



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**LINEA DE INVESTIGACIÓN
PRODUCCIÓN DE FARMOQUÍMICOS**

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

**ESTUDIOS BIOCATALÍTICOS EN DERIVADOS DE ADENOSINA: APLICACIÓN
DE OXINITRILASAS COMO INDUCTORAS DE ASIMETRÍA**

ALUMNO:

QFB. ADOLFO LÓPEZ VÁZQUEZ

MATRÍCULA 2122800393

COMITÉ TUTORAL:

TUTOR: M. en C. Q. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ

ASESORA: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

ASESORA: DRA. AIDA SOLÍS OBA

24 de junio del 2015

**“ESTUDIOS BIOCATALÍTICOS EN DERIVADOS DE ADENOSINA:
APLICACIÓN DE OXINITRILASAS COMO INDUCTORAS DE
ASIMETRÍA”**

COMITÉ TUTORAL

TUTOR: M. EN C. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ

Vo.Bo.

ASESORA: Dra. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

Vo.Bo.

ASESORA: Dra. AÍDA SOLÍS OBA

Vo.Bo.

ALUMNO: QFB. ADOLFO LÓPEZ VÁZQUEZ

MATRÍCULA: 2122800393

**“ESTUDIOS BIOCATALÍTICOS EN DERIVADOS DE ADENOSINA:
APLICACIÓN DE OXINITRILASAS COMO INDUCTORAS DE
ASIMETRÍA”**

JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

PRESIDENTE: DR. HÉCTOR JAIME SALGADO ZAMORA

Vo.Bo.

VOCAL: DR. JOSÉ ALFREDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

Vo.Bo.

SECRETARIO: M. EN C. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ

Vo.Bo.

RESUMEN

El nucleósido adenosina, es un compuesto que participa en diversos procesos fisiológicos, y sus efectos están directamente relacionados con la interacción con sus receptores (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3) y otros son independientes de estos receptores; debido a los distintos efectos terapéuticos que se le han encontrado, es ampliamente utilizada como intermediario para la síntesis de compuestos con actividad como: anticancerígenos, antibióticos, antiinflamatorios, antivirales, antiarrítmicos, insecticidas. Estos compuestos por lo general se obtienen por síntesis química, pero hoy en día, el uso de la síntesis química-enzimática facilita la obtención de estos compuestos que por métodos tradicionales son difíciles de sintetizar. Así el empleo de biocatalizadores abre una nueva vía para la preparación de éstos compuestos con una mayor pureza óptica, y reduce el grado de desechos en comparación con los métodos de síntesis química tradicional, obteniéndose así un menor impacto ambiental.

Se planteó como objetivo principal; la aplicación de oxinitrilasas como inductoras de asimetría con la finalidad de obtener la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina con alta pureza óptica, para lo cual se seleccionaron las enzimas oxinitrilasas obtenidas de las semillas de: mamey, almendra, cereza, ciruela, capulín, guanábana, durazno y zapote en forma de polvos acetónidos, utilizando diferentes temperaturas. Se analizaron y cuantificaron los compuestos obtenidos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y resonancia magnética nuclear de protón (RMN 1H). Del estudio realizado, encontramos que las biocatálisis con el polvo acetónido de mamey presentaron los mejores efectos de inducción asimétrica, con un %*ed* (18.6) para la cianohidrina de la adenosina.

Se demostró la actividad biocatalítica de las diferentes fuentes vegetales de oxinitrilasas empleando los géneros *Prunus*, *Pouteria* y *Annona*, con el compuesto (4D).

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

Por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría, durante el período Abril-2012 a Abril 2014, con número de registro 469516

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA- UNIDAD XOCHIMILCO MI
“ALMA MATER”.

Por abrirme las puertas una vez más y ofrecerme la oportunidad de seguir creciendo académica y profesionalmente.

A MIS PROFESORES DE LA MAESTRÍA.

Por ser parte esencial de este logro, gracias por transmitirme sus conocimientos y consejos, pero sobre todo gracias por su amistad y la gran confianza brindada. En especial a la Dra. Concepción Lozada[†] y al Dr. Jaime Kravzov.

AL CUERPO ACADEMICO CONSOLIDAD: BIOCATÁLISIS APLICADA A LA QUÍMICA ORGÁNICA, LABORATORIO N-201 UAM-X.

Por permitirme ser parte de este equipo de trabajo, el cual me ha ayudado a crecer tanto personal como profesionalmente, por enseñarme a trabajar en equipo y por siempre estar apoyándome.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

El orden no importa, todos son muy especiales y pieza importante en mi vida.

- Primero que nada quiero a mis padres por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi carrera y de todas las locuras que he querido realizar.
- A mi hermana Susy por apoyarme siempre tanto moral como económicamente.
- A mi hermano Alejandro, a mis sobrinas Xime, Carmen y Karen por su apoyo y cariño.
- A mis hermanos que siempre me han estado apoyando.
- A Anali por siempre estar apoyándome, aconsejando, regañándome, impulsando a seguir adelante, pero en especial, gracias por el gran cariño.
- A mis amigos de la maestría por su amistad, pero en particular por la gran familia que hemos formado. En especial a David, Alma, Soei, Fadia, Luis, Cindy, Karen, Oswaldo, Luisa, Tere, Irene, Maribel, Ivan, Zac, Alfonso, Cesar, Octavio y Pablo.
- A David, Alma y Betzy por su amistad, cariño, siempre incluirme en todo, por siempre estar presionado para que terminara la tesis y por su gran apoyo.
- A la Dra. Herminia, el Dr. Norberto y la Dra. Aida por el apoyo, experiencias, orientación para la realización de esta tesis, por compartir sus conocimientos y su pasión por la química y por compartir conmigo ese gran ser humanos que son, por haberme recibido en el laboratorio y apoyarme siempre en todo.
- Al gran equipo, que en lo personal somos más que eso, una gran familia (Biotransformaciones), Dra. Herminia, Dr. Norberto, Dra. Aida, Dra.

Julia, Dr. Héctor, Dra. Liliana, Dr. Alberto, Dr. Ernesto, Marlen, Ricardo, Violeta, Fany, Isma, Rosa, Omar, Cony, Lucy, Osvaldo, Mariana, Mary Tere, Eli, agradezco por su apoyo, su amistad, y por hacer que el laboratorio fuera más que un lugar de trabajo, un hogar.

- A mis amigos: Mariana, Edwin, Desiree, Elvis, Chavaro, Karen, Gerardo, Omar, Luis Antonio, Isma, Jesús, Mi prima Alejandra, por siempre estar al pendiente de mí.

- Son muchas las personas que han formado parte de mi vida en este trayecto profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado, su cariño, aprendizajes y por todas sus bendiciones.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Nucleótidos | 3 |
| 2.2 Nucleósidos | 4 |
| 2.3 Adenosina..... | 4 |
| 2.4 Receptores de adenosina..... | 6 |
| 2.5 Análogos de nucleósidos con actividad farmacológica | 7 |
| 2.6 Análogos de Adenosina: relación estructura actividad dependiente de los receptores A ₁ , A _{2A} , A _{2B} y A ₃ | 8 |
| 2.7 Biocatálisis..... | 11 |
| 2.8 Ventajas y desventajas de la biocatálisis..... | 11 |
| 2.8.1 Ventajas: | 12 |
| 2.8.2 Desventajas:..... | 12 |
| 2.9 Importancia de la biocatálisis para la industria farmacéutica | 12 |
| 2.10 Enzimas | 13 |
| 2.11 Oxinitrilasas | 14 |
| 2.12 Cianohidrininas..... | 16 |
| 2.13 Reacción de adición nucleofílica..... | 17 |
| 2.14 Protección de grupos funcionales..... | 17 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 18 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 18 |
| 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 5. HIPÓTESIS | 19 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | 20 |
| 6.1 Instrumentos y Equipos | 20 |
| 6.2 Insumos Químicos | 20 |
| 7. METODOLOGÍA | 21 |
| 7.1 Síntesis de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (2B) (Esquema 5)..... | 22 |
| 7.2 Protección del 6-amino de la 2',3',- <i>O</i> -isopropilidenadenosina | 23 |
| 7.3 Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C) ... | 23 |
| Método A (Equema 6)..... | 23 |
| Método B (Esquema 7)..... | 24 |
| 7.4 Síntesis del pirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (II) | 24 |

| | |
|---|-----------|
| Método C (Esquema 8)..... | 24 |
| 7.5 Síntesis del pirrol de la adenosina (IV) | 25 |
| Método D (Esquema 9)..... | 25 |
| 7.6 Hidrólisis del éster (I) para la obtención del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (3C) (Esquema 10) | 26 |
| 7.7 Hidrólisis del éster (III) para la obtención del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (II) (esquema 11)..... | 27 |
| 7.8 Síntesis del ácido <i>o</i> -iodoxibenzoico (IBX) (Esquema 12) | 28 |
| 7.9 Síntesis del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (4D) (esquema 13) | 28 |
| 7.10 Síntesis química de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (5E) | 29 |
| Método A (Esquema 14)..... | 29 |
| Método B (Esquema 15)..... | 30 |
| 7.11 Síntesis de la amida de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (6F) (Esquema 16) | 31 |
| 7.12 Preparación del biocatalizador..... | 32 |
| 7.13 Síntesis biocatalítica de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (5E) | 33 |
| 7.13.1 Preparación de la solución amortiguadora de KCN/citratos 1N pH 5 y pH 4.5 | 33 |
| 7.13.2 síntesis de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (5E) por biocatálisis | 33 |
| 7.14 Infrarrojo | 34 |
| 7.15 UV/visible..... | 34 |
| 7.16 Resonancia Magnética Nuclear | 34 |
| 7.17 Desarrollo de los métodos analíticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) | 35 |
| 7.17.1 CLAR Fase Reversa..... | 35 |
| 7.17.2 CLAR Fase normal | 36 |
| 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 37 |
| 8.1 Análisis de adenosina (1A) | 37 |
| 8.1.1 Caracterización por IR del compuesto (1A)..... | 37 |
| 8.1.2 Caracterización por UV-Visible del compuesto (1A)..... | 38 |
| 8.1.3 Caracterización por RMN para el compuesto (1A) | 39 |
| 8.2. Síntesis de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (2B) | 43 |
| 8.2.1 Caracterización del compuesto (2B) | 45 |

| | |
|--|----|
| 8.2.2 Caracterización por IR del compuesto (2B)..... | 45 |
| 8.2.3 Caracterización por UV-Visible del compuesto (2B)..... | 46 |
| 8.2.4 Caracterización por RMN de ¹ H y ¹³ C del compuesto (2B) | 47 |
| 8.3. Caracterización de la 2,5-hexanodiona..... | 51 |
| 8.4. Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (3C) | 52 |
| 8.4.1 Método A | 52 |
| 8.4.2 Método B | 53 |
| 8.4.3 Caracterización del compuesto (3C) | 55 |
| 8.4.4 Caracterización por IR del compuesto (3C)..... | 56 |
| 8.4.5 Caracterización por UV-Visible del compuesto (3C) | 56 |
| 8.4.6 Caracterización por RMN de ¹ H y ¹³ C del compuesto (3C) | 57 |
| 8.5. Análisis de éster del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (I) | 60 |
| 8.5.1 Caracterización por IR del compuesto (I)..... | 60 |
| 8.5.2 Caracterización por RMN de ¹ H y ¹³ C del compuesto (I) | 61 |
| 8.6. Hidrólisis del éster (I) para la obtención del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina | 62 |
| 8.7. Síntesis del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (II) | 62 |
| 8.7.1 Método C..... | 63 |
| 8.7.2 El compuesto (II) se purificó y se determinaron sus características fisicoquímicas..... | 64 |
| 8.7.3 Caracterización por IR del compuesto (II) | 64 |
| 8.7.4 Caracterización por RMN de ¹ H y ¹³ C del compuesto (II)..... | 64 |
| 8.8. Análisis y caracterización del éster del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (III)..... | 66 |
| 8.8.1 Caracterización por IR del compuesto (III) | 66 |
| 8.8.2 Caracterización por RMN de ¹³ C y ¹ H del compuesto (III)..... | 66 |
| 8.9. Síntesis del pirrol de la adenosina (IV) | 67 |
| 8.9.1 Método D | 68 |
| 8.9.2 Caracterización por IR del compuesto (IV)..... | 69 |
| 8.9.3 Caracterización por RMN de ¹³ C y ¹ H del compuesto (IV) | 69 |
| 8.10. Síntesis del reactivo IBX..... | 70 |
| 8.10.1 Caracterización por IR del compuesto IBX..... | 71 |
| 8.10.2 Caracterización por RMN del compuesto IBX | 71 |
| 8.11. Síntesis del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (4D) | 72 |

| | |
|---|------------|
| 8.11.1 Caracterización por IR del compuesto (4D) | 74 |
| 8.11.2 Caracterización por UV-Visible del compuesto (4D)..... | 75 |
| 8.11.3 Caracterización por RMN del compuesto (4D) por ^1H y ^{13}C | 76 |
| 8.12. Síntesis química de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (5E) | 78 |
| 8.12.1 Síntesis del compuesto (5E),..... | 78 |
| 8.12.2 Propiedades fisicoquímicas del compuesto (5E) | 78 |
| 8.12.3 Caracterización por IR del compuesto (5E)..... | 78 |
| 8.12.4 Caracterización por UV-Visible del compuesto (5E)..... | 79 |
| 8.12.5 Caracterización por RMN ^1H y ^{13}C del compuesto (5E) | 80 |
| 8.13. Síntesis química de la amida de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (6F)..... | 82 |
| 8.13.1 Propiedades fisicoquímicas del compuesto (6F) | 82 |
| 8.13.2 Caracterización por IR del compuesto (6F)..... | 83 |
| 8.13.3 Caracterización por UV-Visible del compuesto (6F)..... | 83 |
| 8.13.4 Caracterización por RMN ^1H y ^{13}C del compuesto (6F)..... | 84 |
| 8.14. Análisis de la adenosina y sus derivados por CLAR en fase reversa..... | 86 |
| 8.14.1 Análisis de la adenosina y sus derivados por CLAR en fase normal..... | 87 |
| 8.15.0 Síntesis biocatalítica para la obtención del compuesto (5E) | 89 |
| 8.15.1 Diferentes condiciones (refrigeración, autoclave y estufa) de los biocatalizadores para la reacción con benzaldehído | 93 |
| 8.15.2 Biocatálisis del compuesto (4D) a 5°C, pH 4.5, con diferentes fuentes de oxinitrilasas..... | 94 |
| 9. CONCLUSIONES | 97 |
| 10. PERSPECTIVAS | 98 |
| 11. REFERENCIAS | 100 |
| 12. ANEXOS | 107 |

ÍNDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

Esquemas

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Formación enantioselectiva de cianohidrinas a partir de aldehídos y cetonas..... | 15 |
| Esquema 2. Obtención de diferentes intermediarios a partir de cianohidrinas... | 16 |
| Esquema 3. Ataque del ácido cianhídrico al grupo carbonilo del benzaldehído. | 17 |
| Esquema 4. Ruta de síntesis química para la obtención de los derivados de adenosina..... | 21 |
| Esquema 5. Síntesis de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (2B)..... | 22 |
| Esquema 6. Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C), método A..... | 23 |
| Esquema 7. Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C) y el éster (I), método B..... | 24 |
| Esquema 8. Síntesis del pirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (II) y el éster (III), método C..... | 25 |
| Esquema 9. Síntesis del pirrol de la adenosina (IV), método D..... | 26 |
| Esquema 10. Hidrólisis del éster (I) para la obtención del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C). | 27 |
| Esquema 11. Hidrólisis del éster (III) para la obtención del pirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (II)..... | 27 |
| Esquema 12. Síntesis para la obtención del IBX..... | 28 |
| Esquema 13. Síntesis del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (4D)..... | 29 |
| Esquema 14. Síntesis química de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (5E), método A..... | 30 |
| Esquema 15. Síntesis química de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (5E), método B..... | 31 |
| Esquema 16. Síntesis química de la amida de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (6F)..... | 32 |

| | |
|--|----|
| Esquema 17. Síntesis biocatalítica de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (5E)..... | 34 |
|--|----|

Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ejemplo de la estructura de un nucleótido..... | 3 |
| Figura 2. Clasificación de las bases nitrogenadas..... | 4 |
| Figura 3. Nucleósido de adenosina..... | 5 |
| Figura 4. Relación estructura actividad de la adenosina..... | 8 |
| Figura 5. Espectro de IR de la adenosina..... | 38 |
| Figura 6. Espectro de UV-visible de la adenosina..... | 38 |
| Figura 7. Espectro de RMN de ¹³ C de la adenosina..... | 40 |
| Figura 8. Espectro de RMN de ¹ H de la adenosina..... | 41 |
| Figura 9. Espectro DEPT de la adenosina..... | 41 |
| Figura 10. Espectro COSY de la adenosina..... | 42 |
| Figura 11. Espectro gHMBC de la adenosina..... | 43 |
| Figura 12. Espectro de IR de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (2B)..... | 46 |
| Figura 13. Espectro de UV-Visible de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (2B) | 46 |
| Figura 14. Espectro de RMN de ¹³ C de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina..... | 48 |
| Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina..... | 49 |
| Figura 16. Espectro DEPT de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina..... | 49 |
| Figura 17. Espectro COSY de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina..... | 50 |
| Figura 18. Espectro gHMBC de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina..... | 51 |
| Figura 19. Espectro de IR del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C)..... | 56 |
| Figura 20. Espectro de UV-visible del compuesto (3C)..... | 57 |
| Figura 21. Espectro de RMN de ¹³ C del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C)..... | 59 |
| Figura 22. Espectro de RMN de ¹ H del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C)..... | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 23. Espectro de IR del compuesto (4D)..... | 75 |
| Figura 24. Espectro de UV-Visible del compuesto (4D)..... | 75 |
| Figura 25. Espectro de RMN de ¹³ C del compuesto (4D)..... | 77 |
| Figura 26. Espectro de RMN de ¹ H del compuesto (4D)..... | 77 |
| Figura 27. Espectro de IR del compuesto (5E)..... | 79 |
| Figura 28. Espectro de UV-Visible del compuesto (5E)..... | 79 |
| Figura 29. Espectro de RMN de ¹³ C del compuesto (5E)..... | 81 |
| Figura 30. Espectro de RMN de ¹ H del compuesto (5E)..... | 82 |
| Figura 31. Espectro de IR del compuesto (6F)..... | 83 |
| Figura 32. Espectro de UV-Visible del compuesto (6F)..... | 84 |
| Figura 33. Espectro de RMN de ¹ H de la amida de la 2',3'- isopropilidenadenosina (6F)..... | 85 |
| Figura 34. Cromatograma de la adenosina (1A) y sus derivados (2B, 3C, 4D y 5E), columna Luna C18, flujo 0.6 mL/min, λ= 260 nm, T= 25°C, Agua:MeOH (80:20)..... | 87 |
| Figura 35. Cromatograma de los derivados de adenosina (2B, 3C, I, 4D y 5E), columna OD, gradiente de disolventes, con un flujo de 1.2 mL/min..... | 89 |

Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Ejemplos de análogos de adenosina con actividad farmacológica, dependiente de los receptores de adenosina..... | 9 |
| Tabla 2. Derivados de adenosina con actividad anticancerígena. | 10 |
| Tabla 3. Clases y subclases de enzimas..... | 14 |
| Tabla 4. Propiedades de la adenosina | 37 |
| Tabla 5. Desplazamientos químicos de ¹³ C y ¹ H así como los acoplamientos entre protones de la adenosina..... | 39 |
| Tabla 6. Síntesis de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (2B)..... | 44 |
| Tabla 7. Propiedades de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina..... | 45 |
| Tabla 8. Desplazamientos químicos de ¹³ C y ¹ H del compuesto (2B)..... | 47 |
| Tabla 9. Desplazamientos químicos de ¹³ C y ¹ H de la 2,5-hexanodiona..... | 52 |

| | |
|---|----|
| Tabla 10. Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C), método A..... | 53 |
| Tabla 11. Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C), método B..... | 54 |
| Tabla 12. Propiedades fisicoquímicas del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C)..... | 55 |
| Tabla 13. Desplazamientos químicos de ¹³ C y ¹ H del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (3C)..... | 58 |
| Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas del éster del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (I)..... | 60 |
| Tabla 15. Desplazamientos químicos de ¹³ C y ¹ H del compuesto (I)..... | 61 |
| Tabla 16. Hidrólisis del compuesto (I)..... | 62 |
| Tabla 17. Síntesis del pirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (II)..... | 63 |
| Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas del pirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (II)*..... | 64 |
| Tabla 19. Desplazamientos químicos de ¹³ C y ¹ H, del compuesto (II)..... | 65 |
| Tabla 20. Caracterización fisicoquímica del éster del pirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (III)..... | 66 |
| Tabla 21. Desplazamientos químicos de ¹³ C y ¹ H, del compuesto (III)..... | 67 |
| Tabla 22. Síntesis del pirrol de la adenosina (IV)..... | 68 |
| Tabla 23. Caracterización del pirrol de la adenosina (IV)..... | 68 |
| Tabla 24. Desplazamientos químicos del compuesto (IV) de ¹³ C y ¹ H, con sus respectivos acoplamientos..... | 70 |
| Tabla 25. Síntesis del compuesto IBX..... | 71 |
| Tabla 26. Desplazamiento químico para RMN ¹³ C y ¹ H del compuesto IBX..... | 71 |
| Tabla 27. Síntesis del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (4D), con ACN (A) y con propanona (B)..... | 73 |
| Tabla 28. Caracterización fisicoquímica del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'- <i>O</i> -isopropilidenadenosina (4D)..... | 74 |

| | |
|--|----|
| Tabla 29. Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C y ¹ H del compuesto (4D)..... | 76 |
| Tabla 30. Propiedades fisicoquímicas del compuesto (5E)..... | 78 |
| Tabla 31. Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C y ¹ H del compuesto (5E)..... | 80 |
| Tabla 32. Propiedades fisicoquímicas del compuesto (6F)..... | 82 |
| Tabla 33. Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C y ¹ H del compuesto (6F)..... | 85 |
| Tabla 34. Desarrollo del método analítico por CLAR fase reversa..... | 86 |
| Tabla 35. Resultados con el método BB, t _R de los derivados nucleosídicos (1A, 2B, 3C, 4D y 5E)..... | 86 |
| Tabla 36. Desarrollo del método analítico por CLAR fase normal..... | 88 |
| Tabla 37. Obtención de (5E), empleando polvo acetónido de mamey a diferentes temperaturas..... | 90 |
| Tabla 38. ANOVA de las biocatálisis de (4D) con mamey..... | 92 |
| Tabla 39. Prueba de TUCKEY de 10° vs 30°C..... | 92 |
| Tabla 40. Prueba de Student del control químico vs biocatálisis con mamey... | 92 |
| Tabla 41. Resultados de las biocatálisis del benzaldehído, relación sustrato:biocatalizador 1:1 a 5°C a pH 5.0, 1 eq. de HCN durante 24 horas.... | 93 |

Gráficas

| | |
|--|----|
| Gráfica 1. % ed del compuesto (5E) con mamey a pH 4.5 y su control químico (CQ) a 10, 20 y 30°C..... | 91 |
| Gráfica 2. Comparación de las biocatálisis para el benzaldehído con los polvos acetónidos refrigerados (ER), en autoclave (EIA) y en estufa a 70°C (EIE)... | 94 |
| Gráfica 3. %ed por CLAR fase normal del compuesto (5E)..... | 95 |
| Gráfica 4. Comparación de los biocatalizadores a 5°C para la obtención del compuesto (5E)..... | 96 |

1. INTRODUCCIÓN

Los nucleótidos y nucleósidos son compuestos endógenos que están implicados en diversos procesos celulares, por lo cual, son de suma importancia en investigación para el desarrollo de derivados con actividad farmacológica, utilizados clínicamente como: antibióticos, antivirales, antirretrovirales, cardiovasculares, oncológicos, agentes inmunomoduladores y agentes antiarrítmicos.¹⁻³

Las áreas en las que se ha encontrado mayor aplicación de estos derivados son en oncología y virología (antirretrovirales), debido a que estos imitan la fisiología del metabolismo celular y como consecuencia pueden ser incorporados al ADN o ARN, inhibiendo así la división celular o la replicación viral.¹ Esto tiene gran repercusión ya que tanto el cáncer como las enfermedades virales son problemas de salud pública en nuestro país y a nivel mundial. Estos nuevos análogos proporcionan farmacoterapias más eficaces, dirigidas a dianas moleculares específicas, disminuyendo los efectos adversos.⁴

En la actualidad los tratamientos antirretrovirales marcan la pauta en el uso de terapias triples, en las cuales dos de ellos son análogos nucleosídicos.⁵ Un ejemplo son los antirretrovirales que han reducido la tasa de mortalidad de 2.2 millones en el 2005 a 1.7 millones en el 2011.⁶

En años recientes, se han sintetizado o aislado nuevas estructuras de nucleósidos con aplicaciones clínicas, por ejemplo: el aciclovir, zidovudina (AZT), clofarabina, lamivudina, abacavir, entecavir, ribavirina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lobucavir, nelarabina, azacitidina, capecitabina, entre otros.⁷⁻⁹

Durante el desarrollo de los derivados nucleosídicos, se busca que estos sean efectivos, selectivos y no tóxicos, por lo que se han buscado distintas técnicas para su obtención. Por otra parte las modificaciones estructurales a las bases nucleosídicas juegan un papel importante, debido a que estas pueden mejorar las propiedades farmacológicas de la molécula o presentar una actividad farmacológica distinta a la de la molécula líder; estas modificaciones se han realizado tanto en la base heterocíclica como en la pentosa.¹⁰ Parte de la dificultad de los procesos de obtención de estos derivados radica en la complejidad

molecular que presentan, teniendo problemas en la implementación de procesos de síntesis orgánica, donde se generan residuos difíciles de manejar o eliminar, sin dejar de lado las reacciones no deseadas que son comunes debido a su pobre especificidad, por lo cual estos procesos se vuelven más largos y por lo tanto más costosos. Estos inconvenientes han estimulado el uso de la combinación de síntesis química y biocatalítica en síntesis orgánica en la última década, haciendo énfasis en el uso de biocatalizadores para la obtención de las moléculas requeridas. Los biocatalizadores adquirieron un papel relevante en el desarrollo de nuevos fármacos y moléculas complejas difíciles de obtener por métodos químicos tradicionales, el empleo de estos abre una nueva vía para el diseño, elaboración de procesos optimizados y obtención de nuevos compuestos.¹¹⁻¹³

En esta área se han realizado modificaciones a los derivados nucleosídicos por síntesis química y con menos frecuencia por catálisis enzimática, las cuales van desde hidrólisis enzimática en la base nitrogenada, protecciones regioselectivas en la base nitrogenada y en el azúcar de la molécula, dando como resultado compuestos con una menor toxicidad.¹²

Lo anterior ha conducido a un amplio desarrollo en la síntesis de estos análogos con especial atención en la derivatización y síntesis asimétricas. Además la búsqueda de derivados clínicamente eficaces, ha originado enfoques multidisciplinarios con el objetivo de lograr una producción más sencilla, tratando de desarrollar síntesis enantioselectivas y con menor impacto ambiental en los procesos de fabricación.

Dada la compleja estereoquímica de los derivados nucleosídicos es importante contar con métodos analíticos eficientes que ayuden a caracterizar, identificar, separar y cuantificar adecuadamente cada intermediario formado, así como sus excesos diastereoisoméricos de los productos sintetizados ya sea químico y/o enzimático. Por todo lo anterior, se sintetizarán intermediarios de adenosina con alta pureza óptica, que sean la base para la obtención de nuevos compuestos con actividad farmacéutica; empleando biocatálisis, se controlara la estereoquímica del nuevo centro estereogénico que se generará a partir del aldehído nucleosídico sintetizado, utilizando oxinitrilasas de origen vegetal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Nucleótidos

Un nucleótido es un compuesto cuya estructura está dada por el ensamblaje de tres componentes: base nitrogenada (purina o pirimidina), pentosa y ácido fosfórico.¹⁴ 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.¹⁵ Las características estructurales de los nucleótidos son: ácido fosfórico, base nitrogenada y un azúcar (Figura 1).

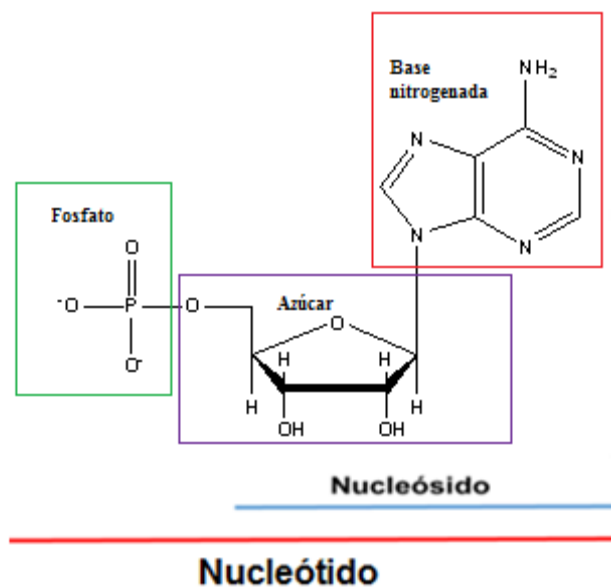


Figura 1. Ejemplo de la estructura de un nucleótido.

Los nucleótidos son componentes estructurales de los ácidos nucleicos, también participan como portadores energéticos (ATP, UTP, GTP Y CTP). Asimismo, forman parte de coenzimas como el NAD⁺, NADP⁺, el FAD y la coenzima A. También son reguladores metabólicos, como el AMP cíclico (AMPc) o el GMP cíclico (GMPc). Algunos nucleótidos participan en los mecanismos de transducción de señales celulares, como el GTP, el GDP y el AMPc.¹⁶ Debido a que están implicados en múltiples funciones, se han desarrollado análogos aptos para interferir en la multiplicación de agentes patógenos, ya que se incorporan en el ADN y en ARN para inhibir la división celular y la replicación viral.¹

2.2 Nucleósidos

El término nucleósido fue introducida por Levene y Jacobs en 1909, estos se clasifican de acuerdo a la base nitrogenada que contienen: púricas (adenina y guanina) y pirimídicas (citosina, uracilo y timina), (Figura 2).^{15,17}

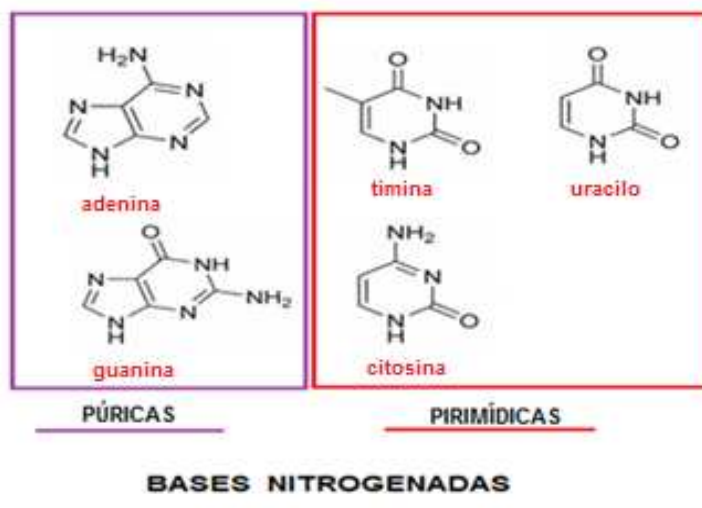


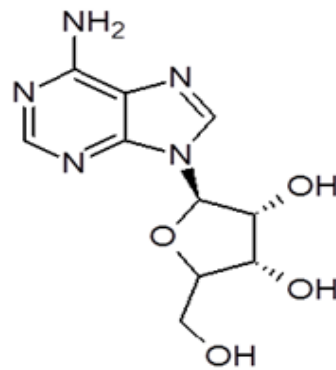
Figura 2. Clasificación de las bases nitrogenadas.

Los nucleósidos son compuestos en los que las bases nitrogenadas (púricas o pirimidinas) están unidas a las pentosas (ribosa o desoxirribosa) por medio de un enlace covalente β -N-glicosídico (Figura 3), formado entre el átomo de carbono carbonílico de la pentosa (carbono 1') y uno de los átomos de nitrógeno de la base nitrogenada el N-1 de la pirimidina o el N-9 de la purina.^{15,17}

2.3 Adenosina

La adenosina es un nucleósido de purina endógeno de origen natural, compuesto por una molécula de adenina unida a una ribofurranosa a través de un enlace β -N-9-glicosídico (6-amino-9-b-D-ribofuranosil-9-H purina), (Figura 3).² En 1929 Drury y Szent-Gyorgyi de la Universidad de Cambridge,¹⁸ descubrieron sus propiedades como vasodilatador coronario y antiarrítmico, en la actualidad se sabe que es un nucleósido de señalización extracelular, ampliamente distribuido en todas las células, tanto del Sistema Nervioso Central como del Periférico, donde ejerce un importante papel como neurotransmisor y/o neuromodulador,¹⁹ tiene propiedades antitrombóticas, reduce la presión arterial y la frecuencia cardíaca; la adenosina

intravenosa se ha mantenido como base en la terapia clínica para el diagnóstico o el tratamiento de pacientes con arritmias supraventriculares desde los años ochenta,²⁰ es el antiarrítmico más utilizados en la práctica clínica de anestesiología.² Además la adenosina endógena está implicada en la respuesta inmune.²¹



Adenosina

Figura 3. Nucleósido de adenosina.

