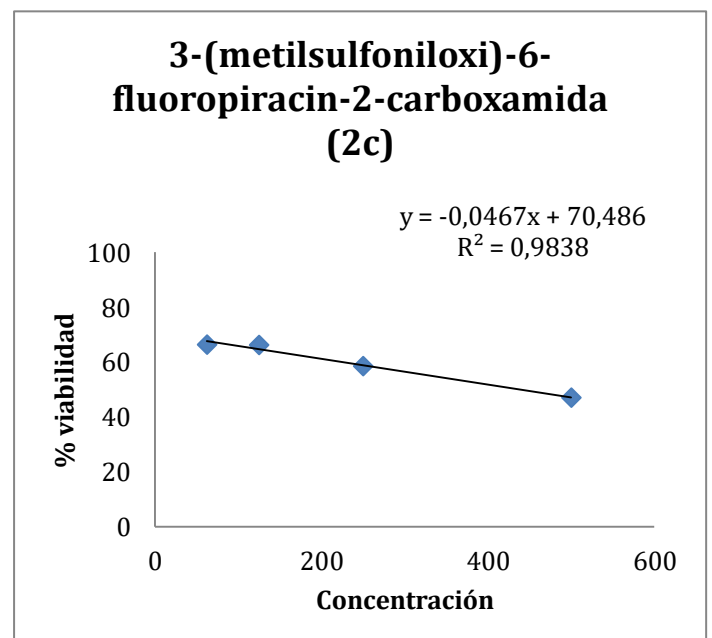
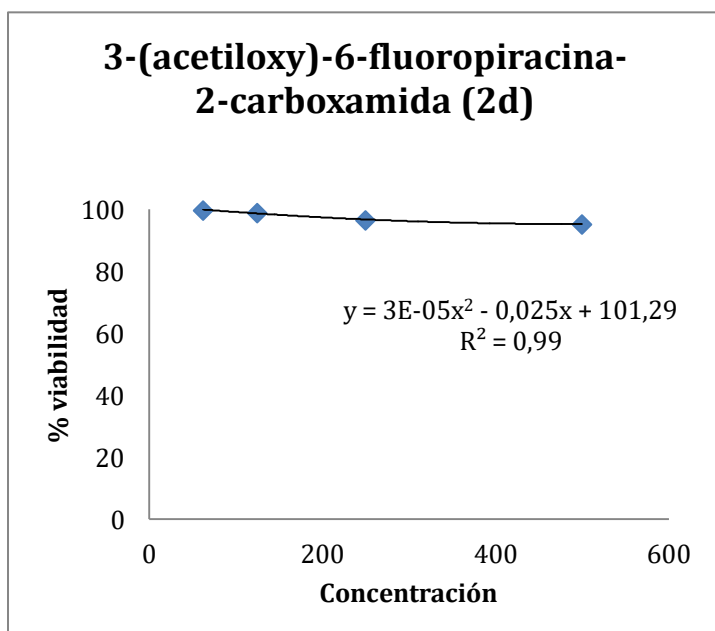
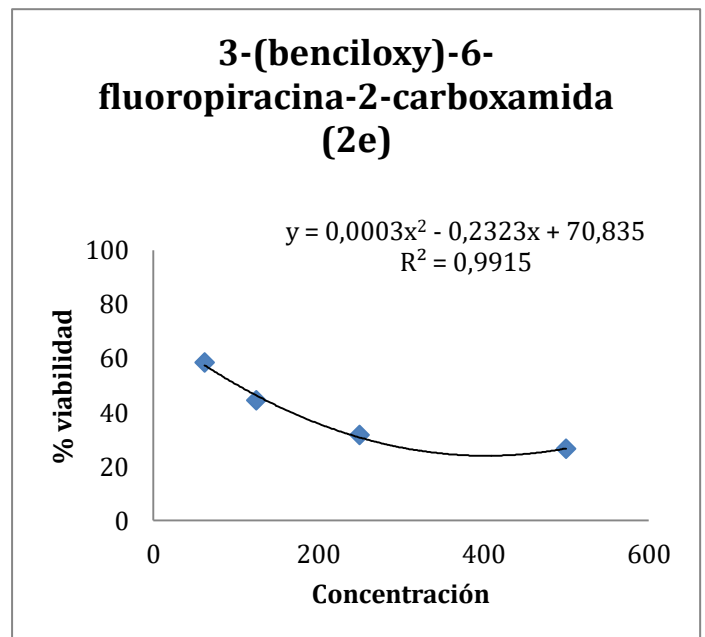
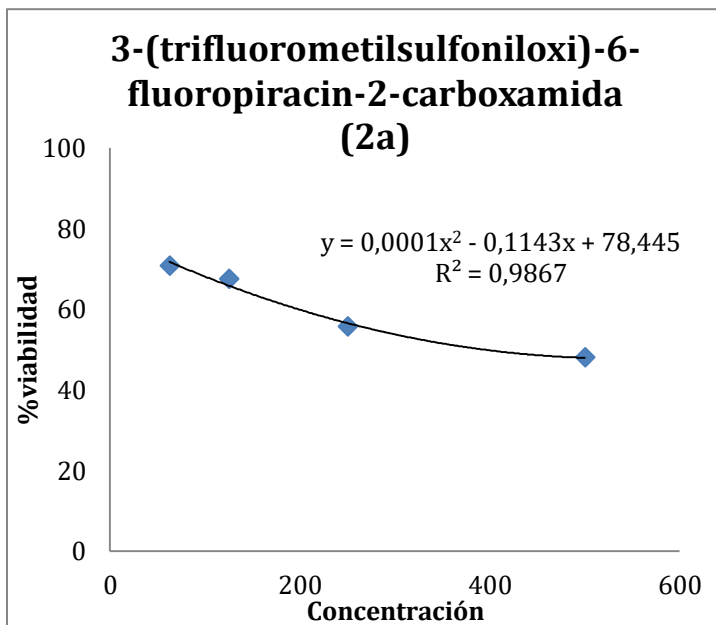


Graficos de Concentración citotóxica 50% (CC50%) en los derivados del grupo A en HRT-18.

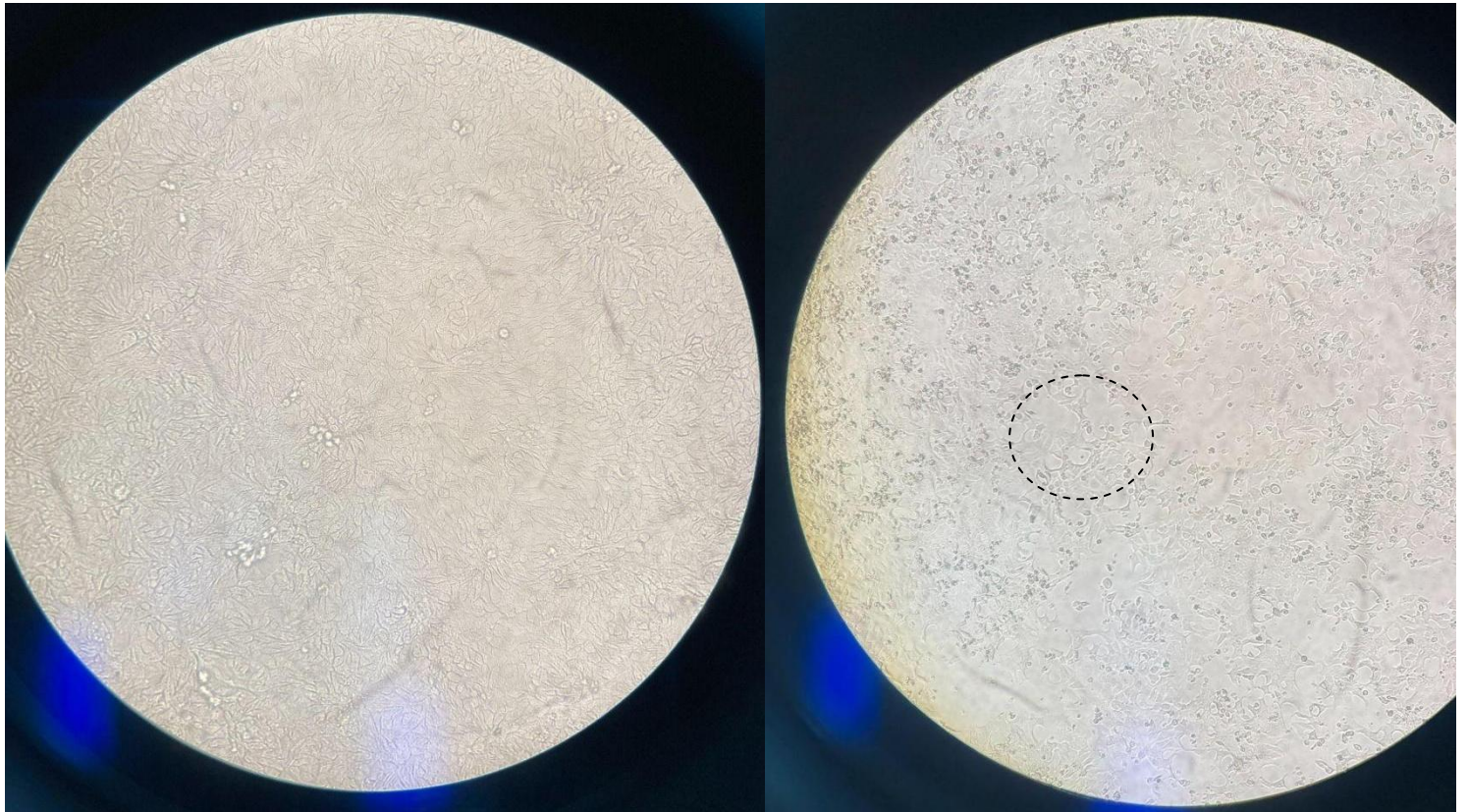




Graficos de CC₅₀ en los derivados del grupo B en HRT-18.



Efecto citopático de Coronavirus bovino cepa mebus en células HRT-18

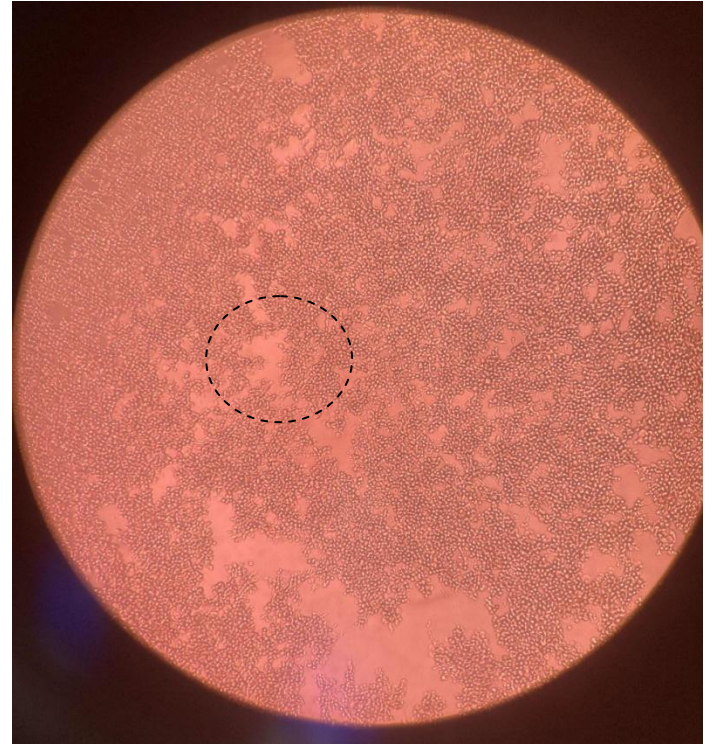
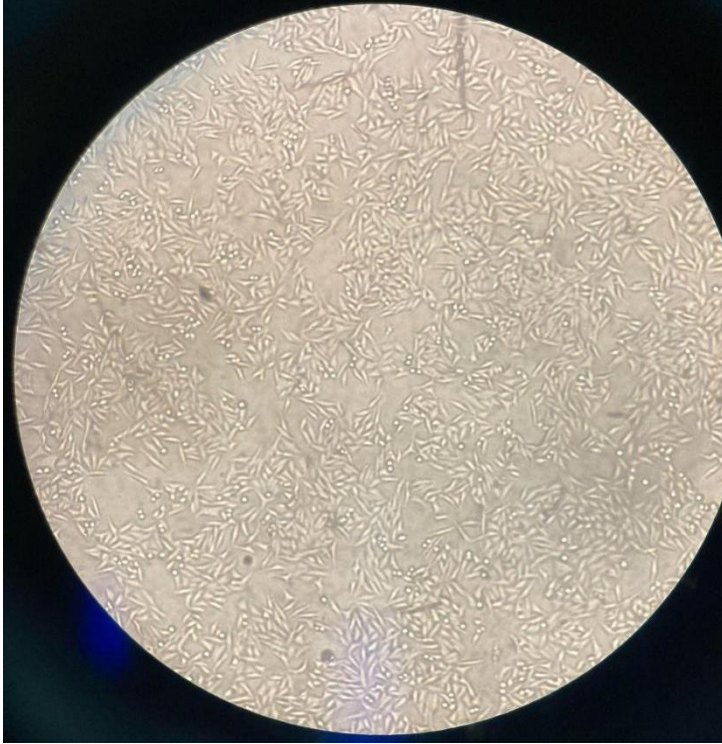


A- Monocapa de células HRT-18 sin infectar (control)

B- Efecto citopático de BoCov

* En el círculo punteado se muestra la ruptura de la monocapa de células por efecto del coronavirus bovino. Las células comienzan a agruparse como en cadenas de lisis perdiendo su forma alargada característica

Efecto citopático de h- Coronavirus 229E en células HEp-2



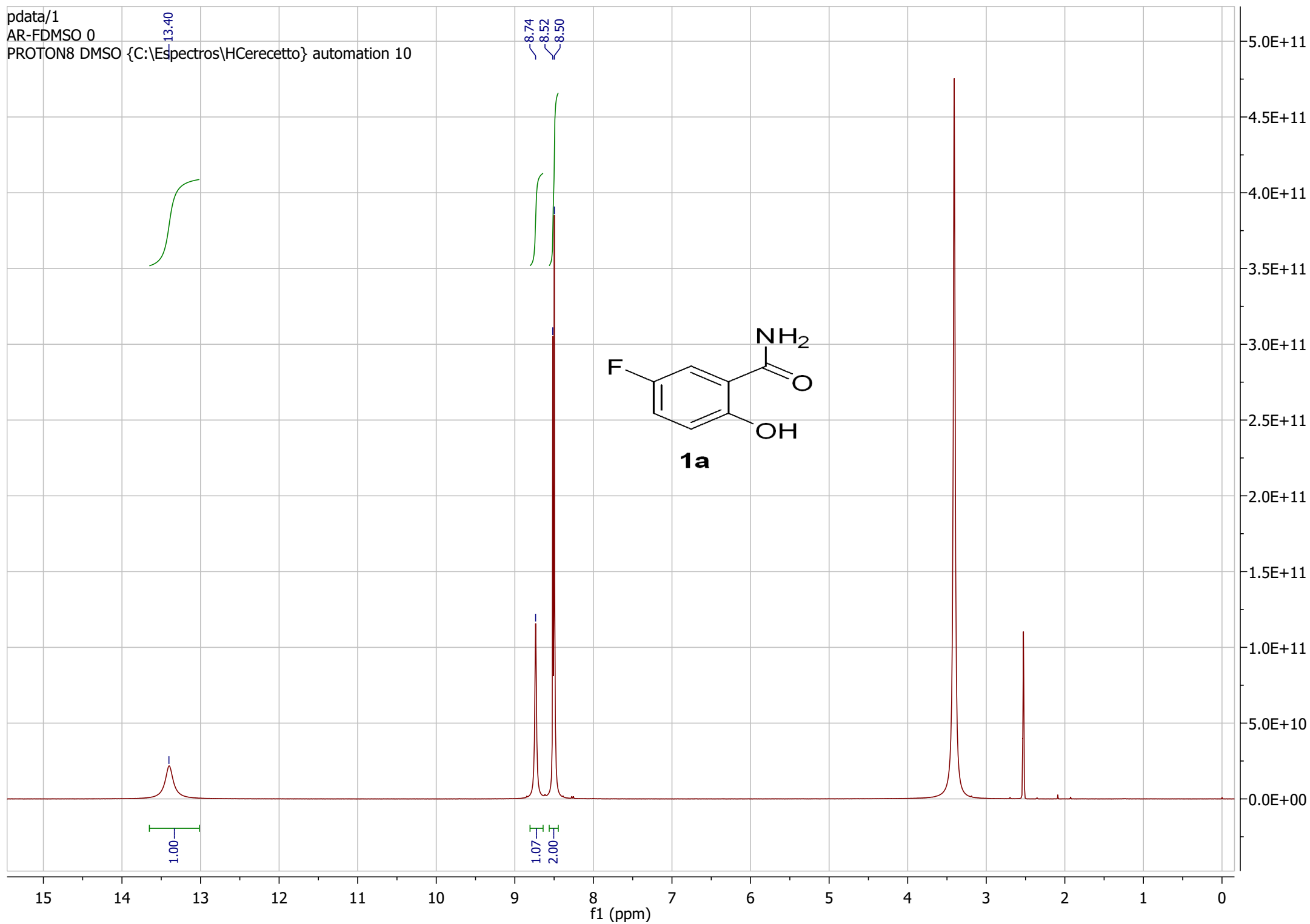
A- Monocapa células HEp-2 sin infectar (control)

B- Efecto citopático H-Cov.

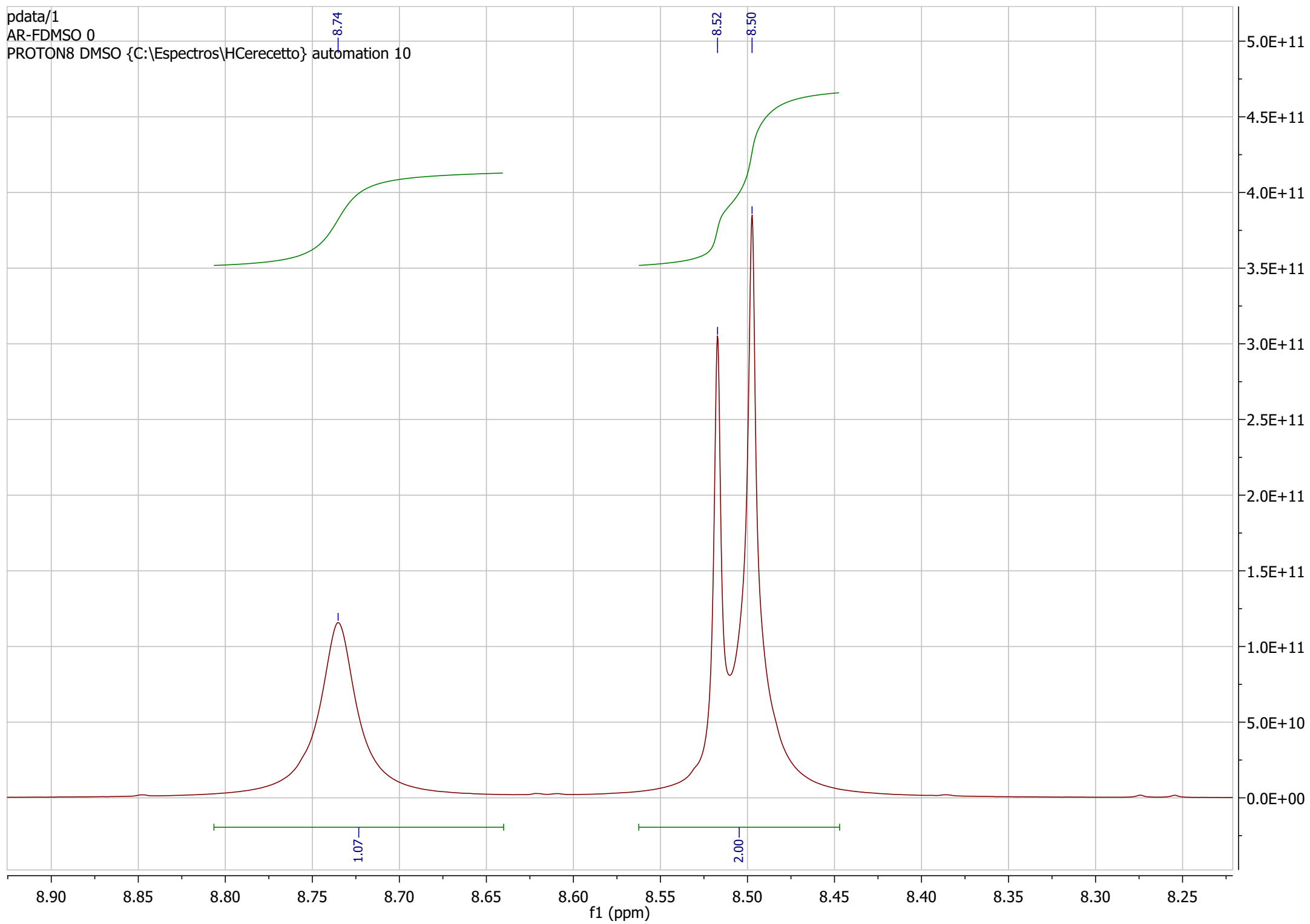
* En el círculo punteado se muestra la ruptura de la monocapa de células por efecto del h-coronavirus 229E. Las células comienzan a agruparse como en cadenas de lisis perdiendo su forma alargada característica.

ANEXOS (Espectros de RMN)

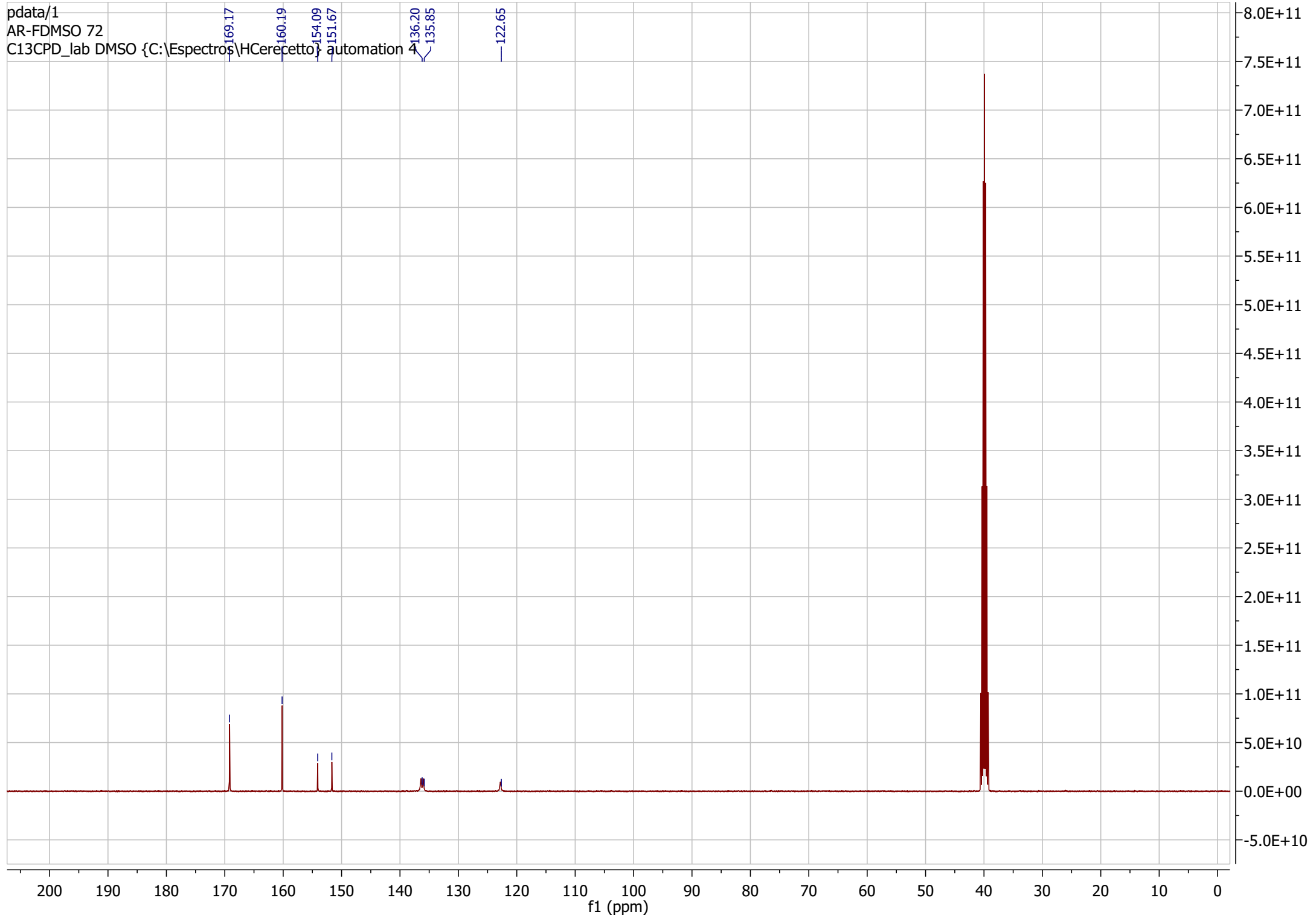
pdata/1
AR-FDMSO 0
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 10



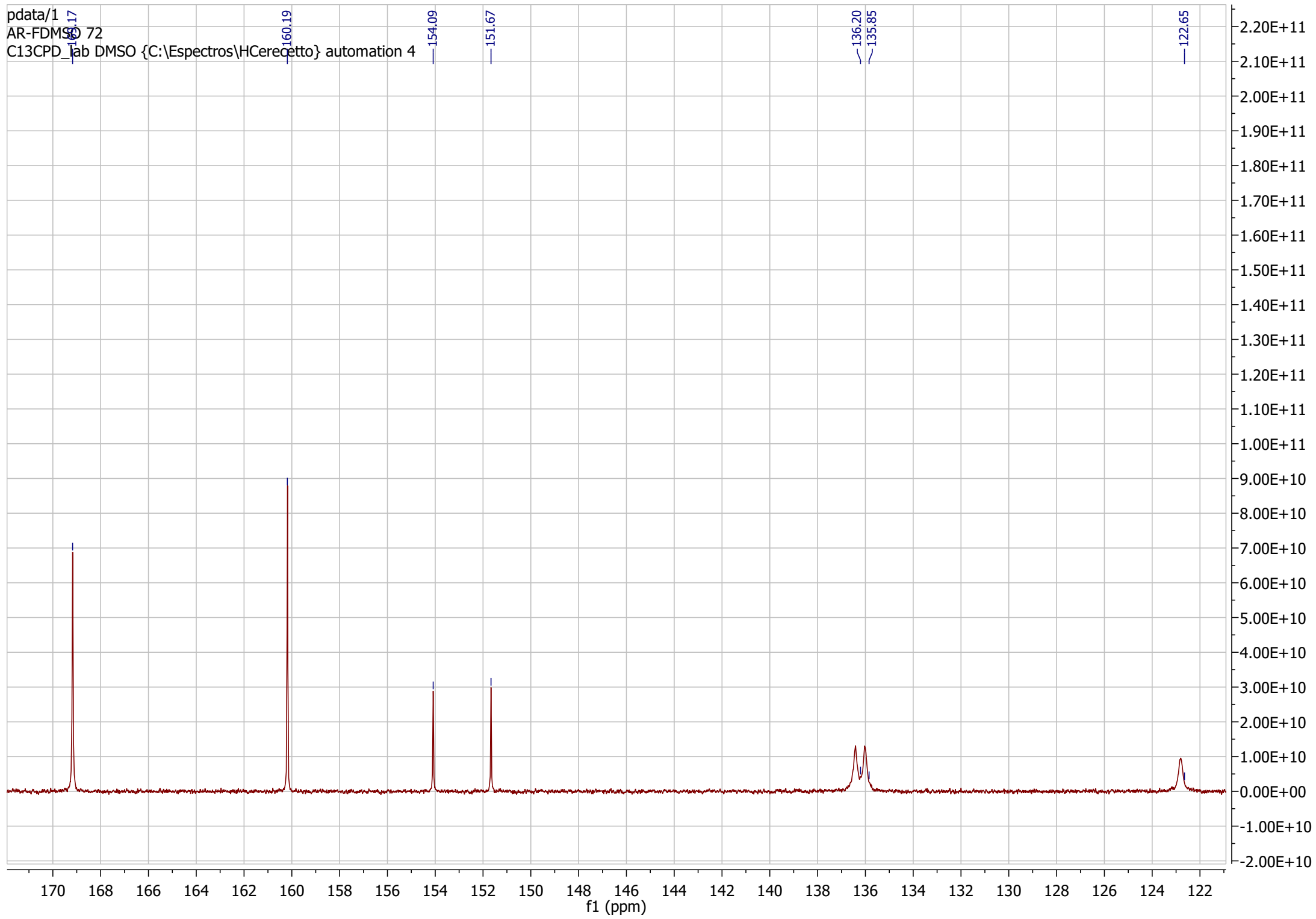
pdata/1
AR-FDMSO 0
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 10



pdata/1
AR-FDMSO 72
C13CPD_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto\ automation 4

