

T
1357

13 37⁰⁰

3788



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
PRODUCCIÓN DE FARMOQUÍMICOS

“OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE NUCLEÓSIDOS DE INOSINA POR
BIOCATÁLISIS”

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Q.F.B. VALENCIA LEDEZMA OMAR ESTEBAN
Matricula: 209180752

COMITÉ TUTORAL

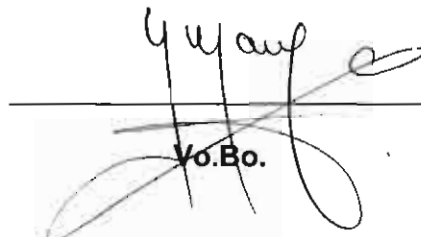
Tutor: DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ
Asesor: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ
Asesor: DRA. AÍDA SOLÍS OBA

Marzo/ 2012

**OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE NUCLEÓSIDOS DE INOSINA POR
BIOCATÁLISIS**

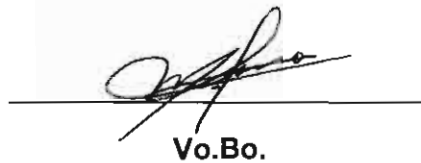
COMITÉ TUTORAL

Tutor: DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ



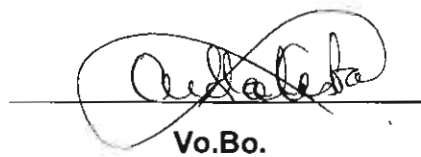
Vo.Bo.

Asesor: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ



Vo.Bo.

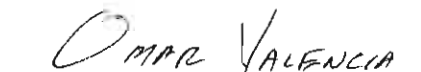
Asesor: DRA. AIDA SOLÍS OBA



Vo.Bo.

Alumno: Q.F.B VALENCIA LEDEZMA OMAR ESTEBAN

Matrícula: 209180752



OMAR VALENCIA

OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE NUCLEÓSIDOS DE INOSINA POR
BIOCATÁLISIS

JURADO DE EXAMEN DE GRADO



PRESIDENTE: DR. HÉCTOR JAIME SALGADO ZAMORA



VOCAL: DR. DANIEL ARRIETA BÁEZ



SECRETARIO: DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ



RESUMEN

Entre los compuestos utilizados como intermediarios para la síntesis de productos con actividad biológica de interés farmacéutico, se encuentran los derivados de inosina, los cuales son utilizados para la obtención de diversos principios activos, p.ej. antibióticos, antimicóticos, antivirales, anticancerígenos, antihelmínticos, insecticidas, etc. Estos derivados nucleosídicos son compuestos que se obtienen, por lo general, por síntesis química, los derivados de inosina presentan una característica estructural relevante, ya que cuentan con más de un centro quiral, lo que conlleva a la denominación de diastereoisómeros. Debido a su complejidad estructural el desarrollo comercial de estos productos aún se encuentra en proceso de implementación, se han tenido grandes avances por la ampliación de estrategias que han dado lugar a la síntesis de una creciente colección de derivados de nucleósidos con actividad farmacológica. Así la biotecnología es hoy una herramienta útil en síntesis orgánica y ha adquirido un papel relevante en el desarrollo de nuevos fármacos y moléculas complejas difíciles de obtener por métodos químicos tradicionales. En la década de los 90's, los procesos de biotransformación y biocatálisis son empleados como parte de programas para el desarrollo de nuevos fármacos. Ya que el empleo de biocatalizadores abre una nueva vía en la generación de compuestos con una mayor pureza óptica, dando un avance importante en la búsqueda y desarrollo de productos con actividad farmacológica, generando un menor impacto ambiental.

Por lo anterior se planteó como objetivo principal "estudiar la inducción asimétrica aplicando enzimas, en la preparación de derivados de nucleósidos de inosina", buscando por medio de biocatálisis, separar y caracterizar los diastereoisómeros del compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina, por la creación de un nuevo centro estereogénico (vía la cianohidrina quiral) empleando enzimas oxinitrilasas, liasas obtenidas de las semillas de: almendra, capulín, cereza, ciruela, durazno, guanábana y mamey en la forma de polvos acetónidos, utilizando diferentes temperaturas (5,10 y 20°C) y distintos pH (4 y 5), ya que tienen la capacidad de incorporar o desincorporar un grupo ciano en un aldehído. Se analizaron y cuantificaron los productos por: Cromatografía de

Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H).

Con base en los % de exceso diastereoisomérico (*ed*) se realizó el análisis estadístico de: varianza, t-pareada y Tukey-Kramer, encontrándose: 1) que los datos obtenidos empleando las dos técnicas (CLAR y RMN ^1H) no presentan diferencia estadísticamente, por lo que es confiable utilizar cualquiera de estas técnicas para realizar la determinación del *ed*; 2) se logró determinar la diferencia al modificar factores como la temperatura o el pH en los diferentes experimentos, consiguiendo de esta forma un mayor o menor % *ed*.

Por otro lado al utilizar los diferentes biocatalizadores se logró una inducción asimétrica a las diferentes temperaturas 5, 10 y 20°C y pH 5; sin embargo el mejor resultado se obtuvo a 20°C, donde se presentó una mayor inducción en el proceso enzimático con respecto a la registrada en los controles químicos, las mejores relaciones diastereoisoméricas son las siguientes: mamey 63.22/36.77 por CLAR y 59.13/40.87 por RMN ^1H ; mientras que para durazno 61.87/38.13 y 63.73/36.27 por CLAR y RMN ^1H respectivamente.

Finalmente se demostró que el empleo de diferentes temperaturas y diferentes valores de pH, generan una diferencia en la inducción enzimática, razón por la cual es importante considerar estos factores, ya que son punto clave en la obtención de una mayor pureza óptica en las cianohidrinás generadas.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar estudios de maestría, durante el periodo Enero-2009 a Diciembre-2010 con número de registro 225096.

Al Cuerpo Académico Consolidado: Biocatálisis Aplicada a la Química Orgánica, UAM-X, Laboratorio N-201, UAM-Xochimilco

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Como en toda gran obra es momento de llegar a los agradecimientos, recordando que la ciencia es muy importante en mi vida pero también es importante el corazón por ello quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas que me ayudaron y apoyaron en la realización de este proyecto.

Mamá gracias por tus consejos, tu ejemplo, tu amor incondicional y uno que otro jalón de oreja que siempre valoro y me sigue ayudando a crecer.

Papá gracias por tus reflexiones, consejos, apoyo, comprensión, cariño y por enseñarme que la vida es una ruleta, que si aprendes a manejar cosas buenas sucederán.

A mis Brothers (Oscar, Gustavo y Adrian) porque cada uno de ustedes me ha aportado una cualidad que he podido aplicar en mi desarrollo personal y profesional, los quiero mucho.

A mis cuñadas (Gaby, Blanca, Matzili) y sobrinos (Vale, Lalo y el pequeño Gustavito Jr.), gracias por formar parte de mi vida, por el apoyo, comprensión, cariño y aguantar mi mal carácter, mil gracias.

Al Dr. Norberto y la Dra. Mina primero que nada por su gran sabiduría, su gran pasión por lo que hacen y su infinito apoyo y por ser grandes seres humanos, sus asesorías fueron invaluable en la culminación de este proyecto, son simplemente un gran ejemplo a seguir, Gracias.

A la Dra. Aida, Dra. Julia y Dr. Ernesto por su asesoramiento académico, colaboración y consejos, gracias.

A Marlen por tu cariño, amistad, consejos, enseñanzas y especialmente por ser tan especial y siempre ayudarme a ver la vida de un color muy agradable, siempre estaré agradecido por haberte conocido.

A Conny por tu entera amistad, consejos y brindarme tu apoyo siempre, mil gracias.

A Susana e Isabel, por su sincero apoyo, cariño y magnífica amistad, muchas gracias.

Y a todos mis amigos, Mario, Samuel, Mare, Erik, Diego, Irvin, Lucia, Victorino, Fabián, Fabricio, Sandra, Patricia, Sol, Mary, Ricardo, gracias por su apoyo y amistad.

ÍNDICE

| | |
|---|-------------|
| Resumen | i |
| Agradecimientos institucionales | iii |
| Agradecimientos personales | iv |
| Esquemas | ix |
| Figuras | ix |
| Gráficas | xii |
| Tablas | xiii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Nucleósidos | 3 |
| 2.2 Nucleósidos con actividad farmacológica. | 6 |
| 2.3 Aplicación farmacéutica de los derivados de nucleósidos. | 8 |
| 2.3.1 Antivirales. | 8 |
| 2.3.2 Anticancerígenos. | 10 |
| 2.3.3 Antibióticos. | 11 |
| 2.3.4 Antifúngicos. | 14 |
| 2.4 Inosina. | 17 |
| 2.4.1 Modificaciones químicas en inosina. | 18 |
| 2.5 Estereoquímica. | 20 |
| 2.5.1 Diastereoisómeros. | 21 |
| 2.5.2 Aplicaciones de la formación de diastereoisómeros. | 22 |
| 2.6 Métodos analíticos para la determinación de excesos enantioméricos y diastereoisoméricos. | 23 |
| 2.7 Bioconversión y biocatálisis. | 24 |
| 2.7.1 Ventajas y desventajas de la biocatálisis. | 26 |
| 2.7.2 Biocatalizadores. | 27 |
| 2.7.3 Oxinitrilasas. | 28 |
| 2.8 Cianohidrinas. | 29 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.8.1 | Síntesis química de cianohidrinas. | 30 |
| 2.8.2 | Síntesis biocatalítica de cianohidrinas. | 31 |
| 2.9 | Hidrólisis química de nitrilos. | 33 |
| 2.10 | Oxidación química de alcoholes. | 33 |
| 2.11 | Análisis estadístico de los resultados. | 35 |
| 2.11.1 | Análisis de varianza. | 35 |
| 2.11.2 | Distribución de <i>t</i> de Student. | 35 |
| 2.12 | Formación de un nuevo centro estereogénico y esquema de síntesis a estudiar en este trabajo. | 36 |
| 2.13 | Aplicaciones potenciales de la biocatálisis en la formación de derivados de inosina. | 38 |
| 3. | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 42 |
| 4. | HIPÓTESIS | 43 |
| 5. | OBJETIVOS | 43 |
| 5.1 | Objetivo General | 43 |
| 5.2 | Objetivos Específicos | 43 |
| 6. | MATERIAL Y MÉTODOS | 44 |
| 6.1 | Descripción del Equipo | 44 |
| 6.2 | Reactivos | 44 |
| 6.3 | SÍNTESIS QUÍMICA | 45 |
| 6.3.1 | Síntesis del ácido <i>o</i> -iodoxibenzoico (IBX). | 45 |
| 6.3.2 | Síntesis del 5'-desoxi-2',3'- <i>O</i> -isopropiliden-5'-oxo-inosina (2). | 45 |
| 6.3.3 | Síntesis del 2',3'- <i>O</i> -isopropiliden-5'-ciano-inosina (3). | 46 |
| 6.3.4 | Síntesis del 1-(2',3'- <i>O</i> -isopropiliden- α -L-talofuranosiluronamida) hipoxantina (4). | 48 |
| 6.4 | Síntesis biocatalítica del 2',3'- <i>O</i> -isopropiliden-5'-ciano-inosina (3). | 52 |
| 6.4.1 | Preparación del buffer de cianuro a pH 4 y 5. | 52 |
| 6.4.2 | Preparación del biocatalizador (polvos acetónidos). | 52 |
| 6.4.3 | Síntesis del compuesto 2',3'- <i>O</i> -isopropiliden-5'-ciano-inosina (3) por biocatálisis. | 53 |
| 6.5 | Métodos espectroscópicos empleados para la caracterización e identificación de los compuestos. | 54 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.5.1 | Caracterización por UV-Visible. | 54 |
| 6.5.2 | Caracterización por Infrarrojo. | 54 |
| 6.5.3 | Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear. | 54 |
| 6.6 | Desarrollo de métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). | 55 |
| 6.6.1 | Desarrollo del método analítico por CLAR utilizando columnas no quirales (Fase Reversa). | 55 |
| 6.6.2 | Desarrollo del método analítico por CLAR utilizando columnas quirales (Fase Normal). | 56 |
| 7. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 57 |
| 7.1 | Análisis de resultados del compuesto IBX. | 57 |
| 7.1.1 | Síntesis de IBX. | 57 |
| 7.1.2 | Caracterización por IR del compuesto IBX. | 57 |
| 7.1.3 | Caracterización por UV-Visible del IBX. | 58 |
| 7.1.4 | Caracterización por RMN del IBX. | 59 |
| 7.1.5 | Análisis de IBX por CLAR en fase reversa. | 60 |
| 7.1.6 | Análisis de IBX por CLAR en fase normal. | 61 |
| 7.2 | Caracterización e identificación por IR, UV-Visible y RMN de 2',3'-O-isopropilideninosina (1). | 63 |
| 7.2.1 | Caracterización e identificación por IR de 2',3'-O-isopropilideninosina (1). | 63 |
| 7.2.2 | Caracterización e identificación por UV-Visible de 2',3'-O-isopropilideninosina (1). | 63 |
| 7.2.3 | Caracterización e identificación por RMN de ^1H y ^{13}C de 2',3'-O-isopropilideninosina (1). | 64 |
| 7.3 | Síntesis de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2). | 67 |
| 7.3.1 | Caracterización e identificación por IR de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2). | 69 |
| 7.3.2 | Caracterización e identificación por UV-Visible de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2). | 70 |
| 7.3.3 | Caracterización e identificación por RMN de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2). | 70 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 7.4 | Desarrollo del método analítico por CLAR para 2',3'-O-isopropilideninosina (1) y el 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2). | 73 |
| 7.4.1 | Determinación por CLAR fase reversa de (1) y (2). | 73 |
| 7.4.2 | Desarrollo del método analítico por CLAR fase normal para los compuestos (1) y (2). | 75 |
| 7.5 | Síntesis del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (3). | 77 |
| 7.5.1 | Caracterización e identificación por IR de 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (3). | 78 |
| 7.5.2 | Caracterización e identificación por RMN de 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (3). | 79 |
| 7.5.3 | Análisis del compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (3) por CLAR en fase normal. | 84 |
| 7.6 | Síntesis de 1-(2',3'-O-isopropiliden- α -L-talofuranosiluronamida) hipoxantina (4). | 86 |
| 7.6.1 | Caracterización e identificación por IR de 1-(2',3'-O-isopropiliden- α -L-talofuranosiluronamida) hipoxantina (4). | 87 |
| 7.6.2 | Caracterización e identificación por RMN de 1-(2',3'-O-isopropiliden- α -L-talofuranosiluronamida) hipoxantina (4). | 88 |
| 7.7 | Síntesis biocatalítica. | 91 |
| 7.7.1 | Reacción no enzimática en la formación de cianohidrinás. | 91 |
| 7.7.2 | Reacción utilizando el método A (control químico A). | 92 |
| 7.7.3 | Reacción utilizando el método B (control químico B) a pH 4 y 5. | 94 |
| 7.8 | Proceso biocatalítico. | 100 |
| 8. | CONCLUSIONES | 109 |
| 9. | REFERENCIAS | 111 |

ÍNDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Esquemas

| | |
|---|----|
| Esquema 1. Diagrama de flujo para determinar el método por CLAR en fase normal. | 56 |
|---|----|

Figuras

| | |
|--|----|
| Fig. 1: Clasificación de las bases nitrogenadas. | 3 |
| Fig. 2: Formación de nucleótidos. | 5 |
| Fig. 3: Antibióticos de derivados nucleosídicos. | 8 |
| Fig. 4: Estructura del antiviral 4'-azidocitidina R1479, obtenido de derivados nucleosídicos. | 10 |
| Fig. 5: Compuestos utilizados en el tratamiento de leucemia. | 11 |
| Fig. 6: Análogos de nucleósidos y nucleótidos con propiedades antibióticas. | 13 |
| Fig. 7: Compuestos antibióticos producidos por <i>Streptomyces griseosporus</i> . | 14 |
| Fig. 8: Compuestos antifúngicos. | 15 |
| Fig. 9: Modificaciones químicas a la molécula de inosina en medio ácido o básico. | 19 |
| Fig. 10: Terminología básica de estereoquímica. | 20 |
| Fig. 11: Procedimiento de bioconversión. | 25 |
| Fig. 12: Formación de productos de alto valor agregado a partir de cianohidrinan enantiopuras. | 30 |
| Fig. 13: Métodos de formación de cianohidrinan racémicas y adición nucleofílica de ^-CN a compuestos carbonílicos. | 30 |
| Fig. 14: Reacción reversible de transcianación enzimática para obtener cianohidrinan ópticamente puras. | 32 |
| Fig. 15: Reacción de oxidación para la obtención de aldehídos. | 34 |
| Fig. 16: Ruta de síntesis para la obtención del compuesto 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2). | 37 |
| Fig. 17: Rutas de síntesis para la obtención del compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano inosina (3). | 37 |

| | |
|--|----|
| Fig. 18: Ruta de síntesis para la obtención del compuesto 1-(2',3'-O-isopropiliden α -L-talofuranosiluronamida)-hipoxantina (4). | 38 |
| Fig. 19: Desarrollo de derivados sustituidos en las posiciones 2, 6 y 8 de los nucleósidos de purina. | 39 |
| Fig. 20: Ruta enzimática de derivados de inosina. | 40 |
| Fig. 21: Estructura de AICAR 1 y sus derivados 2–7. | 41 |
| Fig. 22: Preparación del compuesto AICAR a partir del compuesto (1). | 41 |
| Fig. 23: Síntesis para la obtención de IBX. | 45 |
| Fig. 24: Síntesis para la obtención del aldehído (2). | 46 |
| Fig. 25: Síntesis química para la obtención de la cianohidrina (3). | 46 |
| Fig. 26: Síntesis química para la obtención del compuesto (3), empleando ZnI_2 . | 47 |
| Fig. 27: Síntesis química del compuesto (4). | 48 |
| Fig. 28: Síntesis química método 2 para obtener el compuesto (4). | 49 |
| Fig. 29: Síntesis química del derivado acetilado de la cianohidrina (3). | 49 |
| Fig. 30: Síntesis química del derivado acetilado de la amida (4). | 50 |
| Fig. 31: Síntesis química para obtener el compuesto (4). | 51 |
| Fig. 32: Obtención del compuesto (4), empleando ácido 3-cloroperbenzoico. | 51 |
| Fig. 33: Obtención del compuesto (3) por biocatálisis. | 53 |
| Fig. 34: Espectro de infrarrojo del compuesto IBX. | 58 |
| Fig. 35: Espectro UV-Visible de IBX. | 59 |
| Fig. 36: Espectro de RMN de 1H para el compuesto IBX, a 400 MHz. | 60 |
| Fig. 37: Cromatograma de IBX, ácido iodobenzoico y oxone, columna OJ-H, flujo: 1 mL/min., $\lambda = 254$ nm, T= 28°C, hexano: etanol (80:20). | 62 |
| Fig. 38: Espectro de infrarrojo para el compuesto (1). | 63 |

| | |
|--|----|
| Fig. 39: Espectro de UV-visible para el compuesto (1). | 64 |
| Fig. 40: Espectro de RMN ¹³ C para (1), a 400 MHz. | 66 |
| Fig. 41: Espectro de (1). RMN ¹ H en DMSO. | 66 |
| Fig. 42: Espectro de infrarrojo de (2). | 69 |
| Fig. 43: Espectro de UV-Visible de (2). | 70 |
| Fig. 44: Espectro de RMN ¹³ C para (2), en DMSO, a 400 MHz. | 72 |
| Fig. 45: Espectro de RMN ¹ H para (2), en DMSO. | 73 |
| Fig. 46: Cromatograma de (1), empleando el experimento A'3 con un flujo de 0.2 mL/min, teniendo un t _R =8.66 min. | 74 |
| Fig. 47: Cromatograma del compuesto (2), empleando el experimento A'3 con un flujo de 0.2 mL/min. | 75 |
| Fig. 48: Cromatograma de (1), columna OJ-H, flujo 1 mL/min., λ= 260 nm, T= 28°C, hexano:isopropanol (80:20), t _R = 11.71 min. | 76 |
| Fig. 49: Cromatograma del compuesto (2), columna OJ-H, flujo 1 mL/min., λ= 260 nm, T= 28°C, hexano:isopropanol (80:20), t _R = 5.89 min. | 77 |
| Fig. 50: Espectro de IR del compuesto (3). | 79 |
| Fig. 51: Espectro de RMN ¹³ C del compuesto (3) en DMSO, a 400 MHz. | 81 |
| Fig. 52: Espectro de RMN ¹ H del compuesto (3), en DMSO, a 400 MHz. | 82 |
| Fig. 53: Ampliación de espectro de RMN ¹ H del compuesto (3), en DMSO, a 400 MHz. | 82 |
| Fig. 54: Espectro de RMN (gCOSY) del compuesto (3), en DMSO, a 400 MHz. | 83 |
| Fig. 55: Ampliación del espectro de RMN ¹ H del compuesto (3), asignación de los diastereoisómeros. | 84 |
| Fig. 56: Cromatograma del compuesto (3), empleando un flujo de 1mL/min, con una fase móvil hexano:isopropanol (80:20) a 260 nm. | 85 |

| | |
|--|-----|
| Fig. 57: Rutas de síntesis para la obtención del compuesto (4). | 86 |
| Fig. 58: Espectro de IR del compuesto (4), a 72 h de reacción. | 87 |
| Fig. 59: Espectro de RMN ¹³ C para (4), en DMSO, a 400 MHz. | 89 |
| Fig. 60: Espectro de RMN ¹ H para (4), en DMSO, a 400 MHz. | 89 |
| Fig. 61: Esquema general de la síntesis biocatalítica de la cianohidrina (3). | 100 |
| Fig. 62: Cromatograma de la síntesis biocatalítica para el compuesto (3). (1 y 2: Picos utilizados para realizar la determinación del % <i>ed</i>), columna: OJ-H. | 101 |
| Fig. 63: Espectro de RMN ¹ H de la síntesis biocatalítica para el compuesto (3). (1 y 2: señales utilizadas para realizar la determinación del % <i>ed</i>). | 102 |
| Gráficas | |
| Gráfica 1: % <i>ed</i> para el método A, a diferentes temperaturas. | 93 |
| Gráfica 2: Representación de la distribución de datos obtenida del % <i>ed</i> para el método B a pH 4, a diferentes temperaturas. | 96 |
| Gráfica 3: Representación de la distribución de datos obtenida del % <i>ed</i> para el método B a pH 5, a diferentes temperaturas. | 98 |
| Gráfica 4: Comparación entre el % <i>ed</i> por CLAR y RMN ¹ H para los métodos A y B (pH 4 y 5) a diferentes temperaturas. | 99 |
| Gráfica 5: % <i>ed</i> , para el método B y cada biocatalizador a pH 5 y 5°C. | 103 |
| Gráfica 6: Representación del % <i>ed</i> , para cada método y biocatalizador a pH 5 y 10°C. | 104 |
| Gráfica 7: % <i>ed</i> , para el método B y cada biocatalizador a pH 5, 20°C. | 106 |
| Gráfica 8: % <i>ed</i> , para el método B y cada biocatalizador a pH 4 y 5°C. | 107 |

| | |
|--|-----|
| Gráfica 9: % <i>ed</i> , por CLAR y RMN ¹ H, a diferentes temperaturas para los biocatalizadores almendra y mamey a pH 5. | 108 |
|--|-----|

Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación sistemática de las enzimas según la IUBMB. | 28 |
| Tabla 2. Rendimientos de reacción del compuesto IBX. | 57 |
| Tabla 3. Desplazamiento químico en RMN ¹³ C del compuesto IBX. | 59 |
| Tabla 4. Análisis de IBX por CLAR fase reversa. | 61 |
| Tabla 5. Condiciones para el análisis de IBX y de las materias primas por CLAR en fase normal. | 61 |
| Tabla 6. Resultados obtenidos en el experimento C y D para IBX y sus materias primas. | 62 |
| Tabla 7. Desplazamiento en la que se observa cada C en RMN ¹³ C para el compuesto (1). | 65 |
| Tabla 8. Disolventes empleados en la literatura para la oxidación de R-OH con IBX. | 68 |
| Tabla 9. Condiciones de reacción y rendimiento para la síntesis del aldehído (2). | 68 |
| Tabla 10. Desplazamiento químico para RMN ¹³ C para el compuesto (2). | 71 |
| Tabla 11. Condiciones por CLAR fase reversa para compuesto (1) y (2) utilizando la columna XDB-C8. | 74 |
| Tabla 12. Condiciones por CLAR fase normal, utilizando la columna quiral OJ-H para el compuesto (1) y (2). | 76 |
| Tabla 13. Rendimientos para el compuesto (3). | 78 |
| Tabla 14. Desplazamiento para cada carbono, RMN ¹³ C, del compuesto (3). | 80 |
| Tabla 15. Condiciones utilizadas para el análisis del compuesto (3), por CLAR usando la columna quiral OJ-H. | 85 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 16. Desplazamiento para cada carbono, RMN ^{13}C para el compuesto (4). | 88 |
| Tabla 17. Desplazamiento para los hidrógenos, RMN ^1H , para el compuesto (4). | 90 |
| Tabla 18. Relación diastereoisomérica por CLAR, RMN ^1H ; y % de conversión con el método A con 113 h de reacción. | 92 |
| Tabla 19. Promedios del % <i>ed</i> en CLAR y RMN utilizando el método A. | 93 |
| Tabla 20. Relación diastereoisomérica por CLAR, RMN ^1H ; y % de conversión con el método B a pH 4. | 95 |
| Tabla 21. Promedios del % <i>ed</i> obtenida en CLAR y RMN ^1H utilizando el método B, pH 4. | 96 |
| Tabla 22. Relación diastereoisomérica en CLAR, RMN ^1H , y % de conversión con el método B a pH 5. | 97 |
| Tabla 23. Promedios del % <i>ed</i> obtenido en CLAR y RMN utilizando el método B, pH 5. | 98 |
| Tabla 24. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3) en sistemas bifásicos a 5°C y pH 5 con 113 h de reacción, relación sustrato:biocatalizador 1:1. | 103 |
| Tabla 25. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3) en sistemas bifásicos a 10°C y pH 5 con 113 h de reacción, relación sustrato:biocatalizador 1:1. | 104 |
| Tabla 26. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3) en sistemas bifásicos a 20°C y pH5 con 113 h de reacción, relación sustrato:biocatalizador 1:1. | 105 |
| Tabla 27. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3) en sistemas bifásicos a 5°C y pH 4 con 113 h de reacción, relación sustrato:biocatalizador 1:1. | 107 |

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes avances que se derivaron en el siglo XX y que sin duda continuará en este siglo, es el científico-tecnológico en el campo de la salud. En el área de la química, se ha logrado desarrollar e implementar el enriquecimiento de este crecimiento con sus aportaciones en el desarrollo de nuevos compuestos con actividad biológica y con nuevas metodologías que se reflejan en procesos de desarrollo tecnológico, o readaptaciones de los mismos, con un mayor cuidado de la naturaleza. Nuevos compuestos siguen siendo estudiados con aplicación farmacológica en diversos campos, si bien cada día se presentan nuevos retos de salud, se continúan descubriendo compuestos terapéuticos para el combate de dichas afecciones.

Un ejemplo de compuestos a los cuales se les ha atribuido actividades biológicas importantes son los nucleósidos y desde hace algunos años han sido parte de un riguroso escrutinio, dónde se ha demostrado que son eficientes para el tratamiento de algunas enfermedades. Algunos análogos de nucleósidos tienen usos en terapias inmunomoduladoras; contra diversas enfermedades actuando como: antivirales, anticancerígenos, antibióticos, antifúngicos, antihelmínticos, entre otros.^{1,2}

Sin embargo el desarrollo comercial de estos productos está limitado a un pequeño grupo de compuestos; es de destacar que se encuentra en proceso una creciente colección de derivados de nucleósidos con actividad farmacológica³ y se han obtenido grandes avances desde 1987, debido a la ampliación de estrategias y tácticas en síntesis orgánica, en particular la síntesis asimétrica. Por lo tanto, la preparación y tratamiento con estos compuestos será más eficaz, selectivo y no tóxico.

Se ha generado una intensa investigación de los análogos nucleosídicos, ya que parte de la dificultad de los procesos radica en la complejidad molecular que presentan estos compuestos, mostrando con ello dificultad de implementación de los procesos de síntesis orgánica. Como ejemplo de esto se pueden mencionar los

procesos oxidativos, los cuales generan residuos difíciles de manejar o eliminar, sin dejar de lado las reacciones no deseadas, que son comunes debido a su pobre especificidad, además de representar un gasto económico mayor.^{4, 5}

En gran medida la adaptación de técnicas que permitan realizar la síntesis de compuestos con potencial aportación en medicina y que ayuden a reducir los residuos contaminantes, ha conducido a la búsqueda y avance de aplicaciones tecnológicas más eficientes y con un mayor grado de selectividad. Tal es el caso de la biotecnología, disciplina emergente de la que se derivan ramas como las biotransformaciones y biocatálisis; útiles en síntesis orgánica y que han adquirido un papel relevante en el desarrollo de nuevos fármacos y moléculas complejas, difíciles de producir por métodos químicos tradicionales. De este modo el empleo de biocatalizadores abre una nueva vía para el diseño y elaboración de procesos y compuestos más óptimos.⁶

Así, la síntesis de compuestos derivados de nucleósidos que potencialmente poseen actividad biológica será más factible y esto será de gran utilidad para la humanidad. No hay que dejar de lado que para lograr la caracterización y determinación de la composición de estas nuevas sustancias, siempre será importante contar con métodos analíticos eficientes que ayuden a detectar y cuantificar adecuadamente los productos sintetizados, siendo este un tema relevante, permitiéndose así la base de colaboraciones multidisciplinarias.

Con el objetivo de preparar intermediarios quirales para la obtención de nuevos agentes farmacéuticos activos y en la dirección de generar conocimiento para la integración de futuros procesos, a continuación se presentan los resultados alcanzados en el proyecto "Obtención de derivados de nucleósidos de inosina por biocatálisis".

2. ANTECEDENTES

2.1 Nucleósidos

Los nucleósidos son moléculas monoméricas, las cuales forman parte integral de las macromoléculas de ácidos nucleicos, están constituidas por la unión covalente entre una base heterocíclica y una pentosa que puede ser ribosa o desoxirribosa. Algunos ejemplos de nucleósidos son la citidina, uridina, adenosina, guanosina, timidina y la inosina.

Los nucleósidos se clasifican de acuerdo a la base nitrogenada que contienen, siendo esta una base púrica o pirimidínica (**figura 1**), la cual está ligada a través de un enlace covalente β N-glucosídico, ya sea al N-9 de una purina o al N-1 de una pirimidina.

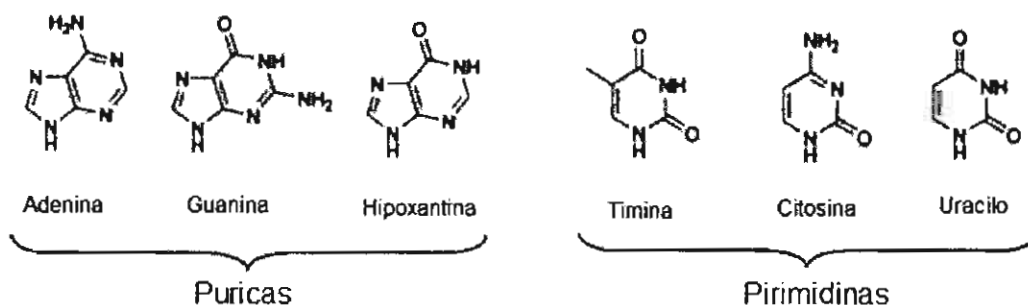


Fig.1: Clasificación de las bases nitrogenadas.

Los nucleósidos que contienen ribosa se llaman ribonucleósidos y los que contienen desoxirribosa son los desoxirribonucleósidos. Los nucleósidos pueden combinarse con un grupo fosfórico (ácido fosfórico: H₃PO₄) mediante determinadas quinasas de la célula, produciendo nucleótidos que son los componentes moleculares básicos del ADN y el ARN. La posición de los átomos en un nucleótido se especifica en relación a los átomos de carbono en la ribosa o desoxirribosa.

El grupo hidroxilo sobre el carbono 3' del azúcar, reacciona con el grupo fosfato del carbono 5' de otro subsiguiente nucleótido para formar la cadena de ADN o ARN.

En resumen un 'nucleótido' es un compuesto monomérico, cuya estructura está dada por el ensamblaje de tres componentes:

Bases nitrogenadas o nitrogenícolos, los cuales derivan de compuestos heterocíclicos aromáticos, la purina y la pirimidina.

Bases nitrogenadas púricas: son la adenina (A) (6-aminopurina) y la guanina (G) (2-amino-6-hidroxipurina). Ambas forman parte del ADN y del ARN.

Bases nitrogenadas pirimidínicas: son la timina (T) (2,6-dihidroxi-5-metilpirimidina o también llamada 5-metiluracilo), citosina (C) (2-hidroxi-6-aminopirimidina) y uracilo (U) (2,6-dihidroxipirimidina). La adenina, guanina, timina y la citosina intervienen en la formación del ADN, mientras que en el ARN aparecen la adenina, guanina, citosina y el uracilo.

Pentosa: El azúcar de cinco átomos de carbono puede ser ribosa (ARN) o desoxirribosa (ADN).

Ácido fosfórico: Cada nucleótido puede contener grupos de ácido fosfórico: uno (monofosfato: AMP), dos (difosfato: ADP) o tres (trifosfato: ATP).⁷

Además de las bases nitrogenadas anteriormente descritas, se han encontrado otras bases nitrogenadas en algunos virus o formando parte de algunos tipos especiales de ARNs. Ejemplos de algunas de estas bases púricas son: hipoxantina, xantina, 2-metiladenina, 6-metilaminopurina. Entre las bases pirimidínicas podríamos citar la 5-metilcitosina (propia del ADN) y la 5-hidroximetilcitosina (HMC). En el ARN de transferencia (ARN-t) que intervienen en el proceso de traducción de proteínas se encuentran la ribotimidina, dihidrouridina, pseudouridina e inosina (I).

La unión del nucleósido con el ácido fosfórico se realiza a través de un enlace de tipo éster entre el grupo OH del carbono 5' de la pentosa y el ácido fosfórico, originando un nucleótido, la numeración de los átomos de azúcar emplea un signo

de prima (por ejemplo, 3'- o 5'-) para distinguir los átomos de azúcar de los de la base heterocíclica, la purina o pirimidina está localizada en el carbono 1' del azúcar y el grupo fosfato se une en el carbono 5' ver **figura 2**. Los nucleótidos son las unidades o monómeros utilizados para construir largas cadenas de polinucleótidos.⁸

- Nucleósido = Pentosa + Base nitrogenada.
- Nucleótido = Pentosa + Base nitrogenada + Ácido fosfórico.
- Polinucleótido = Nucleótido + Nucleótido + Nucleótido + ...

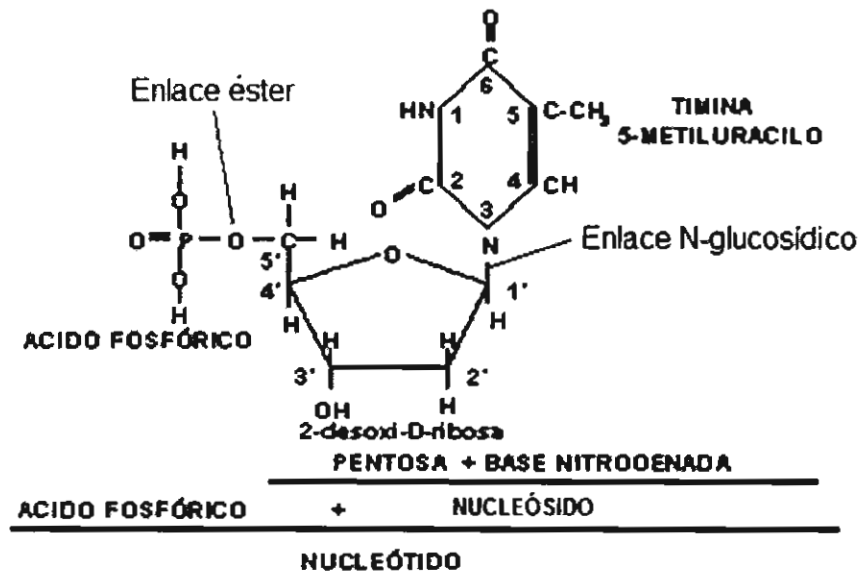


Fig.2: Formación de nucleótidos.

Por lo tanto los nucleósidos son bloques fundamentales para la síntesis de moléculas más complejas en los sistemas biológicos que muestran una amplia gama en la diversidad y actividad biológica. En consecuencia, se han realizado modificaciones tanto en la base heterocíclica y la pentosa residual de azúcar con el fin de evitar los inconvenientes que muestran los análogos de nucleósidos (compuestos no naturales) en ciertas aplicaciones, debido principalmente a la degradación enzimática.

A finales de los 80's, se han sintetizado análogos de nucleósidos, principalmente debido a la aparición de enfermedades tales como el VIH y con mayor urgencia debido a la constante propagación de ésta y de muchas otras enfermedades. Esto ha conducido a una reconsideración de la obtención de análogos con especial atención en la derivatización y síntesis asimétricas, obteniéndose series de derivados complejos de nucleósidos que presentan diversas actividades biológicas.^{3,9}

El trabajo en conjunto de áreas como la química orgánica y la biotecnología, han tomado mayor auge en la actualidad. Las reacciones catalizadas por enzimas o microorganismos se están convirtiendo en los procedimientos estándar para sintetizar compuestos enantioméricamente puros, debido en gran medida a su alta especificidad y eficiencia. Estos catalizadores son baratos y generan menos residuos tóxicos debido a su naturaleza. Por ello es de esperarse que las reacciones biocatalizadas desempeñen un papel cada vez mas importante, sobre todo en la preparación de nuevos centros estereogénicos de compuestos biológicamente activos en los laboratorios de investigación como en la industria farmacéutica.¹⁰

2.2 Nucleósidos con actividad farmacológica

Los nucleósidos y sus análogos han sido ampliamente estudiados, parte de los descubrimientos comenzaron a desarrollarse hace más de 100 años con las investigaciones estructurales de Emil Fischer. La importancia de estas moléculas en la funcionalidad celular fue rápidamente reconocida y debido a esto se desarrollaron investigaciones a partir de la década de 40's, estudiando las bases nitrogenadas y después los nucleósidos en totalidad; teniendo como objetivo el desarrollo molecular de análogos de nucleósidos eficaces en medicina. Así que varios productos farmacológicamente activos, fueron obtenidos de nucleósidos y nucleótidos modificados estructuralmente, que actúan como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivíricos, antitumorales, inmunoestimuladores, inmunosupresores, herbicidas e insecticidas, entre otros.