Se ha encontrado también que puede regular procesos fisiológicos por la unión y/o la activación de uno o más de los cuatro receptores transmembranal de adenosina acoplados a proteína G.⁹ Algunos de estos procesos donde está implicada la adenosina es en la inflamación, ya que se ha observado su acumulación en los tejidos inflamados,²² también durante la hipoxia la concentración de adenosina aumenta, debido a la hidrólisis del enlace fosfo-éster de sus moléculas precursoras (ATP, ADP, AMP).²³

La adenosina se forma en el interior de las células mediante dos rutas metabólicas reversibles. La primera es la hidrólisis del AMP por acción de la enzima 5'-nucleotidasa. Esta es la ruta principal de producción de adenosina en el tejido nervioso y cardiaco, especialmente en situaciones en las que existe una gran demanda de oxígeno o una disminución de la disponibilidad del mismo. La segunda es por la hidrólisis de la S-adenosilhomocisteína (SAH) por acción de la enzima S-adenosilhomocisteína hidrolasa, obteniéndose adenosina y

homocisteína. La adenosina formada puede ser liberada al exterior de la célula por difusión facilitada o a través de un transportador de nucleósidos bidireccional, dependiendo de su concentración.²⁴

Esta adenosina puede ser capturada otra vez por las células endoteliales vasculares y por eritrocitos, donde se transforma en inosina por acción de la enzima adenosina desaminasa o en AMP por acción de la enzima adenosina quinasa, o bien es degradada directamente en el exterior de la célula a inosina por acción de la ecto-adenosina desaminasa.¹⁹

2.4 Receptores de adenosina

Se han identificado y clasificado cuatro distintos tipos de receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. Estos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, pero con tamaño algo menor que el resto de los receptores de esta familia.²⁵ Dependiendo de la distribución de los receptores de adenosina se presentan diferentes perfiles farmacológicos, por lo que la expresión de más de un tipo de receptor su concentración y abundancia en la misma célula permite a la adenosina activar más de una ruta de señalización.²⁴

La activación de los receptores A₁ y A₃ unidos a la proteína G_i, reduce la actividad de la adenilciclase y disminuye los niveles intracelulares del AMPc, mientras que la activación de los receptores A_{2A} y A_{2B} unidos a la proteína G_s presentan el efecto contrario,²⁶ la activación de los receptores A₁ generalmente tienen una función inhibitoria sobre la mayoría de los tejidos (efecto represor del miocardio).²⁷

Así mismo se ha encontrado que los antagonistas de A_{2A} han mostrado propiedades anti-Alzheimer y se están estudiando activamente como agentes anti-Parkinson,²⁸ mientras que los estudios de los antagonistas de los receptores A_{3B} están dirigidos para el tratamiento del glaucoma. Los agonistas selectivos de A₁ muestran un efecto protector en la enfermedad de Huntington.²⁹ Por todo lo anterior estos receptores son prometedoras dianas terapéuticas en una amplia gama de condiciones, incluyendo enfermedades isquémicas cerebrales y cardíacas, trastornos del sueño, inmunes y trastornos inflamatorios y cáncer.⁹

2.5 Análogos de nucleósidos con actividad farmacológica

La investigación sobre nucleósidos comenzó hace más de 100 años con las investigaciones estructurales de Emil Fischer. La importancia de estas moléculas y sus aplicaciones tuvieron un rápido progreso, al principio las bases como núcleo y luego con los nucleósidos.³⁰ Los análogos de nucleósidos son una familia de compuestos con diferentes actividades farmacológicas entre las cuales destacan su actividad como agentes antivirales, antitumorales y como inmunosupresoras. Al ser moléculas lábiles, polifuncionales y quirales su síntesis química requiere múltiples pasos incluidos los de protección-desprotección.¹²

El primer análogo fue la idoxiuridina el cual fue sintetizado por Prusoff en 1959³¹, utilizado principalmente por vía tópica para el tratamiento de herpes simple; otro análogo que se descubrieron dos décadas después son la arabinosido de adenina usado para el tratamiento de la hepatitis B y el aciclovir (ACV) empleado para combatir el virus del herpes.⁷

En la mayoría de los casos los derivados nucleosídicos son selectivos y no tóxicos, ya que estos derivados, se comportan como profármacos que necesitan ser activados farmacológicamente por enzimas celulares o virales.⁴

Sin embargo, hay un número de compuestos con una estructura nucleosídica que no requieren esta activación para presentar actividad farmacológica. En algunos casos, estos derivados de nucleósidos se unen en el sitio de unión del sustrato de la diana enzimática, pero no son reconocidos como sustratos, por lo tanto ejercen una inhibición competitiva con los sustratos naturales. En otros casos, los análogos de nucleósidos interactúan con la enzima diana en un sitio diferente del lugar de unión (sitios alostéricos) y por lo tanto se comportan como inhibidores no competitivos con el sustrato natural.³

2.6 Análogos de Adenosina: relación estructura actividad dependiente de los receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃

Las modificaciones estructurales que se le han realizado al nucleósido de adenosina repercuten en su actividad farmacológica, debido a que es dependiente del sustituyente y la posición de dicho sustituyente en la molécula, como se puede observar en la (Figura 4) y en la **Tabla 1**.^{10,32}

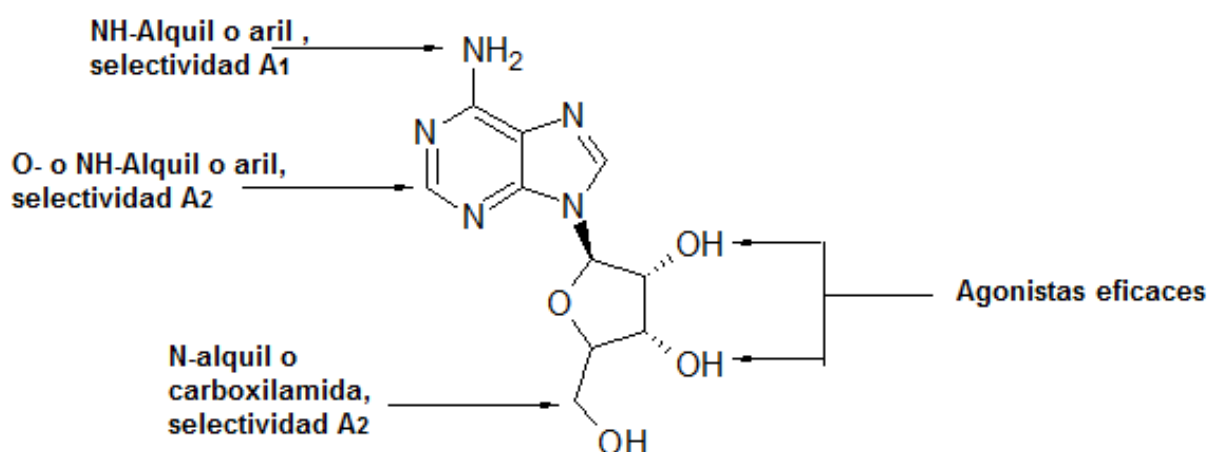
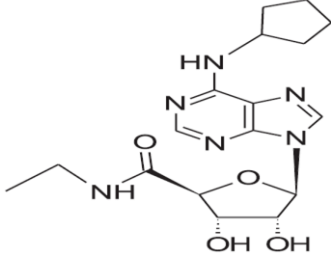
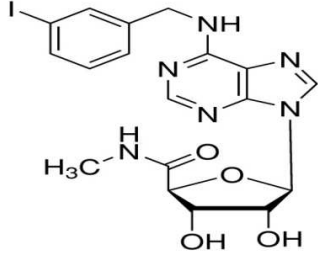
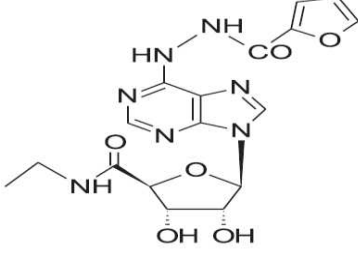


Figura 4. Relación estructura actividad de la adenosina.

En la **Tabla 1** se presentan tres derivados de adenosina con actividad farmacológica; tienen en el carbono de la ribosa un grupo amida. Por lo que se consideró interesante explorar la creación de un nuevo centro estereogénico en una adenosina protegida, y a partir del aldehído correspondiente incrementar el número de carbonos vía una cianohidrina, la cual puede ser transformada a la amida correspondiente por hidrólisis. Así en este proyecto el intermediario clave sería el aldehído y por biocatálisis se obtendría la cianohidrina diastereoisoméricamente enriquecida, utilizando como fuente de oxinitrilasas los polvos acetónidos de las semillas de: almendra, capulín, cereza, ciruela, durazno, guanábana, zapote y mamey. En el Esquema 2, se presenta una amplia gama de posibilidades de transformación de cianohidrininas a múltiples derivados, donde se

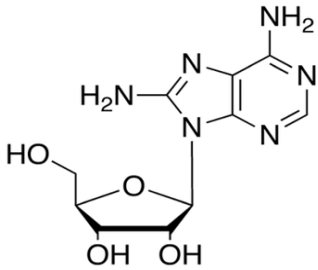
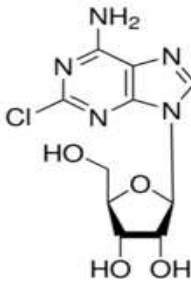
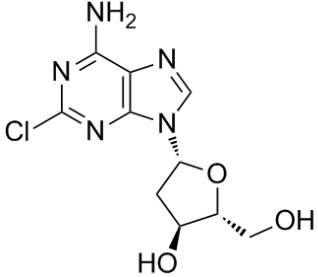
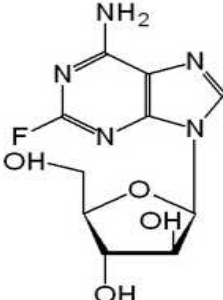
puede visualizar de una mejor manera el gran potencial que se puede tener con la creación de un nuevo centro estereogénico en este sustrato.

Tabla 1. Ejemplos de análogos de adenosina con actividad farmacológica, dependiente de los receptores de adenosina.

| Nombre del análogo | Estructura | Información |
|--------------------|---|--|
| Selodenoson |  | Agente antiarrítmico, es un agonista de los receptores A ₁ , disminuye la frecuencia cardíaca sin disminuir la presión arterial. ^{33,34} |
| IB-MECA |  | Es un agonista selectivo de los receptores A ₃ , es un inmunomodulador en las enfermedades inflamatorias. ³⁴ |
| MRS3997 |  | Agonista de los receptores A _{2A} y A _{2B} , y agonista parcial de los receptores A ₁ , es empleado para combatir la tripanomiasis. ³⁴ |

Así mismo, existen derivados de adenosina en los cuales, su efecto farmacológico es independiente de los receptores, ya que estos tienen su mecanismo de acción directamente sobre ADN, ARN o inhibiendo alguna enzima **Tabla 2.**

Tabla 2. Derivados de adenosina con actividad anticancerígena.

| Nombre | Estructura | Información |
|---|---|---|
| 8-amino-adenosina |  | Disminuye la síntesis de ARN y ADN e induce a la muerte celular por la disminución de la concentración de ATP, por lo cual es un potente agente terapéutico para mieloma múltiple. ^{35,36} |
| 8-cloro-adenosina |  | Disminuye la síntesis de ARNm, reducción de la expresión de un gran número de proteínas, es efectivo para el cáncer de mama, su metabolito trifosforilado también inhibe la polimerización de la actina y la actividad de la topoisomerasa II ya que esta enzima es ATP dependiente. ^{37,38} |
| 2-cloro-dexosiadenosina (Cladribina) |  | Es un fármaco empleado para combatir la leucemia linfocítica, el mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis del ADN, lo cual provoca apoptosis debido a que no se puede reparar el daño. ³⁹ |
| 9-β-D-arabinosil-2-fluoroadenina (Fludarabina) |  | Es un fármaco empleado para combatir la leucemia linfocítica crónica, su mecanismo de acción es, inhibir la síntesis del ADN por intercalación directa en la cadena, además actúa sobre las ribonucleótido reductasas, provocando el estancamientos de ARN de traducción. ⁴⁰ |

2.7 Biocatálisis

Los términos biocatálisis y biotransformaciones son utilizados para describir la metodología basada en el uso de enzimas para la preparación de intermediarios y productos químicos con alta pureza óptica.⁴¹ Si la conversión química de la sustancia se lleva a cabo con la ayuda de una enzima libre o inmovilizada, se emplea el término biocatálisis. Por su parte, si se lleva a cabo con la ayuda de una célula completa se habla de biotransformación.⁴² La biocatálisis aplicada a química orgánica, ha cobrado un gran auge en el mundo, debido a las ventajas que esta presenta sobre los métodos químicos tradicionales.⁴³

En el proceso de biocatálisis se pueden emplear enzimas parcialmente purificadas o extractos crudos, tanto de origen animal como vegetal, por ejemplo los polvos acetónidos. La inmovilización de las enzimas hace que estas se pueden reciclar varias veces sin pérdida significativa de sus propiedades catalíticas.⁴⁴ El medio de reacción puede ser acuoso, orgánico o en dos fases.⁴¹ El proceso en medio acuoso representa una gran limitación debido a la baja o nula solubilidad de una gran cantidad de compuestos orgánicos. Recientemente se ha encontrado que la termoestabilidad de una enzima se puede mejorar en sistemas bifásicos, también se ha observado que es posible llevar a cabo ciertas reacciones enzimáticas en medio orgánico. Algunas de las ventajas de la biocatálisis en medio bifásico, son el equilibrio termodinámico para catalizar las síntesis que son desfavorables en agua y la facilidad de extracción de algunos productos.⁴⁵

2.8 Ventajas y desventajas de la biocatálisis

Los procesos biocatalíticos se han considerado como una importante alternativa práctica y ecológica en la síntesis de productos orgánicos,⁴⁶ sin embargo como todo proceso presenta ventajas y desventajas con respecto a los procesos aplicados en química clásica. Algunas de las ventajas y desventajas de la biocatálisis se pueden observar en los puntos: 2.8.1 y 2.8.2.⁴⁷⁻⁴⁹

2.8.1 Ventajas:

- Especificidad del sustrato.
- Son quimioselectivas: Es la reacción preferencial de una enzima sobre uno de dos o más grupos funcionales diferentes.
- Son altamente enantioselectivas.
- Las enzimas son catalizadores altamente eficientes, las velocidades de reacción promovidas por enzimas pueden ser más rápidas que aquellas no catalizadas con un factor de 10^{12} .
- Condiciones suaves de reacción (generalmente se llevan a temperatura ambiente, pH cercano a la neutralidad, presión atmosférica), esto minimiza los problemas de isomerización, racemización, epimerización y transposiciones.
- Permite llevar a cabo diferentes reacciones químicas sin la necesidad de pasar por etapas de protección y desprotección.

2.8.2 Desventajas:

- El empleo de altas diluciones y el uso de cofactores costosos.
- En algunos casos los procesos tienen rendimientos bajos.
- Altos costos de implementación de los procesos a escala industrial.
- Se puede presentar baja actividad específica.
- Inestabilidad a pH extremo.

2.9 Importancia de la biocatálisis para la industria farmacéutica

La síntesis de moléculas enantiopuras es una de las áreas más desafiantes en química orgánica. La metodología quimio-enzimática está siendo muy utilizada, ya que la combinación de procedimientos químicos con métodos biocatalíticos puede ser una excelente estrategia en la preparación de moléculas con alto grado de complejidad,^{12,48,50} ejemplo es la obtención del taxol, ácido 6-aminopenicilánico, vitamina C, abacavir, entre otros.^{44,51}

Para la implementación de dichos procesos, en la industria farmacéutica es necesario evaluar diferentes factores como son: (i) la viabilidad económica en la

que se enfoca el rendimiento del producto, (ii) la posición que ocupa el proceso biocatalítico en la síntesis, (iii) la pureza enantiomérica, ya que el objetivo de un procedimiento comercial exige que el exceso enantiomérico (*ee*) sea de un 98% o mayor.⁴⁵

2.10 Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos, las cuales tienen dos características muy importantes: la capacidad para reconocer un sustrato y catalizar una reacción, para transformar este en un producto.⁵² La gran mayoría de las enzimas son de naturaleza proteica y son compuestos de alto peso molecular, pero sólo 3 o 4 aminoácidos están directamente involucrados en el *centro activo* y en esta zona se produce la reacción, tras un acoplamiento mutuo entre enzima y sustrato.⁵³

Es fundamental que la enzima mantenga su configuración espacial para que el sustrato encaje en el centro activo. Un cambio de temperatura, pH o salinidad, puede provocar la desnaturalización de la enzima y la alteración de su estructura implica pérdida de funcionalidad.⁵⁴

Las enzimas pueden ser obtenidas de animales, vegetales o microorganismos. Las enzimas se han agrupado en seis clases diferentes de acuerdo al tipo de reacción que catalizan como se muestra en la **Tabla 3**.^{53,55}

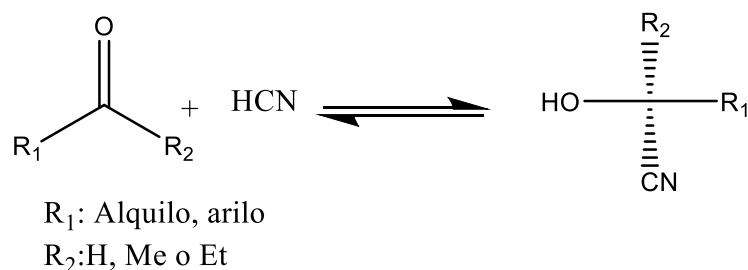
Tabla 3. Clases y subclases de enzimas.

| Clase | Subclase | Tipo de reacción que catalizan |
|------------------------|-----------------|---|
| Isomerasas | Epimerasas | Isomerización de un centro de quiralidad |
| Liasas | Descarboxilasas | Formación de un doble enlace por pérdida de CO ₂ |
| | Oxinitrilasas | Adición de HCN |
| | Deshidratasas | Formación de un doble enlace por pérdida de H ₂ O |
| Ligasas | Carboxilasas | Unión de moléculas por adición de CO ₂ |
| | Sintetasas | Formación de un nuevo enlace: C-O, C-N, C-C y C-S con ruptura simultanea de ATP |
| Hidrolasas | Estereasas | Hidrólisis de un grupo éster |
| | Nucleasas | Hidrólisis de un grupo fosfato |
| | Proteasas | Hidrólisis de un grupo amida |
| Oxidoreductasas | Deshidrogenasas | Introducción de un doble enlace por eliminación de H ₂ |
| | Oxidasas | Oxidación |
| | Reductasas | Reducción |
| Transferasas | Cinasas | Transferencia de un grupo fosfato |
| | Transaminasas | Transferencia de un grupo amino |

2.11 Oxinitrilasas

En 1837 Friedrich Wohler detectó por primera vez la actividad de las oxinitrilasas en la semilla de almendra, estas enzimas catalizan la adición reversible y estereoselectiva de ácido cianhídrico a aldehídos y cetonas para formar cianohidrinas (Esquema 1), la cual contiene el grupo ciano y un hidroxilo.⁵⁶ Se

conocen dos tipos de oxinitrilasas, las denominadas (*R*)-oxinitrilasas que catalizan la formación de cianohidrinan con configuración “*R*” y la (*S*)-oxinitrilasas que favorecen la formación de las cianohidrinan con configuración “*S*”.⁵⁷



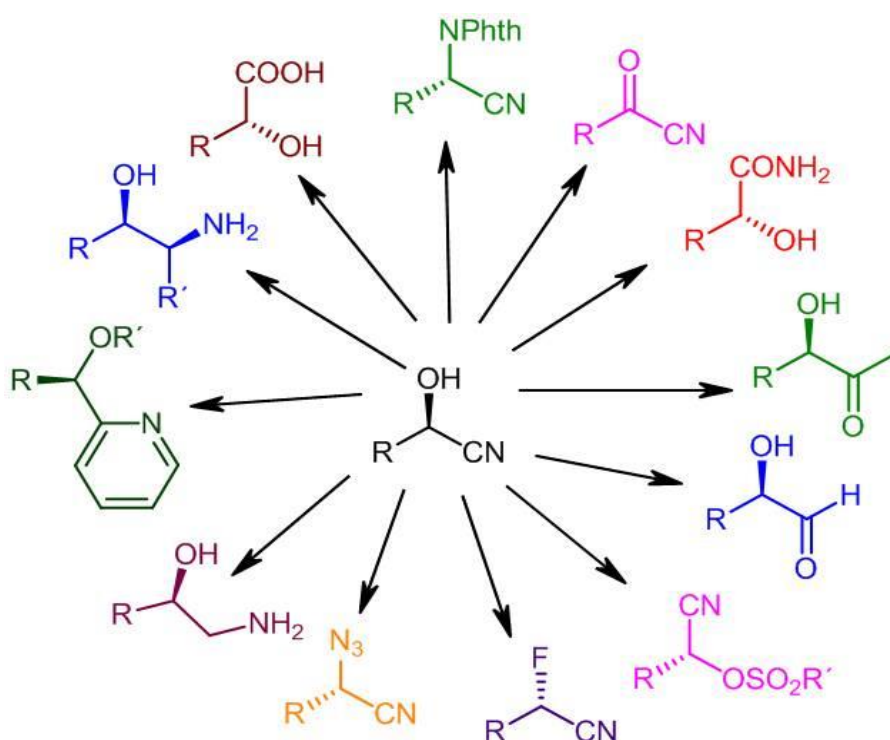
Esquema 1. Formación enantioselectiva de cianohidrinan a partir de aldehídos y cetonas.

Las oxinitrilasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se conoce unas tres mil plantas que pueden producir esta enzima.⁵⁶ Por ejemplo las (*R*)-oxinitrilasas se han aislado de las semillas de diversas plantas como la almendra (*Prunus amygdalus*), capulín (*Prunus serotina*), lino (*Linum usitatissimum*) cereza (*Prunus avium*) ciruela (*Prunus domestica*), zapote (*Pouteria viridis*), durazno (*Prunus pérsica*) y mamey (*Pouteria sapota*);⁵⁷ mientras que las (*S*)-oxinitrilasas se pueden obtener del árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), mandioca (*Manihot esculenta*), caña (*Saccharum officinarum*) y sauco negro (*Sambucus nigra*).⁵⁸ De esta manera, se ha empleado la harina desengrasada de estas semillas como fuentes muy económicas para las biocatálisis, presentando la ventaja de no tener que recurrir a procesos complejos de purificación e inmovilización de la enzima.⁵⁹

Se sabe que la actividad catalítica y la enantioselectividad de estas enzimas depende del pH y la máxima actividad se ha determinado a pH 5 y 6, el inconveniente de esta reacción es que se produce la adición no biocatalizada de cianuro de hidrógeno, con lo que la cianohidrina obtenida presenta baja pureza óptica,⁵⁷ por lo cual se está utilizando medios bifásicos para obtener cianohidrinan enantiopuras con altos rendimientos.⁶⁰

2.12 Cianohidrinas

Las cianohidrinas ópticamente activas son intermediarios importantes en la preparación de compuestos quirales (Esquema 2): como α -hidroxiácidos y sus ésteres, α -aminoácidos, α -hidroxialdehídos, glicoles y α -hidroxicetonas presentes en fármacos, vitaminas, aditivos alimenticio y agroquímico, ejemplo de ellos es el (*R*)-salbutamol, el (*R*)-terbutilna, los cuales son broncodilatadores o la norstatina la cual es un intermediario para agentes anticancerígeno e inhibidores de la proteasa de VIH, todo estos se obtienen a partir de las cianohidrinas.^{57,58,61,62}



Esquema 2. Obtención de diferentes intermediarios a partir de cianohidrinas.⁵⁷

La síntesis a nivel industrial de cianohidrinas enantiopuras está basada en el uso de oxinitrilasas, ya que con el uso de estas enzimas se pueden obtener productos que son difíciles de preparar por métodos químicos convencionales, al mismo tiempo nos permite llevar a cabo transformaciones químicas diferentes, sin la necesidad de protecciones y desprotecciones tediosas, especialmente en los compuestos con varios grupos funcionales.¹¹

2.13 Reacción de adición nucleofílica

El grupo carbonilo es muy reactivo debido a que presentan una estructura plana, polar y en consecuencia, se facilita el ataque de especies nucleofílicas. Este puede ser en catálisis ácida o básica, (Esquema 3).⁶³



Esquema 3. Ataque del ácido cianhídrico al grupo carbonilo del benzaldehído.

2.14 Protección de grupos funcionales

La necesidad de lograr selectividad en la síntesis orgánica ha hecho que se desarrollen numerosos grupos protectores para determinados grupos funcionales, cuando se tiene una molécula con varios grupos funcionales y se desea realizar una transformación selectiva, por lo cual la protección debe cumplir algunas características en específico:

- Modificar temporalmente la naturaleza del grupo funcional del compuesto que se desea mantener intacto mientras reacciona el otro grupo funcional.
- Protegiendo una función determinada se consigue que esta sea temporalmente inerte en unas condiciones en las que si reacciona el otro grupo. La funcionalidad original se recuperara al final del proceso. El grupo que se introduce modificando la funcionalidad y que luego se elimina se llama grupo protector.
- La etapa de protección debe poder realizarse en condiciones suaves, selectivamente y con buen rendimiento.
- El grupo debe tener la mínima funcionalidad posible para evitar reacciones secundarias.
- La etapa de desprotección se debe realizar con buen rendimiento y selectivamente, de forma que no se ataque a otro grupo funcionales presentes en la molécula.⁶⁴

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo de intermediarios nucleosídicos para la síntesis de compuestos con actividad terapéutica como: antibióticos, antimicóticos, antivirales y anticancerígenos actualmente tiene gran relevancia, pero son difíciles de obtener por métodos químicos convencionales, el empleo de biocatalizadores es una alternativa para la obtención de estos compuestos.

En esta investigación se utilizarán las enzimas oxinitrilasas, liasas, utilizando como fuentes de dichas enzimas las semillas de: almendra, capulín, cereza, ciruela, durazno, guanábana, zapote y mamey,^{59,65,66} las cuales tienen la capacidad de incorporar un grupo ciano en un aldehído. Por lo anterior, es relevante desarrollar procedimientos biocatalíticos para lograr una inducción asimétrica, que permita el enriquecimiento de alguno de los estereoisómeros o bien la obtención exclusiva de uno de ellos, por lo cual, en este proyecto al trabajar con la adenosina, la cual contiene ya centros quirales, se pretende obtener un nuevo centro estereogénico con alta pureza óptica utilizando oxinitrilasas con la finalidad de favorecer la formación de uno solo de los diastereoisómeros posibles.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la inducción asimétrica en el nucleósido de adenosina, por medio de la adición biocatalizada del ioncianuro al grupo carbonilo, usando oxinitrilasas presentes en los polvos acetónidos de semillas de: almendra, capulín, cereza, ciruela, durazno, guanábana, zapote y mamey.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Llevar a cabo la síntesis química para la obtención de los derivados de adenosina: aldehído, cianohidrina y amida.
- II. Caracterizar e identificar las materias primas adenosina (**1A**), 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**2B**), y los intermediarios 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**3C**), aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina(**4D**), cianohidrina del 2,5-dimetil pirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina(**5E**), amida de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**6F**), así como el posible producto amida de adenosina (**7G**); por espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear (¹H y ¹³C).
- III. Desarrollar los métodos analíticos por CLAR, para cuantificar e identificar los compuestos A-G.
- IV. Aplicar las enzimas oxinitrilasas, obtenidas de diferentes fuentes vegetales (almendra, capulín, cereza, ciruela, durazno, guanábana, zapote y mamey), para la preparación biocatalítica de la cianohidrina del 2,5-dimetil pirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**5E**).

5. HIPÓTESIS

Se podrá inducir la formación del nuevo centro estereogénico con el enriquecimiento de uno de los diastereoisómeros de la cianohidrina de adenosina, utilizando oxinitrilasas provenientes de diferentes fuentes vegetales.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Instrumentos y Equipos

1. Espectrofotómetro de infrarrojo (IR) Perkin-Elmer Paragon 1600 FT, FT-IR System.
2. Resonancia magnética nuclear (RMN) Varian Mercury DMX400 de 400 MHz y Agilent DD2 600MHz con OneNMRProbe.
3. Espectrofotómetro UV/VIS, Beckman DU650.
4. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent 1100 y 1200 con detector de UV/visible de arreglo de diodos.

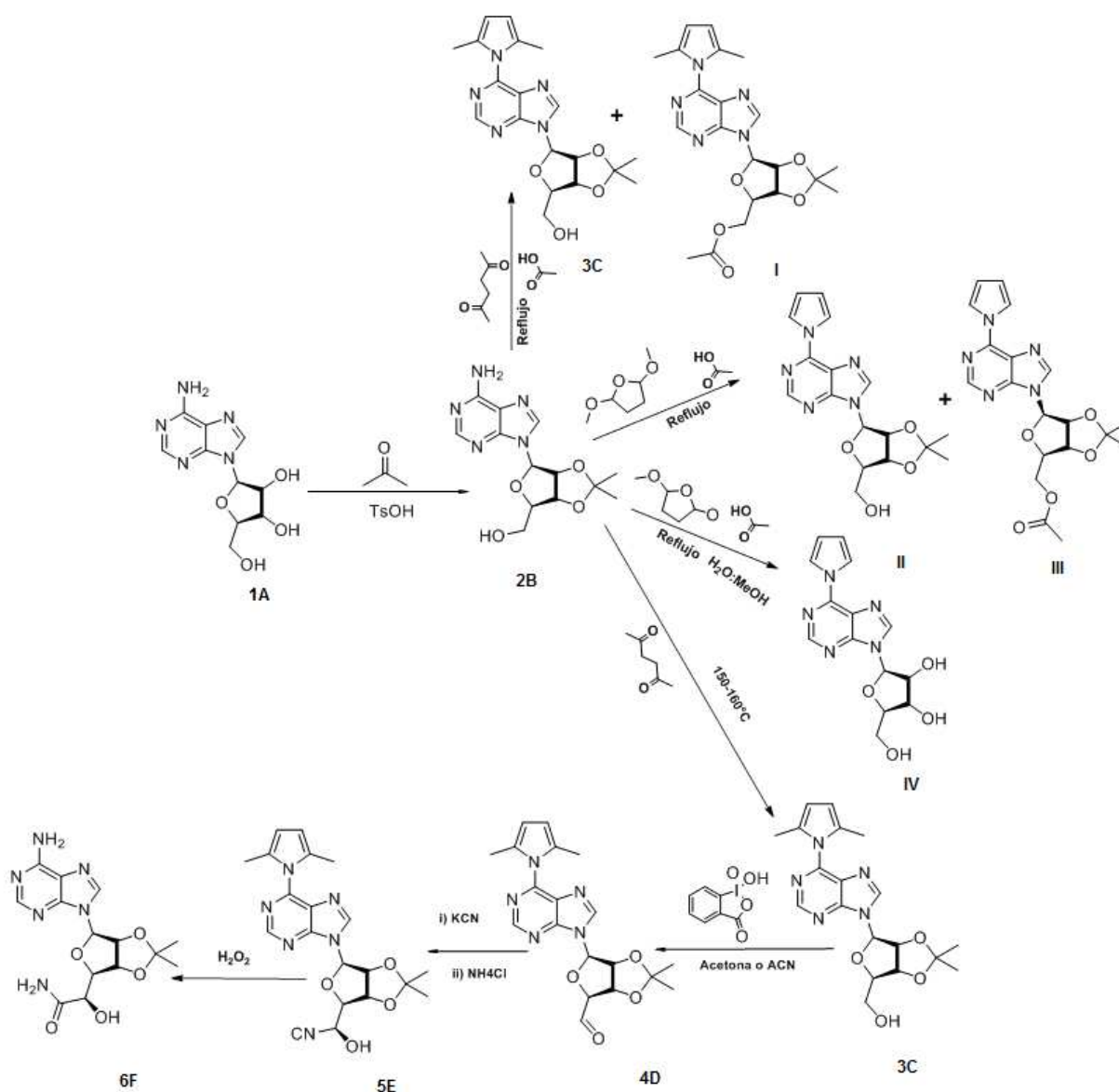
6.2 Insumos Químicos

La materia prima adenosina, 2',3'-O-isopropilidenadenosina se adquirió de Sigma Aldrich, los reactivos y disolventes utilizados para las síntesis fueron grado reactivo (J.T. Baker, Aldrich y Merck), los disolventes grado CLAR (Tecsiquim y J.T. Baker), Sílica Gel para columna flash (200-400 mm) de Merck.

7. METODOLOGÍA

El grupo amino de la adenosina se decidió proteger como derivados del pirrol, para lo cual se emplearon el 2,5-dimetilpirrol y el pirrol.

En el Esquema 4 se muestra la ruta de síntesis química para la obtención de cinco derivados de adenosina (**2B**, **3C**, **4D**, **5E** y **6F**) y de cuatro derivados de pirrol obtenidos durante el proceso de protección del grupo amino (I, II, III y IV). Se describirán las diferentes metodologías utilizadas para su obtención.



Esquema 4. Ruta de síntesis química para la obtención de los derivados de adenosina.

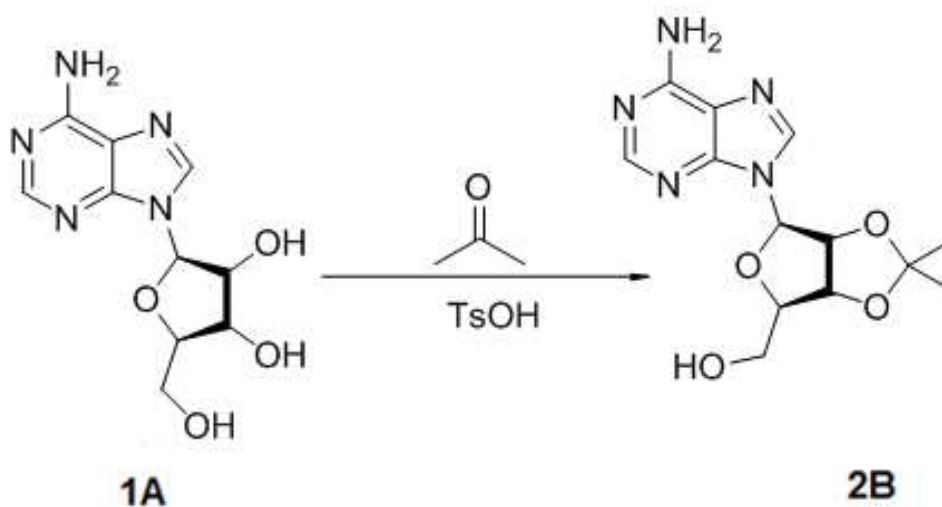
7.1 Síntesis de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (2B) (Esquema 5)

Preparación de Soluciones A y B:

Solución A: Se pesó 1 g (1 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico (TsOH), se disolvió en 15 mL de propanona.

Solución B: Se pesó 1.5g (3 mmol) de adenosina (1A), esta se suspendió en 20 mL de propanona.

Estas soluciones se mezclaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 40 mL más de propanona, se agitan durante 8 horas, y se monitoreo por cromatografía en capa fina (CCF), se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio.⁶⁷ Se filtró en un embudo con un tamaño de poro de 0.45 μm , se lavó con metanol (50 mL) y el filtrado se concentró a presión reducida (rotavapor). Se purificó por cromatografía en columna, utilizando como mezcla de elución: acetato de etilo y metanol (99.9:0.1). El producto fue caracterizado por espectroscopia IR, y RMN de ^{13}C y ^1H .



Esquema 5. Síntesis de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (2B).

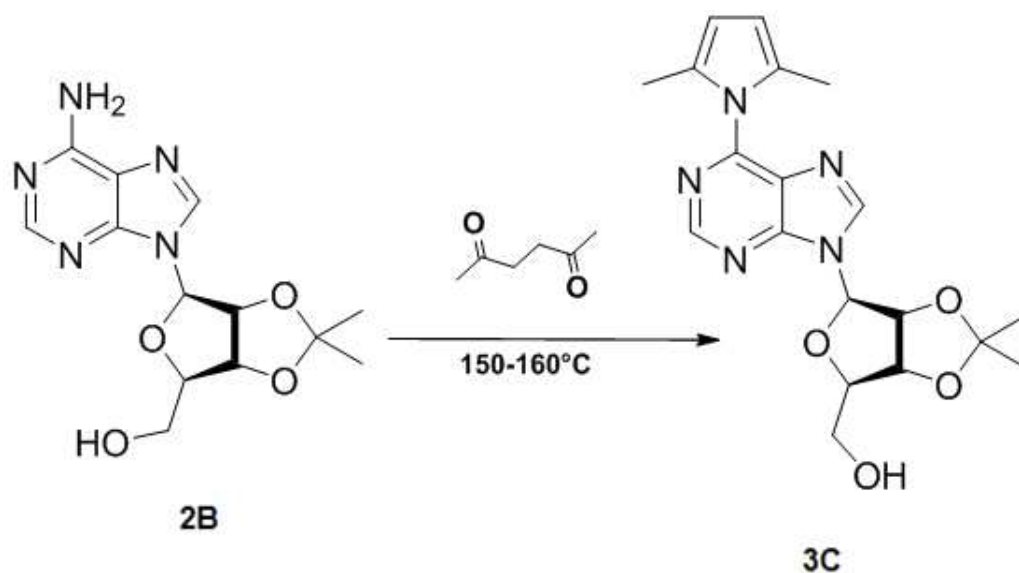
7.2 Protección del 6-amino de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina

Para la protección del grupo amino del compuesto (**2B**), se utilizaron 4 métodos: con 2,5-hexanodiona (método A, donde se obtuvo el 2,5-dimetilpirrol (**3C**) y por el método B, el 2,5-dimetilpirrol (**3C**) y el éster (I)) y con el 2,5-dimetoxitetrahidrofurano (por el método C se obtiene el pirrol (II) y el éster (III) y por el método D, el pirrol de la adenosina (IV)).