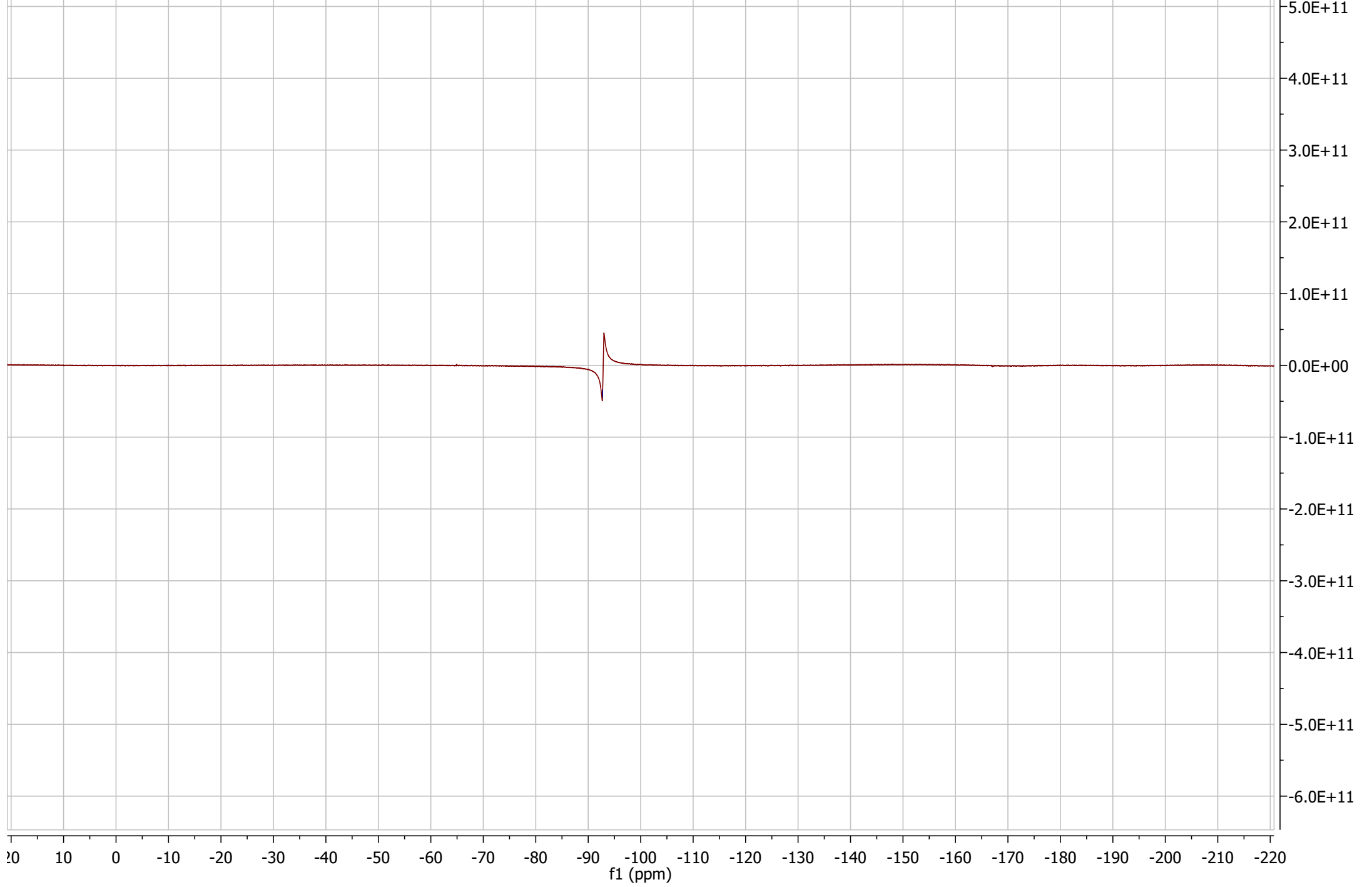


pdata/1
AR-FDMS 72
C13CPD_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 4



pdata/1
AR-FDMSO 0
F19CPD_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 10

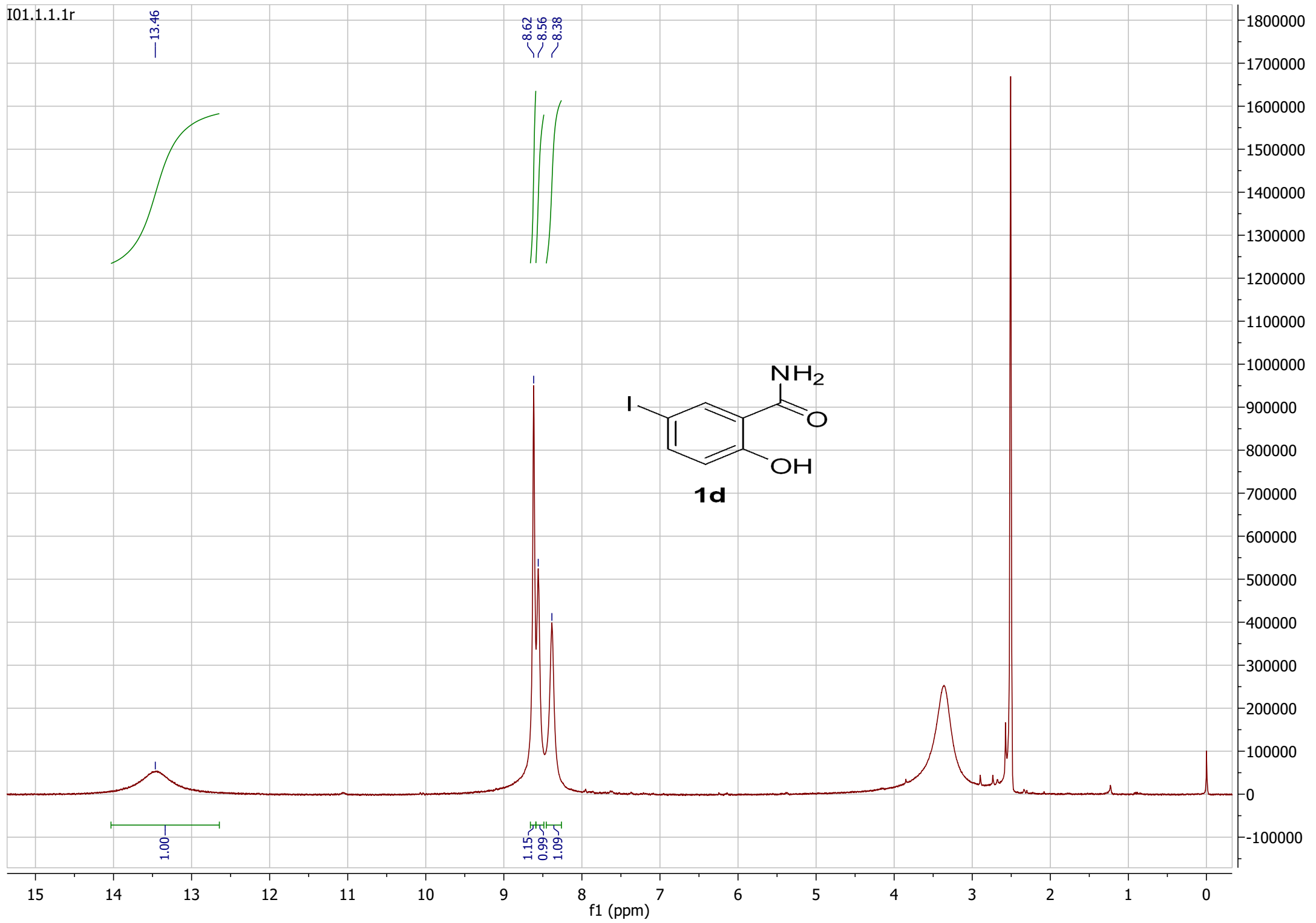
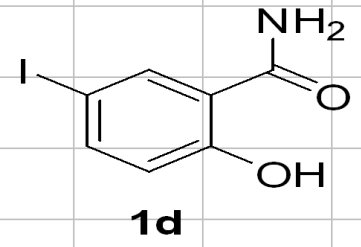
— -92.73



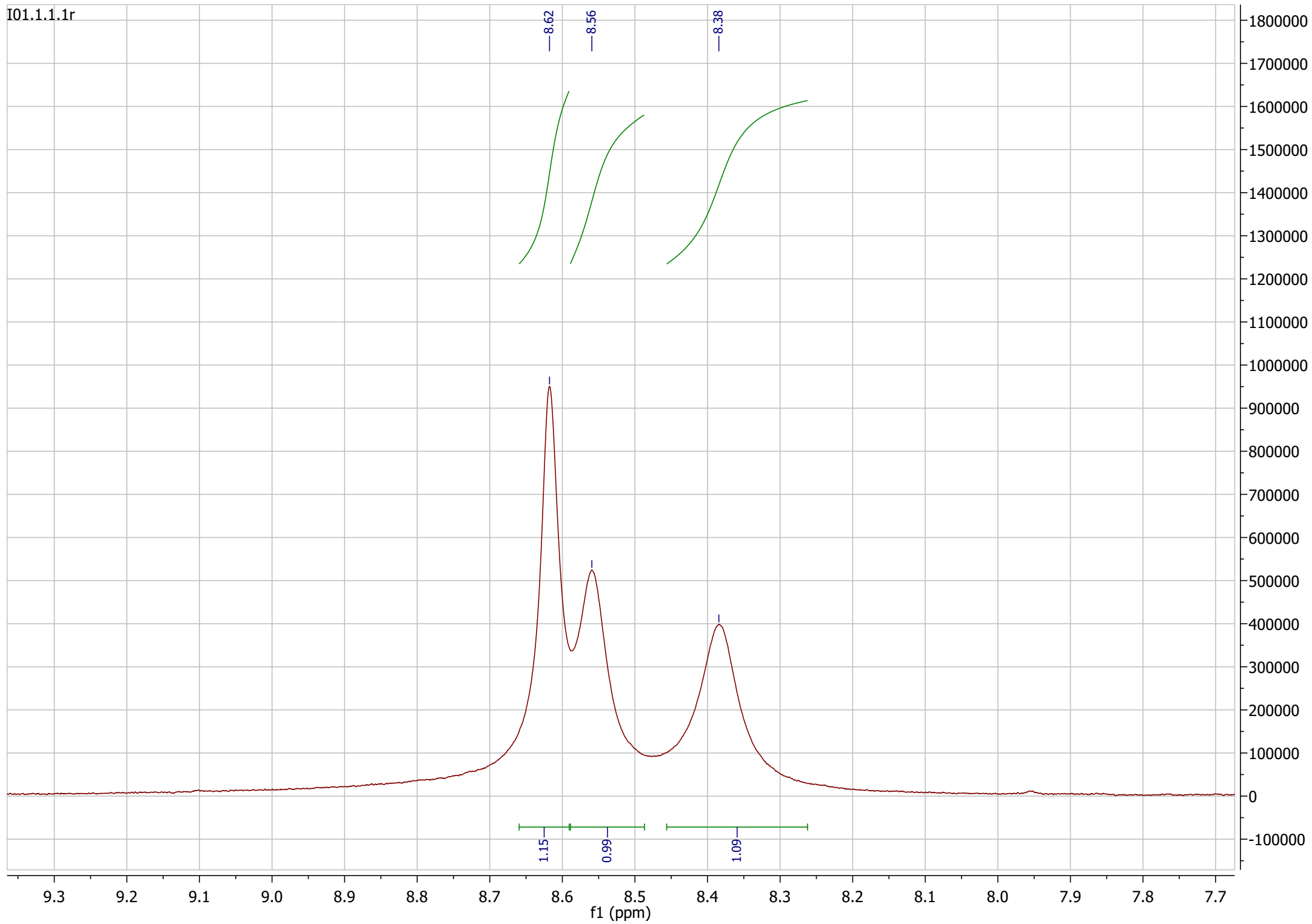
I01.1.1.1r

— 13.46

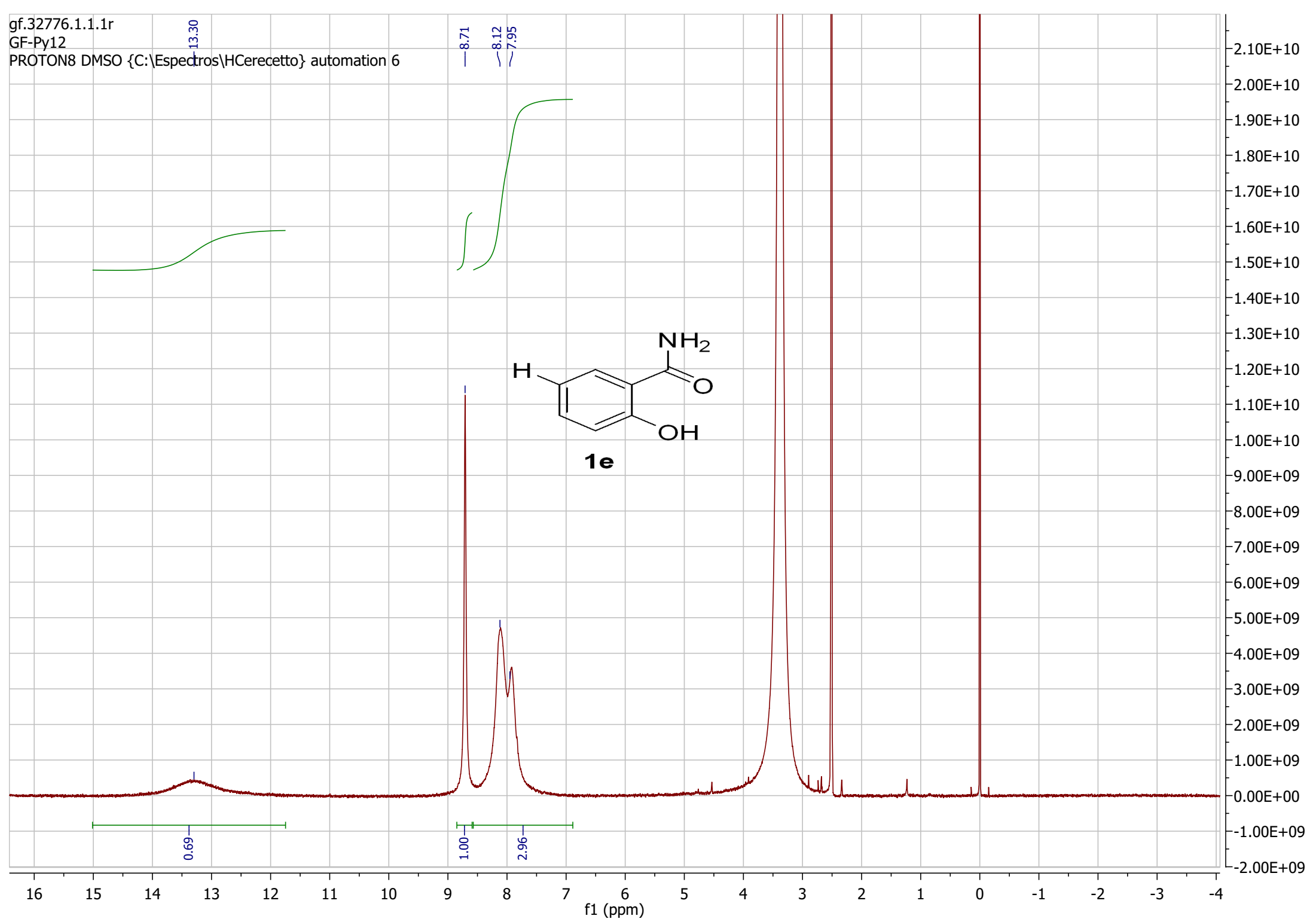
8.62
8.56
8.38



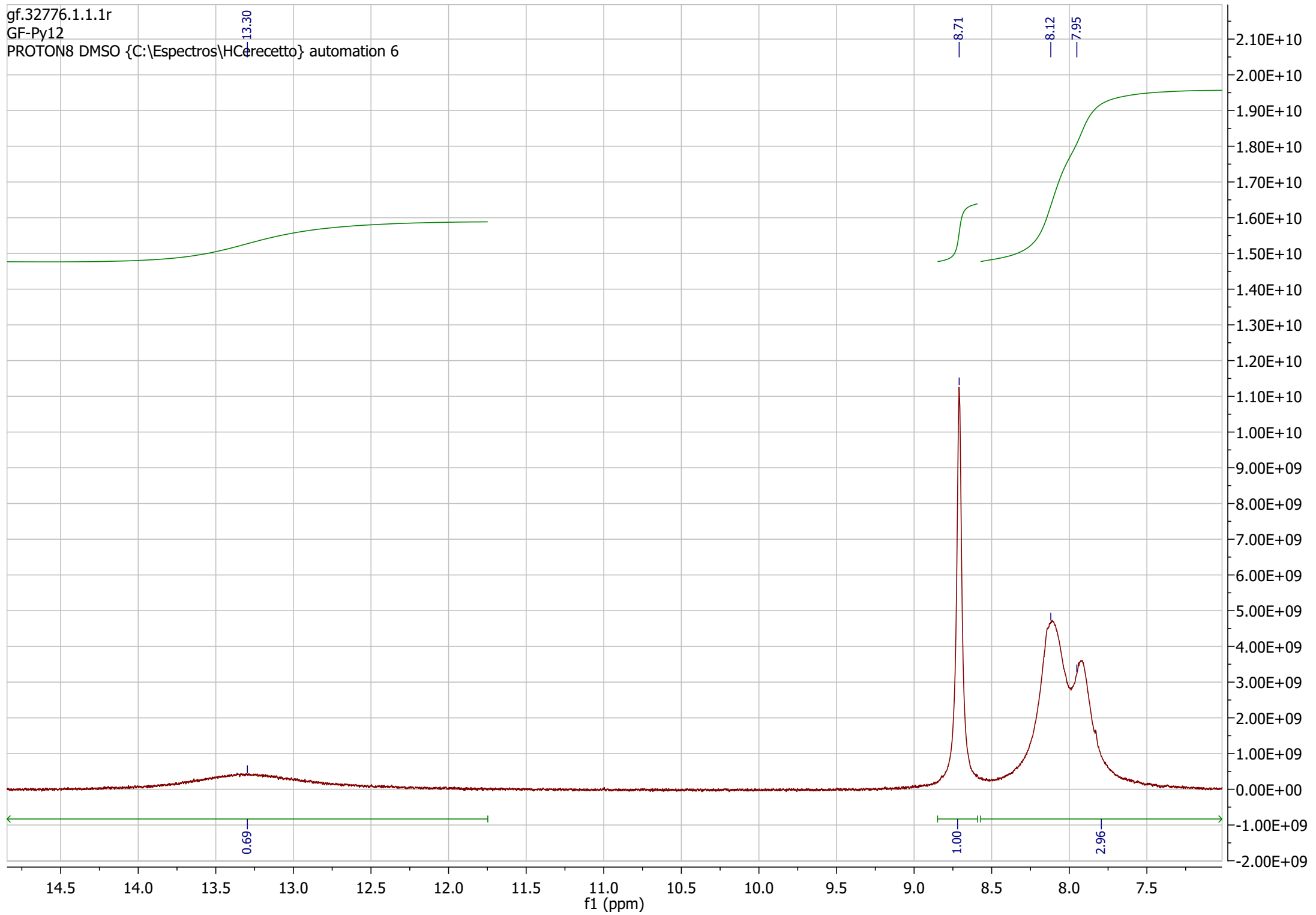
I01.1.1.1r



gf.32776.1.1.1r
GF-Py12
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 6

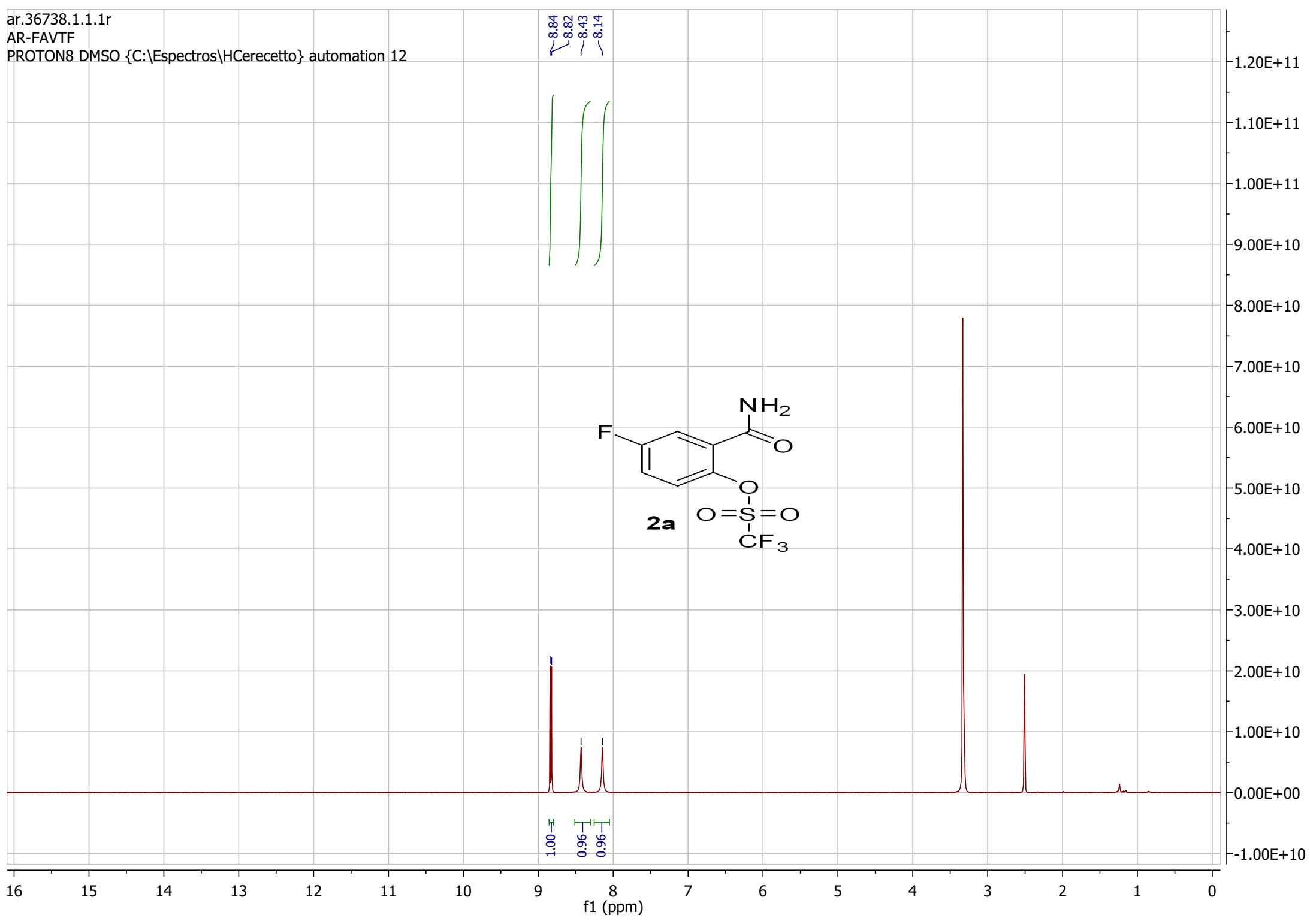
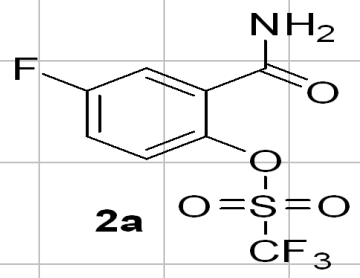


gf.32776.1.1.1r
GF-Py12
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 6

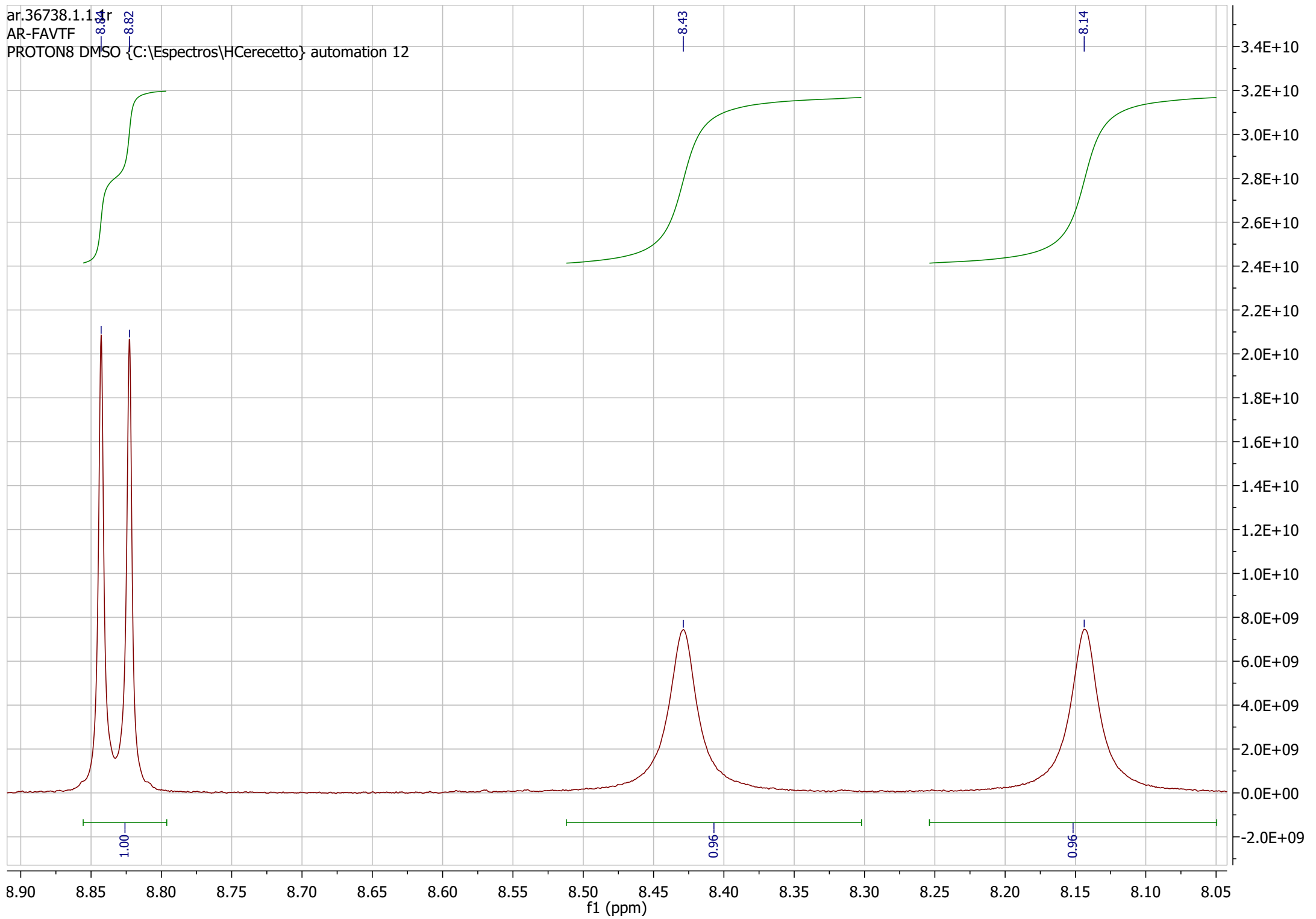


ar.36738.1.1.1r
AR-FAVTF
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12

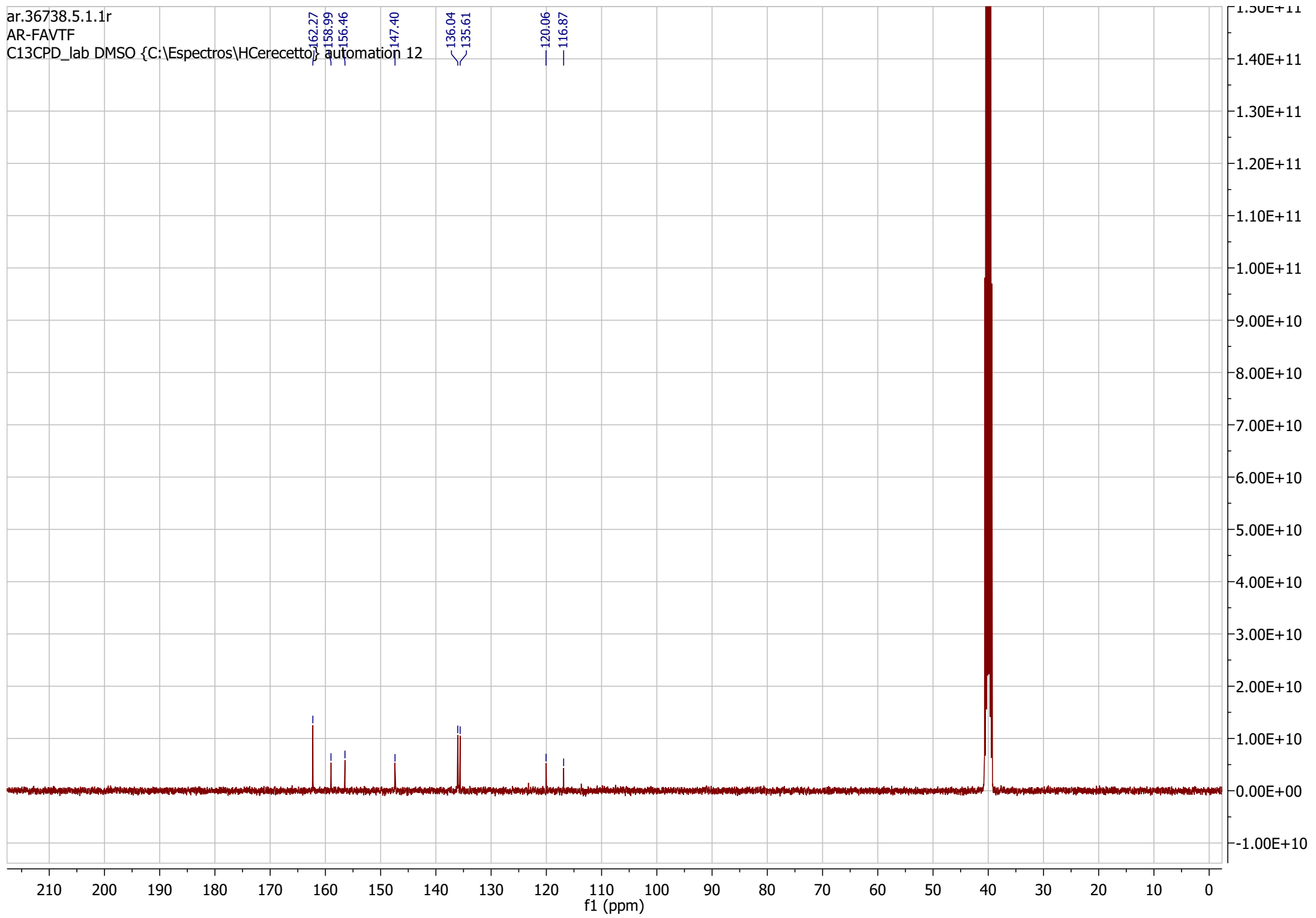
8.84
8.82
8.43
8.14



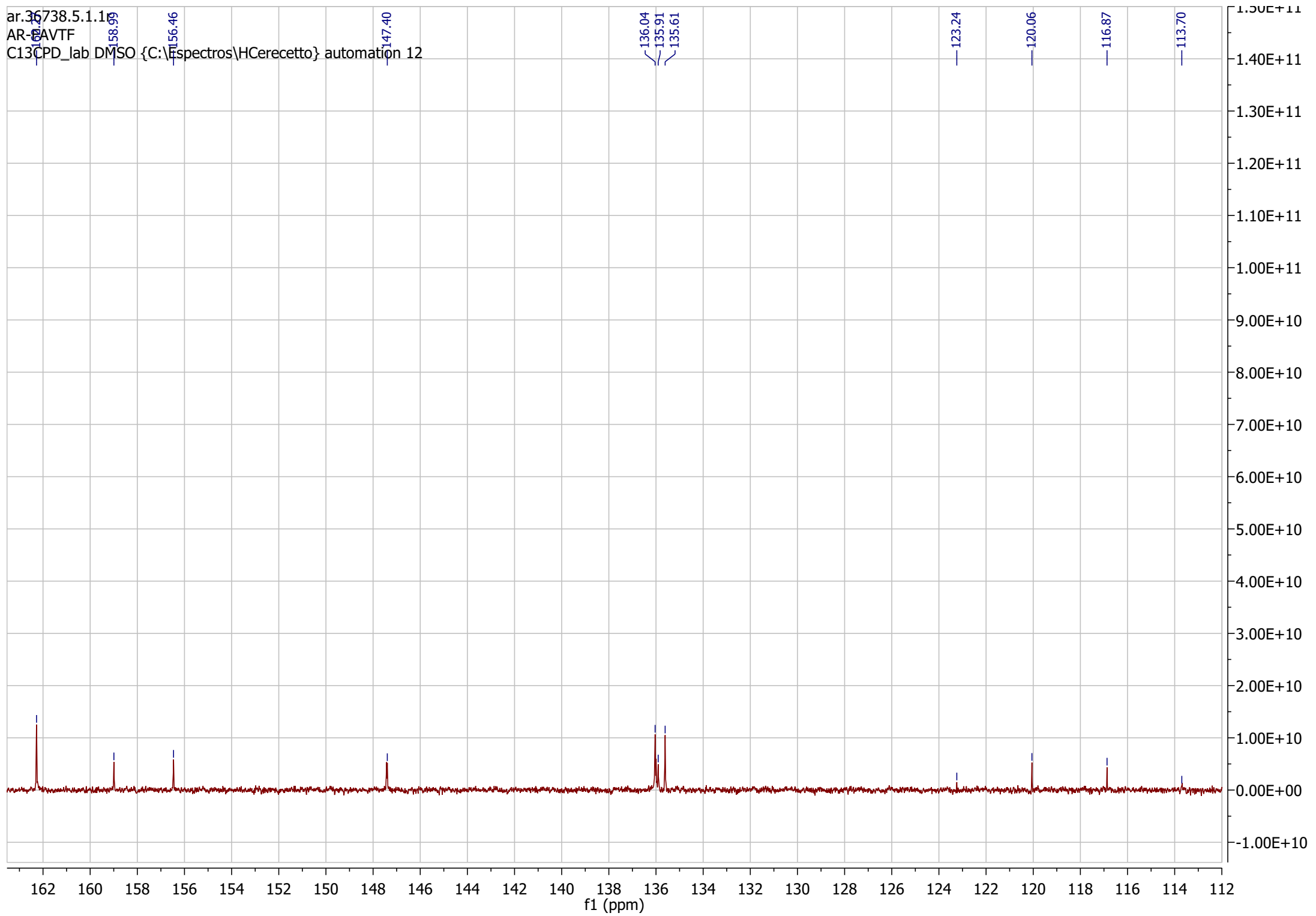
ar.36738.1.1
AR-FAVTF
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12