De este modo es como a través de los últimos 60 años, la investigación ha sido especialmente intensa en la búsqueda de identificar agentes terapéuticos para el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo las infecciones virales, cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades que afectan al sistema nervioso central (SNC).¹¹

El primer análogo descubierto, con aplicación medicinal, fue idoxuridina utilizado principalmente por vía tópica para el tratamiento de herpes simple en 1959; otro ejemplo es el aciclovir (ACV), empleado igualmente para combatir el virus del herpes. El descubrimiento de este compuesto con actividad selectiva, anunció y dejó entrever una nueva etapa en la quimioterapia antiviral y proporcionó una nueva visión en el combate a las infecciones virales (**figura 3**).¹²

Pero el desarrollo no solo se limitó a un cierto grupo farmacológico de compuestos, dada la creciente resistencia bacteriana, las industrias farmacéuticas se vieron obligadas a buscar nuevos medicamentos para el combate de enfermedades bacterianas, parasitarias, micóticas, etc. Así el interés de sintetizar nuevos antibióticos originó el desarrollo de análogos nucleosídicos. A principios de 1970, Moffatt y Emoto, estudiaron la síntesis de polioxinas y nikomicinas derivadas de estos compuestos naturales. Emoto desarrolló una síntesis del antibiótico dipeptidil polioxina J en 1973, tres años más tarde Sorm logró sintetizar la turingiensin, un compuesto utilizado como insecticida y Moffatt en 1982 realizó la síntesis de sinefungin un agente antimicótico, con ellos se iniciaron los primeros esfuerzos en el desarrollo de antibióticos eficaces para contrarrestar diversos padecimientos. A partir de la década de los 80's se incrementó el desarrollo e investigación de derivados de nucleósidos con actividad farmacológica, lográndose la síntesis de moléculas como las que se muestran en la **figura 3**.^{13, 14}

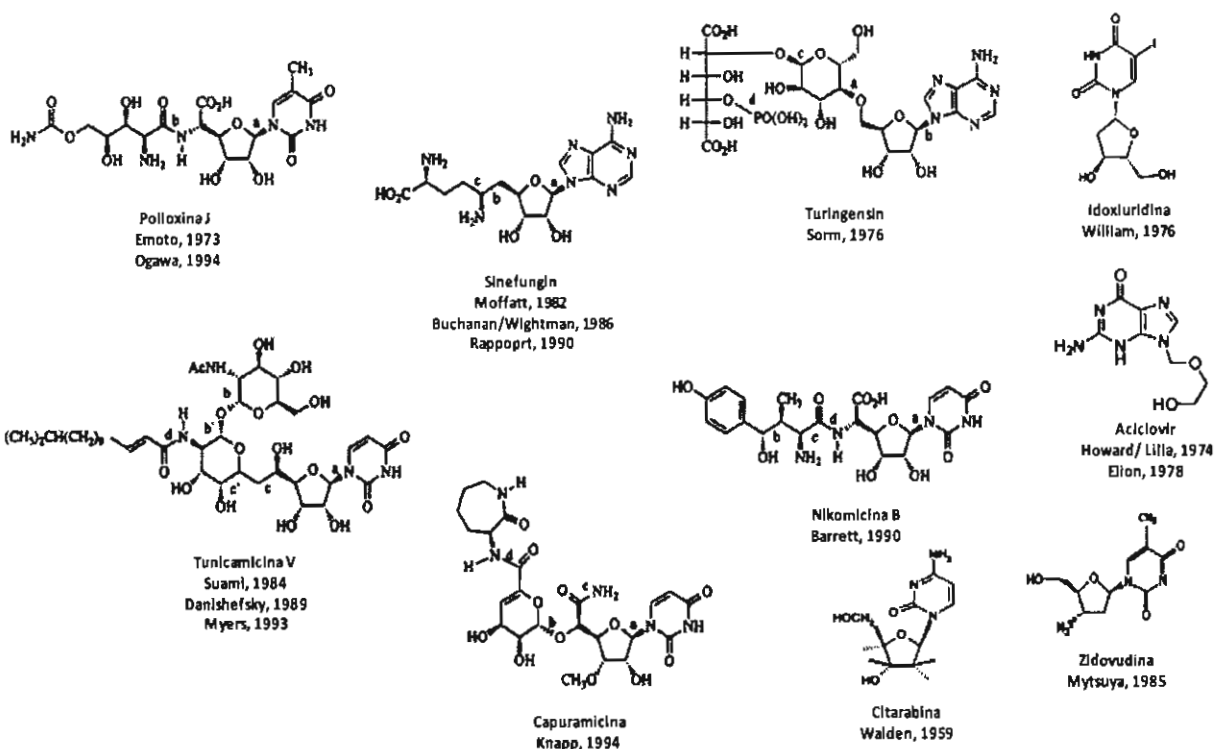


Fig.3: Antibióticos de derivados nucleosídicos.

De especial interés para la sociedad ha sido el desarrollo de los siguientes compuestos antivirales: la zidovudina (AZT) sintetizado por Mitsuya y colaboradores en 1985, utilizado para el tratamiento de la infección por el VIH, y la citosina (citarabina) aprobado por la FDA en 1969 y que ha demostrado ser eficiente en el combate de enfermedades cancerígenas.⁵

2.3 Aplicación farmacéutica de los derivados de nucleósidos

2.3.1 Antivirales

La mayoría de los agentes antivirales que han tenido éxito en medicina, resultado de un bajo perfil de efectos secundarios y a su alta eficacia, son aquellos que están dirigidos a evitar la síntesis enzimática de los virus, dentro de este

grupo de moléculas se encuentran análogos nucleosídicos, representados por grupos de fármacos autorizados para tratar el VIH, la hepatitis B y enfermedades como el herpes.

Los nucleósidos modificados tienen la habilidad de reaccionar como antivirales, interfiriendo con la polimerasa o transcriptasa reversa, inhibiendo la síntesis del ADN viral, por lo tanto actúan como una cadena de terminadores, esta terminación se efectúa al incorporarse la molécula del análogo, después de su fosforilación, a la cadena de ADN, sin embargo un gran número de análogos sintéticos tienen baja actividad o presentan toxicidad excesiva. De ahí la importancia en el desarrollo de nuevos antirretrovirales que logren un tratamiento más eficaz, reducir la toxicidad y proporcionar nuevas opciones terapéuticas.¹⁵

En la actualidad son extensamente utilizados los análogos de nucleósidos como antivirales, tal es el caso del aciclovir análogo derivado de la guanosina, el cual se demostró que era seguro para la administración sistémica, pero con algunos inconvenientes en la formulación; principalmente en la biodisponibilidad que se obtiene al ser administrado por vía oral y con ello una vida media plasmática corta, atribuido especialmente a la baja solubilidad que presentan dichos compuestos. De este modo el empleo de dosis grandes y frecuentes se vuelve un punto importante en la administración de estos compuestos, ya que es necesario mantener la concentración plasmática por encima del umbral preciso para inhibir el virus, representando esta una desventaja. Por lo anterior se busca superarlas, sintetizando derivados de estos compuestos con menores implicaciones estructurales que influyan en una adecuada interacción con el organismo.

El compuesto 4'-azidocitidina R1479, **figura 4**, un nucleósido que ha sido evaluado en la inhibición de la replicación en cultivos celulares, del virus de la hepatitis C (VHC) que es un agente causal de la enfermedad hepática crónica y del cual se estima que existen 170 millones de personas infectadas en todo el mundo, funciona inhibiendo la síntesis de ARN, siendo éste uno de los más potentes y no tiene actividad citotóxica.

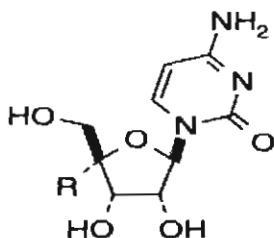


Fig.4: Estructura del antiviral 4'-azidocitidina R1479, obtenido de derivados nucleosídicos.

Los pacientes infectados por el VHC están en riesgo de desarrollar una cirrosis hepática y un posterior carcinoma hepatocelular. Actualmente sólo se dispone de dos procedimientos aprobados para el tratamiento de la infección por VHC, estos tratamientos son el monoterapia con interferón y más recientemente, el tratamiento combinado del análogo de nucleósido ribavirina (virazole) con interfección.^{16, 17}

Otros fármacos como el peniclovir, famciclovir y aciclovir derivados de guanosina, han presentado una elevada eficacia en infecciones de virus del herpes.¹⁸ Finalmente se deben mencionar las contribuciones que estos análogos nucleosídicos aportan en el combate de infecciones provocadas por el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), retrovirus que representa un problema social, para el cual se utilizan diversos compuestos como la zidobudina (3'-desoxi-3'-azidotimidina) y la didanosina (2',3'-didesoxiinosina), análogo nucleosídico de la purina inosina, éste fue el segundo antirretroviral aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) de USA. Presenta un mecanismo de acción más complejo que los nucleósidos pirimidínicos (AZT, ddC, d4T), penetra en la célula por difusión pasiva, actúa inhibiendo la transcriptasa reversa por inhibición competitiva, funcionando como terminador de cadena, bloqueando la elongación, pero en general estos compuestos aún presentan efectos secundarios, mostrando una toxicidad considerablemente alta en las células receptoras.^{15, 19, 20}

2.3.2 Anticancerígenos

Así mismo, se han reportado hallazgos de estos análogos empleándolos para el tratamiento del cáncer, principalmente en el combate de tumores cancerígenos y leucemia. En el tratamiento de la leucemia se incluyen la

cladribina, la fludarabina y en fase de desarrollo clínico esta la clofarabina cuyas estructuras moleculares se muestran en la **figura 5**.

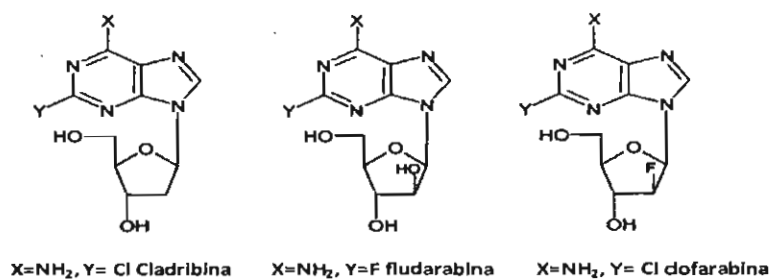


Fig.5: Compuestos utilizados en el tratamiento de leucemia.

Sin embargo estos análogos, al igual que otros agentes nucleosídicos requieren una activación intracelular de la enzima quinasa mediante su forma fosforilada, y de esta manera generar la forma activa del compuesto. Esto debido a que el empleo de dichas moléculas conlleva una gran dificultad en la permeabilidad celular, como ejemplo tenemos la administración concomitante de la fludarabina con un monofosfato libre, simplemente para aumentar la solubilidad de esta molécula en agua y de esta manera favorecer la permeabilidad.²¹

2.3.3 Antibióticos

Los nucleósidos comprenden estructuras complejas y muchas de ellas han demostrado versatilidad al contener diversas funcionalidades, siendo de esta manera interesantes objetivos para diversos grupos de investigación. La inhibición de la biosíntesis de peptidoglicano de una gran cantidad de bacterias, es el lugar donde actúan la gran mayoría de antibióticos, dentro de ellos encontramos a las penicilinas y glucopéptidos. Sin embargo debido a la resistencia emergente de las cepas bacterianas a diversos antibióticos se tiene la necesidad de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos, así es como los antibióticos nucleosídicos son una clase de productos naturales con actividades antibacteriales y resultan ser una alternativa más en el combate de diversas infecciones. Estos compuestos son capaces de inhibir la translocasa I (MraY), enzima involucrada en la biosíntesis de peptidoglicano.¹³ Los nucleósidos con propiedades antibióticas, en general son

clasificados comúnmente en función a su centro estereogénico, objetivo y mecanismo de acción, sin embargo una forma posible de catalogar a los antibióticos de nucleósidos se basa en su esqueleto estructural. Hasta 163 antibióticos nucleosídicos han sido clasificados con base en su estructura, divididos en cuatro grandes grupos que a su vez se subdividen en distintas clases de compuestos que se muestran en la **figura 6**. Sin embargo esta clasificación es convencional, ya que algunos productos presentan características estructurales que están incluidos en más de dos categorías dentro de la clasificación:

1. **Análogos de bases.** Estos compuestos contienen bases heterocíclicas modificadas, ej. 8-azaguanina (A)

2. **Nucleósidos simples:**

2.1. Análogos de adenosina, ej. cordicepina (B)

2.2. Análogos de guanosina, ej. oxanosina (C)

2.3. Análogos de uridina, ej. 2'-azida-2'-deoxiuridina (D)

2.4. Nucleósidos derivados de pirrolopirimidina, ej. tubercidina (E)

2.5. Nucleósidos derivados de tetrahidroimidazodiazepina, ej. cofomicina (F)

2.6. C-Nucleósidos, ej. pirazomicina (G)

2.7. Nucleósidos indólicos, ej. neosidomicina (H)

2.8. Otros. Compuestos que presentan un heterociclo diferente al de cualquier base nitrogenada o que contienen un anillo de azúcar distinto al de ribofuranosa y que además, no están en ninguna otra categoría, ej. neburalina (I)

3. **Acil y glicosil nucleósidos:**

3.1. Sulfamoil nucleósidos, ej. nucleocidina (J)

3.2. 3'-Aminoacil-3'-deoxiadenosinas, ej. lisilaminoadenosina (K)

3.3. 4'-Aminoacil-4'-deoxihexosa (piranosil) citosinas, ej. blasticidina (L)

3.4. Glicosil nucleósidos, ej. capuramicina (M)

3.5. Peptidil nucleósidos, ej. mureidomicina A (N)

3.6. Nucleósidos que contienen un azúcar de cadena larga, ej. ácido octosil A (Ñ)

3.7. Nucleósidos que contienen una cadena de ácido graso, ej. tunicamicina V (O)

4. **Nucleótidos**, ej. agrocina 84 (P)

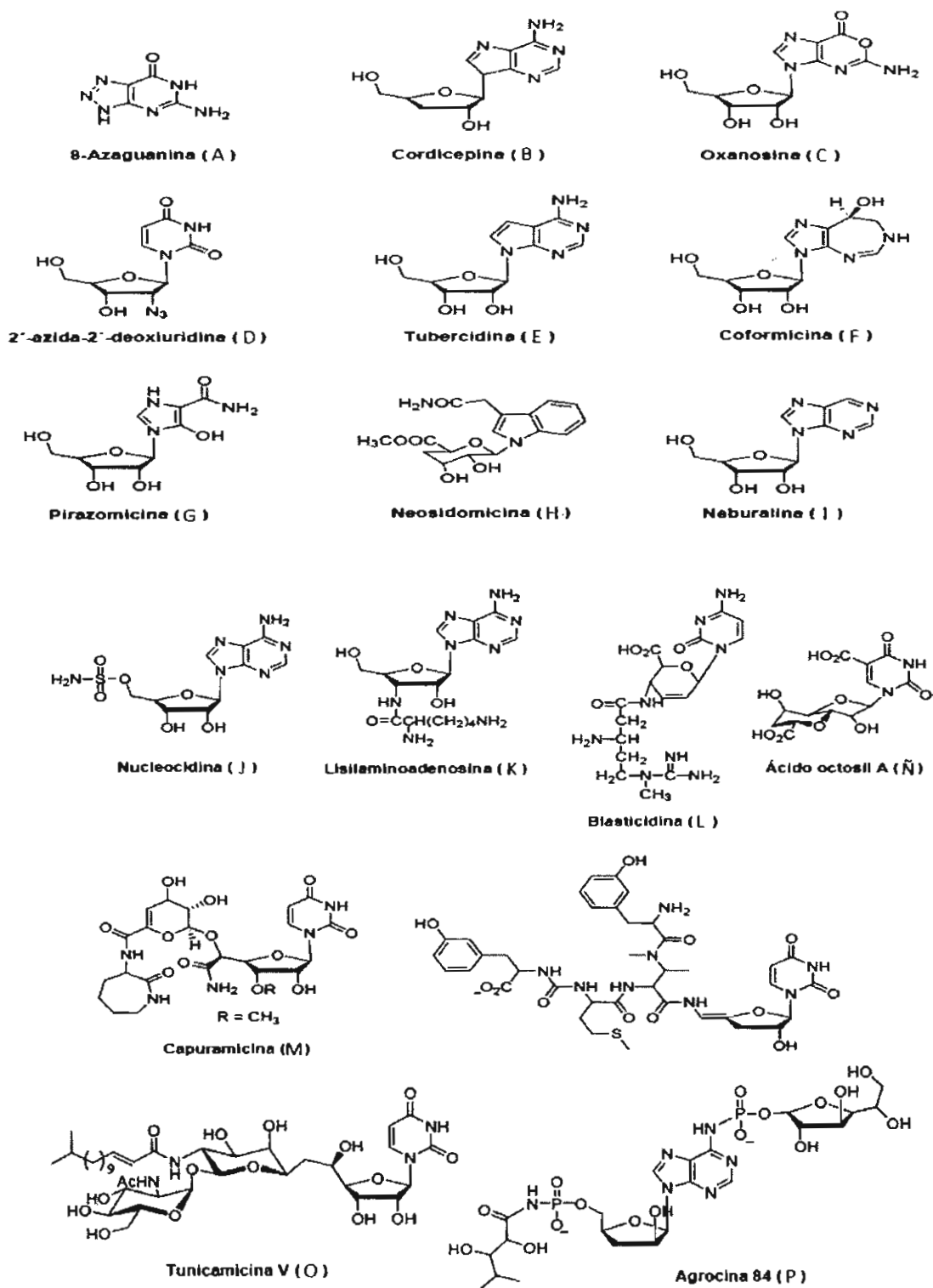


Fig.6: Análogos de nucleósidos y nucleótidos con propiedades antibióticas.

Dentro de esta amplia familia de antibióticos, existe un reducido grupo de compuestos mayormente de tipo peptidil nucleósido y de nucleósidos que contienen una cadena de ácido graso y presentan actividad antimicrobiana, mediante inhibición de la biosíntesis de peptidoglicanos, además, sólo unos pocos, presentan actividad biológica específica para la inhibición de la translocasa I.²² Así se describen este grupo de nucleósidos que estructuralmente tienen relación y los cuales tienen como blanco específico la reacción catalizada por la enzima *MraY*.²³ En la actualidad, existen tres familias representativas de antibióticos que actúan sobre *MraY* y que han sido ampliamente estudiadas, ver **figura 7**. Están constituidas por el conjunto de compuestos que forman las Tunicamicinas (TM) aisladas en 1971 por Takatsuki y Tamura, del caldo de fermentación de *Streptomyces glysosuperificus* nov. sp, las Mureidomicinas (MRDs) aisladas del caldo de fermentación de *Streptomyces flavidoviridens* SANK60486 en 1989 por Isono e Inukai y las Liposidomicinas (LPMs) productos naturales producidos por un hongo aislado de muestras de tierra recogidas en Misaka, Yamanashi-ken, en Japón. Según sus estudios taxonómicos se sabe que pertenece a *Streptomyces griseosporus*.^{24, 25}

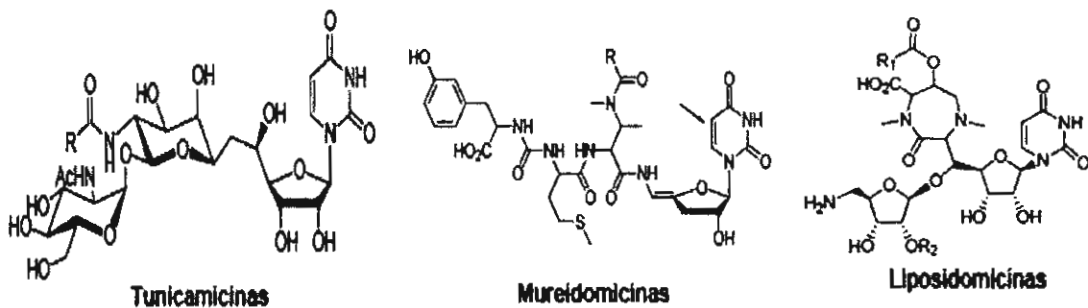


Fig.7: Compuestos antibióticos producidos por *Streptomyces griseosporus*.

2.3.4 Antifúngicos

Otro punto a tratar son las infecciones oportunistas causadas por varios hongos patógenos, las cuales han aumentado progresivamente hasta el grado de

convertirse en un grave problema terapéutico, esto debido principalmente a la creciente resistencia hacia los antimicóticos y en dados casos a su alta toxicidad.²⁶

Los antibióticos complejos peptidil nucleósidos son metabolitos secundarios con gran actividad antifúngica frente a diversos hongos patógenos, esta es otra característica farmacológica a tratar. Así la familia de compuestos acetónidos (2',3'-O-isopropiliden), un grupo protector para *cis*-1,2-dioles, ha demostrado tener útiles características para su empleo en intermediarios para la síntesis de antifúngicos como las polioxinas y nikomicinas.²⁷ Las polioxinas y nikomicinas mostradas en la **figura 8**, son un grupo de antibióticos peptidil nucleósidos, producidos por especies de *Streptomyces* y dichos compuestos inhiben la síntesis de quitina, el segundo polisacárido más común encontrado en la naturaleza y presente en la pared celular de una variedad de hongos fitopatogénicos. Las polioxinas se aislaron por primera vez en la década de 1960 del caldo de fermentación de *Streptomyces cacaoi* encontrándose excelentes fungicidas agrícolas, activos contra varios hongos fitopatógenos incluyendo *Alternaria kikuchiana*, empleándose comercialmente para el control de enfermedades causadas por hongos en frutas y hortalizas, también inhiben la proliferación de *Candida albicans*, un importante patógeno humano en sistemas celulares libres, pero poco activo contra la célula entera. Estas diferencias en actividad son atribuidos a problemas de transporte, lo cual dificulta la entrada de la polioxina a la célula y a la división metabólica intracelular del enlace peptídico, el cual inactiva la molécula.

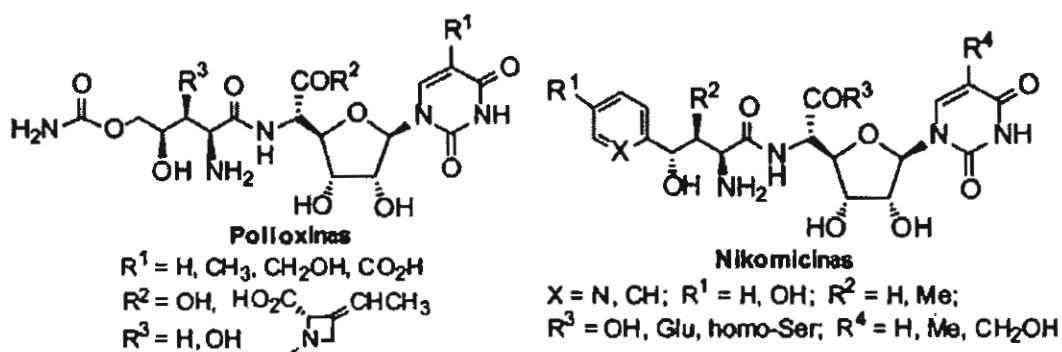


Fig.8: Compuestos antifúngicos.

Posteriormente de otra clase de *Streptomyces* fueron aisladas las nikomicinas, siendo estos compuestos inhibidores selectivos contra diversos hongos entre ellos *Pyricularia oryzae* y *Rhizoctonia solani*.²⁸

Las nikomicinas, denominadas neopolioxinas, están estrechamente relacionadas con las polioxinas (de hecho las nikomicinas X y Z son idénticas a las neopolioxinas A y B).²⁹

Sin embargo un aspecto a considerar de los peptidil nucleósidos es que se han visto comprometidos por su actividad *in vivo*, esto debido a su ineficiente absorción en las células de los hongos. Es indispensable tener una comprensión detallada de la farmacología de estos compuestos, para entender la capacidad y dificultades estructurales, hacia la optimización del antifúngico y mejorar los aspectos farmacodinámicos en la búsqueda de aplicaciones clínicas; en vista de su actividad las nikomicinas y polioxinas siguen siendo punto de enfoque, dónde aun se sigue investigando el proceso de síntesis considerando la estructura-actividad.³⁰⁻³¹ Por lo tanto las sintasas de quitina (CS) son blancos atractivos para las industrias farmacéuticas y agroquímica, debido a su esencial papel en la biosíntesis de quitina en hongos e insectos.³²

El procedimiento usual para la síntesis de derivados de polioxina es la condensación del aminoácido del nucleósido con polioxámicos u otros aminoácidos. El nucleósido se puede obtener por aislamiento y degradación de polioxinas naturales, con la protección adecuada de los derivados de hexosa con bases de pirimidina, y por la elaboración de derivados de uridina 5'-carboxialdehídos.

La generación de un nuevo centro asimétrico por este último procedimiento, da una mezcla de diastereoisómeros, un derivado del ácido β -D-alofuranurónico y un derivado del ácido α -L-talofuranurónico con rendimientos similares. Recientemente se ha reportado la síntesis de α -aminonitrilos por reacción de aldehídos y cetonas con cianuro de trimetilsilano y una amina o amoniaco en metanol. Cuando se usó una amina quiral se logró la generación de un nuevo carbono asimétrico del α -aminonitrilo con estereoselectividad.³³

2.4 Inosina

La inosina es otra purina endógena nucleosídica, la cual es formada durante la ruptura de la adenosina por efecto de la enzima deaminasa de adenosina, es una molécula que se forma cuando la base hipoxantina se une a un anillo de ribosa (también conocido como ribofuranosa) a través de un enlace β -N9-glucosídico. La inosina es uno de los compuestos básicos disponible en las células del organismo. Esta se libera en el espacio extracelular de las células por estrés metabólico o por el sistema nervioso simpático.³⁴ Además interviene en la formación del ácido úrico, el cual se crea para bloquear el efecto de radicales libres tales como el peroxinitrito, agente químico que puede desempeñar un papel determinante en el desarrollo de la esclerosis múltiple (EM).

La inosina también se encuentra como un nucleósido con menor importancia en la transferencia de ARN, debido a que en un par de bases genéticas la inosina se adhiere con la adenina, citosina o uracilo. Este nucleósido es también un eslabón de la cadena de nucleótidos de purina que rigen y son importantes para los movimientos musculares.³⁵ La inosina normaliza el contenido de ATP en la célula, la principal fuente de energía en los procesos celulares, ya que fácilmente penetra la membrana celular. Es favorable, a diferencia de otros nucleósidos de purina (adenosina y guanosina) por el hecho de que no presenta, por ejemplo, un efecto secundario de vasodilatación. Además los derivados de inosina presentan distintos tipos de actividad biológica, por ejemplo, antineoplásicos como la tioinosina.

Es uno de los nucleósidos que se encuentra en menor proporción en los ácidos nucleicos. La inosina 5'-monofosfato (ácido inosínico) se aisló por primera vez del tejido muscular por Liebig en 1874, la inosina atrajo especial atención después de que fue identificada en los anticodones de una serie de tARNs. La producción de inosina se inició después de su uso exitoso en el tratamiento de enfermedades causadas por trastornos a nivel celular y sobre todo en las enfermedades del corazón. Las primeras pruebas o indicios de actividad farmacológica fueron atribuidas a dicho compuesto en la década de 1970, donde

se comenzó a comercializar como suplemento. El empleo que le daban era como potenciador del atletismo y en diversos sitios web se afirma que aumenta la eficacia muscular. Sin embargo los ensayos clínicos no encontraron evidencia significativa de actividad farmacológica que provoque la inosina en la función o crecimiento muscular.

La conformación de la inosina se ha establecido principalmente por rayos X, determinándose de esta forma las longitudes de los enlaces y ángulos presentes en la molécula de inosina. El anillo de purina resultó ser plano, presentando una conjugación que permite la interacción de los electrones π del anillo de purina, pero el átomo de oxígeno del grupo carbonilo y el átomo de carbono en la posición 1, provocan que el azúcar se desvíe de este plano, además cuentan con más de un centro estereogénico generando quiralidad en la molécula, estas características estructurales son importantes ya que son reflejo de la actividad biológica que presentan los nucleósidos, circunstancia que se debe considerar a la hora de trabajar con estas moléculas.^{36,37}

2.4.1 Modificaciones químicas en inosina

La inosina ha sido objeto de varios estudios sobre su modificación química, la dificultad en la modificación química de inosina se encuentra principalmente en la labilidad de su enlace *N*-glucosídico.

Se han elaborado diversas investigaciones del comportamiento de la molécula tanto en medio ácido como básico y a diferentes temperaturas, en un rango de 50 a 140°C. En medio ácido el enlace glucósido se hidroliza dando como resultado la formación de hipoxantina y D-ribosa (**figura 9**). En medio alcalino hay una apertura del anillo en el C-2 con la formación de 5-amino-l- α -D-ribofuranosil-4-imidazolcarboxamida y la isomerización de la fracción ribofuranosa a un residuo piranosilo.

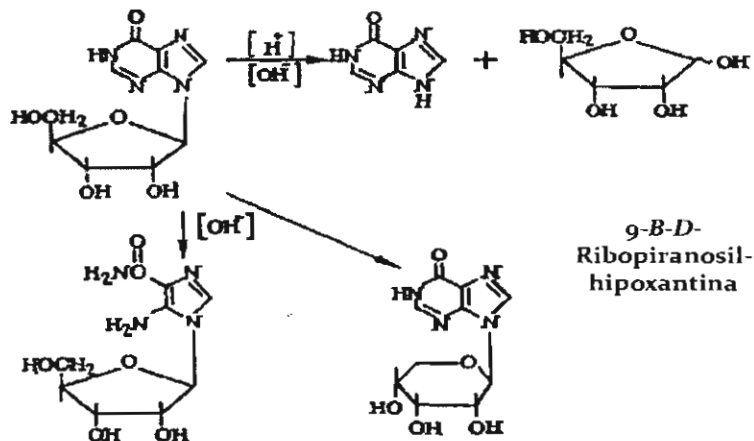


Fig.9: Modificaciones químicas a la molécula de inosina en medio ácido o básico.

La inosina puede ser modificada tanto en la parte del azúcar como en ciertas partes de la base de purina. El comportamiento de la porción de la molécula de ribosa es básicamente el común a todos los ribonucleósidos, por lo tanto con la fosforilación dirigida del grupo hidroxilo primario, se obtiene un importante nucleótido, el 5'-monofosfato de inosina (ácido inosínico), el cual es un valioso compuesto en el metabolismo celular.

Las reacciones de alquilación o acilación de los grupos hidroxilo se utilizan con frecuencia para la introducción de grupos protectores en la parte del azúcar. El *cis*-diol se pueden proteger de manera selectiva por reacción con aldehídos y cetonas en presencia de catalizadores ácidos, para formar acetales o cetales cíclicos de cinco o seis miembros. Esta reacción será aprovechada en nuestra materia prima como grupo protector. Lo anterior permite realizar un buen número de reacciones en medios neutros o básicos sin afectar los necesarios alcoholes.

La molécula de purina de la inosina, es caracterizada por las reacciones de sustitución electrofílica, llevándose a cabo en condiciones bastante suaves. Por lo general estas reacciones se producen en el átomo de N₁ y en el C₈. La mayor atención se ha enfocado a las reacciones de alquilación, ya que fue importante investigar la alquilación de los nucleósidos en esta parte de molécula y para la comprensión de los procesos químicos y bioquímicos que ocurren en la alquilación de los ácidos nucleicos.³⁸

2.5 Estereoquímica

Las publicaciones en el siglo XIX de Van't Hoff y Le Bed, intentando explicar la asimetría molecular, deducida por Pasteur años antes, marcaron el principio de la estereoquímica. Este campo de estudio se define como la parte de la química que estudia las estructuras moleculares en tres dimensiones. Uno de los aspectos de la estereoquímica es el estereoisomerismo, ver **figura 10**; los isómeros (compuestos de igual fórmula molecular) que difieren entre sí solo en la forma en que los átomos están orientados en el espacio son llamados estereoisómeros. La quiralidad es un atributo geométrico, consecuencia de esa orientación de los átomos en una molécula. Una molécula presenta quiralidad cuando no puede superponerse a su imagen especular. Los estereoisómeros de un compuesto quiral se denominan enantiómeros y poseen la misma energía interna. Los estereoisómeros que no son enantiómeros son denominados diastereoisómeros y no poseen la misma energía interna.³⁹

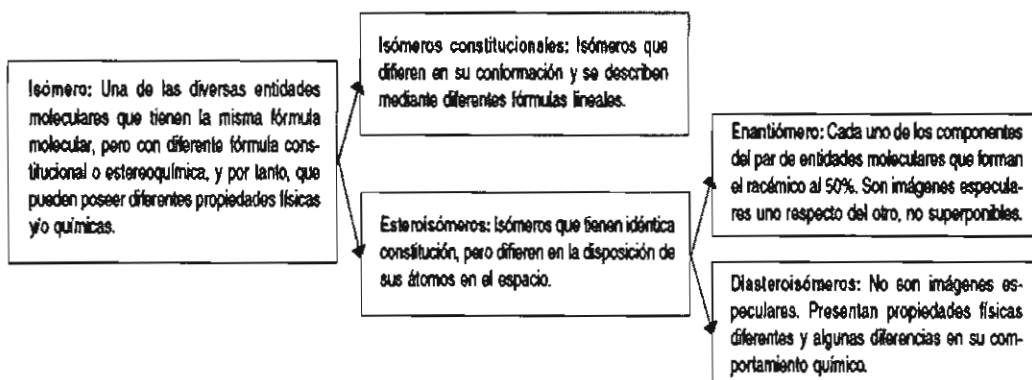


Fig.10: Terminología básica de estereoquímica

El estudio de la disposición espacial de los átomos que componen las moléculas y el cómo afecta esto a las propiedades y reactividad de dichas moléculas se convierte en un punto central. La estereoquímica proporciona conocimientos importantes para la química en general ya sea inorgánica, orgánica, biológica, fisicoquímica o química de polímeros.

Biológicamente, la forma de las moléculas es de importancia para el reconocimiento y funcionamiento de los sistemas enzimáticos. Moléculas con idéntica conectividad en sus átomos pero diferente orientación de ellos en el espacio pueden tener propiedades y efectos muy diferentes.⁴⁰

2.5.1 Diastereoisómeros

Son moléculas que se diferencian por la disposición espacial de los grupos, pero que no son imágenes especulares. Para que dos moléculas sean diastereoisómeros es necesario que al menos tengan dos centros quirales, un centro quiral es un átomo de carbono con cuatro sustituyentes distintos. En uno de los centros los sustituyentes están dispuestos de forma similar en ambas moléculas y en el otro deben cambiar.

Los diastereoisómeros tienen propiedades químicas similares, puesto que son miembros de la misma familia; sin embargo, esas propiedades no son idénticas. En la reacción de dos diastereoisómeros con una sustancia determinada, ni los dos conjuntos de reactivos ni los dos estados de transición son imágenes especulares, por lo que salvo por pura coincidencia no serán de energías iguales. Los valores de las E_{act} serán diferentes, lo mismo que las velocidades de reacción.³⁹

Los diastereoisómeros tienen propiedades físicas diferentes: distintos puntos de fusión y de ebullición, solubilidades en un disolvente determinado, índices de refracción, etc. También difieren en la rotación específica: pueden tener igual o diferente signo de rotación y algunos ser inactivos. En la perspectiva de obtener nuevos fármacos es importante contemplar la configuración estructural debido a que es preferible obtener un estereoisómero puro que una mezcla de los diastereoisómeros. Los análogos de nucleósidos presentan una gran complejidad estructural, lo cual se ve relacionado directamente con la interacción enzimática y la contribución de los efectos farmacológicos.⁴¹

2.5.2 Aplicaciones de la formación de diastereoisómeros

La formación de diastereoisómeros puede ser útil en la resolución de enantiómeros. La inducción asimétrica implica un proceso donde los estereoisómeros posibles de una unidad quiral, se formen en cantidades diferentes. El método empleado para determinar la estereoselectividad de una reacción, es el que resulta de medir el exceso enantiomérico (*ee*), o el exceso diastereoisomérico (*ed*). El caso ideal es cuando se produce sólo uno de los estereoisómeros posibles, a este tipo de reacción se le llama enantioespecífica. En las últimas décadas la inducción asimétrica usando un catalizador en fase homogénea que posea al menos un centro quiral, se ha convertido en una herramienta muy importante para la química orgánica. Este método es conocido como catálisis asimétrica y se basa en el empleo de un auxiliar quiral que promueva la formación de nuevos centros quirales en el producto final, y que dicho producto se obtenga con un exceso enantiomérico en la configuración deseada y que el auxiliar o catalizador pueda ser recuperado sin alteraciones al finalizar la reacción.⁴²

Debido a sus propiedades particulares, los compuestos que poseen centros estereogénicos tienen múltiples aplicaciones tanto en la ciencia como en tecnología que van desde la obtención de fármacos y la preparación de nuevos materiales, hasta su aplicación en catálisis asimétrica. En farmacología las sustancias quirales son muy importantes debido a que los fármacos con actividad biológica actúan en el organismo por medio del reconocimiento molecular, lo anterior significa que los receptores celulares son capaces de diferenciar moléculas muy semejantes que posean algún grupo funcional distinto o distinguir entre isómeros con diferente configuración, reconociendo únicamente al que tiene la estereoquímica adecuada.⁴³

2.6 Métodos analíticos para la determinación de excesos enantioméricos y diastereoisoméricos.

La determinación de configuraciones absolutas de compuestos orgánicos es un importante objetivo tanto de los investigadores en productos naturales como de los dedicados a la síntesis orgánica; en los últimos años, por el marcado interés en el desarrollo de secuencias sintéticas enantioselectivas y por la introducción de un cierto número de fármacos quirales, se incrementó notablemente la necesidad de determinar la composición enantiomérica de los productos sintéticos obtenidos o los productos naturales aislados. A pesar de que el número de productos aislados de fuentes naturales, y provenientes de síntesis asimétricas va en continuo aumento, la disponibilidad de una cantidad suficiente de muestra para la determinación de sus estructuras, incluyendo configuración relativa y absoluta, es en muchos ámbitos cada día menor, de ahí que el empleo de técnicas que permitan un análisis rápido, confiable, no destructivo y que requiera un cantidad mínima de muestra es indispensable en la actualidad.⁴⁴

La meta de una inducción asimétrica es la obtención de uno de los enantiómeros con un gran exceso sobre el otro. Por esta razón después de una reacción lo que se mide es el exceso enantiomérico. Para determinar cuál es el exceso de un enantiómero sobre el otro, se emplean además del método clásico de polarimetría, nuevos métodos: a) Cromatográficos con columnas quirales y b) De resonancia magnética nuclear (RMN). El desarrollo de métodos alternativos a la polarimetría se debe a las limitaciones que esta presenta.

En función de lo anterior, es necesario señalar que tanto los métodos cromatográficos como los de RMN han demostrado ser muy eficientes en la determinación del exceso enantiomérico. Mientras que los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) o cromatografía de gases (CG), utilizan columnas quirales para la separación de los enantiómeros, los métodos de espectroscopía de RMN están basados en el empleo de reactivos de desplazamiento denominados CSR (Chiral Chemical Shift) por sus siglas en Inglés.⁴⁵

2.7 Bioconversión y biocatálisis

La obtención de enantiómeros ópticamente puros de intermediarios quirales ha tomado mayor importancia en el desarrollo de ingredientes farmacéuticos activos. La generación de enantiómeros puros puede ser producida por compuestos químicos o síntesis químio-enzimática. La biocatálisis a menudo ofrece ventajas sobre la síntesis química, por el hecho de que las reacciones catalizadas por enzimas son a menudo altamente enantioselectivas y regioselectivas, se llevan a cabo a temperatura ambiente y a presión atmosférica, evitando así el uso de condiciones más extremas que pueden causar problemas como: isomerización, racemización o epimerización. Las células microbianas y las enzimas aisladas pueden ser inmovilizadas y ser a su vez reutilizadas durante varios ciclos. Además, las enzimas pueden ser sobre expresadas para que los procesos biocatalíticos sean económicamente más eficientes. Así las herramientas de biología molecular, incluyendo intercambio de genes y la evolución dirigida de biocatalizadores, puede conducir a una mayor actividad enzimática, selectividad y estabilidad.⁴⁶ La biocatálisis es una tecnología clave en la síntesis de productos químicos y farmacéuticos ópticamente puros, compuestos farmacológicamente activos desarrollados mediante incorporación de métodos de síntesis biocatalíticos están involucrados en el tratamiento de enfermedades como el VIH, las enfermedades del corazón, cáncer, diabetes e infecciones bacterianas como la tuberculosis.

En el siguiente diagrama de flujo, una bioconversión se da por la participación del biocatalizador (células microbianas, vegetales y animales, o enzimas aisladas) este método consiste en la producción del biocatalizador seguida de su uso en la reacción de interés y la posterior purificación del producto ver **figura 11**.⁴⁷ La implementación de un nuevo proceso de bioconversión, por lo tanto, requiere de una cuidadosa selección del biocatalizador y la metodología de purificación durante el desarrollo del proceso.

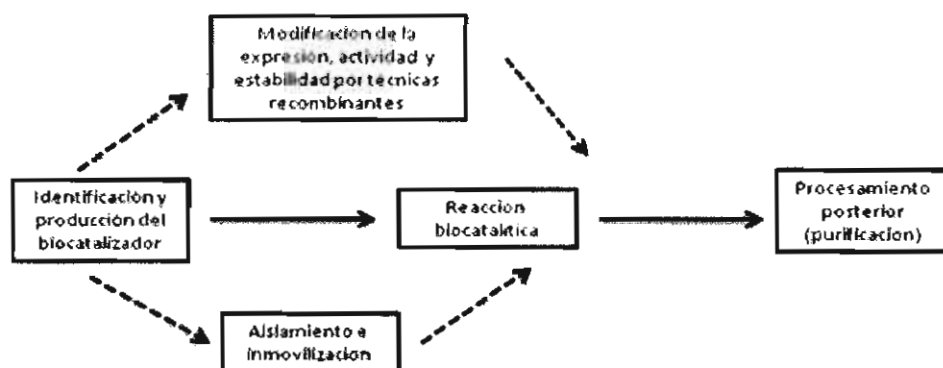


Fig.11: Procedimiento de bioconversión.

En el diagrama, las flechas continuas representan los pasos involucrados en un proceso que utiliza un biocatalizador con células completas. Las flechas punteadas indican las opciones para el uso de un biocatalizador enzimático aislado o mejora de los biocatalizadores (células completas o enzima aislada) por técnicas genéticas.