7.3 Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**3C**)

Método A (Esquema 6)

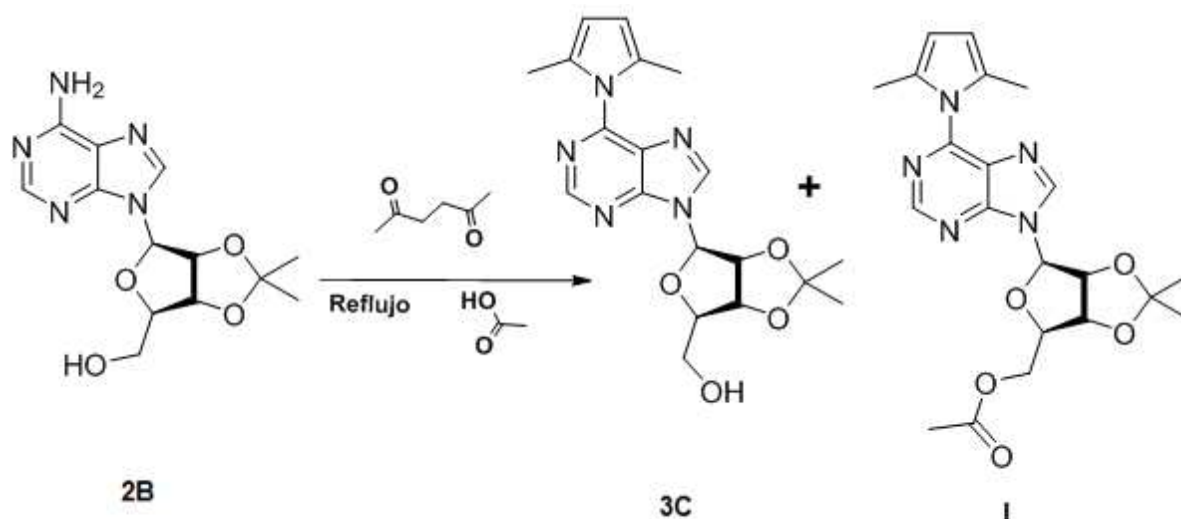
Se pesó 1g (1 mol) de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**2B**) en un matraz balón de 25 mL, se le agregaron 4 mL (10 moles) de 2,5-hexanodiona, se calentó a 150-160°C, con agitación por 48 horas, la reacción se monitoreo por CCF. El matraz con la muestra se colocó directamente al vacío por 12 horas, el producto se purificó por cromatografía en columna con sílica gel, usando como fase móvil mezclas de hexano: acetato de etilo (75:25, 50:50, 25:75), el disolvente se destiló a presión reducida (rotavapor) y el aire se desplazó con N₂ seco.⁶⁸ El producto obtenido se caracterizó por espectroscopia IR y RMN (¹H y ¹³C).



Esquema 6. Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**3C**), método A.

Método B (Esquema 7)

Se pesó 1g (1 mol) de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**2B**), se agregaron 2 mL (5 moles) de 2,5-hexanodiona, y 0.8 a 3 mL de ácido acético, se calentó a reflujo de 4 a 6 horas, se neutralizó con solución saturada de bicarbonato de sodio, se extrajo con acetato de etilo (5 X 100 mL), el producto se purificó por cromatografía en columna con sílica, empleando como fase móvil, mezclas de hexano:acetato de etilo (75:25, 50:50, 25:75, 00:100), el disolvente se destiló a presión reducida (rotavapor) y el aire se desplazó con N₂ seco. Las técnicas empleadas^{68,69} fueron modificadas en el laboratorio (se adicionó, ácido acético para reducir el tiempo de reacción). Se obtuvieron los productos (**3C**) y (I) los cuales se caracterizaron por espectroscopia IR y RMN (¹H y ¹³C).



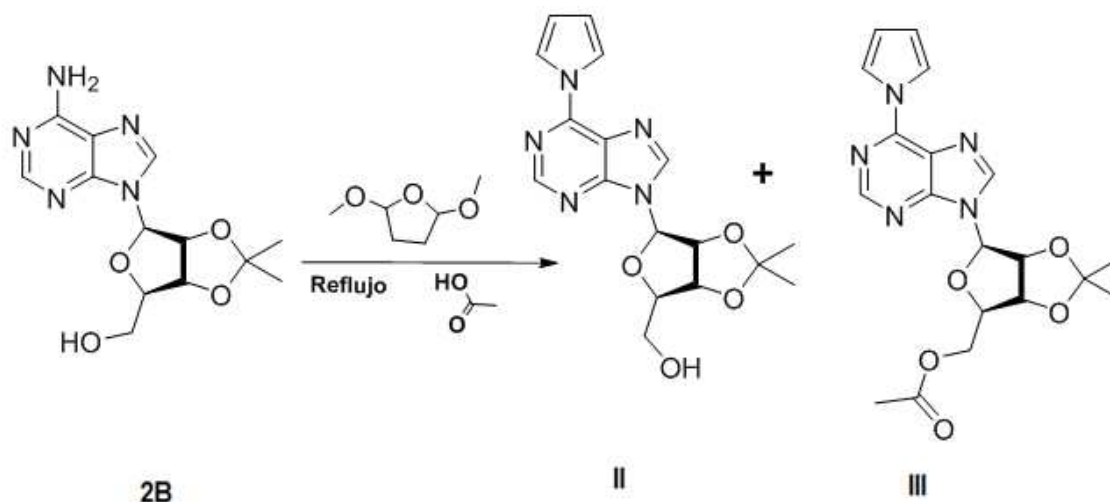
Esquema 7. Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**3C**) y el éster (I), método B.

7.4 Síntesis del pirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (II)

Método C (Esquema 8)

Se pesaron 25 mg (0.7mmoles) de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**2B**) en un matraz balón de 10 mL, se le adicionaron 21 μL (1.62 mmoles) de 2,5-dimetoxitetrahidrofurano y 2 mL de ácido acético como medio de reacción, se calentó a reflujo durante 5 horas, la reacción se monitoreo por CCF, se neutralizó

con una solución saturada de bicarbonato de sodio, se extrajo con cloruro de metileno (3X15 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró y se destiló el disolvente a presión reducida; el residuo se purificó por cromatografía en columna con sílica gel, empleando distintas mezclas de hexano:acetato de etilo como eluyente (75:25, 50:50, 25:75, 00:100), el disolvente se destiló a presión reducida (rotavapor) y el aire se desplazó con N₂ seco.^{69,70} Se obtuvieron los productos (II) y (III) los cuales se caracterizaron por espectroscopia IR y RMN (¹H y ¹³C).

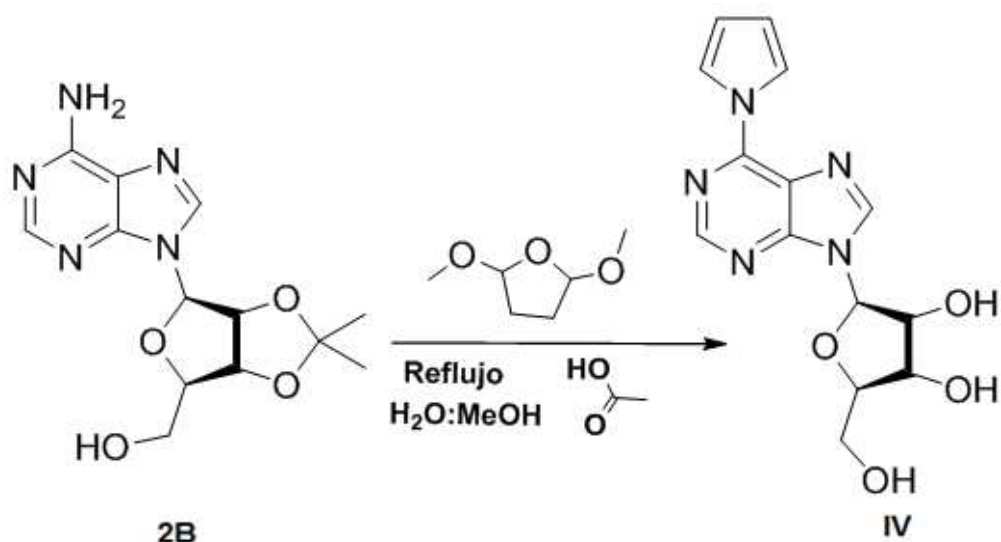


Esquema 8. Síntesis del pirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (II) y el éster (III), método C.

7.5 Síntesis del pirrol de la adenosina (IV)

Método D (Esquema 9)

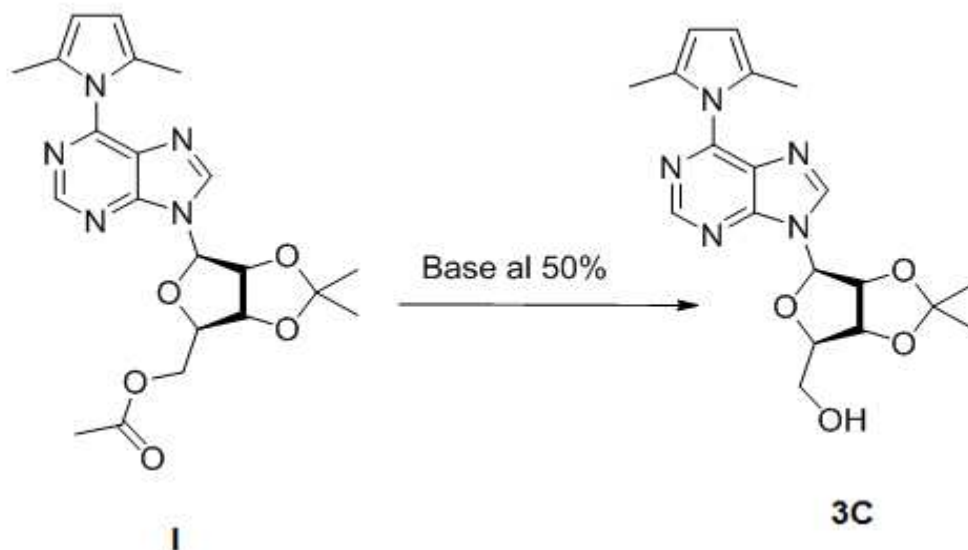
Se pesaron 30 mg (0.9mmoles) de 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**2B**), se agregaron 21 μ L (1.6 mmoles) de 2,5-dimetoxitetrahidrofurano, 2 mL de ácido acético diluido con metanol y agua (80:20 o 50:50). Se calentó a reflujo por 15 horas, la reacción se monitoreó por CCF, se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, se extrajo con acetato de etilo (4 X 25mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró y se destiló el disolvente a presión reducida; el residuo se purificó por cromatografía en columna con sílica gel, empleando distintas mezclas de hexano: acetato de etilo (50:50, 25:75 y 0:100), el disolvente se destiló a presión reducida (rotavapor) y el aire se desplazó con N₂ seco.⁷⁰ El producto se caracterizó por espectroscopia IR y RMN (¹H y ¹³C).



Esquema 9. Síntesis del pirrol de la adenosina (IV), método D.

7.6 Hidrólisis del éster (I) para la obtención del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (3C) (Esquema 10)

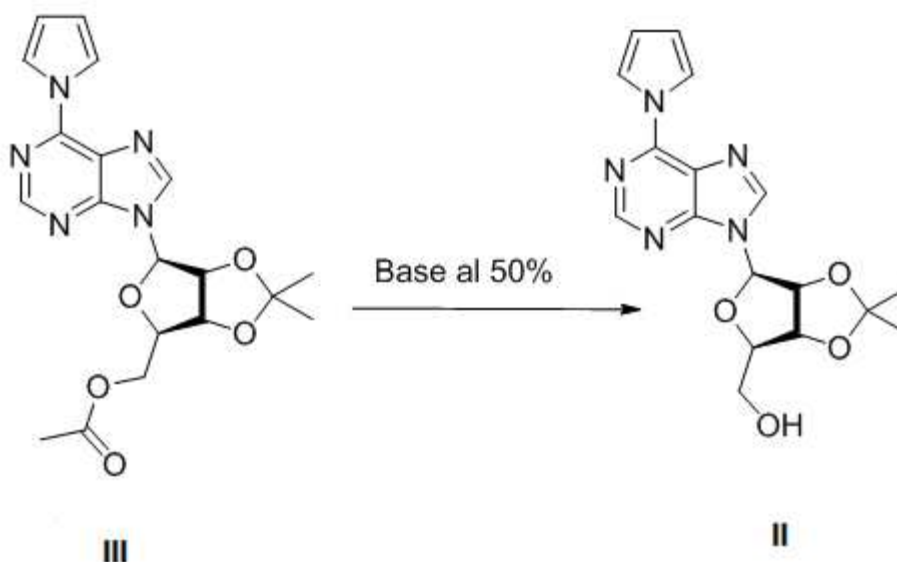
En un matraz de 10mL se pesaron 100 mg de (I), se agregaron 2 mL de NaOH al 50%, se calentó con agitación a 70°C durante 6 min, se neutralizó con ácido acético, se extrajo con acetato de etilo (3 X 40 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró y se destiló el disolvente a presión reducida, el residuo se purificó por cromatografía en columna con sílica, empleando como eluyente hexano:acetato de etilo (75:25, 50:50, 25:75, 00:100), el disolvente se destiló a presión reducida (rotavapor) y el aire se desplazó con N₂ seco. Los productos se caracterizaron por espectroscopia IR y RMN (¹H y ¹³C).



Esquema 10. Hidrólisis del éster (I) para la obtención del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (3C).

7.7 Hidrólisis del éster (III) para la obtención del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (II) (Esquema 11)

En un matraz de 10 mL se pesaron 30 mg de (III), se agregaron 2 mL de KOH al 50%, se calentó a reflujo durante 25 min, se monitoreó por CCF. Se neutralizó con ácido acético, se extrajo con acetato de etilo (150 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró y se destiló el disolvente a presión reducida.



Esquema 11. Hidrólisis del éster (III) para la obtención del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (II).

7.8 Síntesis del ácido *o*-iodoxibenzoico (IBX) (Esquema 12)

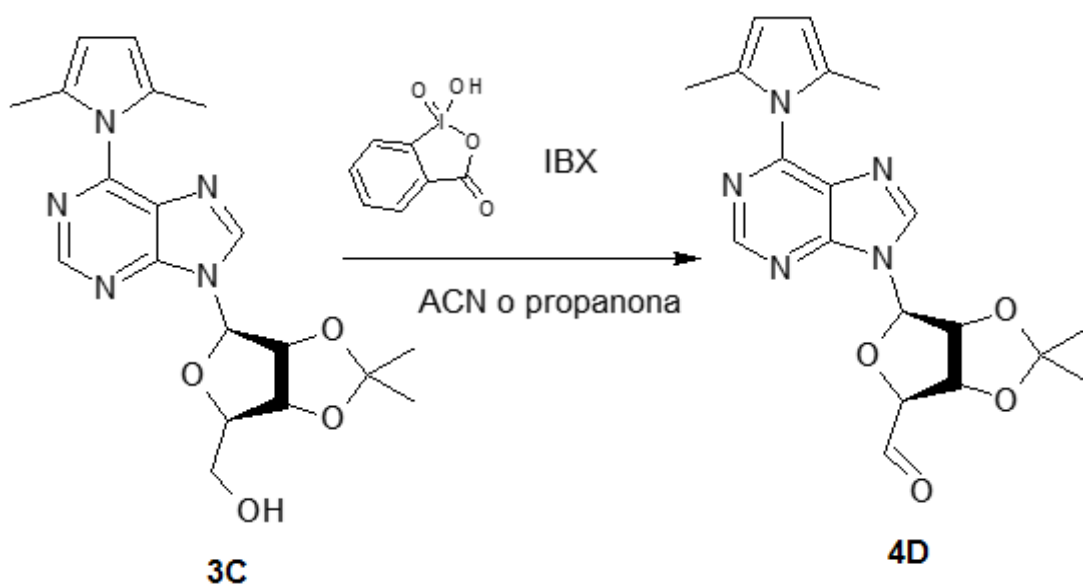
En un matraz balón de 1000 mL se pesaron 10 g (1 mmol) de ácido 2-iodobenzoico, con agitación se adicionó una solución de Oxone[®] 74.3g (3 mmol) en 400 mL de agua desionizada, la mezcla se calentó a 75°C- 80°C durante 12 horas, se monitoreó la reacción por CCF. La mezcla se enfrió a 0-5°C por 30 min con agitación lenta, se filtró en un embudo de vidrio sinterizado, lavando con agua (6 x 100 mL) y acetona (2 x 100 mL). El sólido se secó por 16 horas a temperatura ambiente.^{71,72} El producto se caracterizó por espectroscopia IR y RMN (¹H y ¹³C).



Esquema 12. Síntesis para la obtención del IBX.

7.9 Síntesis del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (4D) (Esquema 13)

En un matraz bola de 250 mL, se pesaron 400 mg (1 mmol) de 2,5-dimetilpirrol de la 2,3-*O*-isopropilidenadenosina (3C) el cual se disolvió en 7 mL de acetonitrilo, se adicionaron 870 mg de IBX (3 mmol). La reacción se realizó en atmósfera de nitrógeno, calentando a 78°C durante 3 horas, se monitoreo por CCF; la reacción se enfrió a -5°C, se filtró en vidrio sinterizado para eliminar los residuos de IBX, se lavó con acetonitrilo a (-5°C) (3 X 20mL), el disolvente se destiló a presión reducida (rotavapor), el aire se desplazó con N₂ seco para evitar la hidratación.⁷³⁻⁷⁶ El producto se caracterizó por espectroscopia IR y RMN (¹H y ¹³C).



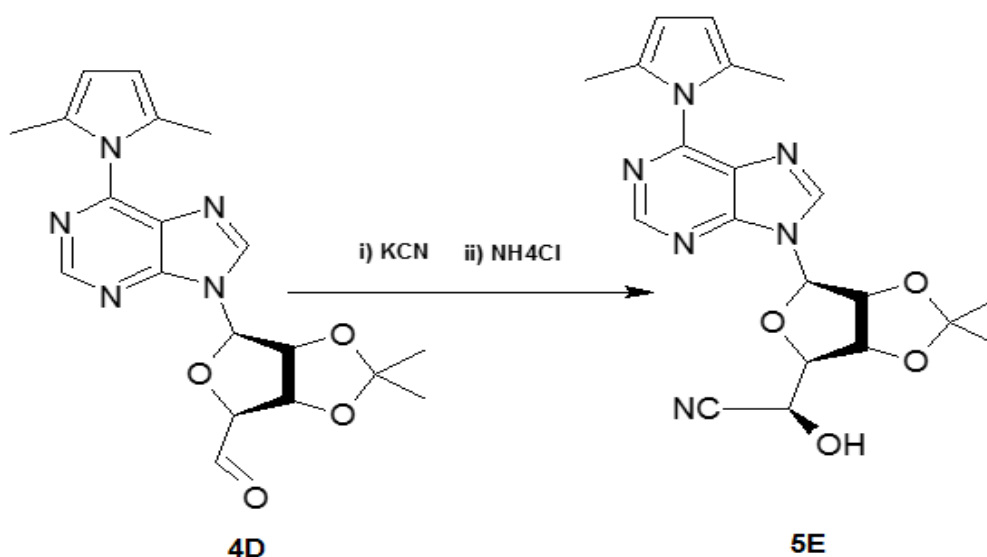
Esquema 13. Síntesis del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**4D**).

7.10 Síntesis química de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**5E**)

A partir del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosinase realizó la síntesis química para la obtención de la cianohidrina (**5E**) empleando los métodos (A y B).

Método A (Esquema 14)

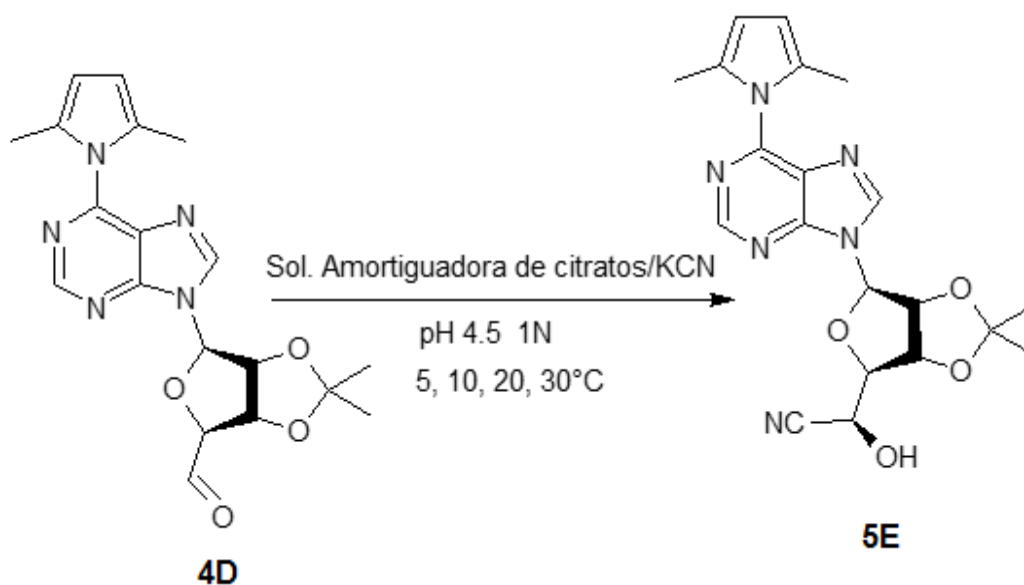
Se prepararon soluciones acuosas de: cloruro de amonio (2.2 mmol) en 2 mL de agua y de cianuro de potasio (2.2 mmol) en 2 mL de agua; estas soluciones se mezclaron en un vial de 25 mL y se adicionó 1 mmol del compuesto (**4D**) a 30°C por 24 horas, se monitoreó por CCF. La cianohidrina se extrajo con AcOEt (6 x 5 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, el disolvente se destiló a presión reducida, hasta la obtención de un aceite café oscuro.⁷⁷ El producto se caracterizó por espectroscopia IR y RMN (¹H y ¹³C).



Esquema 14. Síntesis química de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**5E**), método A.

Método B (Esquema 15)

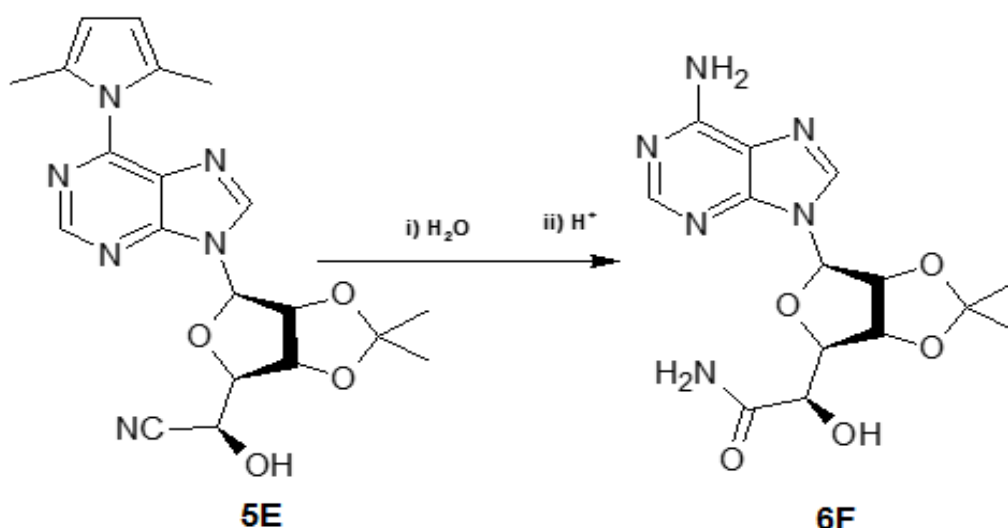
En un tubo de ensayo con tapa de rosca de 5 mL, se agregaron 0.5 mL de una solución amortiguadora de cianuro de potasio (KCN) y ácido cítrico (pH 4.5 1N), el HCN se extrajo con éter diisopropílico (2 x 1 mL) y a la fase orgánica se le adicionaron 141 mg (0.5mmol) del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**4D**), la mezcla se agitó a: 5, 10, 20 y 30°C (este método se empleó como control químico para las reacciones biocatalíticas). La reacción se agitó durante 96 horas, monitoreándose por CCF, se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL), se secó con Na₂SO₄anhidro, se filtró y el disolvente se destiló a presión reducida, el producto obtenido se analizó por CLAR y RMN para determinar el exceso diastereoisomérico.⁷⁹⁻⁸¹



Esquema 15. Síntesis química de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**5E**), método B.

7.11 Síntesis de la amida de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**6F**) (Esquema 16)

En un matraz de bola de 50 mL, se pesaron 50 mg del compuesto (**5E**), se le adicionó 1 mL de H₂O₂ al 30%, se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 24 horas, se monitoreó por CCF, el crudo de la reacción se liofilizó para eliminar el agua, el sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna con sílica gel, empleando como fase móvil una mezcla de AcOEt:MeOH 75/25 (15 mL) y 50/50 (10 mL).⁷⁸



Esquema 16. Síntesis química de la amida de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**6F**).

7.12 Preparación del biocatalizador

Se seleccionaron semillas de plantas de los géneros *Prunus*, *Annona* y *Pouteria*, como fuentes de oxinitrilasas: almendra (*Prunusdulcis*), ciruela (*Prunus domestica*), capulín (*Prunusserotina*), cereza (*Prunusavium*), zapote (*Pouteriaviridis*), durazno (*Prunus pérsica*), guanábana (*Annonamuricata*) y mamey (*Pouteriasapota*).⁷⁹⁻⁸²

La semilla de cada uno de los frutos, se lavaron perfectamente, se eliminó el endocarpio. Posteriormente, se remojaron en agua para retirar el tegumento que recubren el endospermo, los cuales se molieron con acetona en una licuadora; el disolvente se eliminó por filtración y este proceso se repitió tres veces. El sólido se secó a temperatura ambiente. Posteriormente, se tamizó para homogenizar el tamaño de partícula y obtener un polvo fino y uniforme. El polvo se almacenó en frascos ámbar y en refrigeración a 4°C.⁶⁶

7.13 Síntesis biocatalítica de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (5E)

7.13.1 Preparación de la solución amortiguadora de KCN/citratos 1N pH 5 y pH 4.5

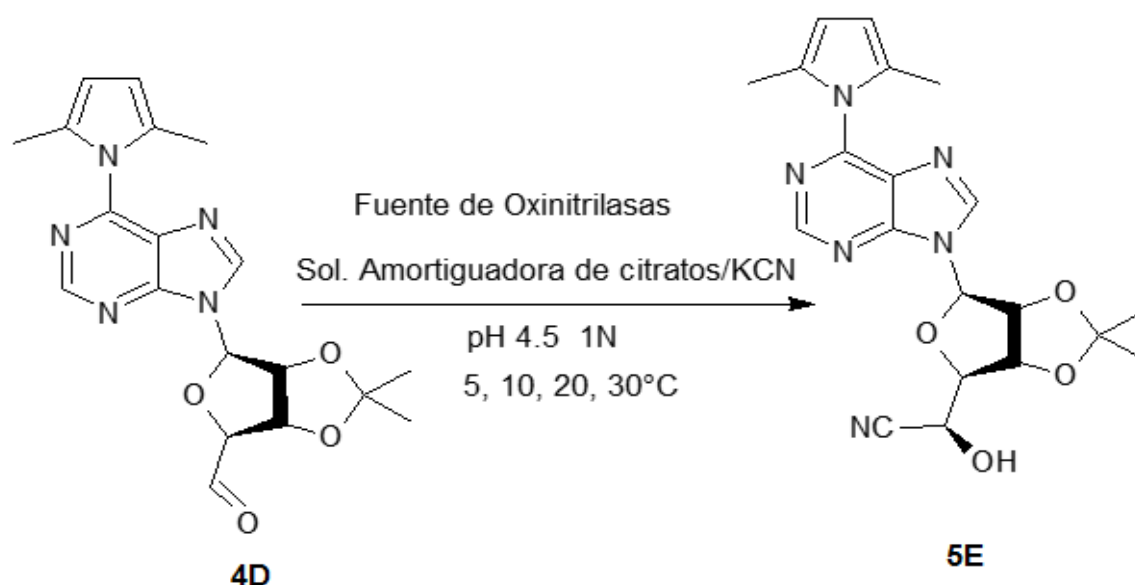
Se pesaron 6.512 g de KCN se disolvieron en 60 mL de agua destilada, el pH se ajustó a 5.0 o 4.5 ± 0.05 con ácido cítrico, la solución se aforó a 100 mL con agua destilada. La solución se guardó en frascos de 10 mL cada uno, estos se etiquetaron y se sellaron hasta su empleo, conservándolos en refrigeración a 4°C.

Nota: Estas soluciones tienen que estar en refrigeración y selladas dada la peligrosidad del ácido cianhídrico.

7.13.2 Síntesis de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (5E) por biocatálisis

Se utilizó como fuente de HCN la solución amortiguadora de KCN/citratos (pH 4.5, 1N) (1 o 6 equivalentes); el HCN se extrajo con éter diisopropílico (2 x 1.5 mL), se colectó la fracción orgánica y se adicionaron 26 o 50 μL de la solución amortiguadora de KCN/citratos, se mantuvo en agitación durante 5 minutos para saturar la fase orgánica, se adicionó la fuente de oxinitrilasas en relación 1:1 sustrato:biocatalizador. La mezcla se agitó magnéticamente durante 10 minutos a 5, 10, 20 o 30°C; transcurrido el tiempo, se adicionaron 15 o 20 mg el aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**4D**) y se mantuvo con agitación a temperatura constante de 5, 10, 20 y 30°C, (ver Esquema 17). La reacción se monitoreó por CCF y espectroscopia IR; después del término de la reacción se agregó una mínima cantidad de agua para disolver el HCN y se extrajo con AcOEt (3 x 4 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se destiló a presión reducida, el producto se analizó por CLAR y RMN para determinar los excesos diastereoisoméricos (%*ed*).^{73,74,82}

A la fase acuosa se le adiciona solución de NaOCl (para transformar el HCN).



Esquema 17. Síntesis biocatalítica de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**5E**).

7.14 Infrarrojo

Para llevar a cabo el análisis de los compuestos, se disolvieron o se resuspendieron en (CHCl_3), aplicando la muestra sobre la celda formando una película.

7.15 UV/Visible

Para el análisis de los compuestos: (**1A**), (**2B**), (**3C**), (**4D**), (**5E**) y (**6F**) se pesaron 2 mg los cuales se disolvieron en 25 mL de metanol. De esta solución se tomaron 5 μL que se diluyeron en 1 mL de metanol y se leyó en el espectrofotómetro UV/VIS.

7.16 Resonancia Magnética Nuclear

Para el análisis de los compuestos (**1A**) y (**2B**), se empleó DMSO deuterado, CD_3OD para el compuesto (IV) y CDCl_3 para los compuestos (**3C**), (**4D**), (**5E**), (**6F**) (I, II, III) y la 2,5 hexanodiona. Se usó TMS (referencia interna) $\delta^1\text{H} = 0$, $\delta^{13}\text{C} = 0$

Esta técnica además de ser utilizada para la caracterización de cada uno de los compuestos sintetizados, se usó para: 1) la cuantificación de los % de exceso diastereoisomérico (%*ed*), utilizando las áreas bajo la curva (ABC) de las señales características del centro quiral formado. Esta información la proporciona el equipo integrando únicamente las señales de interés de ambos diastereoisómeros y 2) en la determinación de los porcentajes de conversión del aldehído a la cianohidrina tanto en la síntesis química como en la biocatalítica, se utilizó el área bajo la curva del protón del aldehído y de los protones de los diastereoisómeros formados. Esta información la proporciona el equipo integrando únicamente las señales de interés o se utiliza la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de conversión} = \frac{1ABC \text{ del producto} \times 100}{ABC \text{ del producto} + ABC \text{ del reactivo}}$$

7.17 Desarrollo de los 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 1200 y 1100, para obtener las mejores condiciones de separación y cuantificación de cada uno de los diastereoisómeros del compuesto (5E), se utilizaron columnas con fase estacionaria C8, C18 y quirales.

7.17.1 CLAR Fase Reversa

Se pesaron 2 mg de los compuestos y se disolvieron en 2 mL de metanol y las muestras se filtraron por membrana de nailon de 0.20 μm . El análisis se realizó en un equipo Agilent 1200, utilizando las columnas Luna-C8 y Luna-C18 de 150 mm de largo x 3 mm de diámetro interno y 5 μm tamaño de partícula de *n*-octadecilsilano como fase estacionaria. Se probaron diferentes variables como: polaridad de la fase móvil, velocidad de flujo, el volumen de inyección 1, 2, 4 μL ; la temperatura fue de 25°C y se utilizaron las longitudes de onda máxima reportadas para algunos de los derivados de adenosina, λ : 220, 254, 260, 280 nm.⁸³⁻⁸⁸

7.17.2 CLAR Fase normal

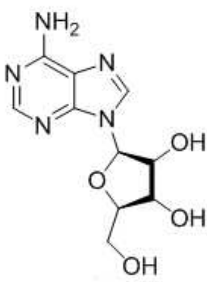
Se pesaron 2 mg de los compuestos y se disolvieron en isopropanol, las muestras se filtraron por membrana de nailon de 0.20 μm . El análisis se realizó en un equipo Agilent 1100, para la separación de la muestra se utilizaron las columnas quirales, OD, OJ-H y OB-H, se probaron diferentes variables como: polaridad de la fase móvil, velocidad de flujo, el volumen de inyección, a una temperatura de 25°C, se utilizó las longitudes de onda máxima reportadas para algunos de los derivados de adenosina, λ : 220, 254, 260, 280 nm.^{74,89-92}

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis de la adenosina (1A)

En el laboratorio se determinaron las propiedades de la adenosina (**1A**), Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades de la adenosina.

| | | |
|---|---|--|
|  | C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄ | (6-amino-9-β-D-ribofuranosil-9-H-purina) |
| | Peso molecular | 267.25 |
| | Apariencia | polvo blanco cristalino |
| | P. F. (°C) | 234 -237 |
| | Solubilidad | Soluble en DMSO, agua caliente, ligeramente soluble en metanol, acetonitrilo, prácticamente insoluble en isopropanol y cloruro de metileno. Se disuelve en ácidos minerales diluidos |

La adenosina fue caracterizada por IR y RMN con la finalidad de analizar y comparar con los derivados nucleosídicos obtenidos al término de cada reacción.

8.1.1 Caracterización por IR del compuesto (1A)

En la Figura 5 se muestra el espectro de infrarrojo de la adenosina. En donde se puede observar las vibraciones por estiramiento de N-H y O-H en 3307cm⁻¹ y su banda de confirmación en 753 cm⁻¹, así mismo las vibraciones C-H (sp³) en 2929cm⁻¹ y la vibración C-O en 1212 cm⁻¹.