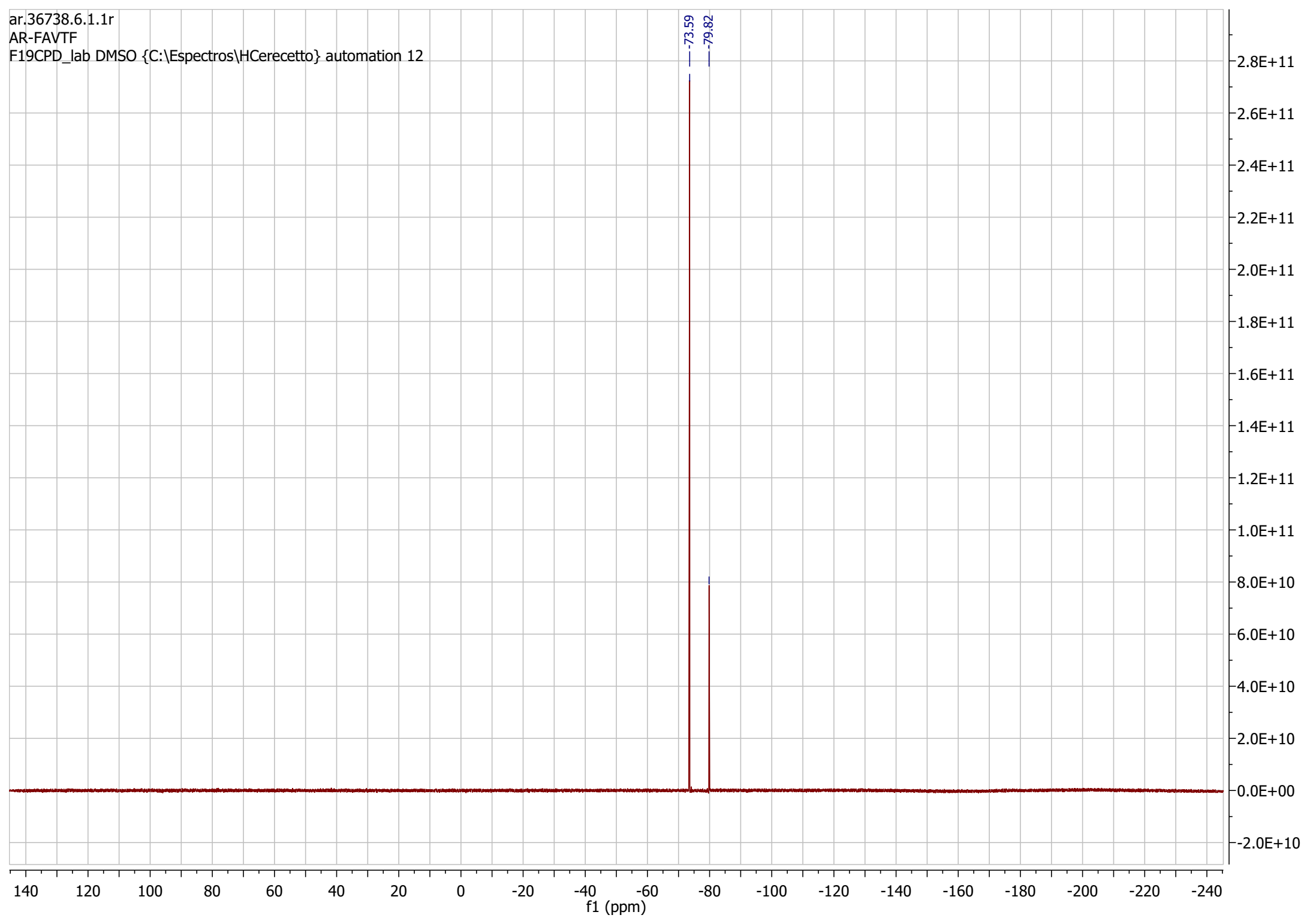
ar.36738.5.1.1r
AR-FAVTF
C13CPD_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12



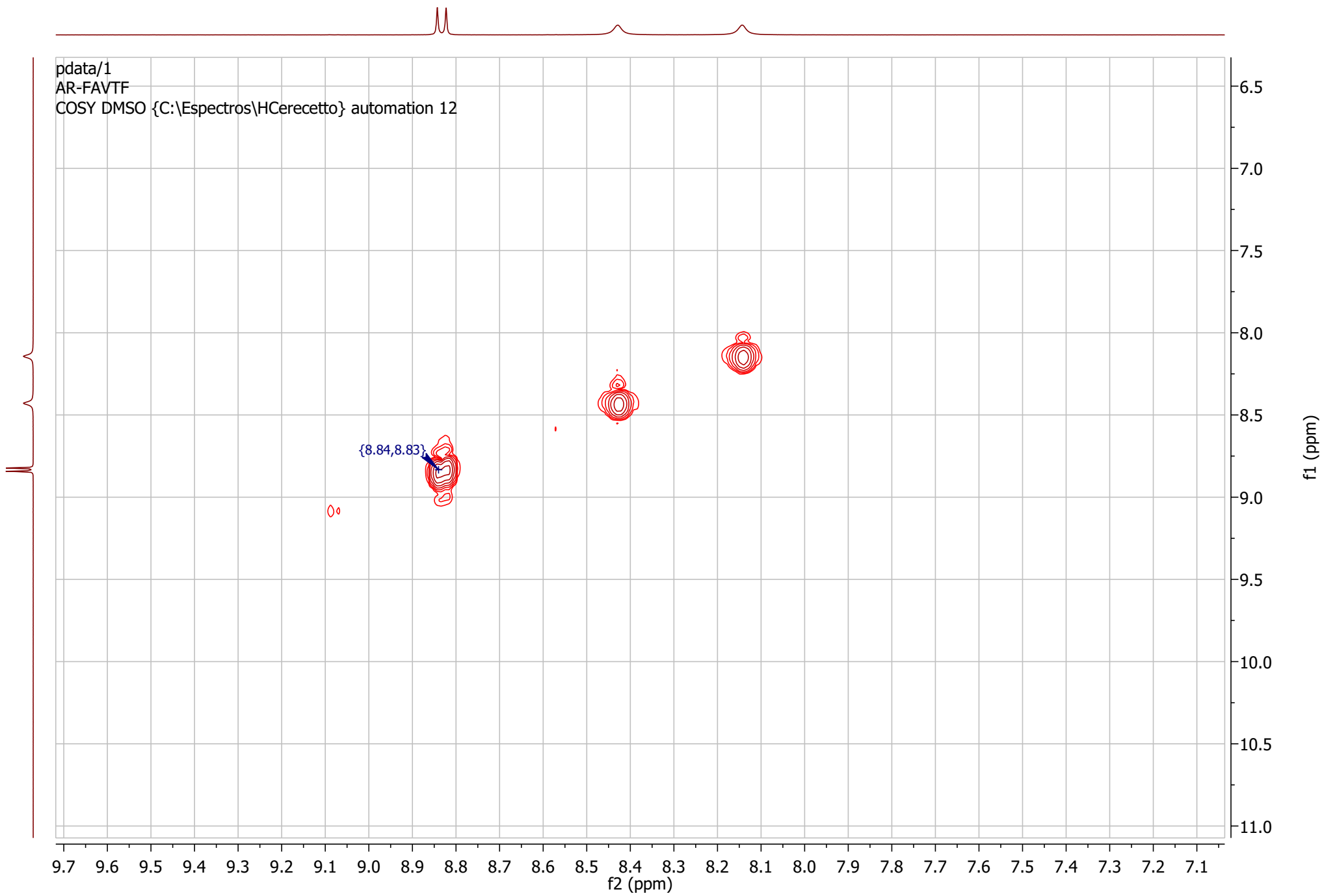
ar.36738.5.1.1.1
AR-6AVTF
C13CPD_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12



ar.36738.6.1.1r
AR-FAVTF
F19CPD_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12

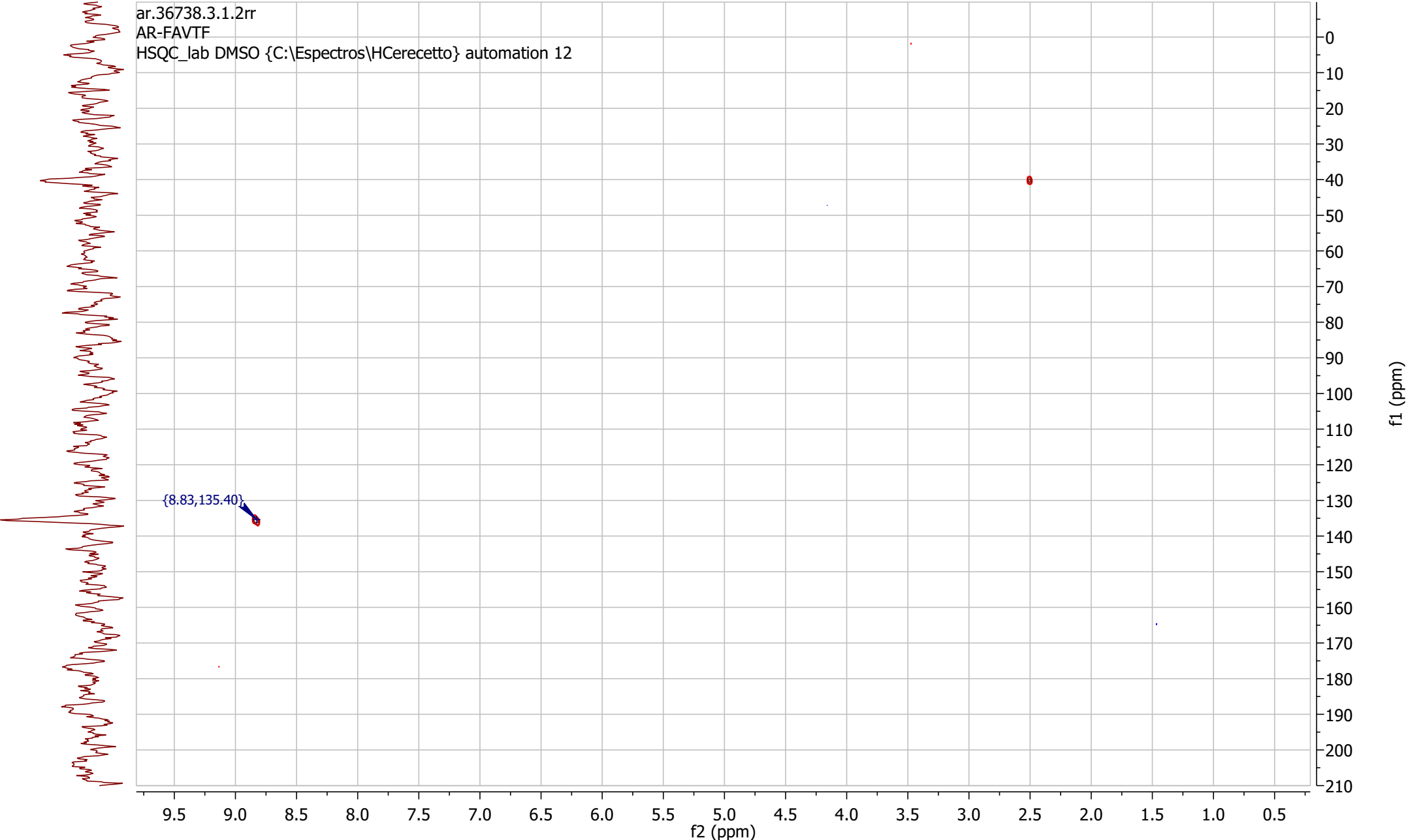


pdata/1
AR-FAVTF
COSY DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12



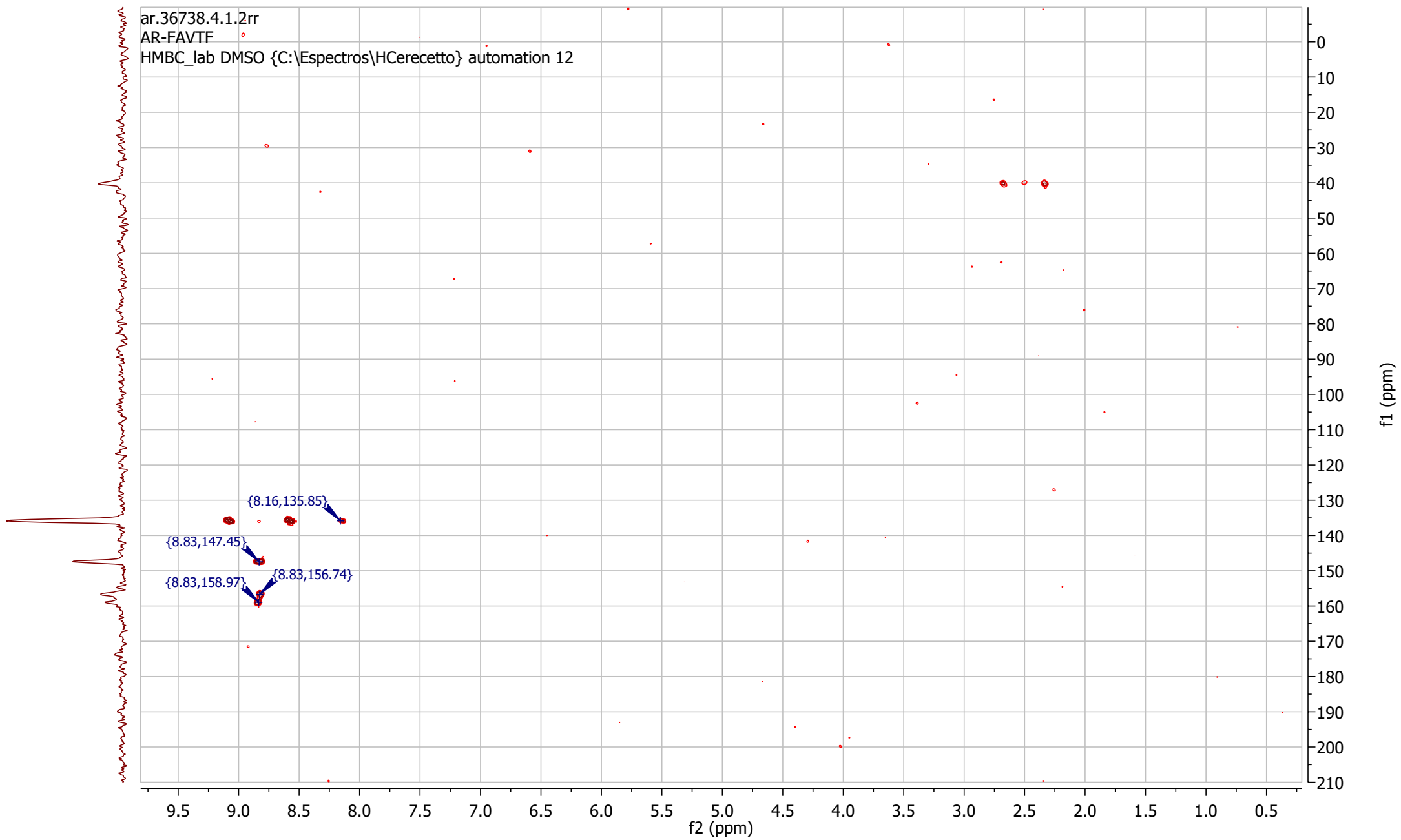


ar.36738.3.1.2rr
AR-FAVTF
HSQC_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12

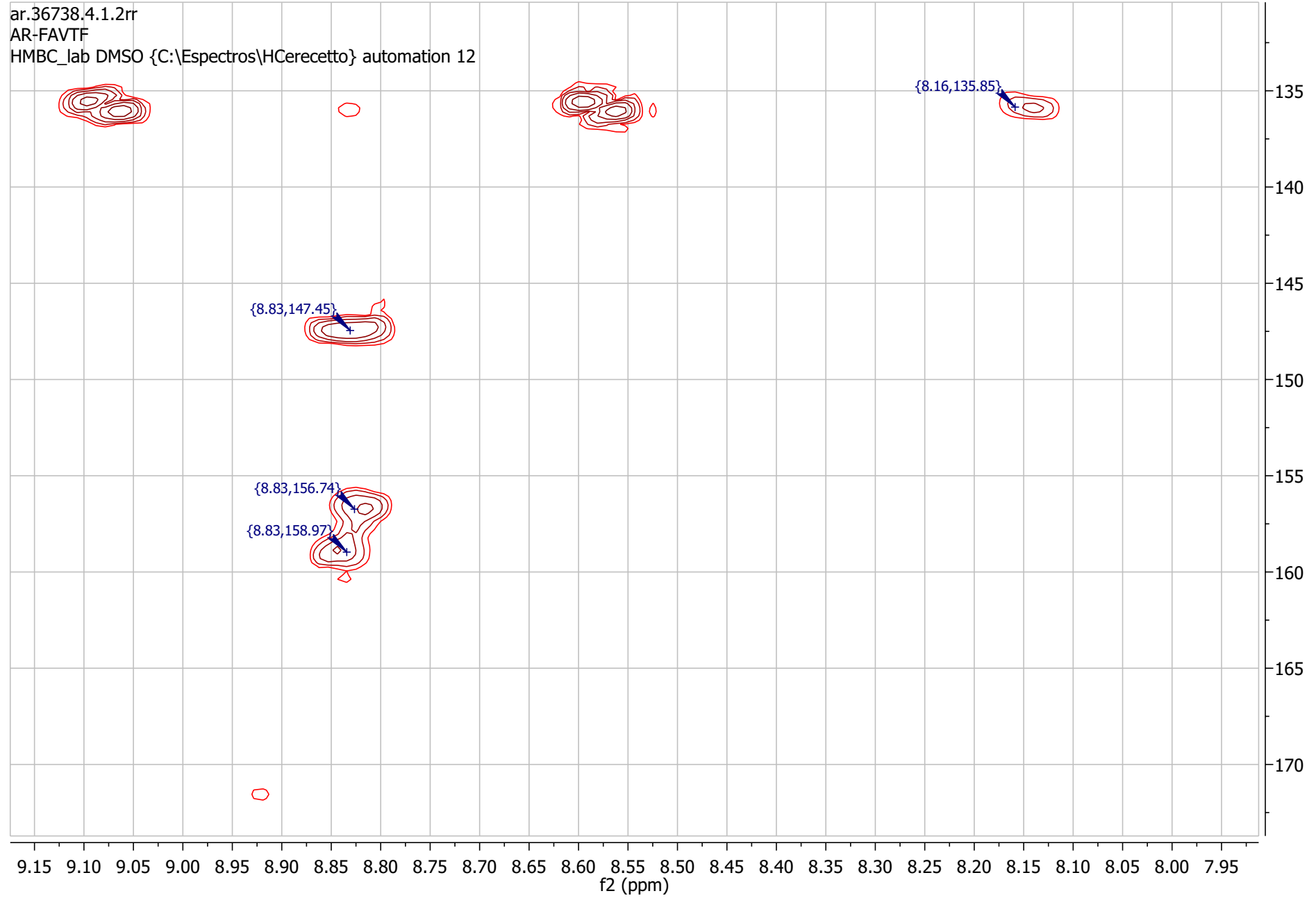




ar.36738.4.1.2rr
AR-FAVTF
HMBC_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12

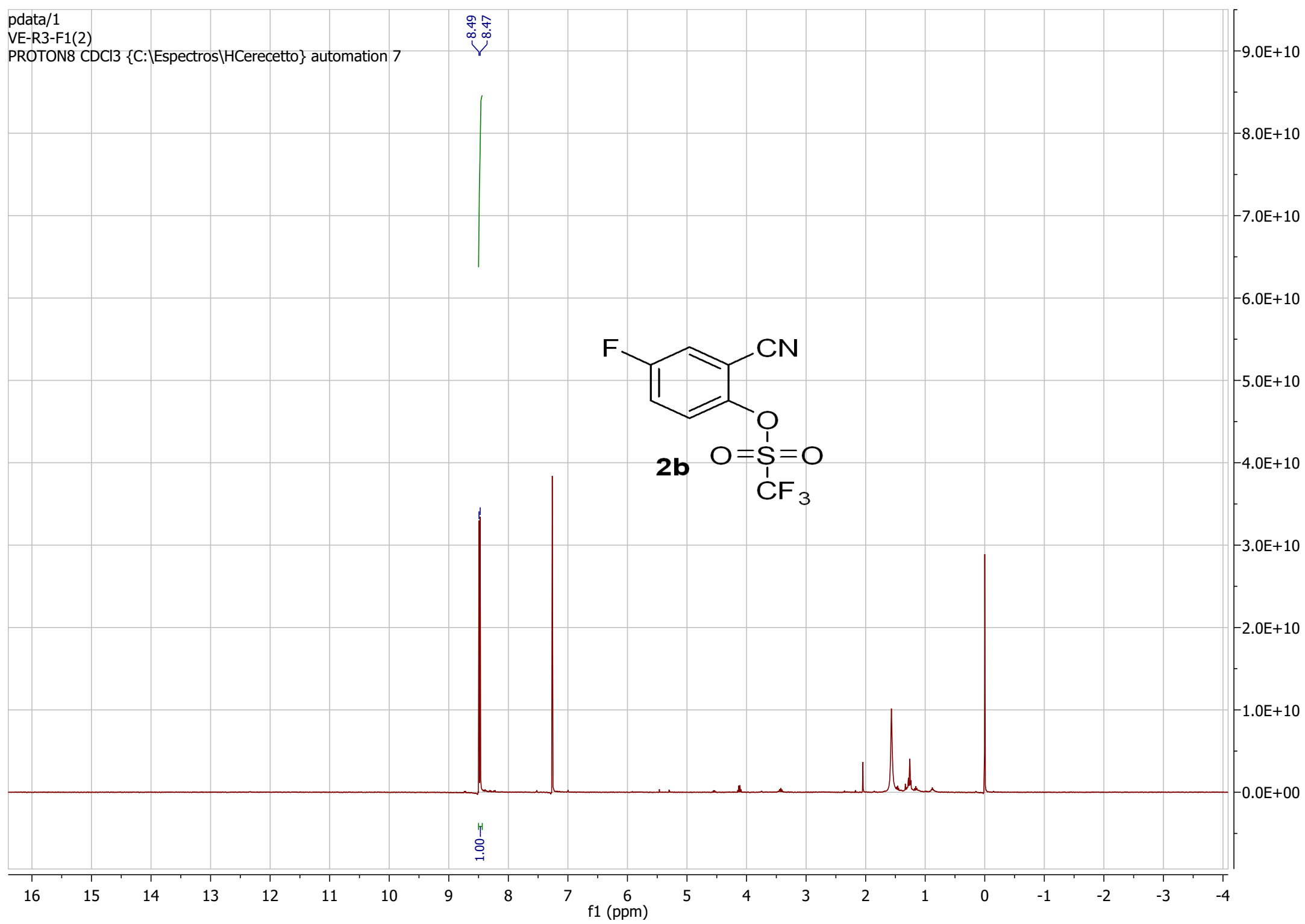
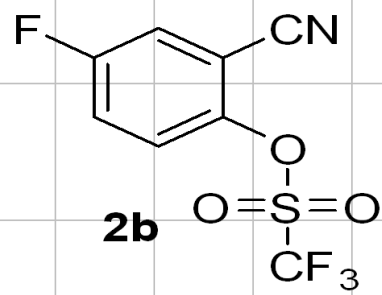


ar.36738.4.1.2rr
AR-FAVTF
HMBC_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12

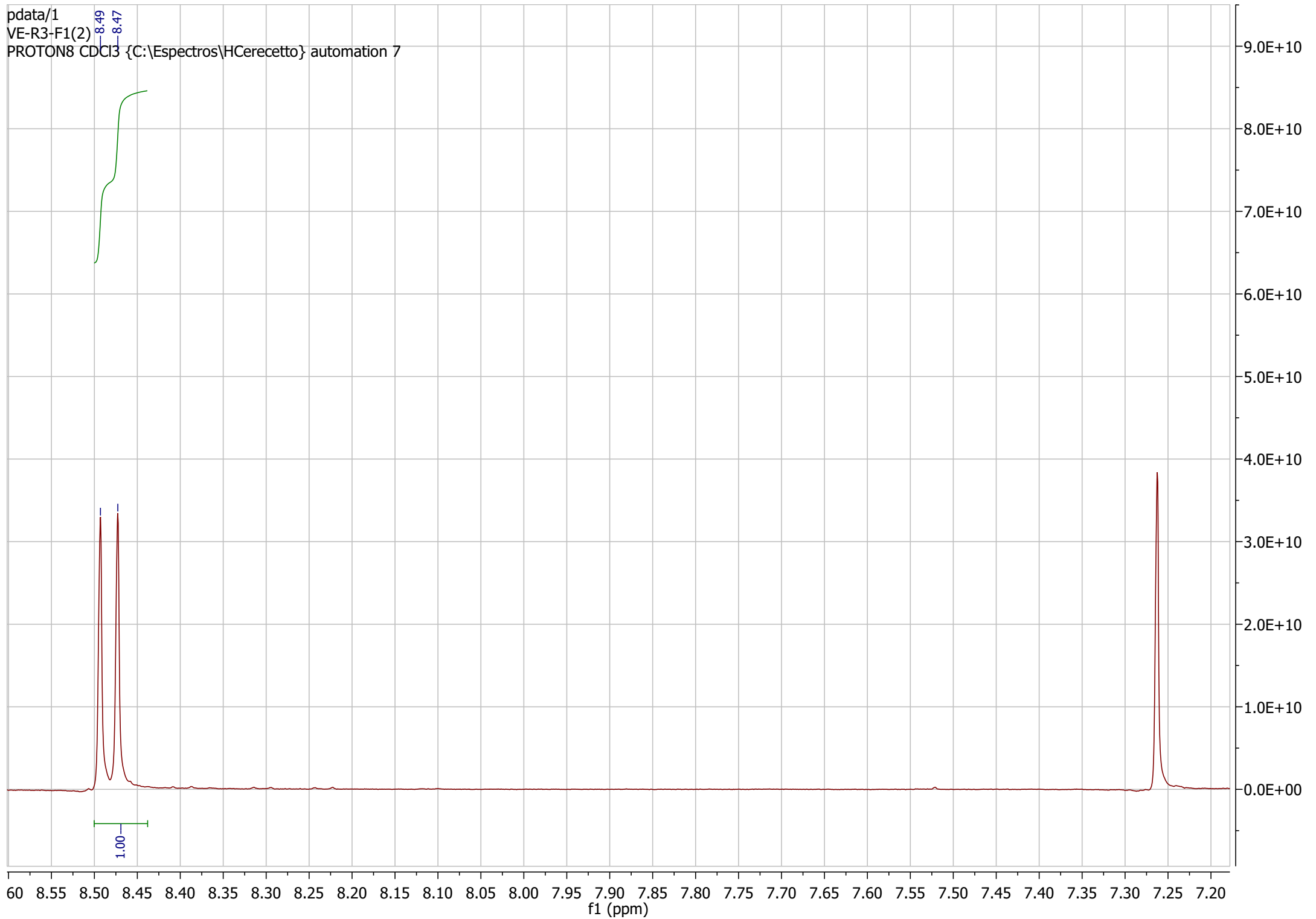


pdata/1
VE-R3-F1(2)
PROTON8 CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7