La síntesis de fármacos quirales está ganando más importancia a medida que se van elucidando nuevos conocimientos sobre las propiedades individuales de sus enantiómeros. En algunas circunstancias (el costo prohibitivo o la falta de un catalizador quiral adecuado) la biocatálisis asimétrica, utilizando ya sea enzimas aisladas o células completas, puede ser útil para la preparación de bioconversiones quirales.⁴⁸ Las biotransformaciones también han encontrado aplicación en la preparación de compuestos donde la transformación química es, hasta ahora, imposible. Adicionalmente, cuando el biocatalizador, el microorganismo o bien la enzima aislada, están inmovilizados son susceptibles de ser reutilizados sin presentar una pérdida de sus propiedades catalíticas. Además, las enzimas libres pueden estar en solución, en un reactor de membrana, como suspensión, "cross-linked" o inmovilizadas. El medio de reacción puede ser acuoso, orgánico o en dos fases.^{49, 50}

2.7.1 Ventajas y desventajas de la biocatálisis

Ventajas

- Son más amigables con el ambiente (generalmente se llevan a cabo en medios acuosos, los desechos son biodegradables).
- Condiciones suaves de reacción (generalmente se llevan a temperatura ambiente y presión atmosférica, con un consumo energético mínimo).
- Combinación de reacciones (se puede llevar a cabo más de una reacción en el mismo proceso de biotransformación, utilizando un microorganismo con un adecuado sistema enzimático, o mediante conversiones escalonadas utilizando diferentes microorganismos).
- Especificidad del sustrato (las enzimas catalizan solamente la transformación de un tipo de sustrato).
- Quimioselectividad: es la reacción preferencial de una enzima sobre uno de dos o más grupos funcionales diferentes.
- Especificidad de sitio (regio-especificidad): una reacción enzimática regio-selectiva es aquella en la cual la formación o ruptura de un enlace ocurre preferencialmente sobre todos los otros sitios posibles.
- Estereoespecificidad: en presencia de una mezcla racémica como material de partida, solamente un enantiómero es convertido.
- Las biotransformaciones también encuentran aplicación en la preparación de algunos compuestos en los que la transformación química, por el momento, no son viables.
- Permite llevar a cabo diferentes reacciones químicas sin la necesidad de pasar por etapas de protección y desprotección.⁵¹

Desventajas

- El empleo de altas diluciones y el uso de cofactores costosos.
- Limitada estabilidad térmica y su incompatibilidad con algunos disolventes orgánicos.

- En algunos casos los procesos de biotransformación tienen rendimientos bajos.
- Altos costos de implementación de los procesos a escala industrial.⁴

2.7.2 Biocatalizadores

Como ya se mencionó, las enzimas son catalizadores biológicos por ello son capaces de catalizar y de favorecer diversas reacciones que son utilizadas para la síntesis, modificación y degradación de una gran diversidad de compuestos orgánicos. Cada enzima tiene un mecanismo de acción único, los sustratos se encuentran en concentraciones miles de veces mayores que las de la enzima en una reacción típica, de este modo, cada molécula de enzima cataliza la conversión en producto de varias moléculas de sustrato. La región en donde se lleva a cabo el acoplamiento y así mismo la catálisis es denominado centro activo y la unión con el sustrato da origen a la formación del complejo enzima-sustrato (ES) y el sustrato es convertido a producto. La conformación estructural enzimática es determinante para que se lleve a cabo la unión en el centro activo con el sustrato. Cambios de temperatura, pH o salinidad, provocan la desnaturalización de la enzima y con ello pérdida de funcionalidad.^{52, 53}

En el centro activo se efectúan diferentes tipos de reacciones tales como la formación de uniones carbono-carbono, enlaces tipo éster, saturación e insaturación de enlaces carbono-carbono, reacciones de oxidación, entre otras, las cuales dependen del tipo de enzima y el sustrato en cuestión. Cuando se lleva a cabo la reacción, se libera el producto del centro activo y la enzima queda disponible para unirse a otra molécula de sustrato e iniciar nuevamente el proceso, por lo tanto como las enzimas no se consumen en el proceso, es decir se reutilizan, la cantidad que se requiere es muy baja.

La **tabla 1** resume, de un modo general, el sistema de clasificación de enzimas normalizado por la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Para la clasificación completa de un biocatalizador, además de

la nomenclatura descrita, se deberá indicar la fuente de la enzima y el soporte si se encuentra inmovilizada.⁵⁴⁻⁵⁶

Tabla.1. Clasificación sistemática de las enzimas según la IUBMB.

| Clase | Reacción que catalizan | Subclase |
|--------------------------|--|---|
| EC 1 oxidorreductasas | Oxidaciones, reducciones | Indica grupo oxidado en el dador de hidrógeno |
| EC 2 transferasas | Transferencia de grupo funcional | Indica el grupo que se transfiere |
| EC 3 hidrolasas | Hidrólisis | Indica el tipo de enlace que se hidroliza |
| EC 4 liasas | Adición/eliminación no hidrolítica | Indica el enlace que se forma o rompe |
| EC 5 isomerasas | Isomerizaciones | Indica el tipo de isomerización |
| EC 6 ligasas | Formación de enlaces con consumo de ATP | Indica el tipo de enlace que se forma |

Las enzimas se pueden usar de dos formas:

- 1.- Enzimas aisladas: enzimas purificadas o inmovilizadas sobre diversos soportes, lo cual permite emplear medios con una mínima cantidad de agua, haciéndose así posible el uso de una mayor variedad de sustratos.
- 2.- Células completas: al emplear este método se dispone como ventaja que los cofactores son reciclados por el propio sistema celular. La principal limitación reside en la necesidad de que el sustrato sea soluble en medios acuosos y sea captado al interior de la célula. Además de que no se requiere, en este caso, de la purificación de enzimas que generalmente representa costos elevados.⁵⁷

2.7.3 Oxinitrilasas

Dado que se desea formar una unión C-C se emplean liasas, las cuales son enzimas que forman enlaces por mecanismos distintos a la hidrólisis o la oxidación. En este caso las mas empleadas son las oxinitrilasas las cuales tienen la capacidad de incorporar cianuro de hidrógeno en aldehídos, cetonas y metilcetonas, para dar α -hidroxinitrilos enantiopuros (cianohidrininas), las cuales son

intermediarios importantes en la síntesis de compuestos con actividad biológica como fármacos y agroquímicos.

Las enzimas conocidas como oxinitrilasas o hidroxinitrilasas han sido encontradas en varias plantas, algunas inducen a la obtención de (*R*)-cianohidrininas como son las: almendras, lino, manzana, cereza, durazno y ciruela, pero existen otras variedades que generan la formación de (*S*)-cianohidrininas como son: la mandioca, caña, sauco negro, sorgo, hongo de la corteza y árbol de caucho. La actividad catalítica es muy dependiente del pH del medio de la reacción, con un óptimo a pH 5.5; se ha demostrado que la reducción del pH del medio de reacción o el empleo de disolventes orgánicos disminuye la biocatálisis de la adición del ión cianuro, pero aunque presente una reducción se muestra una alta enantioselectividad.^{58, 59}

Hasta hace poco, la única fuente de oxinitrilasas eran los productos naturales ya indicados. Sin embargo, las enzimas aisladas de *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* y *Linum usitatissimum* se han logrado sobre expresar exitosamente en varios microorganismos, logrando corroborar la catálisis en la formación de (*S*)-cianohidrininas.⁶⁰

2.8 Cianohidrininas

Las cianohidrininas o α -hidroxinitrilos son compuestos de carácter multifuncional por lo que ofrecen una amplia variedad de posibilidades sintéticas, siendo precursores de un gran número de productos de alto valor agregado ver **figura 12**. Ocupan un lugar importante en disciplinas como la química y la biología. Por un lado, las cianohidrininas tienen un considerable potencial como bloques de construcción quirales en la síntesis orgánica y por otro, con los hallazgos de la historia enzimática se ha demostrado que es una de las primeras moléculas en la tierra prebiótica, lo anterior ha aumentado nuestra comprensión y permitido la producción y utilización de cianohidrininas enantioméricamente enriquecidas.⁴¹

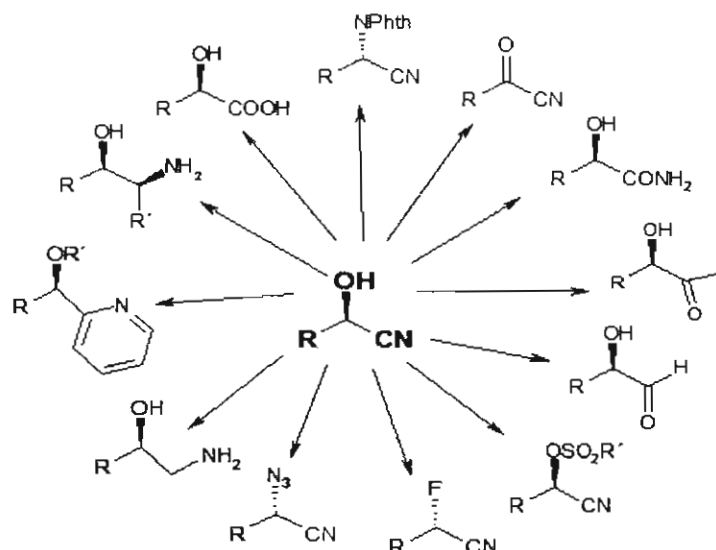


Fig.12: Formación de productos de alto valor agregado a partir de cianohidrinas enantiopuras.

2.8.1 Síntesis química de cianohidrinas

La adición de ión cianuro a aldehídos o cetonas produce α -hidroxinitrilos o cianohidrinas. Mientras que la adición directa de HCN es comúnmente utilizada en la industria, otros métodos también son utilizados, sobre todo a nivel laboratorio, ver figura 13.

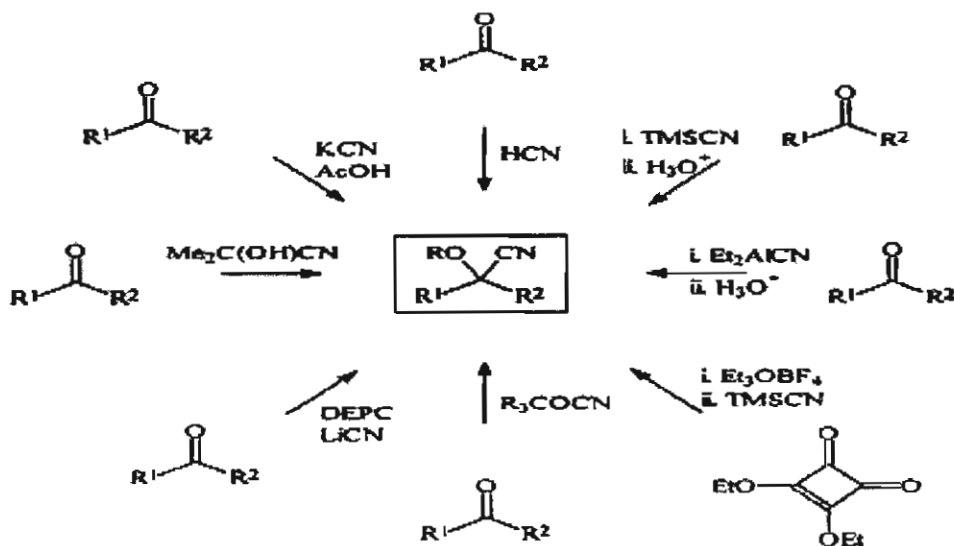


Fig.13: Métodos de formación de cianohidrinas racémicas y adición nucleofílica de $^{\ominus}CN$ a compuestos carbonílicos.

Las anteriores reacciones de preparación de cianohidrinas son las más comunes:

- 1) Adición de una solución acuosa de la sal del cianuro a una solución del sustrato en ácido acético.
- 2) Reacción con cianuro de trialquilsilanos, para producir derivados de cianohidrinas O-sililtrialquiladas. En esta reacción se emplean como catalizadores yoduro de zinc, la cianohidrina protegida se lava con HCl.
- 3) Éter corona-18 con cianuro de potasio.
- 4) A través de una transcianación, que se lleva a cabo a partir de la cianohidrina de la acetona en condiciones básicas, se cataliza la descomposición de la cianohidrina de la acetona a propanona y ácido cianhídrico, lo que permite formar una nueva cianohidrina. Se ha encontrado recientemente que los alcóxidos de lantano (III) son catalizadores efectivos para esta reacción, posiblemente debido a su carácter fuertemente básico.

Con bases y ácidos de Lewis en la reacción de trialquilsililcianación, se pueden obtener cianohidrinas protegidas con una variedad de compuestos carbonílicos, incluyendo cetonas impedidas estéricamente, compuestos α,β -insaturados, cetonas fácilmente enolizables y cetonas sensibles a ácidos.

Existen otros métodos empleados para la preparación de cianohidrinas pero sin embargo estos son usados con menor frecuencia.⁶¹

2.8.2 Síntesis biocatalítica de cianohidrinas

Como ya se ha comentado en la reacción de transcianación, la cual consiste en la utilización de la cianohidrina de la acetona como fuente de cianuro en la síntesis de cianohidrinas, existe la posibilidad de realizar la reacción mediante biocatálisis, empleando oxinitrilasas y obteniendo cianohidrinas quirales.

Esta reacción es un proceso reversible que consta de dos pasos, ver **figura 14**, en el primero se produce la liberación de ácido cianhídrico desde la

cianohidrina de la acetona y en el segundo, éste se consume en la formación de la cianohidrina ópticamente activa a partir del correspondiente aldehído ó cetona.

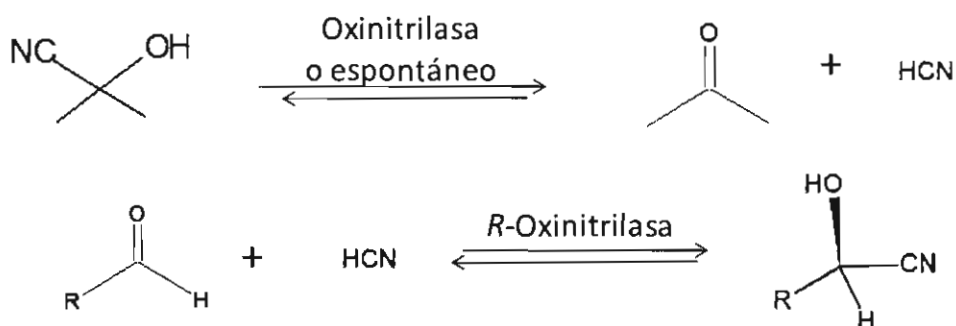


Fig.14: Reacción reversible de transcianación enzimática para obtener cianohidrinás ópticamente puras.

En este equilibrio, la concentración de ácido cianhídrico es crítica, debe ser lo suficientemente alta como para generar una reactividad razonable en el proceso, pero un gran exceso de ácido cianhídrico provocaría la adición espontánea (química) no la enzimática, con lo cual disminuiría la selectividad de la reacción de adición e incluso podría producirse la inhibición de la enzima. La velocidad de formación de ácido cianhídrico a partir de la cianohidrina de la acetona se incrementa al aumentar el pH del medio, por lo que el control del pH va a ser fundamental para el desarrollo de las reacciones de transcianación.

En los sistemas bifásicos, donde se llevan a cabo las reacciones de transcianación enzimática, tanto los sustratos como los productos van a estar repartidos entre la fase orgánica y la fase acuosa. Este reparto va a tener influencia en la pureza óptica de las cianohidrinás obtenidas. Experimentalmente es conocido que los excesos enantioméricos de las cianohidrinás son menores a mayor carácter hidrofílico del aldehído de partida, pues cuanto mayor sea el contacto con la fase acuosa, mayor será la adición no enzimática de ácido cianhídrico.⁶²

La adición de HCN a un compuesto carbonílico catalizada por oxinitrilasas, para la obtención de cianohidrinás ópticamente puras, es un proceso de interés farmacéutico.⁶³

2.9 Hidrólisis química de nitrilos

La hidrólisis de nitrilos es el método más usado para la obtención de amidas o ácidos carboxílicos, las amidas pueden considerarse como derivados acilados del amoníaco o de aminas. Los métodos clásicos para preparar una amida, es la hidrólisis empleando condiciones ácidas (p.ej. H_2SO_4) o básicas (p.ej. KOH) dando una reacción irreversible.⁶⁴

La hidratación de nitrilos ha tomado un gran auge tanto en la industria como en farmacología, debido en gran parte a los derivados activos que se obtienen.⁶⁵ Sin embargo se debe tener en cuenta las complicaciones que conlleva la obtención de la amida por hidrólisis, ya que se presenta la posibilidad de formar el ácido no deseado y el empleo de condiciones de reacción ácida o básica extremas. Se han reportado diversos procedimientos para evitar la hidrólisis de la amida, sobretodo empleando combinaciones ácidas, otras técnicas incluyen el empleo de agentes oxidantes a temperatura ambiente como el H_2O_2 en medio orgánico (DMSO). Sin embargo los rendimientos obtenidos suelen ser bajos y los tiempos de reacción son muy largos.⁶⁶

2.10 Oxidación química de alcoholes

La oxidación de un alcohol implica la pérdida de uno o más hidrógenos del carbono enlazado al grupo -OH. El tipo de producto que se genera depende del número de hidrógenos que tiene el alcohol, es decir, si es primario, secundario o terciario. Los alcoholes primarios dan aldehídos o ácidos carboxílicos, y los alcoholes secundarios producen cetonas, mientras que por otro lado los alcoholes

terciarios no reaccionan con la mayor parte de los agentes oxidantes, ver **figura 15**.

Entre los agentes más comunes que se utilizan a nivel laboratorio se encuentran los cromatos (CrO_3 , $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), o permanganato de potasio (KMnO_4), sales de Ni^{2+} y Co^{2+} en NaOCl ; aire sobre Ag_2O en medio alcalino; H_2O_2 en medio alcalino, entre otros.^{67, 68}

La generación del respectivo aldehído es realizada con la finalidad de formar un grupo carbonilo, ($\text{C} = \text{O}$), uno de los grupos funcionales más importantes y versátil en química orgánica.

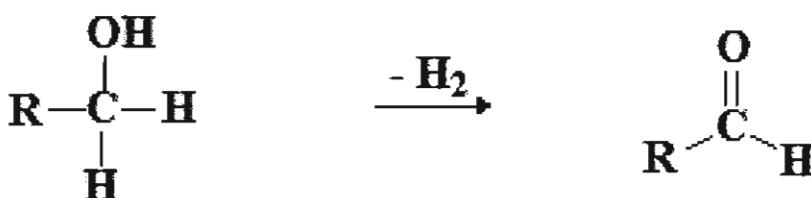


Fig. 15: Reacción de oxidación para la obtención de aldehídos.

Se presenta el problema con los alcoholes primarios de que el aldehído se oxida con facilidad al ácido correspondiente.

El ácido 2-iodoxibenzoico (IBX) ha atraído una gran atención principalmente por su utilidad sintética como oxidante, aspecto que fue reportado en 1994 por Frigerio y Santagostino.⁶⁹ El IBX ha sido ampliamente empleado en síntesis orgánica como reactivo altamente selectivo y con condiciones de reacción suaves para la oxidación de alcoholes a compuestos carbonílicos, así como para una gran variedad de transformaciones oxidativas sintéticamente útiles. Siendo este compuesto el representante más importante del yodo pentavalente, fue preparado por primera vez en 1893 por Hartman y Mayer. Inicialmente fue obtenido a partir del ácido 2-iodobenzoico con bromato de potasio, pero esto le confería un carácter altamente explosivo. En 1999 se reportó un método práctico y seguro para su preparación empleando para ello el ácido 2-iodobenzoico y peróxido de hidrógeno a 70°C .⁷⁰ Los aldehídos dan adiciones nucleofílicas con mayor facilidad que las correspondientes cetonas y es la reacción más característica de este tipo de

compuestos y la adición de ión cianuro, catalizada por ácido, se emplea para generar cianohidrininas y sus derivados.

2.11 Análisis estadístico de los resultados

2.11.1 Análisis de varianza.

En la mayoría de los experimentos se estudia el efecto de una o más variables independientes sobre una respuesta. Las variables independientes controlables en un experimento reciben el nombre de factores, y el nivel de intensidad de un factor se denomina nivel del factor.

Como el nombre lo indica, el procedimiento de análisis de varianza o ANOVA (del Inglés analysis of variance) consiste en analizar la variación que hay en un conjunto de respuestas y asignar porciones de esta variación a cada conjunto de variables independientes. Esto implica que las variables de respuesta cambian como consecuencia de la variación de un conjunto de variables independientes, algunas de valor desconocido. El objetivo del análisis de varianza consiste en localizar las variables independientes importantes y determinar cómo afectan la respuesta.

En el procedimiento del análisis de varianza se divide la suma de los cuadrados de las desviaciones, denominada suma total de los cuadrados de las desviaciones, en partes, cada una de las cuales se atribuye a una de las variables independientes del experimento y se añade un residuo relacionado con el error aleatorio.

2.11.2 Distribución de t de Student.

Se le denomina distribución de t , a las distribuciones de medias en las que se emplea la desviación estándar de la muestra. Al igual que con la distribución normal estándar o distribución z , la distribución t también es simétrica, pero su

desviación estándar es amplia. El tamaño exacto de una desviación estándar depende de un concepto complejo, relacionado con el tamaño de la muestra llamado grados de libertad, el cual se relaciona con el número de veces que se usa la información de la muestra. Debido a que esta se usa una sola vez para estimar la desviación estándar.

Las hipótesis o suposiciones para aplicar la *t* de Student son que en cada grupo la variable estudiada siga una distribución normal y que la dispersión en ambos grupos sea homogénea (igualdad de varianzas). Si no se verifica que se cumplen estas premisas los resultados de la prueba *t* de Student no tienen ninguna validez. Por otra parte no es obligatorio que los tamaños de los grupos sean iguales, ni tampoco es necesario conocer la dispersión de los dos grupos.⁷¹

2.12 Formación de un nuevo centro estereogénico y esquema de síntesis a estudiar en este trabajo.

El desarrollo de derivados nucleosídicos útiles para la síntesis de compuestos farmacológicamente activos representa un avance tecnológico importante; la generación de un nuevo centro estereogénico en una molécula que ya posee centros quirales, incrementa el número de estereoisómeros. Por ello es importante desarrollar procedimientos sintéticos para lograr una inducción asimétrica, hemos seleccionado a la biocatálisis para inducir el enriquecimiento de alguno de los estereoisómeros o bien, en el mejor de los casos, la obtención de sólo uno de ellos. Es muy significativo el desarrollar la obtención de intermediarios óptimamente puros en la búsqueda de derivados de nucleósidos de inosina, por vías químio-enzimáticas, así como el desarrollar los métodos analíticos que ayuden a detectar y cuantificar a dichos compuestos.⁷²

Partiendo del compuesto 2',3'-*O*-isopropilideninosina (**1**), se buscara generar un nuevo centro estereogénico en la molécula. Planteándose la siguiente ruta de síntesis a explorar, para ello el compuesto (**1**) será oxidado al aldehído correspondiente, ver **figura 16**, el compuesto cuenta con cuatro centros quirales

preestablecidos y se estudiará la formación de un nuevo centro estereogénico, y estos diastereoisómeros se analizarán para ver con qué porcentaje de exceso diastereoisomérico (% ed) se logra inducir, vía una biocatálisis, por lo que será necesario también el estudiar el porcentaje de producto obtenido por síntesis química.

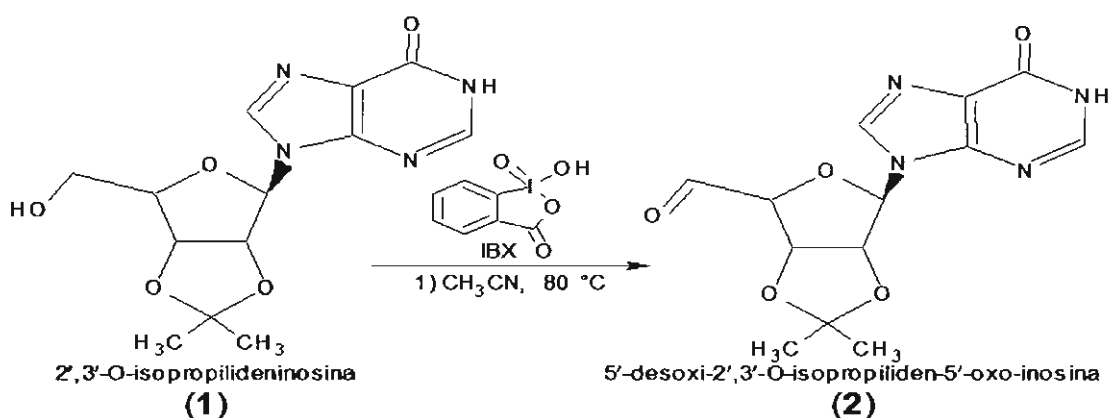
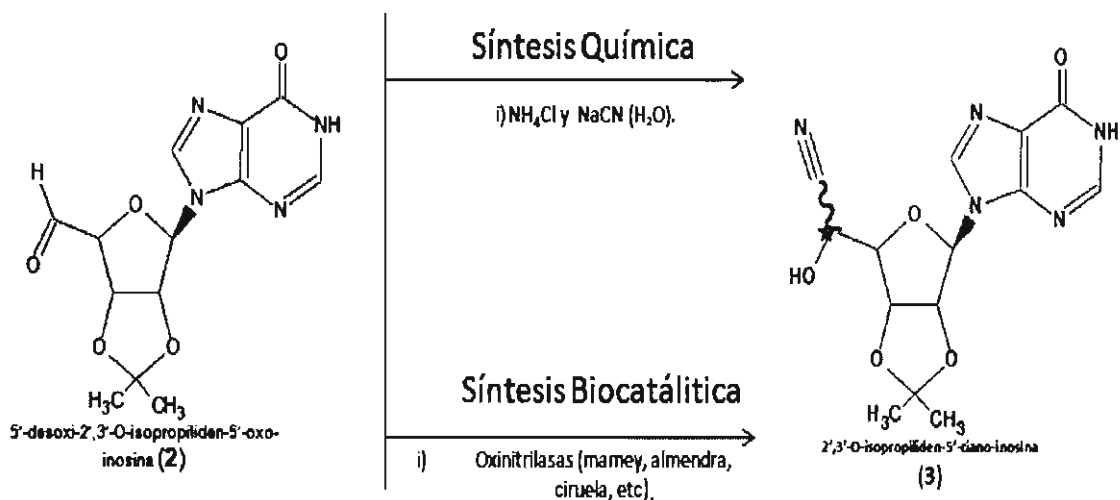


Fig. 16: Ruta de síntesis para la obtención del compuesto 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2).

Una vez obtenido el aldehído y conociendo que se puede generar a partir de este una cianohidrina se plantearon las siguientes rutas de síntesis a estudiar, ver figura 17.



★Nuevo centro quiral formado

Fig. 17: Rutas de síntesis para la obtención del compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano inosina (3).

Asimismo se estudiara la transformación a un derivado más estable, la amida correspondiente, mediante la siguiente ruta de síntesis de la **figura 18**.

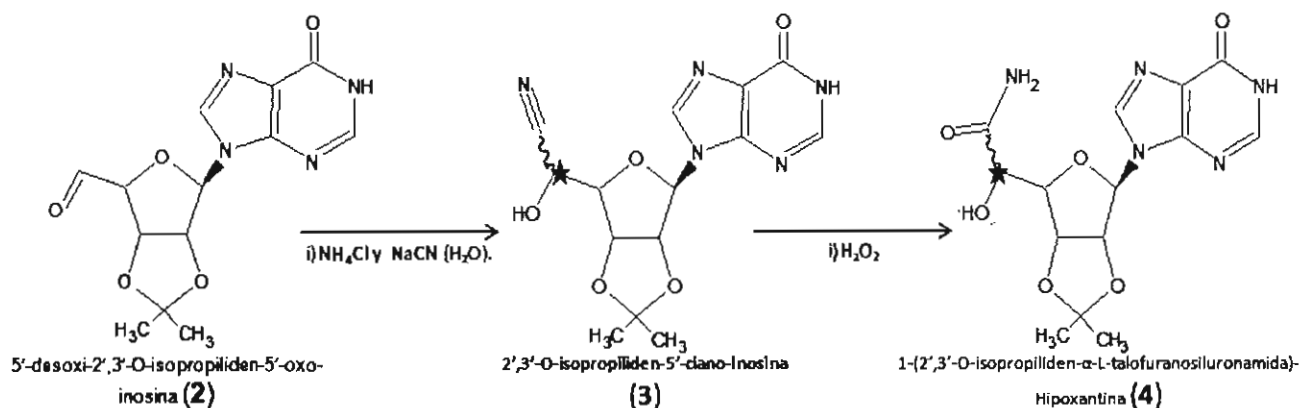


Fig. 18: Ruta de síntesis para la obtención del compuesto 1-(2',3'-O-isopropiliden α-L-talofuranosiluronamida)-hipoxantina (4).

2.13 Aplicaciones potenciales de la biocatálisis en la formación de derivados de inosina

A continuación se describen tres posibles extensiones del presente proyecto hacia la obtención de nucleósidos más funcionalizados de interés farmacéutico, donde se puede aplicar la metodología que deseamos desarrollar en la generación de un nuevo centro estereogénico.

1. Los nucleósidos de purinas han presentado actividad tanto en la quimioterapéutica contra el cáncer, como en actividad antiviral, por ejemplo la 2-acetonilinosina, nucleósido cuya purina exhibe una relevante actividad antiviral (índice terapéutico >1000) contra el ARN del virus del género *Bunyavirus*. Lo que ha llevado al desarrollo de derivados sustituidos en las posiciones 2, 6 y 8 de la base, intentando obtener no solamente una mayor estabilidad a la degradación enzimática, sino también estudiando las alteraciones que ocurren en las interacciones de unión con los receptores, buscando así encontrar diferencias entre las enzimas humanas y las virales, lo que es de suma importancia en química orgánica y medicina, algunas de estas modificaciones se muestran en la **figura 19**.⁷³ Con base en lo anterior, es de interés estudiar la preparación de análogos estructurales de estos compuestos partiendo del producto obtenido de

manera estereoselectiva por biocatálisis del aldehído en 5' de la inosina protegida con el HCN y posterior hidrólisis.⁷⁴ Lo anterior nos permitiría obtener un derivado funcionalizado en 5' como por ejemplo una α -hidroxiamida, por supuesto que la reacción biocatalítica de adición de HCN con otra base como guanosina, (6-NH₂) sería otro sustrato a considerar para explorar en un futuro.

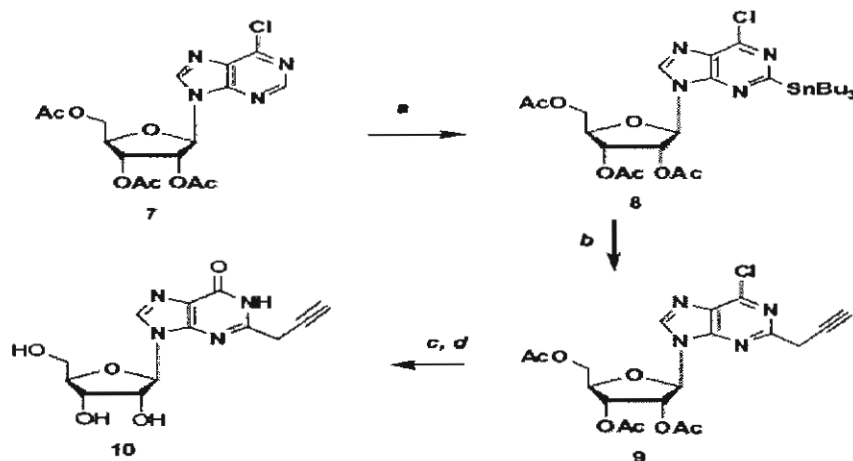


Fig.19: Desarrollo de derivados sustituidos en las posiciones 2, 6 y 8 de los nucleósidos de purina.

2. Recientemente se ha desarrollado una ruta enzimática para preparar derivados de inosina de manera estereoselectiva utilizando la conocida reacción de deaminación de derivados en (5'*RS*) de adenosina. En esta reacción no interfieren los patrones de sustitución en 5' o las protecciones de los alcoholes 2' y 3' de la ribosa con la enzima utilizada, observándose que reacciona preferentemente el diastereoisómero (5'*S*), quedando sin reaccionar el (5'*R*)-adenosin derivado.^{75, 76} Esto permitiría el estudio de nuevos grupos por la presencia de sustituyentes en 5' que modifiquen al alcohol primario por un alcohol secundario más funcionalizado. Se ha demostrado que es necesaria la presencia del alcohol en 5', para la correcta unión en el estado de transición con la enzima adenosin deaminasa (ADA, EC 3.5.4.4.),⁷⁵ pero la enzima adenil deaminasa (AMPDA, EC 3.5.4.6) puede aceptar grupos distintos a OH en 5', tales como: N₃, Cl, H, SCH₃, OCOCH₃, **figura 20**.⁷⁶ Esto nos motiva a suponer posibles aplicaciones de la ruta biocatalítica que estudiaremos en este trabajo con

derivados de adenosina y su posterior transformación a los sustratos obtenidos en esta secuencia de biocatálisis, estudiando el efecto de un grupo nitrilo en 5'.

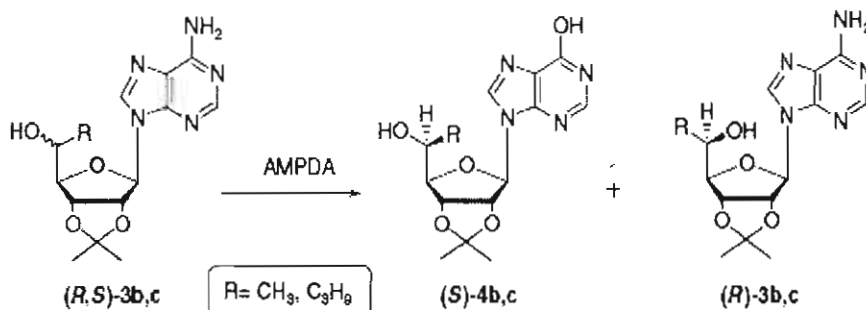


Fig.20: Ruta enzimática de derivados de inosina.

3. En la búsqueda de compuestos que presenten actividad como inhibidores del crecimiento de células cancerosas, se han preparado compuestos derivados de inosina reemplazando al alcohol en 5', por grupos: amino y tiol. Se conocen la existencia de inosin y adenosinquinasa en células de mamíferos, ambas han mostrado inhibición en sistemas bacterianos y por supuesto en mamíferos estos efectos son atribuidos a la conversión *in vivo* (por una fosforilación) a un nucleósido 5'-substituido, vía la acción enzimática de las quinasa, los cuales pueden ser los responsables del efecto inhibitorio.⁷⁷

Una molécula que ha generado un considerable interés por el número de efectos en el metabolismo celular, es la denominada AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranosida), también conocida como AICA ribosita o acadesina, ver **figura 21**. Se asume que es fosforilada y mimetiza los efectos del nucleótido adenosina (AMP) y activa la proteína quinasa (AMPK), una enzima sensible al balance energético en mamíferos y controla el metabolismo de glucosa y lípidos. De aquí que AICAR se considere un AMPK activador y sea prometedora en enfermedades metabólicas como diabetes tipo 2 y en obesidad, donde la glucosa juega un papel importante. Se ha demostrado que en células cardíacas, AICAR coadyuva a la recuperación del corazón después de una isquemia, si bien el mecanismo de acción no es conocido.⁷⁸

Ya que AICAR es preparado por reacción de inosina protegida, ver **figura 22**, la posibilidad de emplear los derivados obtenidos, protegidos adecuadamente en el carbono 5', generaría por una secuencia similar nuevos compuestos con potencial actividad biológica al tener el grupo alcohol a ser fosforilado y poseer un nuevo centro estereogénico para estudiar sus implicaciones.

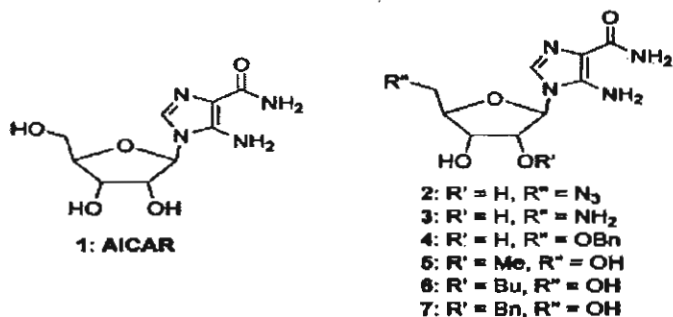


Fig.21: Estructura de AICAR 1 y sus derivados 2-7.

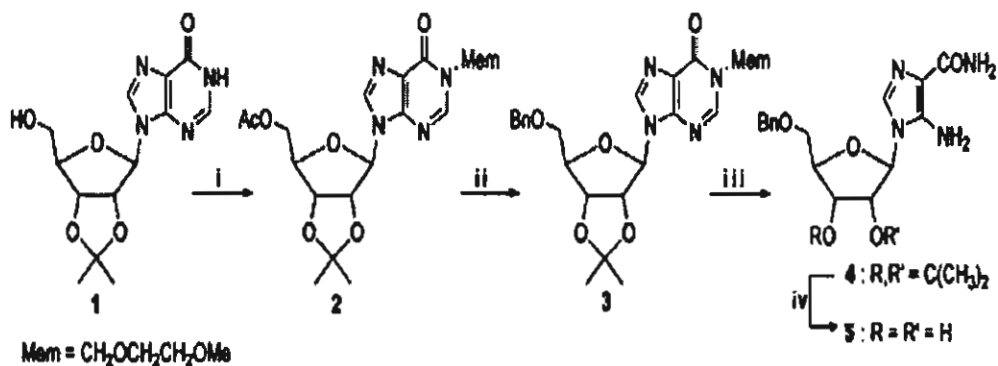


Fig.22: Preparación del compuesto AICAR a partir del compuesto (1).

Luego de la construcción del marco teórico del proyecto, se procede a llevar a la práctica los conceptos anteriormente planteados.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En esta investigación se utilizarán enzimas oxinitrilasas, liasas que tienen la capacidad de incorporar o desincorporar un grupo ciano en un aldehído, bajo la forma de polvos acetónidos de las semillas siguientes: almendra (*Prunus dulcis*), capulín (*Prunus serotina*), cereza (*Prunus avium*), ciruela (*Prunus domestica*), durazno (*Prunus persica*), guanábana (*Annona muricata*) y mamey (*Pouteria sapota*). Dependiendo de la fuente de la oxinitrilasa, la temperatura y el pH entre otros factores a considerar, el ataque nucleofílico del ión cianuro podrá darse por una cara u otra del compuesto carbonílico, obteniéndose un nuevo centro estereogénico. De este modo es relevante desarrollar procedimientos sintéticos por biocatálisis para lograr una inducción asimétrica, que permita el enriquecimiento de alguno de los estereoisómeros o bien la obtención de uno de ellos. Por ello sería significativo realizar la obtención de intermediarios en busca de la preparación química y biocatalítica de derivados de nucleósidos de inosina, así como desarrollar los métodos analíticos que ayuden a detectar y cuantificar dichos compuestos.

El desarrollo de derivados nucleosídicos útiles para la síntesis de compuestos farmacológicamente activos representa un avance tecnológico importante. Entre los compuestos utilizados como intermediarios para la síntesis de antibióticos, antimicóticos, antivirales y anticancerígenos se encuentran los derivados de inosina. El empleo de biocatalizadores, representa un avance importante en la búsqueda y desarrollo de derivados nucleosídicos con actividad biológica. En los últimos años hay una creciente tendencia en la utilización de los fármacos quirales enfocándose a un único estereoisómero, por lo general un enantiómero en lugar de mezclas racémicas, pero también en moléculas más complejas a usar preferentemente un diastereoisómero.

4. HIPÓTESIS

Se podrá inducir la obtención de uno de los diastereoisómeros de derivados nucleosídicos de inosina, al estudiar el efecto biocatalítico de oxinitrilasas provenientes de diferentes fuentes vegetales.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar la inducción asimétrica aplicando enzimas, en la preparación de derivados de nucleósidos de inosina.

5.2 Objetivos Específicos

1. Preparar por métodos químicos convencionales los derivados de nucleósidos de inosina.
2. Estudiar el uso de oxinitrilasas, de diferentes orígenes, para la preparación biocatalítica de los derivados nucleósidos de inosina.
3. Desarrollar el método analítico de las materias primas y productos para el seguimiento de la biocatálisis.
4. Purificar y caracterizar los compuestos obtenidos por métodos espectroscópicos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Descripción del Equipo

1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent 1050 con detector de UV/Visible de arreglo de diodos.
2. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent 1100 con detector de UV/Visible de arreglo de diodos.
3. Espectrofotómetro de UV-Visible Beckman DU650
4. Espectrofotómetro de infrarrojo (IR) Perkin-Elmer Paragon 1600 FT y Perkin-Elmer Spectrum BX, FT-IR System.
5. Resonancia magnética nuclear (RNM) Varian 400 MHz
6. Potenciómetro Corning Pinnacle 530 pH meter.