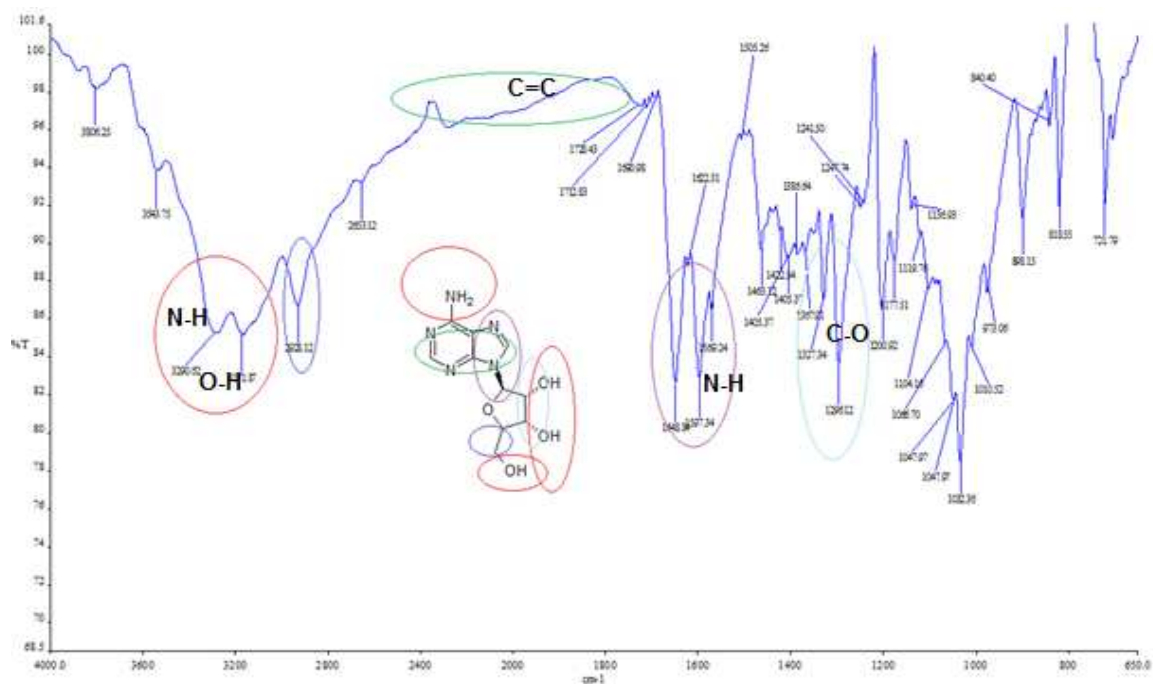


Figura 5. Espectro de IR de la adenosina.

8.1.2 Caracterización por UV-Visible de compuesto (1A)

El compuesto (**1A**) presenta una longitud máxima en 260 y una mínima en 226 nm, como se muestra en la (Figura 6). Esto concuerda con lo reportado por Ting,⁹³ donde la absorbancia máxima es de 260 nm.

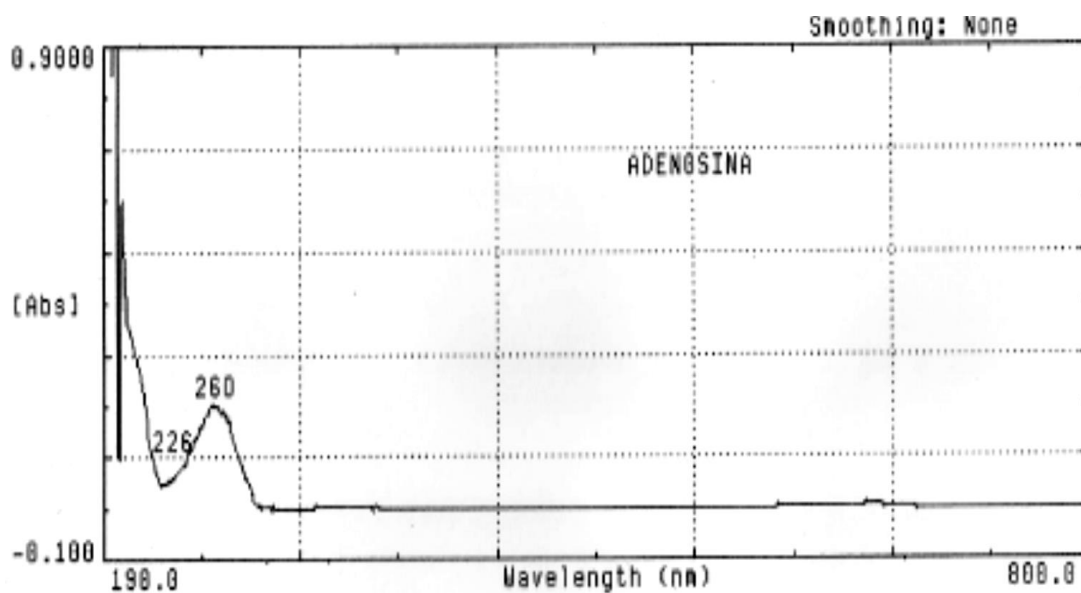


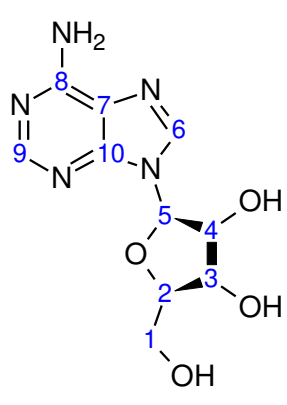
Figura 6. Espectro de UV-Visible de la adenosina.

8.1.3 Caracterización por RMN del compuesto (1A)

El análisis de RMN para la adenosina se realizó en DMSO, en la Tabla 5 se muestra el desplazamiento químico para cada hidrógeno y carbono que la constituyen. En la Figura 7 se muestra el espectro de carbono, ^{13}C y en la (Figura 8) se muestran los espectros de RMN para ^1H .

En la **Tabla 5** se muestra el desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H así como los acoplamientos entre protones; cabe mencionar que para una mejor asignación, se emplearon las técnicas en 2D de RMN, DEPT (Figura 9) COSY (Figura 10) y gHMBC (Figura 11)

Tabla 5.Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H así como los acoplamientos entre protones de la adenosina.

|  | No. Carbono | ^{13}C (ppm) | ^1H (ppm) | |
|---|----------------------|-----------------------|--------------------|--------------|
| | | 1 | 61.7 | 3.56 (m, 1H) |
| | 2 | 86.0 | 3.97(m. 1) | |
| | 3 | 70.7 | 4.15 (d.d. 1H) | |
| | 4 | 73.5 | 4.61 (d.d. 1H) | |
| | 5 | 88.0 | 5.88 (d. 1H) | |
| | 6 | 140.0 | 8.35 (s. 1H) | |
| | 7 | 119.4 | _____ | |
| | 8 | 156.3 | _____ | |
| | 9 | 152.5 | 8.14 (s. 1H) | |
| | 10 | 149.1 | _____ | |
| | H del OH unido al C1 | | 5.46 (m. 1H) | |
| | H del OH unido al C3 | | 5.20 (d. 1H) | |
| | H del OH unido al C4 | | 5.46 (m. 1H) | |
| | H del NH_2 | | 7.35 (s. 2H) | |

En la Figura 7 se puede observar que el número total de señales de carbonos corresponde con el total presente en la molécula. El carbono No. 1 de la adenosina donde se llevarán a cabo las distintas transformaciones se encuentra en 61.7 ppm y los carbonos 3 y 4 en 70.7 y 73.5 ppm, los cuales están unidos a grupo hidroxilo, que serán protegidos, formando el cetal, los cuales se verán modificados en el transcurso de las reacciones.

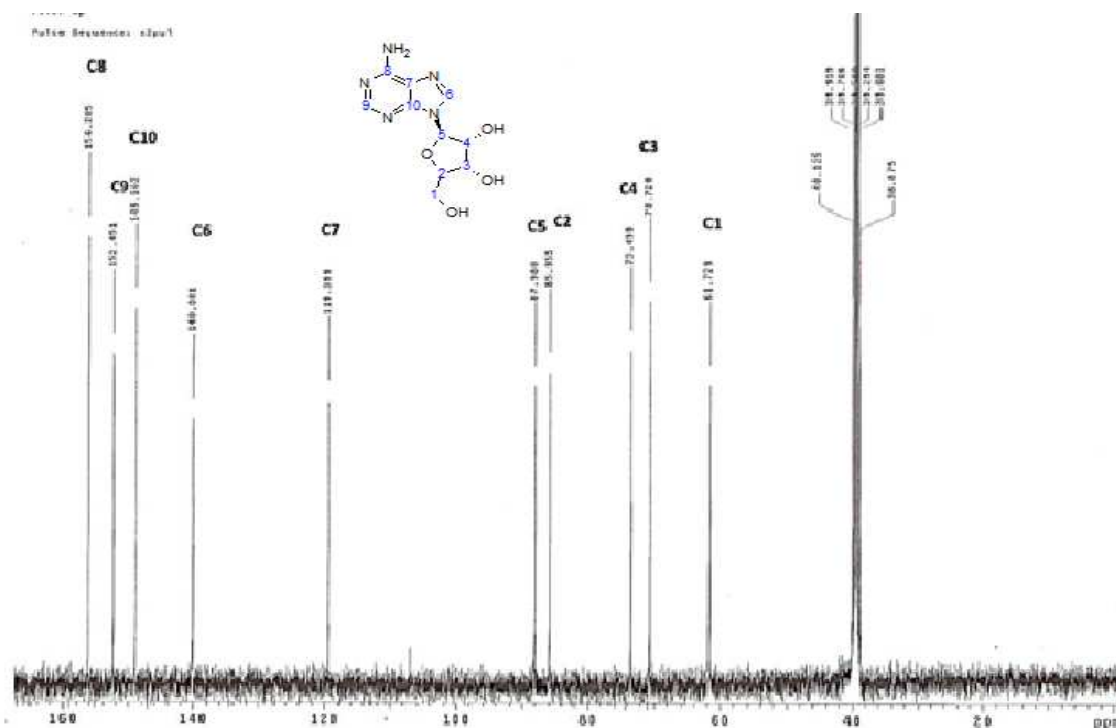


Figura 7. Espectro de RMN de ¹³C de la adenosina.

En el espectro de RMN ¹H Figura 8, se observan las señales correspondientes a cada protón presente en la molécula y su respectivo acoplamiento. En especial, se puede observar que los protones unidos al carbono 1 presentan diferentes desplazamientos (3.55 y 3.67 ppm respectivamente), debido a la conformación espacial de dichos protones y que son diastereotópicos.

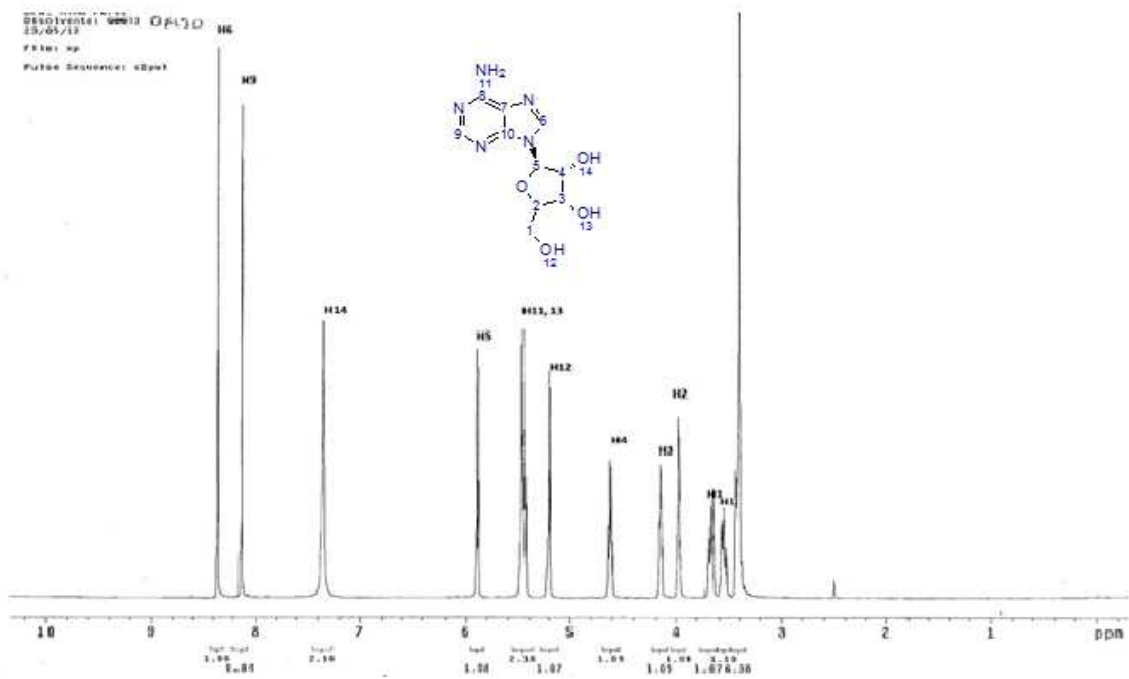


Figura 8. Espectro de RMN de ¹H de la adenosina.

Además del análisis de ¹³C y ¹H se realizaron los análisis en dos dimensiones DEPT (Figura 9) COSY (Figura 10) y gHMBC (Figura 11) para confirmar la identificación de la molécula de adenosina.

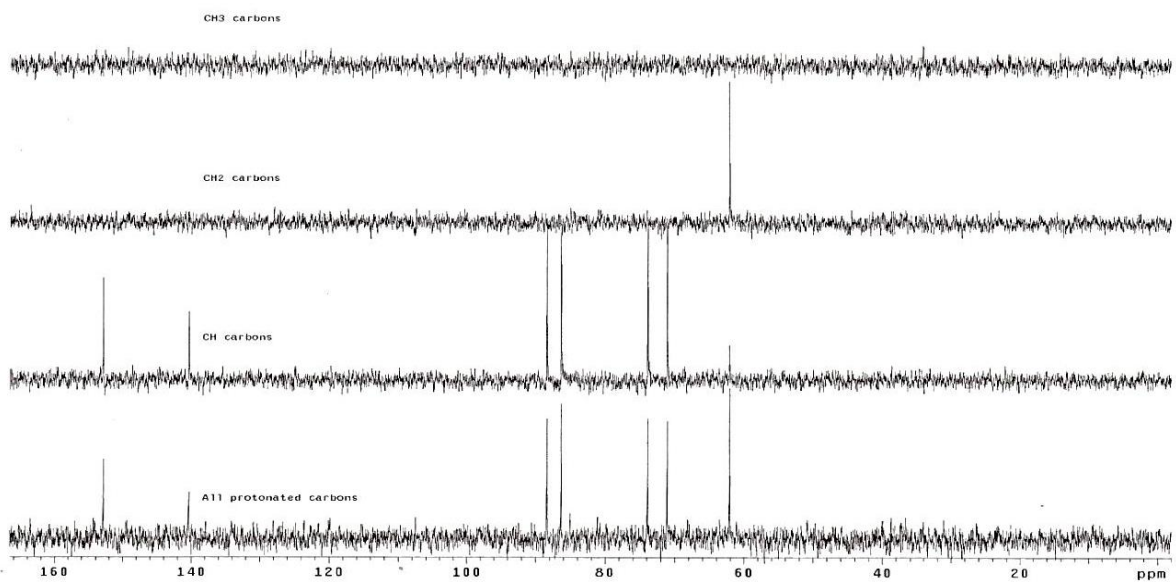


Figura 9. Espectro DEPT de la adenosina.

En el espectro DEPT (Figura 9), se puede observar la presencia de un grupo CH₂ y 6 grupos CH, lo cual concuerda con la molécula de adenosina, ya que los 3 carbonos restantes de nuestra molécula son carbonos cuaternarios los cuales no son observables por esta técnica.

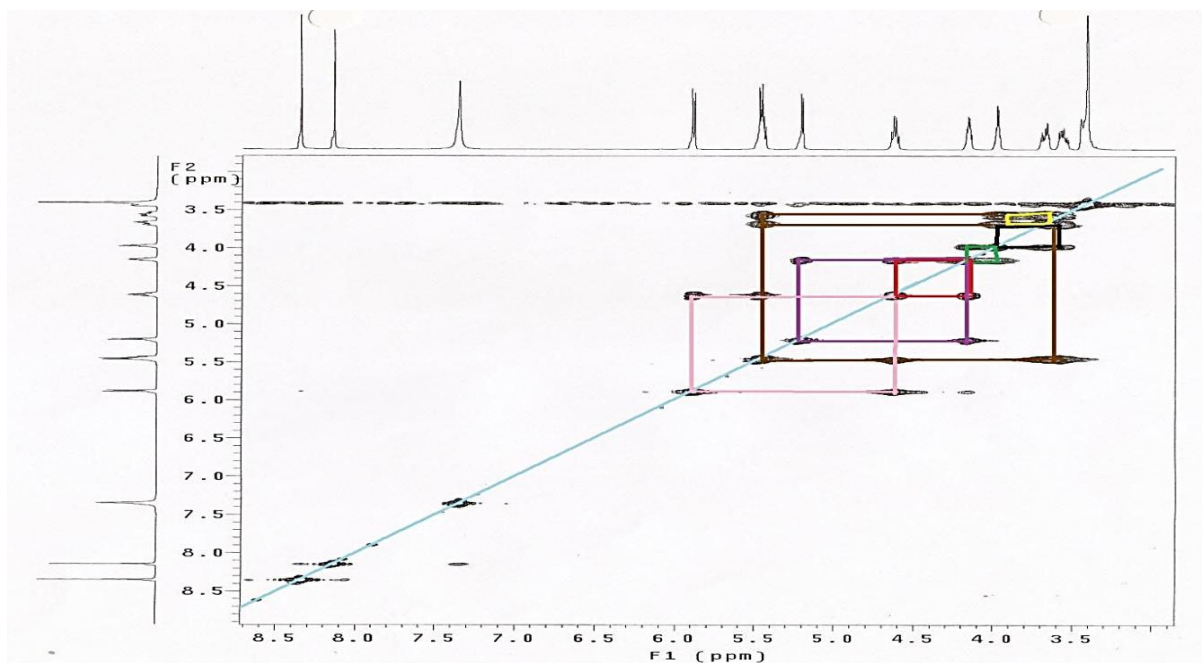


Figura 10. Espectro COSY de la adenosina.

En el espectro COSY de la adenosina (Figura 10) se pueden observar 7 correlaciones homonucleares de los protones presentes en la molécula, ejemplo de ellos es la correlación que existe entre el protón 3 (línea morada), con el protón 4 (línea roja) lo cuales se verán modificados por la formación del grupo acetal.

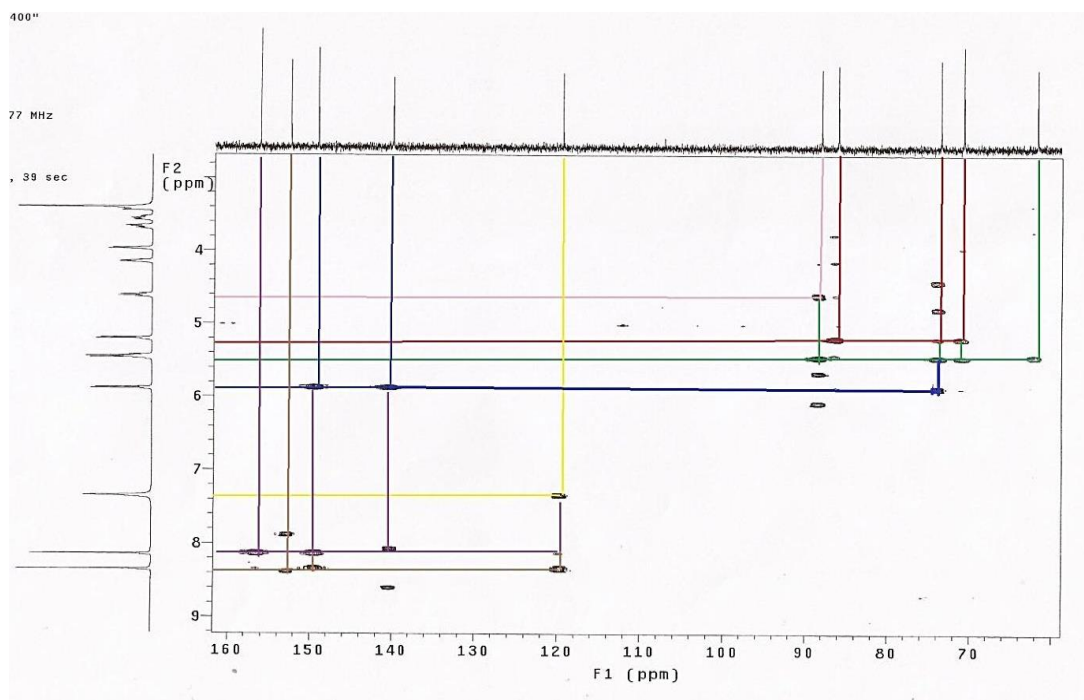


Figura 11. Espectro gHMBC de la adenosina.

El espectro gHMBC de la adenosina permite detectar la correlación del protón con el carbono a dos o a tres enlaces de distancia, lo cual nos permitió hacer una identificación de la molécula de adenosina (ver Figura 11).

En el análisis de la adenosina por RMN ^{13}C y ^1H los resultados son similares a lo reportado por Ah-Kow.⁹⁴

8.2 Síntesis de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (2B)

Para la obtención del 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**2B**) se realizaron 9 lotes (**Tabla 6**) tomando como referencia la técnica de Townsend.⁶⁷ La reacción se agitó por 48 horas y se monitoreó por CCF, usando como fase móvil acetato de etilo. En los lotes 1 y 2 se obtuvo un % de conversión bajo (56-62 %), debido a que cuando se mezclaban al mismo tiempo tanto catalizador y materia prima, se formaba una suspensión muy viscosa, la cual era difícil de agitar, por lo que se realizaron modificaciones a la técnica: a) se mezcló por separado el ácido p-toluensulfónico con la propanona y posteriormente se le fue agregando la materia

prima (adenosina), esto ayudó a que se disolviera mejor la adenosina (solución homogénea), que facilitó la agitación, b) así mismo se modificaron las relaciones del catalizador (TsOH) de 5 a 3 ya que se obtenían los mismos rendimientos, por lo cual las mejores condiciones: son materia prima:catalizador 1:3 mol por 24 horas obteniendo un rendimiento del 99% (Lote 7).

Tabla 6. Síntesis de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**2B**).

1A **2B**

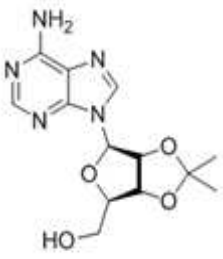
Síntesis de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (2B)

| Lote | Adenosina mg(mmol) | TsOH mg (mmol) | Propanona mL | Tiempo (h) | Rendimiento % |
|----------|-----------------------|-------------------|-----------------|---------------|------------------|
| 1 | 50(0.19) | 10.44 (0.06) | 13.5 | 48 | 62 |
| 2 | 50(0.19) | 32.0 (0.19) | 7.0 | 18 | 56 |
| 3 | 50.2 (0.19) | 32.0 (0.19) | 15 | 24 | 86 |
| 4 | 300 (1.12) | 200.0 (1.16) | 16 | 48 | 81 |
| 5 | 150 (0.57) | 500.0 (2.90) | 20 | 24 | 77 |
| 6 | 500 (1.88) | 840.0 (4.88) | 50 | 24 | 91 |
| 7 | 100 (0.38) | 190.0 (1.10) | 25 | 24 | 99 |
| 8 | 200 (0.75) | 644.0 (3.74) | 25 | 24 | 96 |
| 9 | 1000 (3.74) | 1580.0 (9.18) | 35 | 24 | 98 |

8.2.1 Caracterización del compuesto (2B)

El producto se caracterizó y sus propiedades se encuentran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Propiedades de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina.

| | | |
|---|---|--|
|  | C₁₃H₁₇N₅O₄ | 6-(6-amino-9H-purina-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-ol |
| | PM | 307.31 |
| | Apariencia | Cristales blancos |
| | P. F. | 222-224 °C |
| | Solubilidad | Soluble en DMSO, agua caliente, soluble en metanol, acetonitrilo, prácticamente insoluble en etanol, acetato de etilo, cloruro de metileno y hexano. Se disuelven en ácidos minerales diluidos |

8.2.2 Caracterización por IR del compuesto (2B)

En la Figura 12, se muestra el espectro infrarrojo del compuesto (**2B**) en donde se pueden observar las señales correspondientes a las vibraciones de estiramientos C-H (sp³) del cetal formado 2868 cm⁻¹, y se conserva la vibración de 2936cm⁻¹ ya existentes en la adenosina, así mismo se observan las vibraciones OH y NH₂ en 3177cm⁻¹, 3326 cm⁻¹ y 3366cm⁻¹, la cual es más fina en comparación con la adenosina por la formación del cetal, también se observa la vibración C-O más pronunciada en 1212 cm⁻¹. Esto concuerda con el análisis de IR del compuesto (**2B**) reportado por Enomoto.⁹⁵

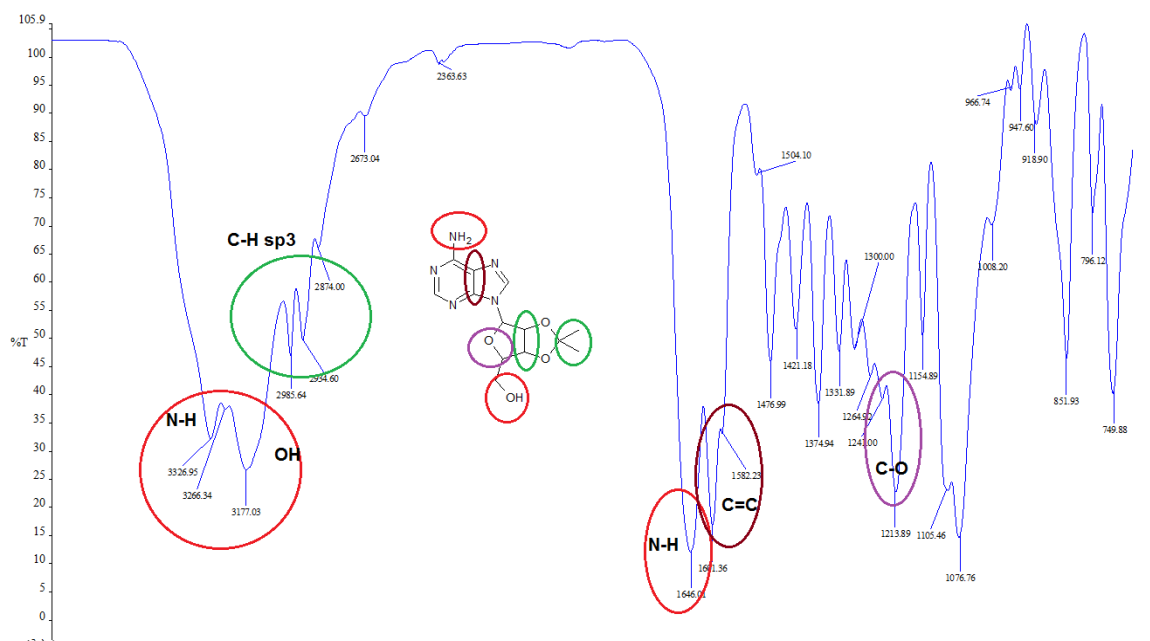


Figura 12. Espectro de IR de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (2B).

8.2.3 Caracterización por UV-Visible del compuesto (2B)

El compuesto (2B) presenta una longitud máxima en 260 y una mínima en 226 nm, la cual es idéntica a la materia prima (1A), en la Figura 13 se muestra el espectro UV-Vis del compuesto (2B).

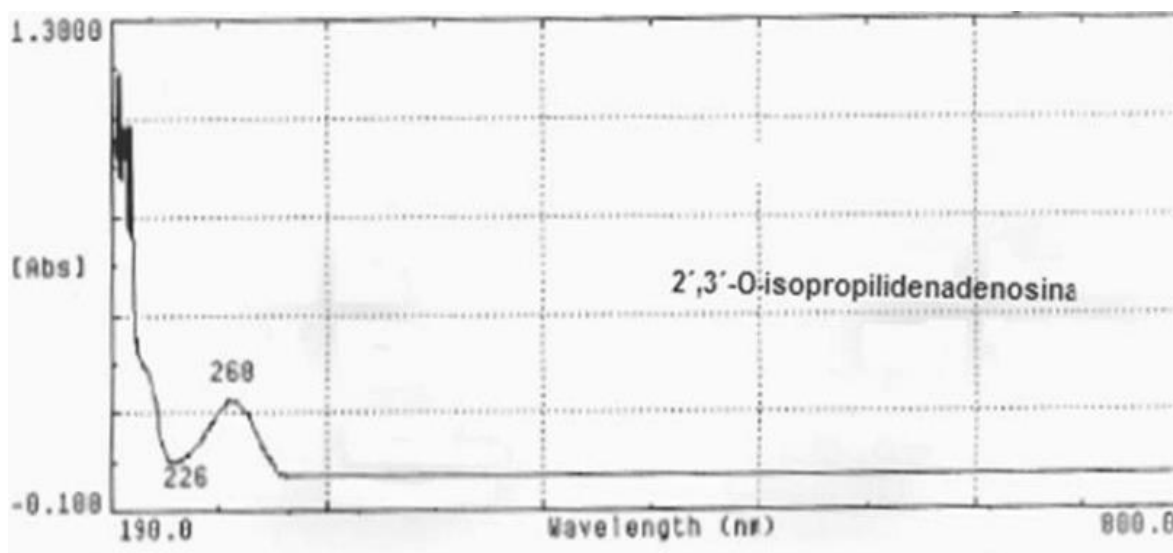


Figura 13. Espectro de UV-Visible de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (2B).

8.2.4 Caracterización por RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto (2B)

Para este análisis, la muestra se disolvió en DMSO. En la **Tabla 8** se muestran los desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H . En la Figura 14y 15 se muestran los espectros de RMN (^{13}C y ^1H) respectivamente.

Tabla 8.Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H del compuesto (2B).

| No. Carbono | ^{13}C (ppm) | ^1H (ppm) |
|-------------|-----------------------|-------------------------------|
| 1 | 61.6 | 3.55 (m. 2H) |
| 2 | 86.4 | 4.22 (m. 1H) |
| 3 | 81.4 | 4.97 (d.d. 1H) |
| 4 | 83.3 | 5.34 (m. 1H) |
| 5 | 89.7 | 6.12 (m. 1H) |
| 6 | 139.8 | 8.34 (s. 1H) |
| 7 | 119.1 | _____ |
| 8 | 156.2 | _____ |
| 9 | 152.7 | 8.17 (s. 1H) |
| 10 | 148.9 | _____ |
| 11 | 113.1 | _____ |
| 12 | 27.1 | 1.54 (s.1H) |
| 13 | 25.2 | 1.32 (s. 1H) |
| | _____ | 5.27 (m. 1H) del OH |
| | _____ | 7.36(s. 2H) del NH_2 |

En la Figura 14 correspondiente al espectro de ^{13}C de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina, se observa que el número total de señales de carbono corresponden con el total presente en dicha molécula, así como también se puede apreciar el efecto del grupo cetal en el desplazamiento de los carbonos 3 y 4 a mayor ppm (81.4 y 83.3 ppm) comparado con la adenosina (70.7 y 73.5 ppm).

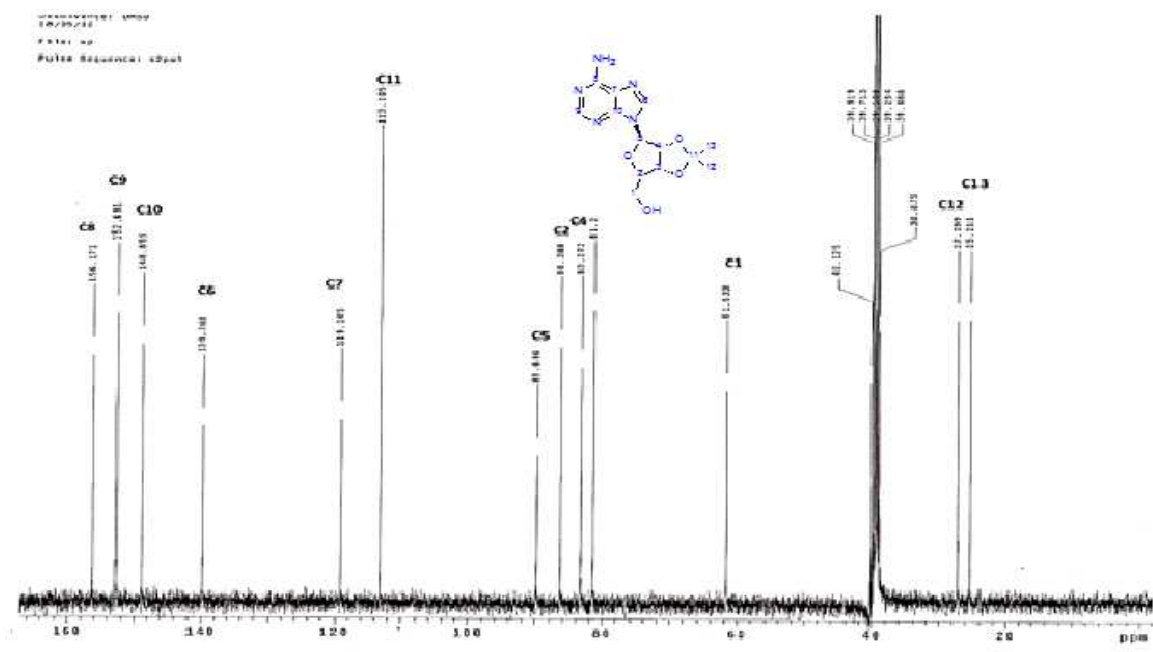


Figura 14. Espectro de RMN de¹³C de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina.

En cuanto al espectro de hidrógeno (Figura 15), se observan las señales correspondientes a cada protón de la molécula y su respectivo acoplamiento, así como la aparición de 2 nuevas señales en 1.54 y 1.32 ppm que integran para 3 protones los cuales corresponden a los hidrógenos del CH₃ del grupo cetal.