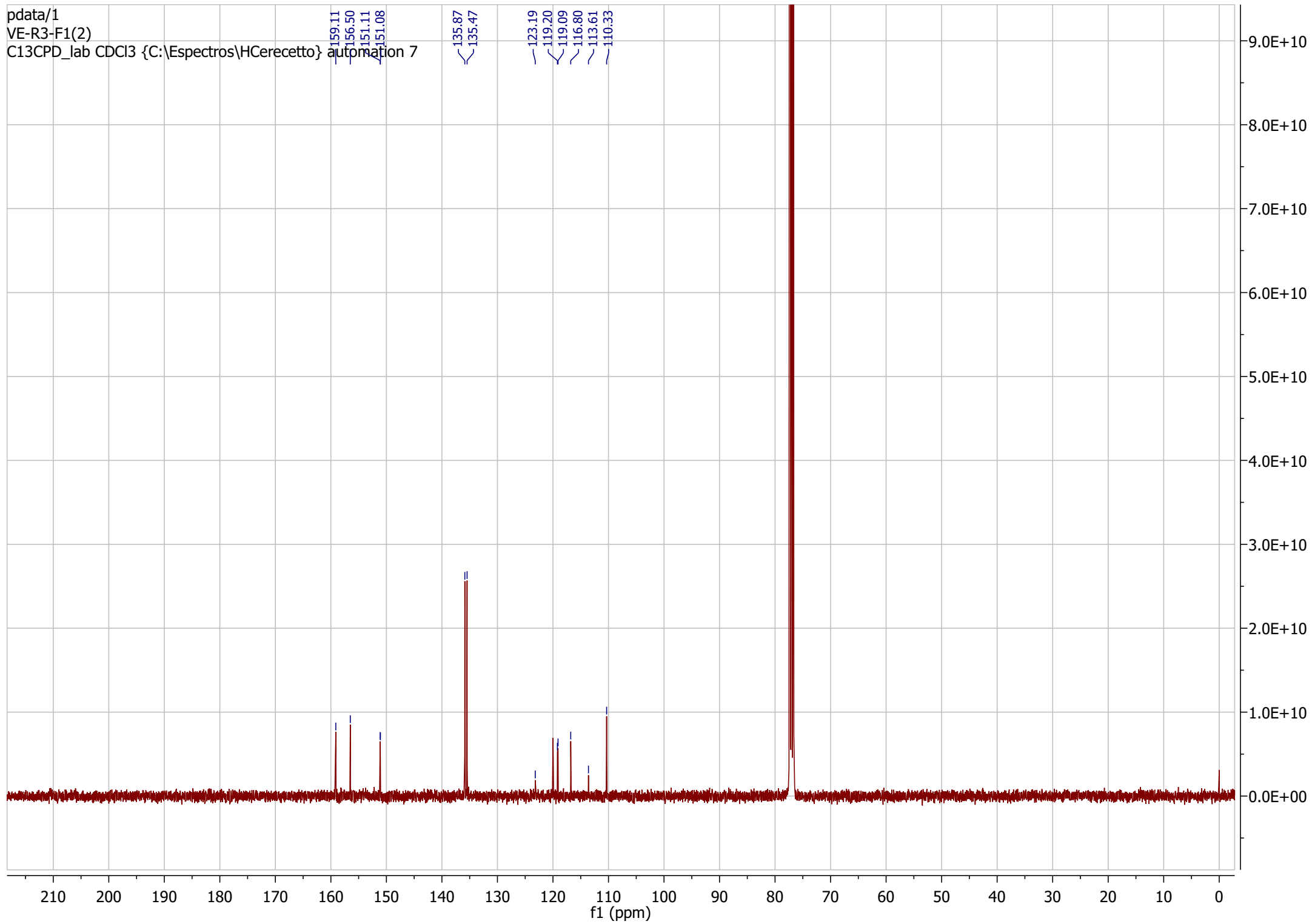
8.49
8.47



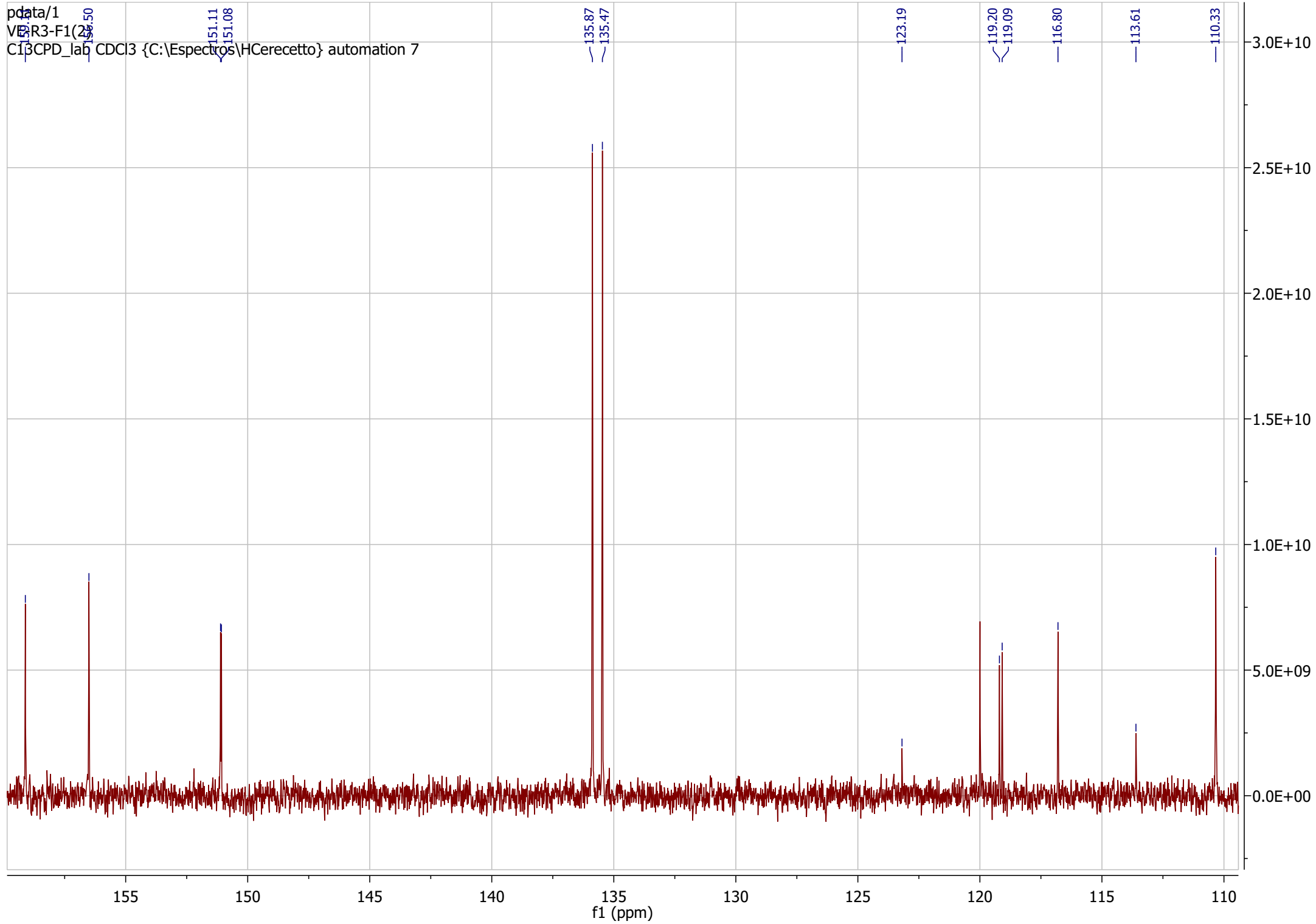
pdata/1
VE-R3-F1(2)
PROTON8 CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7



pdata/1
VE-R3-F1(2)
C13CPD_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7

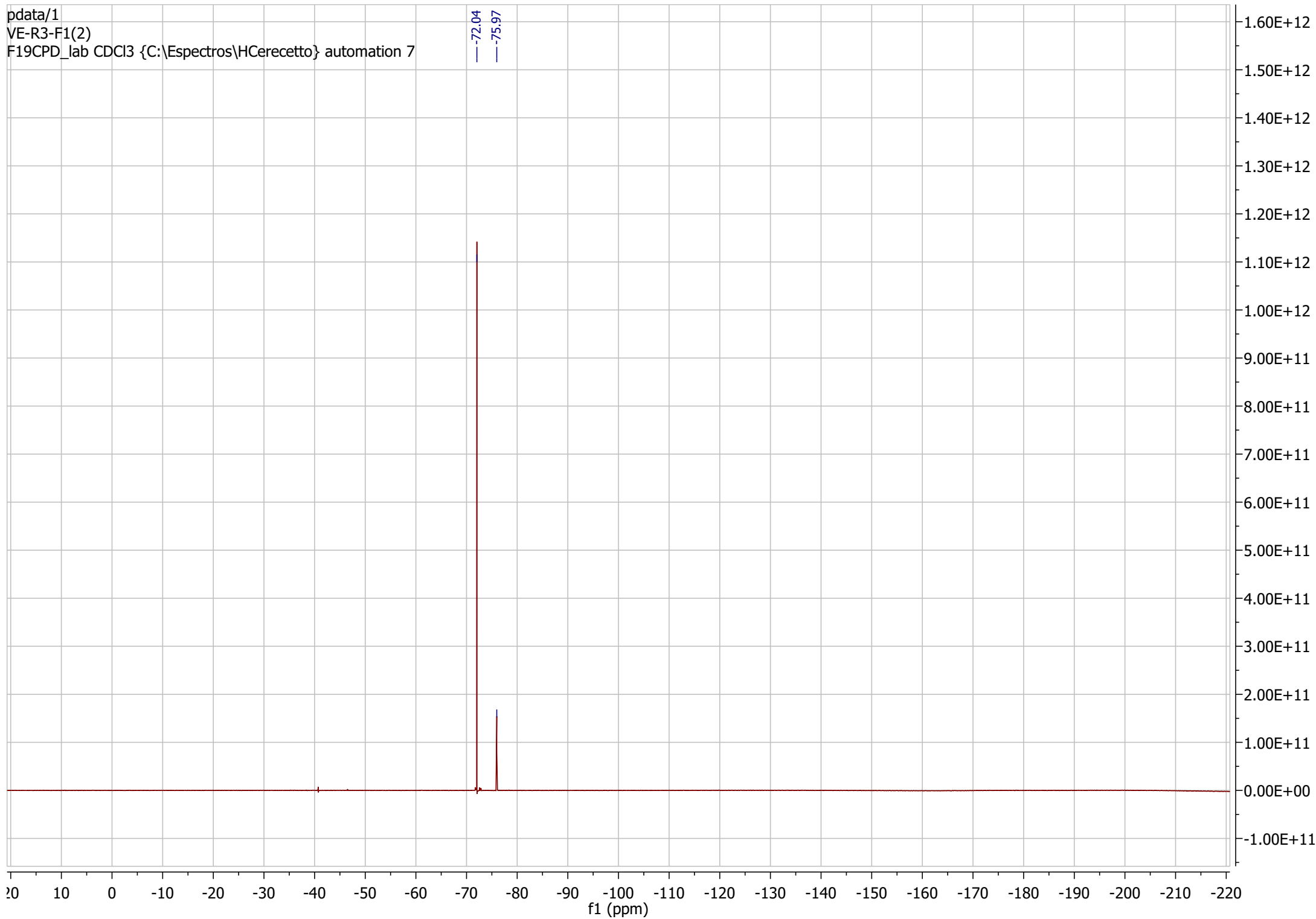


pdata/1
VE-R3-F1(2)
C13CPD_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7

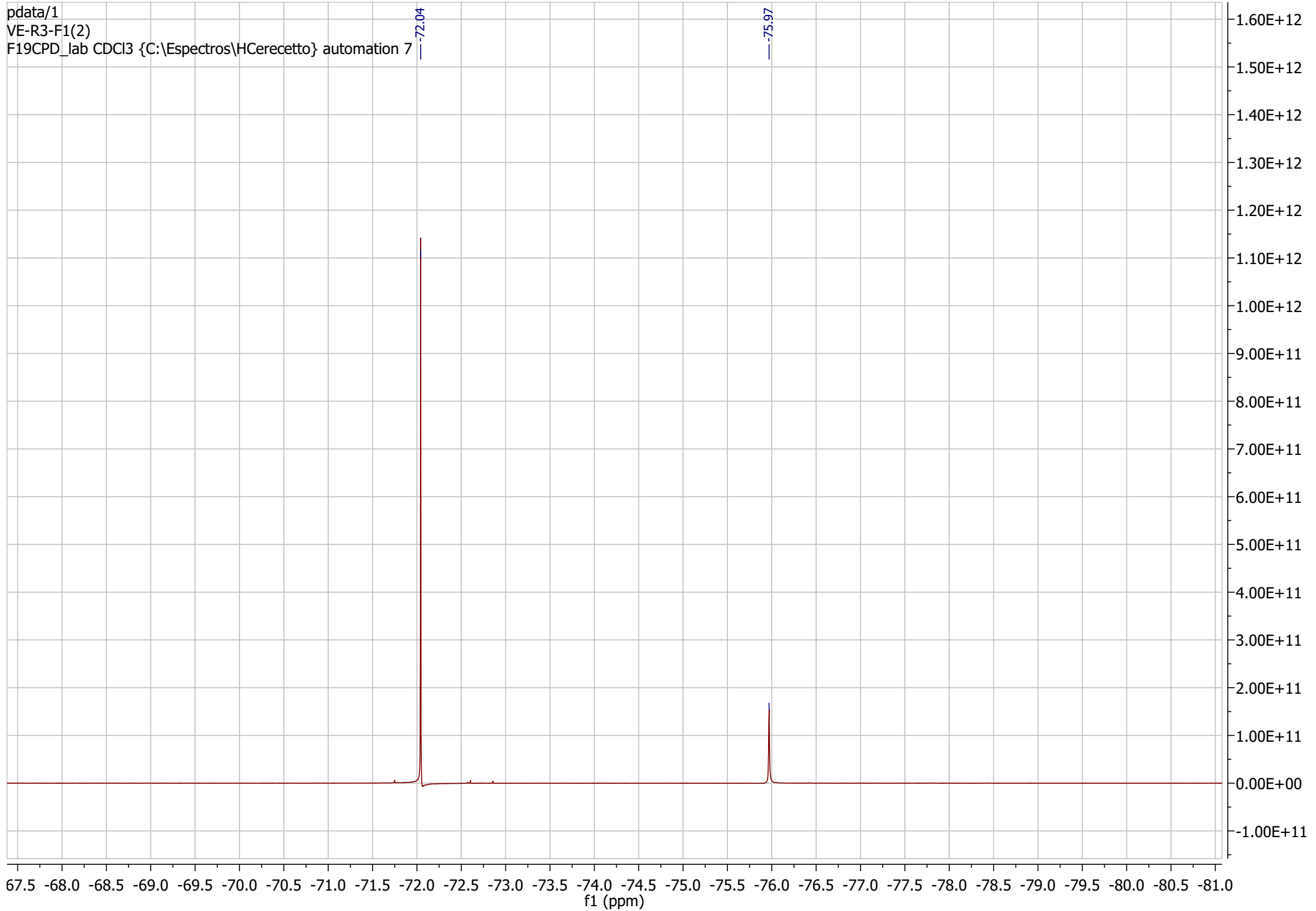


pdata/1
VE-R3-F1(2)
F19CPD_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7

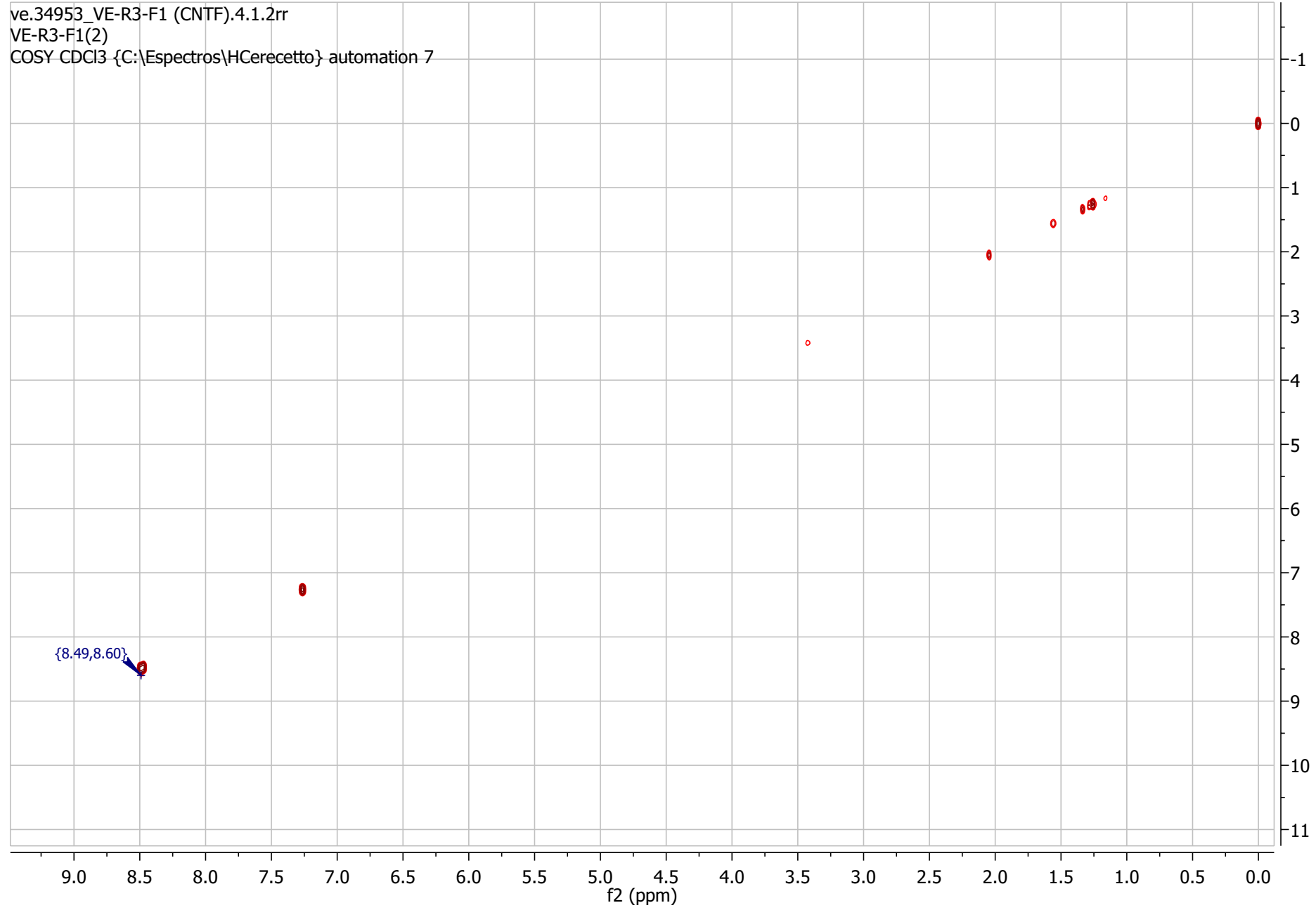
--72.04
--75.97



pdata/1
VE-R3-F1(2)
F19CPD_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7



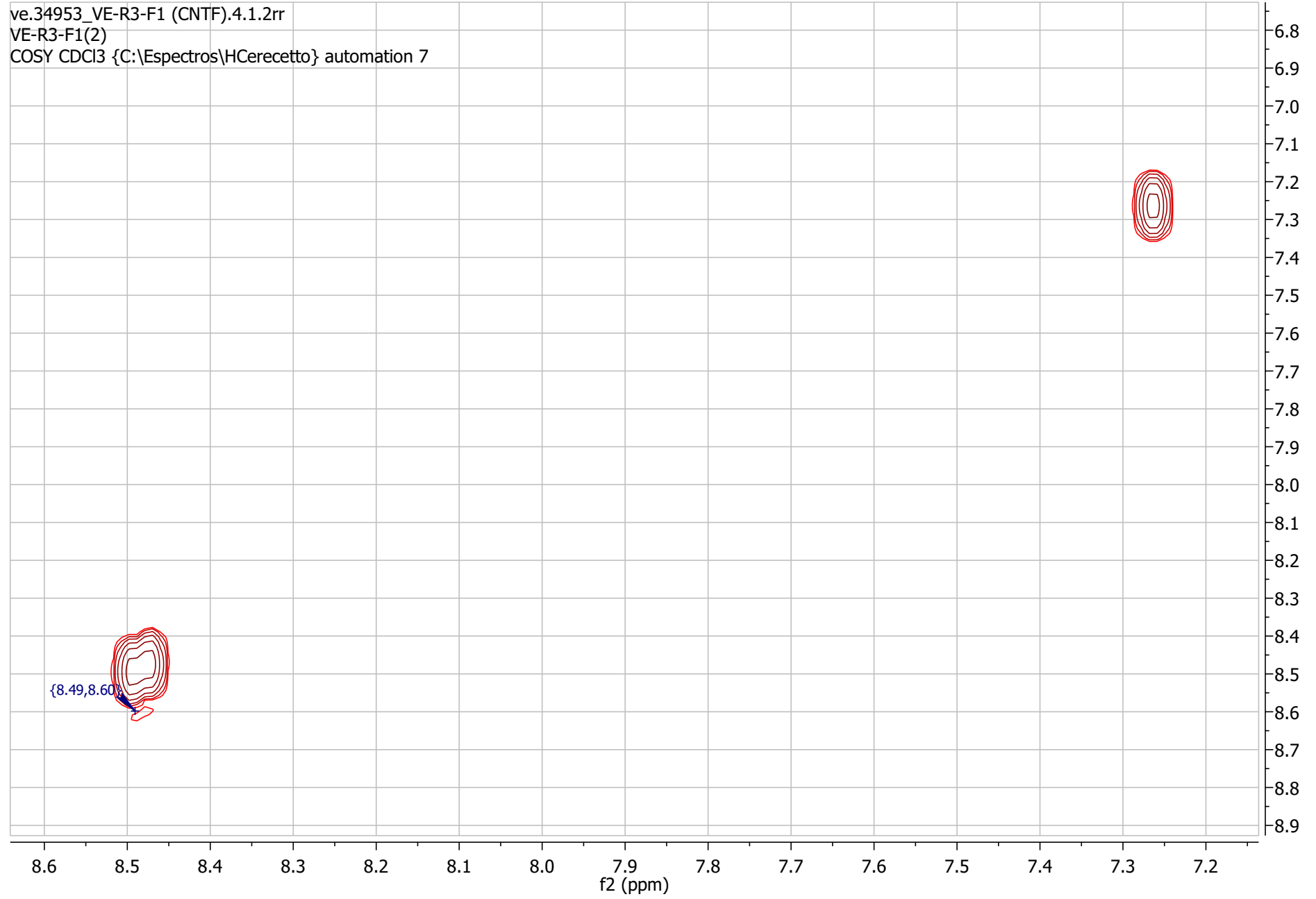
ve.34953_VE-R3-F1 (CNTF).4.1.2rr
VE-R3-F1(2)
COSY CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7



f1 (ppm)

f2 (ppm)

ve.34953_VE-R3-F1 (CNTF).4.1.2rr
VE-R3-F1(2)
COSY CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7



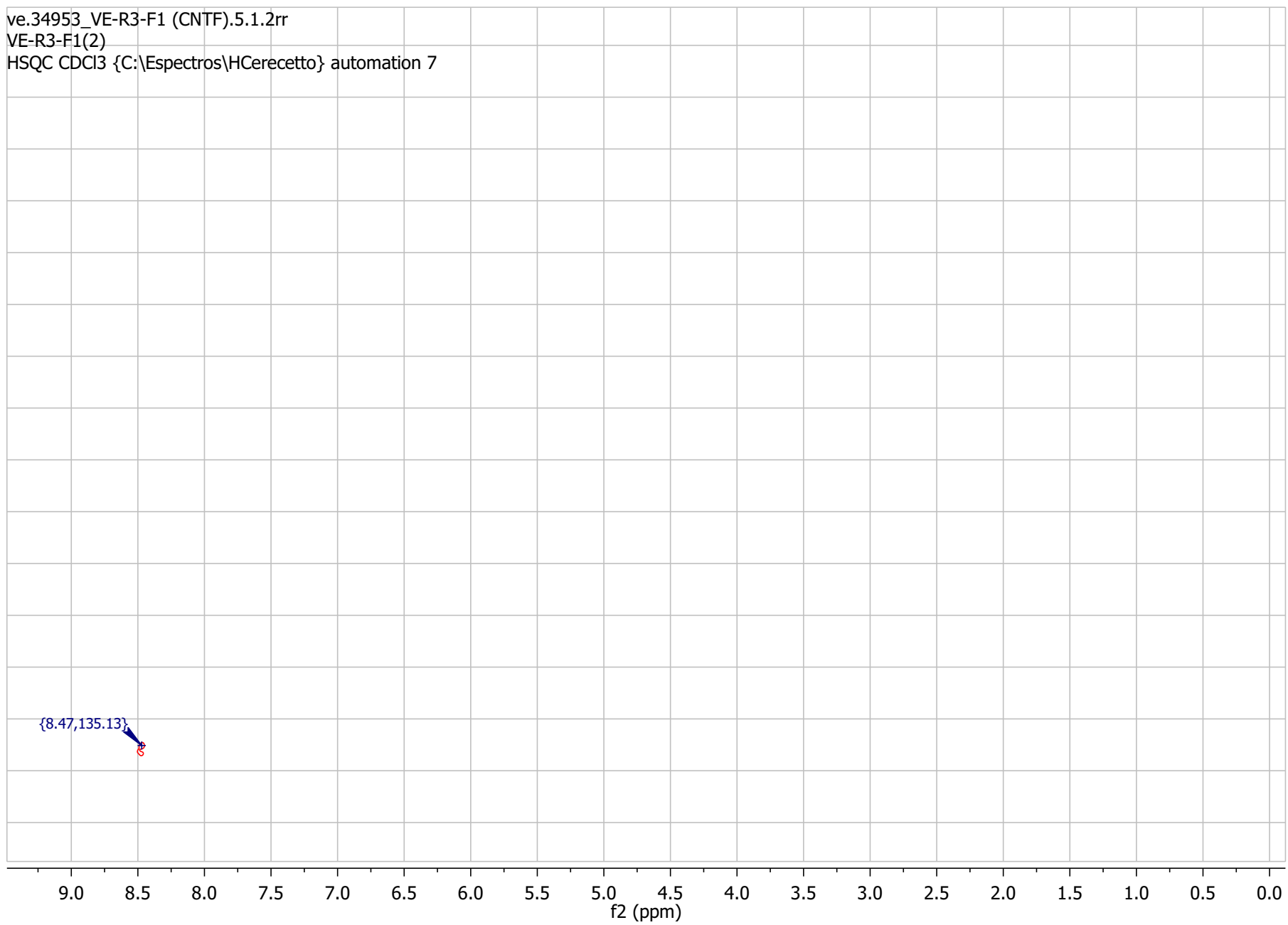
{8.49,8.60}

f1 (ppm)

f2 (ppm)



ve.34953_VE-R3-F1 (CNTF).5.1.2rr
VE-R3-F1(2)
HSQC CDCl₃ {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7

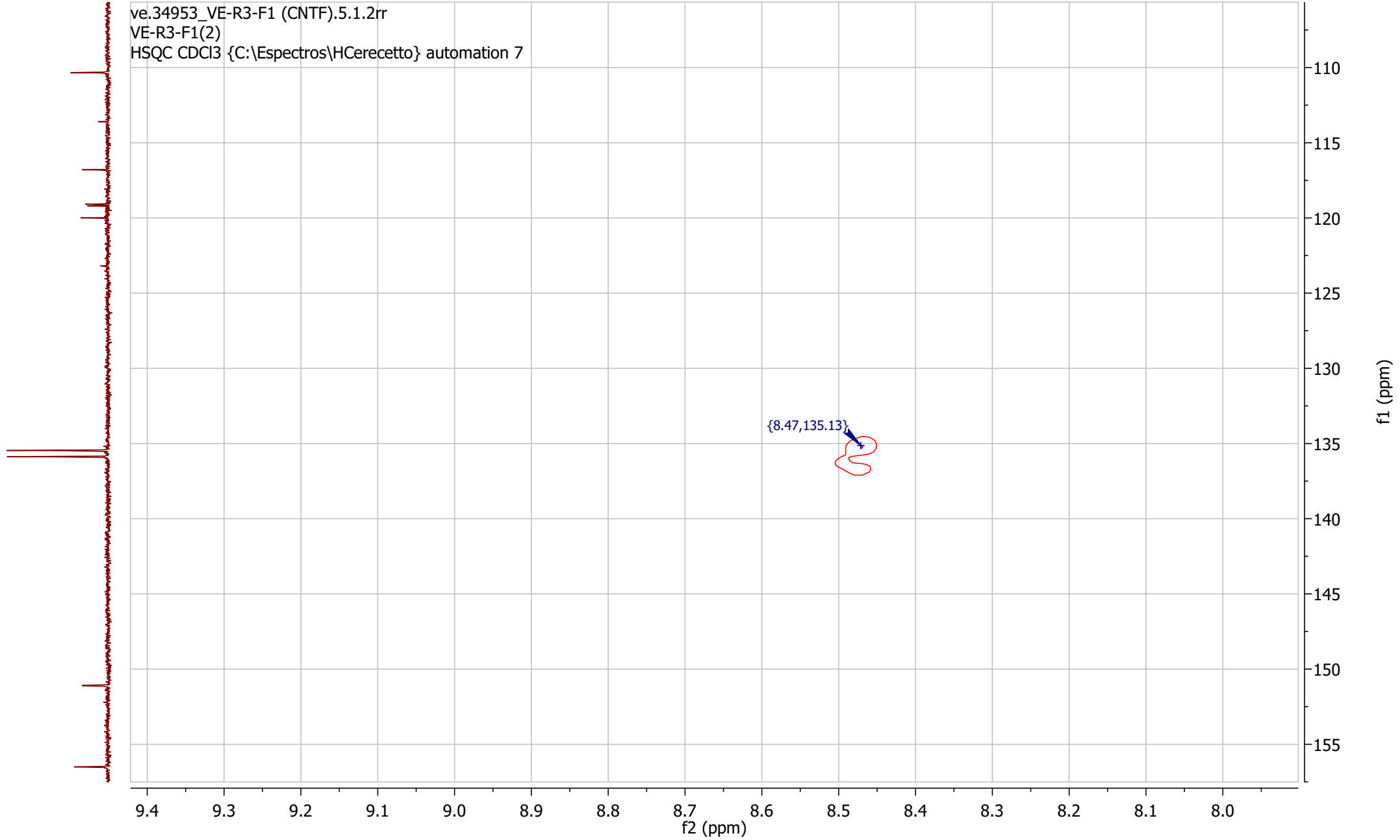


{8.47, 135.13}

f1 (ppm)