6.2 Reactivos

- 2',3'-O-isopropilideninosina, Aldrich
- Ácido 2-iodobenzoico, 98%, Aldrich
- Oxone, Aldrich
- Cianuro de sodio (NaCN) Reactivo analítico (R.A), J.T.Baker
- Cloruro de amonio (NH₄Cl) Reactivo analítico (R.A), J.T.Baker
- Carbonato de potasio anhidro (K₂CO₃), Merck
- Dimetil sulfóxido (CH₃)₂SO, Merck
- Isopropanol y hexano grado CLAR, Tecsiquim.
- Acetonitrilo, R.A., J.T.Baker
- Sulfato de sodio anhídrido (Na₂SO₄), R.A, J.T.Baker
- Acetato de etilo (AcOEt), cloruro de metileno (CH₂Cl₂), metanol (MeOH), cloroformo (CHCl₃) y hexano, R.A, J.T.Baker y Tecsiquim
- Sílica Gel, 230-400 mesh, 60 Å, Merck
- Placas de Sílica gel 20x20 cm., Merck
- Ácido clorhídrico (HCl), J.T. Baker

6.3 SÍNTESIS QUÍMICA

6.3.1 Síntesis del ácido o-iodoxibenzoico (IBX)

En un matraz balón de 500mL se pesaron 2.53g del ácido 2-iodobenzoico (1mmol), se le adicionó una solución de Oxone® 18.62g (3mmol) en 100mL de agua desionizada, se colocó en agitación constante a 75°C, la reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF) durante 2h, después la mezcla se enfrió de 0-5°C por 30 min con agitación lenta, la mezcla se filtró en un filtro de vidrio poroso, y el sólido se lavó con agua (6x100mL) y acetona (2x100mL). Los cristales se secaron por 16 hrs. El producto es poco soluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos, pero a altas temperaturas aumenta su solubilidad (pf. 31-32°C) **figura 23**.⁷⁹

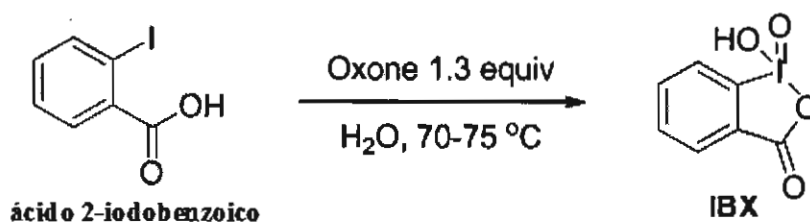


Fig. 23: Síntesis para la obtención de IBX.

6.3.2 Síntesis del 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2).

En un matraz balón de 50mL provisto de refrigerante, se pesaron 0.9g del compuesto (1), (1mmol) disuelto en 25mL de CH₃CN, se adicionaron 3 equivalentes 2.45g de IBX (3mmol), la reacción se calentó a 80°C (**figura 24**), se siguió la reacción por CCF e infrarrojo durante 5 hrs. La mezcla se filtró en vidrio poroso y se lavó con 10mL de CH₃CN. El disolvente se evaporó a presión reducida y se desplazó el aire con N₂ seco para evitar la hidratación del aldehído obtenido (2).⁸⁰

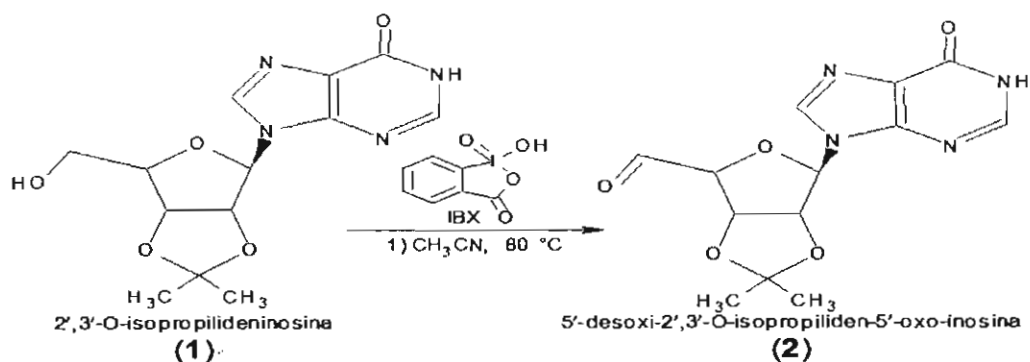


Fig. 24: Síntesis para la obtención del aldehído (2).

6.3.3 Síntesis del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (3).

Método 1 para la obtención de la cianohidrina

La síntesis de (3), se abordó inicialmente mediante la técnica descrita por W. Jian-qiang *et al.*¹ figura 25. Se prepararon soluciones acuosas de cloruro de amonio (2.2mmol) en 2mL de agua y 2.2mmol de cianuro de sodio en 2mL de agua, estas soluciones se mezclaron y se adicionó 1mmol del aldehído (2), la reacción se mantuvo en agitación entre 20 y 30°C, se monitoreó por CCF durante 24 hrs. Finalmente se extrajo el compuesto (3) con AcOEt (6 x 5 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se eliminó el disolvente a presión reducida (rotavapor) hasta la obtención de un sólido café claro.

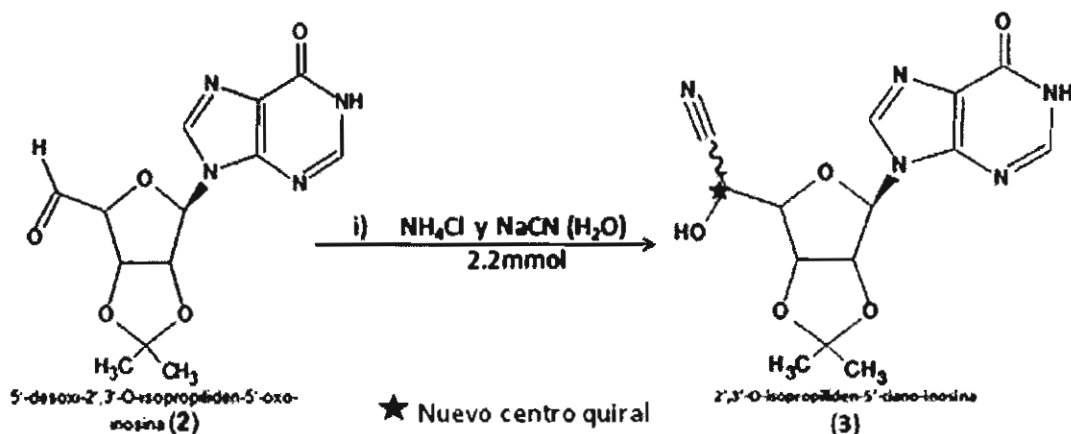


Fig. 25: Síntesis química para la obtención de la cianohidrina (3).

Método 2 para la obtención de la cianohidrina

Se empleó yoduro de zinc y cianuro de trimetilsilano para la obtención de (3). En un matraz balón de 25mL se pesaron 3.2 mg, (10 μ mol) de ZnI_2 , a este se le adicionó una solución de cianuro de trimetilsilano 119 mg (1.2mmol). Una vez obtenida una mezcla homogénea, se adicionó 0.05g (1mmol) del aldehído (2), usando como disolvente CH_2Cl_2 (10mL), esta reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente, se monitoreó por CCF. El disolvente se eliminó a presión reducida, el producto crudo se redisolvió en 10mL de metanol. La cianohidrina protegida con el trimetilsilano se lavó con HCl (3M, 5mL). Esta mezcla se concentró y se añadió agua (5mL) y CH_2Cl_2 (10mL) después de la separación de las dos fases, la fase acuosa se extrajo nuevamente con CH_2Cl_2 (2 x 10mL). La fase orgánica fue secada con Na_2SO_4 anh. y se eliminó el disolvente a presión reducida (rotavapor). La cianohidrina cruda se purificó por recristalización con *n*-hexano o por cromatografía de columna con CH_2Cl_2 /ácido acético 99:1 como eluyente ver figura 26.⁸¹

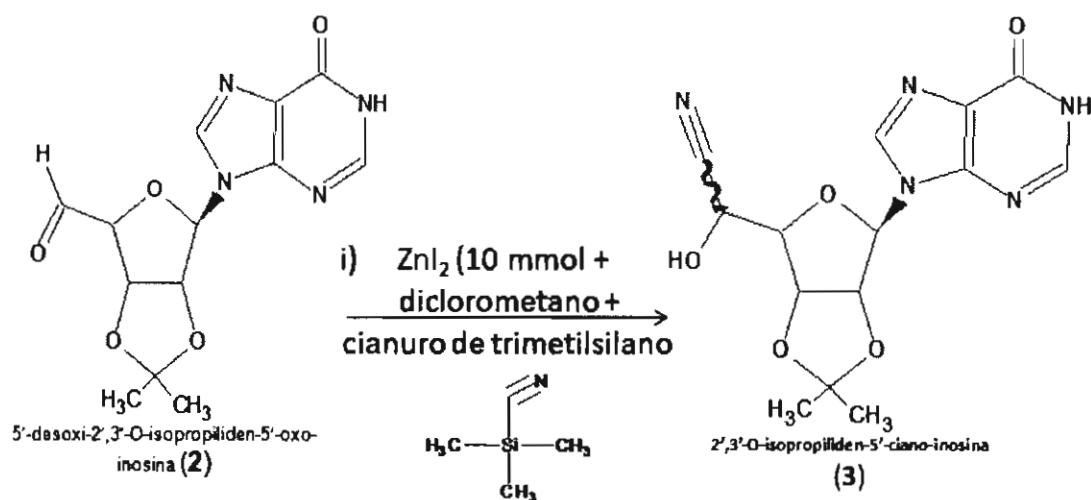


Fig. 26: Síntesis química para la obtención del compuesto (3), empleando ZnI_2 .

6.3.4 Síntesis del 1-(2',3'-O-isopropiliden- α -L-talofuranosiluronamida)hipoxantina (4).

Método 1 de obtención de amida

En un matraz balón de 100mL se pesaron 0.5g (1mmol) del compuesto (3) preparado por el método 1 de obtención de la cianohidrina de la sección anterior. Se adicionaron (6mmol) 1.5mL de H₂O₂ al 30%, ver figura 27, se colocó en agitación a temperatura ambiente y se monitoreó por CCF. Se diluyó con MeOH (10mL), la solución se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se purificó en columna empleando como fase móvil una mezcla de CHCl₃:MeOH 75/25 (15mL) y 50/50 (10mL) para lavar la columna.¹

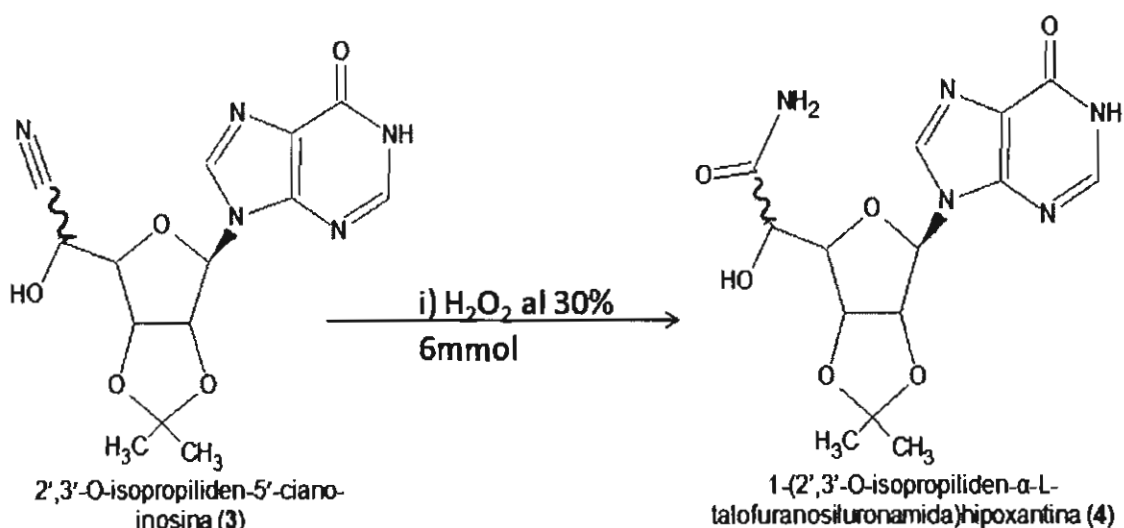


Fig. 27: Síntesis química del compuesto (4).

Método 2 de obtención de amida

En un matraz balón de 50mL se colocaron 0.05g (0.01mol) del compuesto (3), se disolvió en 1.5mL de DMSO, la mezcla se enfrió en baño de hielo con agitación, se adicionaron 40 microlitros H₂O₂ 30% y 20 mg de K₂CO₃, ver figura 28.

La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y monitoreó por CCF e infrarrojo. Una vez concluida la reacción se extrajo con AcOEt y se concentró a presión reducida.⁸²

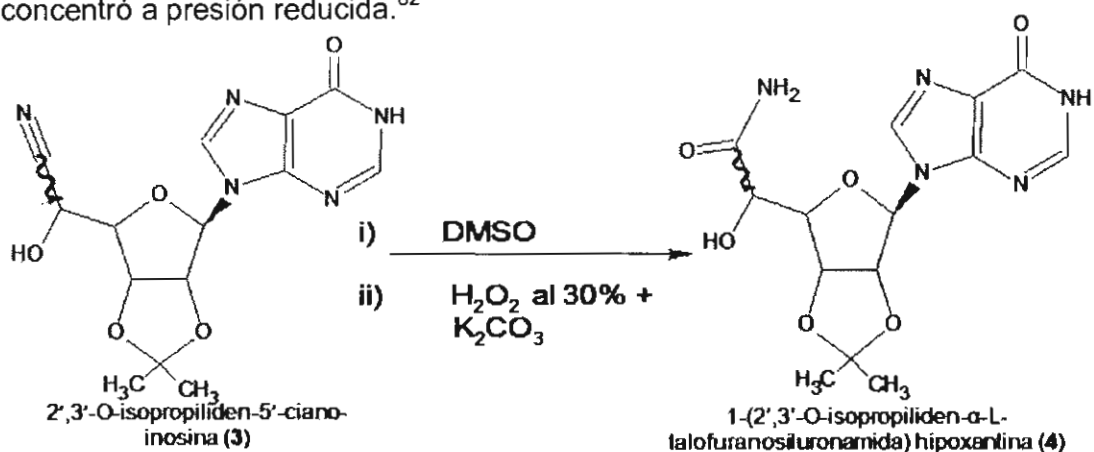


Fig. 28: Síntesis química método 2 para obtener el compuesto (4).

Método 3 de obtención de amida

a) Obtención del derivado acetilado de la cianohidrina.

En un matraz balón de 100mL, se colocaron 0.2g (0.61mmol) del compuesto (3) disuelto en 5mL de piridina anhidra, esta mezcla se realizó a 0°C y una vez que la mezcla fue homogénea se adicionaron 0.73mmol de cloruro de acetilo, se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente, figura 29. Se monitoreó por CCF hasta que la materia prima se trasformó completamente.

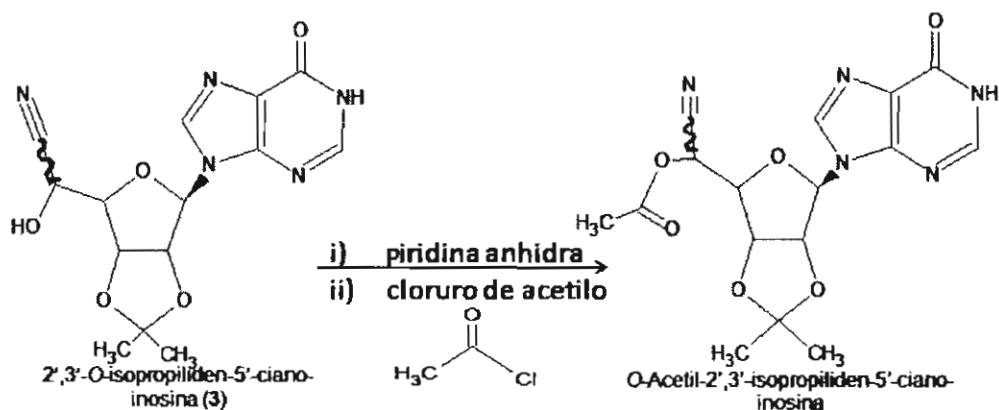


Fig. 29: Síntesis química del derivado acetilado de la cianohidrina (3).

b) Obtención del derivado acetilado de la amida (4)

Una vez obtenida la cianohidrina de inosina protegida como su acetato, se adicionó a la reacción un exceso de H_2O_2 al 30% (1.5 mL), se monitoreó por CCF e IR hasta determinar que la reacción fue completa, ver **figura 30**.¹

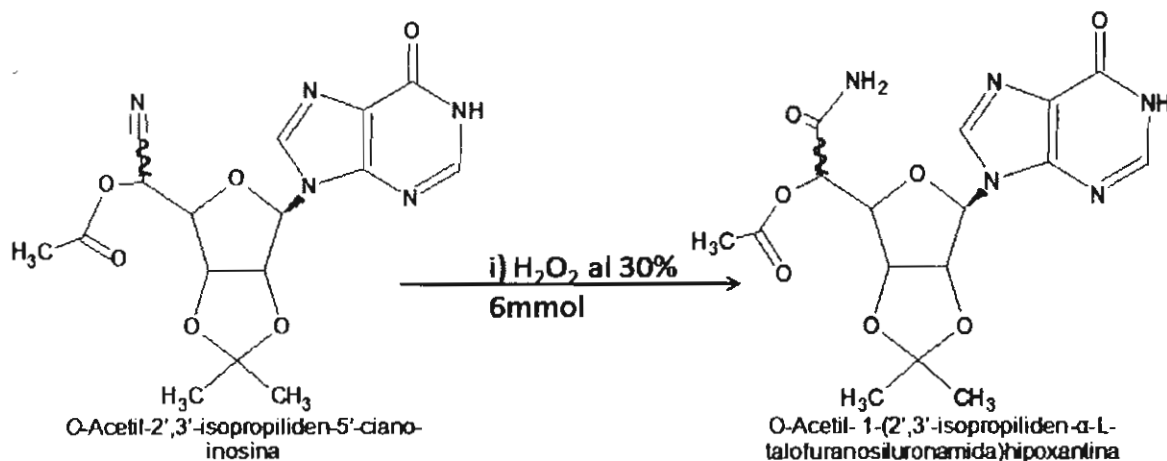


Fig. 30: Síntesis química del derivado acetilado de la amida (4).

Método 4 de obtención de amida

En un matraz balón de 100mL se pesaron 0.1g del compuesto (2) y se mezclaron con 0.05g NaCN (2.2mmol), se empleó como medio de reacción solución metanólica de K_2CO_3 (saturada), esta mezcla se colocó en agitación a temperatura ambiente hasta la conversión de (2) en (3). Una vez concluida la reacción se adicionaron 0.02 g (0.5mmol) de NaCN y un exceso del 15% de H_2O_2 (2mL) para formar el compuesto (4), ver **figura 31**.

Se monitoreó la reacción por CCF e IR hasta la total conversión. Concluida la reacción se concentró a presión reducida y se recrystalizó de etanol. Cuando fue necesario se purificó en columna.⁸³

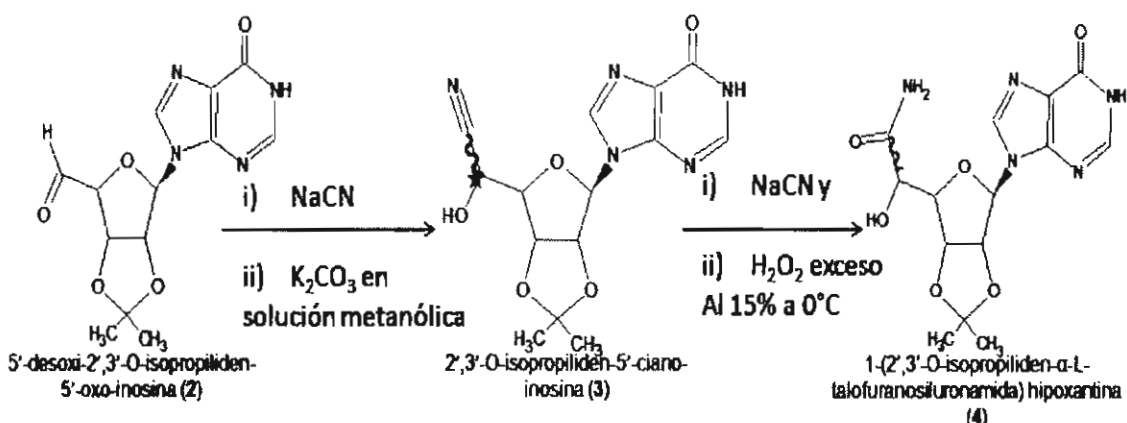


Fig. 31: Síntesis química para obtener el compuesto (4).

Método 5 de obtención de amida

En un matraz balón de 100mL se pesaron 14.4mg del ácido 3-cloroperbenzoico (4mmol). Se adicionaron 0.07g del compuesto (3) en relación de 1mmol, con una solución de agua (10mL) y etanol (5mL). Se mantuvo en agitación constante a una temperatura de 25 a 30°C. Se monitoreó por CCF e IR hasta determinar el término de la reacción. Cuando la reacción finalizó se concentró la mezcla hasta sequedad a presión reducida (figura 32).⁸⁴

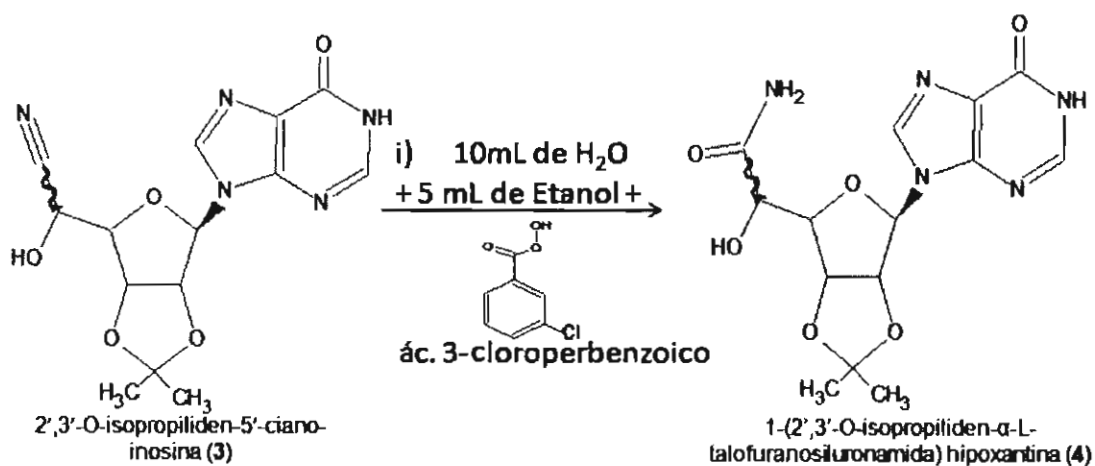


Fig. 32: Obtención del compuesto (4), empleando ácido 3-cloroperbenzoico.

6.4 Síntesis biocatalítica del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano- inosina (3).

6.4.1 Preparación del buffer de cianuro a pH 4 y 5

Se pesaron 6.512g de KCN, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió en 60mL de H₂O destilada, se ajustó el pH a 4.0, o a 5.0 ± 0.05 con ácido cítrico y se llevó a volumen. La solución se guardó en refrigeración.

6.4.2 Preparación del biocatalizador (polvos acetónidos)

Se utilizaron las semillas de almendra (*Prunus dulcis*), capulín (*Prunus serotina*), cereza (*Prunus avium*), ciruela (*Prunus domestica*), durazno (*Prunus persica*), guanábana (*Annona muricata*) y mamey (*Pouteria sapota*) como fuentes de oxinitrilasas.⁸⁵

La preparación consistió en lavar los huesos de cada uno de los frutos empleados, se eliminó el endocarpio en los frutos con coraza dura, se remojó en agua para retirar el tegumento que recubre el endospermo, el cual fue lavado por triplicado por licuefacción con acetona. El sólido se filtró y se secó en campana de extracción para eliminar la acetona. El polvo se colocó en frascos ámbar, estos se etiquetaron, se sellaron y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su uso, de esta forma se obtuvieron las harinas desengrasadas (polvos acetónidos) de cada una de las fuentes de oxinitrilasas.

6.4.3 Síntesis del compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (3) por biocatálisis.

El HCN de una solución amortiguadora de KCN/citratos (0.50mL) (1N, pH 5) se extrajo dos veces con 1.5mL de éter diisopropílico, la fracción orgánica se separó y se adicionó un exceso de 50 μ L de la solución amortiguadora KCN/citratos, se mantuvo en agitación durante 5 min, con el fin de saturar la fase orgánica, en seguida se adicionó la fuente de oxinitrilasa sustrato:biocatalizador (1:1), se mantuvo en agitación durante 10 min y pasado este tiempo se adicionó el aldehído (2)(1mmol), se mantuvo la agitación y temperatura constante a 5, a 10 y a 20°C ver **figura 33**. La reacción biocatalítica se monitoreó por CCF e IR, después del término de la reacción se añadió una mínima cantidad de agua para eliminar el HCN, finalmente se extrajo con AcOEt (3 x 5mL), la extracción se filtró y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente fue evaporado a presión reducida, el producto obtenido se analizó por CLAR y RMN para determinar el % de conversión y excesos diastereoisoméricos (*ed*).⁸⁶

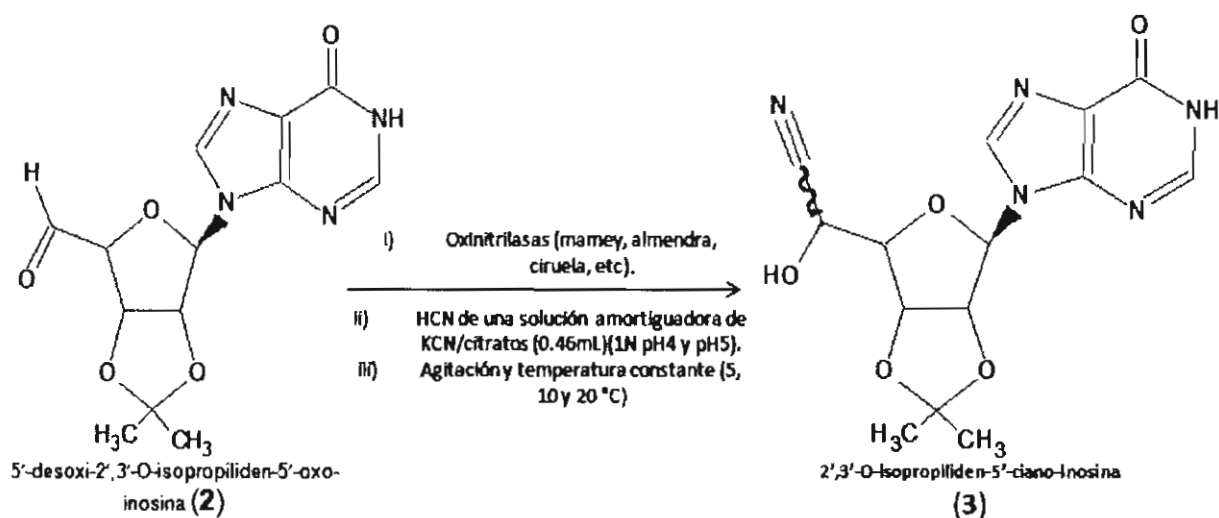


Fig. 33: Obtención del compuesto (3) por biocatálisis.

6.5 Métodos espectroscópicos empleados para la caracterización e identificación de los compuestos.

Se caracterizaron e identificaron cada uno de los productos y en su caso posibles derivados, por UV-Visible, IR y RMN.

6.5.1 Caracterización por UV-Visible

Se realizó un barrido para determinar la longitud de onda máxima de absorción de las materias primas en el espectrofotómetro de UV-Visible de 200-800nm, para este análisis se pesaron 2mg de los respectivos compuestos y se disolvieron completamente en 1mL de DMSO.

6.5.2 Caracterización por Infrarrojo

Se analizó cada una de las materias primas y los productos de reacción, con el fin de determinar la presencia de los grupos funcionales más representativos presentes en cada molécula. El desarrollo de la técnica consistió en disolver la muestra en cloroformo (CHCl_3). Los espectros de infrarrojo registraron máximos de absorción los cuales se indican en cm^{-1} .

6.5.3 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se realizaron a temperatura ambiente en DMSO como disolvente (en caso contrario se especificarán la temperatura y el disolvente utilizado). Los desplazamientos químicos se describen en la escala δ (en ppm) tomando como referencia la señal del disolvente empleado o, en su defecto, la señal del tetrametilsilano (TMS). En los espectros de ^1H se indica además la multiplicidad, el número de protones correspondientes a cada señal y la asignación de las señales más significativas.

La técnica se empleó para la cuantificación de los % de exceso diastereoisomérico (% *ed*), utilizando para ello las áreas bajo la curva de las señales pertenecientes al centro quiral formado, esta información la proporciona el

equipo integrando únicamente las señales de interés de ambos diastereoisómeros. Además se determinó el porcentaje de conversión de la síntesis química y biocatalítica, empleando para ello el área bajo la curva de la señal característica al aldehído y las áreas bajo la curva de las señales utilizadas para determinar el % *ed*, esta información la proporciona el equipo integrando únicamente las señales de interés o se puede utilizar la siguiente fórmula.

$$\% \text{ conversión} = \frac{ABC \text{ del producto} \times 100}{ABC \text{ del producto} + ABC \text{ del reactivo}}$$

6.6 Desarrollo de métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Los análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizaron en dos cromatógrafos Agilent serie 1050 y 1100, para obtener las mejores condiciones de separación y cuantificación de cada uno de los diastereoisómeros de la inosina, utilizando una columna con fase estacionaria C8 y una columna quiral OJ-H.

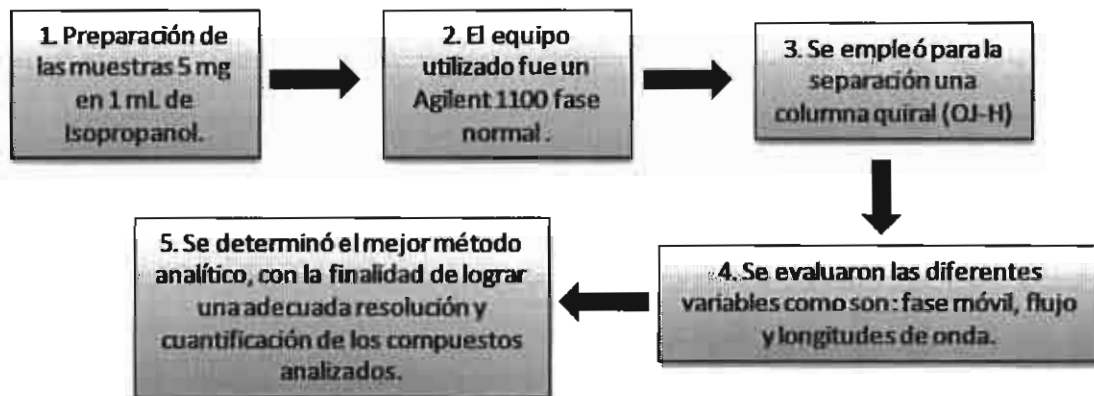
6.6.1 Desarrollo del método analítico por CLAR utilizando columnas no quirales (Fase Reversa)

Para la preparación de la muestra a analizar se pesaron 5mg del compuesto, el cual se disolvió en 1mL de isopropanol grado HPLC, se utilizó un filtro de 2µm. Se utilizó una columna no quiral Agilent Eclipse XDB-C8 4.6 x 150 mm, el empaque de la columna fue *n*-octil, se probaron diferentes variables, mezcla de fase móvil dependiendo del compuesto, la temperatura fue de 25°C, se realizó un barrido alrededor de la longitud de onda reportada para algunos nucleósidos en donde se tomaron las siguientes longitudes de onda λ : 220, 240, 254, 260, 280 nm.^{40, 87- 89}

6.6.2 Desarrollo del método analítico por CLAR utilizando columnas quirales (Fase Normal)

La separación de la muestra se realizó en una columna quiral OJ-H, la cual tiene como fase estacionaria un soporte de sílica gel celulosa tris-(4-metilbenzoato).⁹⁰

Esquema 1. Diagrama de flujo para determinar el método por CLAR en fase normal.



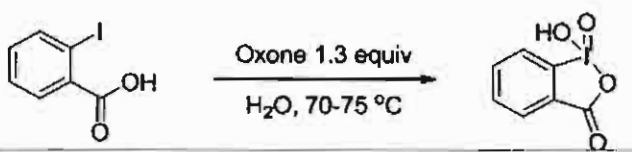
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis de resultados del compuesto IBX

7.1.1 Síntesis de IBX

El IBX se empleó para realizar la oxidación del compuesto 2',3'-O-isopropilideninosina (1). La reacción se siguió por CCF empleando como eluyente 90:10 CHCl₃/MeOH, la reacción se lleva a cabo en 3 h. Los lotes con mejores rendimientos y el punto de fusión obtenidos se presentan en la **tabla 2**.

Tabla 2. Rendimientos de reacción del compuesto IBX.

| | | | |
|--|---------------|----------------|----------------|
|  | | | |
| | IBX | | |
| | Lote 1 | Lote 11 | Lote 14 |
| Gramos (g) | 2.12 | 13.4 | 4.7 |
| Rendimiento (%) | 77 | 79.19 | 83.9 |
| pf (°C) | 227-230 °C | 222-225 °C | 224-227 °C |

Nota: El punto de fusión reportado es de 233°C

La reacción en estas condiciones no presenta mayor inconveniente, reafirmando lo descrito por Frigerio y colaboradores⁷⁹ ya que este método permite la obtención de IBX en menor tiempo y con una pureza mucho más alta, comparada con la obtenida al utilizar otras técnicas.

7.1.2 Caracterización por IR del compuesto IBX

El análisis por IR, **figura 34**, se muestra el espectro del compuesto IBX sintetizado, en el se puede observar la presencia de uniones C-H a 2922.10 y

2852.13 cm^{-1} respectivamente. La presencia de dos bandas características en 1739.24 y 1709.45 cm^{-1} , indican insaturaciones; un grupo carbonilo que de acuerdo a la literatura^{91,92} aparece en el intervalo de 1765-1645 cm^{-1} , que corresponden a la estructura del IBX. Debido a la conjugación que presenta la molécula la banda del grupo alcohol no es apreciable en el espectro.

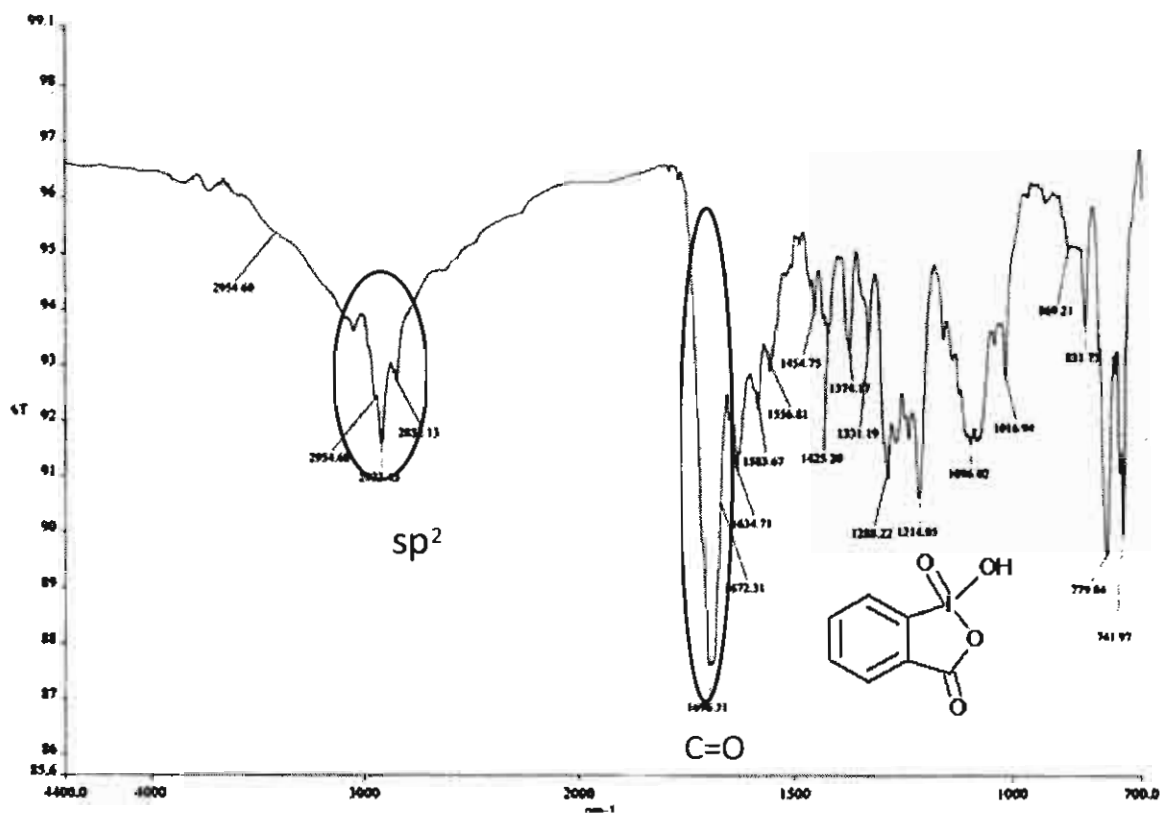


Fig. 34: Espectro de infrarrojo del compuesto IBX.

7.1.3 Caracterización por UV-Visible del IBX

Esta técnica espectrofotométrica permitió identificar la mayor longitud de onda de absorción del IBX, utilizando como disolvente DMSO, ver **figura 35**. En el espectro se observa que a la longitud de 216 nm el compuesto presentó la mayor absorción de luz.

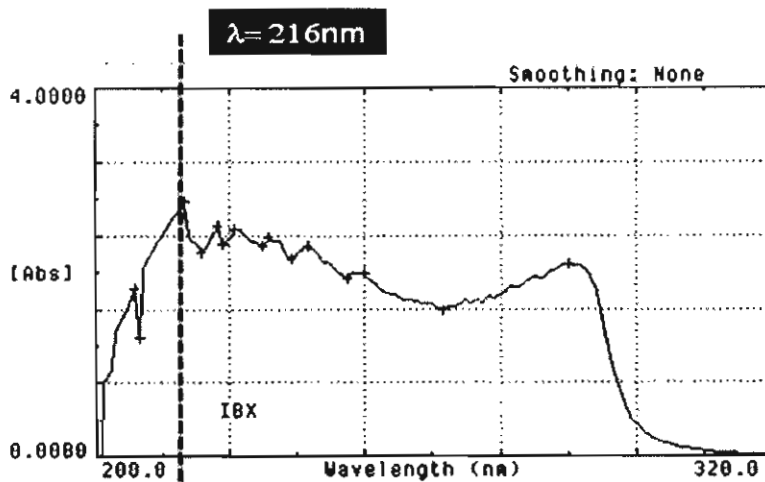


Fig. 35: Espectro UV-Visible de IBX.

7.1.4 Caracterización por RMN del IBX

El análisis fue realizado usando como disolvente DMSO, en la **tabla 3** se muestra el desplazamiento químico en la que aparece cada carbono, se realizó una comparación de los valores experimentales con los calculados por el programa ACD/Labs CNMR HNMR Predictor versión 5.11.

Tabla 3. Desplazamiento químico en RMN ^{13}C del compuesto IBX.

| No de Carbono | CHn | Valores obtenidos (ppm) | Predictor (ppm) |
|---------------|-----|-------------------------|-----------------|
| 3 | C | 111.43 | 109.17 |
| 4 | C | 132.12 | 127.10 |
| 5 | C | 167.93 | 162.58 |
| 6 | CH | 124.56 | 125.69 |
| 7 | CH | 133.91 | 135.34 |
| 8 | CH | 130.66 | 126.77 |
| 9 | CH | 133.50 | 127.27 |

En la **figura 36** se muestra el espectro de hidrógeno, se observan dos tripletes dobleteados en 7.74 y 7.81 ppm que corresponden a la resonancia del protón del C7 y del C8 respectivamente y en la literatura se reportan tripletes en 7.70 ppm para estos protones, pero además se puede observar la presencia de algunas impurezas con señales en desplazamientos químicos de 7.3 y 7.5 que corresponden a acoplamiento del reactivo utilizado en la síntesis (ácido 2-iodobenzoico) para la formación del IBX, aunque se debe mencionar que estas señales son de baja intensidad.