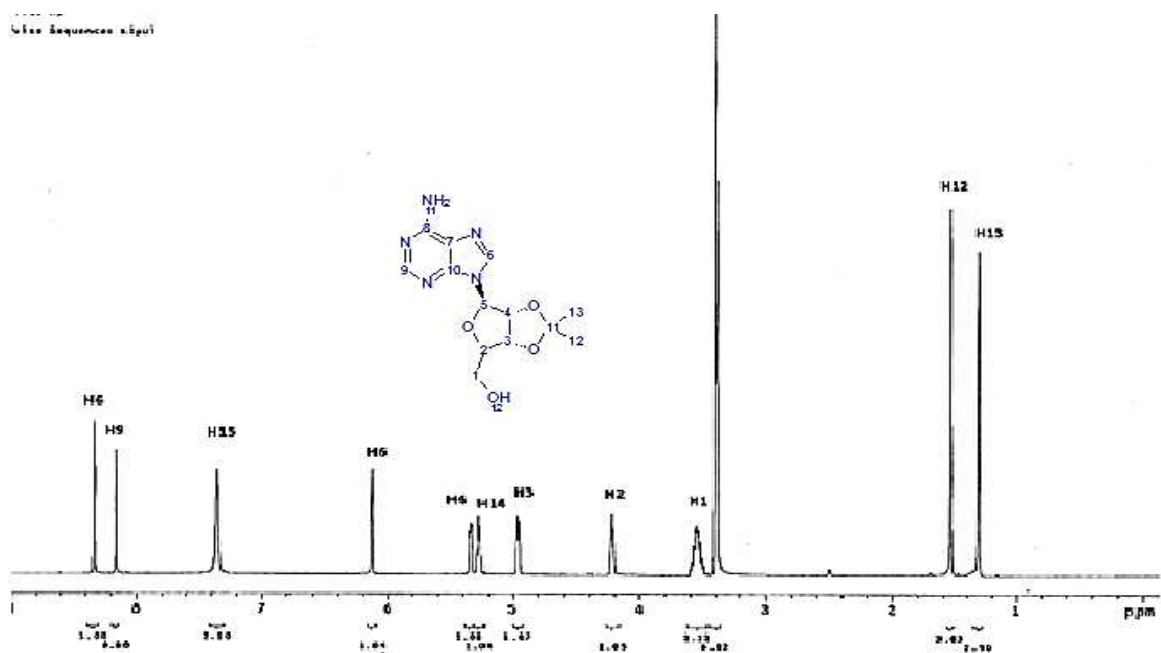


Figura 15. Espectro de RMN de ¹H de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina.

Se analizó y caracterizó la 2',3'-O-isopropilidenadenosina por RMN de: ¹³C, ¹H y los experimentos de dos dimensiones DEPT (Figura 16), COSY (Figura 17) y gHMBC (Figura 18) para corroborar la identificación de la molécula.

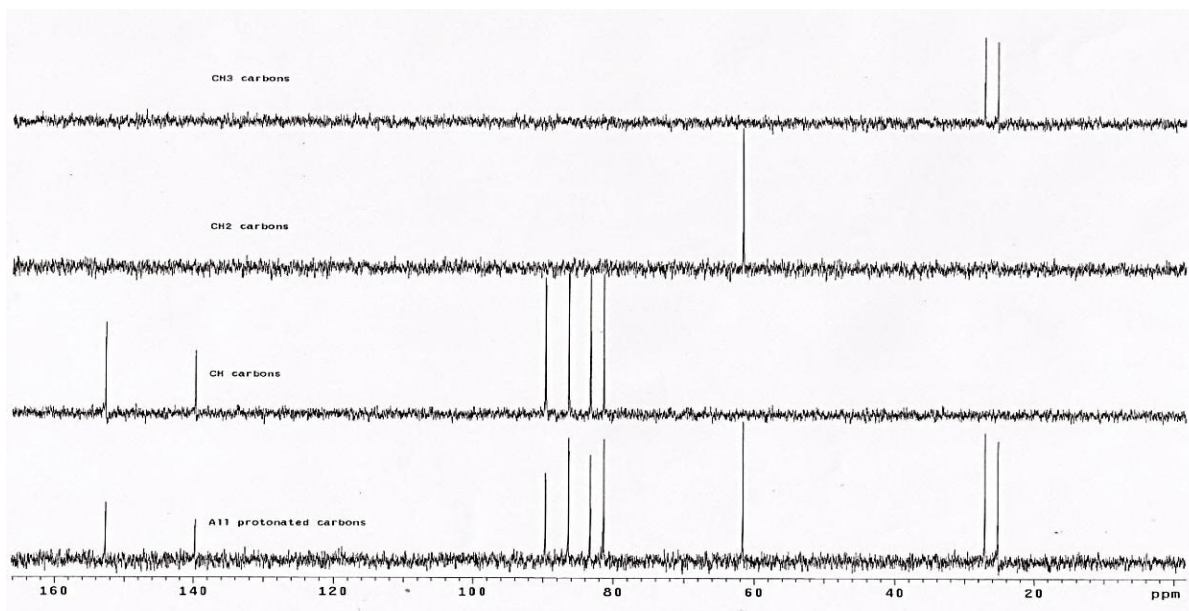


Figura 16. Espectro DEPT de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina.

En el espectro DEPT de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (Figura 16) se puede observar la presencia de 6 grupos CH, 2CH₃ y 1CH₂, los cuales corresponden con los presentes en la molécula, en dicho espectro se observan 2 señales en 27.1 y 25.2 ppm características del grupo protector (cetal).

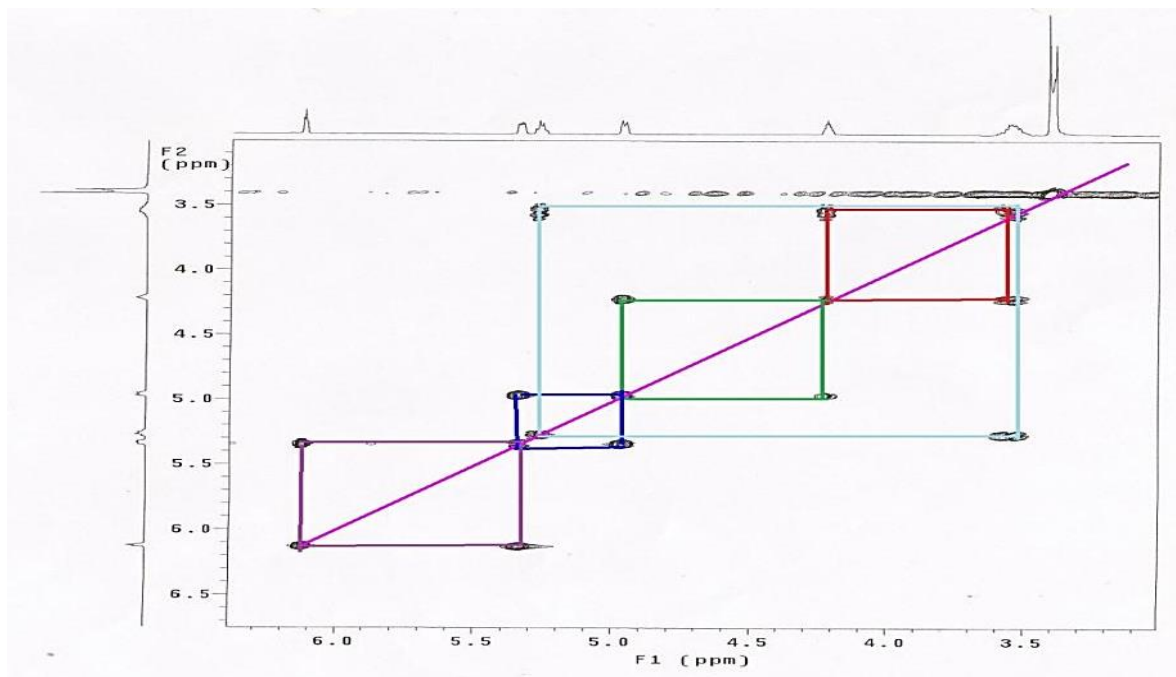


Figura 17. Espectro COSY de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina.

En la Figura 17 se pueden observar 6 correlaciones homonucleares entre los protones presentes en la molécula.

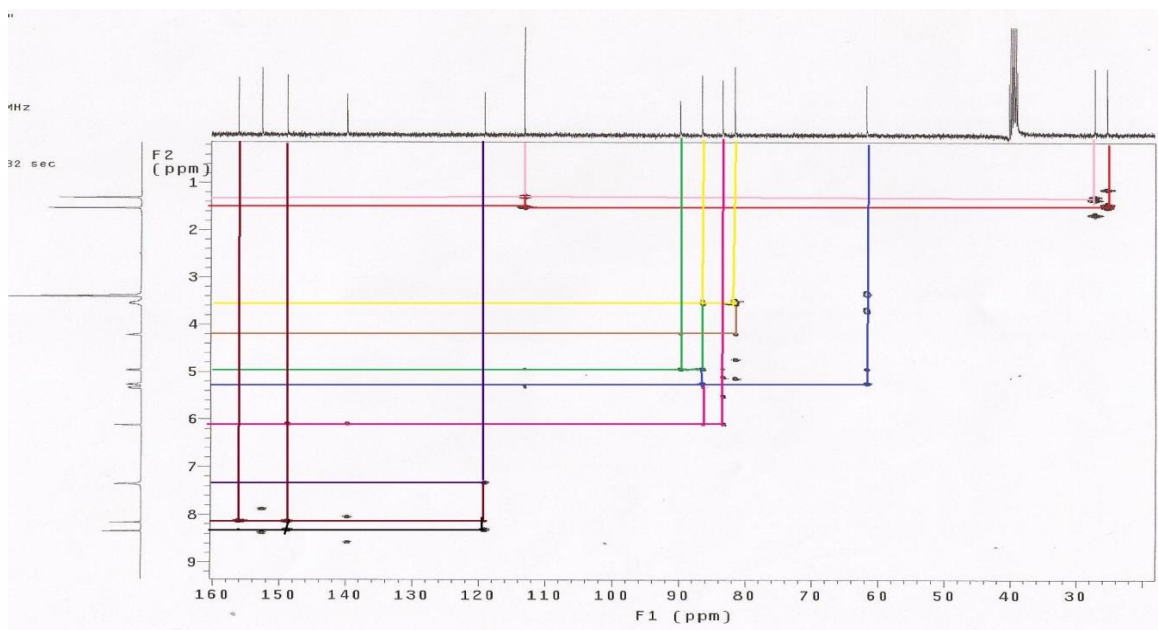


Figura 18. Espectro gHMBC de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina.

En la Figura 18, se puede observar la correlación de los protones de adenosina con sus carbonos a dos o a tres enlaces de distancia, por ejemplo el protón 13 (línea roja) se correlaciona con el carbono 11 y 12 los cuales pertenecen al grupo cetral de la protección.

Estos resultados son similares a lo informado por Debnath⁹⁶, Saladino⁹⁷ y los espectros obtenidos por el compuesto puro (Sigma Aldrich, CAS 122404) por lo cual nos permite concluir que se obtuvo el compuesto deseado, con un alto grado de pureza debido a que en los espectros de RMN solo se observan las señales del compuesto de interés, por lo cual esta técnica es una alternativa para la obtención de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**2B**).

8. 3 Caracterización de la 2,5-hexanodiona

Debido a que la 2,5-hexanodiona fue empleada para la protección del grupo amino esta se caracterizó por IR y RMN, para poder diferenciar entre la materia prima y el producto.

En el espectro de infrarrojo obtenido de la 2,5-hexanodiona, se puede observar las vibraciones características de C=O 1703 cm^{-1} , así como las vibraciones de estiramiento de C-H (sp^3) a $2956, 2910\text{ cm}^{-1}$ (ver anexo 1a).

Para la obtención de espectro de RMN de ^1H y ^{13}C la muestra se disolvió en CDCl_3 . El compuesto es simétrico por lo cual solo se observan 3 señales de ^{13}C , (ver anexo 2a) y 2 señales del ^1H , (ver anexo 3a).

En la **Tabla 9** se muestran los desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H de la 2,5 hexanodiona, estos son similares con lo informado por Clark.⁹⁸ Estos resultados son una base importante para las protecciones posteriores debido a que nos permite comparar la transformación de este reactivo al formar el pirrol.

Tabla 9. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H de la 2,5-hexanodiona.

| No. Carbono | ^{13}C (ppm) | ^1H (ppm) y acoplamientos |
|-------------|-----------------------|------------------------------------|
| 1 | 29.014 | 2.164 (s. 3H) |
| 2 | 206.317 | _____ |
| 3 | 36.158 | 2.693 (s. 2H) |
| 4 | 36.158 | 2.693 (s. 2H) |
| 5 | 206.317 | _____ |
| 6 | 29.014 | 2.164 (s. 3H) |

8.4 Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (3C)

Para esta síntesis se emplearon 2 métodos (**A** y **B**), con la finalidad de tener un mejor rendimiento.

8.4.1 Método A

Para este método se realizaron 10 lotes a partir de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina para la obtención del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**3C**). Esta técnica se realizó como lo informó Nowak⁶⁸, con algunas diferencias en el tiempo (mayor a 48 horas). Cabe mencionar que el

rendimiento máximo que reportan es del 56%, el rendimiento máximo obtenido fue de 41% ver **Tabla 10**.

Tabla 10. Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**3C**), método A.

2B $\xrightarrow{150-160^\circ\text{C}}$ 3C

Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (3C)

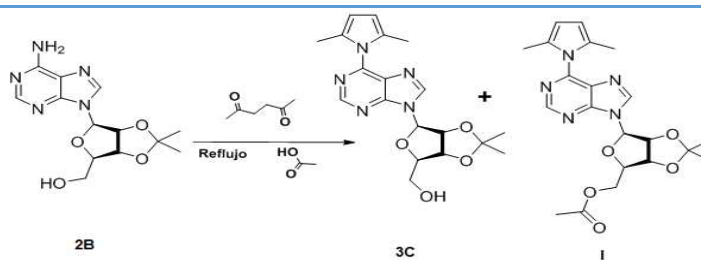
| Lote | Compuesto 2B mg (mmol) | 2,5-hexanodiona mL(mmol) | Tiempo (h) | Rendimiento (%) |
|------|------------------------|--------------------------|------------|-----------------|
| 1 | 100 (0.36) | 0.5 (4.26) | 48 | 9 |
| 2 | 100 (0.36) | 0.5 (4.26) | 48 | 25 |
| 3 | 152 (0.50) | 1.7 (14.50) | 68 | 24 |
| 4 | 100 (0.33) | 2.0 (17.06) | 72 | 32 |
| 5 | 25(0.08) | 0.3 (2.56) | 48 | 26 |
| 6 | 28 (0.09) | 0.3 (2.56) | 48 | 39 |
| 7 | 208 (0.68) | 1.0 (8.52) | 49 | 11 |
| 8 | 250 (0.81) | 1.0 (8.52) | 49 | 41 |
| 9 | 50 (0.16) | 0.5 (4.52) | 51 | 27 |
| 10 | 500 (1.62) | 2.0 (17.06) | 48 | 30 |

Cabe mencionar que con este método se obtienen una gran cantidad de subproductos, lo cual complica el proceso de purificación por cromatografía en columna. El producto obtenido es una pasta oscura difícil de solubilizar.

8.4.2 Método B

Para el método B, se realizaron 23 lotes,⁶⁸⁻⁷⁰ cambiando las condiciones de reacción, temperatura, relación molar de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**2B**): 2,5-hexanodiona, tiempo de reacción, y en algunas el catalizador, **Tabla 11**, con la finalidad de mejorar el rendimiento.

Tabla 11. Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**3C**), método B.



Síntesis del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (3C**) y el éster (I)**

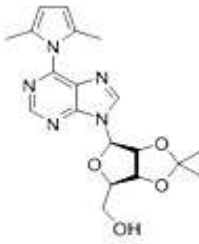
| Lote | Compuesto 2B mg (mmol) | 2,5- hexanodiona mL (mmol) | Ácido acético (mL) | Tiempo (h) | Rendimiento 3C (%) |
|------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------|---------------|-----------------------|
| 1 | 28 (0.10) | 0.4 (3.41) | 1.2 | 8 | 22 |
| 2 | 20 (0.06) | 0.25 (2.13) | 0.8 | 8 | 50 |
| 3 | 20 (0.06) | 0.25 (2.13) | 0.8 | 8 | 50 |
| 4 | 100(0.33) | 1.0 (8.53) | 3.0 | 6 | 23 |
| 5 | 500 (1.63) | 1.0 (8.53) | 2.5 | 7 | 22 |
| 6 | 30 (0.10) | 0.15 (1.27) | 1.2 | 14 | 11 |
| 7 | 811 (2.64) | 1.5 (12.80) | 5.0 | 8 | 11 |
| 8 | 30 (0.10) | 0.1 (0.85) | 0.2 | 4 | 27 |
| 9 | 25 (0.08) | 0.4 (3.41) | 1.2 | 8 | 25 |
| 10 | 607 (1.98) | 1.5 (12.80) | 1.2 | 6 | 14 |
| 11 | 500 (1.63) | 1.2 (10.24) | 1.2 | 4 | 37 |
| 12 | 1500 (4.88) | 3.6 (30.71) | 3.8 | 4 | 18 |
| 13 | 500 (1.63) | 2.0 (17.06) | 0.5 | 4 | 59 |
| 14 | 587(1.91) | 2.5 (21.33) | 2.0 | 4 | 14 |
| 15 | 50 (0.16) | 0.4(3.41) | 2.0 | 2 | 46 |
| 16 | 250 (0.81) | 0.5 (4.26) | 1.2 | 4 | 38 |
| 17 | 553 (1.78) | 0.5 (4.26) | 1.2 | 4 | 39 |
| 18 | 200 (0.65) | 0.8 (6.82) | 1.2 | 4 | 55 |
| 19 | 203 (0.66) | 0.8 (6.82) | 1.2 | 4 | 55 |
| 20 | 244 (0.79) | 0.5 (4.26) | 1.2 | 4 | 38 |
| 21 | 263 (0.85) | 0.5 (4.26) | 1.2 | 4 | 38 |
| 22 | 400 (1.30) | 1.0 (8.53) | 0.8 | 4 | 54 |
| 23 | 407 (1.32) | 1.0 (8.53) | 0.8 | 4 | 54 |

Las reacciones de protección del grupo amino se siguieron por CCF, en donde las muestras primero se neutralizaron con una solución saturada de bicarbonato de sodio, y después se eluyeron con la siguiente fase móvil AcOEt:hex (50:50), esta neutralización previa se recomienda debido a que el ácido acético presente en la reacción interfiere en la observación de los compuestos por CCF. Con el método B, se mejoró el rendimiento, del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina del 59% vs 41% con el obtenido por el método A, además de que el tiempo de reacción disminuyó de 48 horas a 4 horas. Otro punto importante es la cantidad de subproductos obtenidos por dichas técnicas, en el método A se obtienen 8 diferentes subproductos los cuales dificultan la purificación (cromatografía en columna), mientras que por el método B se obtienen solamente 2 subproductos. Se caracterizaron por RMN e IR los productos obtenidos en los 2 métodos, y se corroboró que con ambos métodos se obtiene el producto (**3C**).

8.4.3 Caracterización del compuesto (**3C**)

El producto obtenido se caracterizó en el laboratorio y sus propiedades se encuentran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Propiedades fisicoquímicas del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**3C**).

| | | |
|---|---|---|
|  | C₁₉H₂₃N₅O₄ | 6-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-Il)-9-[2,3-O-(1-metiletilideno)-β-D-ribofuranosil]9H-purina |
| | Peso molecular | 385.41 |
| | Apariencia | aceite color naranja |
| | Solubilidad | Soluble en metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, cloruro de metileno |
| 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina CAS 606957-67-9 | | |

8.4.4 Caracterización por IR del compuesto (3C)

En la Figura 19, se muestra el espectro IR del compuesto (3C) en donde se puede observar la vibración de estiramiento de OH en 3338 cm^{-1} , observándose que desaparece la banda en 3326 cm^{-1} y 3366 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento de NH debido a la formación del pirrol, y en 1733 cm^{-1} se observan las vibraciones del pirrol. Conservándose además todas las vibraciones del compuesto (2B).

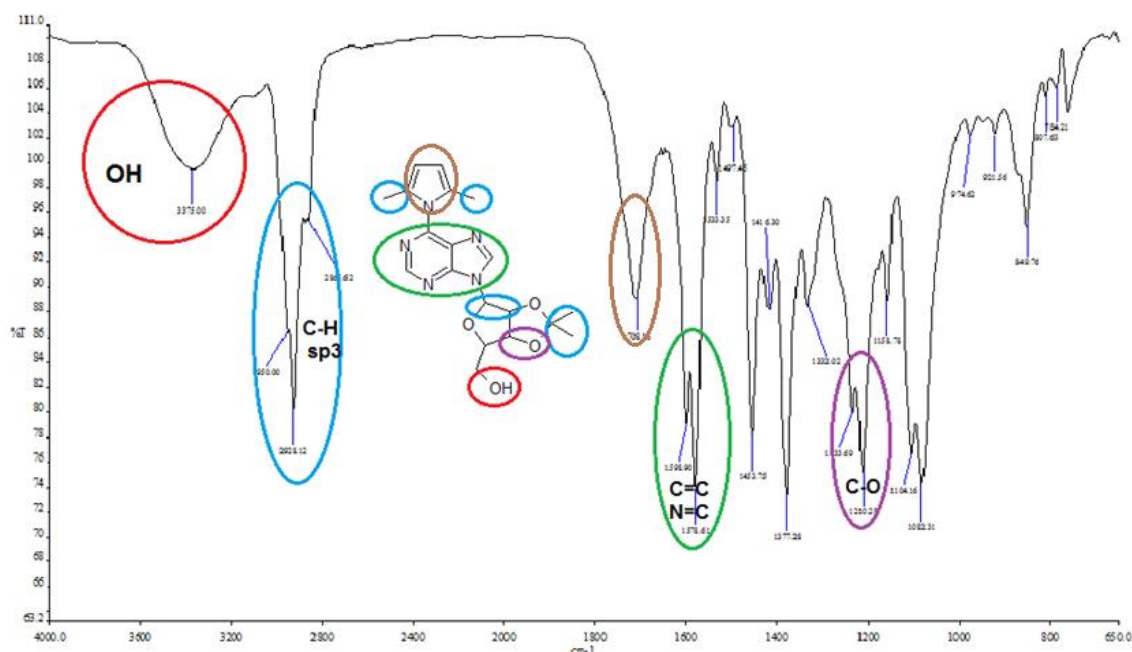


Figura 19. Espectro de IR del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (3C).

8.4.5 Caracterización por UV-Visible del compuesto (3C)

El compuesto (3C) tiene una absorbancia máxima de 283 nm y la mínima en 247 nm (Figura 20) lo cual corresponde con lo que informó Nowak.^{68,99}

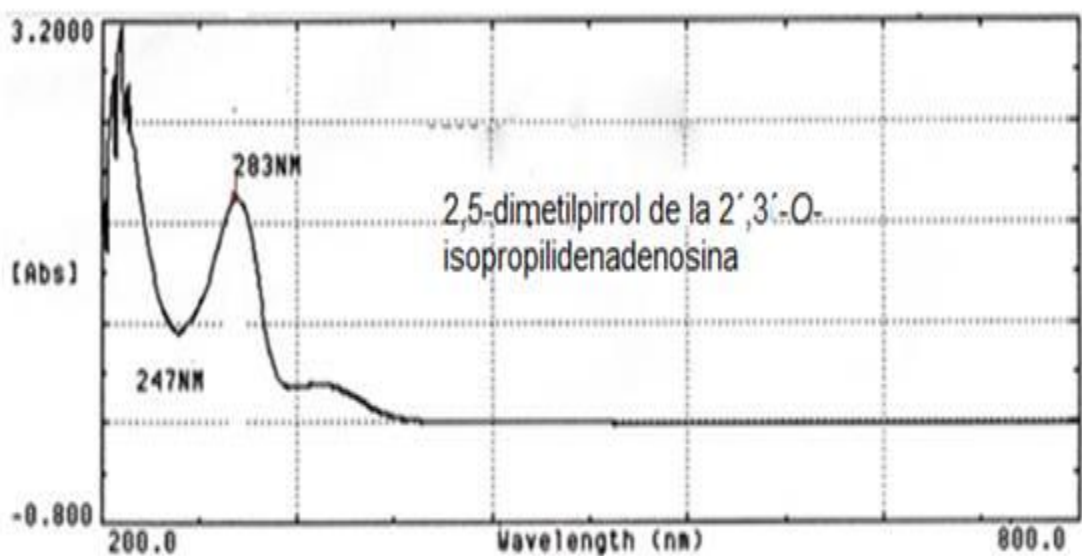


Figura 20. Espectro de UV-visible del compuesto (3C).

8.4.6 Caracterización por RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto (3C)

Para este análisis, la muestra se disolvió en CDCl_3 . En la **Tabla 13** se puede observar los desplazamientos químicos en los que aparece cada carbono y protón del compuesto, los cuales concuerdan con lo informado por Nowak,^{68,99} por lo cual se concluye que se obtuvo el producto deseado.

Tabla 13.Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (3C).

| No. Carbono | ^{13}C (ppm) | ^1H (ppm) | |
|-------------|-----------------------|---------------------|-----------------|
| | | | |
| 1 | 63.3 | 3.84 (m. 1H) | 4.00 (d. 1H) |
| 2 | 86.2 | 8.91 (s. 1H) | |
| 3 | 81.6 | 4.59 (s. 1H) | |
| 4 | 83.0 | 5.24 (d. 1H) | |
| 5 | 94.1 | 7.26 (s. 1H) | |
| 6 | 144.4 | 8.34 (s. 1H) | |
| 7 | 130.1 | _____ | |
| 8 | 151.1 | _____ | |
| 9 | 151.9 | 8.18 (s. 1H) | |
| 10 | 152.1 | _____ | |
| 11 | 114.4 | _____ | |
| 12 | 27.6 | 1.67 (s.1H) | |
| 13 | 25.2 | 1.40 (s. 1H) | |
| 14 | 13.6 | 2.20 (s. 3H) | |
| 15 | 129.9 | _____ | |
| 16 | 109.4 | 5.99 (S. 1H) | |
| 17 | 109.4 | 5.99 (S. 1H) | |
| 18 | 129.9 | _____ | |
| 19 | 13.6 | 2.20 (s. 3H) | |
| | _____ | 5.27 (m. 1H) del OH | |

En la Figura 21 correspondiente al espectro de RMN ^{13}C del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (3C), se observa la aparición de nuevas señales en 13.6, 129.6, 109.4 y 130.0 ppm, correspondientes al fragmento del pirrol. En cuanto al espectro de hidrógeno, Figura 22, se observan las señales correspondientes a la molécula (3C), la aparición de los protones del pirrol en 2.03 y 6.02 ppm, aunque son 8 protones, solo se observan 2 señales dado que el pirrol es simétrico.

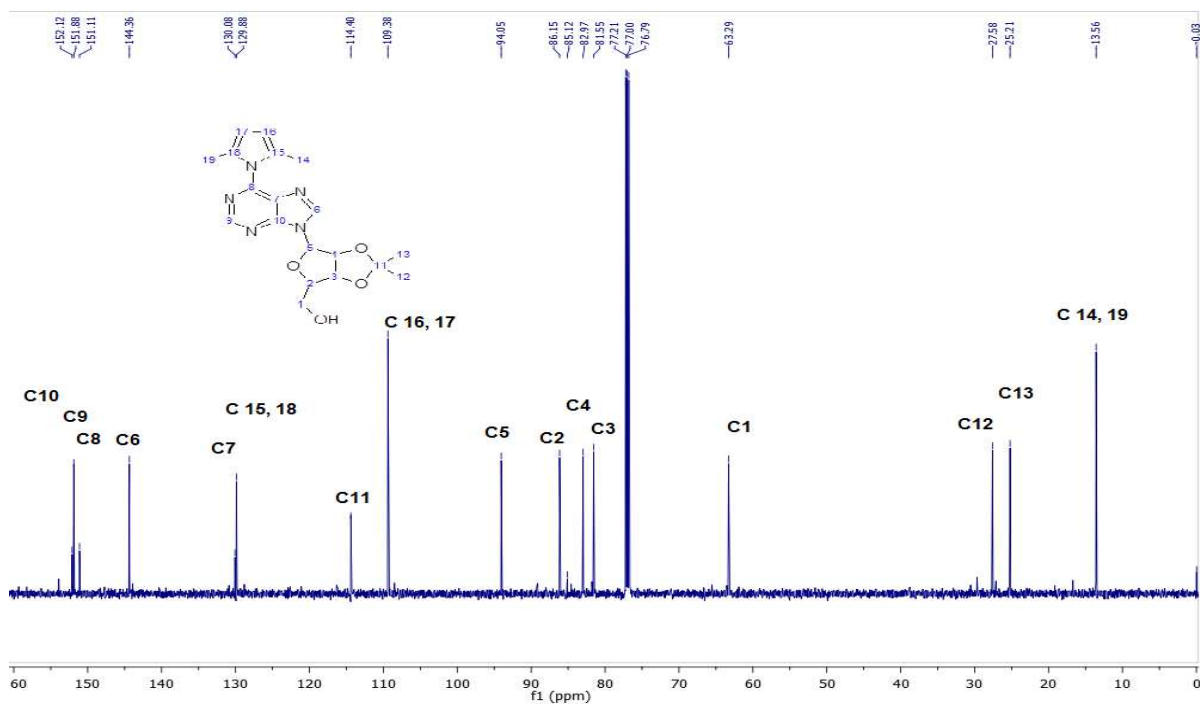


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**3C**).

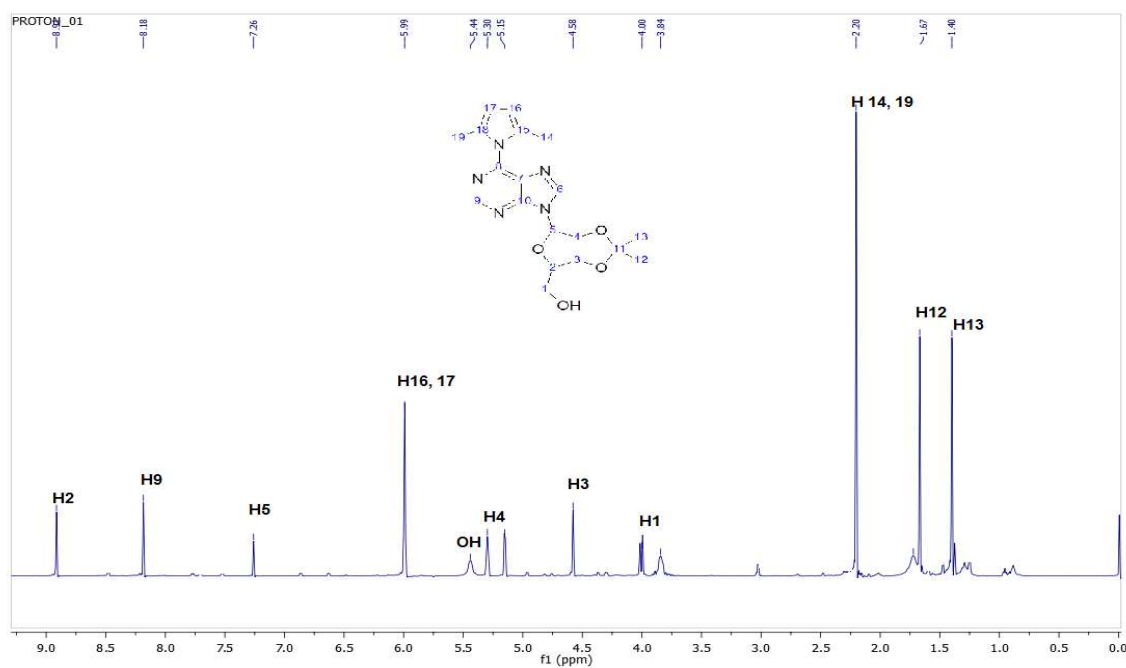


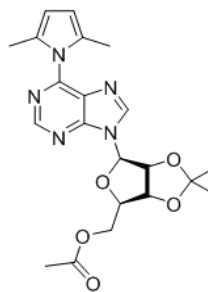
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**3C**).

Las asignaciones en las Figuras 21 y 22, reportadas en la **Tabla 13**, se compararon con lo informado por Nowak,⁶⁸ y nos permite concluir que se obtuvo el compuesto esperado, **(3C)** por los dos métodos. El método B es el más adecuado, ya que el tiempo de reacción es menor (48 a 4 horas), se tiene mayor rendimiento (59%) y el proceso de purificación es más fácil (8 a 2 subproductos). Por éste método se obtiene el éster del 2,5-dimetilpirrol de 2',3'-O-isopropilidenadenosina (I), que por hidrólisis básica, permite obtener mayor cantidad del compuesto **(3C)**.

8.5. Análisis de éster del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (I)

Este compuesto se obtiene como subproducto en el método B de la protección de grupo amino y sus propiedades se encuentran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas del éster del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (I).

| | | |
|---|---|--|
|  | C₂₁H₂₅N₅O₅ | 9-[5-O-acetil-2,3-O-(1-metiletilideno)-β-D-ribofuranosil]-6-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il)9H-purina |
| | Peso molecular | 427.454 |
| | Apariencia | Aceite color naranja |
| | Solubilidad | Soluble en metanol, acetonitrilo, isopropanol, acetato de etilo y cloruro de metileno. |

8.5.1 Caracterización por IR del compuesto (I)

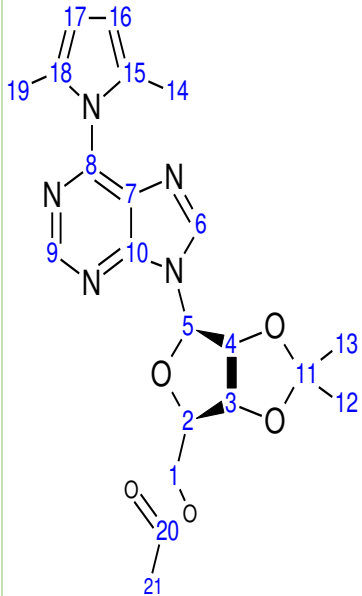
En el espectro de infrarrojo del compuesto (I), se puede observar las vibraciones del C=O del éster en 1744cm⁻¹; así mismo, se observan que desaparecen las vibraciones características de NH₂ y OH del compuesto **(2B)** (3177, 3326y 3366cm⁻¹), por la formación del pirrol y el éster, conservándose además todas las vibraciones del compuesto **(2B)**, (ver anexo 1b).

8.5.2 Caracterización por RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto (I)

Para este análisis, la muestra se disolvió en CDCl_3 , en la **Tabla 15** se muestra el desplazamiento químico de ^{13}C y ^1H .

Tabla 15. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H del compuesto (I).

| No. Carbono | ^{13}C (ppm) | ^1H (ppm) | |
|-------------|-----------------------|--------------------|--------------|
| | | | |
| 1 | 63.9 | 4.40 (m. 1H) | 5.07 (m. 1H) |
| 2 | 84.7 | 4.28 (m. 1) | |
| 3 | 81.4 | 4.43 (d.d. 1H) | |
| 4 | 84.1 | 5.50 (d.d. 1H) | |
| 5 | 91.0 | 5.99 (d. 1H) | |
| 6 | 143.6 | 8.90 (s. 1H) | |
| 7 | 129.4 | _____ | |
| 8 | 150.6 | _____ | |
| 9 | 152.5 | 8.19 (s. 1H) | |
| 10 | 152.5 | _____ | |
| 11 | 115.0 | _____ | |
| 12 | 27.2 | 1.42 (s. 3H) | |
| 13 | 25.4 | 1.66 (s. 3H) | |
| 14 | 13.5 | 2.20 (s. 3H) | |
| 15 | 129.8 | _____ | |
| 16 | 109.1 | 5.99 (d.1H) | |
| 17 | 109.1 | 5.99 (d. 1H) | |
| 18 | 129.8 | _____ | |
| 19 | 13.5 | 2.20 (s. 3H) | |
| 20 | 170.3 | _____ | |
| 21 | 20.7 | 2.02 (s. 3H) | |

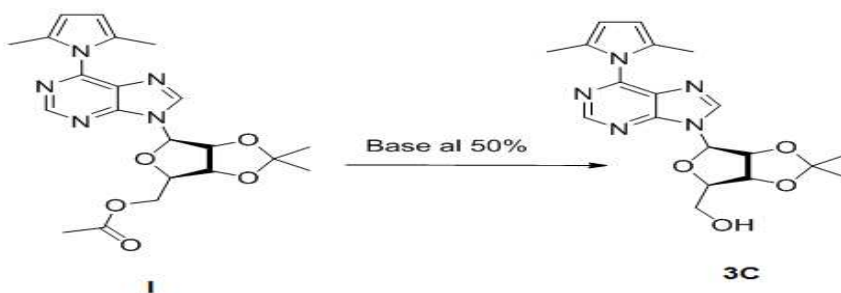


Con base a la asignación del éster del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (I) por IR, y RMN (^1H y ^{13}C), (ver anexo 2b y 3 b) y al comparar estos espectros con los comunicados por Nowak,⁶⁸ nos permite concluir que corresponden al compuesto (I).