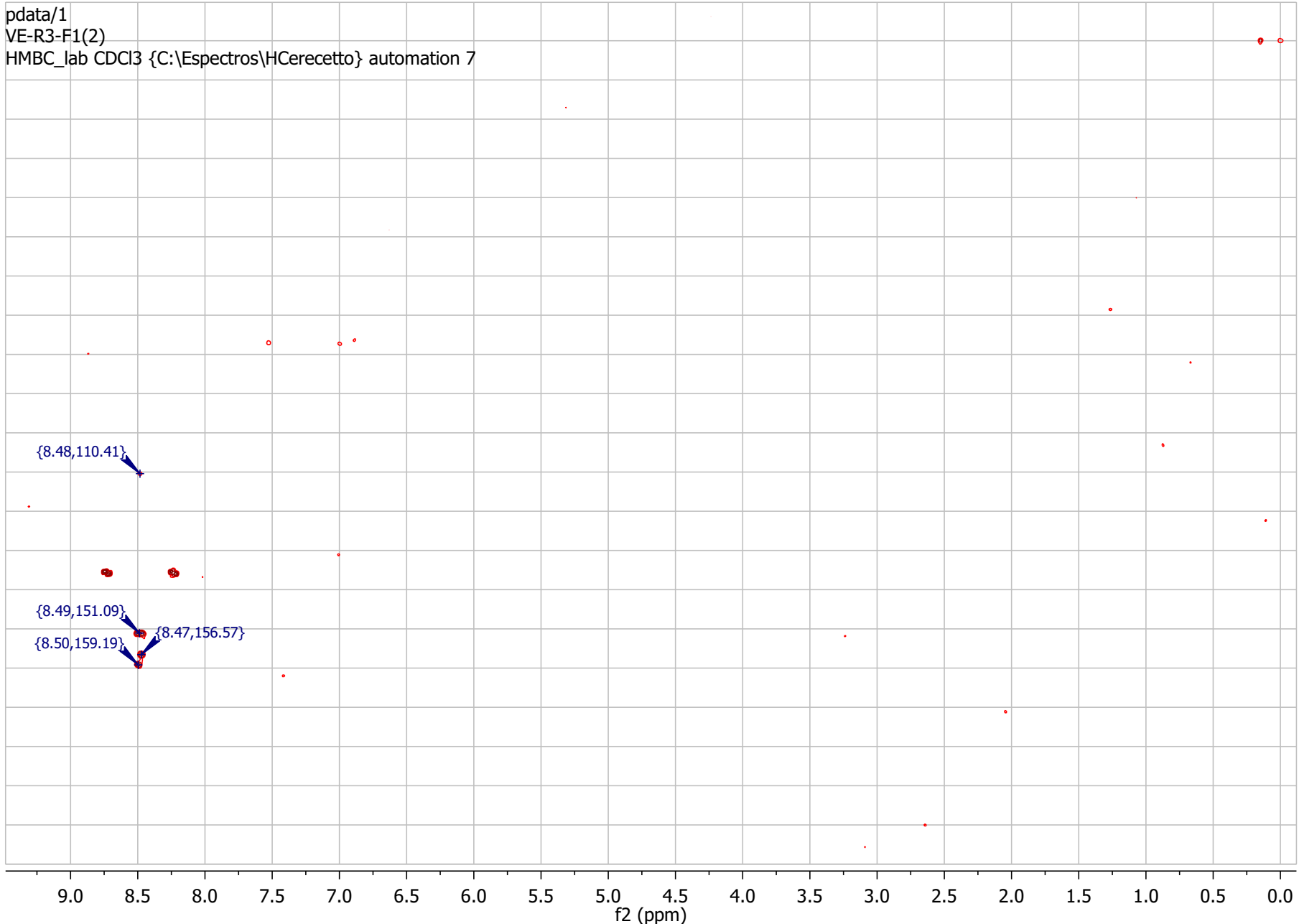
f2 (ppm)

ve.34953_VE-R3-F1 (CNTF).5.1.2rr
VE-R3-F1(2)
HSQC CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7





pdata/1
VE-R3-F1(2)
HMBC_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7



{8.48, 110.41}

{8.49, 151.09}

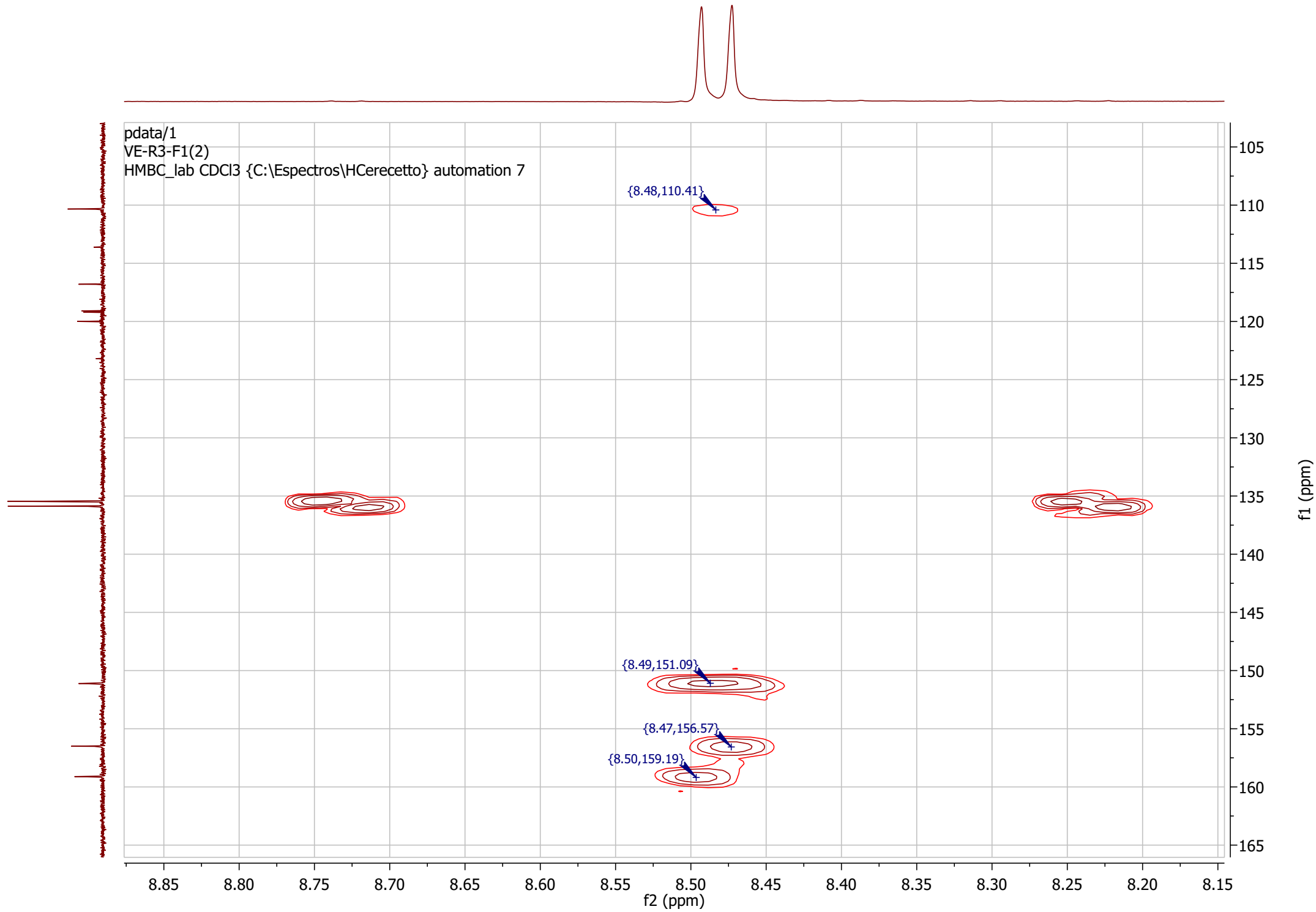
{8.50, 159.19}

{8.47, 156.57}

f1 (ppm)

f2 (ppm)

pdata/1
VE-R3-F1(2)
HMBC_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 7



pdata/1
VE-R1
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12

8.71
8.69
8.22
7.99

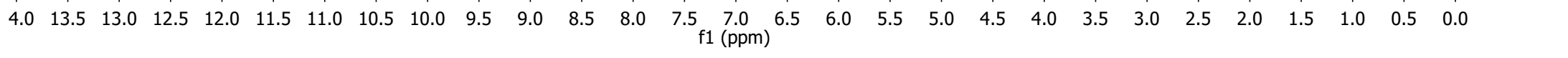
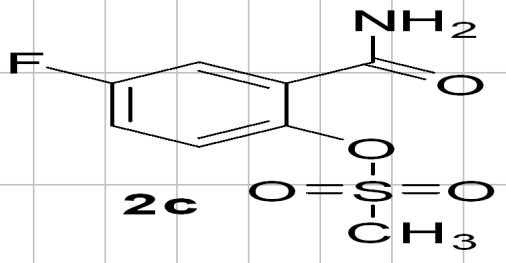


1.00
0.98
0.98

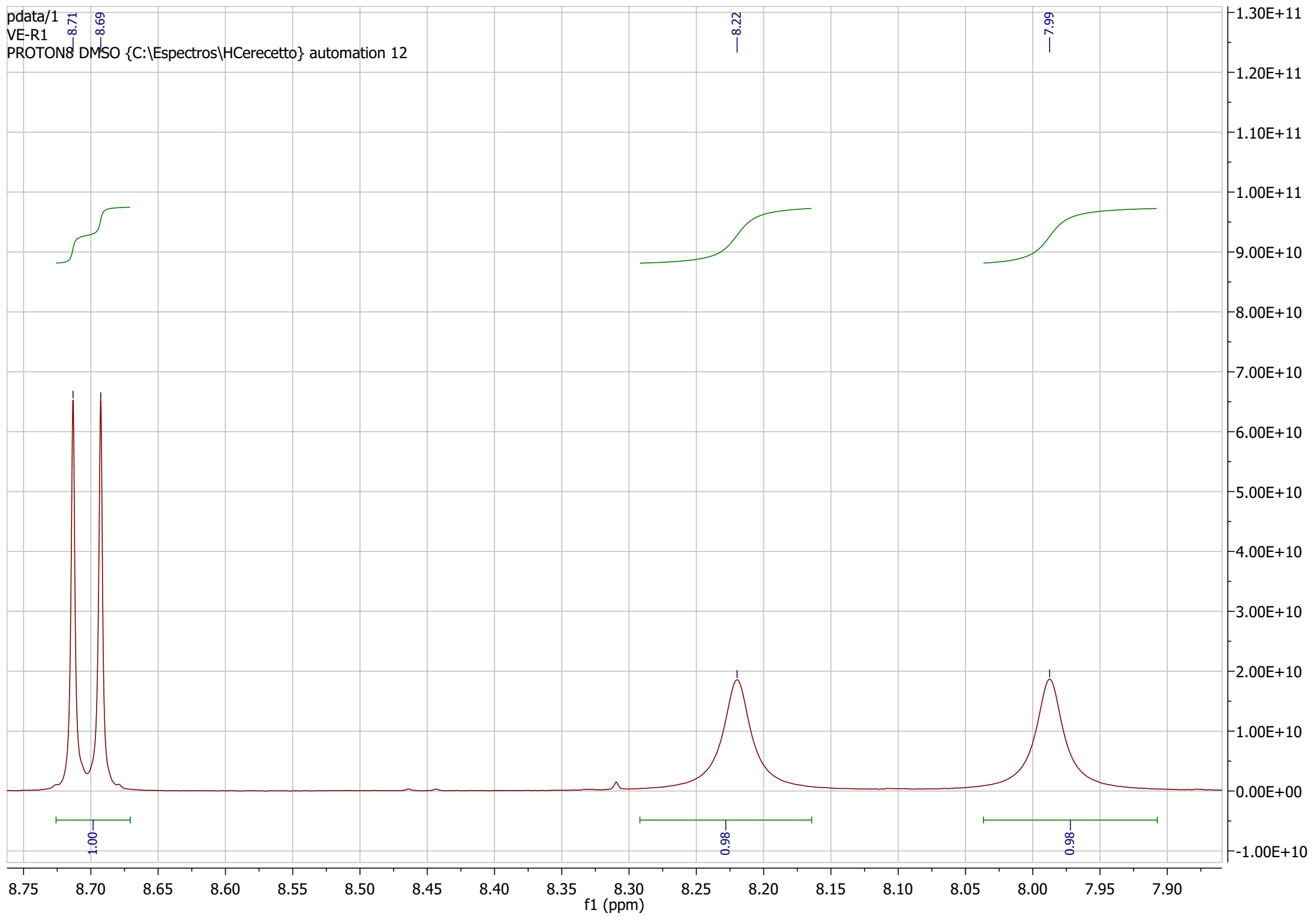
3.06

H₂O

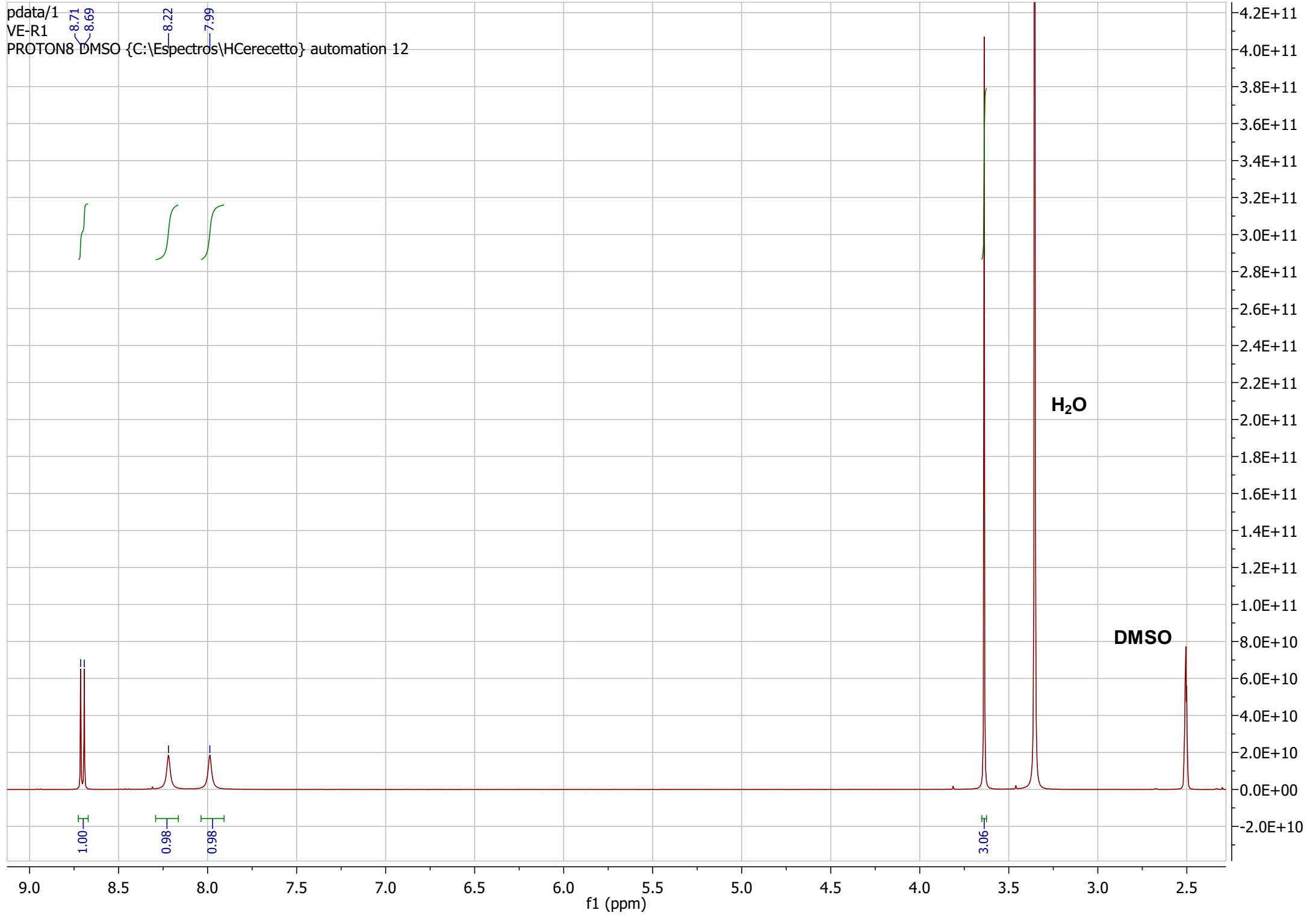
DMSO



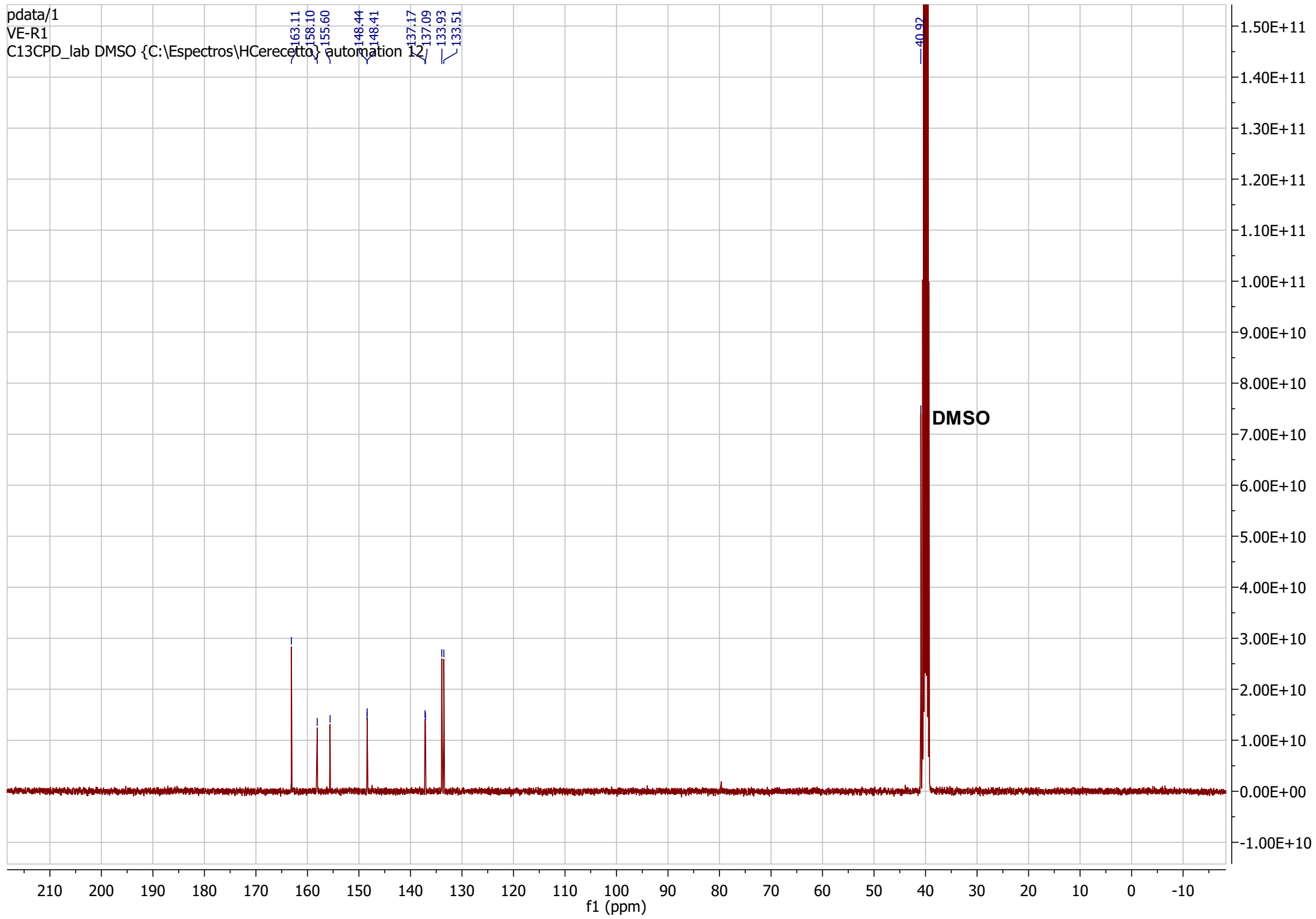
pdata/1
VE-R1
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12



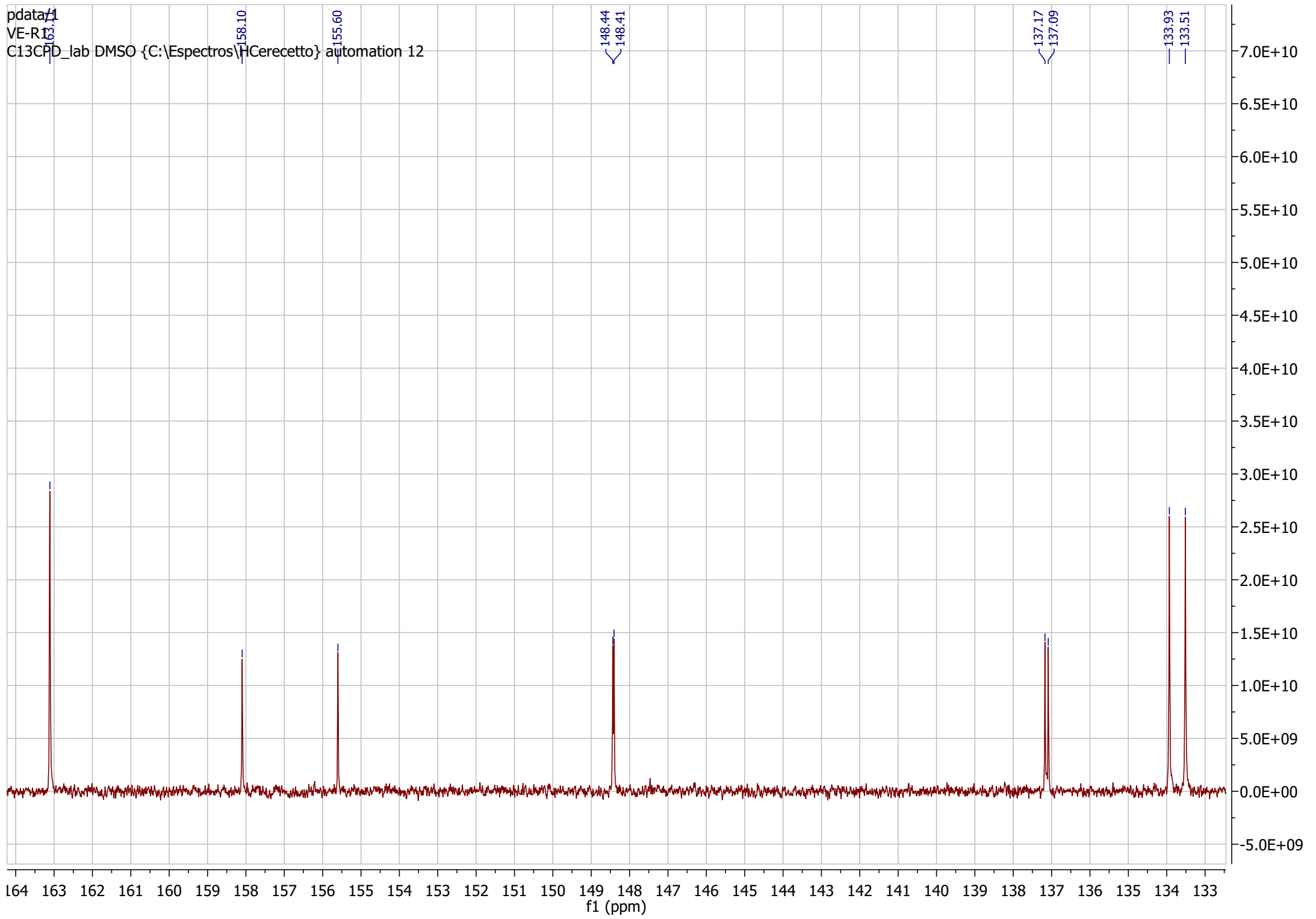
pdata/1
VE-R1
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12



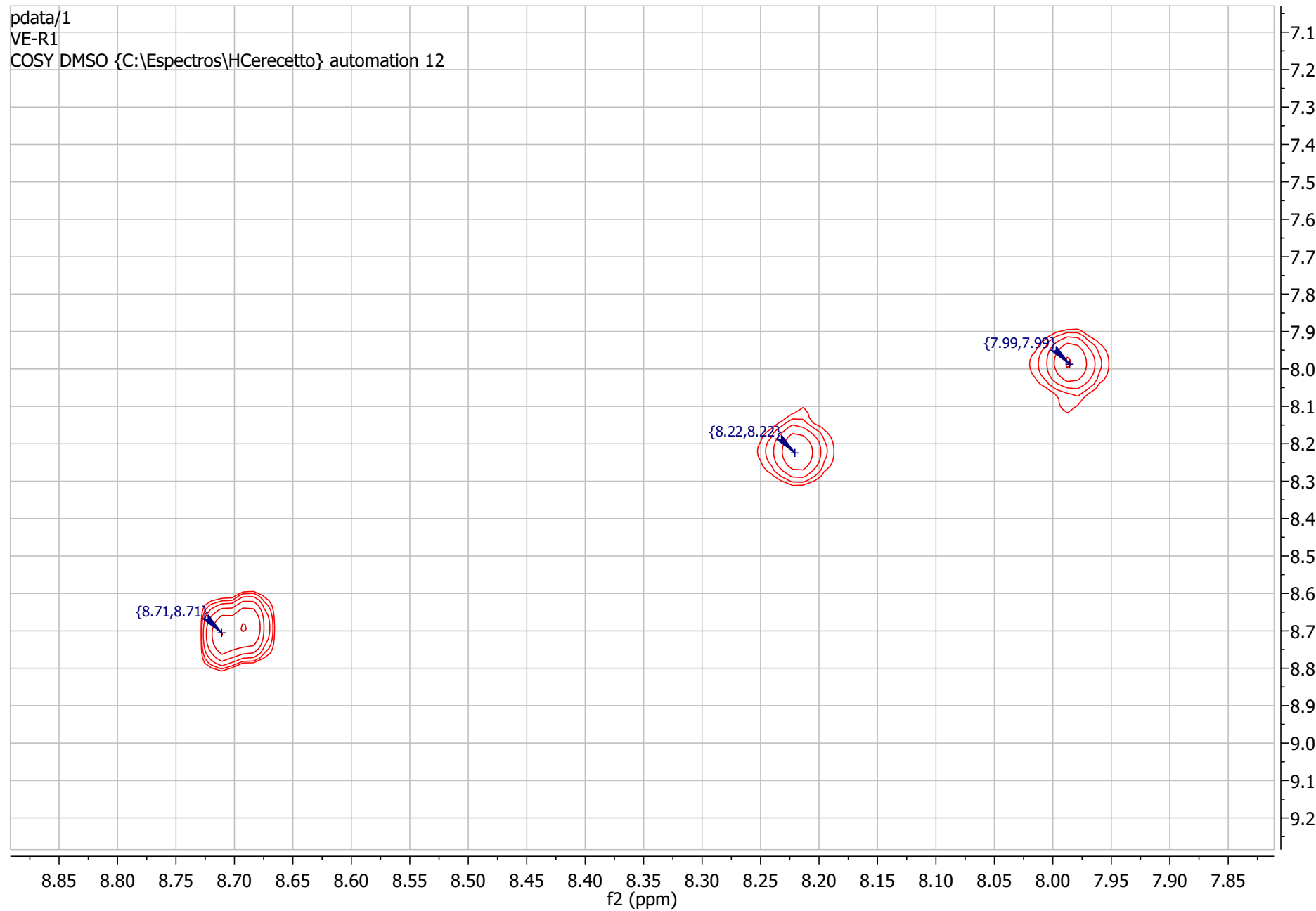
pdata/1
VE-R1
C13CPD_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation



pdata/1
VE-R13
C13CPD_lab DMSO {C:\Espectros\H\Cerecetto} automation 12

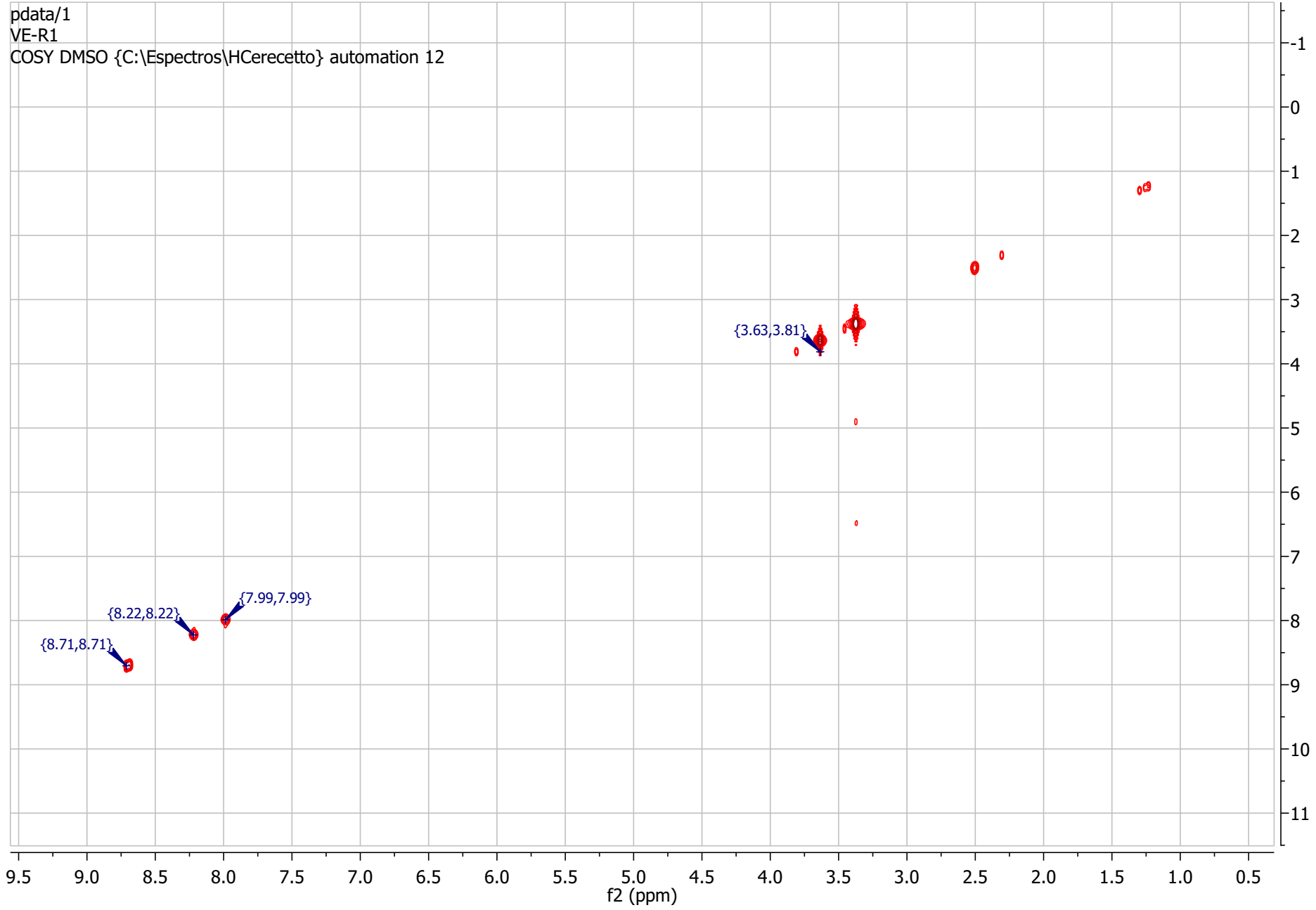


pdata/1
VE-R1
COSY DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12

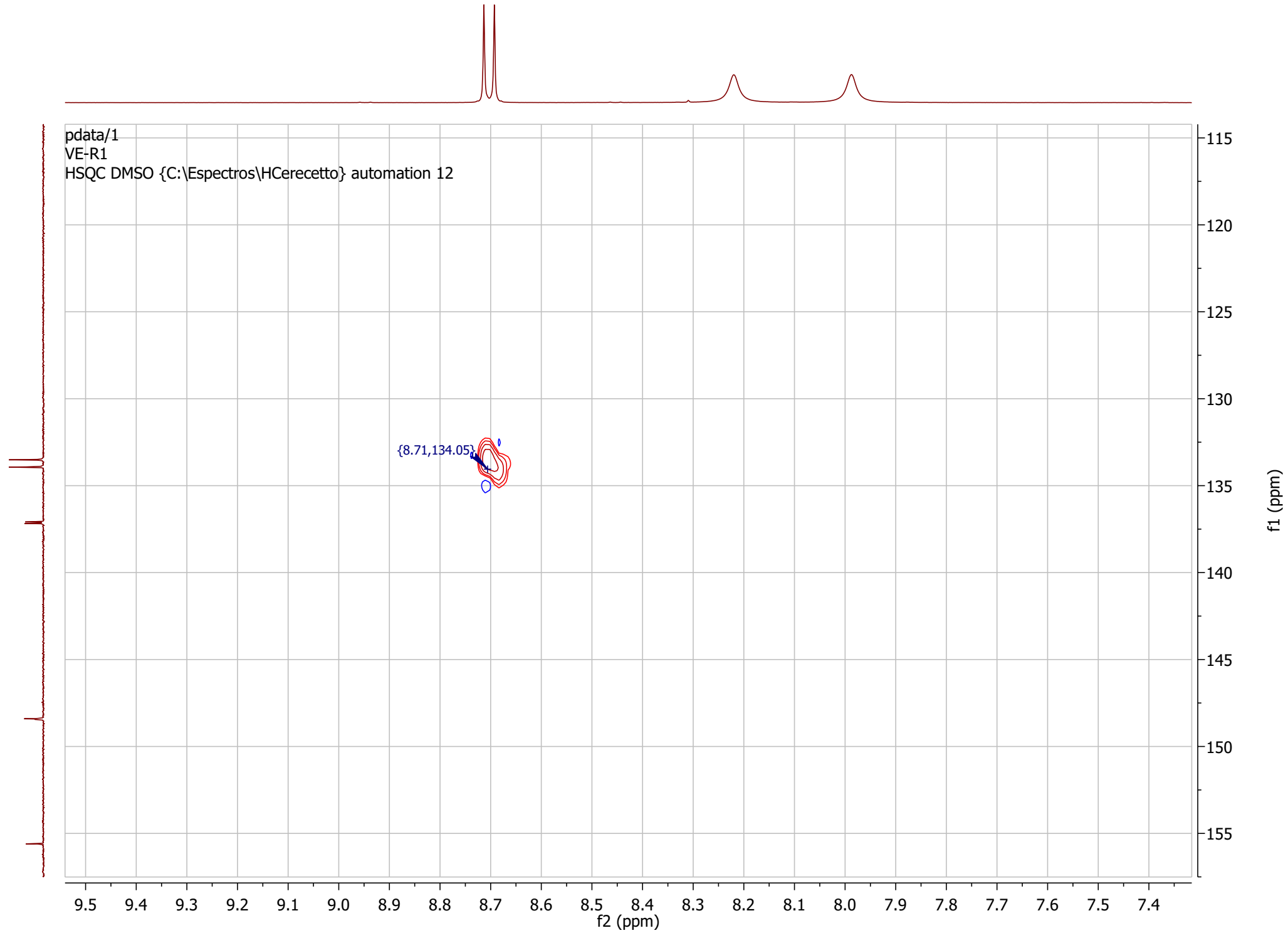


f1 (ppm)

f2 (ppm)