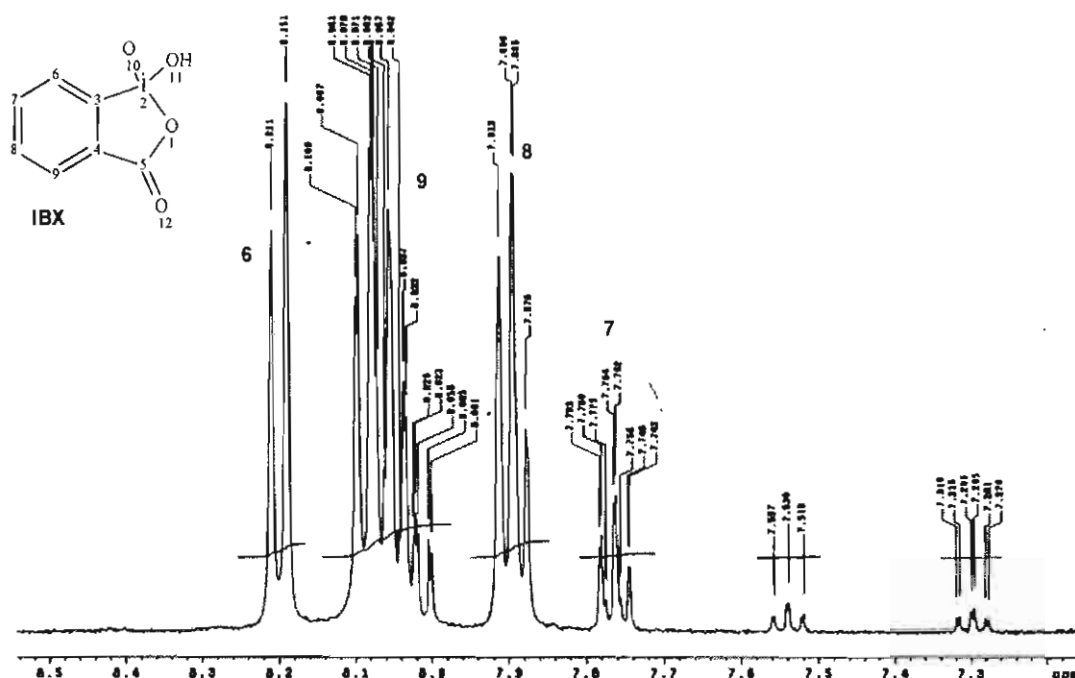


Tabla 4. Análisis de IBX por CLAR fase reversa.

| Método | Columna | Fase Móvil CH ₃ CN:MeOH | Vol. Inyección | Flujo mL/min | λ (nm) | Temperatura |
|--------|---------|---------------------------------------|-------------------|-----------------|--------|-------------|
| A | XDB-C8 | 95:5 | 5 μL | 0.1 | 220 | 25°C |
| B | | 95:5 | | 0.2 | 240 | |
| C | | 99:1 | | 0.4 | 254 | |
| D | | 99.9:0.1 | | 0.4 | 260 | |
| | | | | | 280 | |

Dado que las condiciones exploradas no presentaron una buena resolución de los picos del IBX y sus materias primas, se decidió probar en fase normal utilizando una columna quiral.

7.1.6 Análisis de IBX por CLAR en fase normal

Para el análisis de CLAR fase normal, se utilizaron diferentes relaciones de fase móvil y flujo para la separación del IBX y de sus materias primas. En la **tabla 5**, se muestran las condiciones usadas.

Tabla 5. Condiciones para el análisis de IBX y de las materias primas por CLAR en fase normal.

| Experimentos | Columna Quiral | Fase Móvil | Inyección | Flujo | λ (nm) | T | t _R (min) |
|--------------|-------------------|--------------------------|-----------|-----------|--------|------|----------------------|
| C | OJ-H | hexano:etanol (80:20) | 10 μL | 0.8mL/min | 220 | 28°C | 10.86 |
| D | | hexano:etanol (80:20) | | 1mL/min | 240 | | |
| | | | | | 254 | | 8.34 |
| | | | | | 260 | | |
| | | | | | 280 | | |

En la **figura 37**, se observan los diferentes tiempos de retención del IBX y las materias primas obtenidas usando las condiciones del experimento D. El pico que corresponde al IBX, presentó un tiempo de retención (t_R) de 8.34min, los otros dos picos presentes corresponden a las materias primas: El ácido 2-iodobenzoico y oxone, por lo cual se decidió analizar estos dos compuestos en las mismas condiciones. El t_R de las materias primas así como del IBX varía del experimento C al D (**tabla 6**).

Tabla 6. Resultados obtenidos en el experimento C y D para IBX y sus materias primas.

| | Compuesto | Tiempo de Retención (min) |
|---------------|----------------------|---------------------------|
| Experimento C | IBX | 10.866 |
| | Ácido 2-iodobenzoico | 13.967 |
| | Oxone | 15.152 |
| Experimento D | IBX | 8.34 |
| | Ácido 2-iodobenzoico | 12.271 |
| | Oxone | 13.19 |

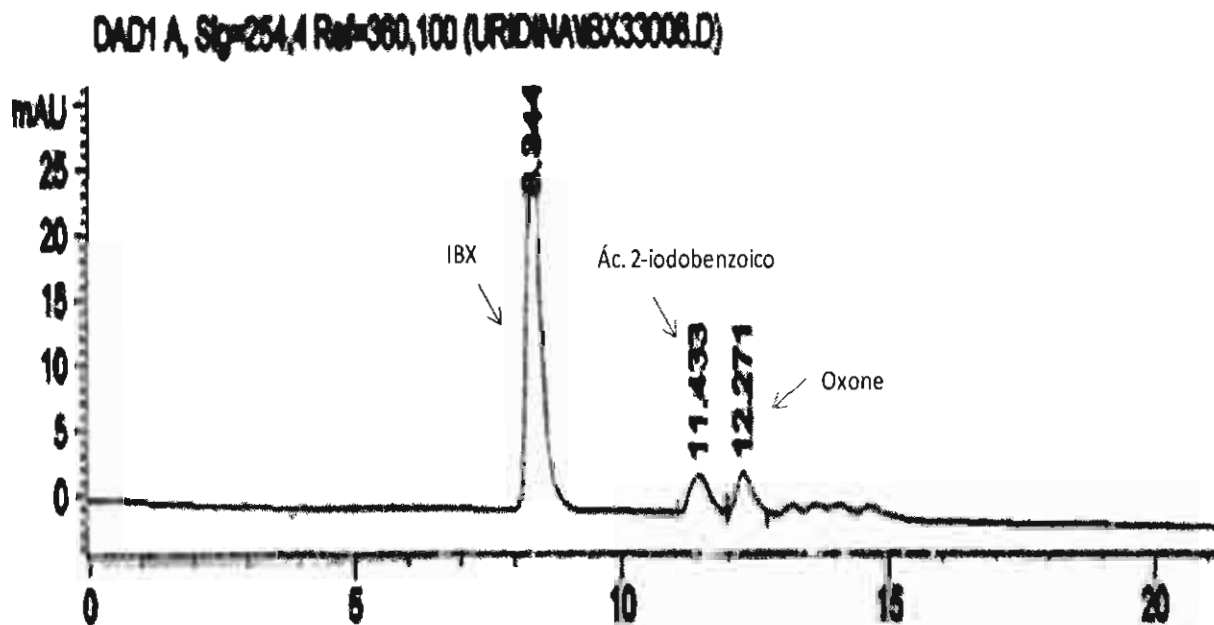


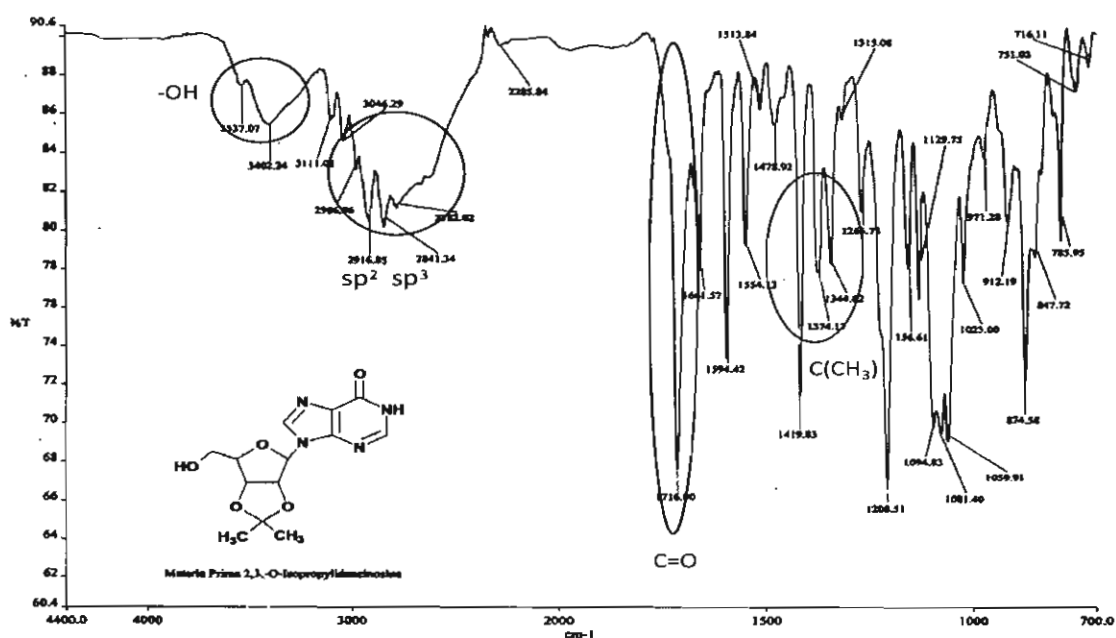
Fig. 37: Cromatograma de IBX, ácido iodobenzoico y oxone, columna OJ-H, flujo: 1 mL/min., $\lambda = 254 \text{ nm}$, $T = 28^\circ\text{C}$, hexano: etanol (80:20).

Los resultados obtenidos muestran que las condiciones son adecuadas en ambos experimentos ya que permiten identificar el IBX y materias primas usadas en su síntesis, se tienen tiempos de retención cortos y resolución adecuada de los picos.

7.2 Caracterización e identificación por IR, UV-Visible y RMN de 2',3'-O-isopropilideninosina (1).

7.2.1 Caracterización e identificación por IR de 2',3'-O-isopropilideninosina (1).

Como se puede observar en la **figura 38**, el espectro de IR muestra la presencia a 1716.00 cm^{-1} de la banda característica del grupo carbonilo y la banda de las uniones O-H a 3402.24 cm^{-1} , correspondiente al alcohol (-OH) y al -NH.⁹²



7.2.2 Caracterización e identificación por UV-Visible de 2',3'-O-isopropilideninosina (1)

La muestra se disolvió en etanol, obteniendo una longitud máxima a 210 nm, **figura 39**.

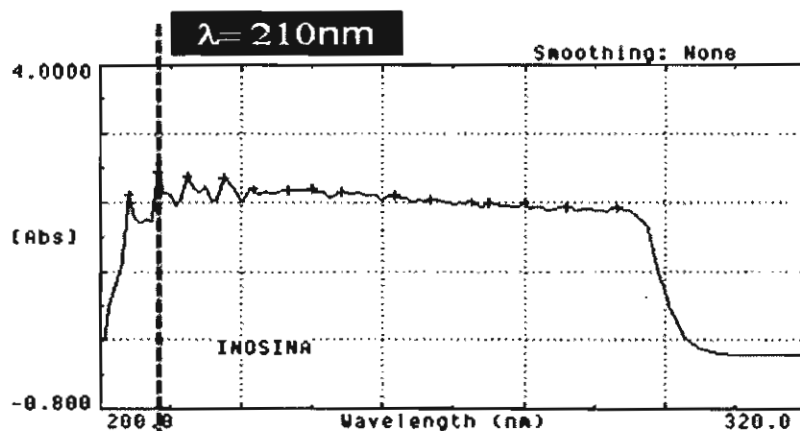


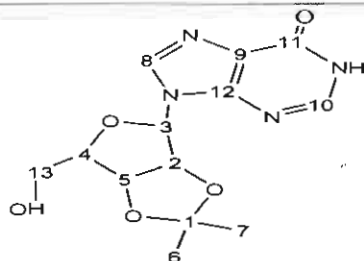
Fig. 39: Espectro de UV-visible para el compuesto (1).

Es importante señalar que la longitud de absorción máxima se determinó en 210, sin embargo en la literatura⁸⁷⁻⁸⁹ se emplean longitudes de onda que van desde los 220 a los 280 nm por ello el posterior análisis cromatográfico se realizó probando dichas longitudes de onda.

7.2.3 Caracterización e identificación por RMN de ^1H y ^{13}C de 2',3'-O-isopropilideninosina (1).

El análisis de RMN para el compuesto (1) fue realizado usando como disolvente DMSO, en la **tabla 7** se muestra el desplazamiento químico en la que aparece cada carbono, se realizó una comparación de los valores experimentales con los calculados por el programa ACD/Labs Predictor versión 5.11. En la **figura 40** se muestra el espectro de RMN para carbono, ^{13}C (100 MHz) y en la **figura 41** se muestra el espectro para protón, ^1H (400.10 MHz).

Tabla 7. Desplazamiento en la que se observa cada C en RMN ¹³C para el compuesto (1).



| No. de Carbono | CHn | Valores obtenidos para (1) (ppm) | Valores Predictor (ppm) |
|----------------|-----------------|----------------------------------|-------------------------|
| 1 | C | 113.42 | 114.63 |
| 2 | CH | 84.11 | 83.57 |
| 3 | CH | 91.25 | 91.10 |
| 4 | CH | 86.20 | 84.40 |
| 5 | CH | 81.08 | 81.25 |
| 6 | CH ₃ | 27.17 | 26.30 |
| 7 | CH ₃ | 25.13 | 24.65 |
| 8 | C | 144.37 | 140.20 |
| 9 | C | 125.19 | 124.91 |
| 10 | CH | 147.09 | 145.93 |
| 11 | CH | 156.71 | 157.23 |
| 12 | C | - | 151.68 |
| 13 | CH ₂ | 62.13 | 62.45 |

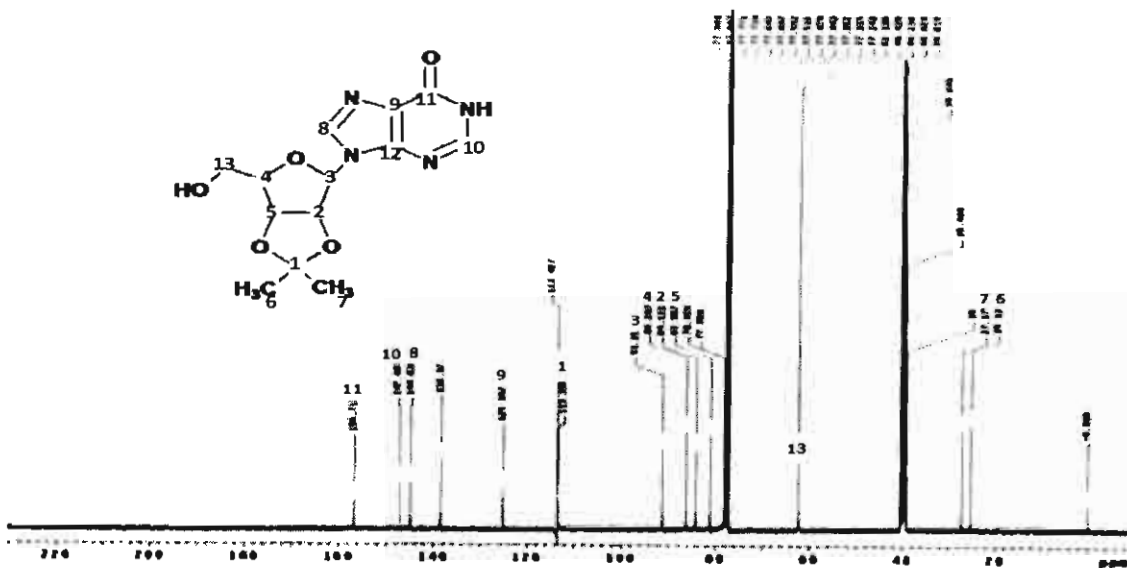


Fig. 40: Espectro de RMN ^{13}C para (1), a 400 MHz.

Se observó un desplazamiento de los valores debido al empleo de DMSO deuterado como disolvente, sin embargo las señales presentan una correspondencia similar a la determinada mediante el Predictor. En cuanto al espectro de hidrógeno que se presenta en la **figura 41**, se identificaron las señales pertenecientes a cada ^1H .

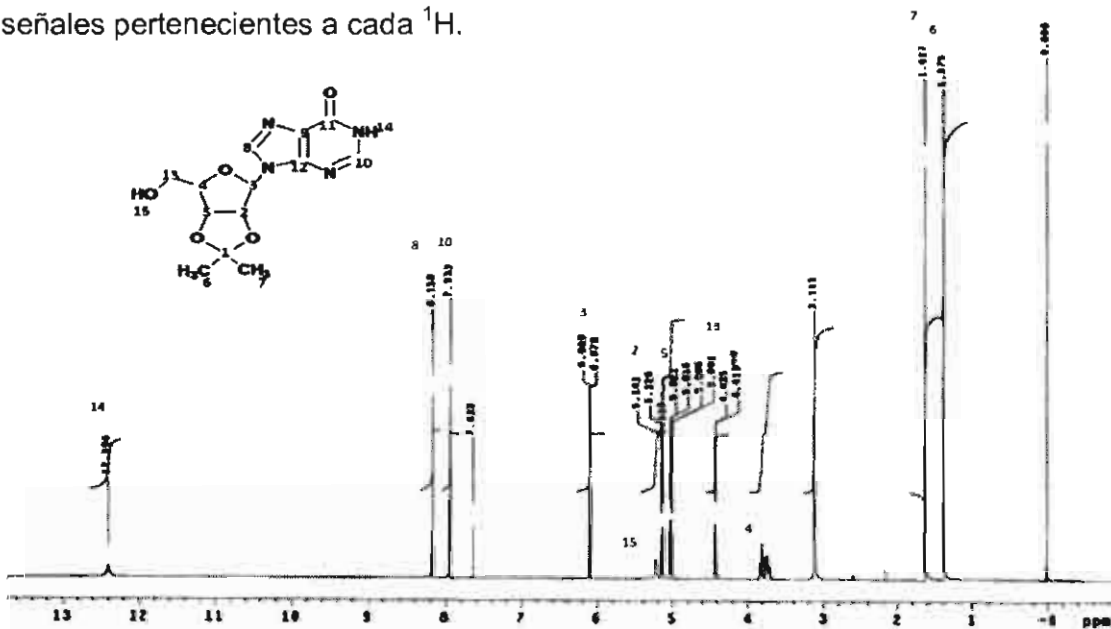


Fig. 41: Espectro de (1). RMN $^1\text{H}(\text{DMSO})$: δ 1.37(s, 3H), 1.62(s, 3H), 3.83(dd, 2H), 4.41(m, 1H), 4.42(m, 1H), 5.12 (m, 1H), 5.21 (m, 1H), 6.07(s, 1H), 7.93 (s, 1H), 8.15(s, 1H), 12.33 (s, 1H) ppm.

Se logró identificar las bandas características por RMN ^{13}C y el ^1H para la materia prima (1), este análisis fue de gran utilidad para la caracterización del aldehído sintetizado (2) y sus siguientes transformaciones.

7.3 Síntesis de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2).

Para la obtención del aldehído (2) se utilizó como oxidante al IBX, este compuesto presenta una solubilidad baja en la mayoría de los disolventes orgánicos, por ello fue determinante buscar el disolvente adecuado para llevar a cabo esta reacción. Se utilizó inicialmente AcOEt, sin embargo la reacción no fue favorable, teniendo rendimientos máximos del 60% debido a la poca solubilidad presentada por el compuesto (1) en dicho disolvente.

La reacción se siguió durante 8 hrs, al realizar la caracterización de los dos primeros lotes se observó una oxidación mediana del alcohol (1), obteniéndose un bajo % de conversión. Por lo que se cambió el disolvente, en la literatura consultada⁸⁰ se emplearon diversos disolventes para realizar la oxidación del alcohol al aldehído, observando estos autores que la reacción general se puede acelerar y la temperatura puede fluctuar entre 55-80°C, obteniendo resultados casi cuantitativos en algunos casos. Se decidió explorar de acuerdo al rendimiento y tiempo de reacción reportado los siguientes disolventes, ver **tabla 8**. Para determinar la solubilidad, se realizaron pruebas de solubilidad de (1) con los disolventes mostrados en la **tabla 8**, obteniendo una mayor solubilidad de (1) en acetonitrilo (CH_3CN), pero empleando un volumen tres veces mayor que el de los ejemplos reportados.

Tabla 8. Disolventes empleados en la literatura para la oxidación de R-OH con IBX.

| DISOLVENTE | RENDIMIENTO (%) | TIEMPO | TEMPERATURA °C |
|--------------------|-----------------|----------|----------------|
| Cloroformo | 80 | 6.5 hrs | 65 |
| AcOEt | 90 | 3.25 hrs | 80 |
| Acetona | 100 | 45min | 55 |
| CH ₃ CN | 94 | 25min | 80 |

Se procedió a estudiar la reacción de oxidación y en la **tabla 9** se muestran los resultados obtenidos para la síntesis del aldehído de inosina. La relación alcohol (1)/ IBX fue de 1:3 eq.

Tabla 9. Condiciones de reacción y rendimiento para la síntesis del aldehído (2).

| Lote | Compuesto (1) (mg) | IBX (g) | Tiempo de reacción (h) | Temperatura (°C) | Rendimiento (%) | Disolvente |
|------|--------------------|---------|------------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| 1 | 99.45 | 0.271 | 16 | 77-80 | 31.9 | AcOEt |
| 2 | 99.07 | 0.272 | 8 | 77-80 | 55.7 | AcOEt |
| 3 | 99.4 | 0.273 | 8.40 | 80 | 44.79 | AcOEt |
| 4 | 100 | 0.272 | 9 | 80 | 25 | CH ₃ CN |
| 5 | 100 | 0.272 | 8.5 | 80 | 54.22 | CH ₃ CN |
| 6 | 298.5 | 0.825 | 8.10 | 80 | 76.25 | CH ₃ CN |
| 7 | 801 | 2.17 | 9 | 80 | 84.9 | CH ₃ CN |
| 8 | 870 | 2.37 | 9.5 | 80 | 86.91 | CH ₃ CN |
| 9 | 100 | 0.272 | 8.5 | 80 | 87.85 | CH ₃ CN |
| 10 | 1000 | 2.72 | 8 | 80 | 91.34 | CH ₃ CN |

Para el seguimiento de la oxidación por CCF se utilizaron diferentes mezclas de elución (50:50 AcOEt-hexano, 70:30 AcOEt-hexano, 100% AcOEt hasta 90:10 CHCl₃-MeOH) y reveladores (cámara de yodo, lámpara UV y revelador de 0.5mL anisaldehído/ácido acético glacial 10mL, 85mL de etanol y 5mL de ácido sulfúrico concentrado), estrictamente en este orden, dada la difícil identificación del aldehído (2) por CCF, los R_f de la materia prima y el aldehído eran muy similares, por lo cual el seguimiento de la reacción se hizo por IR.

7.3.1 Caracterización e identificación por IR de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2).

En la figura 42, se muestra el espectro del compuesto (2), en el se puede observar la formación de un segundo carbonilo en la molécula en 1689.48 cm⁻¹, y la banda característica de los protón del aldehído en 2642.56 cm⁻¹, estas dos bandas y la desaparición de la banda del alcohol son indicadores claves en la obtención de este compuesto.

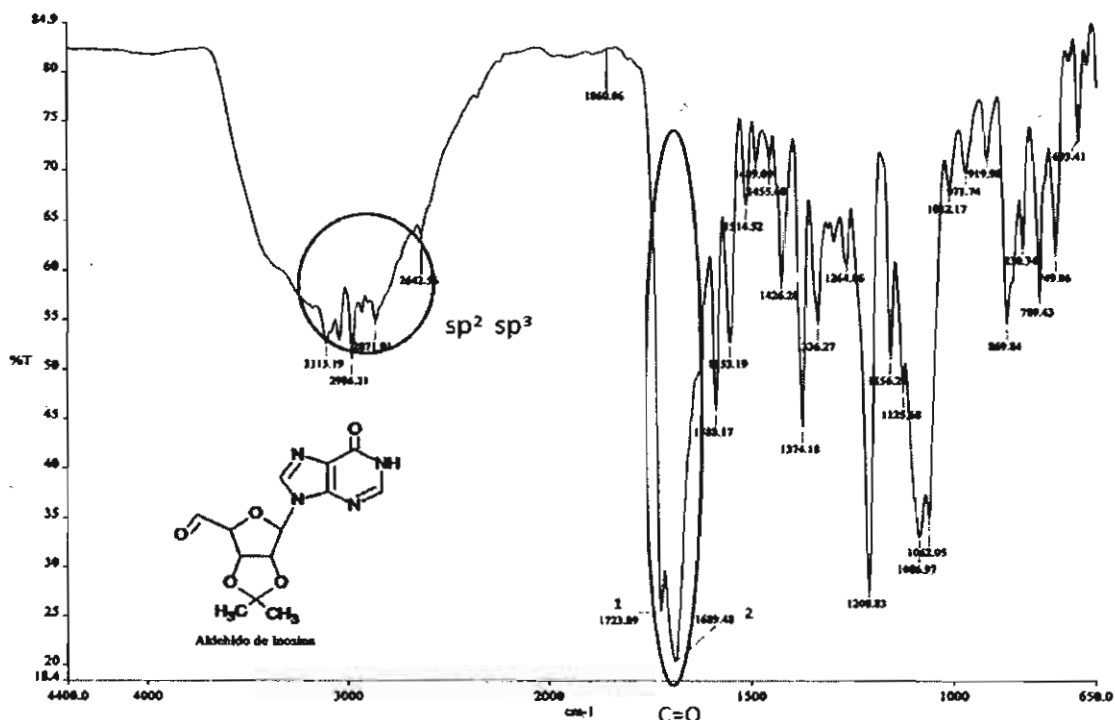


Fig. 42: Espectro de infrarrojo de (2).

7.3.2 Caracterización e identificación por UV-Visible de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2).

Se pesaron 4mg de (2) en 2mL de metanol, obteniendo una longitud máxima a 218 nm, ver figura 43.

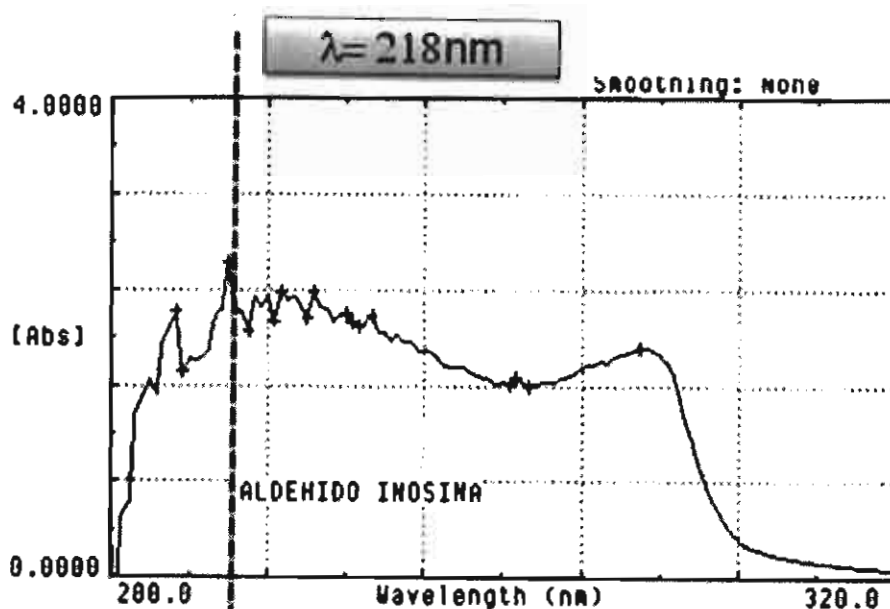
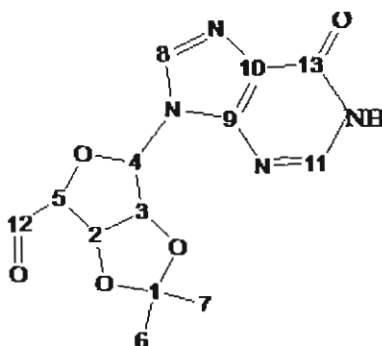


Fig. 43: Espectro de UV-Visible de (2).

7.3.3 Caracterización e identificación por RMN de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2).

En las figuras 44 y 45, se muestran los espectros RMN ^{13}C y RMN ^1H del aldehído (2), utilizando como disolvente DMSO. En la tabla 10 se presenta la comparación de los desplazamientos químicos experimentales con las obtenidas con el programa Predictor para RMN ^{13}C .

Tabla 10. Desplazamiento químico para RMN ^{13}C para el compuesto (2).



| No. de Carbono | CHn | Valores obtenidos para (2) (ppm) | Predictor (ppm) |
|----------------|-----------------|-------------------------------------|--------------------|
| 1 | C | 112.65 | 114.74 |
| 2 | CH | 80.59 | 75.70 |
| 3 | CH | 83.86 | 81.39 |
| 4 | CH | 91.79 | 88.07 |
| 5 | CH | 88.68 | 85.44 |
| 6 | CH ₃ | 24.89 | 25.19 |
| 7 | CH ₃ | 26.41 | 26.52 |
| 8 | CH | 139.53 | 140.20 |
| 9 | C | - | 150.76 |
| 10 | C | 126.12 | 125.51 |
| 11 | CH | 145.81 | 145.93 |
| 12 | CH | 156.30 | 207.92 |
| 13 | C | 200.21 | 157.23 |

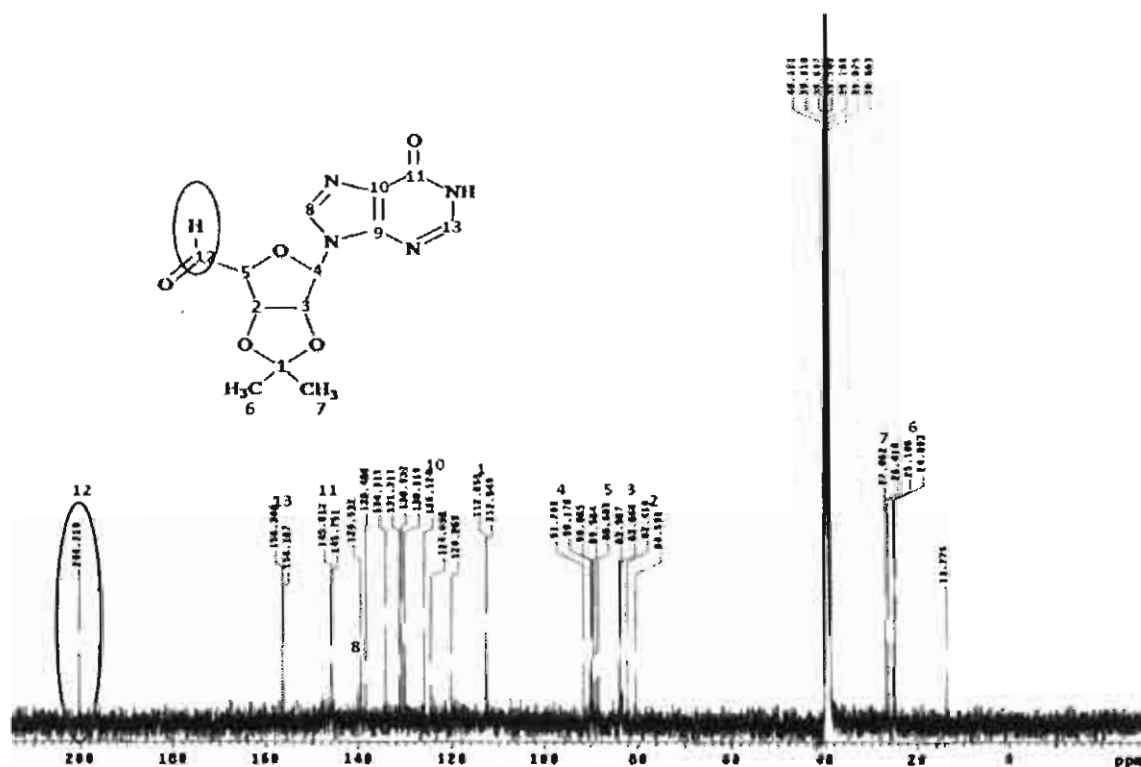


Fig. 44: Espectro de RMN ^{13}C para (2), en DMSO a 400 MHz.

En el espectro de RMN ^{13}C para (2) de la **figura 44**, se tiene la presencia del carbono del carbonilo del aldehído en 200.21 ppm como la señal más característica, la asignación realizada en la **tabla 9** nos permite concluir que se obtuvo el compuesto deseado. Sin embargo se realizaron análisis de dos dimensiones COSY y gHMBC para corroborar dicho resultado, ya que fueron reconocidas en otros lotes señales de IBX y del alcohol (1), dando con ello un espectro de RMN más complejo.

Con el espectro del aldehído (2) obtenido por RMN ^1H , fue posible asignar prácticamente todas las señales correspondientes a los protones presentes en la molécula, con ayuda del ACD/Labs. En la **figura 45** se muestra el espectro de RMN ^1H de (2), se identificaron las señales características, mostrando mayor intensidad en algunas señales, esto se atribuye como se mencionó anteriormente a la presencia de (1) o trazas de IBX.

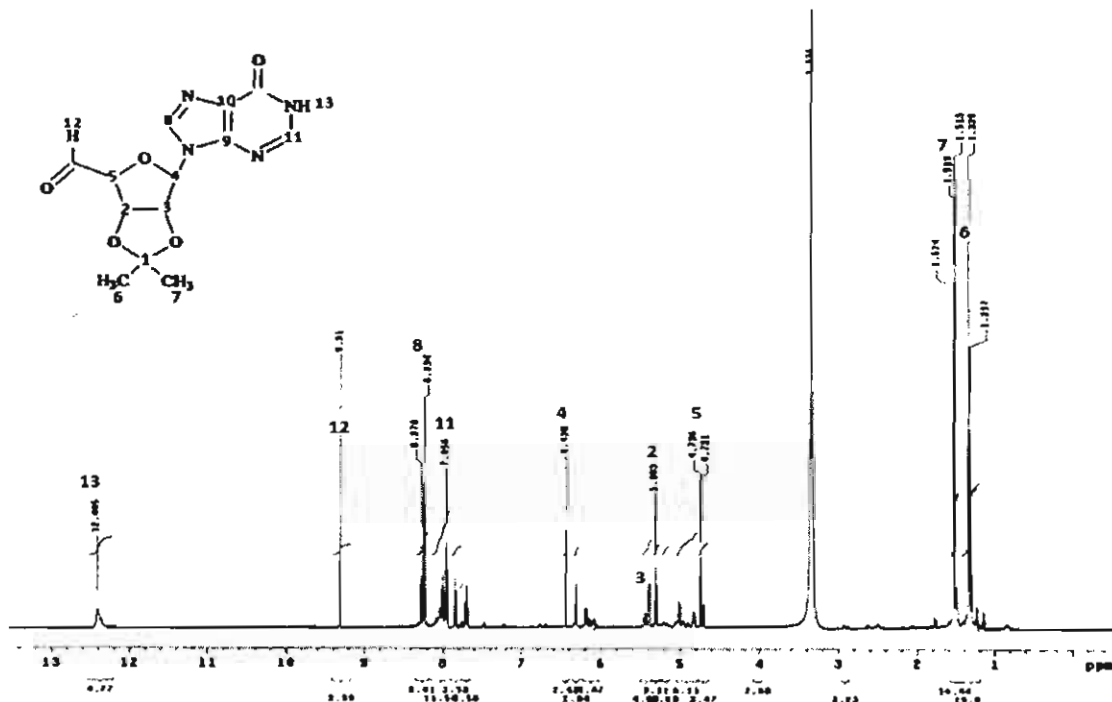


Fig. 45: Espectro de RMN ¹H para (2), en DMSO: δ 1.33(s,3H), 1.59(s, 3H), 4.73(s, 1H), 5.22(dd, 2H), 5.41(dd, 2H), 7.93 (s,1H), 9.31(s, 1H), 12.45 (s, 1H) ppm.

Esta técnica permitió identificar las señales características tanto para el compuesto (1) como para el compuesto (2), cabe mencionar que cada señal se comparó con el programa ACD/Labs.

7.4 Desarrollo del método analítico por CLAR para 2',3'-O-isopropilideningosina (1) y el 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (2).

7.4.1 Determinación por CLAR fase reversa de (1) y (2).

Se analizó el alcohol (1) por CLAR empleando la columna XDB-C8 modificando las siguientes variables: Fase móvil CH₃CN:MeOH en diferentes proporciones, con diferentes flujos; con un volumen de inyección de 2 y 5 µL con cinco diferentes longitudes de onda: 220, 240, 254, 260 y 280 nm. En la **tabla 11**

se muestran las condiciones realizadas y en la **figura 46** se presenta el cromatograma donde se obtuvo el mejor t_R .

Tabla 11. Condiciones por CLAR fase reversa para compuesto (1) y (2) utilizando la columna XDB-C8.

| Experimento | Fase móvil | Vol. de inyección | Flujo mL/min |
|-------------|-------------------------------------|-------------------|--------------------------|
| A | CH ₃ CN:MeOH 50:50 | 10 µL | 0.2 0.1 |
| A'1 | CH ₃ CN:MeOH 80:20 | 10 µL | 0.4 0.2 0.1 |
| A'2 | CH ₃ CN:MeOH 90:10 | 10 µL | 0.4 0.2 0.1 |
| A'3 | CH ₃ CN:MeOH 95:05 | 10 µL 5 µL | 0.8 0.4 0.2 0.1 |
| A'4 | CH ₃ CN:MeOH 99:01 | 10 µL 5 µL | 0.8 0.4 0.2 0.1 |
| A'5 | CH ₃ CN:MeOH 99.9:0.1 | 10 µL 5 µL | 0.8 0.4 0.2 0.1 |

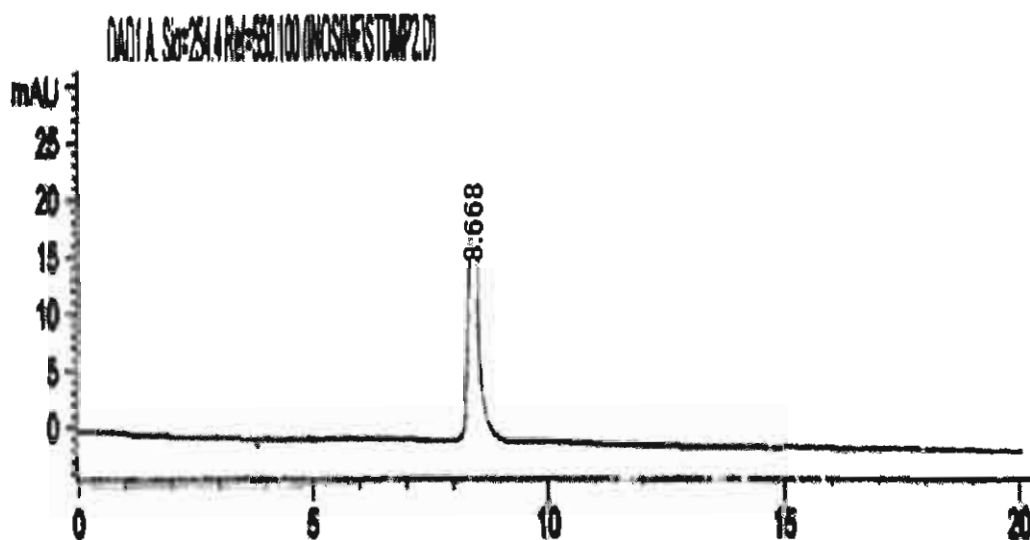


Fig. 46: Cromatograma de (1), empleando el experimento A'3 con un flujo de 0.2 mL/min, teniendo un t_R =8.66 min.

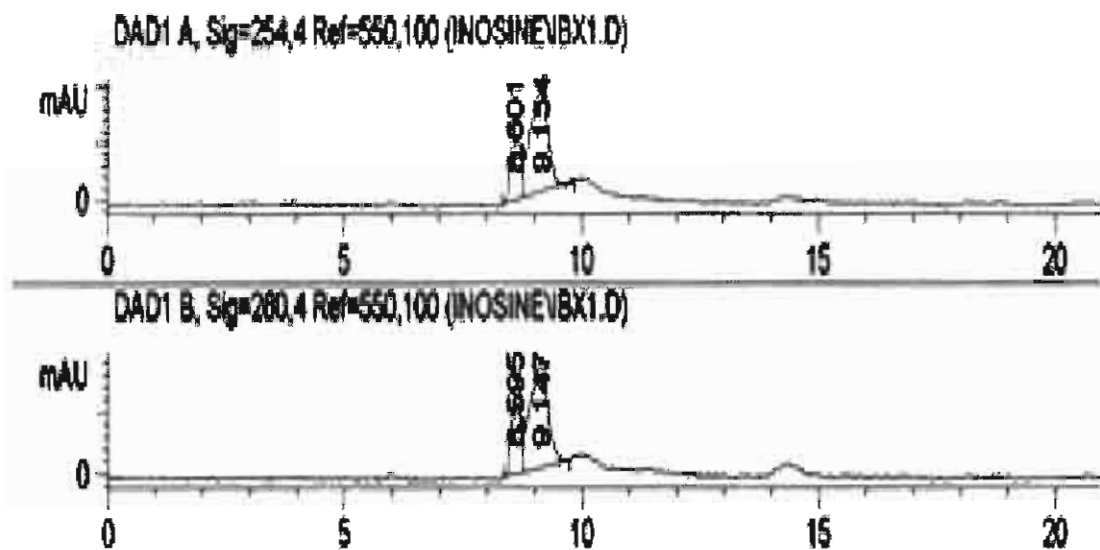


Fig. 47: Cromatograma del compuesto (2), empleando el experimento A'3 con un flujo de 0.2 mL/min.

Empleando las condiciones del experimento A'3 (figura 47), se observa el traslape de los picos de (1) y (2), lo que dificultaría la determinación de los excesos diastereoisoméricos y el % de conversión. Estos resultados nos llevaron a tener que desarrollar otros métodos utilizando fase normal.