8.6. Hidrólisis del éster (I) para la obtención del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina

El éster (I) se hidrolizó con la finalidad de obtener el compuesto (3C). Se realizaron 4 lotes, cambiando las condiciones de reacción: temperatura y la base utilizada, **Tabla 16**.

Tabla 16. Hidrólisis del compuesto (I).



Hidrólisis del compuesto (I)

| Lote | Compuesto (I)mg (mmol) | Base (mL) | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Rendimiento (%) |
|------|------------------------|--------------------|------------------|--------------|-----------------|
| 1 | 20 (0.05) | 5.0 de NaOH al 30% | 80 | 20 | 8 |
| 2 | 23 (0.05) | 1.2 KOH al 50% | Reflujo | 5 | 34 |
| 3 | 56.4 (0.13) | 1.5 de KOH al 50% | 70 | 12 | 20 |
| 4 | 117 /0.28) | 2.0 de KOH al 50% | 80 | 15 | 12 |

Para las hidrólisis del éster (I) el mejor rendimiento fue en el lote 2 (34%) donde se utilizó 1.2 mL de KOH al 50% durante 5 minutos.

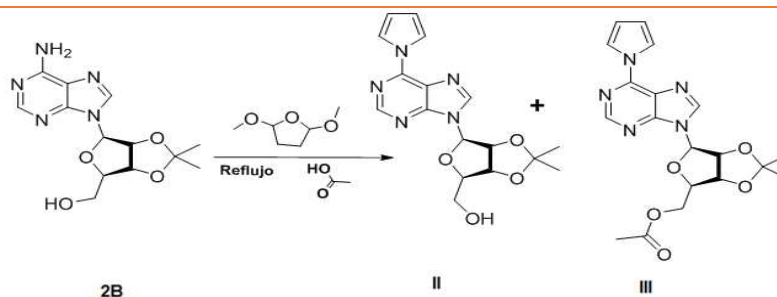
8.7. Síntesis del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (II)

Para la protección del grupo amino del compuesto (2B), se desarrolló el método C con la finalidad de contar con otra técnica diferente para la protección del grupo amino, empleando 2,5-dimetoxitetrahydrofurano (DMTHF).

8.7.1 Método C

Se realizaron 10 lotes. Utilizando ácido acético como medio de reacción y catalizador, a diferentes condiciones: temperatura, tiempo y relación molar, **Tabla 17**.

Tabla 17. Síntesis del pirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (II).



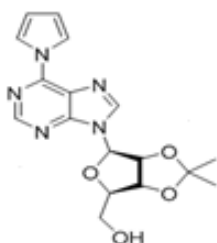
Síntesis del pirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (II) y el éster (III).

| Lote | Compuesto 2B mg (mmol) | DMTHF mL (mmol) | Ácido acético (mL) | Tiempo (h) | Rendimiento del compuesto (II) (%) |
|------|------------------------------|--------------------|--------------------------|---------------|---|
| 1 | 22 (0.07) | 0.01 (0.07) | 3.0 | 11 | 14 |
| 2 | 20 (0.06) | 0.01 (0.07) | 3.0 | 12 | 17 |
| 3 | 26 (0.08) | 0.015 (0.11) | 1.2 | 8 | 37 |
| 4 | 51 (0.17) | 0.04 (0.31) | 2.0 | 6 | 32 |
| 5 | 223 (0.72) | 0.9 (6.94) | 2.0 | 3 | 56 |
| 6 | 500 (1.63) | 1.5 (11.57) | 1.0 | 4 | 45 |
| 7 | 320 (1.04) | 1.0 (7.71) | 1.2 | 3 | 14 |
| 8 | 160 (0.52) | 0.05 (0.38) | 1.2 | 14 | 10 |
| 9 | 500 (1.62) | 1.5 (11.57) | 1.2 | 5 | 69 |
| 10 | 615 (2.00) | 1.8 (13.90) | 1.2 | 3 | 43 |

Las condiciones en las cuales se obtuvo el mayor rendimiento (69%) fueron donde se empleó una relación de la materia prima (**2B**) con el DMTHF (1:7), con 1.2 mL de ácido acético, durante 5 horas a temperatura de reflujo. Además del producto (II), ver **Tabla 18**, se obtuvo el éster (III).

8.7.2 El compuesto (II) se purificó y se determinaron sus características fisicoquímicas.

Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (II)*.



$C_{17}H_{19}N_5O_4$

{(6R)-2,2-dimetil-6-[6-(1H-pirrol-1-il)-9H-purin-9-il]tetrahidrofurano[3,4-d][1,3]dioxol-4-il}metanol

| | |
|----------------|--|
| Peso molecular | 257.36 |
| Apariencia | Aceite color naranja |
| Solubilidad | Soluble en metanol, acetonitrilo, isopropanol, cloruro de metileno y acetato de etilo. |

* Compuesto no reportado en la literatura.

8.7.3 Caracterización por IR del compuesto (II)

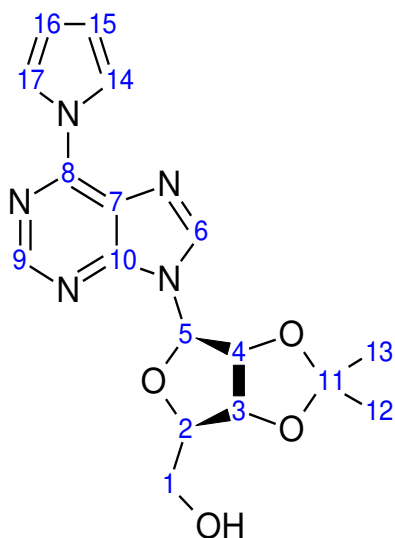
En el espectro de IR (anexo 1c) correspondiente al pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina se pueden observar las vibraciones de estiramiento características de OH en 3310 cm^{-1} , y la banda características del pirrol en 1733 cm^{-1} , las bandas C-H (sp^2) en 3151 cm^{-1} , C-H (sp^3) 2987 , 2943 y 2872 cm^{-1} , las vibraciones de C=C y C=N 1595 y 1581 cm^{-1} y la vibración C-O en 1214 cm^{-1} .

8.7.4 Caracterización por RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto (II)

Para este análisis, la muestra se disolvió en CDCl_3 . En la **Tabla 19** se puede observar los desplazamientos químicos en los que aparece cada carbono y protón del compuesto, comparando con el compuesto (3C) hay mucha similitud pero con la ausencia de los metilos en el pirrol.

Tabla 19. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H , del compuesto (II).

| No. Carbono | ^{13}C (ppm) | ^1H (ppm) |
|-------------|-----------------------|---------------------|
| 1 | 63.2 | 3.83 (d. 2H) |
| 2 | 86.1 | 4.00 (d. 1H) |
| 3 | 81.6 | 5.13 (d. 1H) |
| 4 | 82.7 | 5.26 (d. 1H) |
| 5 | 93.9 | 5.94 (s. 1H) |
| 6 | 143.1 | 8.30 (s. 1H) |
| 7 | 123.8 | _____ |
| 8 | 148.6 | _____ |
| 9 | 152.0 | 8.67 (s. 1H) |
| 10 | 152.0 | _____ |
| 11 | 114.3 | _____ |
| 12 | 27.7 | 1.66 (s. 1H) |
| 13 | 25.2 | 1.39 (s. 1H) |
| 14 | 113.2 | 8.07 (s. 1H) |
| 15 | 121.0 | 6.43 (s. 1H) |
| 16 | 121.0 | 6.43 (s. 1H) |
| 17 | 113.2 | 8.07 (s. 1H) |
| | _____ | 4.55 (s. 1H) del OH |



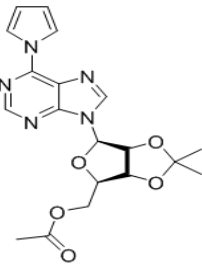
En el espectro correspondiente a los desplazamientos de ^{13}C (anexo 2c) del pirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina, se pueden observar las señales en 113.2 y 121.0 ppm correspondientes al pirrol. Se asignaron las señales a cada hidrógeno presentes en la molécula (II) (anexo 3c), así como la desaparición de los protones del grupo amino (NH_2) y la aparición de 2 señales correspondientes a los protones del pirrol en 6.43 y 8.07 ppm.

La asignación realizada de los grupos funcionales por IR y la asignación por RMN (Tabla 19) nos permiten concluir que se obtuvo el compuesto esperado (II).

8.8. Análisis y caracterización del éster del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (III)

La caracterización del éster del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (III). Se observa en la Tabla 20.

Tabla 20. Caracterización fisicoquímica del éster del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (III).

| | | |
|--|---|--|
|  | C₁₉H₂₁N₅O₅ | {{(6R)-2,2-dimetil-6-[6-(1H-pirrol-1-il)-9H-purina-9-il]tetrahidrofurano[3,4-d][1,3]dioxol-4-il}metil acetato |
| | Peso molecular | 399.40 |
| | Apariencia | Aceite color naranja |
| | Solubilidad | Soluble en metanol, acetonitrilo, isopropanol acetato de etilo y cloruro de metileno |

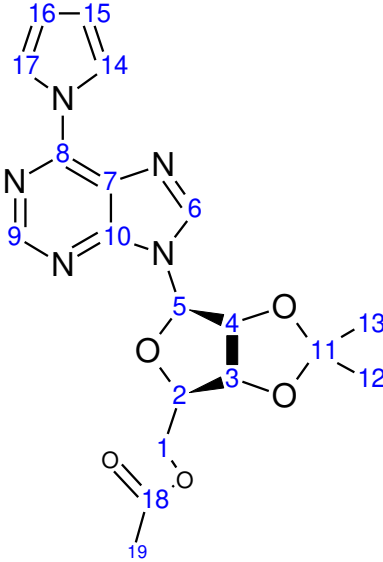
8.8.1 Caracterización por IR del compuesto (III)

En el espectro de infrarrojo se puede observar que desaparecen las vibraciones de estiramiento características de OH y NH₂ en 3177, 3326 y 3266 cm⁻¹, y se observan las vibraciones de estiramiento C-H (sp²) en 3150, C-H (sp³) 2936 y 2851 cm⁻¹, la vibración C=O en 1743 cm⁻¹, C=C, C=N en 1594 y 1578cm⁻¹ y la vibración C-O en 1212 cm⁻¹, ver anexo 1d.

8.8.2 Caracterización por RMN de ¹³C y ¹H del compuesto (III)

Para este análisis, la muestra se disolvió en CDCl₃, en la Tabla 21 se muestra el desplazamientos químicos de ¹³C y ¹H. Estos desplazamientos y acoplamientos son muy parecidos con el pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina, con la diferencia en el carbonilo presente en el éster (C-18) el cual se observa en 170 ppm.

Tabla 21. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H , del compuesto (III).



| No. Carbono | ^{13}C (ppm) | ^1H (ppm) |
|-------------|-----------------------|--------------------|
| 1 | 64.0 | 4.25 (d.d. 2H) |
| 2 | 85.0 | 4.39 (d.d. 1H) |
| 3 | 81.6 | 4.52 (d. 1H) |
| 4 | 84.3 | 5.47 (d. 1H) |
| 5 | 91.3 | 6.19 (s. 1H) |
| 6 | 142.2 | 8.30 (s. 1H) |
| 7 | 122.9 | _____ |
| 8 | 148.0 | _____ |
| 9 | 152.4 | 8.72 (s. 1H) |
| 10 | 152.3 | _____ |
| 11 | 114.8 | _____ |
| 12 | 27.2 | 1.64 (s. 3H) |
| 13 | 25.4 | 1.42 (s. 3H) |
| 14 | 112.6 | 7.26 (s. 1H) |
| 15 | 120.6 | 6.43 (d. 1H) |
| 16 | 120.6 | 6.43 (d. 1H) |
| 17 | 112.6 | 7.26 (s. 1H) |
| 18 | 170.3 | _____ |
| 19 | 20.7 | 1.99 (s. 3 H) |

La asignación realizada de los grupos funcionales por IR y el desplazamiento observado en los espectros de ^{13}C y ^1H (ver anexos 2d y 3d) nos permite concluir que el subproducto obtenido por el método C corresponde al éster de pirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (III).

8.9. Síntesis del pirrol de la adenosina (IV)

8.9.1 Método D

El método D, se realizó para obtener el pirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (II), la reacción se llevó a cabo en agua y metanol en diferente proporciones, pero no se obtuvo el compuesto (II). Se logró la protección del grupo amino como pirrol, pero se favoreció la hidrólisis del cetal, presente en el compuesto (**2B**), por lo cual el producto obtenido bajo estas condiciones, es el pirrol de adenosina (IV). En la

Tabla 22 se muestran las diferentes condiciones de reacción: tiempo, relación molar, y las reacciones se llevaron a cabo con reflujo.

Tabla 22. Síntesis del pirrol de la adenosina (IV).

Síntesis del pirrol de la adenosina (IV)

| Lote | Compuesto 2B mg (mmol) | DMTHF mL (mmol) | Ácido acético (mL) | Agua: Metanol (mL) | Tiempo (h) | Rendimiento (%) |
|------|------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|------------|-----------------|
| 1 | 30 (0.97) | 0.2 (1.54) | 2 | 1:1 | 20 | 11 |
| 2 | 30 (0.97) | 0.05 (0.38) | 1 | 1:1 | 12 | 19 |
| 3 | 20 (0.065) | 0.1 (0.77) | 1.2 | 3:2 | 12 | 70 |

Aunque se obtuvo un mayor rendimiento (70%) en la protección del grupo amino con respecto a los otros métodos, no se obtuvo el compuesto con el grupo cetal (II) ya que también se favoreció la hidrólisis del cetal, protección necesaria para la oxidación del alcohol (**3C**) al aldehído (**4D**). Este compuesto fue caracterizado, **Tabla 23**.

Tabla 23. Caracterización del pirrol de la adenosina (IV).

| | | |
|--|---|--|
| | C₁₄H₁₅N₅O₄ | 6-(1H-pirrol-1-il)-9-β-D-ribofuranosil-9H-purina |
| | Peso molecular | 317.30 |
| | Apariencia | polvo blanco cristalino |
| | solubilidad | Soluble en DMSO, agua caliente, ligeramente soluble en metanol, acetonitrilo, prácticamente insoluble en hexano y cloruro de metileno. |

8.9.2 Caracterización por IR del compuesto (IV)

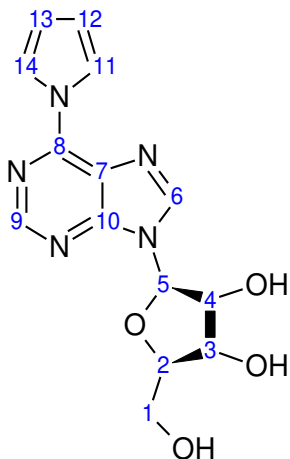
En el espectro de IR del compuesto (IV) (ver anexo 1e) se puede observar la vibración en 3334 cm^{-1} , de estiramiento de los grupos OH presentes en la molécula, las cuales tienen gran similitud con la del compuesto (**1A**), confirmando la eliminación del cetal, y en 1733 cm^{-1} la vibración correspondiente al pirrol, se conservan las demás señales de la molécula (**1A**).

8.9.3 Caracterización por RMN de ^{13}C y ^1H del compuesto (IV)

Para este análisis, la muestra se disolvió en DMSO. En la **Tabla 24** se muestran los desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H así como los acoplamientos entre protones. Estos desplazamientos y acoplamientos son muy parecidos a los observados en la adenosina (**1A**), la diferencia es la aparición de 2 señales en ^{13}C correspondiente a los 2 carbonos del pirrol, 112.0 y 120.1 ppm ver (ver anexo 2e), otra diferencia es la observada en el espectro de ^1H (ver anexo 3e) donde se ve la desaparición de los metilos presentes en el compuesto (**2B**) y la señal de los OH libres en 4.85 ppm.

Tabla 24. Desplazamientos químicos del compuesto (IV) de ^{13}C y ^1H , con sus respectivos acoplamientos.

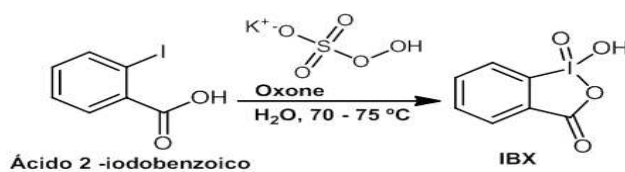
| No. Carbono | ^{13}C (ppm) | ^1H (ppm) |
|-------------|-----------------------|---------------------|
| 1 | 61.5 | 3.78 (d. 2H) |
| 2 | 86.3 | 3.92 (d. 1H) |
| 3 | 74.1 | 4.36 (d.d. 1H) |
| 4 | 70.7 | 4.75(d. 1H) |
| 5 | 89.4 | 6.11 (d. 1H) |
| 6 | 143.6 | 8.63 (s. 1H) |
| 7 | 122.1 | _____ |
| 8 | 152.0 | _____ |
| 9 | 151.4 | 8.67 (s. 1H) |
| 10 | 147.7 | _____ |
| 11 | 112.1 | 8.29 (s. 1H) |
| 12 | 120.2 | 6.41 (s. 1H) |
| 13 | 120.2 | 6.41 (s. 1H) |
| 14 | 112.1 | 8.29 (s. 1H) |
| | | 3.30 (s. 1H) del OH |
| | | 4.85 (s. 1H) del OH |
| | | 4.85 (s. 1H) del OH |



8.10. Síntesis del reactivo IBX

Se realizaron 4 lotes, **Tabla 25**, este compuesto se empleó para realizar la oxidación del compuesto (**3C**), dado que es un oxidante que se puede separar fácilmente por filtración y nos ayuda a oxidar alcoholes solo hasta aldehído o cetona.

Tabla 25. Síntesis del compuesto IBX.



Síntesis de IBX

| Lote | Ac. 2-iodobenzoico g (moles) | Oxone g (moles) | Tiempo (h) | Rendimiento (%) |
|------|---------------------------------|--------------------|---------------|--------------------|
| 1 | 20 (0.08) | 148.6 (0.48) | 8 | 70 |
| 2 | 10 (0.04) | 74.3 (0.24) | 7:30 | 28 |
| 3 | 10 (0.04) | 74.3 (0.24) | 12 | 82 |
| 4 | 10 (0.04) | 74.3 (0.24) | 8 | 82 |

8.10.1 Caracterización por IR del compuesto IBX

El espectro IR del compuesto IBX (ver anexo 1f), se observan las bandas correspondientes a las vibraciones por estiramiento de C-H (sp^2) en 2924 y 2853 cm^{-1} , las vibraciones del grupo carbonilo en 1599 y 1555 cm^{-1} y las del O-H en 3396 cm^{-1} .

8.10.2 Caracterización por RMN del compuesto IBX

El análisis de RMN para el IBX se realizó en DMSO, en la **Tabla 26** se muestra el desplazamiento químico del IBX.

Tabla 26. Desplazamiento químico para RMN ^{13}C y 1H del compuesto IBX.

| No de Carbono | ^{13}C (ppm) | 1H (ppm) y acoplamientos |
|---------------|----------------|-----------------------------|
| 1 | 125.4 | ----- |
| 2 | 130.5 | 8.1 (d. d. 1H) |
| 3 | 146.9 | 7.9 (t. d. 1H) |
| 4 | 131.9 | 7.8 (t. d. 1H) |
| 5 | 133.8 | 8.0 (d, d. 1H) |
| 6 | 133.4 | ----- |
| 7 | 167.9 | ----- |
| | | 3.4 (s, 1H) del OH |

En el anexo 2f, correspondiente al espectro de ^{13}C del IBX, se observan las 7 señales de los carbonos presentes en la molécula, donde el carbono 7 en 167.9 ppm es del carbonilo.

Así mismo, en el anexo 3f, correspondiente al espectro de ^1H del IBX, se observan 5 señales, 4 de ellas correspondientes a los metilos presentes en el compuesto y el 5 corresponde al O-H de esta molécula. Estos resultados, comparando con lo comunicado por Fallis,¹⁰⁰ se puede concluir que el producto obtenido es el compuesto IBX.

8.11 Síntesis del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (4D)

Se realizaron 14 lotes para la obtención del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**4D**). Se oxidó el compuesto (**3C**) utilizando como agente oxidante el IBX, como disolventes al acetonitrilo (A) o propanona (B), la reacción se llevó a cabo a diferentes temperaturas, en atmósfera de nitrógeno y a diferentes tiempos de reacción, **Tabla 27**.

Tabla 27. Síntesis del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**4D**), con ACN (A) y con propanona (B).

3C **4D**

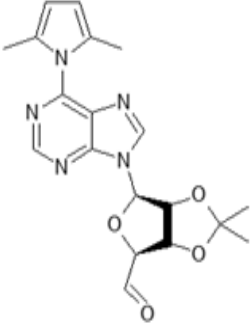
Síntesis del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2,3-*O*-isopropilidenadenosina (4D**)**

| Lote | Compuesto 3C mg (mmol) | IBX mg (mmol) | ACN (A) o propanona (B) (mL) | Tiempo (h) | Tempetaruta (°C) | Rendimiento (%) |
|------|------------------------------|------------------|------------------------------------|---------------|---------------------|--------------------|
| 1 | 48.0 (0.12) | 109.0 (0.40) | 15 (A) | 8 | 80 | Crudo150 |
| 2 | 51.2 (0.13) | 138.0 (0.50) | 8 (A) | 8 | 80 | 82 |
| 3 | 20.0 (0.05) | 46.0 (0.16) | 8 (A) | 6 | 80 | 82 |
| 4 | 30.0 (0.07) | 70.0 (0.25) | 4 (A) | 6 | 80 | 56 |
| 5 | 108.9 (0.28) | 250.0 (0.90) | 5 (A) | 3 | 80 | 90 |
| 6 | 50.0 (0.13) | 178.0 (0.63) | 7 (A) | 2 | 80 | 70 |
| 7 | 159.0 (0.41) | 485.0 (1.73) | 8 (A) | 2 | 80 | 38 |
| 8 | 291.0 (0.75) | 560.0 (2.00) | 8 (A) | 6 | 78 | 63 |
| 9 | 188.0 (0.48) | 500.0 (1.80) | 12 (A) | 3 | 80 | 86 |
| 10 | 111.0 (0.30) | 258.0 (0.92) | 7 (A) | 3 | 78 | Crudo 120 |
| 11 | 500.0 (1.30) | 1157.0 (4.13) | 15 (A) | 3 | 78 | 90 |
| 12 | 27.0 (0.07) | 73.0 (0.26) | 12 (B) | 6 | 55 | 70 |
| 13 | 20.0 (0.05) | 46.0 (0.16) | 5 (B) | 6 | 55 | 60 |
| 14 | 152.0 (0.40) | 232.0 (0.83) | 10 (B) | 6 | 55 | 65 |

Los mayores rendimientos (90%) se obtuvieron cuando se utilizó como medio de reacción el acetonitrilo, a temperaturas más altas y en menor tiempo. Con la propanona, los rendimientos son menores (60%) y el tiempo es mayor, pero el

exceso de IBX es más fácil de eliminar, lavando con éter diisopropílico debido a que la propanona se evapora a temperatura ambiente y se tiene que resuspender el sólido con éter isopropílico. Lo cual esto ayuda a que el IBX no se solubilice y en el filtrado eliminarlo. Debido a que el aldehído (**4D**) se hidrata con facilidad, se tiene que almacenar en atmósfera de N₂ (seco) y en refrigeración (-5°C), **Tabla 28**.

Tabla 28. Caracterización fisicoquímica del aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**4D**).

| | | |
|---|---|---|
|  | C₁₉H₂₁N₅O₄ | (3a<i>S</i>,6<i>R</i>,6a<i>R</i>)-6-[6-(2,5-dimetil-1<i>H</i>-pirrol-1-il)-9<i>H</i>-purina-9-il]-2,2-dimetiltetrahidrofurano[3,4-<i>d</i>][1,3]dioxole-4-carbaldehído |
| | Peso molecular | 383.41 |
| | Almacenamiento | Atmosfera de nitrógeno seco debido a que se hidrata y es sensible a la luz |
| | Apariencia | Polvo aceitoso color café |
| | Solubilidad | Soluble en metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, cloruro de metileno |

8.11.1 Caracterización por IR del compuesto (**4D**)

En el espectro IR del compuesto (**4D**) (Figura 23) se observa la desaparición de la banda correspondiente al OH en 3339 cm⁻¹, vibraciones de estiramiento de C-H (sp²) en 3118 cm⁻¹, vibración por estiramiento del grupo carbonilo formado en 1786 cm⁻¹, y las vibraciones de C=N y C=C en 1711 y 1558 cm⁻¹.

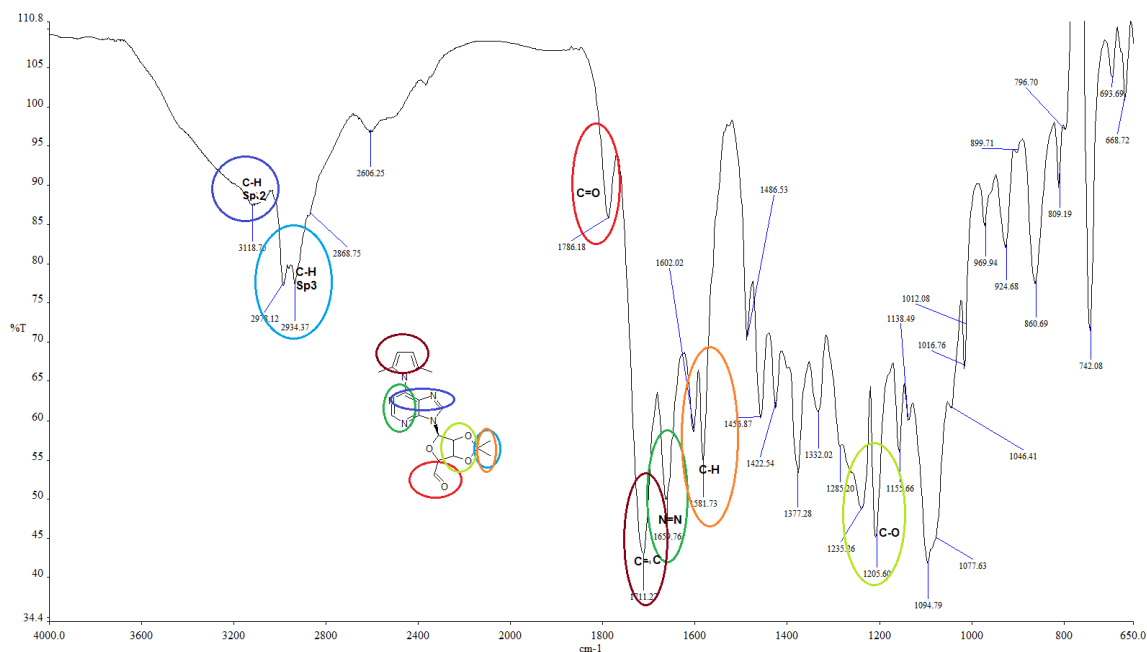


Figura 23. Espectro de IR del compuesto (4D).

8.11.2 Caracterización por UV-Visible del compuesto (4D)

El compuesto (4D) presentó una absorbancia máxima de 270 nm y la mínima en 250nm Figura 24.

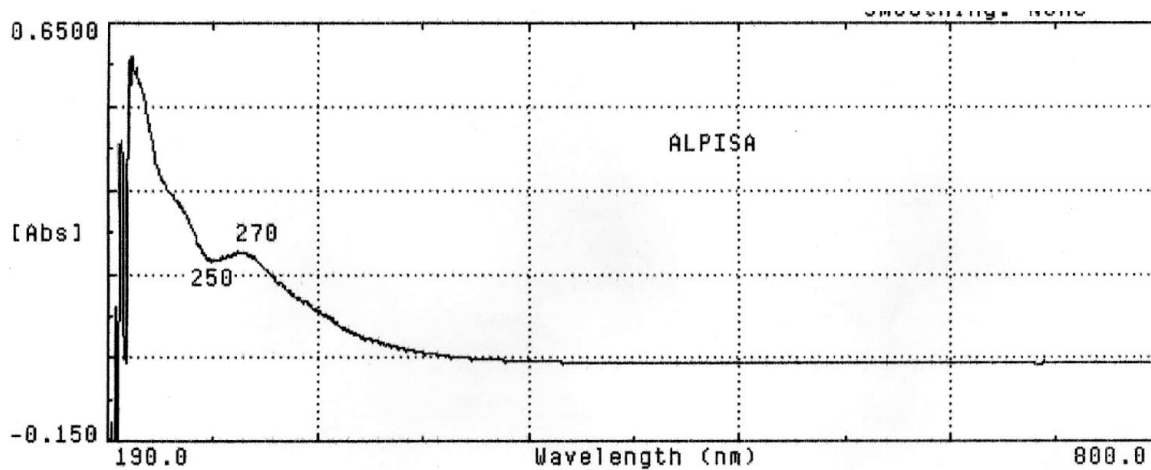
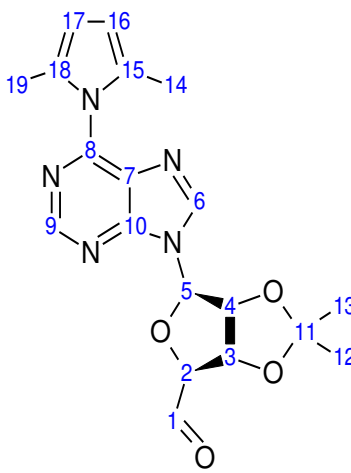


Figura 24. Espectro de UV-Visible del compuesto (4D).

8.11.3 Caracterización por RMN del compuesto (4D) por ^1H y ^{13}C .

Para el análisis de RMN, el compuesto (4D) se disolvió en CDCl_3 , en la **Tabla 29**, se pueden observar los desplazamientos químicos de carbono e hidrógeno. Se compararon los valores experimentales con los calculados por el programa ACD/Labs CNMR y HNMR Predictor versión 5.11. En las Figuras 25 y 26 se muestran los espectros de RMN^{13}C y ^1H .

Tabla 29. Desplazamientos químicos de RMN^{13}C y ^1H del compuesto (4D).



| No. de Carbono | ^{13}C (ppm) | Predictor (ppm) | ^1H (ppm) |
|----------------|-----------------------|-----------------|--------------------|
| 1 | 208.3 | 207.9 | 10.05 (s. 1H) |
| 2 | 83.6 | 85.4 | 4.28 (m. 1H) |
| 3 | 76.0 | 75.8 | 5.13 (m. 1H) |
| 4 | 82.0 | 83.4 | 5.28 (m. 1H) |
| 5 | 86.8 | 88.8 | 6.27 (m. 1H) |
| 6 | 142.3 | 143.1 | 8.95 (s. 1H) |
| 7 | 128.5 | 121.9 | _____ |
| 8 | 146.1 | 148.4 | _____ |
| 9 | 153.0 | 153.7 | 9.42 (m. 1H) |
| 10 | 152.6 | 152.1 | _____ |
| 11 | 114.9 | 113.8 | _____ |
| 12 | 27.7 | 24.9 | 1.63 (s. 3H) |
| 13 | 25.3 | 26.6 | 1.37 (s. 3H) |
| 14 | 13.6 | 13.4 | 2.23 (s. 3H) |
| 15 | 129.5 | 129.6 | _____ |
| 16 | 109.9 | 109.8 | 5.90 (m. 1H) |
| 17 | 109.9 | 109.8 | 5.90 (m. 1H) |
| 18 | 128.7 | 129.6 | _____ |
| 19 | 13.6 | 13.4 | 2.23 (s. 3H) |

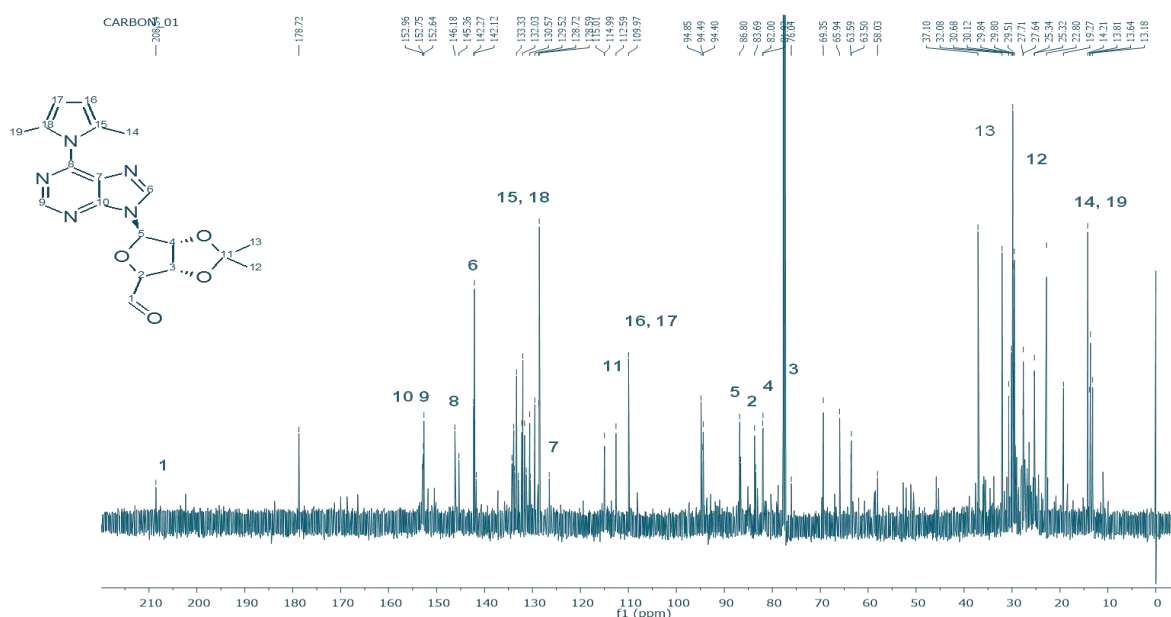


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto (4D).