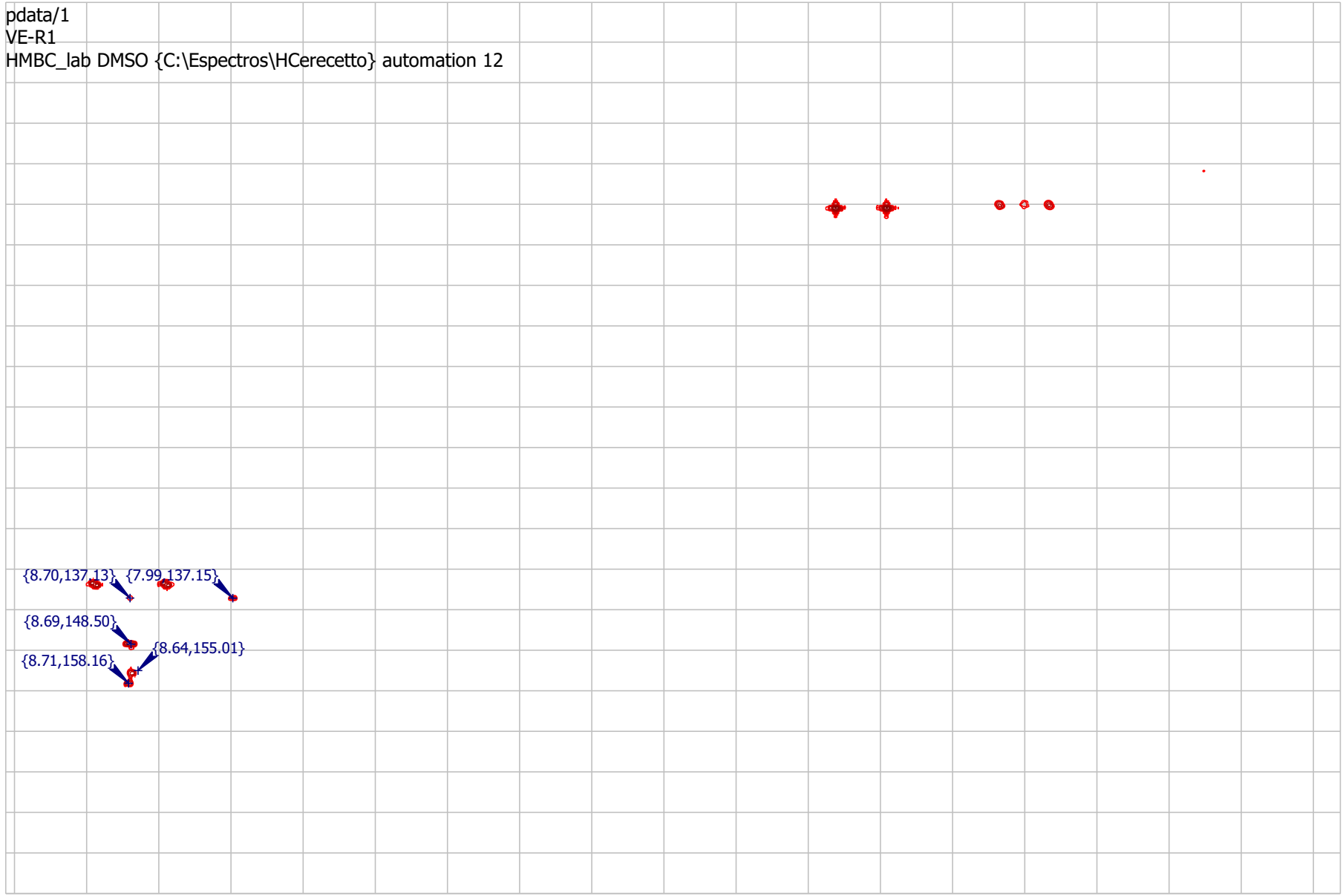


pdata/1
VE-R1
HSQC DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12





pdata/1
VE-R1
HMBC_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12

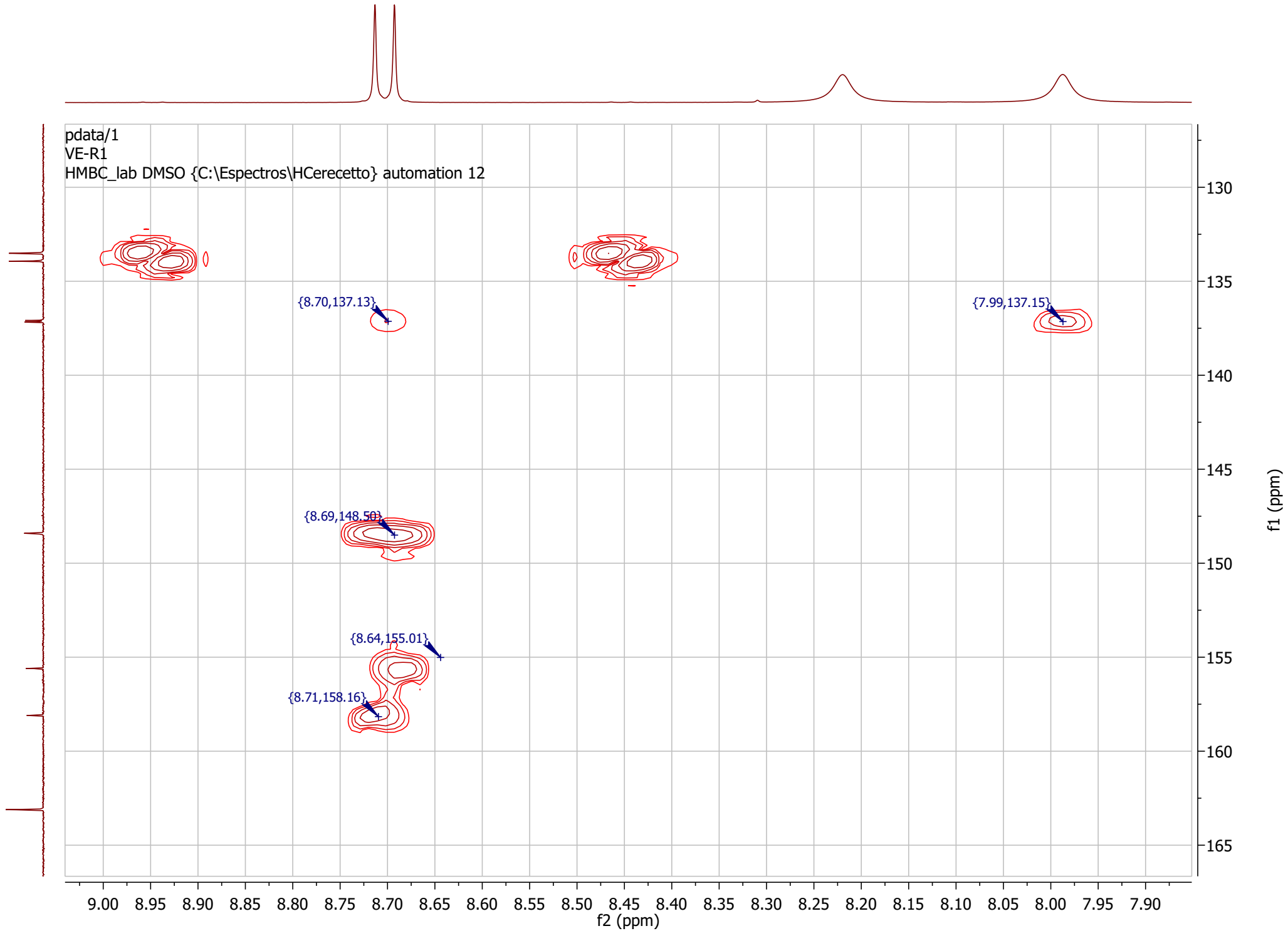


{8.70,137.13} {7.99,137.15}
{8.69,148.50}
{8.71,158.16} {8.64,155.01}

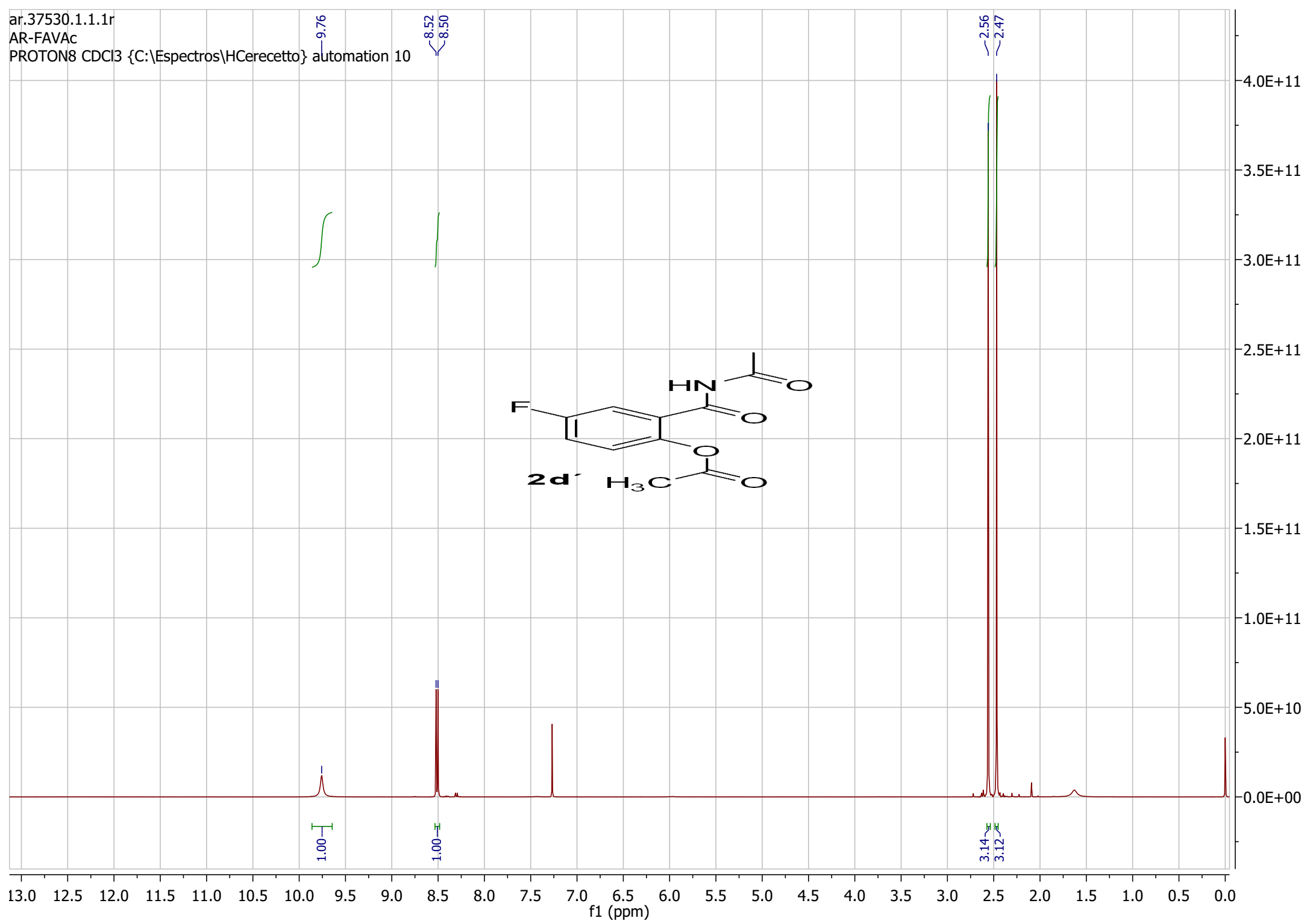
f1 (ppm)

f2 (ppm)

pdata/1
VE-R1
HMBC_lab DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 12



ar.37530.1.1.1r
AR-FAVAc
PROTON8 CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 10



9.76

8.52

8.50

2.56

2.47

1.00

1.00

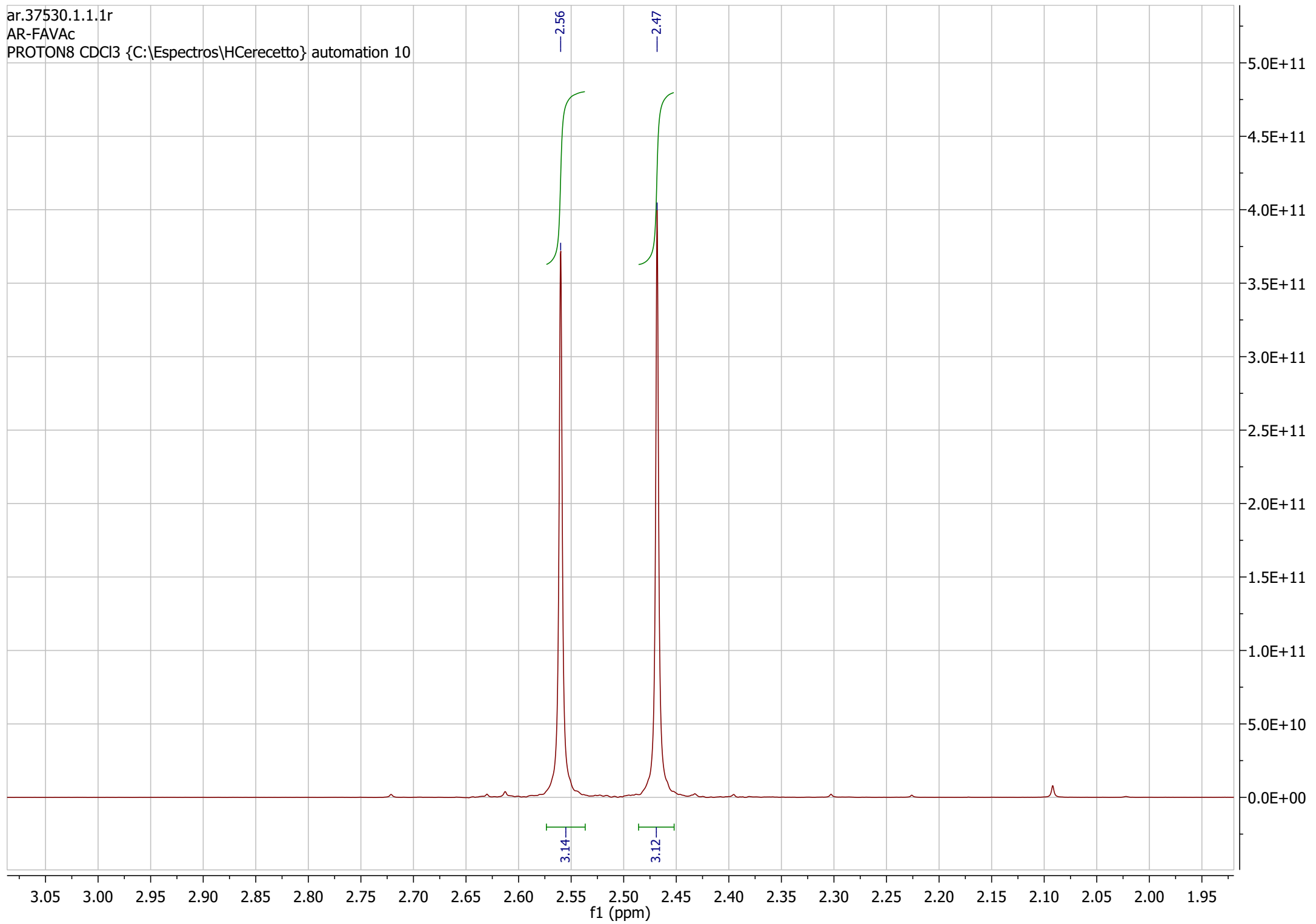
3.14

3.12

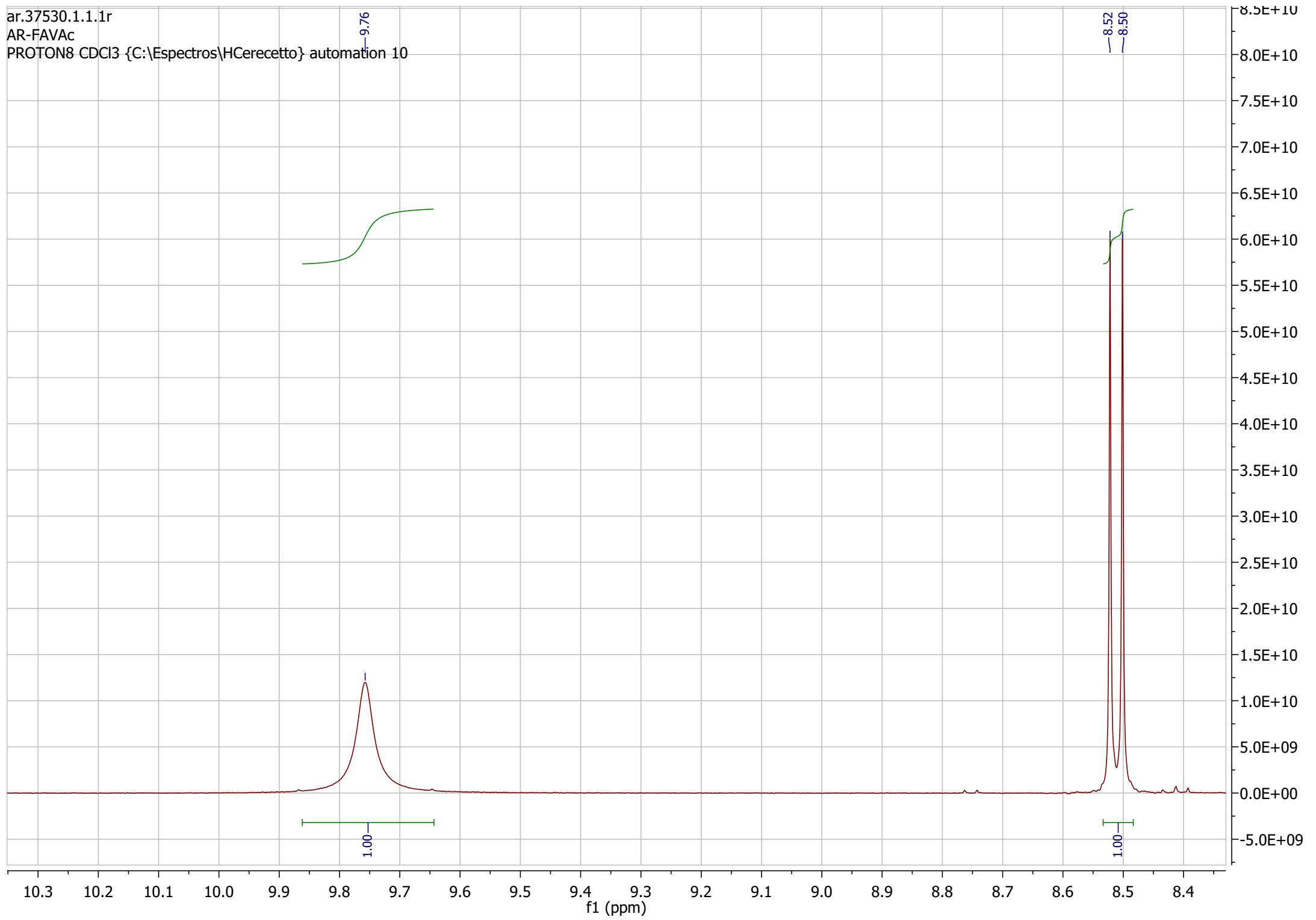
13.0 12.5 12.0 11.5 11.0 10.5 10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
f1 (ppm)

4.0E+11
3.5E+11
3.0E+11
2.5E+11
2.0E+11
1.5E+11
1.0E+11
5.0E+10
0.0E+00

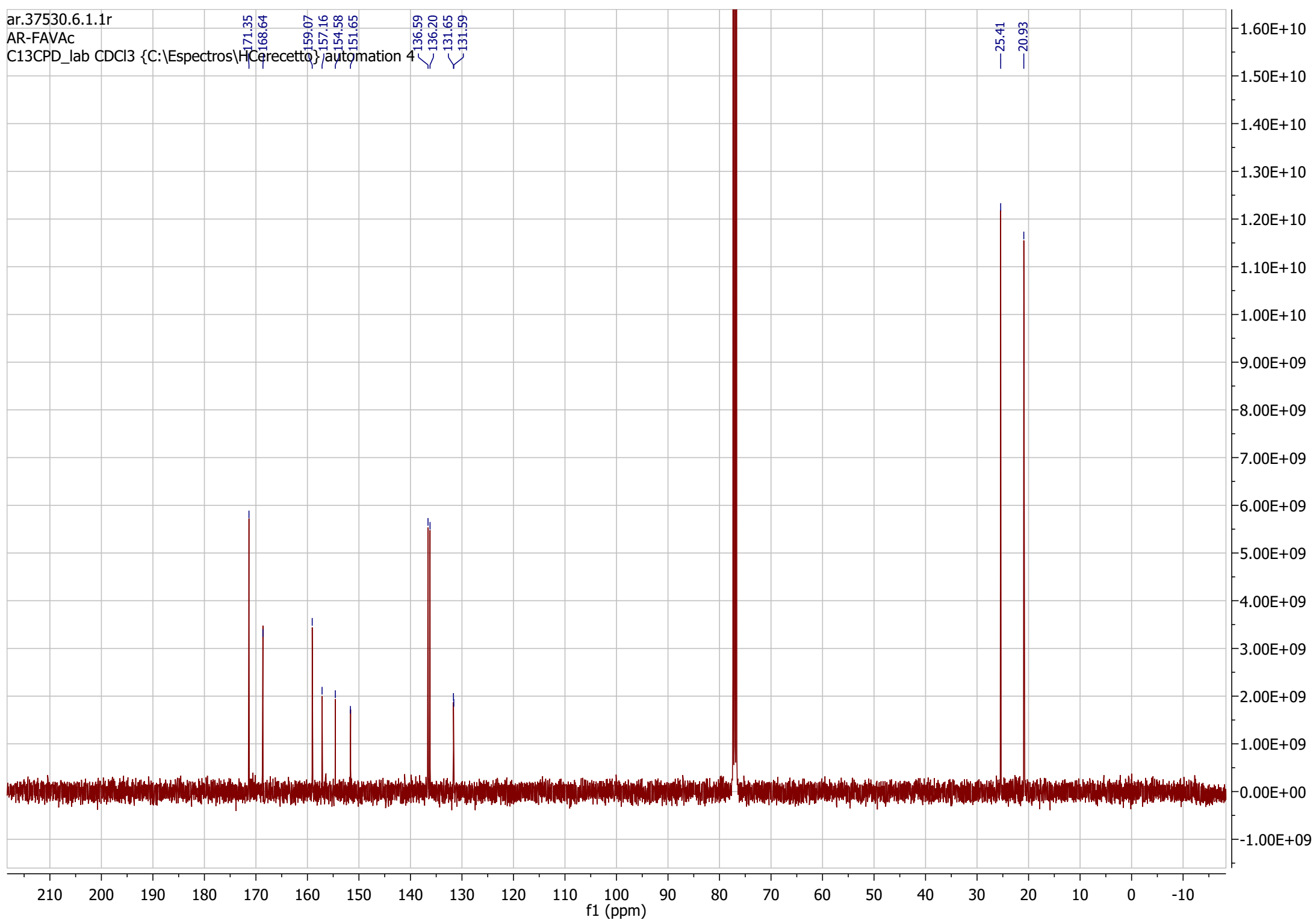
ar.37530.1.1.1r
AR-FAVAc
PROTON8 CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 10

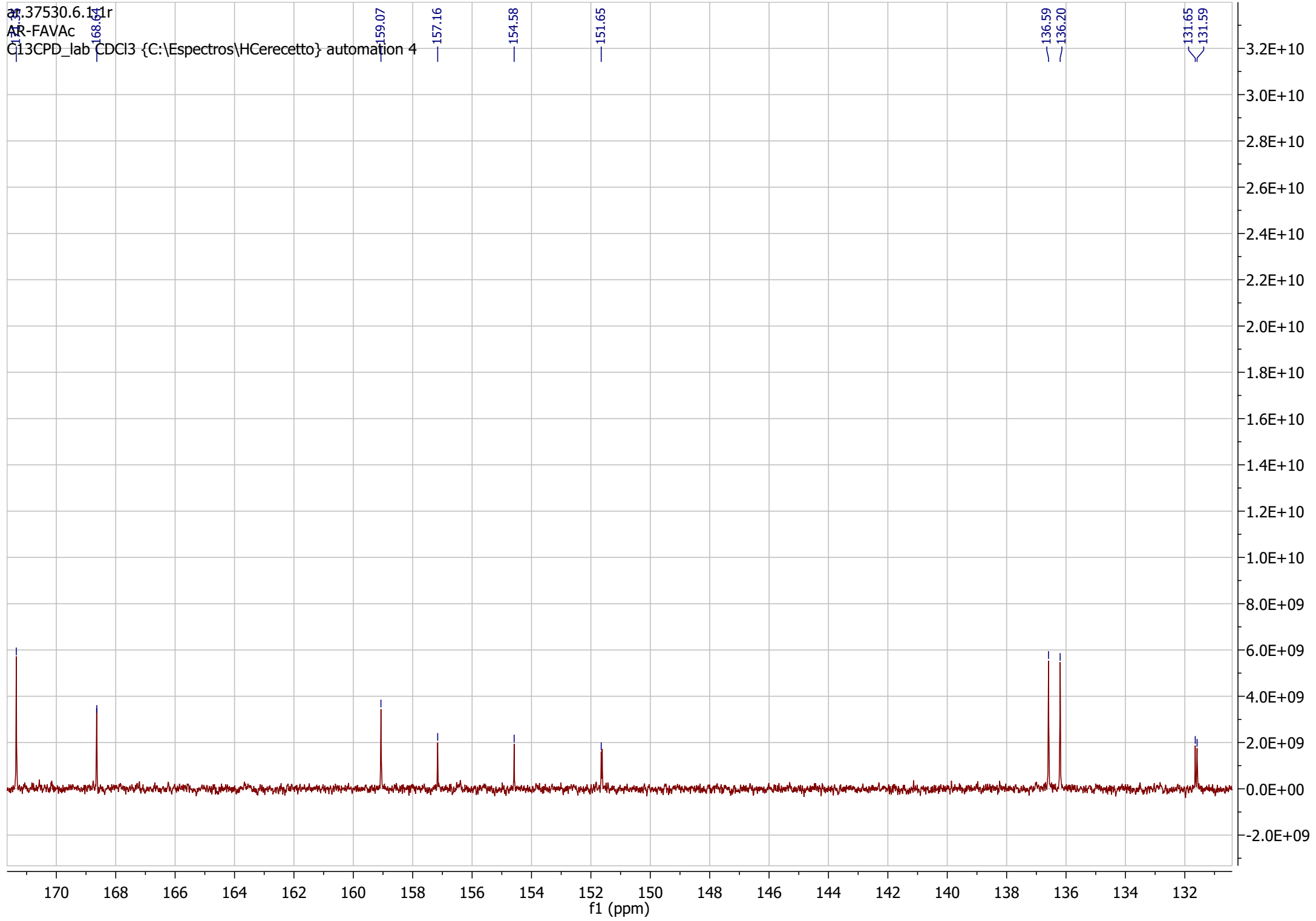


ar.37530.1.1.1r
AR-FAVAc
PROTON8 CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 10