7.4.2 Desarrollo del método analítico por CLAR fase normal para los compuestos (1) y (2).

Al analizar el compuesto (1) por CLAR, utilizando la columna OJ-H, a 5 diferentes longitudes de onda: 220, 240, 254, 260 y 280 nm, encontramos que en las tres últimas es donde se muestra la mejor resolución, con una fase móvil de 80:20 hexano:isopropanol, con flujos de: 0.8 y 1.0 mL/min; con un volumen de inyección de 5 μ L y temperatura de 28°C. En la **tabla 12** se muestran las condiciones utilizadas.

Tabla 12. Condiciones por CLAR fase normal, utilizando la columna quiral OJ-H para el compuesto (1) y (2).

| Experimento | Fase móvil | Vol. de inyección | Flujo mL/min |
|-------------|-------------------------------|-------------------|--------------|
| A | Hexano:isopropanol (50:50) | 5 µL | 1 0.8 |
| A'1 | Hexano:isopropanol (70:30) | 5 µL | 0.8 |
| A'2 | Hexano:isopropanol (80:20) | 5 µL | 0.8 |
| A'3 | Hexano:isopropanol (80:20) | 5 µL | 1 |
| A'4 | Hexano:isopropanol (86:14) | 5 µL | 1 |

En las **figuras 48 y 49** se muestran los cromatogramas para el compuesto (1) y (2). Se logró la mejor resolución de estos compuestos, empleando las condiciones del experimento A'3, con un tiempo de retención de 11.7 min para (1) y de 5.89 min para (2).

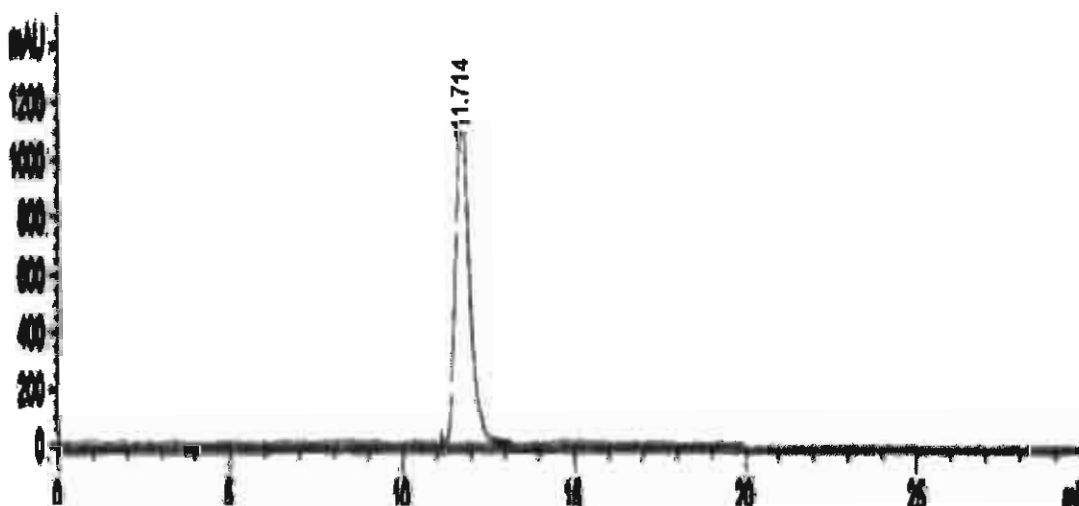


Fig. 48: Cromatograma de (1), columna OJ-H, flujo 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, $T = 28^\circ\text{C}$, hexano:isopropanol (80:20), $t_R = 11.71$ min.

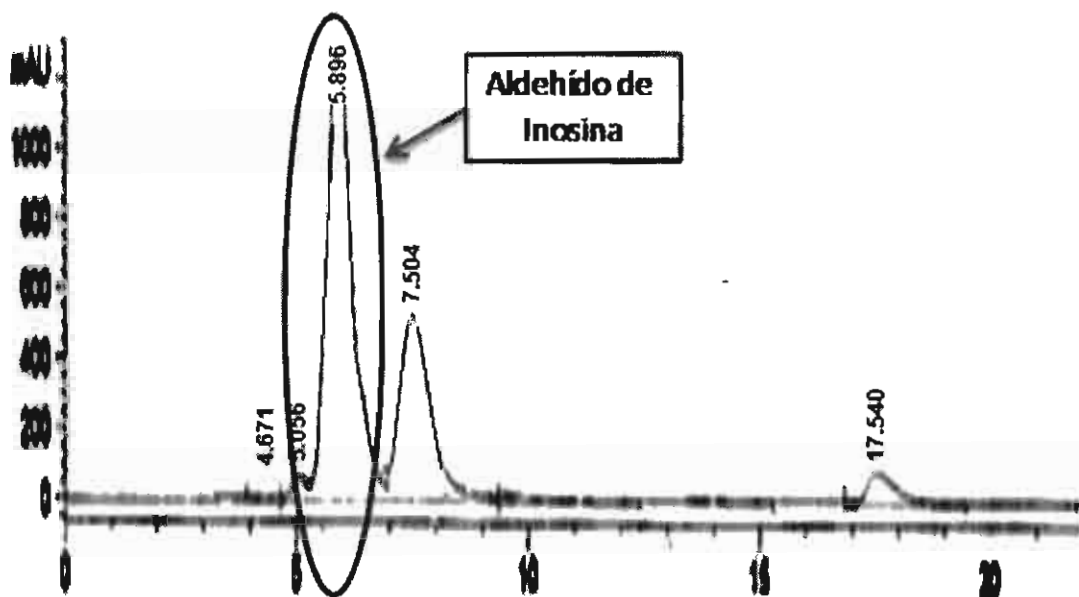


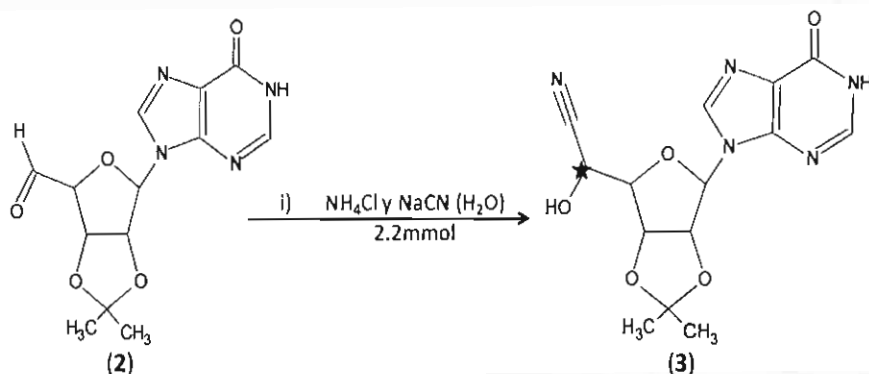
Fig. 49: Cromatograma del compuesto (2), columna OJ-H, flujo 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, T= 28°C, hexano:isopropanol (80:20), $t_R = 5.89$ min

En la **figura 49** se pueden observar otros picos en 7.50 min y en 17.54 min este pico se puede atribuir al hidrato de (2). El pico en 7.50 min no se asignó y puede ser una impureza que absorbe intensamente en esa zona. La separación de los compuestos por medio de CLAR fase normal, fue adecuada ya que se tiene buena resolución y los tiempos de retención obtenidos tanto para los compuestos (1) y (2) son diferentes.

7.5 Síntesis del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (3).

Se realizaron 12 lotes a partir de (2) para la obtención de la cianohidrina (3). Se empleó NH_4Cl y NaCN en relación de 2 mmol de cada uno, con un rendimiento máximo del 75%, por la escasa solubilidad que presentó el compuesto (2), ver **tabla 13**.

Tabla 13. Rendimientos para el compuesto (3).



2',3'-O-Isopropiliden-5'-ciano-inosina

| | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 | Lote 6 | Lote 7 | Lote 8 | Lote 9 | Lote 10 | Lote 11 | Lote 12 |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| Compuesto (3) (mg) | 39.7 | 63.4 | 59 | 28.2 | 14.2 | 20 | 38.1 | 81.3 | 54.3 | 110 | 76 | 149.2 |
| Rendimiento (%) | 72.9 | 72.76 | 67.8 | 51.8 | 65.1 | 36.8 | 70 | 74.7 | 49.6 | 67.4 | 69.9 | 68.5 |

Las reacciones se siguieron por CCF y se eluye en cloroformo/metanol 90:10, además de emplearse la técnica espectroscópica de IR para determinar la completa conversión de (2) a (3), con un tiempo de reacción de 12 hrs y de un 99% de conversión, determinado por RMN.

7.5.1 Caracterización e identificación por IR de 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (3).

Es de mencionar que todos los lotes (12) fueron analizados por IR, RMN y CLAR, pero solo se describirá a detalle el mejor resultado obtenido.

En la **figura 50** se muestra el espectro de IR del compuesto (**3**) en donde se observa la banda correspondiente a uniones C-N en 2257 cm^{-1} correspondientes a la adición en la molécula de un nitrilo, la banda del carbonilo de la base nitrogenada se observó en 1692 cm^{-1} y en 3212 cm^{-1} la banda del grupo alcohol.

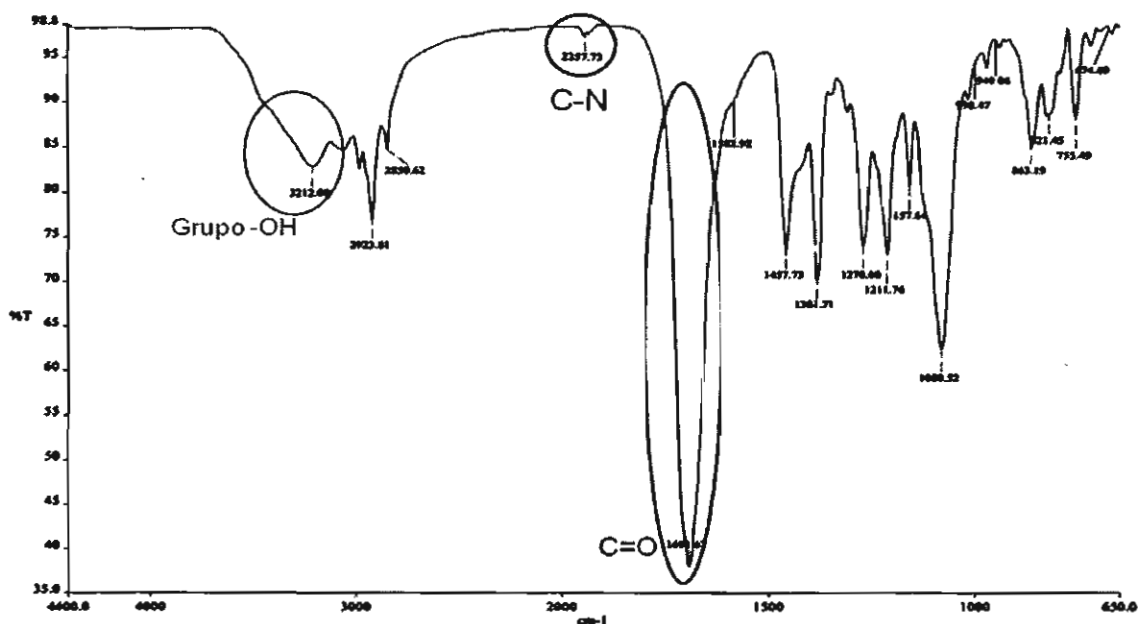
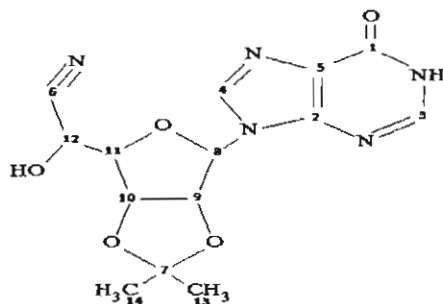


Fig. 50: Espectro de IR del compuesto (**3**).

7.5.2 Caracterización e identificación por RMN de 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (**3**).

Para el análisis de RMN la muestra se disolvió en DMSO deuterado, a continuación se muestran los espectros de RMN para ^{13}C (100 MHz) y para ^1H (400.10 MHz) **figura 51, 52, 53**. En la **tabla 14**, el empleo de DMSO generó un desplazamiento de los valores.

Tabla 14. Desplazamiento para cada carbono, RMN ¹³C, del compuesto (3).



| No. de Carbono | CHn | Valores obtenidos para (3) (ppm) | Valores Predictor (ppm) |
|----------------|-----------------|-------------------------------------|----------------------------|
| | | Lote 8 | ACD/Labs |
| 1 | C | 156.27 | 157.23 |
| 2 | C | 147.57 | 148.88 |
| 3 | CH | 146.10 | 145.93 |
| 4 | CH | 140.20 | 140.20 |
| 5 | C | 124.42 | 125.47 |
| 6 | C | 119.10 | 116.78 |
| 7 | C | 113.53 | 113.97 |
| 8 | CH | 89.60 | 88.23 |
| 9 | CH | 81.30 | 80.59 |
| 10 | CH | 80.54 | 79.51 |
| 11 | CH | - | 76.55 |
| 12 | CH | 60.97 | 58.38 |
| 13 | CH ₃ | 27.04 | 26.81 |
| 14 | CH ₃ | 25.21 | 25.12 |

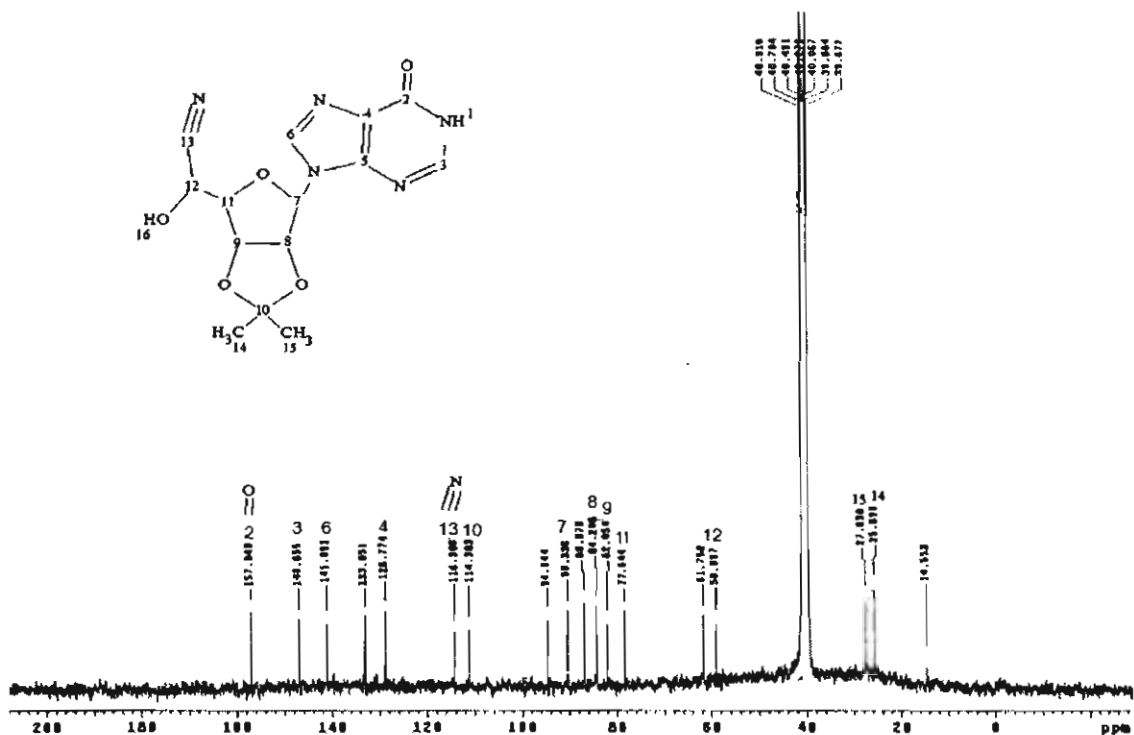


Fig. 51: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto (3) en DMSO, en 400 MHz.

Para el análisis de ^1H , se asignaron las señales correspondientes a los hidrógenos de (3), es necesario indicar la duplicidad presentada en las señales atribuida a la generación de un quinto centro estereogénico, debido a que la molécula inicialmente es ópticamente pura y la generación de un quinto centro quiral derivaría en la formación de un diastereoisómero adicional, esto concibe posibles combinaciones diastereoisoméricas, por lo tanto la atribución de una duplicidad era esperada, y debido a que se generan diastereoisómeros el análisis en RMN pudo realizarse en un ambiente aquiral, por ello no fue necesario el empleo de reactivos de desplazamiento utilizados frecuentemente en la resolución de enantiómeros por esta misma técnica. Al encontrar dicha duplicidad fue necesario emplear técnicas de 2 dimensiones para lograr asignar cada una de las señales obtenidas, en la **figura 52 y 53** se muestran el espectro de resonancia obtenido y su ampliación para poder distinguir la duplicidad presentada en el espectro.

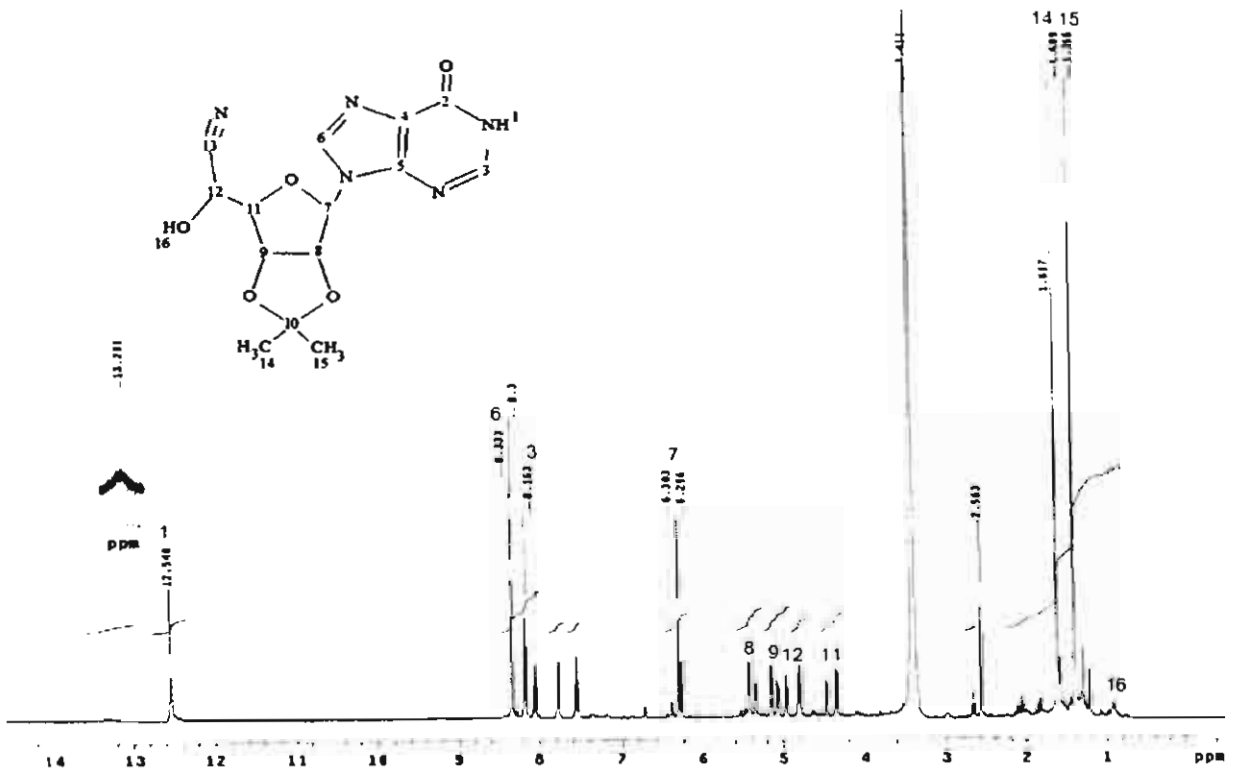


Fig. 52: Espectro de RMN ^1H del compuesto (3), en DMSO a 400 MHz.

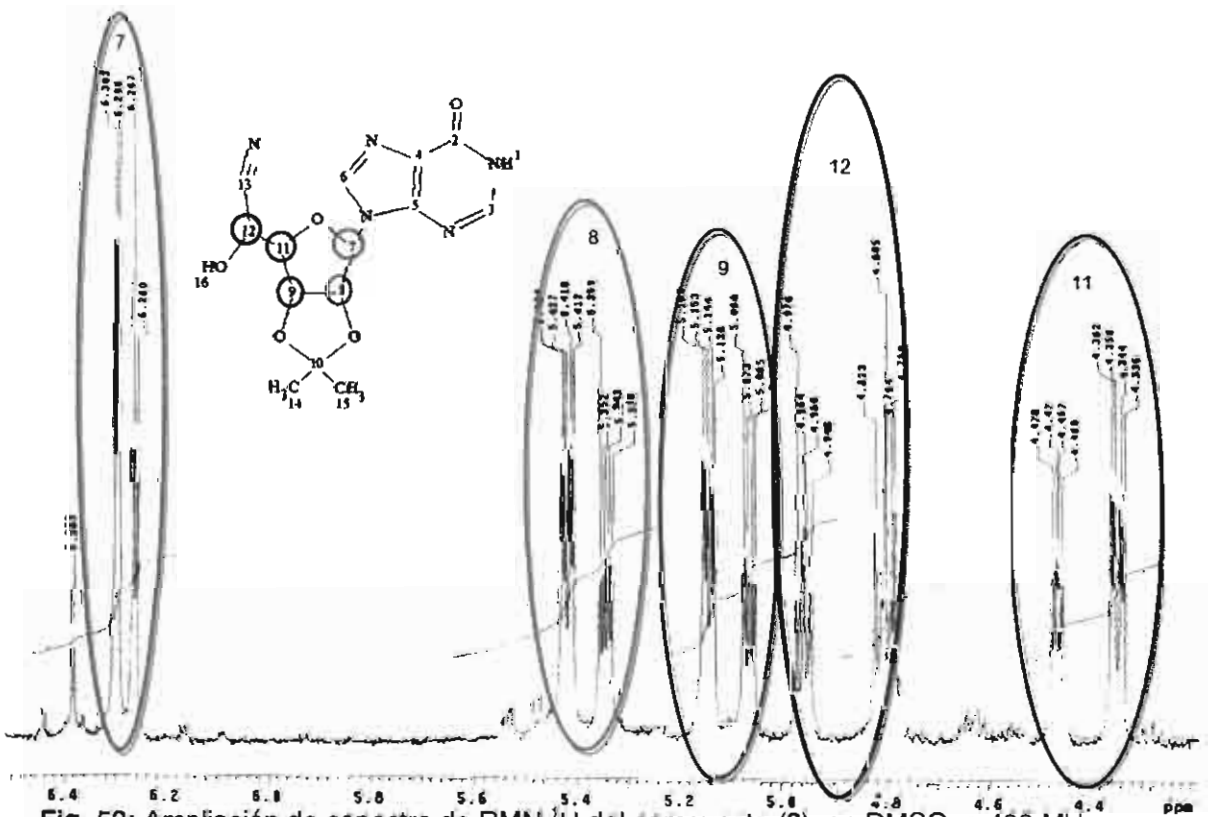


Fig. 53: Ampliación de espectro de RMN ^1H del compuesto (3), en DMSO, a 400 MHz.

En la **figura 53** se observa la duplicidad de señales generada en la obtención de la cianohidrina (**3**), cada ovalo resalta las señales generadas pertenecientes a los 5 centros quirales. El ovalo en color rojo corresponde a las señales pertenecientes al nuevo centro estereogénico formado. Se realizó un análisis **COSY** para lograr asignar con mayor precisión cada una de las señales adquiridas. Este análisis permite referenciar cada señal con el acoplamiento que se presenta en la molécula con tres enlaces de distancia, permitiendo de esta manera asignar las interacciones presentes entre los protones de la molécula y determinar a qué protón le corresponde cada señal obtenida **figura 54**.

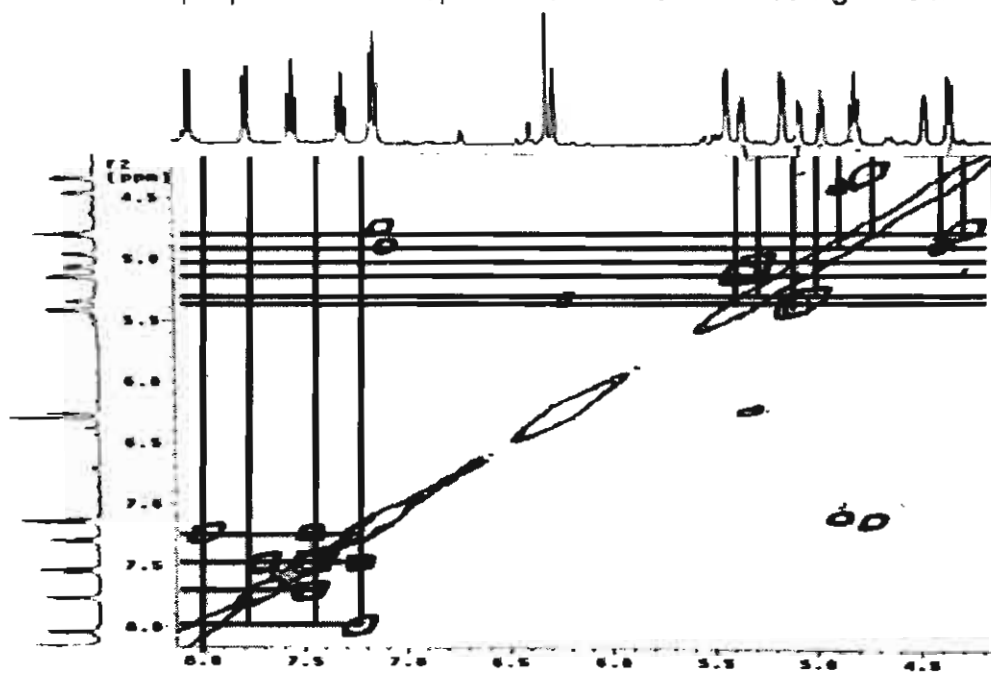


Fig. 54: Espectro de RMN (gCOSY) del compuesto (**3**), en DMSO, a 400 MHz.

Una vez obtenida la asignación, se determinó la señal perteneciente al nuevo centro estereogénico formado (**figura 53**). Estas señales fueron tomadas y utilizadas para determinar el porcentaje de exceso diastereoisomérico (*%ed*) por RMN y contar con una técnica para determinar además del *%ed*, el porcentaje de conversión, esto mediante la ausencia o presencia de la señal correspondiente al hidrógeno del aldehído (**2**) en 9.33 ppm. En la **figura 55** se muestra una ampliación de las señales utilizadas para la determinación del *%ed*. En este caso las señales pertenecen al nuevo centro estereogénico formado, como ya se

explicó la duplicidad indica la presencia de dos diastereoisómeros a los que se les catalogara como D1 y D2, ya que no fue nuestro propósito determinar la configuración absoluta de cada uno de ellos.

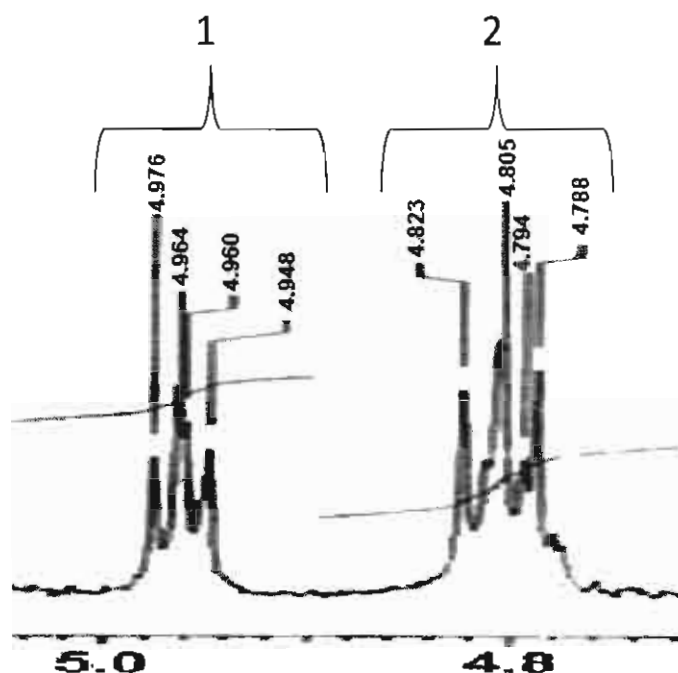


Fig. 55: Ampliación del espectro de RMN ^1H del compuesto (3), asignación de los diastereoisómeros.

Con estos resultados se logró caracterizar el compuesto (3), mediante el empleo de la técnica espectroscópica por RMN. Se cuantificó un %*ed* de 4.48% por este método encontrando una relación de diastereoisómeros de 52.24 para el diastereoisómero 1 y 47.76 para el diastereoisómero 2.

7.5.3 Análisis del compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (3) por CLAR en fase normal

Para el análisis de CLAR fase normal, en la **tabla 15**, se muestran las mejores condiciones empleadas en el análisis del compuesto (3).

Tabla 15. Condiciones utilizadas para el análisis del compuesto (3), por CLAR usando la columna quiral OJ-H.

| Experimento | Fase móvil | Flujo (mL/min) | λ (nm) | T |
|-------------|----------------------------|----------------|-------------------|------|
| 1 | hexano:isopropanol (86:14) | 0.8 | 220 240 254 | 28°C |
| 2 | hexano:isopropanol (80:20) | 1 | 260 280 | 28°C |

En el cromatograma del compuesto (3) (figura 56) se observan dos señales, con tiempos de retención de 16.15 y 21.32 min (D1 y D2) respectivamente, que corresponden a los dos diastereoisómeros, como ya se mencionó anteriormente el partir de una sustancia ópticamente pura y formar un nuevo centro quiral crea la formación de diastereoisómeros y por ello se esperaba detectar en CLAR dos picos pertenecientes a cada diastereoisómero, estos picos nos sirvieron para determinar el %*ed*, para el compuesto (3) obteniendo un 2.74% y una relación de diastereoisómeros de 51.37/48.63. Si lo comparamos con el %*ed* obtenido por RMN¹H vemos la posibilidad de emplear ambas metodologías para la cuantificación.

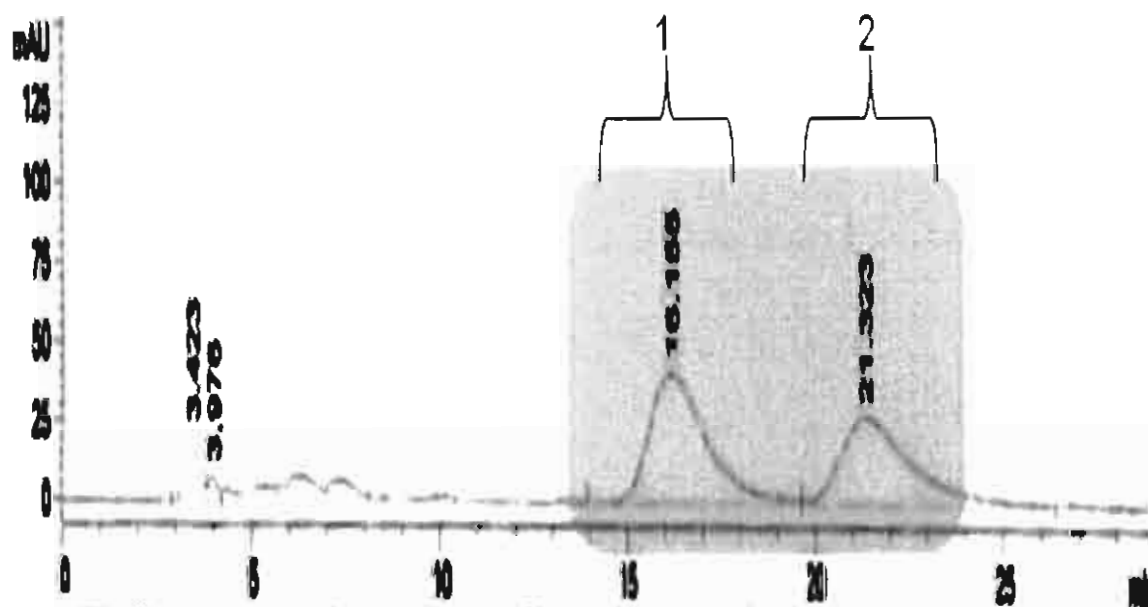


Fig. 56: Cromatograma del compuesto (3), empleando un flujo de 1mL/min, con una fase móvil hexano:isopropanol (80:20) a 260 nm.

El desarrollo de este método cromatográfico fue útil para la cuantificación del % *ed*, y nos mostró que el producto obtenido cuenta con una pureza adecuada para otras transformaciones. Este método se utilizará posteriormente en nuestro estudio de obtención de la cianohidrina (3) empleando polvos acetónidos de vegetales (ruta biocatalítica). Con base en estos resultados contamos con dos métodos (RMN¹H y CLAR) para realizar la cuantificación del % de *ed*.

7.6 Síntesis de 1-(2',3'-O-isopropiliden- α -L-talofuranosiluronamida) hipoxantina (4).

Se llevaron a cabo diferentes reacciones de hidrólisis química de nitrilos, **figura 57**, con la finalidad de obtener la amida (4), se seleccionó primero al peróxido de hidrógeno a diferentes tiempos de reacción para realizar la hidrólisis, sin embargo en algunos experimentos (5) se obtuvieron productos que no se pudieron identificar. Esto puede deberse a que la cianohidrina (3) es inestable, problemas al determinar el final de la reacción por CCF y no obteniéndose señales por RMN. Es de mencionar que la síntesis de (4) generaría un compuesto con una estabilidad mayor a la presentada por la cianohidrina (3), esto nos permitiría contar con un derivado al cual se le pueden anclar otras cadenas de compuestos más complejos estructuralmente, que proporcionen una activación de la molécula generando actividades farmacológicas importantes, como las descritas en el apartado 2.3 del marco teórico.

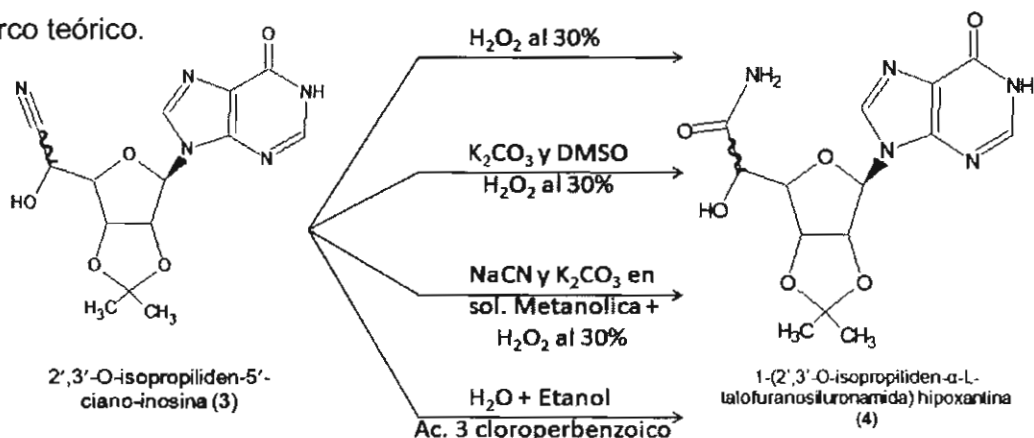


Fig.57: Rutas de síntesis para la obtención del compuesto (4).

Las otras tres síntesis también fueron probadas y desarrolladas sin resultados positivos. De las cuatro síntesis descritas en la **figura 57**, el mejor resultado se alcanzó empleando peróxido de hidrógeno al 30% (6mmol) con 72h de reacción. Se obtuvo un sólido con un pf. 186-197°C (lit. pf= 196°C)¹ con un 50% de rendimiento. El producto se purificó por cromatografía en columna, empleando como fase móvil una mezcla de CHCl₃/MeOH en proporciones de 75:25, 50:50 y 100% MeOH.

7.6.1 Caracterización e identificación por IR de 1-(2',3'-O-isopropiliden- α -L-talofuranosiluronamida) hipoxantina (4).

En el espectro de IR, ver **figura 58**, se puede observar la presencia de hibridaciones sp^2 y sp^3 a 2922.10 y 2852.13 cm^{-1} respectivamente, dos bandas características en 1702 cm^{-1} correspondientes al carbonilo de la base nitrogenada y 1638 cm^{-1} carbonilo de la amida y en 3360 y 3213 cm^{-1} la banda característica de uniones N-H.

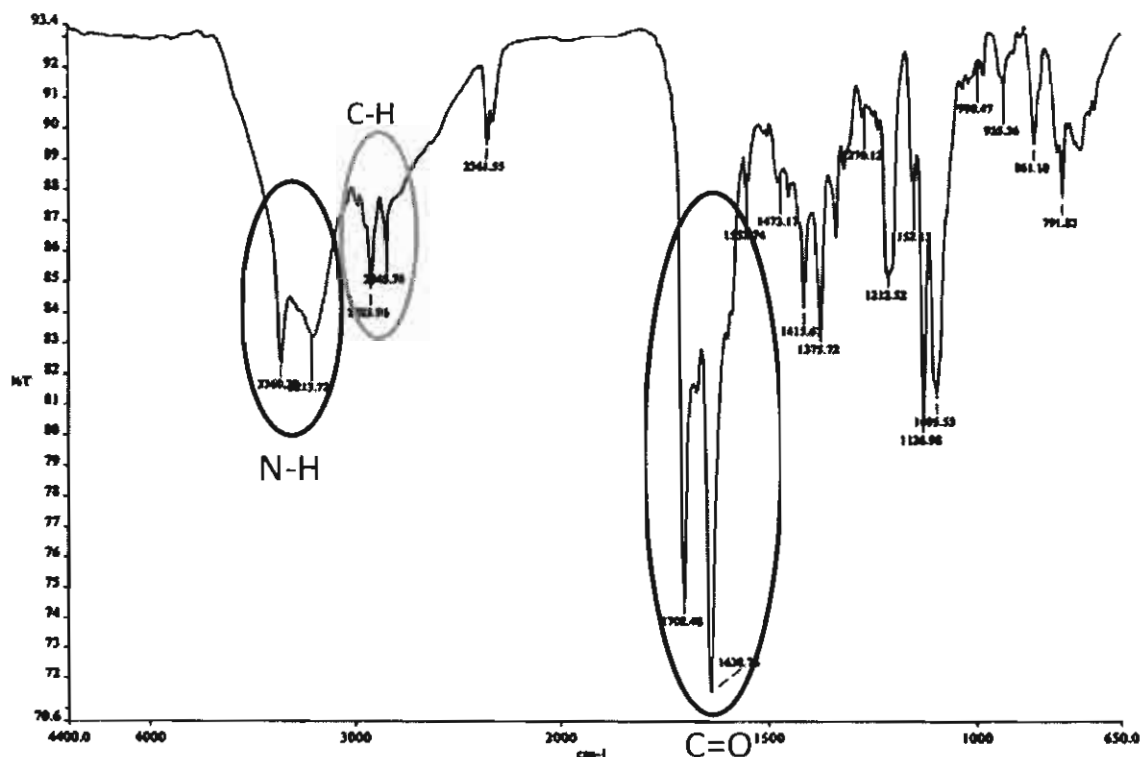


Fig.58: Espectro de IR del compuesto (4), a 72 h de reacción.

7.6.2 Caracterización e identificación por RMN de 1-(2',3'-O-isopropiliden- α -L-talofuranosiluronamida) hipoxantina (4).

Para el análisis de RMN se utilizó como disolvente DMSO, en la **tabla 16** y **figura 59** se muestran los desplazamientos químicos en donde aparecen cada carbono, se realizó la comparación de los valores experimentales con los calculados por el programa Predictor citado, y comparando contra los resultados informados para el compuesto (4) por Jian-qian Wang y col¹. En la **figura 60** se presenta el espectro de RMN ¹H (400.10 MHz).