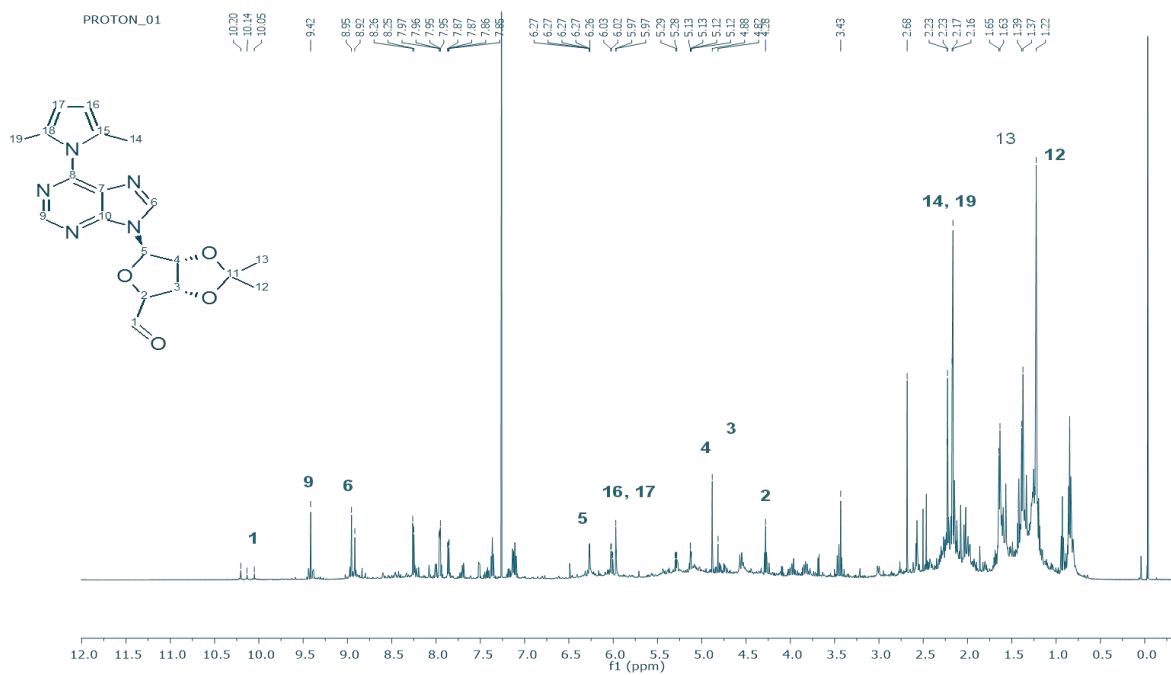


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H del compuesto (4D).

En la Figura 25 correspondiente al espectro de ^{13}C del compuesto (4D), se observa en 208 ppm la señal característica del carbono del carbonilo, y en el espectro de ^1H , en la Figura 26 se observa en 10.05 ppm el hidrógeno del

aldehído formado. Con base en la caracterización realizada mediante IR, UV y RMN se puede concluir que se obtuvo el compuesto de interés (**4D**) intermediario en nuestro estudio para obtener por biocatálisis el compuesto (**5E**).

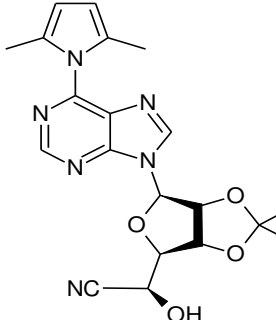
8.12 Síntesis química de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina (**5E**)

8.12.1 Síntesis del compuesto (**5E**)

Se realizaron 5 lotes con % de conversión del 68 al 83%, estos fueron determinados por la integración del protón del aldehído y de los protones de los diastereoisómeros de la cianohidrina formada (**5E**). Caracterizándose por IR, UV y RMN (Figuras 27- 30).

8.12.2 Propiedades fisicoquímicas del compuesto (**5E**)

Tabla30. Propiedades fisicoquímicas del compuesto (**5E**).

| | | |
|---|---|---|
|  | C₂₀H₂₂N₆O₄ | (3aR,6R,6aR)- 6-[6-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il)-9H-purina-9-il]tetrahidrofurano[3,4-d][1,3]dioxol-4-il}(hidroxilo)acetonitrilo |
| | Peso molecular | 410.42 |
| | Apariencia | Aceite color café |
| | Solubilidad | Soluble en metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, cloruro de metileno |

8.12.3 Caracterización por IR del compuesto (**5E**)

El espectro de IR del compuesto (**5E**), Figura 27, se observa la vibración por estiramiento del grupo -C≡N(ciano) en 2234 cm⁻¹, la banda de estiramiento de O-H en 3215 cm⁻¹ y las vibraciones correspondientes a la unión C-H (sp³) 2855, 2928 y 2862 cm⁻¹.

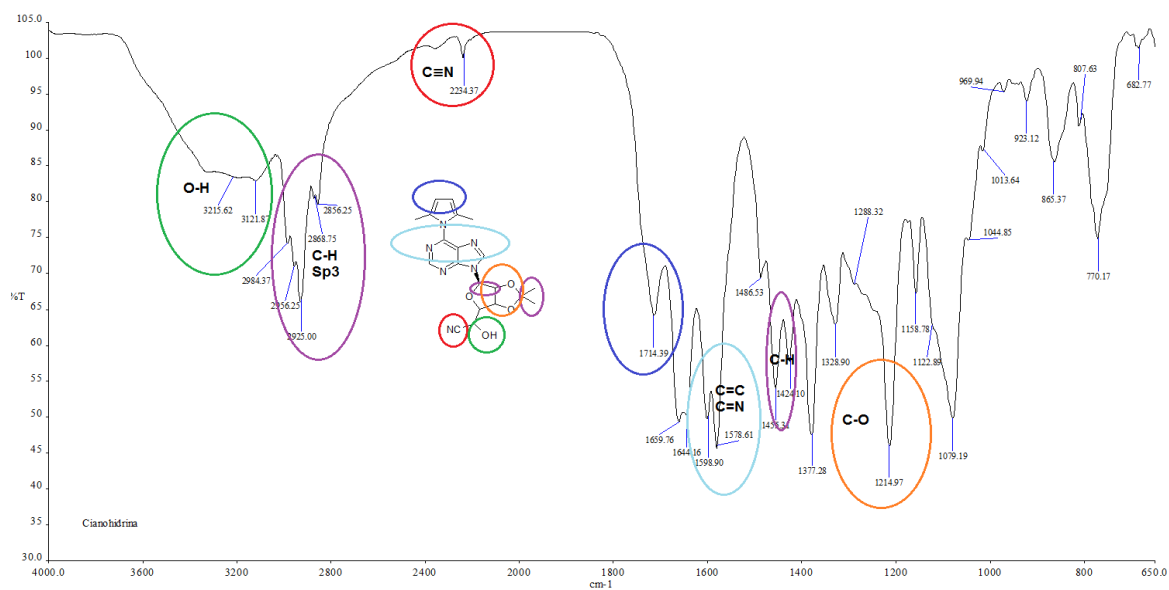


Figura 27. Espectro de IR del compuesto (5E).

8.12.4 Caracterización por UV-Visible del compuesto (5E)

El compuesto (5E) tiene una absorbancia máxima de 270 nm y una mínima en 250nm, observándose una inflexión en 230 nm, Figura 28.

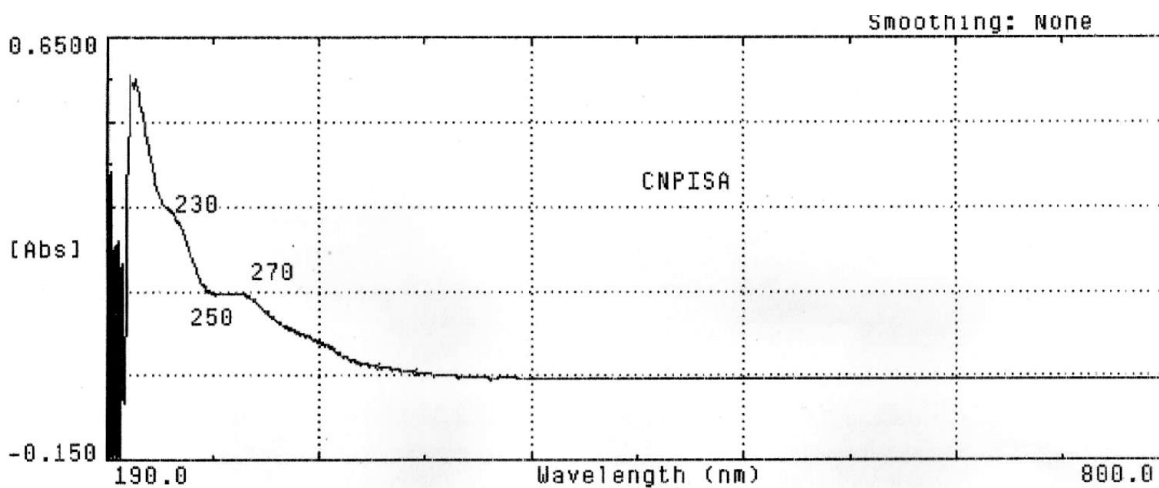


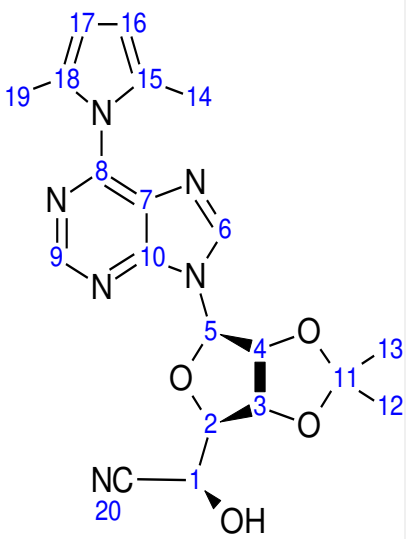
Figura 28. Espectro de UV-Visible del compuesto (5E).

8.12.5 Caracterización por RMN ^1H y ^{13}C del compuesto (5E)

Para el análisis de RMN, el compuesto (5E) se disolvió en CDCl_3 , en la **Tabla 31**, se pueden observar los desplazamientos químicos de carbono e hidrógeno estos se compararon con los calculados por el programa ACD/Labs CNMR y HNMR Predictor versión 5.11.

Tabla 31. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C y ^1H del compuesto (5E).

| No. de Carbono | ^{13}C (ppm) | Predictor (ppm) | ^1H (ppm) |
|----------------|-----------------------|-----------------|--------------------|
| 1 | 60.8 | 58.4 | 4.7 y 4.8 |
| 2 | 82.0 | 76.6 | 4.39 |
| 3 | 83.3 | 79.8 | 5.03 |
| 4 | 86.6 | 81.9 | 5.54 |
| 5 | 94.6 | 87.5 | 6.29 |
| 6 | 145.2 | 143.1 | 8.72 |
| 7 | 129.4 | 120.7 | — |
| 8 | 151.4 | 148.4 | — |
| 9 | 152.7 | 153.7 | 9.05 |
| 10 | 152.9 | 154.3 | — |
| 11 | - | 113.9 | — |
| 12 | 25.3 | 25.1 | 1.38 |
| 13 | 27.8 | 26.8 | 1.53 |
| 14 | 13.7 | 13.4 | 2.20 |
| 15 | 130.6 | 129.5 | — |
| 16 | 110.0 | 109.8 | 5.90 |
| 17 | 110.0 | 109.8 | 5.90 |
| 18 | 130.6 | 129.5 | — |
| 19 | 13.7 | 13.4 | 3.20 |
| 20 | 115.0 | 116.8 | — |



En las Figuras 29 y 30 se muestran los espectros de RMN de ^{13}C y ^1H (600 MHz), en donde se asignaron las señales correspondientes a los protones

presentes en la molécula, observándose la duplicidad de señales por la formación del quinto centro estereogénico H1, 4.75 y 4.83 ppm las cuales se utilizarán para determinar el % *ed*, y el % de conversión (Figura 30). Con base en la caracterización realizada por IR y RMN se puede concluir que el compuesto sintetizado es la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2,3-*O*-isopropilidenadenosina (**5E**). Esta caracterización nos sirve de referencia para las biocatálisis.

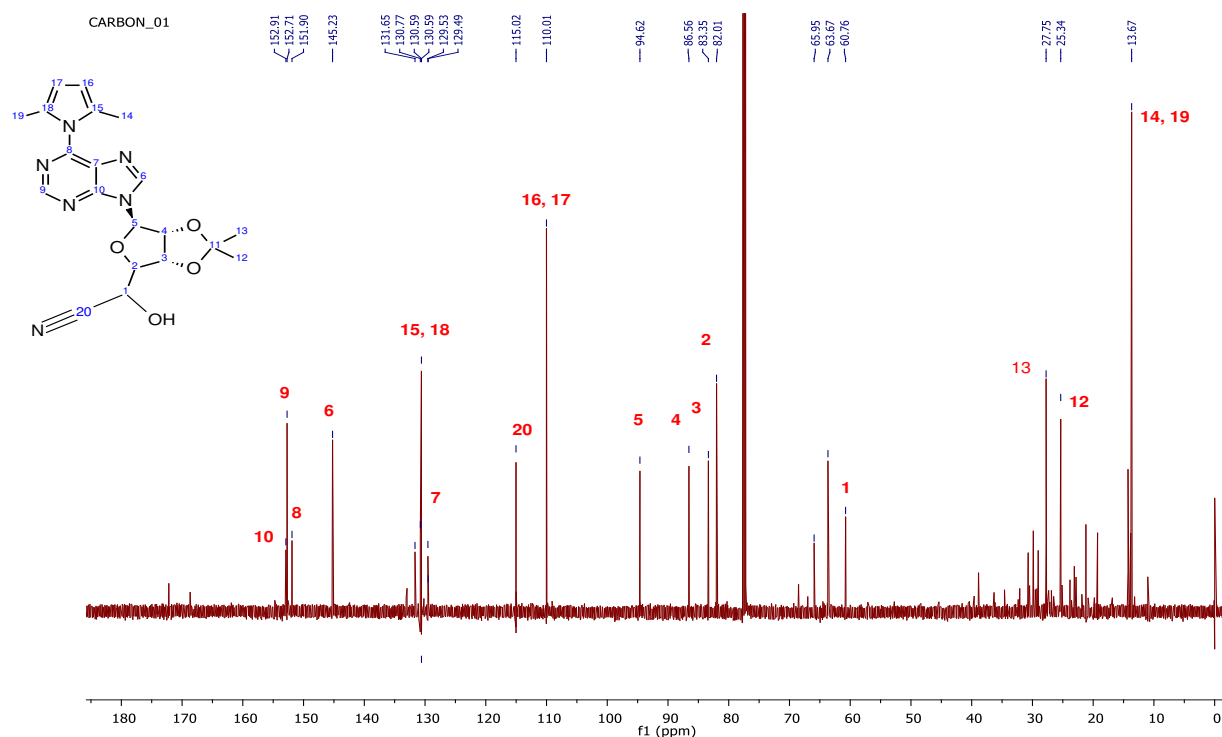


Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto (**5E**).

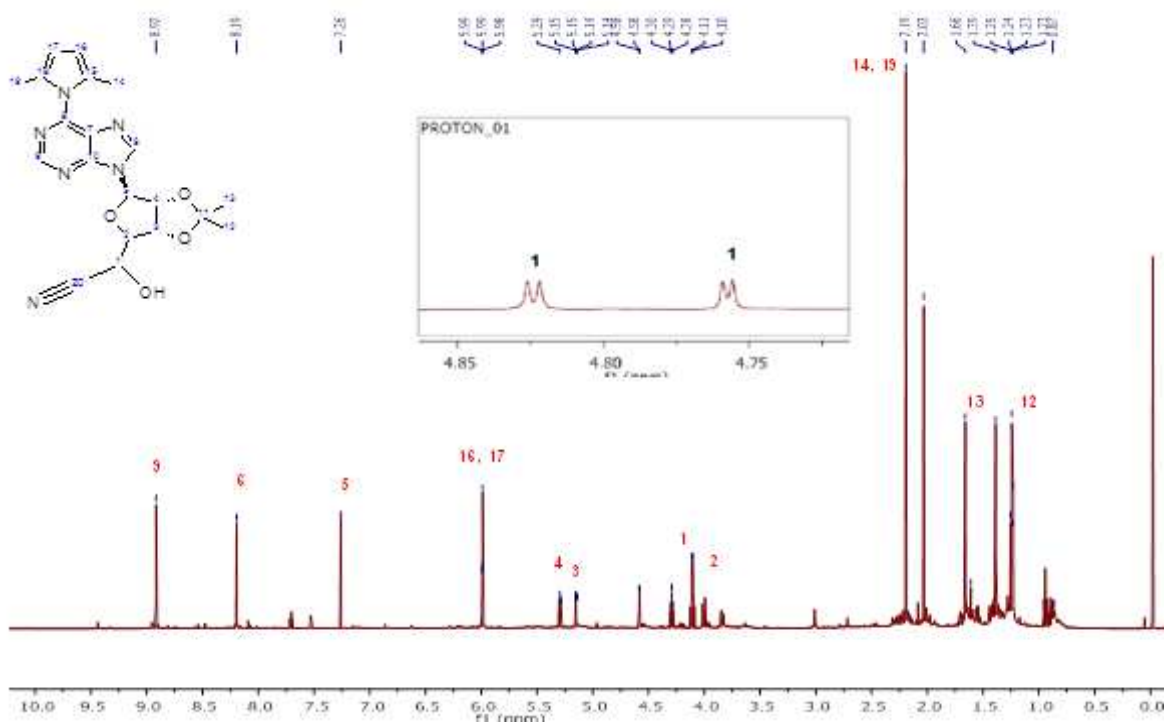


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H del compuesto (5E).

8.13 Síntesis química de la amida de la 2',3'-isopropilidenadenosina (6F)

Se realizaron 2 lotes, empleando un exceso de H_2O_2 al 30%, (6 eq). Obteniéndose un polvo blanco que al tomarle su Pf. Solo se obscurece a 210°C .

8.13.1 Propiedades fisicoquímicas del compuesto (6F)

Tabla 32. Propiedades fisicoquímicas del compuesto 6F.

| | | |
|--|--|---|
| | $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_4$ | 2-[(3aR,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purina-9-yl)-2,2-dimetiltetrahydrofuran[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl]-2-hidroxiacetamida |
| | Peso molecular | 350.33 |
| | Apariencia | Polvo blanco |
| | Solubilidad | Soluble en metanol, poco soluble en acetato de etilo, insoluble en cloruro metileno, éter etílico. |

8.13.2 Caracterización por IR del compuesto (6F)

El espectro de IR de compuesto (6F), en la Figura 31, se observan las vibraciones correspondientes a los grupos O-H, y N-H en 3357 cm^{-1} , la vibración del C=O de la amida en 1708 cm^{-1} , y las vibraciones del C-H (sp^3) en $2855, 2928, 2862\text{ cm}^{-1}$ y se observa la desaparición del grupo $\text{C}\equiv\text{N}$ en 2234 cm^{-1} .

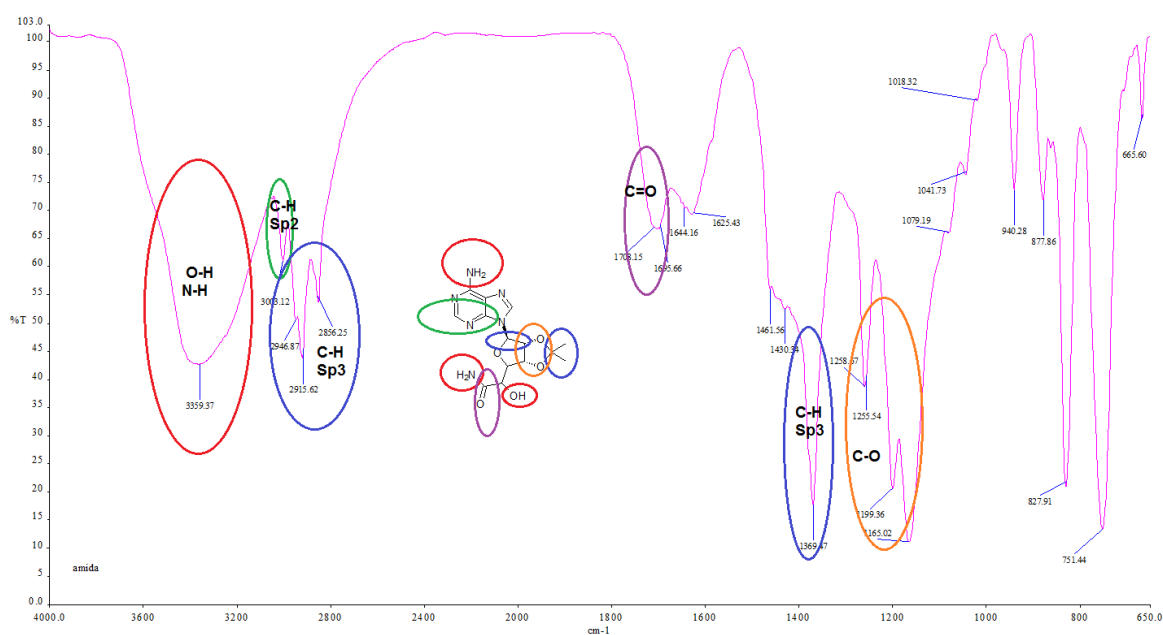


Figura 31. Espectro de IR del compuesto (6F).

8.13.3 Caracterización por UV-Visible del compuesto (6F)

El compuesto (6F) tiene una absorbancia máxima en 260 nm y una mínima en 245 nm , (Figura 32). Donde se puede observar que el espectro presenta gran similitud con el compuesto 1A y 2B, ya que, con las condiciones empleadas se elimina la protección de grupo amino del compuesto (5E).¹⁰¹⁻¹⁰³

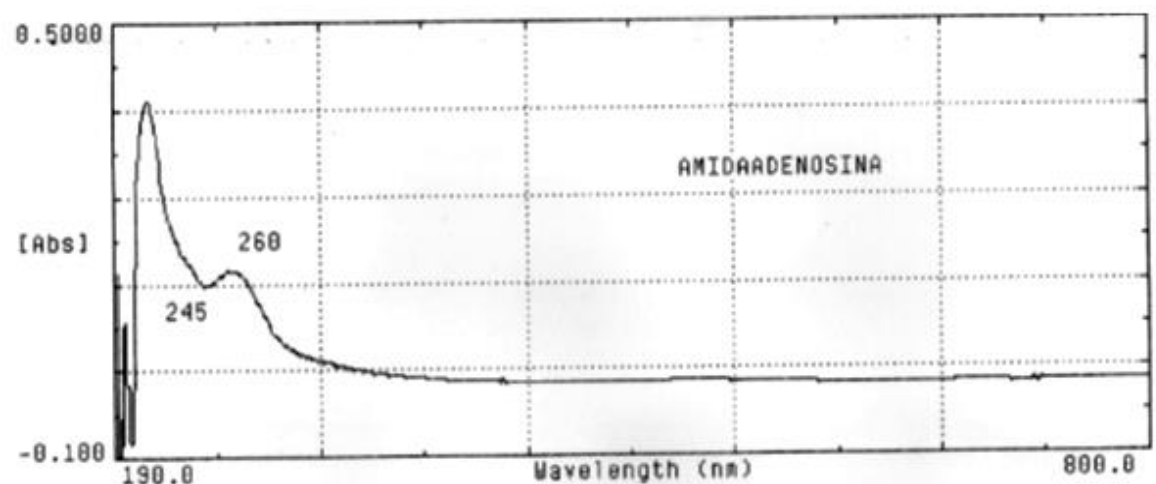


Figura 32. Espectro de UV-Visible del compuesto (6F).

8.13.4 Caracterización por RMN ^1H y ^{13}C del compuesto (6F)

Para el análisis de RMN, el compuesto (6F) se disolvió en CDCl_3 . En la **Tabla 33**, se pueden observar los desplazamientos químicos de cada carbono y se compararon con los calculados por el programa ACD/Labs CNMR y HNMR Predictor versión 5.11.

En la Figura 33, correspondiente al espectro ^1H de la amida de 2',3'-O-isopropilidenadenosina, se asignaron las señales correspondientes a los protones de la molécula, en donde se observa duplicidad de señales por la formación del quinto centro estereogénico, lo cual concuerda con lo informado por Wang.⁷⁷

Tabla 33. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C y ^1H del compuesto (**6F**).

| No. de Carbono | ^{13}C (ppm) | Predictor (ppm) | ^1H desplazamiento (ppm) |
|----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------------------|
| 1 | 68.9 | 68.1 | 4.19 |
| 2 | 81.1 | 79.3 | 4.73 |
| 3 | 75.4 | 76.6 | 4.84 |
| 4 | 83.9 | 82.9 | 5.54 |
| 5 | 86.9 | 88.7 | 6.29 |
| 6 | 138.9 | 140.2 | 8.30 |
| 7 | 123.6 | 120.2 | — |
| 8 | 146.8 | 151.5 | — |
| 9 | 152.2 | 152.9 | 8.25 |
| 10 | 151.4 | 152.6 | — |
| 11 | 113.9 | 113.9 | — |
| 12 | 26.4 | 26.8 | 1.53 |
| 13 | 24.2 | 25.1 | 1.38 |
| 14 | 175.7 | 174.7 | — |
| | | | 7.35 de NH |
| | | | 6.90 del OH |

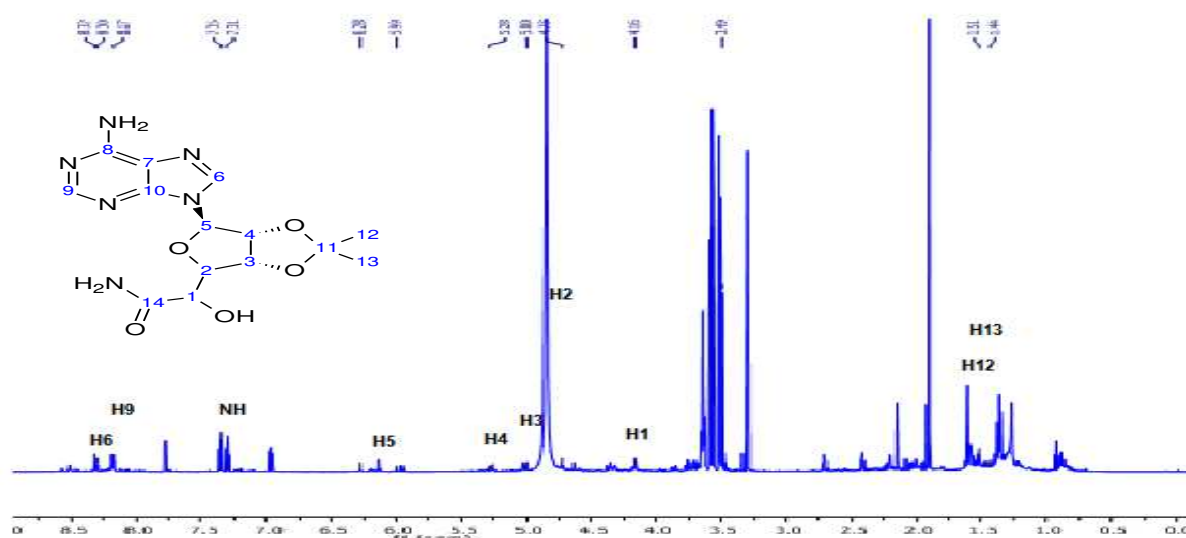
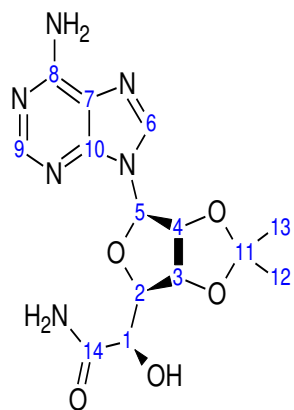


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H de la amida de la 2',3'-isopropilidenadenosina (**6F**).

8.14. Análisis de la adenosina y sus derivados por CLAR en fase reversa

Con la finalidad de identificar la adenosina (**1A**), y sus derivados (**2B**), (**3C**), (**4D**) y los diastereoisómeros de la cianohidrina (**5E**), se desarrollaron los métodos analíticos por CLAR en fase reversa. Se probaron 2 columnas: A) XDB Luna C8 de 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m, y B) Luna C18 de 150 mm x 3.0 mm, con un volumen de inyección de 5 μ L, a 25°C, modificando la velocidad del flujo y utilizando como fase móvil Agua:MeOH en diferentes proporciones como se observa en la **Tabla 34**.

Tabla 34. Desarrollo del método analítico por CLAR fase reversa.

| Método | Columna | Fase móvil Agua:MeOH | Flujo mL/min | λ (nm) |
|--------|----------|-------------------------|-----------------|--------------------------|
| AA | XDB-C8 | 90:10 | 0.8 | 220 254 260 280 |
| AB | | 80:20 | 0.8 | |
| AB | | 70:30 | 0.4 | |
| BA | Luna C18 | 70:30 | 0.4 | |
| BB | | 80:20 | 0.6 | |

Las mejores condiciones de separación se obtuvieron con el método BB, **Tabla 34**. En la **Tabla 35** se observan los tiempos de retención para cada derivado de la adenosina y en la Figura 34 el cromatograma de la adenosina y sus derivados, en el que se resalta la separación de los diastereoisómeros de (**5E**).

Tabla 35. Resultados con el método BB, t_R de los derivados nucleosídicos (**1A**, **2B**, **3C**, **4D** y **5E**).

| Compuestos | t_r (min) |
|---------------|----------------|
| (1A) | 22.08 |
| (2B) | 35.96 |
| (3C) | 8.94 |
| (4D) | 11.34 |
| (5E) | 35.67 |
| | 40.68 |

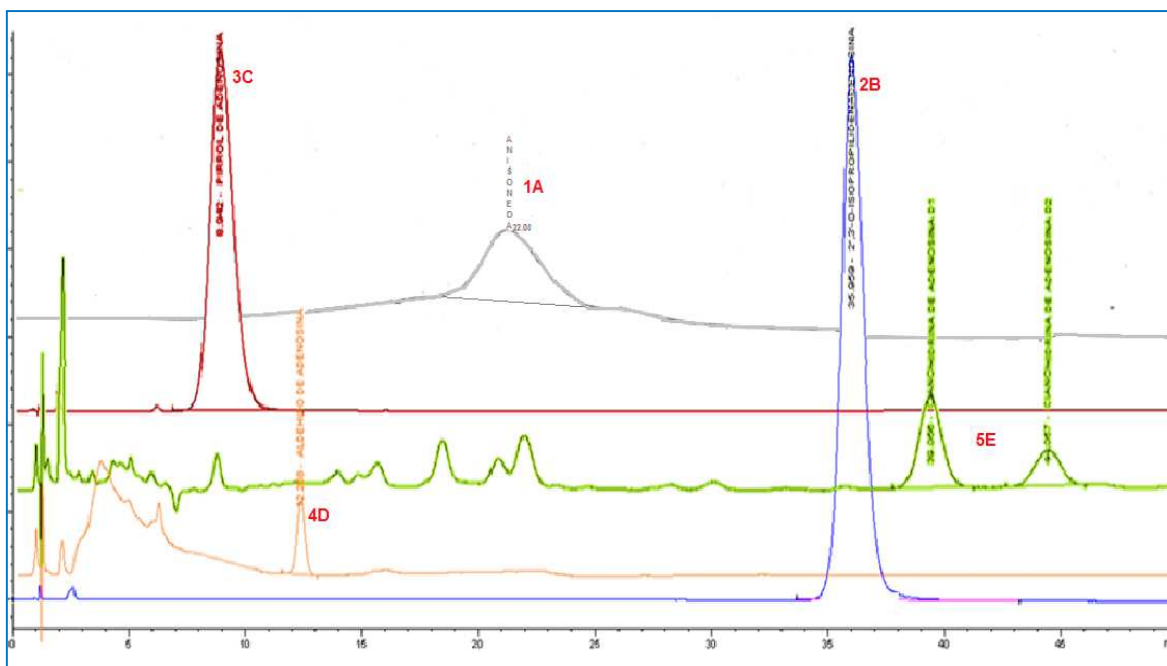


Figura 34. Cromatograma de la adenosina (**1A**) y sus derivados (**2B**, **3C**, **4D** y **5E**), columna Luna C18, flujo 0.6 mL/min, $\lambda = 260$ nm, $T = 25^\circ\text{C}$, Agua:MeOH (80:20).

8.14.1 Análisis de la adenosina y sus derivados por CLAR en fase normal

Con la finalidad de identificar la adenosina (**1A**), y sus derivados (**2B**), (**3C**), (**4D**) y los diastereoisómeros de la cianohidrina (**5E**), se desarrollaron también los métodos analíticos por CLAR en fase normal, se probaron 3 columnas quirales OB-H, OJ-H y la OD, con un volumen de inyección de $5 \mu\text{L}$, a 25°C , utilizándose como fase móvil *n*-hexano: isopropanol en diferentes proporciones y velocidades de flujo, **Tabla 36**.

Tabla 36. Desarrollo del método analítico por CLAR fase normal.

| Método | Columnas Quiral | Fase móvil Hex:iPrOH | Flujo mL/min | λ (nm) |
|--------|-----------------|----------------------|--------------|-------------------|
| 1A | OB-H | 85:15 | 1.0 | 220 |
| 2A | | 80:20 | 1.0 | 254 260 280 |
| 1B | OJ-H | 80:20 | 1.0 | 220 |
| 2B | | 70:30 | 1.0 | 254 260 280 |
| 1C | OD | 95:5 | 1.0 | 220 |
| 2C | | 90:10 | 0.8 | 254 260 |
| 3C | | 85:15 | 1.2 | 280 |
| 4C | | 80:20 | 1.0 | |
| 5C | | Con gradiente | 1.2 | |

Las mejores condiciones de separación se obtuvieron con el método 5C (columna OD 4.6 X 250 mm), con gradiente de 90:10 hexano:isopropanol durante 16 min, 80:20 a los 20 min y se mantiene hasta los 55 min; 78:22 a los 56 min y se mantiene hasta los 65 min, bajando 90:10 hasta los 70 y se mantiene a los 75 min. En la Figura 35 se observa que por este método se logró la separación de la adenosina y sus derivados.

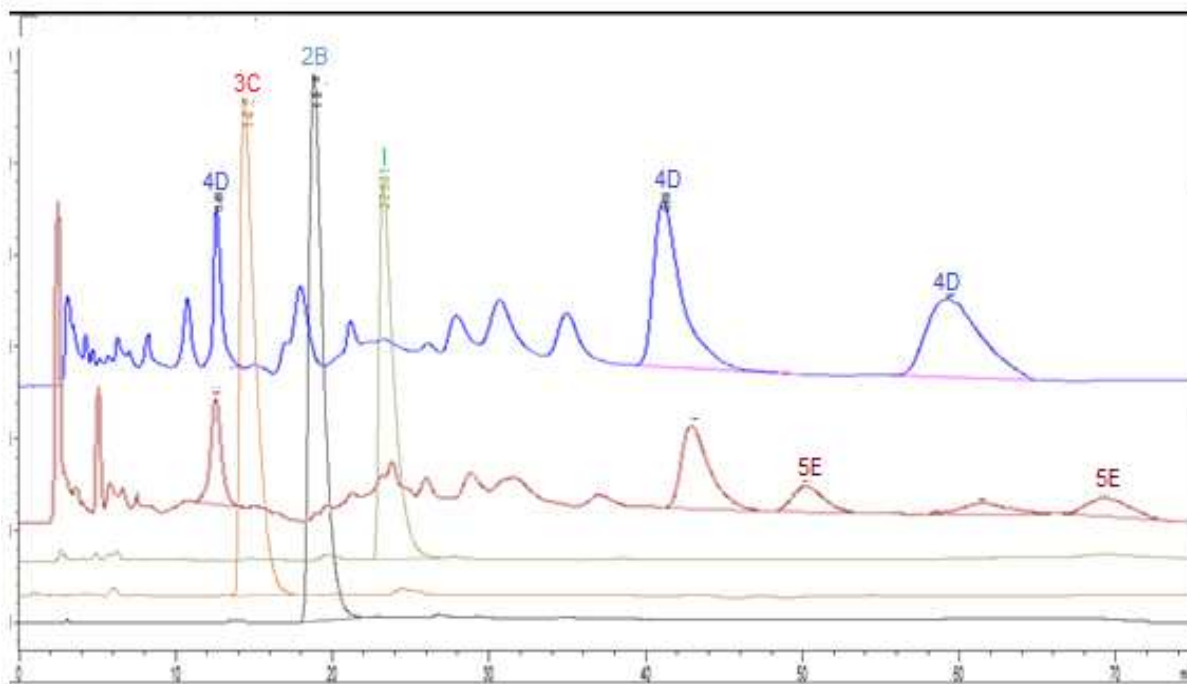


Figura 35. Cromatograma de los derivados de adenosina (**2B**, **3C**, **4D** y **5E**), columna OD, gradiente de disolventes, con un flujo de 1.2 mL/min.