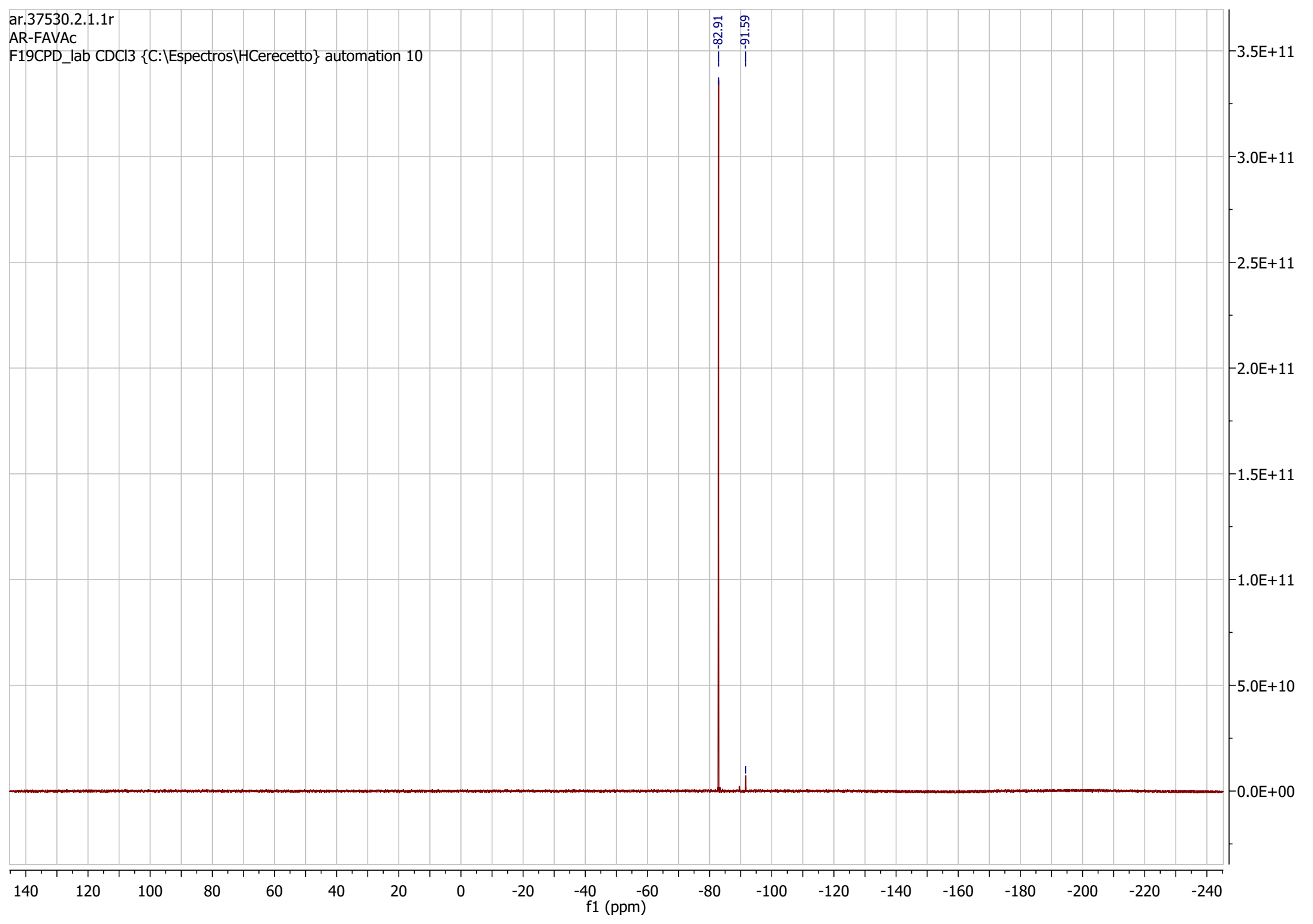


ar.37530.6.1.1r
AR-FAVAc
C13CPD_lab CDCl3 {C:\Espectros\H Cerecetto} automation 4

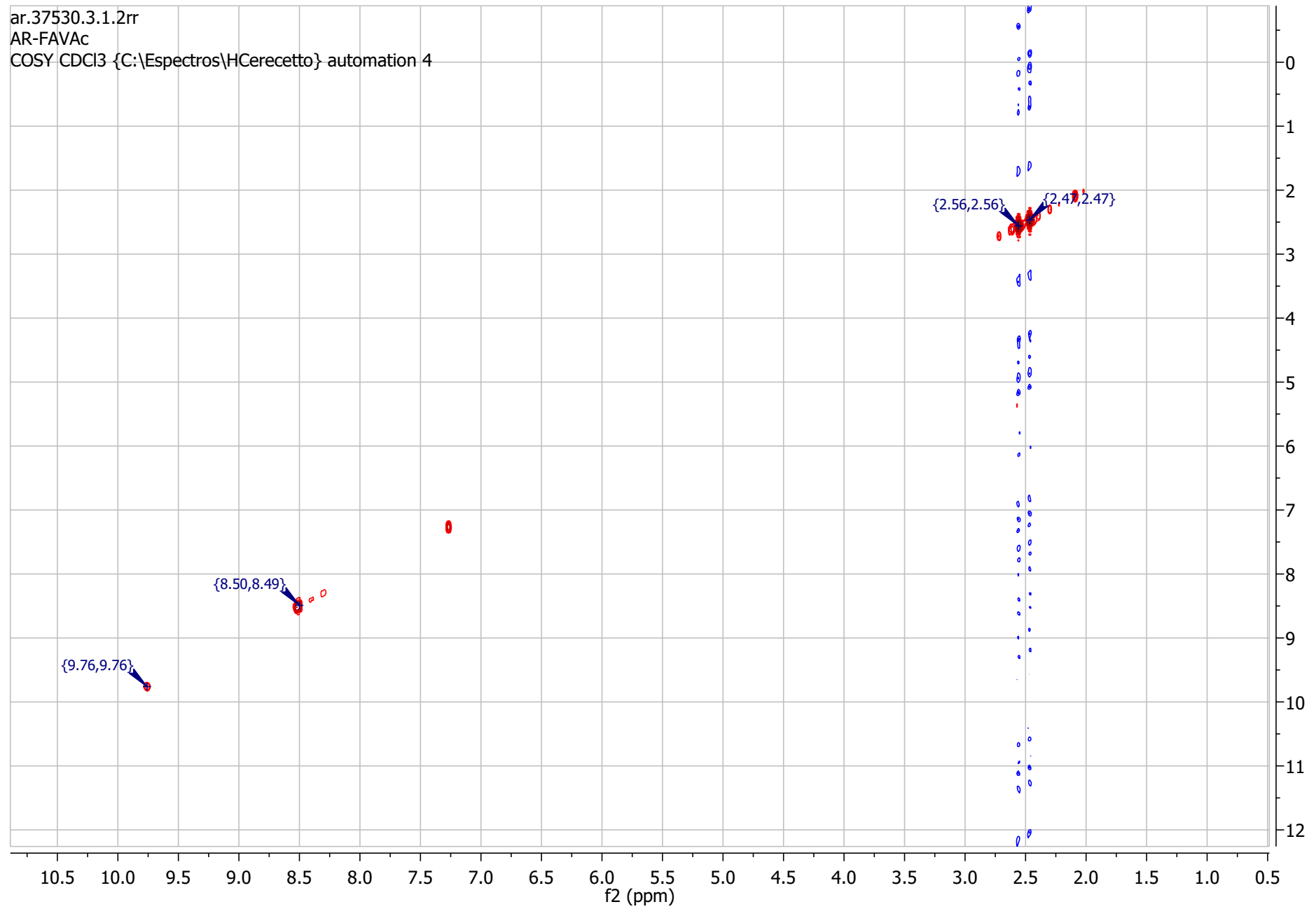




ar.37530.2.1.1r
AR-FAVAc
F19CPD_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 10



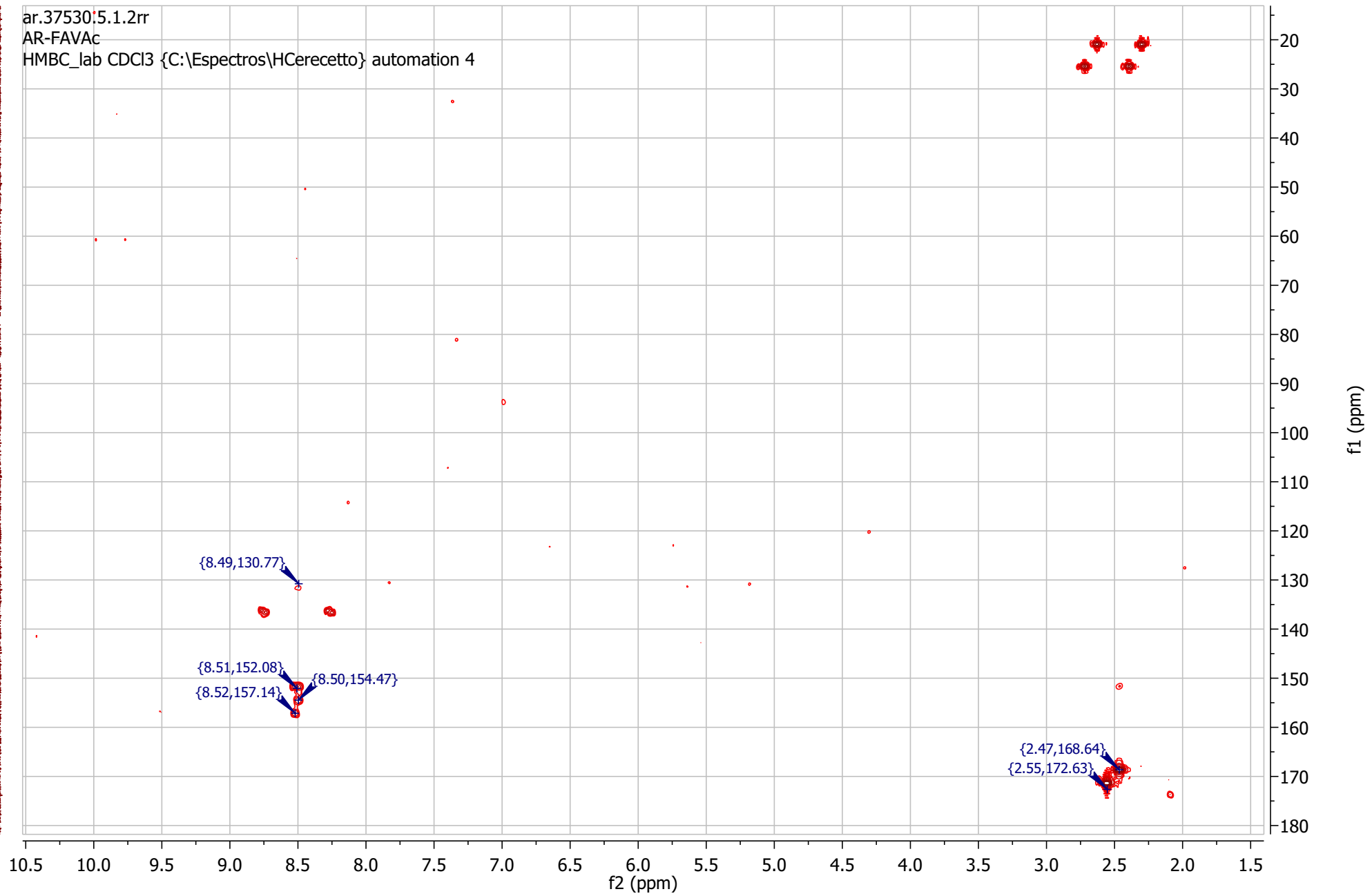
ar.37530.3.1.2rr
AR-FAVAc
COSY CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 4



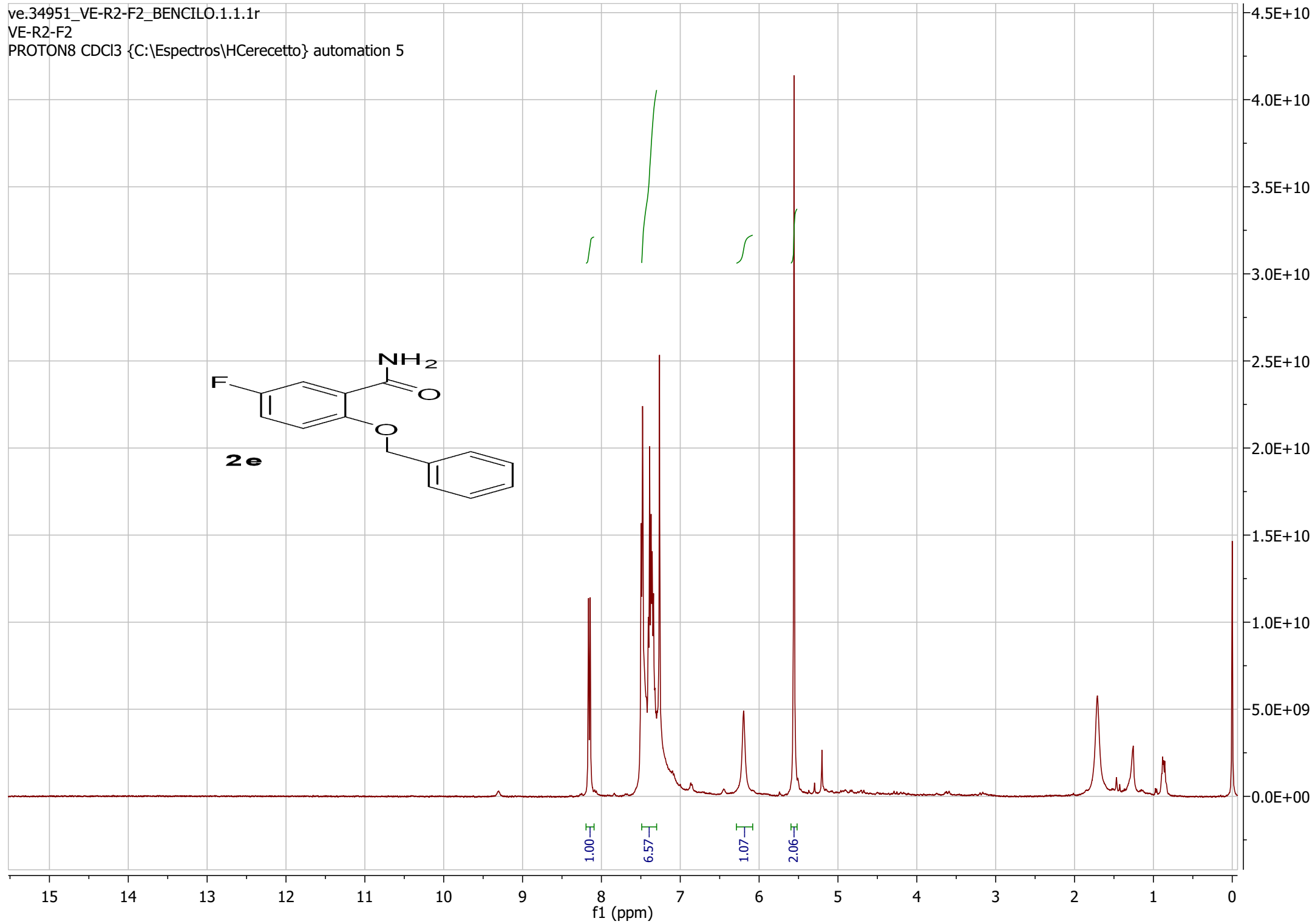
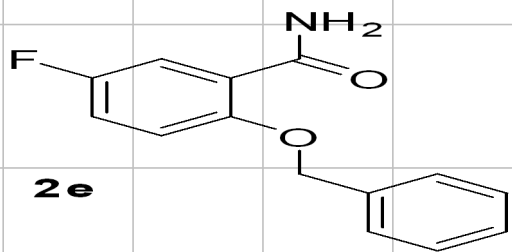
ar.37530;5.1.2rr

AR-FAVAc

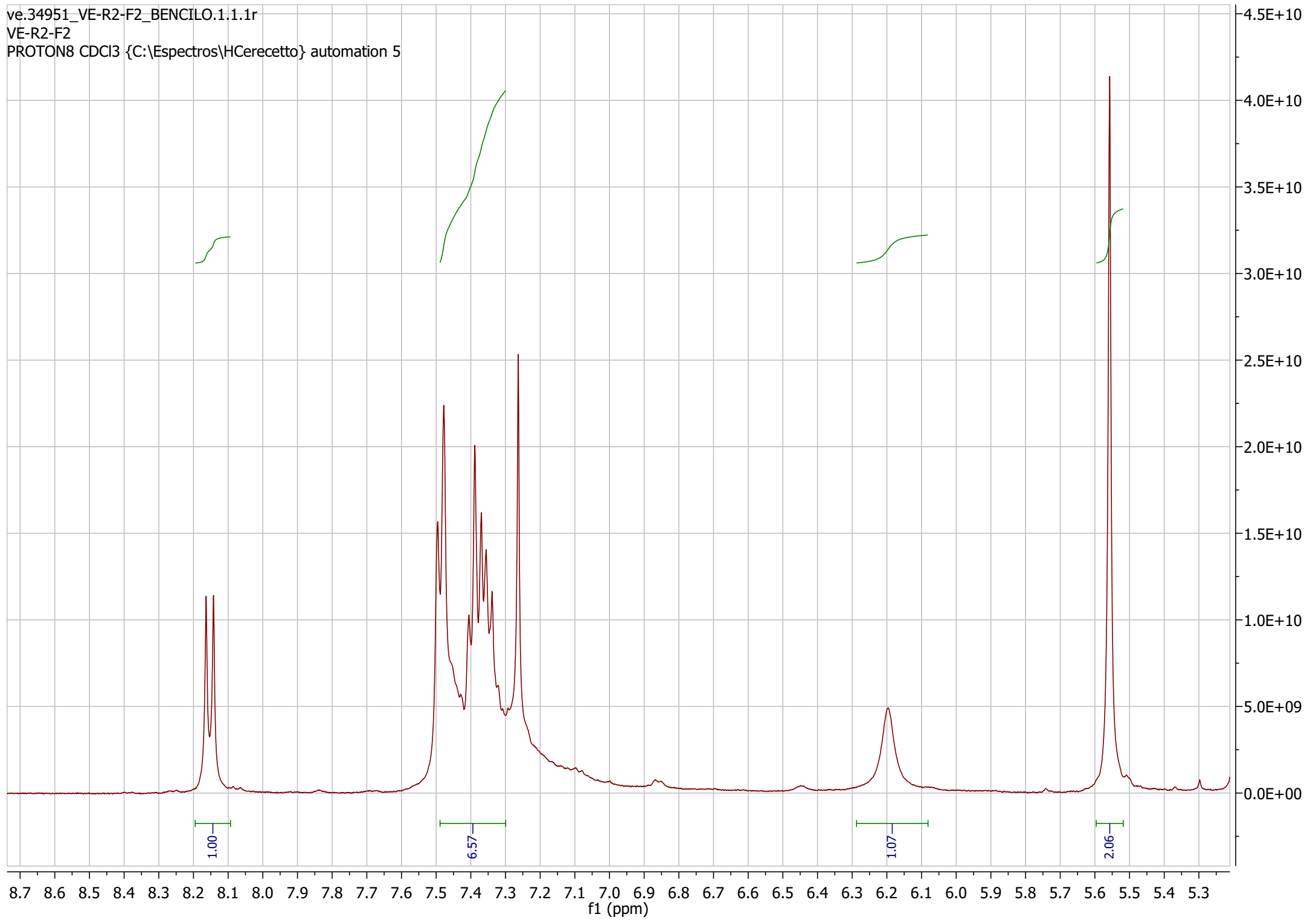
HMBC_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 4



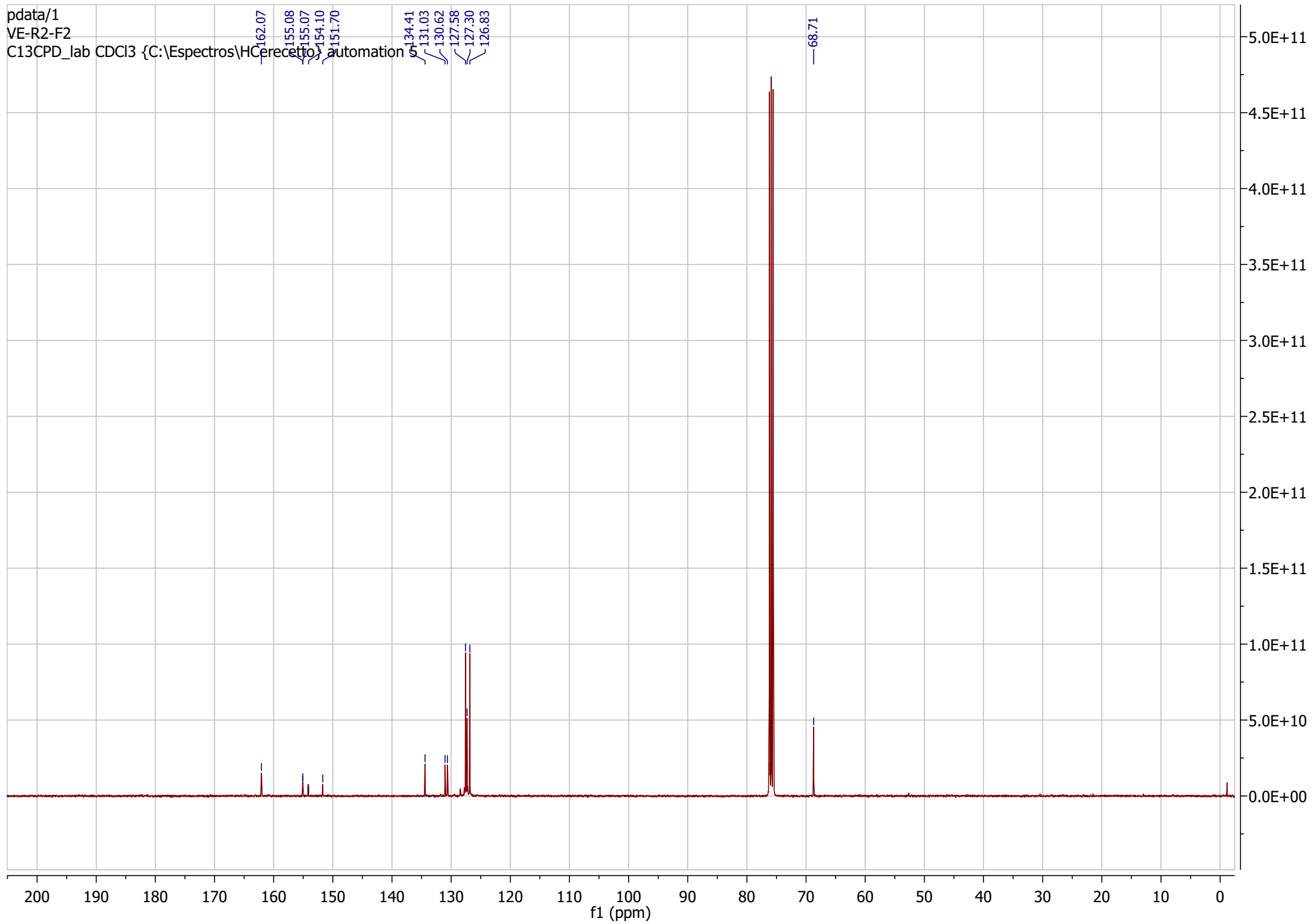
ve.34951_VE-R2-F2_BENCILO.1.1.1r
VE-R2-F2
PROTON8 CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 5



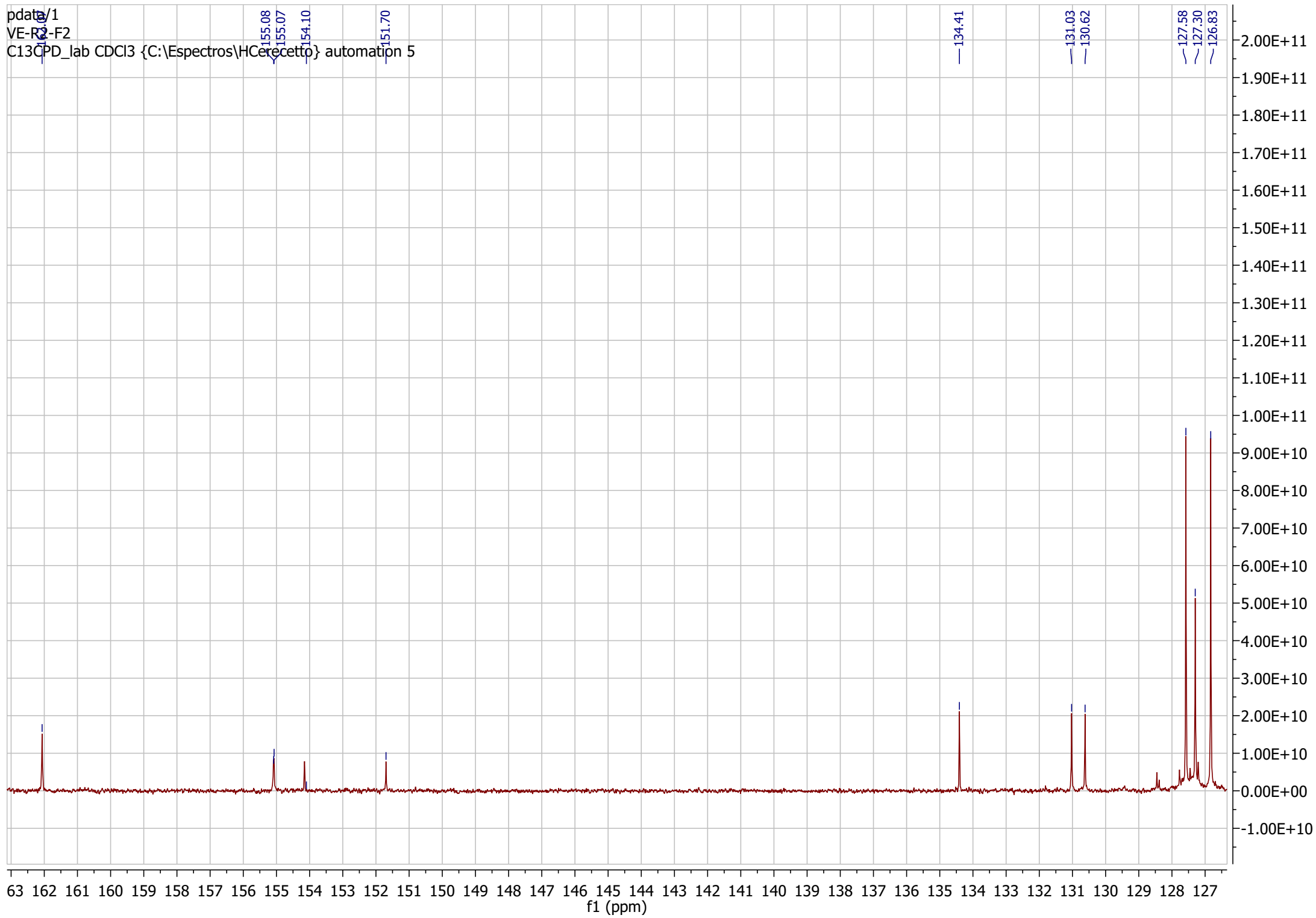
ve.34951_VE-R2-F2_BENCIOLO.1.1.1r
VE-R2-F2
PROTON8 CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 5



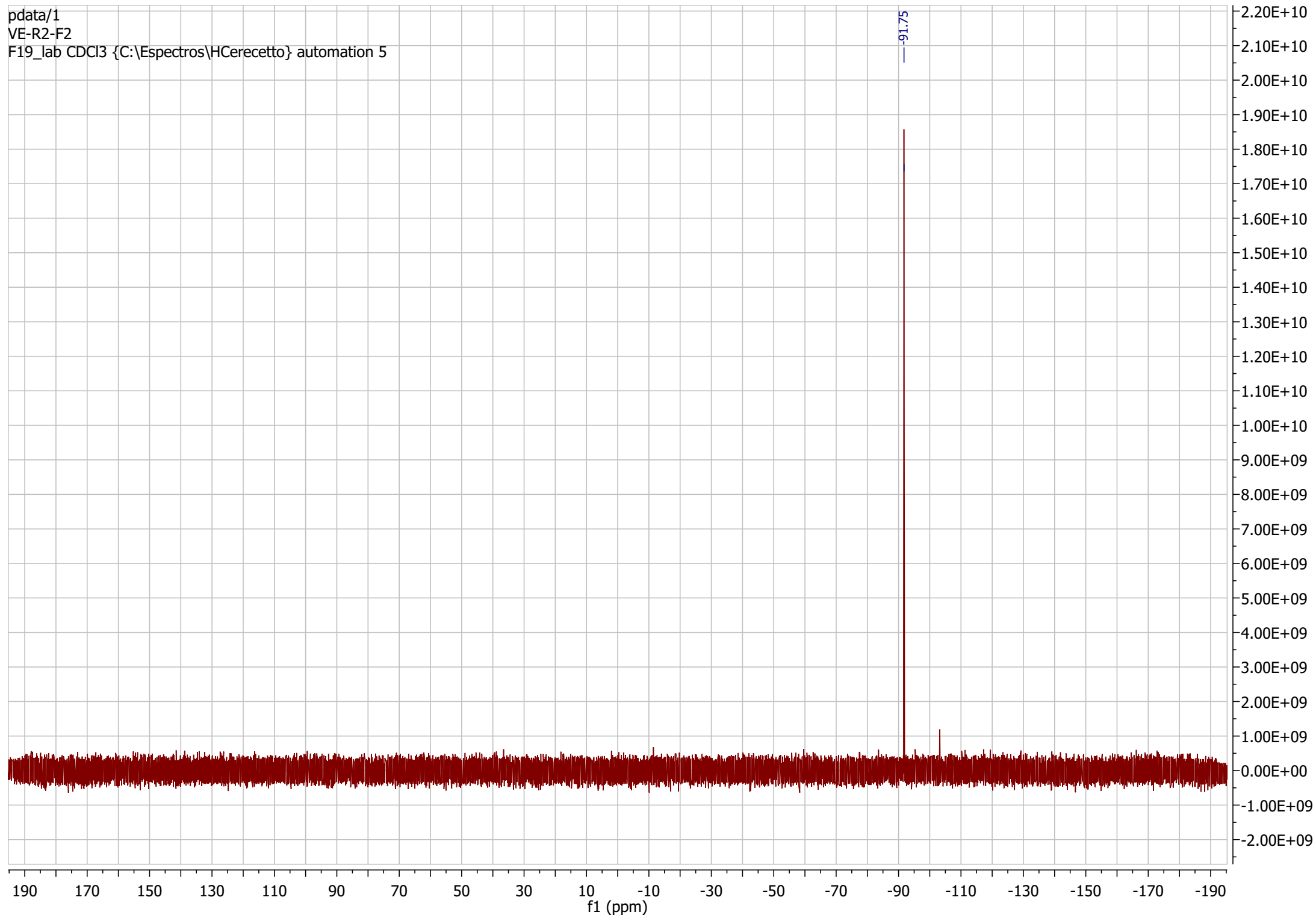
pdata/1
VE-R2-F2
C13CPD_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto) automation 5