Tabla 16. Desplazamiento para cada carbono, RMN ¹³C para el compuesto (4).

| No. de Carbono | CHn | Valores obtenidos para (4) (ppm) | Valores informados por Jian-qian et al ¹ (ppm) | Predictor (ppm) |
|----------------|-----------------|----------------------------------|---|-----------------|
| 1 | CH ₃ | 30.43 | 25.2 | 25.12 |
| 2 | CH ₃ | 32.37 | 27.1 | 26.81 |
| 3 | CH | 72.38 | 71.1 | 68.43 |
| 4 | CH | 76.63 | 81.0 | 76.53 |
| 5 | CH | - | 84.1 | 79.32 |
| 6 | CH | 86.45 | 86.4 | 81.62 |
| 7 | CH | 95.06 | 89.7 | 89.644 |
| 8 | C | 118.25 | 113.1 | 113.97 |
| 9 | C | 129.30 | 124.1 | 125.47 |
| 10 | CH | 144.36 | 138.4 | 140.20 |
| 11 | CH | 151.27 | 145.9 | 145.93 |
| 12 | C | - | 147.6 | 145.92 |
| 13 | C | 161.78 | 156.4 | 157.23 |
| 14 | C | 178.20 | 172.7 | 173.05 |

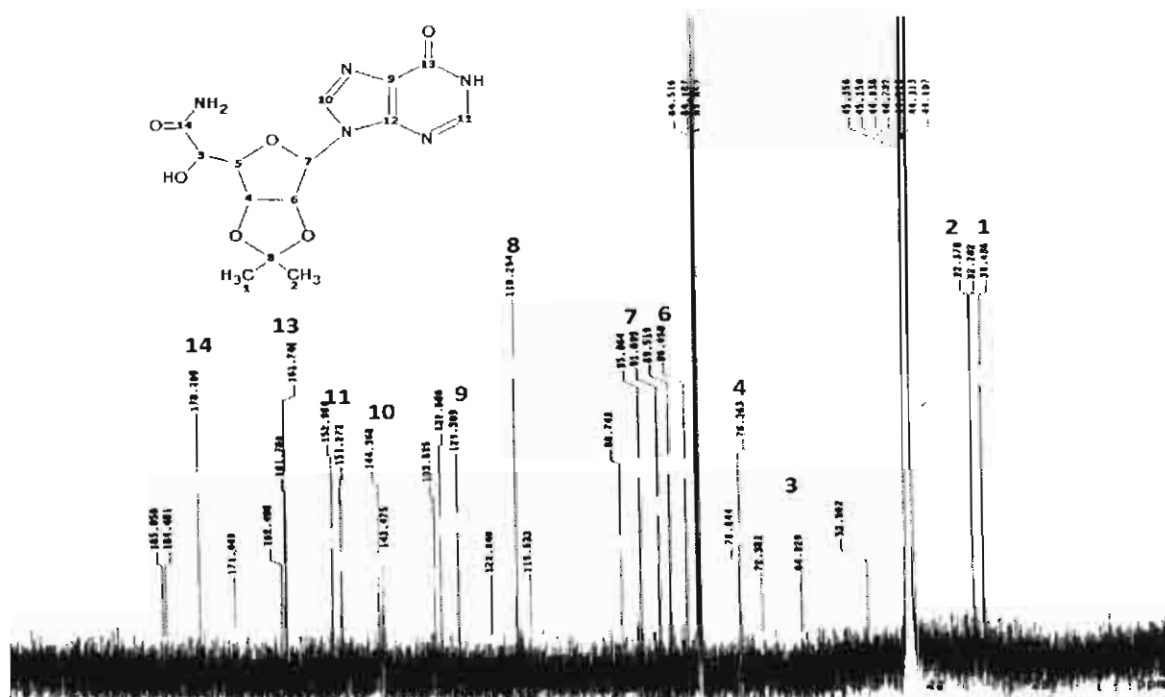


Fig. 59: Espectro de RMN ^{13}C para (4), en DMSO a 400 MHz.

En la **tabla 17** se muestran los desplazamientos para los protones del compuesto (4) y la comparación con los datos referenciados obtenidos previamente para este compuesto y los generados mediante el Predictor.

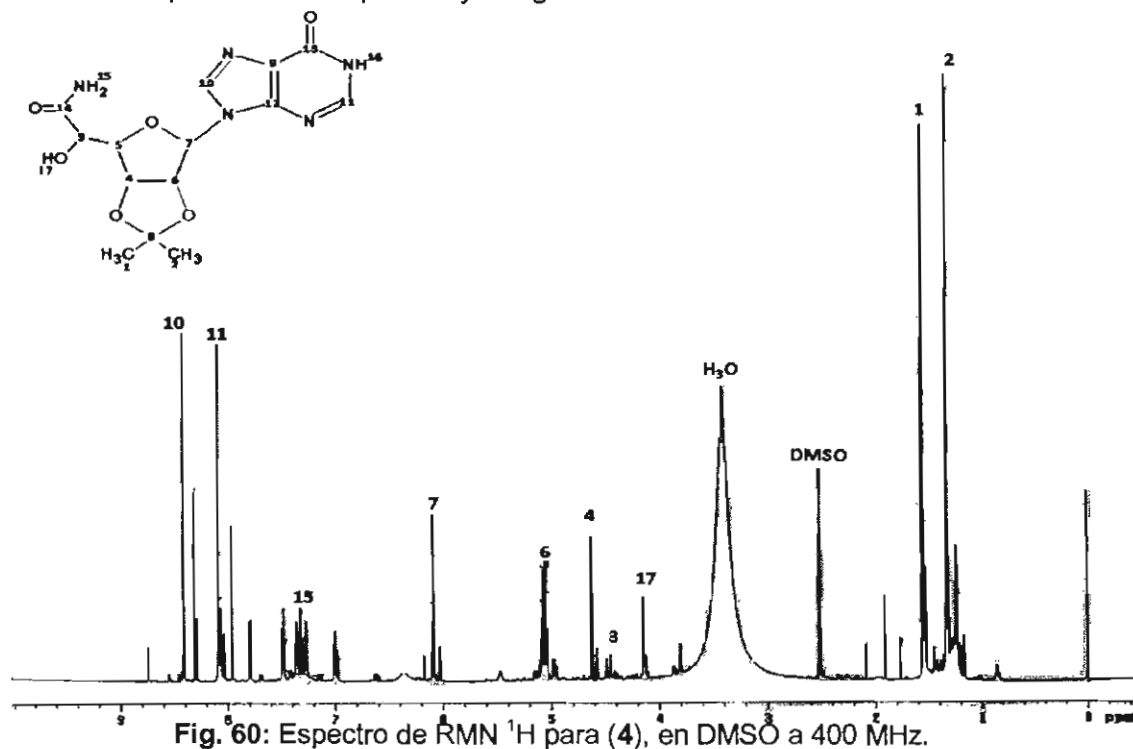
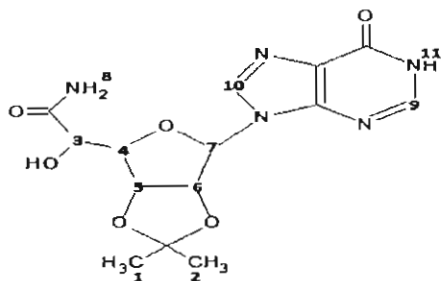


Fig. 60: Espectro de RMN ^1H para (4), en DMSO a 400 MHz.

Tabla 17. Desplazamiento para los hidrógenos, RMN ¹H, para el compuesto (4).



| No. de Protón | CHn | Valores obtenidos para (4) (ppm) | Valores informados por Jian-qian et al 1 (ppm) | Predictor (ppm) |
|---------------|-----------------|----------------------------------|--|-----------------|
| 1 | CH ₃ | 1.32 | 1.27 | 1.38 |
| 2 | CH ₃ | 1.55 | 1.51 | 1.53 |
| 3 | CH | 4.14 | 4.54 | 4.17 |
| 4 | CH | - | 4.95 | 4.19 |
| 5 | CH | 4.62 | 5.04 | 4.73 |
| 6 | CH | - | 6.03 | 4.84 |
| 7 | CH | - | 6.10 | 5.39 |
| 8 | C | 6.09 | 7.24 | 6.00 |
| 9 | C | 7.36 | 7.32 | 7.35 |
| 10 | CH | - | 8.05 | 8.20 |
| 11 | CH | 8.31 | 8.35 | 8.26 |
| 12 | | - | - | 12.63 |

El análisis elaborado por IR y RMN nos permitió determinar la obtención del compuesto encontrándose similitud con los datos reportados en la literatura para la amida (4)., sin embargo el punto de fusión encontrado mostró que a pesar de tenerse el producto, éste se encuentra impuro.

7.7 Síntesis biocatalítica.

Una vez sintetizado el compuesto (2), se llevó a cabo el estudio de la reactividad de éste con oxinitrilasas de los géneros *Prunus*, *Pouteria* y *Annona* con el fin de preparar la correspondiente cianohidrina (3) con elevada pureza óptica.

Sin embargo debido a que se emplearan medios acuosos en la técnica de biocatálisis, es importante enfatizar que la reacción química y la biocatalítica se encuentran en competencia por este motivo se realizó inicialmente un estudio para determinar el % de conversión y %*ed* en la reacción no enzimática.

7.7.1 Reacción no enzimática en la formación de cianohidrininas.

Para el estudio de las biocatálisis se tomó en cuenta que el uso de una pequeña cantidad de solución amortiguadora (2-10%) en un disolvente orgánico inmisible es la metodología habitual para las reacciones catalizadas por las oxinitrilasas. Sin embargo, diversos trabajos han establecido que debido a que la adición química de ión cianuro transcurre en la fase acuosa y de manera espontánea, este punto se debe considerar clave en el proceso de biocatálisis, por lo que fue necesario tener un control químico para determinar además, el % de conversión y el % *ed*, la cantidad de HCN que se añade al aldehído por la reacción química que se genera con el empleo de sistemas bifásicos (mezcla de disolvente orgánico y solución amortiguadora de KCN/citratos), que en este caso serían utilizados en este proceso. Por lo que se decidió plantear en nuestra metodología la presentación de dos controles químicos: el primero se realizaría con NaCN y NH₄Cl denominado como **método A**, y el segundo fue elaborado empleando sistemas "micro-acuosos" donde se utilizó como disolvente orgánico éter diisopropílico/solución amortiguadora de KCN/citratos 1N a pH 4 y 5 el cual se denominó como **método B**.

7.7.2 Reacción utilizando el método A (control químico A)

Las reacciones químicas se realizaron a 10, 20 y 30°C con NaCN y NH₄Cl, en agua, en la **tabla 18** se muestran los resultados obtenidos, se elaboraron 15 lotes, con 5 repeticiones por cada temperatura utilizada. Las cianohidrinas obtenidas son analizadas por CLAR utilizando una columna quiral OJ-H y por RMN¹H.

Tabla 18. Relación diastereoisomérica por CLAR, RMN¹H; y % de conversión con el **método A** con 113h de reacción.

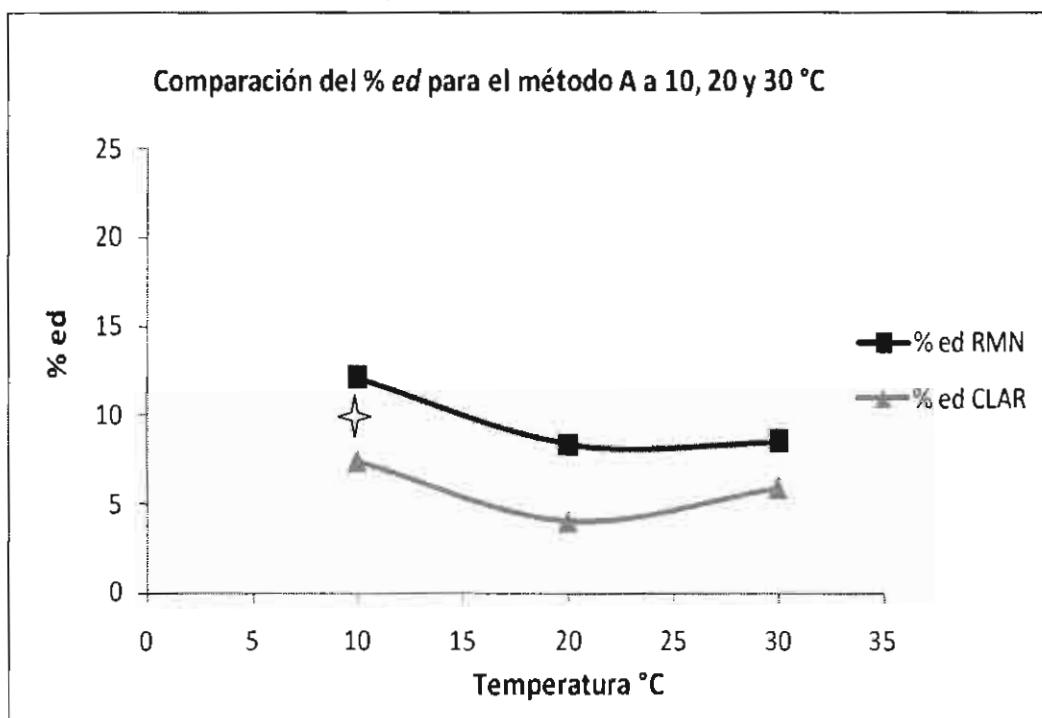
| FUENTE | T (°C) | Relación de diastereoisómeros por CLAR Y RMN ¹ H | | | | % de conversión |
|-----------------|--------|---|-----------|----------|----------|-----------------|
| | | %1 (CLAR) | %2 (CLAR) | %1 (RMN) | %2 (RMN) | |
| Método A | 10 | 52.56 | 47.44 | 53.1 | 46.9 | 98 |
| | 10 | 55.16 | 44.84 | 56.87 | 43.13 | 97 |
| | 10 | 52.68 | 47.32 | 54.83 | 45.17 | 99 |
| | 10 | 53.7 | 46.3 | 55.55 | 44.45 | 99 |
| | 10 | 55.71 | 44.29 | 56.53 | 43.47 | 100 |
| | 20 | 50.57 | 49.43 | 53.7 | 46.3 | 99 |
| | 20 | 54.58 | 45.42 | 54.05 | 45.95 | 100 |
| | 20 | 50.19 | 49.81 | 56.39 | 43.61 | 100 |
| | 20 | 52.34 | 47.66 | 52.63 | 47.37 | 98 |
| | 20 | 52.37 | 47.63 | 54.12 | 45.88 | 100 |
| | 30 | 53.87 | 46.13 | 55.73 | 44.27 | 100 |
| | 30 | 50.76 | 49.24 | 52.8 | 47.2 | 99 |
| | 30 | 53.02 | 46.98 | 54.52 | 45.48 | 100 |
| | 30 | 52.01 | 47.99 | 53.72 | 46.28 | 97 |
| | 30 | 55.1 | 44.9 | 54.47 | 45.53 | 100 |

Como se puede observar en la **tabla 18**, se comparan los dos métodos para cuantificar los excesos diastereoisoméricos, utilizando CLAR y RMN¹H. La relación diastereoisomérica para el **método A**, presentó valores que no exceden el 55% de relación hacia uno de los dos diastereoisómeros generados. Presentando un porcentaje de conversión de 97 a 100% debido al tiempo de reacción. De la relación obtenida, se realizó un análisis estadístico inferencial y se aplicó un

análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de *t* pareada para cada temperatura empleada. Lo anterior con el fin de determinar si existe diferencia estadística entre los resultados obtenidos por CLAR y RMN¹H. En la **tabla 19** se muestra el promedio después de haber calculado el % *ed* para cada temperatura utilizada, tanto por CLAR y RMN¹H. En la **gráfica 1** se observa la dispersión presentada de los datos antes mencionados.

Tabla 19. Promedios del % *ed* en CLAR y RMN utilizando el **método A**

| Fuente | Temperatura (°C) | % <i>ed</i> CLAR | % <i>ed</i> RMN |
|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| Método A | 10 | 7.40 ± 2.85 | 12.3 ± 3.01 |
| | 20 | 4.02 ± 3.49 | 8.35 ± 2.74 |
| | 30 | 5.90 ± 3.33 | 8.49 ± 2.16 |



Gráfica 1: % *ed* para el **método A**, a diferentes temperaturas.

Los resultados del ANOVA muestran que no existe diferencia entre los valores del % *ed* obtenido con ambas técnicas analíticas a las diferentes temperaturas utilizadas. El análisis de *t* pareada mostró que existe una diferencia entre los datos por CLAR y RMN¹H al emplear una temperatura de 10°C (✦, ver **grafica 1**), mientras que con las temperaturas de 20 y 30°C no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre estos valores para ambos métodos.

7.7.3 Reacción utilizando el método B (control químico B) a pH 4 y 5

El empleo de sistemas “micro-acuosos” fue estudiado a diferentes temperaturas: 5, 10, 20 y 30°C con éter diisopropílico y solución amortiguadora de KCN/citratos. Los resultados generados del análisis por CLAR y RMN¹H mostraron un aumento del % *ed* de la cianohidrina con respecto al **método A**. Sin embargo, todas las reacciones en medio orgánico son mucho más lentas que sus homólogas en medios bifásicos, por lo que se requieren tiempos de reacción largos para alcanzar altas conversiones⁶². Sin embargo debido a que las reacciones enzimáticas se llevan a cabo en la fase acuosa, resulta evidente la necesidad de la solución amortiguadora para mantener una elevada actividad enzimática. Se realizaron 14 lotes en las diferentes temperaturas utilizadas para el **método B** empleando solución de KCN/citratos a pH 4. En la **tabla 20** se muestra el % de conversión y la relación de diastereoisómeros para el **método B** a pH 4, y 113h de reacción.

El pH se determinó de acuerdo al óptimo reportado para la actividad de las enzimas oxinitrilasas, el cual está reportado en 5.5, pero a ese pH la reacción química de adición de cianuro al aldehído es significativa, lo cual conduce a una disminución de la actividad óptica del producto, por lo que se disminuye el pH para minimizar la reacción química lo cual conduce a un aumento en la pureza enantiomérica del producto⁹³, por esta razón se decidió emplear pH 4 y 5 y así determinar si existe una supresión de la adición química de HCN.

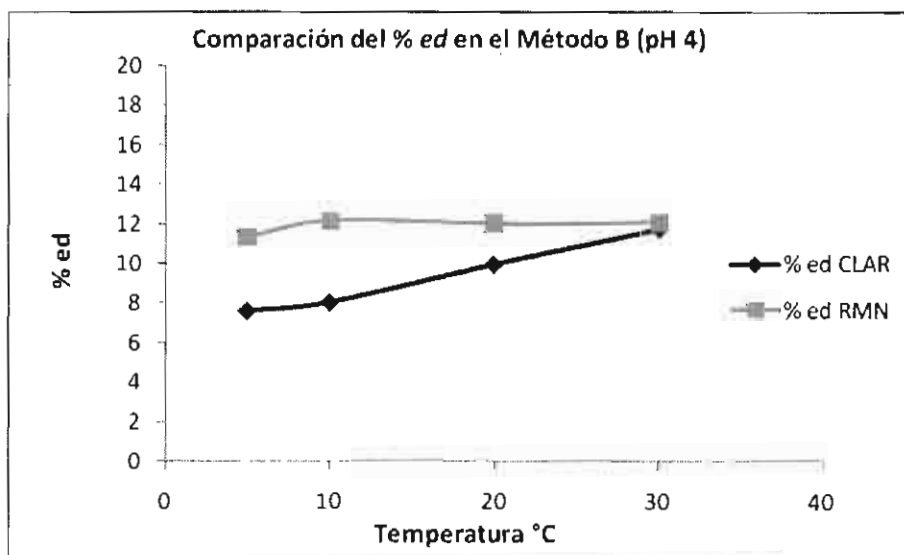
Tabla 20. Relación diastereoisomérica por CLAR, RMN¹H; y % de conversión con el método B a pH 4.

| FUENTE | Temperatura | Relación de diastereoisómeros por CLAR Y RMN ¹ H | | | | % de conversión |
|----------|-------------|---|---------|--------|--------|-----------------|
| | | %1 CLAR | %2 CLAR | %1 RMN | %2 RMN | |
| Método B | 5 | 53.27 | 46.73 | 50.24 | 49.76 | 97 |
| | 5 | 54.59 | 45.41 | 55.66 | 44.34 | 99 |
| | 5 | 55.11 | 44.89 | 58.13 | 41.87 | 95.5 |
| | 5 | 51.76 | 48.24 | 53.2 | 46.8 | 98 |
| | 10 | 52.27 | 47.63 | 54.02 | 45.98 | 96 |
| | 10 | 56.06 | 43.94 | 57.24 | 42.76 | 99 |
| | 10 | 53.17 | 46.83 | 55.67 | 44.33 | 97 |
| | 10 | 52.56 | 47.44 | 55.3 | 44.7 | 94.4 |
| | 20 | 50.81 | 49.19 | 55.06 | 44.94 | 96 |
| | 20 | 53.14 | 46.86 | 56.92 | 43.08 | 95 |
| | 20 | 56.83 | 43.17 | 55.08 | 44.92 | 95 |
| | 30 | 54.27 | 45.73 | 56.52 | 43.48 | 96.4 |
| | 30 | 57.48 | 42.52 | 55.55 | 44.45 | 98 |
| | 30 | 60.69 | 39.31 | 58.13 | 41.87 | 94 |

El análisis de resultados de la relación de diastereoisómeros con solución amortiguadora a pH 4, mostró un aumento en la relación comparándolo con el **método A**, teniendo resultados que van desde 60.69/39.31 a 50.81/49.19 por CLAR y de 58.13/41.87 a 50.24/49.76 por RMN¹H, pero el porcentaje de conversión es ligeramente menor con tiempos de reacción de 113 hrs, igual que el **método A**, sin embargo la disminución no es tan significativa en comparación a la obtenida con el **método A**. En diversos estudios se reduce el tiempo de reacción para disminuir de esta manera la adición química no espontánea, obteniendo % de conversión menores, sin embargo para fines de este proyecto no se realizó de esta manera y solo se determinó el grado de adición química. En la **tabla 21** se muestra el promedio del % *ed* para cada temperatura y en la **gráfica 2** se muestra la dispersión obtenida de los datos calculados.

Tabla 21. Promedios del % *ed* obtenida en CLAR y RMN¹H utilizando el **método B**, pH 4.

| Fuente | T(°C) | % <i>ed</i> CLAR | % <i>ed</i> RMN |
|-----------------|-------|------------------|-----------------|
| Método B | 5 | 7.63 ± 2.99 | 11.32 ± 3.07 |
| | 10 | 8.06 ± 3.76 | 12.14 ± 2.65 |
| | 20 | 9.97 ± 3.07 | 12.00 ± 2.13 |
| | 30 | 11.75 ± 3.30 | 12.07 ± 2.60 |



Gráfica 2: Representación de la distribución de datos obtenida del % *ed* para el **método B** a pH 4, a diferentes temperaturas.

La dispersión de los datos muestra una variación menor al 5% entre los resultados para ambos métodos, esto nos indica que los resultados obtenidos por ambos métodos pueden ser utilizados para la determinación del % *ed*.

De igual forma se realizó la determinación de la relación diastereoisomérica empleando la solución de citratos a pH 5. En la **tabla 22** se muestran las relaciones diastereoisoméricas obtenidas por CLAR y RMN¹H, por el **método B** empleando solución de KCN/citratos a pH 5 y 113h de reacción; se elaboraron 17 lotes a las diferentes temperaturas.

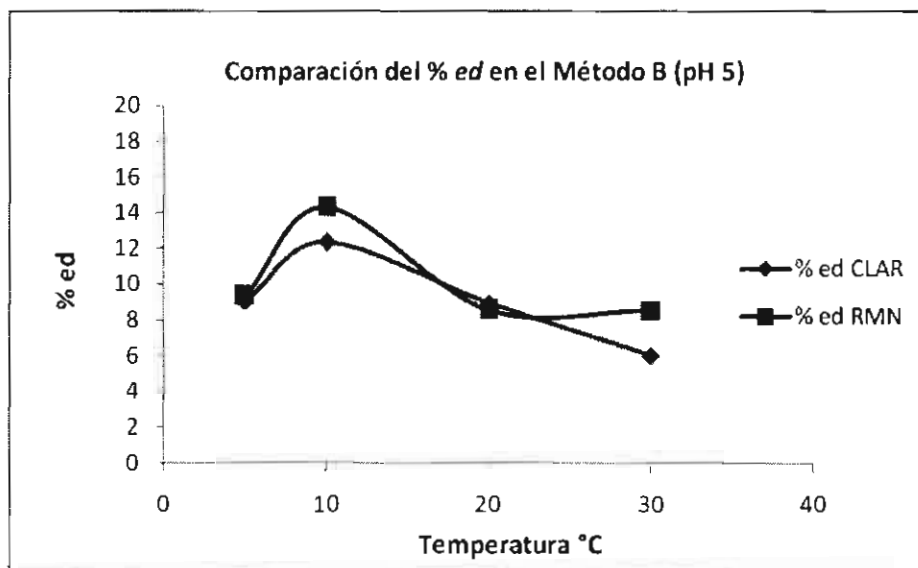
Tabla 22. Relación diastereoisomérica en CLAR, RMN¹H, y % de conversión con el método B a pH 5.

| FUENTE | Temperatura | Relación de diastereoisómeros por CLAR Y RMN ¹ H | | | | % de conversión |
|-----------------|-------------|---|---------|--------|--------|-----------------|
| | | %1 CLAR | %2 CLAR | %1 RMN | %2 RMN | |
| Método B | 5 | 52.45 | 47.55 | 51.25 | 48.75 | 97 |
| | 5 | 56.31 | 43.69 | 58.34 | 41.66 | 97 |
| | 5 | 54.73 | 45.27 | 56.08 | 43.92 | 96 |
| | 5 | 54.66 | 45.34 | 53.02 | 46.98 | 99 |
| | 10 | 55.42 | 44.58 | 53.9 | 46.1 | 95 |
| | 10 | 55.82 | 44.18 | 57.34 | 42.66 | 95 |
| | 10 | 55.96 | 44.04 | 56.81 | 43.19 | 99 |
| | 10 | 56.76 | 43.24 | 57.64 | 42.36 | 98 |
| | 20 | 61.57 | 38.38 | 53.61 | 46.39 | 98 |
| | 20 | 54.91 | 45.09 | 52.83 | 47.17 | 98 |
| | 20 | 55.09 | 44.91 | 57.1 | 42.9 | 95 |
| | 20 | 53.46 | 46.54 | 52.91 | 47.09 | 97 |
| | 30 | 52.92 | 47.08 | 52.63 | 47.37 | 94 |
| | 30 | 51.38 | 48.62 | 52.35 | 47.65 | 94 |
| | 30 | 55.32 | 44.68 | 52.08 | 47.92 | 96 |
| | 30 | 53.42 | 46.58 | 56.25 | 43.75 | 98 |
| | 30 | 54.34 | 45.66 | 55.88 | 44.12 | 95 |

El análisis de resultados de la relación de diastereoisómeros con solución amortiguadora a pH 5, mostró un aumento en la relación obtenida, teniendo resultados que van desde 61.57/38.38 a 51.38/48.62 por CLAR y de 58.34/41.66 a 51.25/48.75 por RMN¹H, el porcentaje de conversión es ligeramente menor que el **método A** y semejantes al **método B** con pH 4. En la **tabla 23** se muestra el promedio del % *ed* para cada temperatura, y en la **gráfica 3** se observa la dispersión obtenida de los datos calculados.

Tabla 23. Promedios del % ed obtenido en CLAR y RMN utilizando el método B, pH 5.

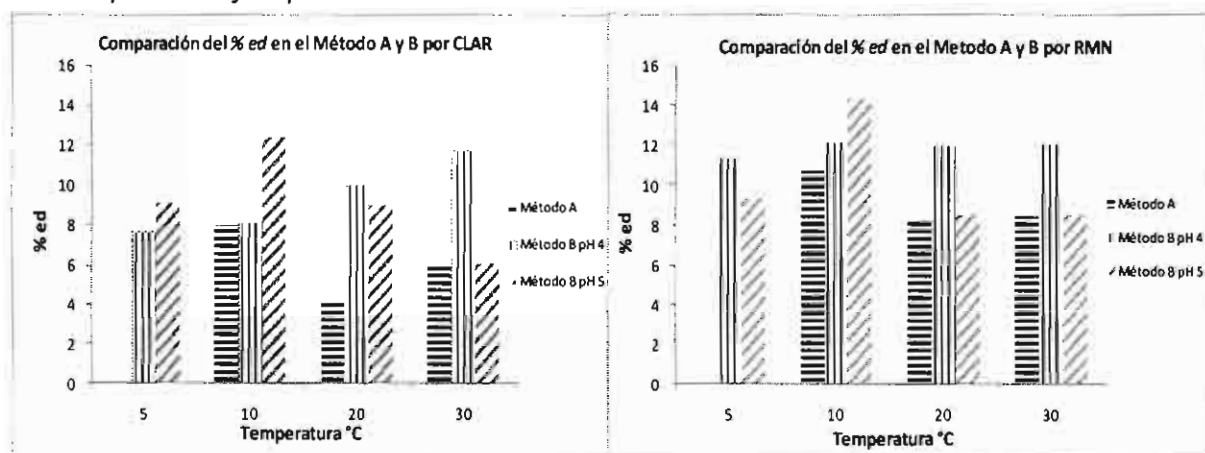
| Fuente | T (°C) | % ed CLAR | % ed RMN ¹ H |
|-----------------|--------|--------------|-------------------------|
| Método B | 5 | 9.07 ± 3.17 | 9.34 ± 3.31 |
| | 10 | 12.36 ± 1.12 | 14.32 ± 3.39 |
| | 20 | 8.97 ± 2.23 | 8.56 ± 4.64 |
| | 30 | 6.03 ± 2.97 | 8.55 ± 4.09 |



Gráfica 3: Representación de la distribución de datos obtenida del % ed para el método B a pH 5, a diferentes temperaturas.

La gráfica de dispersión de datos muestra un incremento en los % ed a 10 °C, teniendo 12.36 y 14.32 para CLAR y RMN¹H respectivamente, de este modo se denota una influencia de la temperatura en la adición espontánea de ión ⁻CN en la reacción de formación de la cianohidrina. Además de esto, se debe considerar el pH de la solución amortiguadora de KCN/citratos, ya que los resultados obtenidos en los controles muestran una influencia en la adición de HCN y por ende en el % ed calculado para los lotes elaborados, siendo ligeramente más alto dicho % a pH 5, con ello se puede especular, mas no afirmar, que a mayor pH la reacción química se favorece.

El análisis estadístico elaborado para el **método B** a pH 4 y pH 5, al momento de realizar la prueba de *t* pareada para las mediciones de % *ed* por CLAR y RMN¹H demostró que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados calculados con una probabilidad menor a 0.5 respecto de las temperaturas (5, 10, 20 y 30° C). Así mismo, el ANOVA realizado para comparar los valores obtenidos utilizando como factores la temperatura y las soluciones amortiguadoras utilizadas en el presente método, demostró ser estadísticamente semejantes en las mediciones. Al mismo tiempo, se realizó una prueba de Tukey-Kramer para determinar la influencia de la temperatura en el % *ed* de la reacción, en la cual se encontró que no existe evidencia de una diferencia en los resultados obtenidos a las temperaturas utilizadas. Finalmente, con este estudio se logró determinar el grado de conversión generado en estas condiciones y la relación diastereoisomérica que presentan las reacciones químicas de adición de HCN en el compuesto (**2**), aldehído derivado de inosina, estos resultados servirán de comparación al realizar la reacción enzimática empleando las oxinitrilasas, esperando en este sentido obtener cianohidrinas con una mayor pureza óptica. En la **gráfica 4** se muestran los histogramas donde se comparan los dos **métodos A** y **B** y la diferencia de % *ed* calculado en cada uno, como se puede observar en ambas gráficas la obtención de un mayor o menor exceso diastereoisomérico está determinado en este caso por dos factores determinantes como son la temperatura y el pH.



Gráfica 4: Comparación entre el % *ed* por CLAR y RMN¹H para los **métodos A y B** (pH 4 y 5) a diferentes temperaturas.

En la **gráfica 4** se puede distinguir que al emplear un sistema "microacuoso" a pH 5 y 10°C se puede obtener un exceso diastereoisomérico del 12 %, en cambio a pH 4 resulta más conveniente utilizar temperaturas más altas para obtener el mismo resultado, poniendo en evidencia factores sobre los que se puede actuar para variar la razón diastereomérica del proceso.

7.8 Proceso biocatalítico

Con base en los resultados obtenidos con los dos métodos químicos y los valores de % *ed* observados, se probó la adición de HCN empleando oxinitrilasas pensando incrementar el % *ed*, al generar un ambiente quiral.

Inicialmente se estudió el comportamiento del aldehído (**2**) frente a la reacción de formación de la cianohidrina enzimática, empleando un sistema bifásico disolvente orgánico/ solución amortiguadora de KCN/citratos 1N a pH 4 y 5. La cantidad de enzima utilizada en los procesos biocatalíticos fue en relación sustrato/biocatalizador 1:1, a diferentes temperaturas 5, 10 y 20°C utilizando como disolvente orgánico éter diisopropílico, ver **figura 61**.

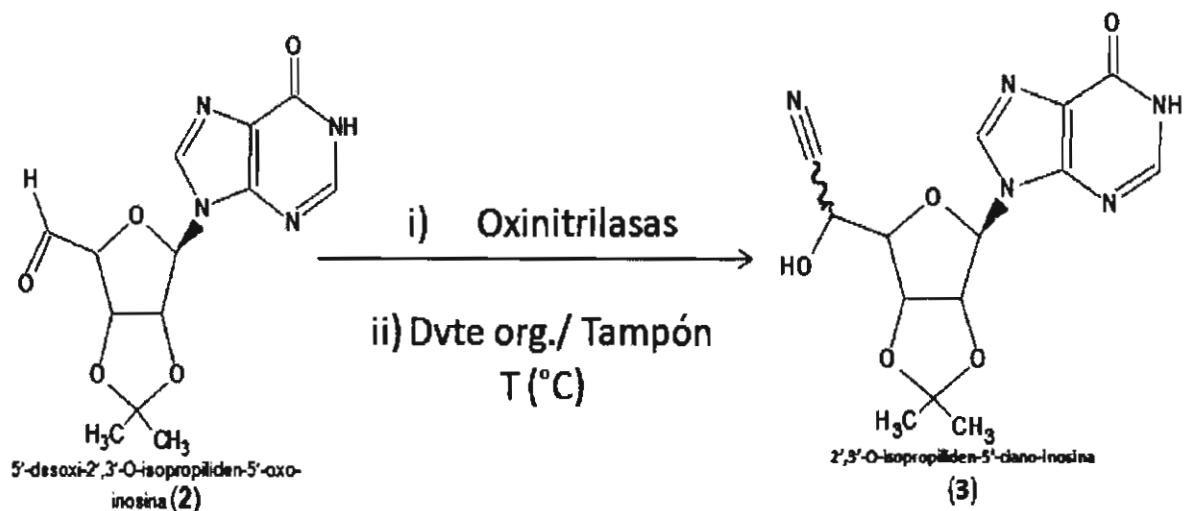


Fig. 61: Esquema general de la síntesis biocatalítica de la cianohidrina (**3**).

Se decidió utilizar para el proceso biocatalítico la solución de citratos a pH 4 y 5, dado que en la literatura⁶¹ se considera como el pH óptimo 5.5 en el cual las oxinitrilasas, obtenidas de fuentes vegetales, muestran su mayor actividad enzimática, el fin de disminuir el pH como se mencionó anteriormente es para disminuir la adición química. Además se probaron a temperaturas de 5, 10 y 20°C debido a que a mayor temperatura se incrementa la adición espontánea (química) de cianuro de hidrógeno al carbonilo, provocando con ello la obtención de un menor % *ed*.

Se elaboraron 76 lotes distribuidos en las diferentes temperaturas, pH's, y la fuente de oxinitrilasa empleada, en las tablas se muestran los promedios de cada biocatalizador teniendo entre 4 y 5 datos para cada uno. En la **figura 62 y 63** se muestra el cromatograma y el espectro de RMN de un experimento biocatalítico con el objetivo de identificar nuevamente los picos y las señales utilizadas en ambas técnicas analíticas para la determinación de la relación diastereoisomérica como del % de conversión.

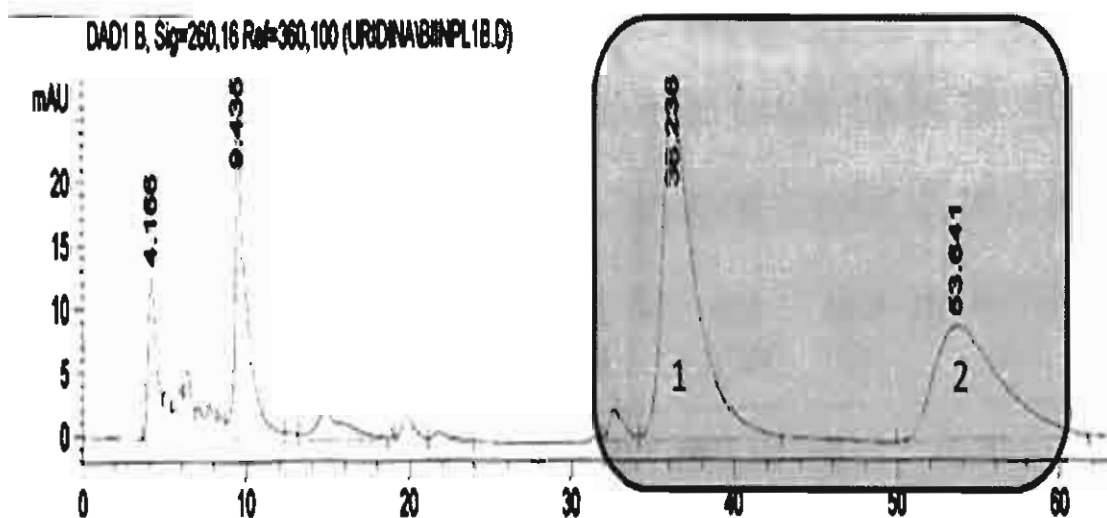


Fig. 62: Cromatograma de la síntesis biocatalítica para el compuesto (3). (1 y 2: Picos utilizados para realizar la determinación del % *ed*), columna OJ-H.

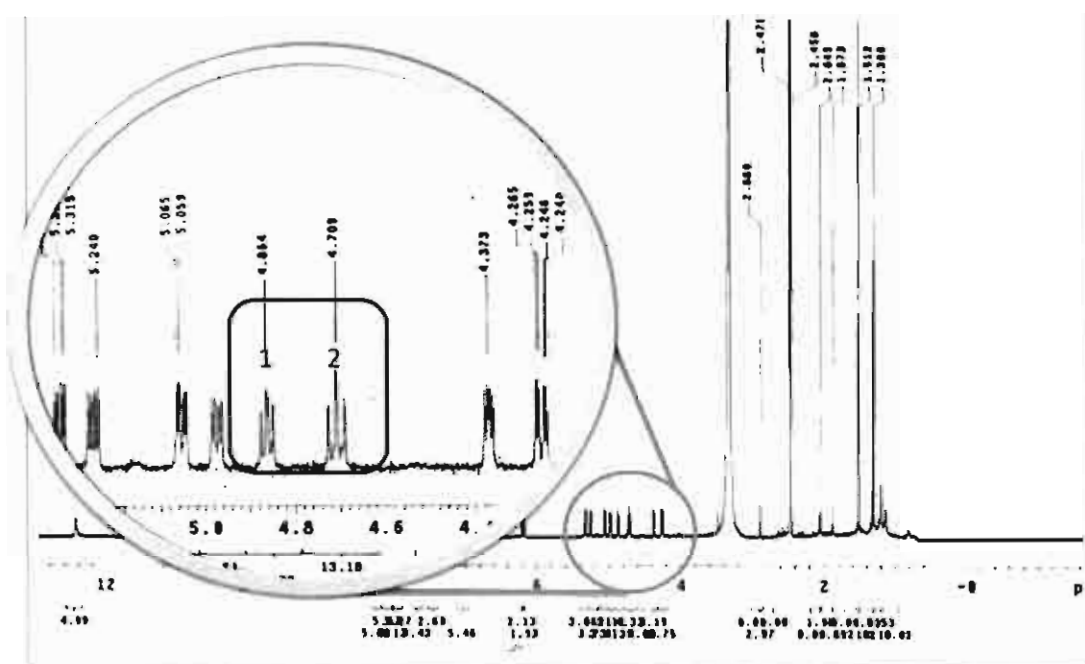


Fig. 63: Espectro de RMN ¹H de la síntesis biocatalítica para el compuesto (3). (1 y 2: señales utilizadas para realizar la determinación del % ed).

Una vez analizada cada muestra tanto por CLAR como por RMN¹H, se procedió a determinar con los datos obtenidos en cuál de las diferentes fuentes vegetales utilizadas, se obtienen cianohidrinas con una mayor pureza óptica. Se utilizó como fuente de oxinitrilasas las semillas de: almendra, capulín, cereza, ciruela, durazno, guanábana y mamey.

A continuación se muestran los resultados para la síntesis biocatalítica de (3) con diferentes biocatalizadores, temperaturas y pH.

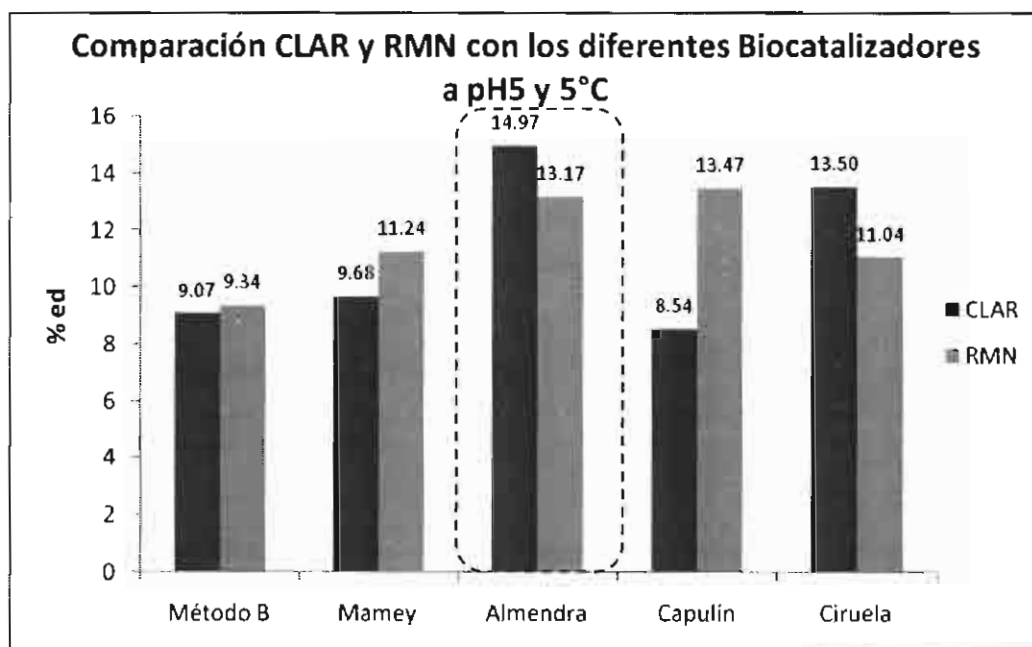
En la **tabla 24** se muestran los resultados de los % ed y el % de conversión, al utilizar solución de citratos a pH 5 y con una temperatura de 5°C, y los diferentes biocatalizadores. Es importante señalar que se buscó determinar el mejor tiempo de reacción, tratando de optimizar la reacción y obtener porcentajes hasta del 100% de conversión, sin embargo el presentar elevados porcentajes de conversión en estos procesos de cianación no suelen ser tan favorables, ya que en ciertos casos se induce el proceso no enzimático. Así mismo en la **gráfica 5** se

puede observar la comparación de los resultados obtenidos con los diferentes biocatalizadores y el **método B** (control del proceso no enzimático).

Tabla 24. % *ed* de la cianohidrina (**3**) en sistemas bifásicos a 5°C y pH 5 con 113 h de reacción, relación sustrato:biocatalizador 1:1.

| Fuente Oxinitrilasas | Equiv. de buffer | % <i>ed</i> CLAR | % <i>ed</i> RMN ¹ H | %C* |
|----------------------|------------------|------------------|--------------------------------|-------|
| método B | 1 | 9.07 | 9.34 | 94-99 |
| almendra | 1 | 14.97 | 13.17 | 92-96 |
| capulín | 1 | 8.54 | 13.47 | 91.96 |
| ciruela | 1 | 13.50 | 11.04 | 92.96 |
| mamey | 1 | 9.68 | 11.24 | 96-98 |

* % de conversión.



Gráfica 5: % *ed*, para el método B y cada biocatalizador a pH 5 y 5°C.

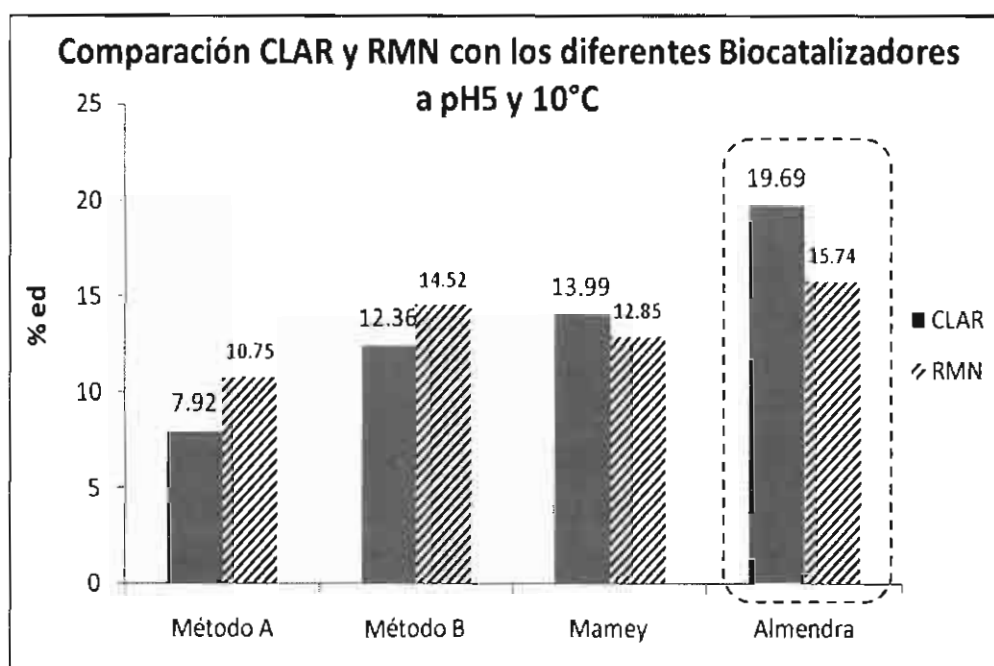
En la **gráfica 5** se puede observar que los biocatalizadores presentan un % *ed* mayor al **método B** (control), sin embargo la inducción no sobrepasa el 15% de *ed*. En este caso el mejor biocatalizador fue la almendra, teniendo una relación de diastereoisómeros un 58.67/41.33 por CLAR y 56.56/43.44 por RMN¹H.

A la temperatura de 10°C hubo un ligero aumento en el % *ed* usando almendra, ver **tabla 25**, presentando un % de *ed* de 19.69 y 15.74 por CLAR y RMN¹H respectivamente, ver **gráfica 6** para comparar los tres métodos.

Tabla 25. % *ed* de la cianohidrina (**3**) en sistemas bifásicos a 10°C y pH 5 con 113 h de reacción, relación sustrato:biocatalizador 1:1.

| Fuente | Equiv. de buffer | % <i>ed</i> CLAR | % <i>ed</i> RMN ¹ H | %C* |
|----------|------------------|------------------|--------------------------------|--------|
| método A | 1 | 7.92 | 10.75 | 97-100 |
| método B | 1 | 12.36 | 14.32 | 94-99 |
| almendra | 1 | 19.69 | 15.74 | 89-96 |
| mamey | 1 | 13.49 | 12.85 | 94-98 |

* % de conversión



Gráfica 6: Representación del % *ed*, para cada método y biocatalizador a pH 5 y 10°C.

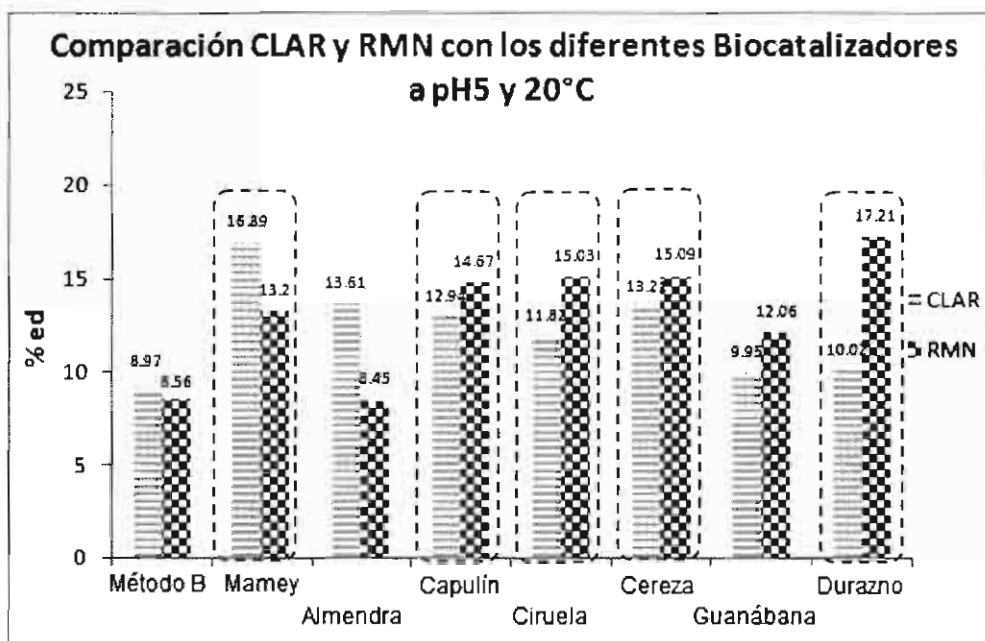
En la **gráfica 6** podemos observar que a 10°C y pH 5, el mejor biocatalizador en estas condiciones es la almendra, incrementándose en un 5% el exceso diastereoisomérico y presentando una relación de diastereoisómeros por CLAR de 61.38/38.62 y por RMN de 57.26/42.74, mientras que con mamey no se observó una inducción, ya que presenta un % *ed* similar al obtenido con el método B, en este caso la relación de diastereoisómeros para mamey fue de 56.40/43.60 y 55.30/44.70 por CLAR y RMN respectivamente.

A 20°C los excesos diastereoisoméricos sólo fueron mayores en un 5-8%, al obtenido con los **métodos A y B**, ver **tabla 26**. Los biocatalizadores que presentaron los mejores excesos fueron: mamey y durazno; 16.89% *ed* por CLAR y 13.20% *ed* en RMN¹H. En este caso se evidenció una mayor dispersión en la relación diastereoisomérica calculada por ambas técnicas analíticas, lo cual se atribuye al proceso de adición no enzimático.

Tabla 26. % *ed* de la cianohidrina (**3**) en sistemas bifásicos a 20°C y pH5 con 113 h de reacción, relación sustrato:biocatalizador 1:1.

| Fuente | Equiv. de buffer | % <i>ed</i> CLAR | % <i>ed</i> RMN¹H | %C* |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------------|------------|
| método A | 1 | 6.19 | 7.2 | 97-100 |
| método B | 1 | 8.97 | 8.5 | 94-99 |
| almendra | 1 | 13.61 | 8.45 | 95-98 |
| capulín | 1 | 12.94 | 14.67 | 89-94 |
| cereza | 1 | 13.21 | 15.09 | 85-93 |
| ciruela | 1 | 11.82 | 15.03 | 85-93 |
| durazno | 1 | 10.02 | 17.21 | 93-96 |
| guanábana | 1 | 9.95 | 12.06 | 86-92 |
| mamey | 1 | 16.89 | 13.20 | 95-98 |

* % de conversión.



Gráfica 7: % ed, para el método B y cada biocatalizador a pH 5, 20°C.

En la **gráfica 7**, podemos observar que mamey, capulín, ciruela, cereza y durazno son los biocatalizadores que generaron un mayor exceso diastereoisomérico al encontrado en el **método B**, las relaciones de diastereoisómeros para los biocatalizadores son las siguientes: mamey 63.22/36.77 por CLAR y 59.13/40.87 RMN¹H; mientras que para durazno 61.87/38.13 y 63.73/36.27 por CLAR y RMN¹H respectivamente.

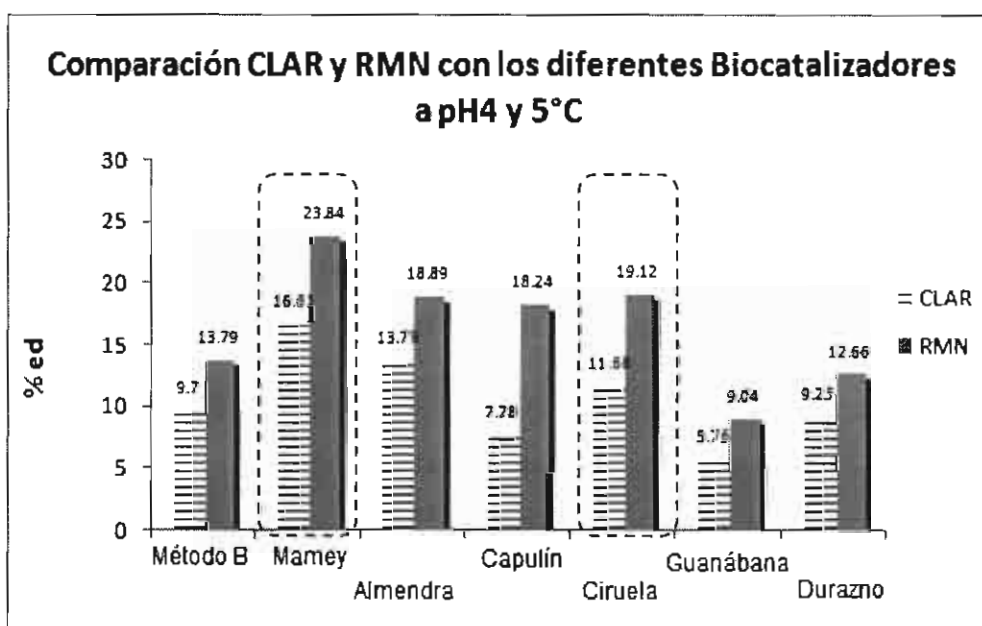
Al disminuir el pH de la solución amortiguadora de KCN/citratos a 4, se esperaba obtener un mayor % ed, ya que la adición química de HCN es menor y por lo tanto la adición enzimática se vería favorecida, sin embargo los resultados no fueron tan favorables, se logró obtener un incremento con respecto al **método B** a pH 4 (control) del orden de 6% de ed por CLAR y de un 10% de ed por RMN¹H.

Los mejores % ed fueron con los biocatalizadores de ciruela y mamey. Se obtuvo para ciruela un 11.66 y 19.12% ed por CLAR y RMN¹H y para mamey 16.61 y 23.84 % ed por CLAR y RMN¹H respectivamente, ver **tabla 27 y gráfica 8**.

Tabla 27. % ed de la cianohidrina (**3**) en sistemas bifásicos a 5°C y pH 4 con 113 h de reacción, relación sustrato:biocatalizador 1:1.

| Fuente | Equiv. de buffer | % ed CLAR | % ed RMN | %C* |
|-----------|------------------|-----------|----------|-------|
| método B | 1 | 9.7 | 13.79 | 94-99 |
| almendra | 1 | 7.78 | 18.89 | 94-99 |
| capulín | 1 | 7.78 | 18.24 | 93-97 |
| ciruela | 1 | 11.66 | 19.12 | 94-99 |
| durazno | 1 | 5.76 | 9.04 | 85-90 |
| guanábana | 1 | 9.25 | 12.66 | 84-92 |
| mamey | 1 | 16.61 | 23.84 | 96-98 |

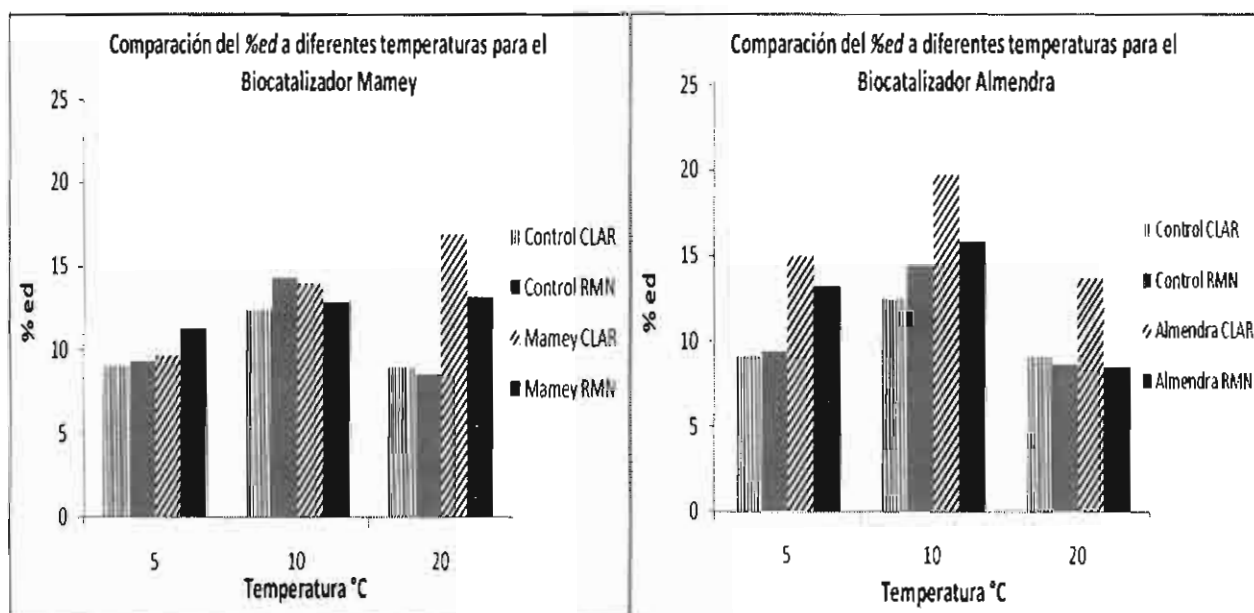
* % de conversión.



Gráfica 8: % ed, para el método B y cada biocatalizador a pH 4 y 5°C

A pesar de haber presentado una mayor inducción el proceso enzimático con respecto a la registrada en los controles (**métodos A y B**), los excesos diastereoisoméricos obtenidos en todos los casos fueron bajos. La razón de la baja pureza óptica de las cianohidrinias obtenidas, puede ser atribuida a la adición química no deseada de cianuro de hidrógeno, producida por el carácter hidrofílico

que presentan los sustratos, ya que a mayor contacto entre la fase acuosa del sistema bifásico y el sustrato empleado, la posibilidad que se presente la reacción química espontánea provocara en primera instancia menores % *ed*, por tal motivo es necesario buscar y determinar sistemas donde se suprima completamente esta adición química asegurando la inducción asimétrica por parte de las enzimas oxinitrilasas utilizadas. En la **gráfica 9** se compara el % *ed* para los biocatalizadores que mostraron una mayor inducción asimétrica con el aldehído (2) a distintas temperaturas y pH 5.



Gráfica 9: % *ed*, por CLAR y RMN¹H, a diferentes temperaturas para los biocatalizadores mamey y almendra a pH 5.

En este caso, se puede observar que para el biocatalizador de harina de almendra presenta mejores % *ed* a temperaturas menores a 20°C; caso contrario con el biocatalizador de harina de mamey, el cual mostró mejores resultados utilizando una temperatura de 20°C. Con esto sólo se pone en evidencia la sensibilidad que tienen las reacciones biocatalizadas, dado que los procesos enzimáticos son susceptibles a presentar inactivación de acuerdo a las condiciones a las que se vean expuestos y a la naturaleza de la fuente de oxinitrilasas, presentándose variación de la actividad.

8. CONCLUSIONES

Se realizó la síntesis del compuesto IBX, empleando la técnica descrita por Marco Frigerio y colaboradores, obteniéndose el compuesto con mayor pureza y en menor tiempo, comparándolo con el procedimiento de bromato de potasio (KBrO_3). El compuesto IBX presenta ventajas debido a sus propiedades fisicoquímicas, mostrando baja solubilidad en la mayoría de los disolventes utilizados en síntesis orgánica. Este compuesto fue utilizado para realizar la oxidación del compuesto 2',3'-O-isopropilideninosina al aldehído correspondiente 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (**2**) el cual se obtuvo con un rendimiento de 91.34 % empleando CH_3CN como disolvente y 3 eq. de IBX, además de corroborarse mediante técnicas espectroscópicas la obtención del compuesto, sin embargo (**2**) presenta baja solubilidad teniéndose con ello dificultad en la obtención de un producto completamente puro.

La síntesis de la cianohidrina de inosina, 2', 3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (**3**) se llevó a cabo por dos métodos. El primero empleando $\text{NaCN-NH}_4\text{Cl}$; y el segundo usando un sistema micro-acuoso con buffer de KCN/citratos en éter diisopropílico. En ambos se obtuvo un alto % de conversión, pero baja pureza óptica. Con estos métodos se pudo determinar los % de conversión y de exceso diastereoisomérico, parámetros que sirvieron para determinar en el proceso biocatalítico la inducción por parte de los biocatalizadores seleccionados.

Con respecto a la síntesis de la amida de inosina (**4**) se logró la obtención con una baja pureza óptica, evidenciada por el alto rango obtenido en el punto de fusión y la identificación de impurezas por RMN, sin embargo fue posible su obtención usando peróxido de hidrógeno al 30% (6mmol).

Se desarrollaron los métodos analíticos: por CLAR y RMN, para los siguientes compuestos: IBX, ácido 2-iodobenzoico, oxone, 2',3'-O-isopropilideninosina (**1**), 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (**2**) y 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (**3**). Con los resultados obtenidos se confirma que al emplear Resonancia Magnética Nuclear y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (empleando una columna quiral), son métodos analíticos adecuados para cuantificar el % de

exceso diastereoisomérico, ya que los resultados obtenidos por ambos métodos son confiables y reproducibles sin diferencia estadísticamente significativa entre ambos. Lo anterior permite contar con dos métodos rápidos y no destructivos para la cuantificación del % *ed*.

Finalmente el compuesto 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-inosina (**2**), resultó ser un sustrato útil en las reacciones de cianación catalizadas por oxinitrilasas empleando diversas fuentes vegetales de los géneros *Prunus*, *Pouteria* y *Annona*. Los bajos excesos diastereoisoméricos obtenidos en el compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-inosina (**3**), se atribuyen principalmente a la adición química no enzimática (espontánea), que se lleva a cabo en competencia con la reacción enzimática de cianación.

De este modo se debe buscar minimizar la reacción química en los procesos biocatalíticos, logrando así la obtención de cianohidrinas con una mayor pureza óptica. El control químico elaborado para la reacción no enzimática, permitió evidenciar la inducción generada en las diferentes fuentes de oxinitrilasas empleadas, teniendo los mejores resultados con los biocatalizadores de harinas de: almendra (*Prunus dulcis*) y mamey (*Pouteria sapota*). El biocatalizador de almendra presentó los mayores excesos diastereoisoméricos empleando temperaturas de 5 y 10°C, mientras que para el biocatalizador mamey la mayor inducción asimétrica se presentó al utilizar una temperatura de 20°C.

Es importante mencionar la selectividad que presentan este tipo de reacciones, pudiendo ser empleadas en la obtención de compuestos enantiopuros, para elaborar compuestos con alto valor agregado, útiles en la producción de diversos productos farmacéuticos desde antibióticos hasta antivirales, utilizados para combatir diversas infecciones. Sin embargo las reacciones biocatalíticas son susceptibles a diversos factores, encontrándose que modificaciones en la temperatura y pH de la reacción son fundamentales para conseguir una mayor o menor pureza óptica, sin dejar de lado la concentración de la solución amortiguadora empleada con respecto al aldehído (**2**), poniendo en evidencia la selectividad que presentan las reacciones catalizadas por enzimas.

9. REFERENCIAS

1. Wang J., Archer C., Li J., Bott S., Wang P.; *Thermophilic esterases/lipases as an effective tool for the resolution of nucleoside diastereoisomers: convenient one-pot synthesis of α -L-taluronamide and β -D-alluronamide nucleosides*. J. Org. Chem., **1998**, 63, 4850-4853.
2. Casanova E., Hernández A., Priego E., Liekens S., Camarasa M., Balzarini J., Pérez M.; *5'-O-tritylinosine and analogues as allosteric inhibitors of human thymidine phosphorylase*. J. Med. Chem., **2006**, 49, 5562-5570.
3. Ichikawa S., Matsuda A.; *Synthesis of complex nucleoside antibiotics*. Nucleos. Nucleot. Nucl., 2005, 24, pp 319-329.
4. Pérez Méndez H.I.; *Oxidación microbiológica de alcoholes por Nocardia corallina B-276*, Tesis Doctoral, **1998**, México, Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco, 3-23.
5. <http://www.tciamerica.com/usefulInfo/.../L3014E.pdf>, *Nucleosides, nucleotides & related reagents*, Fecha de consulta 07-Nov- 2011.
6. Sánchez J., Sinisterra J.; *Biocatálisis aplicada a la química farmacéutica*. An. R. Acad. Nac. Farm., **2007**, 73, 1199-1236.
7. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf, *Métodos fisicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de ácidos nucleicos*, Fecha de consulta 16-Nov-2011
8. Díaz J., Juarez M.; *Bioquímica: un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida*. **2006**, McGraw-Hill, México, 270-300.
9. Ferrero M., Gotor V.; *Biocatalytic selective modifications of conventional nucleosides, carbocyclic nucleosides, and C-nucleosides*. Chem. Rev. **2000**, 100, 4319-4347.
10. Faber K.; *Biotransformation in organic chemistry*. **1997**, Springer, Berlín, 2-9.
11. Bookser B., Raffaele N.; *High-throughput synthesis of hepdirect prodrugs of nucleoside monophosphates*. J. Comb. Chem., **2008**, 10, 567-572.
12. De Clercq E., Field H.; *Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy*. Brit. J. Pharmacol., **2006**, 147, 1-11.

13. Knapp S.; *Synthesis of complex nucleoside antibiotics*. Chem. Rev., 1995, 95(6), 1859-1876.
14. Gentle C., Harrison S., Inukai M., Bugg T.; *Structure–function studies on nucleoside antibiotic mureidomycin A: synthesis of 5'-functionalised uridine models*. J. Chem. Soc., Perkin Trans., **1999**, 1, 1287–1294.
15. http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/2_AF_VIH_2002/2_farmacologia_antirretrovirales.pdf, *Farmacología de los antirretrovirales*. Fecha de consulta 9-Nov-2011.
16. Smith D., Martin J., Klumpp K., Baker S., Blomgren P., Devos R., Granycome C., Hang J., Hobbs C., Jiang W., Laxton C., Le Pogam S., Leveque V., Ma H., Maile G., Merrett J., Pichota A., Sarma K., Smith M., Swallow S., Symons J., Vesey D., Najera I., Cammack N.; *Design, synthesis, and antiviral properties of 40-substituted ribonucleosides as inhibitors of hepatitis C virus replication: The discovery of R1479*. Bioorg. Med. Chem. Lett., **2007**, 17, 2570–2576.
17. Devos R., Hobbs C., Jiang W., Martin J., Merrett J., Najera I.; *Uso de derivados de nucleósidos antivirales para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones de hepatitis C*, **2004**, España, Compañía: F. Hoffmann-La Roche AG., Pat ES2 272 732T3.
18. Boyd M.; *Análogos de nucleósidos en la terapia combinada de infecciones por herpes simples*, **1998**, España, Compañía: Novartis International Pharmaceutical Ltd., Pat. ES2 199 339T3.
19. Miyasaka T., Tanaka H., De Clercq E., Baba M., Walker R., Ubasawa M.; *Derivados de nucleósidos de aciclovir 6-sustituidos y agente antivírico que los contiene como su ingrediente activo*, **1991**, España, Compañía: Mitsubishi Chemical Corporation, Pat. 2 134 758T3.
20. Hostetler K.; *Antiviral liponucleosides: treatment of hepatitis B*, **1993**, USA Pat. WO 93/00910.

21. Mcguigan C., Whitchurch C., Mills K., Pentyrch C., Congiatu C., Porto T.; *Phosphoramidate derivatives of nucleoside compounds for use in the treatment of cancer*, **2010**, Compañía: Cardiff Protides Limited, European, Pat. EP 1 866 324 B1.
22. Martín Ortiz L.; *Explorando la química de los iluros de azufre en la síntesis de antibióticos tipo nucleósido: aproximación sintética de liposidomicinas y muraimicinas*. Tesis Doctoral, **2006**, España, Universidad de Málaga, 19-33.
23. Spork A., Koppermann S., Dittrich B., Herbst-Irmer R., Ducho C.; *Efficient synthesis of the core structure of muraymycin and caprazamycin nucleoside antibiotics based on a stereochemically revised sulfur ylide reaction*. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 763-766.
24. Spork A., Koppermann S., Ducho C.; *Improved convergent synthesis of 5'-epi-analogues of muraymycin nucleoside antibiotics*. *Synlett.*, **2009**, 15, 2503-2507.
25. Winn M., Goss R., Kimurab K., Bugg T.; *Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: Recent advances in structure–function studies and nucleoside biosynthesis*. *Nat. Prod. Rep.*, **2010**, 27, 279-304.
26. Kimura K., Bugg T.; *Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis*. *Nat. Prod. Rep.*, **2003**, 20, 252–273.
27. Bhaket P., Stauffer C., Datta A.; *Complex peptidyl nucleoside antibiotics: efficient syntheses of the glycosyl nucleoside amino acid cores*. *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 8594-8601.
28. Stauffer C., Bhaket P., Fothergill A., Rinaldi M., Datta A., *Total synthesis and antifungal activity of a carbohydrate ring-expanded pyranosyl nucleoside analogue of nikkomycin B*. *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 9991-9997.
29. <http://www.medcutan-ila.org/articulos/2004/6/pdf/04-079.pdf>, *Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología*. Fecha de consulta 10-Nov-2011
30. Lenardon M., Munro C., Gow N.; *Chitin synthesis and fungal pathogenesis*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2010**, 13, 416–423.
31. Anderson M., Roemer T., Fabrey R.; *Cancer and infectious diseases*. *Annu. Rep. Med. Chem.*, **2003**, Cap. 17, 163-172.

32. Plant A., Thompson P., Williams D.; *Stereoselective synthesis of novel uracil polyoxin C conjugates as substrate analogues of chitin synthase*. J. Org. Chem., **2008**, 73, 3714-3724.
33. Fiandor J., Garcia M., G. De las Heras F., Medez P.; *Synthesis of modified polyoxins by reaction of uridine-5'-aldehyde with trimethylsilyl cyanide and amino acids*. Synthesis, **1987**, 978-981.
34. Soriano F., Liaudet L., Marton A., Haskó G., Batista C., Deitch E., Szabó C.; *Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock*. Crit. Care Med., **2001**, 29, 703-708.
35. Idzko M., Panther E., Bremer H., Windisch W, Sorichter S., Herouy A., Elsner P., Mockenhaupt M., Girolomoni G., Norgauer J.; *Inosine stimulates chemotaxis, Ca²⁺-transients and actin polymerization in immature human dendritic cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism independent of adenosine receptors*. J. Cell. Physiol., **2004**, 199, 149-156.
36. Liao J., Thakur SA., Zalinger ZB., Gerrish KE.; *Inosine-containing RNA is a novel innate immune recognition element and reduces RSV infection*. PLoS ONE, **2011**, 6(10), 1-14.
37. Altona C., Sundaralingam M.; *Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. A new description using the concept of pseudorotation*. J. Am. Chem. Soc., **1972**, 94, 8205-8212.
38. Ratsino E., Sokolov L.; *Inosine - properties and chemical modification (survey)*. Pharm. Chem. J., **1978**, 12, 1289-1298
39. Jiménez V., Láinez M., Martínez E., Matas A., Nieto M., Recalde J.; *Medicamentos esteroisómeros: el cuento del cambio quiral*. Bol. Ter. Andal., **2008**, 24, 18-20.
40. <http://es.scribd.com/doc/56091001/Analysis-of-Chiral-Organic-Molecules-Methodology-and-Applications>, *Analysis of chiral organic molecules methodology and applications*. Fecha de consulta 07-Nov-2011.

41. Gao X., Chen W., Zhu G., Yi R., Wu Z., Xu P., Zhao Y.; *Fast separation of antiviral nucleoside phosphoramidate and H-phosphonate diastereoisomers by reversed-phase liquid chromatography*. J. Chromatogr. A., **2011**, 1218, 1416-1422.
42. Murray R., Mayes P., Granner D., Rodwell.; *Bioquímica de Harper*. 14 Ed., **1997**, Manual Moderno, México, 419-428.
43. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqu/vertiz_k_w/capitulo2.pdf
Quiralidad, Fecha de consulta 07-Nov-2011.
44. Preite M.; *Determinación de excesos enantioméricos y asignación de configuraciones absolutas por análisis de resonancia magnética nuclear*. *Quím. Nova*, **1994**, 17, 137-151.
45. Collado Lozano M.; *Aminoácidos naturales como materiales de partida en la preparación de nuevos reactivos y catalizadores enantioselectivos*. Tesis Doctoral, **2004**, España, Universitat Jaume I de Castellón, 4-15.
46. Patel R.; *Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis*. *Coordin. Chem. Rev.*, **2008**, 252, 659-701.
47. Lye G., Ayazi-Shamlou P., Baganz F., Dalby P., Woodley J.; *Accelerated design of bioconversion processes using automated microscale processing techniques*. *Trends Biotechnol.*, **2003**, 21, 29-37.
48. Chartrain M., Mathre D., Reamer Z., Patel Z., Shinkai I., Greasham R.; *Asymmetric bioreduction of cyclohexylphenyl ketone to its corresponding alcohol (+)-cyclohexylphenyl alcohol by the yeast *Candida magnoliae* MY 1785*. *J. Ferment. Bioeng.*, **1997**, 83, 395-396.
49. Luna H.; *Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos*. *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **2004**, 48, 211-219.
50. Pollard D., Woodley J.; *Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now*. *Trends Biotechnol.*, **2000**, 25, 66-73.
51. Luna H., Manjarrez N., Pérez H.I., Solís A.; *Nuevas fuentes potenciales de enzimas oxinitrilasas*. *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **1997**, 41-3, pp 113-114.

52. Lehninger A., Cox M., Nelson D., *Lehninger Principios de Bioquímica*, 4ª Ed., 2006, Omega, 136-230.
53. Antonio Blanco.; *Química Biológica*, 8ª Ed., 2004, El Ateneo, México, 125-240.
54. Wang A., Zhang F., Huang L., Yin X., Li H., Wang Q., Zeng Z., Xie T.; *New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids*. J. Med. Plants., 2010, 4, 847-856.
55. Monsalve L.N.; *Biocatálisis aplicada a reacciones de esteroides, terpenos y dicetonas y a la síntesis de poliamidoaminas lineales*. Tesis Doctoral, 2009, Argentina, Universidad de Buenos Aires, 3-18.
56. <http://es.scribd.com/doc/43485405/BIOTECNOLOGIA>, Fecha de consulta 9-Nov-2011.
57. <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r70428.PDF>, *Enzimas con aplicación Industrial*, Fecha de consulta 10-Nov-2001.
58. Solís A., Luna H., Pérez H.I., Manjarrez N., Sánchez R., Velasco M.A., Castillo R.; *New sources of (R)-oxynitrilase: capulin (Prunus capuli) and mamey (Mammea americana)*. Biotechnol. Lett., 1998, 20(12), 1183–1185.
59. Dean V., Zabelinskaja-Mackova A y Griengl H.; *Oxynitrilases for asymmetric C–C bond formation*. Curr. Opin. Chem. Biol., 2002, 4, 103–109.
60. Griengl H., Schwab H., Fechter M. *The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases*. Tibitech, 2002, 18, 252-256.
61. Gregory R.; *Cyanohydrins in nature and the laboratory: biology, preparations, and synthetic applications*. Chem. Rev., 1999, 99, 3649-3682.
62. Gonzalo C.; *Biotransformaciones en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéutico*. Tesis Doctoral, 2003, España, Universidad de Oviedo, 2-160.
63. Gotor V.; *Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals*. Org Process. Res. Dev., 2002, 6, 420-426.

64. Moore L., Grange L., Catalytic conversión of nitriles to amides. **1972**, USA, Compañía: Nalco Chemical, Pat. 840,818., 3,670,620.
65. Kim E., Kim H., Kim J.; *An efficient Pd-catalyzed hydration of nitrile with acetaldoxime*. Tetrahedron Lett., **2009**, 50, 2973-2975.
66. http://www.ark.chem.ufl.edu/Published_Papers/PDF/045-MASS.pdf, *Efficient conversión of nitriles to amides with basic hydrogen peroxide in dimethyl sulfoxide*. Fecha de consulta 16-Nov-2011.
67. Smith M.B., *Organic Synthesis*, 3^a Ed., **1994**, McGraw-Hill, New York, 253-255.
68. Furniss B., Hannaford A., Smith P., Tetchell A.; *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, 5^a ed., **1989**, Longman, England, 445-610.
69. Miura T., Nakashima K., Tada N., Itoh A.; *An effective and catalytic oxidation using recyclable fluorous IBX*. Chem. Commun., **2011**, 47, 1875-1877.
70. Viktor V. Zhdankin.; *Organoiodine(V) reagents in organic synthesis*. J. Org. Chem., **2011**, 76, 1185-1197.
71. Dawson B., Trapp R.; *Bioestadística médica*, 4^a Ed., **2005**, Manual Moderno, México, 10-50.
72. Escorihuela J.; *Catalizadores enantioselectivos soportados y homogéneos derivados de aminoácidos*. Tesis Doctoral, **2009**, España, Universidad Jaume, 3-91.
73. Gupta M., Nair V.; *Facile, chemoenzymatic synthesis of the potent antiviral compound, 2-acetonylinosine*. Tetrahedron Lett., **2005**, 46, 1165-1167.
74. Ciuffreda P., Loseto A., Santaniello E.; *Stereoselective adenylylate deaminase (5'-adenylic acid deaminase, AMPDA)-catalyzed deamination of 5'-alkyl substituted adenosines: a comparison with the action of adenosine deaminase (ADA)*. Tetrahedron: Asymmetry, **2004**, 15, 203-206.
75. Ciuffreda P., Loseto A y Santaniello E.; *Stereoselective deamination of (5'RS)-5'-methyl-2',3'-isopropylidene adenosine catalyzed by adenosine deaminase: preparation of diastereomerically pure 5'-methyl adenosine and inosine derivatives*. Tetrahedron: Asymmetry, **2002**, 13, 239-241.

76. Ciuffreda P., Loseto A., Alessandrini L., Terraneo G., Santaniello E.; *Adenylate deaminase (5'-adenylic acid deaminase, AMPDA)-catalyzed deamination of 5'-deoxy-5'-substituted and 5'-protected adenosines: a comparison with the catalytic activity of adenosine deaminase (ADA)*. Eur. J. Org. Chem., **2003**, 4748-4751.
77. Hampton A., Bayer M., Gupta V., Chu S.; *Synthesis of 5'-substituted derivatives of inosine*. J. Med. Chem., **1968**, 11, 1229-1232.
78. Bracci A., Colombo G., Ronchetti F., Compostella F.; *2'-O-Alkyl derivatives and 5'-analogues of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) as potential Hsp90 inhibitors*. Eur. J. Org. Chem., **2009**, 5913-5919.
79. Frigerio M., Santagostino M., Sputore S.; *A user-friendly entry to 2-iodoxybenzoic acid (IBX)*. J. Org. Chem., **1999**, 64, 4537-4538.
80. More J. D., Finney N. S.; *A simple and advantageous protocol for the oxidation of alcohols with o-iodoxybenzoic acid (IBX)*. Org. Lett., **2002**, 4, 3001-3003.
81. Csaba L. B., Csaba P., Tosa M., Vass E., Irimie F. D.; *Synthesis of enantiomerically enriched (R)- and (S)-benzofuranyl and benzo[b]thiophenyl-1,2-ethanediols via enantiopure cyanohydrins as intermediates*. Tetrahedron: Asymmetry, **2010**, 21, 443-450.
82. Katritzky A. R., Pilarski B., Urogi L.; *Efficient conversion of nitriles to amides with basic hydrogen peroxide in dimethyl sulfoxide*. Synthetic Commun., **1989**, 949-950.
83. Demodaran N. P., Jones G. H., Moffat J. G.; *Synthesis of the basic nucleoside skeleton of the polyoxin complex*. J. Org. Chem., **1971**, 3812-3813.
84. Sharafi A., Mohsenzadeh F., Mojtahedi M., Saidi M., Balalaie S.; *Microwave-promoted transformation of nitriles to amides with aqueous sodium perborate*. Synthetic Commun., **2001**, 31, 431-434.
85. Solís A., Luna H., Pérez H. I., Manjarrez N., Sánchez R.; *Preparación de (R)-cianhidrinas usando harina de semillas de capulín y mamey como biocatalizadores*. Rev. Soc. Quím. Méx., **1998**, 42, 214-216.

86. Solís A., Luna H., Pérez H. I., Manjarrez N.; *Evaluation of guanabana (Annona muricata) seed meal as a source of (S)-oxynitrilase*. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2351-2353.
87. Qiam Z M., Wan J B., Zhang Q W., Li S P.; *Simultaneous determination of nucleobases, nucleosides and saponins in Panax notoginseng using multiple columns high performance liquid chromatography*. *J. Pharmaceut. Biomed*, **2008**, 1361-1367.
88. Gao J L., Leung K., Wang Y T., Lai C M., Li S P., Hu F L., Lu G H., Jiang Z H., Yu Z L.; *Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in Ganocletrla spp. by HPLC-DAD-MS*. *J. Pharmaceut. Biomed*, **2007**, 44, 807-811.
89. Matyska M., Pesek J., Duley J., Zamzami M., Fischer S.; *Aqueous normal phase retention of nucleotides on silica hydride-based columns: Method development strategies for analytes relevant in clinical analysis*. *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33, 930–938.
90. Goossens J. F., Roux S., Egron D., Perigaud C., Bonte J. P., Vaccher C., Foulon C.; *Separation of nucleoside phosphoramidate diastereoisomers by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis*. *J. Chromatogr. B*; **2008**, 875, 288–295.
91. Siesler H.W., Ozaki Y., Kawata S.; *Near-Infrared spectroscopy: principles, instruments, applications*. Wiley V. C. H. 1^a Ed., **2002**, Weinheim, Germany.
92. Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S.; *Introduction to spectroscopy*. Brooks Cole, 3^a Ed., **2000**, USA.
93. North M.; *Synthesis and applications of non-racemic cyanohydrins*. *Tetrahedron: Asymmetr.*, **2003**, 14, 147–176.