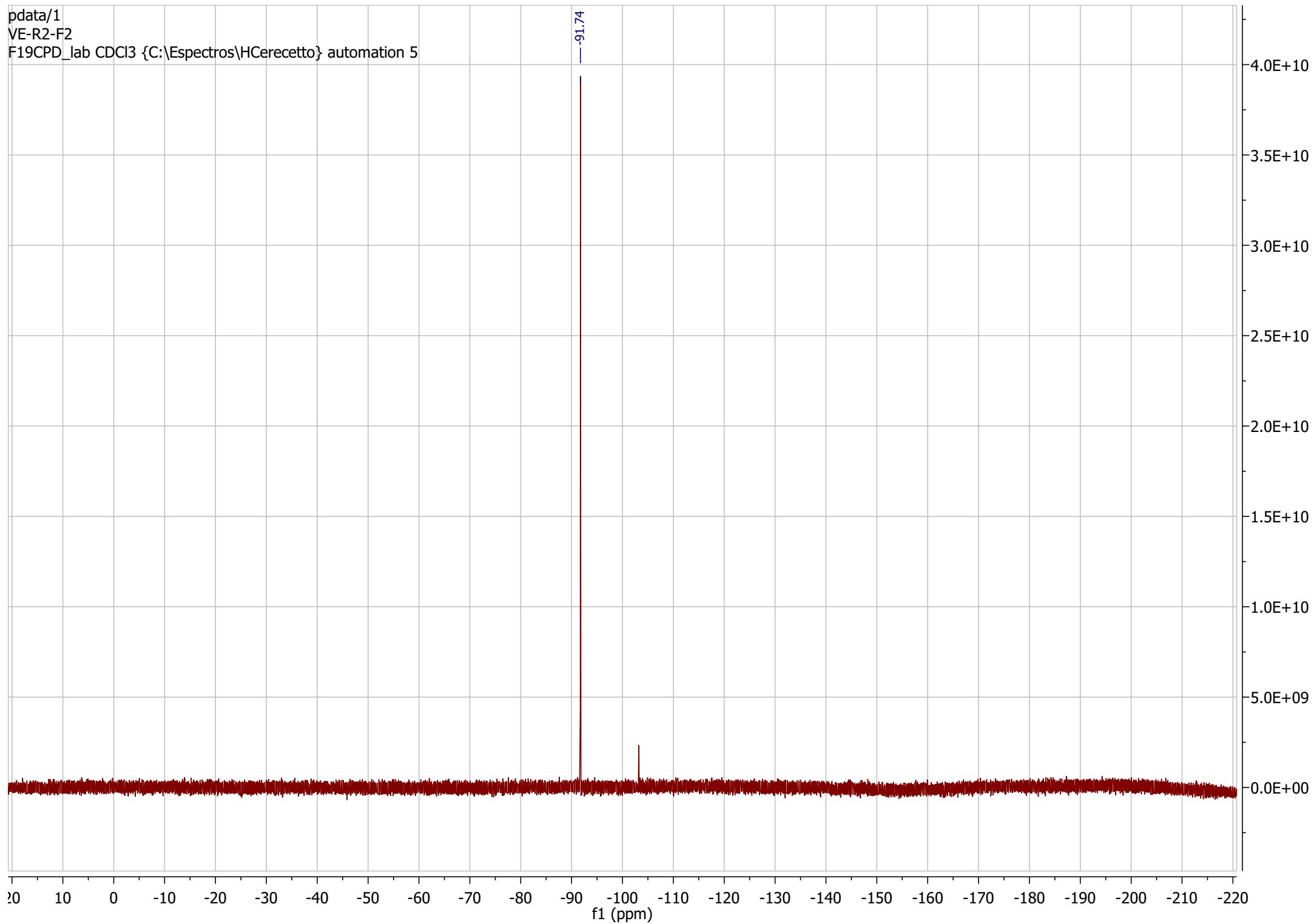
pdata/1
VE-R2-F2
C13CPD_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 5

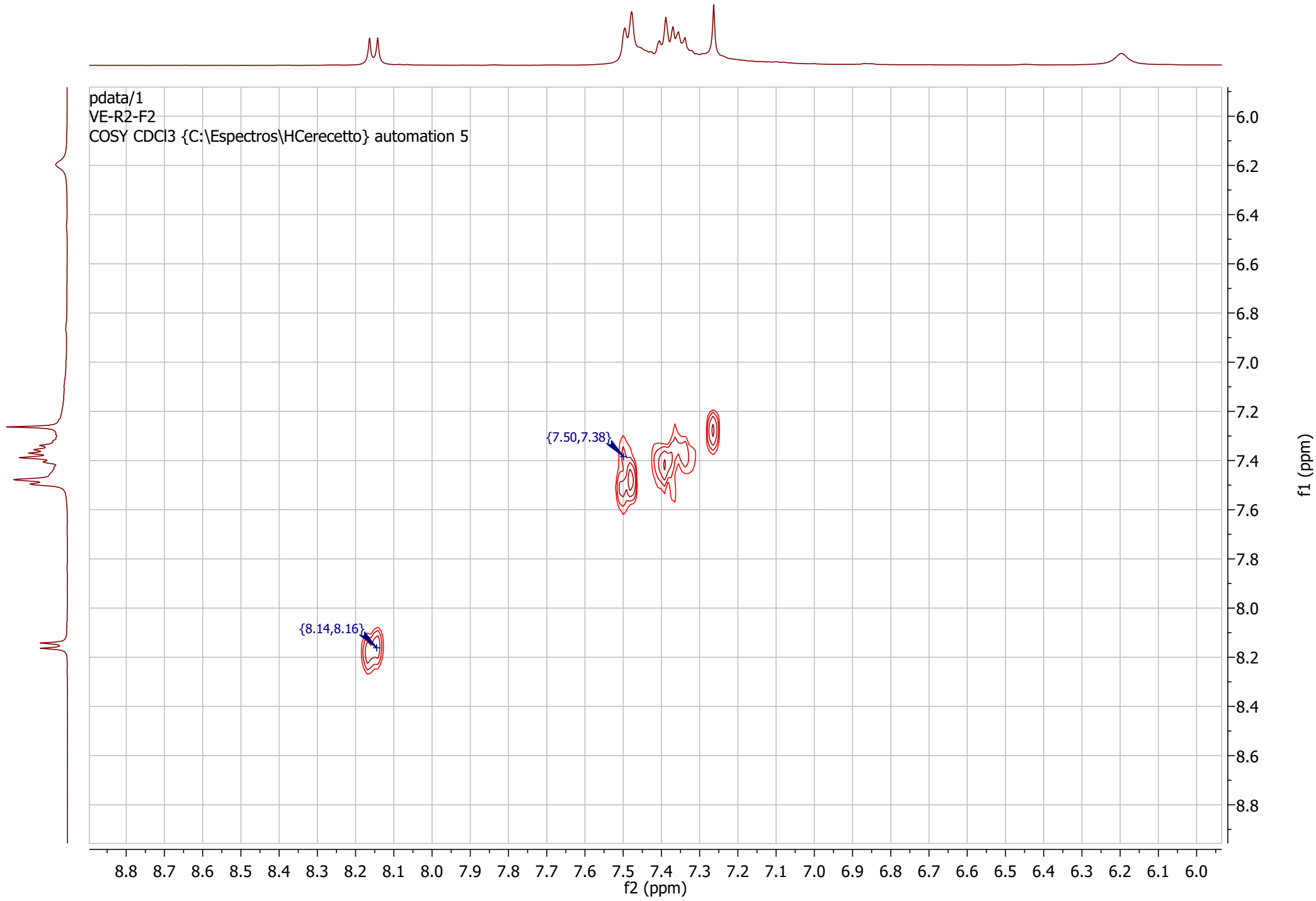


pdata/1
VE-R2-F2
F19_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 5

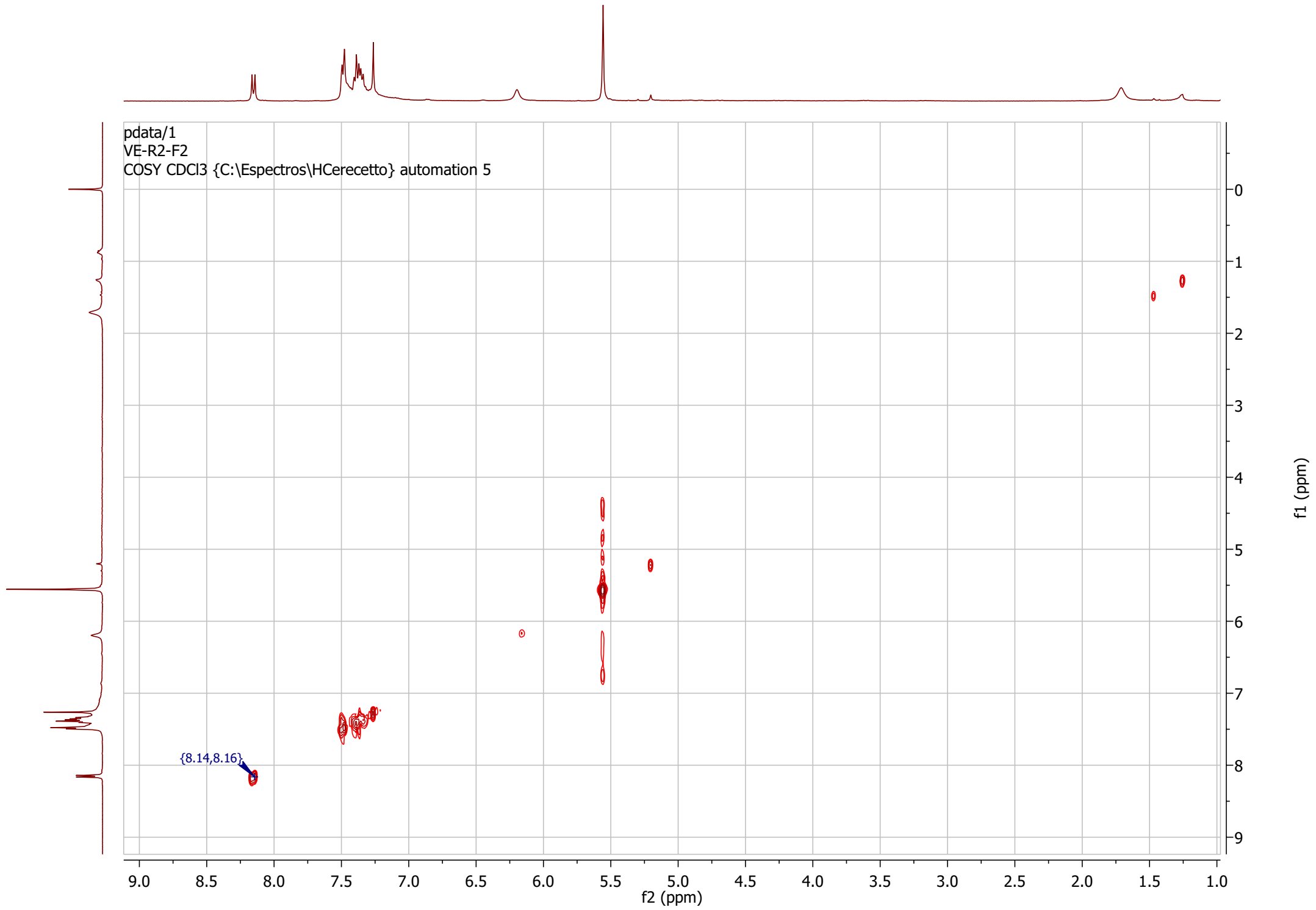


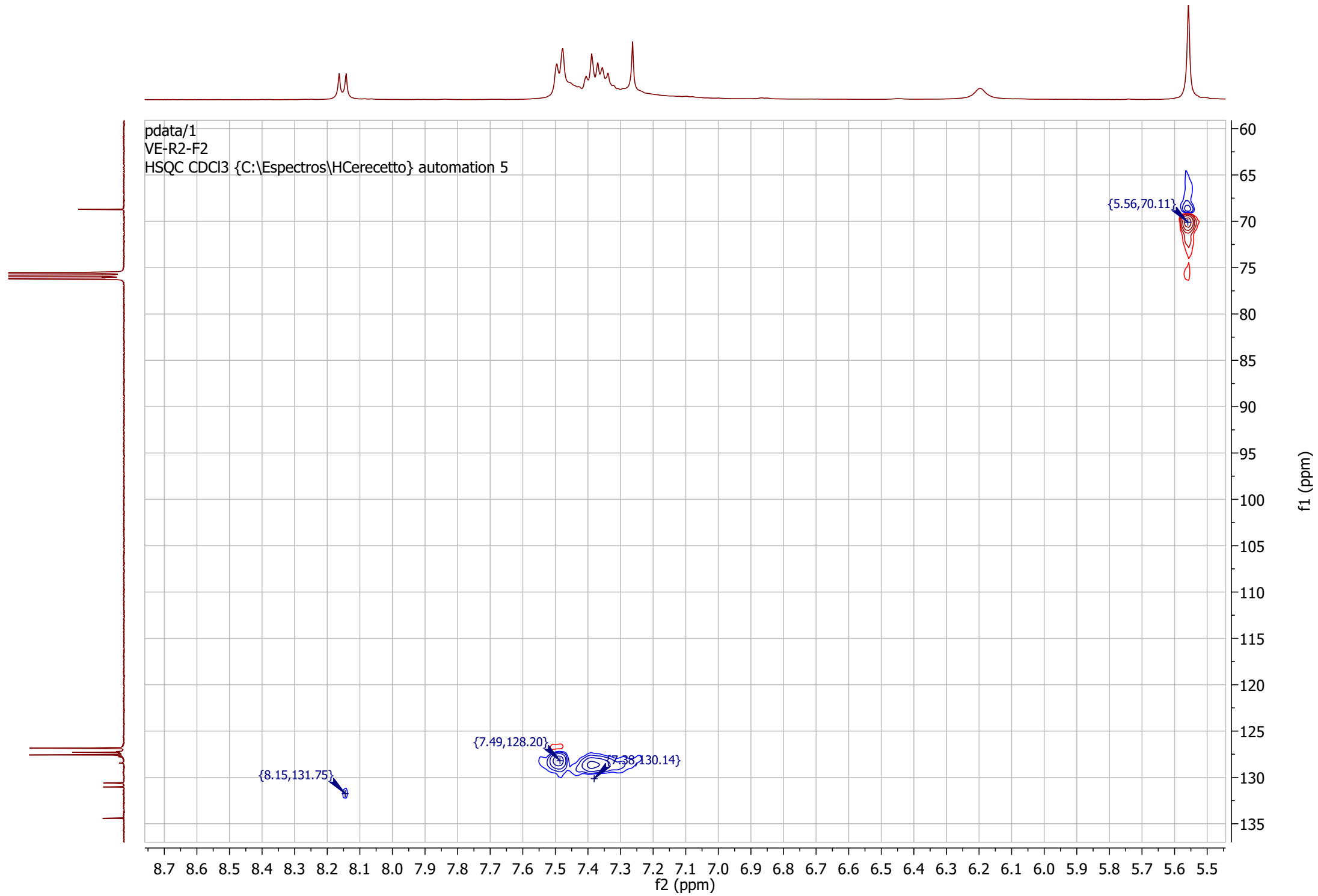
pdata/1
VE-R2-F2
F19CPD_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 5



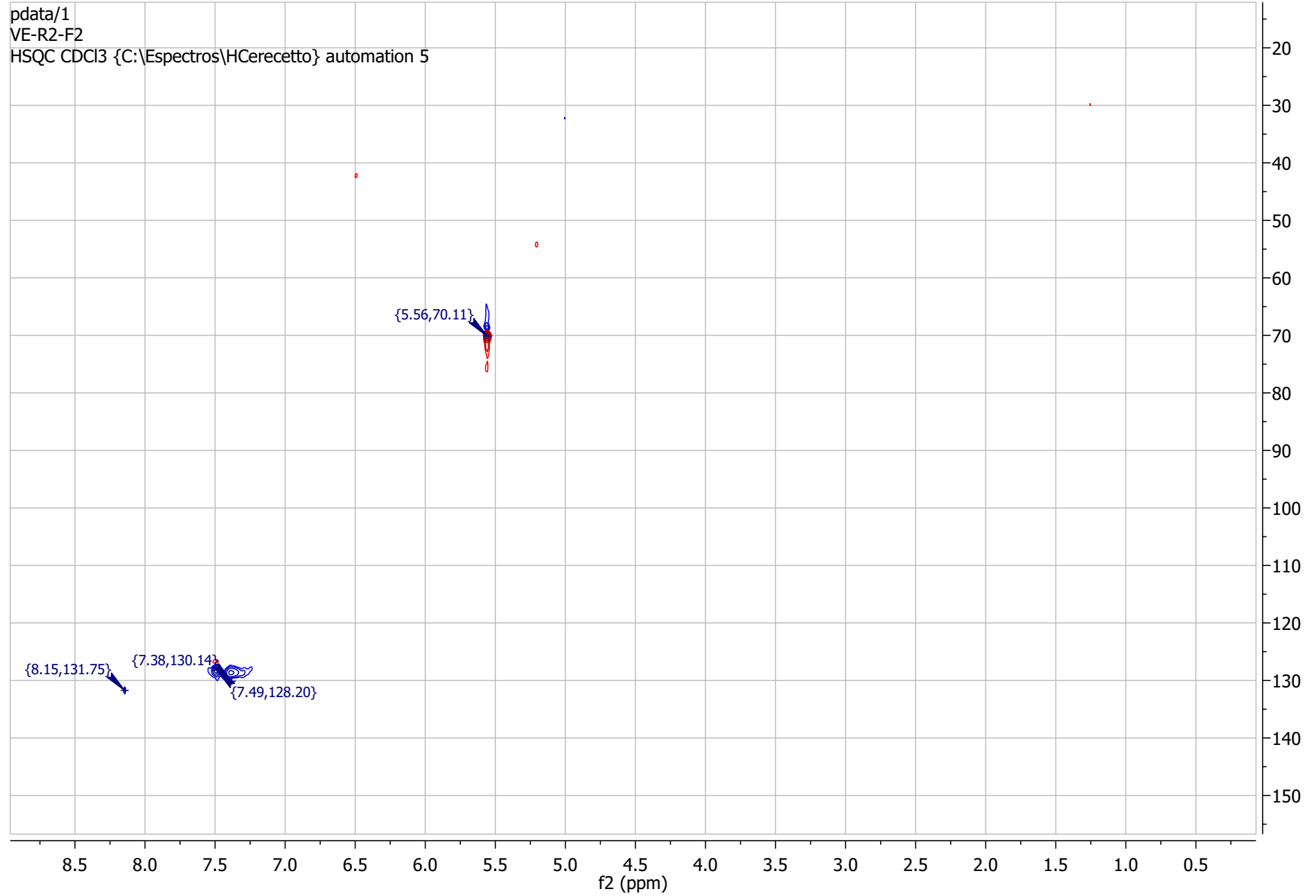


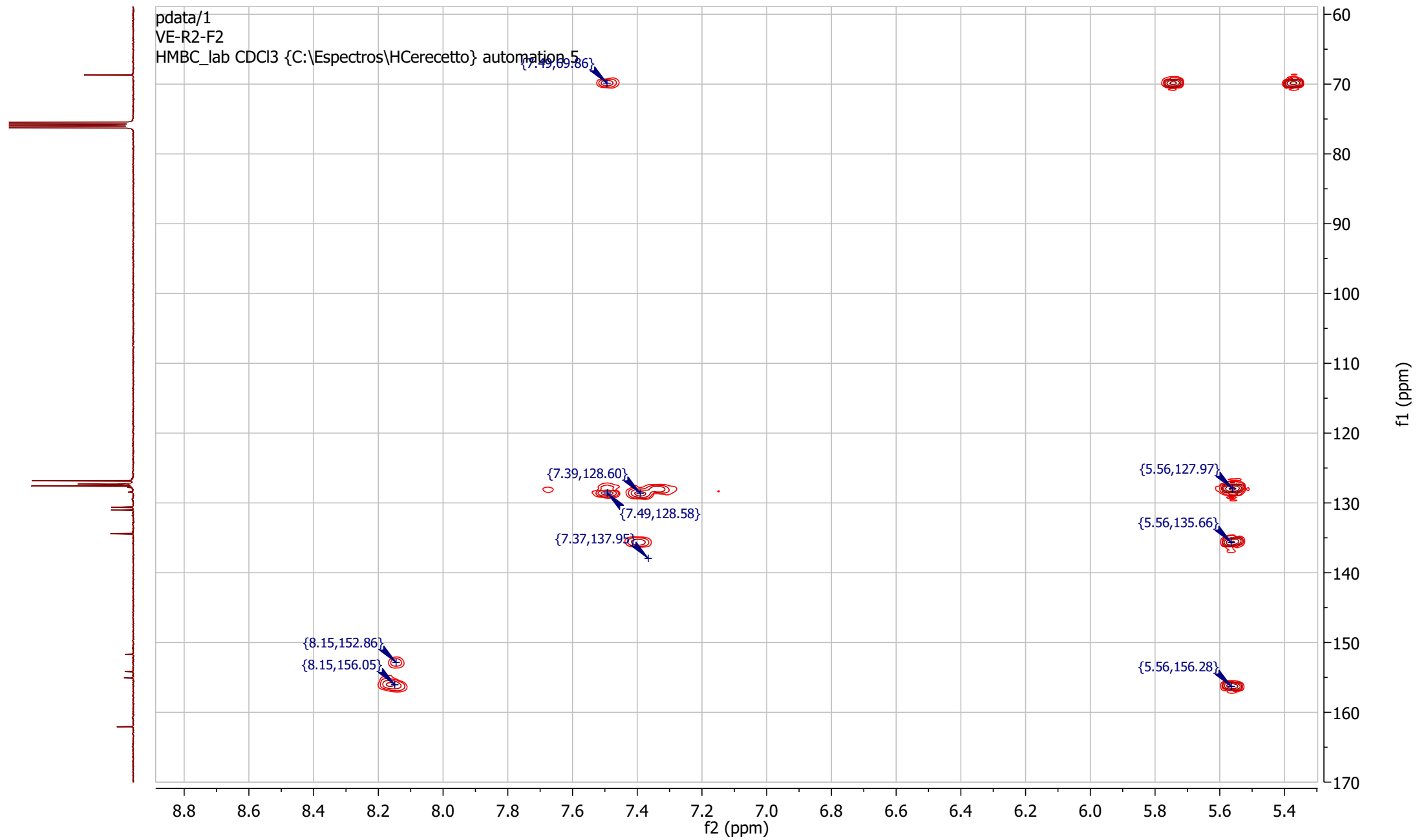
pdata/1
VE-R2-F2
COSY CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 5

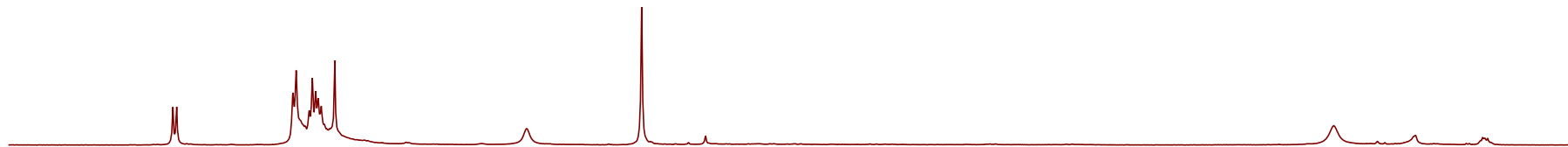




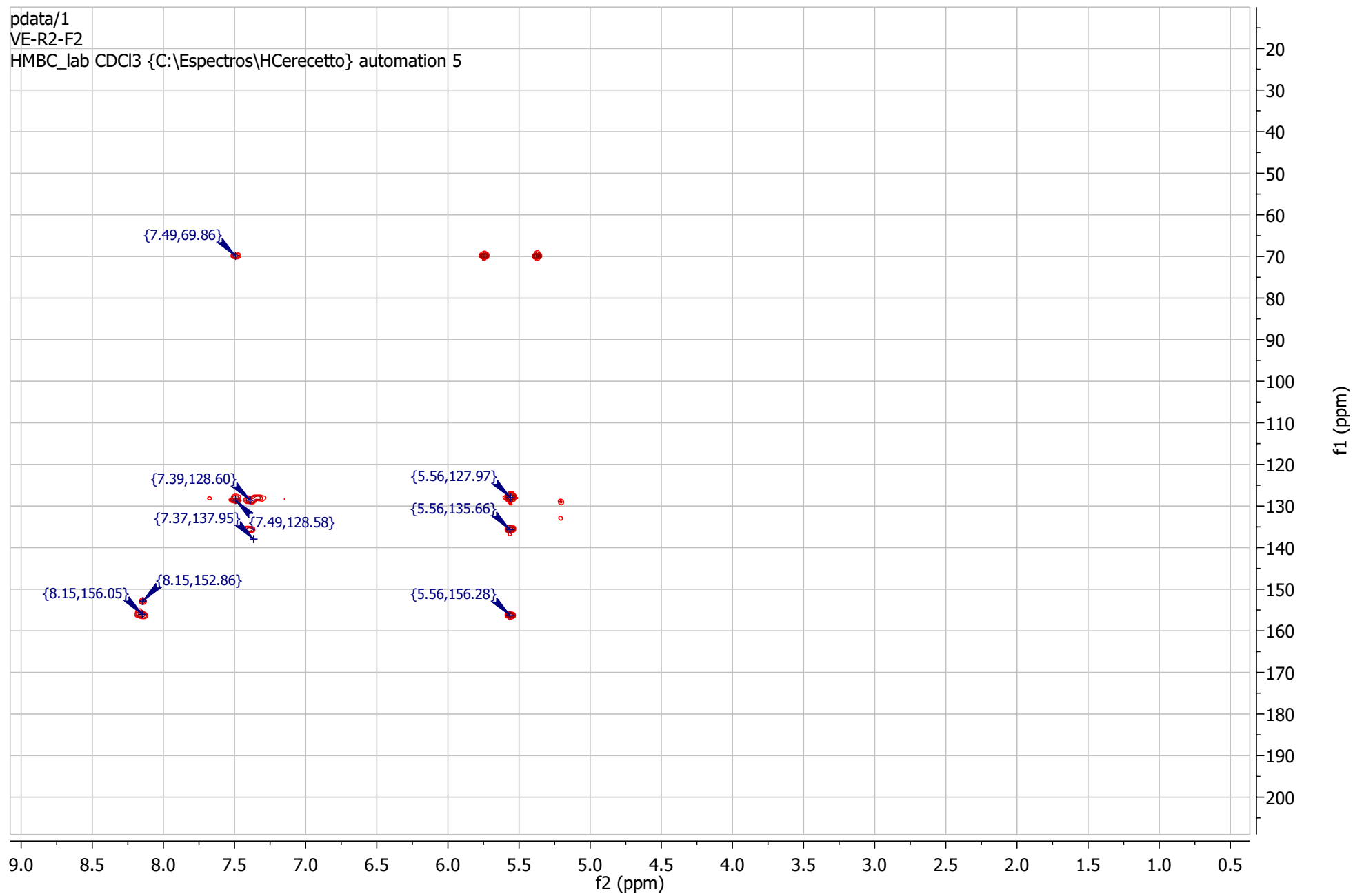
pdata/1
VE-R2-F2
HSQC CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 5



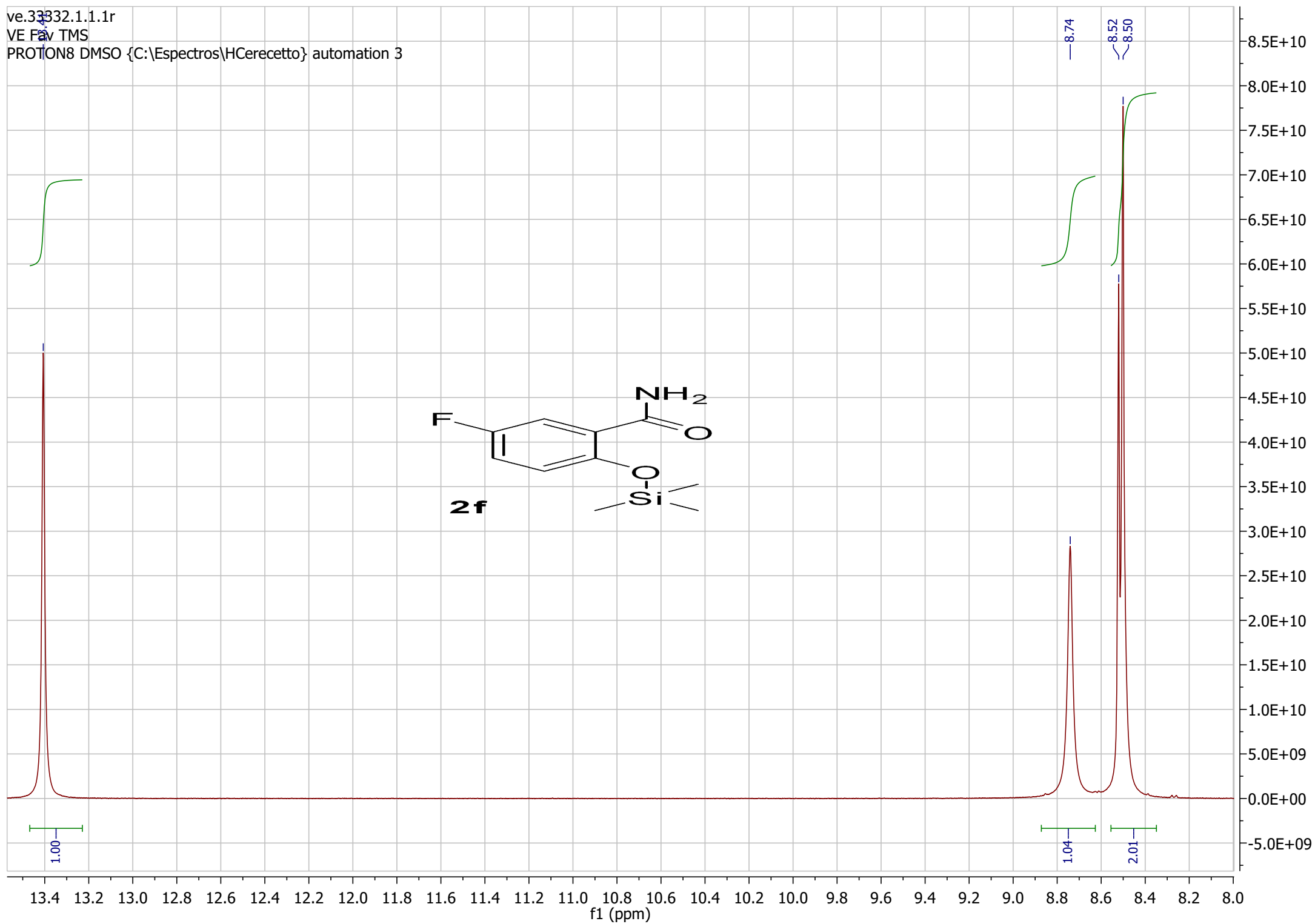




pdata/1
VE-R2-F2
HMBC_lab CDCl3 {C:\Espectros\HCerecetto} automation 5



ve.3332.1.1.1r
VE Fav TMS
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 3



13.4 13.2 13.0 12.8 12.6 12.4 12.2 12.0 11.8 11.6 11.4 11.2 11.0 10.8 10.6 10.4 10.2 10.0 9.8 9.6 9.4 9.2 9.0 8.8 8.6 8.4 8.2 8.0
f1 (ppm)

8.5E+10
8.0E+10
7.5E+10
7.0E+10
6.5E+10
6.0E+10
5.5E+10
5.0E+10
4.5E+10
4.0E+10
3.5E+10
3.0E+10
2.5E+10
2.0E+10
1.5E+10
1.0E+10
5.0E+09
0.0E+00
-5.0E+09

1.00

1.04

2.01

8.74

8.52

8.50

ve.33332.1.1.1r
VE Fav TMS
PROTON8 DMSO {C:\Espectros\HCerecetto} automation 3