Con el diseño de estos dos métodos analíticos (CLAR Y RMN) se puede cuantificar e identificarla separación de los diastereoisómeros del nuevo centro estereogénico de la cianohidrina (**5E**).

Con el método fase reversa los tiempos de retención de la adenosina y sus derivados son menores, es mejor la resolución de los diastereoisómeros (DA y DB), y el gasto de los disolventes es menor (flujo 0.6 mL/min vs 1.2 mL/min), además del costo de las columnas quirales, comparándolo con el método fase normal.

8.15 Síntesis biocatalítica para la obtención del compuesto (**5E**)

Una vez sintetizado el compuesto (**4D**), se llevaron a cabo las biocatálisis para la obtención del compuesto (**5E**), empleando como fuentes de oxinitrilasas las semillas de las plantas como polvos acetónidos de: mamey, durazno, ciruela, guanábana, almendra, capulín, zapote y cereza, con la finalidad de preparar la correspondiente cianohidrina con exceso diastereoisomérico (%*ed.*)

Cabe mencionar que estas reacciones se realizaron en medio bifásico (éter isopropílico / soluciones acuosas de citratos), a pH de 4.5, usando una relación de

los polvos acetónidos con el sustrato, de 1:1, a diferentes temperaturas, 5, 10, 20 y 30°C.

Se elaboraron 14 lotes por triplicado, con la finalidad de encontrar la mejor alternativa para la obtención de la cianohidrina (**5E**).

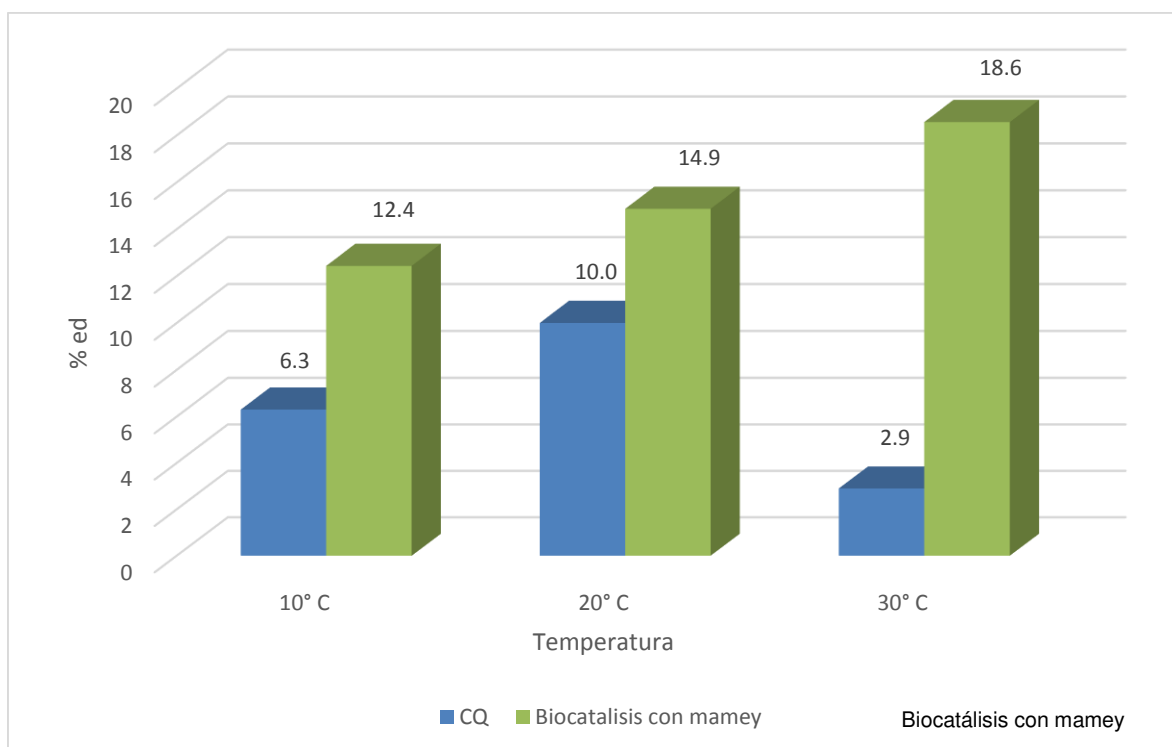
Con base en lo reportado con los polvos acetónidos de mamey a 30°C por Martínez,⁷⁴ y Luna,¹⁰⁴ se seleccionaron los polvos acetónidos de las semillas de: almendra, ciruela, capulín, cereza, durazno, guanábana, zapote y mamey como fuente de oxinitrilasas, para catalizar la adición del cianuro al aldehído de adenosina (**4D**). A continuación se muestran los resultados de las biocatálisis con los diferentes polvos acetónidos seleccionados, a diferentes temperaturas, **Tabla 37** y en las **Tabla 38 y 39** el análisis estadístico.

Tomando como referencia lo obtenido por Martínez,⁷⁴ primero se realizó la adición de cianuro al aldehído (**4D**) utilizando como biocatalizador los polvos acetónidos de mamey, a 10, 20 y 30°C durante 96h y con su respectivo control químico (compuesto **4D** con medio bifásico: éter diisopropílico/solución acuosa de citratos, a pH 4.5, sin biocatalizador).

Tabla 37. Obtención de (**5E**), empleando polvo acetónido de mamey a diferentes temperaturas.

| Temperatura | | Lotes | * <i>DA</i> | ** <i>DB</i> | % <i>ed</i> | % conversión por RMN |
|-------------|-----------------|-------|-------------|--------------|-------------|----------------------|
| 10°C | Control químico | Q | 46.8 | 53.1 | 6.8 | 85 |
| | Biocatálisis | 1 | 42.5 | 57.4 | 14.9 | 80 |
| | | 2 | 44.6 | 55.4 | 10.8 | 81 |
| | | 3 | 44.2 | 55.8 | 11.6 | 85 |
| 20°C | Control químico | Q | 45.0 | 55.0 | 10.0 | 80 |
| | Biocatálisis | 1 | 42.0 | 58.0 | 16.0 | 86 |
| | | 2 | 42.2 | 57.7 | 15.5 | 85 |
| | | 3 | 43.4 | 56.5 | 13.1 | 83 |
| 30°C | Control químico | Q | 48.5 | 51.4 | 2.9 | 81 |
| | Biocatálisis | 1 | 40.1 | 59.8 | 19.7 | 80 |
| | | 2 | 40.6 | 59.6 | 19.9 | 85 |
| | | 3 | 41.5 | 58.5 | 17.0 | 86 |

DA* diastereoisómero 1, *DB* diastereoisómero 2



Gráfica 1. % ed del compuesto (**5E**) con mamey a pH 4.5 y su control químico (CQ) a 10, 20 y 30 °C.

En la **Tabla 37** se muestran los resultados de los %ed y los % de conversión. Con 1 equivalente de la solución de citratos a pH 4.5 a 10, 20 y 30°C, se obtuvieron similares porcentajes de conversión con respecto al control químico. En este proceso de formación de la cianohidrina por biocatálisis, hay que considerar que en ciertos casos se puede inducir también el proceso no enzimático (químico). Con respecto al %ed, se observa cierto enriquecimiento del diastereoisómero *DBa* las diferentes temperaturas empleadas en los dos procesos.

En la gráfica 1 se puede observar que las mejores condiciones para la biocatálisis de (**4D**) es con mamey en comparación con su control químico a la temperatura de 30°C, por lo cual se decidió hacer el análisis estadístico (ANOVA) de todos los resultados (ver **Tabla38**), donde se obtuvo una significancia estadística entre las temperaturas de 10 y 30°C, de 0.014 ($>p=0.05$). Se realizó un análisis TUCKEY para comparar entre estas dos temperaturas, **Tabla39**. Con base en estos resultados, se puede decir que existe una diferencia significativa entre las temperaturas de 10° y 30°C.

Tabla 38. ANOVA de las biocatálisis de (4D) con mamey.

| ANOVA (Biocatalítica) | | | |
|------------------------------|-------|---------------------|----------------|
| Temperatura (°C) | Media | Desviación Estándar | Error estándar |
| 10 | 12.43 | 2.17 | 1.25 |
| 20 | 14.86 | 1.55 | 0.89 |
| 30 | 18.56 | 1.40 | 0.80 |
| F=0.014 | | | |

Tabla 39. Prueba de TUCKEY de 10°vs 30°C.

| TUCKEY (Biocatalíticas) | | |
|--------------------------------|---------------------|------------------------|
| Temperatura (°C) | <i>p</i> encontrada | <i>p</i> de referencia |
| 10° vs 30°C | 0.011 | 0.05 |

Asimismo, se realizó una comparación entre los controles químicos y los biocatalíticos, donde a 30°C presenta una diferencia significativa, **Tabla 40**, por lo cual con base en estos resultados y los obtenidos en la **Tabla 39**, se puede decir que a 30°C se favorece la biocatálisis.

Tabla 40. Prueba de Student del control químico vs biocatálisis con mamey.

| “ t “ Student (Química vs Biocatalítica) | | |
|---|--------|------|
| Temperatura | t | Ref. |
| 30°C | 0.0052 | 0.05 |

Para corroborar que no existe inducción química, sino biocatalítica, se realizaron las biocatálisis con los polvos acetónidos de mamey, ciruela y almendra con el benzaldehído, dado que este compuesto ha sido ampliamente estudiado.^{105,106}

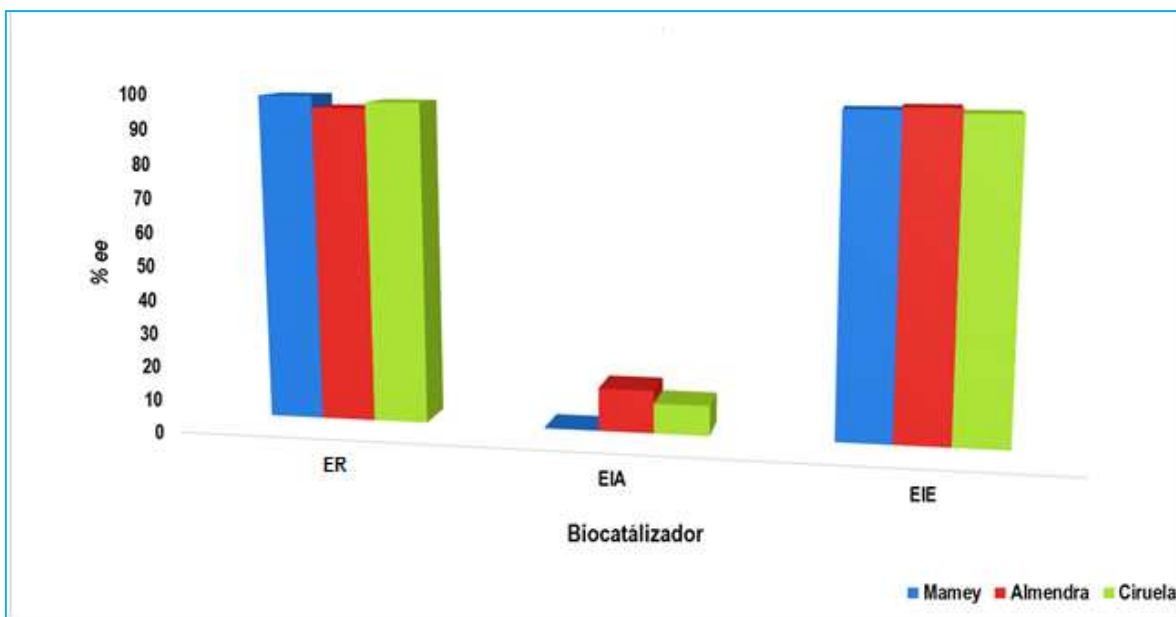
8.15.1 Diferentes condiciones (refrigeración, autoclave y estufa) de los biocatalizadores para la reacción con benzaldehído

Con base en los resultados anteriores (Gráfica 1) y para asegurar que la reacción fuera enzimática y no por el efecto del soporte de los polvos lo cual podría favorecer la reacción química, se hizo reaccionar al benzaldehído para la obtención del *R*-mandelonitrilo con las condiciones informadas por Solis,¹⁰⁵ y Hernández,¹⁰⁶ utilizando los polvos acetónidos de mamey, almendra y ciruela sometidos a estrés en autoclave (121°C/15min a 20 lb/in²) (EIA), en la estufa (70°C/4días) (EIE) y en (refrigeración a 4°C) (ER). Cada prueba se realizó por duplicado encontrando los siguientes resultados ver **Tabla 41** y Gráfica 2.

Tabla 41. Resultados de las biocatálisis del benzaldehído, relación sustrato:biocatalizador 1:1 a 5°C a pH 5.0, 1 eq. de HCN durante 24 horas.^{102,103}

| Fuente | Prueba | % <i>R</i> -mandelo nitrilo | % <i>S</i> -mandelo nitrilo | Benzaldehído |
|----------|--------|-----------------------------|-----------------------------|--------------|
| Mamey | S/E | - | - | 100% |
| | ER-1 | 99.0 | 1.0 | * |
| | ER-2 | 99.5 | 0.5 | * |
| | EIA-1 | 50 | 50 | >90% |
| | EIA-2 | 50 | 50 | >90% |
| | EIE-1 | 97.0 | 3.0 | * |
| | EIE-2 | 99.3 | 0.7 | * |
| Almendra | ER-1 | 97.0 | 3.0 | * |
| | ER-2 | 98.0 | 2.0 | * |
| | EIA-1 | 61.0 | 39.0 | > 90% |
| | EIA-2 | 52.0 | 48.0 | > 90% |
| | EIE-1 | 98.0 | 2.0 | * |
| | EIE-2 | 99.0 | 1.0 | * |
| Ciruela | ER-1 | 98.3 | 1.7 | * |
| | ER-2 | 98.5 | 1.5 | * |
| | EIA-1 | 57.7 | 42.3 | > 90% |
| | EIA-2 | 48.6 | 51.4 | > 90% |
| | EIE-1 | 98.9 | 1.1 | * |
| | EIE-2 | 96.6 | 3.4 | * |

S/E= Sin Enzima, ER=Enzima Refrigerada, EIA=Enzima Inactivada en Autoclave, EIE=Enzima Inactivada en Estufa, *trazas



Gráfica 2. Comparación de las biocatálisis para el benzaldehído con los polvos acetónidos refrigerados (ER), en autoclave (EIA) y en estufa a 70°C (EIE).

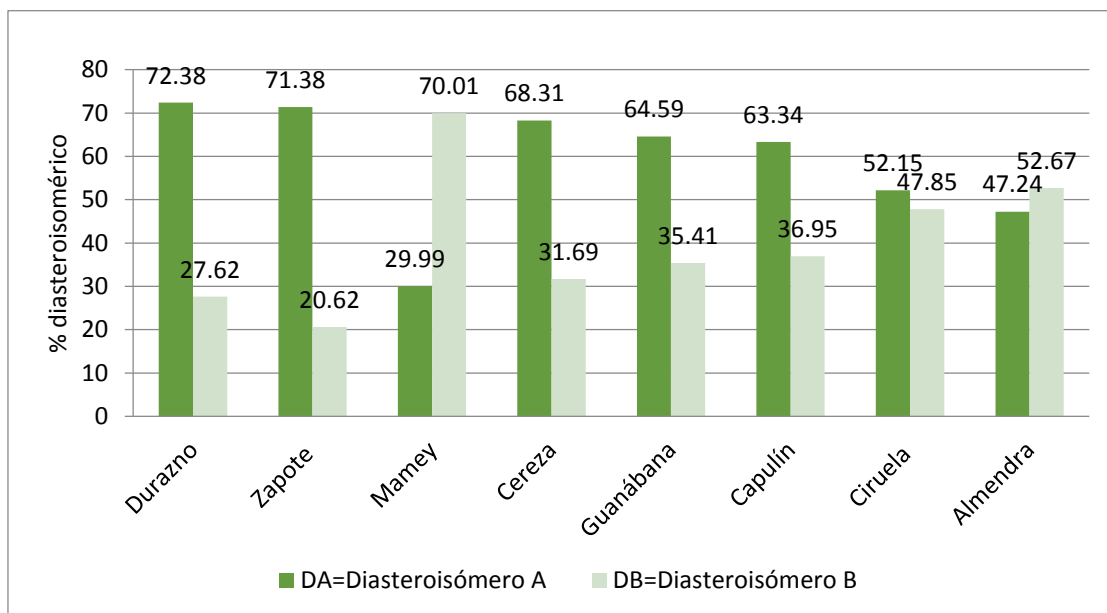
Con los resultados de la **Tabla 41** y la Gráfica 2 se puede concluir que al menos en los polvos acetónidos sometidos a estrés en la estufa a 70°C durante 4 días no se desnaturalizó la enzima, observándose % ee similares a los polvos refrigerados, en éstas dos biocatálisis se obtuvieron trazas del benzaldehído. Sin embargo, en los polvos sometidos a estrés en autoclave la enzima se inactiva, ya que se recupera benzaldehído (>90%) y los %ee fueron cercanos a 50:50 lo que probablemente ocurrió fue la reacción química, ya que en las otras condiciones de los biocatalizadores (EIE y ER), hay enantioselectividad obteniéndose el *R*-mandelonitrilo (>97%). Por lo anterior, se concluye que la reacción con los polvos acetónidos de mamey y (4D) están siendo biocatalizados.

8.15.2 Biocatálisis del compuesto (4D) a 5°C, pH 4.5, con diferentes fuentes de oxinitrilasas

Con la finalidad de comparar los distintos biocatalizadores, se realizaron pruebas biocatalíticas a 5°C, con 8 polvos acetónidos: mamey, ciruela, almendra, capulín, cereza, durazno, zapote y guanábana, ver Gráfica 3.

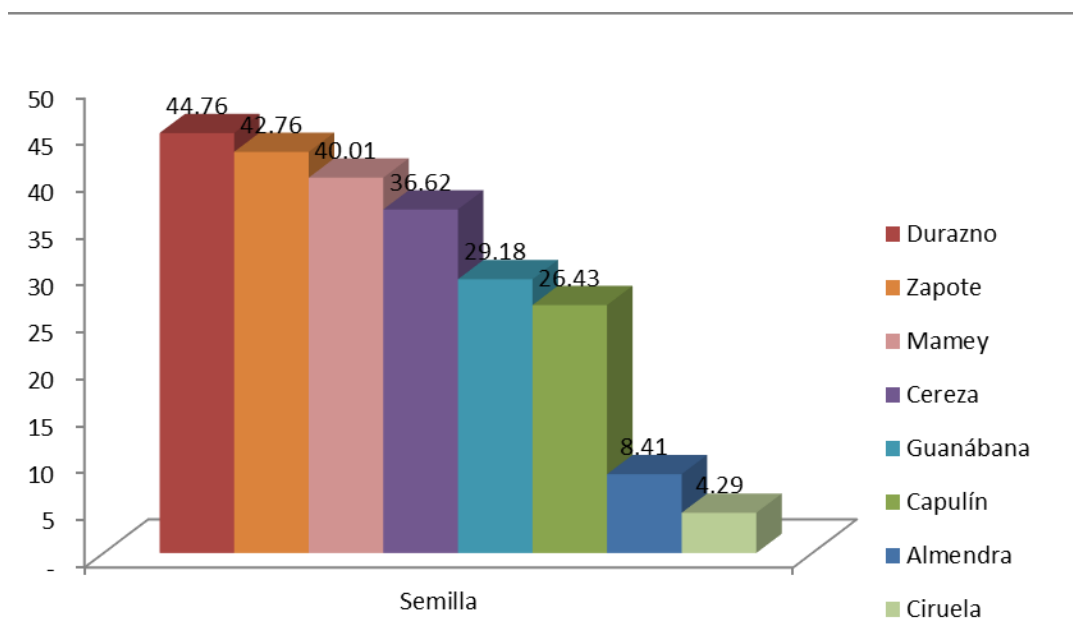
Se observa que con el polvo acetónido de mamey se favorece la obtención del diastereoisómero B (DB), mientras que durazno, capulín, guanábana, cereza y

zapote se favorece la obtención del diasteroisómero A (DA);asimismo, se observa que para ciruela y almendra es poco el enriquecimiento de uno de los diasteroisómeros.



Gráfica 3. %ed por CLAR fase normal del compuesto (5E).

En la gráfica 4, se comparan los % del exceso diastereoisómero de la cianohidrina (5E), en donde se puede observar que usando ciruela y almendra como fuente del biocatalizador es baja (<10%), mientras que con durazno y zapote son los que presenta una mayor % de exceso diastereoisómero (>40%).



Gráfica 4. % de exceso diastereoisomérico de la cianohidrina (5E) con los distintos catalizadores a 5°C

Se realizó el análisis estadístico ANOVA para ver la diferencia significativa entre la obtención de los diastereoisómeros A y B por biocatálisis con las diferentes fuentes de oxinitrilasas, en donde el diastereoisómero A con los polvos acetónidos de mamey tiene diferencias significativas con los otros polvos acetónidos dando como resultado una $p < 0.05$ ($p = 0.05$), por lo cual se decidió realizar la prueba de TUCKEY donde se encontró que si hay diferencia significativa $p < 0.05$ ($p = 0.05$). Asimismo, almendra y ciruela presentan diferencias significativas en los % de conversión con todos los polvos acetónidos $p < 0.05$ ($p = 0.05$), pero no presentan gran diferencia entre ellas (almendra-ciruela) $p = 0.961$ ($p = 0.05$). Sumado a esto se observó que los controles químicos no presentaban conversión.

9. CONCLUSIONES

Por síntesis química se obtuvieron la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**2B**), el 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**3C**), el aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**4D**), la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**5E**) y la amida de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina(**6F**)

La protección del compuesto 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**3C**) empleando 2,5-hexanodiona y ácido acético, fue la que dio mejor resultado, aportando así una alternativa para la protección del grupo amino de la adenosina.

Se logró inducir un nuevo centro estereogénico en el aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**4D**) por síntesis química y biocatalítica para la obtención de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**5E**).

Se caracterizaron e identificaron con técnicas espectroscópicas (UV, IR y RMN), los compuestos: adenosina (**1A**), la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**2B**), el 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**3C**), el aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**4D**), la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**5E**) y la amida de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**6F**), IBX, 2,5-hexanodiona, así como los subproductos (I), (II), (III), (IV).

Se desarrollaron los métodos analíticos por CLAR fase normal y reversa de los compuestos adenosina (**1A**), la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**2B**), el 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**3C**), el aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**4D**).

Se desarrollaron los métodos analíticos por CLAR fase normal y reversa de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina(**5E**) para

cuantificarlo y compararlo con RMN de ^1H el % de conversión y el %*ed* del nuevo centro estereogénico formado.

Se demostró la actividad biocatalítica de las diferentes fuentes vegetales de oxinitrilasas empleando los géneros *Prunus*, *Pouteria* y *Annona*, con el aldehído del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**4D**).

Se mejoraron los %*ed* de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**5E**), con los biocatalizadores de los polvos acetónidos de: mamey, cereza, capulín, durazno y zapote.

El biocatalizador de mamey fue el que presentó los mejores %*ed* a 30°C, de la cianohidrina del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-*O*-isopropilidenadenosina (**5E**), con respecto al obtenido por el control químico.

10. PERSPECTIVAS

En este estudio fue posible determinar que el empleo de agentes biocatalíticos son una herramienta útil en la inducción asimétrica para la obtención de la cianohidrina de la adenosina (**5E**), favoreciendo la obtención de compuestos enriquecidos en uno de sus diastereoisómeros de potencial utilidad en la Industria Farmacéutica. Lo cual confirma que la biocatálisis es una gran alternativa en el campo de la síntesis orgánica.

Estos resultados podrían ser la base para la elaboración de futuros procedimientos biocatalíticos, en donde el conocer las condiciones adecuadas mejorará la inducción asimétrica en el sustrato de estudio y abre nuevas rutas para la obtención de nucleósidos de manera estereoselectiva.

Al obtener el compuesto 2,5-dimetilpirrol del 2,3-*O*-isopropilidenadenosina nos permite visualizar una serie de modificaciones (en la protección del grupo amino) para realizarse a la base nucleosídica, con la finalidad de tener alternativas para la obtención del aldehído de adenosina.

Un elemento a considerar es la oxidación del alcohol del 2,5-dimetilpirrol del 2,3-O-isopropilidenadenosina, donde se plantea buscar otros oxidantes el cual nos permita obtener con un mayor grado de pureza el aldehído.

Otro enfoque a estudiar, sería el ampliar las fuentes de oxinitrilasas (biocatalizador), buscando catalizadores en los que se obtenga mayor o igual %*ed* al obtenido con mamey, también se puede considerar a las oxinitrilasas con conocida capacidad de formar (S)-cianohidrinas, para ver cómo influyen en la relación del %*ed*.

Sin duda la hidrólisis del grupo ciano a la amida, es un tema que puede desarrollarse por catálisis enzimática y esto no se pudo llevar a cabo en este trabajo.

11. REFERENCIAS

1. Jordheim, L.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C., 2013. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 12, 447-464.
2. Eltzschig, H., 2009. Adenosine: An old drug newly discovered. *Anesthesiology*, 111, 904-915.
3. Casanova, E.; Hernández, A.I.; Prieto, E.M.; Liekens, S.; Camarasa, M.J.; Balzarini, J.; Pérez, M.J., 2006. 5'-O-tritylinosine and analogues as allosteric inhibitors of human thymidine phosphorylase. *J Med Chem*, 49, 5562-5570.
4. Ribera, E.; Tuset, M.; Martín, M.; Del Cacho, E., 2011. Características de los fármacos antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 25(5), 362-391.
5. Martínez, J. M.; Lázaro, A.; Samper, A., 2012. Informe técnico de eficacia en terapia antirretroviral 2012. *SESCAM*, 1-46.
6. Izazola, J. A.; Sucilla, H. & García, C., 2012. VIH/SIDA EN MÉXICO 2012. Secretaría de Salud, 1-47.
7. Clercq, E.; Field, H., 2006. Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *Brit J Pharmacol*, 147, 1-11.
8. Gandhi, V.; Kantarjian, H.; Faderl, S.; Bonate, P.; Du, M.; Ayres, M.; Beth, M.; Keating, M.; Plunkett, W., 2013. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of plasma clofarabine and cellular clofarabine triphosphate in patients with acute leukemias. *Clin Cancer Res*, 9, 6335-6342.
9. Jacobson, K.; Gao, Z., 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 5(3), 247-264.
10. Long, M.C.; Shaddix, S. C.; Moukha-Chafiq, O.; Maddy, J. A.; Nagy, L.; Parker, B., 2008. Structure–activity relationship for adenosine kinase from *Mycobacterium tuberculosis* II. Modifications to the ribofuranosyl moiety. *Biochem Pharmacol*, 75, 1588-1600.
11. Gotor, V., 2002. Lipases and (*R*)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. *J Biotechnol*, 96, 35-42.
12. Sánchez, J. M.; Sinisterra, J. V., 2007. Biocatálisis aplicada a la química farmacéutica. *Acad. Nac. Farm.*, 73(4), 1199-1236.
13. Panke, S.; Wubbolts, M., 2005. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. *Bioorgchem / Biocatalbiotransfor*, 9, 188-194.
14. Larry, R., 2011. Veterinary physiological chemistry. Cap 13 Nucleotides. 3 ed. San Diego, USA: Academic Press of Elsevier. 74-79
15. Luque, J.; Herráez, A., 2001. Biología Molecular e ingeniería conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. España: Harcourt. 33-53.
16. Fontana, L.; Sáen, M.; Santisteban, R.; Gil Hernández, A., 2006. Compuestos nitrogenados de interés en nutrición clínica. *Nut. Hosp.*, 21, 15-29.
17. Herráez, Á., 2009. Texto ilustrado de Biología molecular e ingeniería genética conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. 2 ed. España: Foletra S.A34-47.

18. Drury, A. N.; Szent-Gyorgyi, A., 1929. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *The J Physiol*, 68(3), 213–237.
19. Layland, J.; Carrick, D.; Lee, M.; Oklroyl, K.; Berry, C., 2014. Adenosine physiology, pharmacology, and clinical applications. *Cardiovascular Interventions* 7(6), 581-591.
20. Dekecrétaz, E., 2006. Supraventricular tachycardia. *New Engl J Med*, 354, 1039-1051.
21. Fredholm, B., 2007. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ*, 14, 1315-1325.
22. Patel, N.; Wu, W.; Mishara, P.K.; Chen, F.; Millman, A.; Csóka, B.; Koscsó, B.; Eltzschig, H.; Haskó, G.; Gause, W., 2014. A2B Adenosine receptor induces protective antihelminth type 2 immune responses. *Cell Host & Microbe*, 15, 339-350.
23. Eltzschig, H.K.; Ibla, J.C.; Furuta, G.T.; Leonard, M.O.; Jacobson, K. A.; Enjyoji, K.; Colgan, S.P., 2003. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: Role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med*, 198, 783-796.
24. Ruiz, M. A., 2001. Desensibilización de la vía de transducción de la adenosina en cerebro: estudio in vivo e in vitro. *Tesis Doctoral*, en la Universidad de Castilla, España, 4-20.
25. Spicuzza, L.; Di Maria, G.; Polosa, R., 2006. Adenosine in the airways: Implications and applications. *Eur J Pharmacol*, 533, 77-88.
26. Kilpatrick, E.; Narayan, P.; Mentzer, R.; Lasley, R., 2002. Cardiac myocyte adenosine A2a receptor activation fails to alter cAMP or contractility: Role of receptor localization. *Physiol HearCircPhysio*, 282, 1035-1040.
27. Sato, A.; Terata, K.; Miura H.; Toyama, K.; Loberiza, F.R.; Hatoum, O.A.; Saito, T.; Sakuma, I.; Gutterman, D.D., 2005. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease *Physiol HearCircPhysio*, 288(4), 1633-1640.
28. Behan, W.; Stone, T., 2002. Enhanced neuronal damage by co-administration of quinolinic acid and free radicals, and protection by adenosine A2A receptor antagonists. *Brit J Pharmacol*, 135, 1435-1442.
29. Blum, D.; Gall, D.; Galas, M.; Alcantara, P.; Bantubungi, K.; Shiffmann, S., 2002. The adenosine A1 receptor agonist adenosine amine congener exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions and motor impairments in the 3-nitropropionic acid model of neurotoxicity. *J Neurosci*, 22, 9122-9133.
30. Bookser, B.; Raffaele, N., 2008. High-throughput synthesis of HepDirectprodrugs of nucleoside monophosphates. *J Comb Chem*, 10, 567-572.
31. Talarico, L., 2002. Actividad antiherpética in vitro de *brassinosteroides* obtenidos por síntesis química. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Farmacia Universidad de Belgrano. Argentina.

32. Jacobson, K.; Van Galen, P. J. M.; Williams, M., 1992. Adenosine receptors: pharmacology, structure–activity relationships, and therapeutic potential. *J Med Chem*, 7, 407-422.
33. Nell, P. G.; Albrecht, B., 2009. The Adenosine A1 receptor and its ligands. *Progr Med Chem*, 47, 163-201.
34. Samsel, M.; Dzierzbicka, K., 2011. Therapeutic potential of adenosine analogues and conjugates. *PharmacolRep*, 63, 601-617
35. Gandhi, V.; Ayres, M.; Halgren, R. G.; Krett, N.L.; Newman, R.; Rosen, S., 2001. 8-Chloro-cAMP and 8-chloro-adenosine act by the same mechanism in multiple myeloma cells. *Cancer Res*, 61, 5474-6479.
36. Krett, N.L.; Davies, K.; Ayres, M.; Ma, C.; Nabhan, C.; Gandhi, V.; Rosen, S., 2004. 8-Amino-adenosine is a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*, 3, 1411-1420.
37. Stellrecht, C. M.; Ayres, M.; Arya, R.; Gandhi, V., 2009. A unique RNA-directed nucleoside analog is cytotoxic to breast cancer cells and depletes cyclin E levels. *Breast Cancer Res*, 121, 355–364.
38. Yang, S-Y.; Jia, X.; Feng, L. Y.; Li, SY.; An, GS.; Ni, JH.; Jia, HT., 2009. Inhibition of topoisomerase II by 8-chloro-adenosine triphosphate induces DNA double-stranded breaks in 8-chloro-adenosine-exposed human myelocytic leukemia K562 cells. *BiochemPharmacol*, 77, 433-443.
39. Rubnitz, J E.; Razzouk, B.; Srivastava, D K.; Pui, C H.; Ribeiro, R.; Santana, V., 2004. Phase II trial of cladribine and cytarabine in relapsed or refractory myeloid malignancies. *Leuk Res*, 28, 349-352
40. Lukenbill, J.; Kalaycio, M., 2013. Fludarabine: A review of the clear benefits and potential harms. *Leuk Res*, 37, 986-994.
41. Luna, H., 2004. Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos. *Rev.Soc.Quím.Méx.*, 48, 211-219.
42. Leresche, J. E.; Meyer, H. P., 2006. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Org. Process Res Dev*, 10, 572-580.
43. Velasco, R.; John, F.; Montenegro, M.; Diego, L.; Vélez, S.; García, P.; Durango, D., 2009. Biotransformación de compuestos aromáticos sustituidos mediante hongos filamentosos fitopatógenos de los géneros *Botryodiplodia* y *Colletotrichum*. *Rev.Soc. Quím. Per.*, 75, 94-111.
44. Arroyo, M.; Acebal, C.; de la Mata, I., 2014. Biocatálisis y Biotecnología. *ARBOR, Ciencia, Pensamiento y Cultura*, 190, 1-11.
45. Rubin, S. B.; Zhao, H., 2006. Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution. *CombChem High T Scr*, 9, 247-257.
46. Moore, J. C.; Bornscheuer, U. T., 2014. Editorial overview: Biocatalysis and biotransformation: Riding the third wave of biocatalysis. *Curr Opin Chem Bio*, 19, 5-6.
47. Sutton, P. W., 2012. Practical methods for biocatalysis and biotransformations 2. UK: John Whittall. 117-125.

48. Patel, R. N., 2008. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *CoordinChem Rev*, 252, 659-701.
49. Davis, B. G.; Boyer, V., 2001. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. *Roy SocChy*, 18, 618-640.
50. Pollard, D. J.; Woodley, J. M., 2007. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol*, 25(2), 66-73.
51. Mahmoudian, M., 2014. Special feature biocatalysis: The green factor. *Org. Process ResDev* 18 (6), 751–751.
52. Silverman, R. B.; Holladay, M. W., 2014. Chapter4-Enzymes. The organic chemistry of drug design and drug action, 3, 165-205.
53. Lehninger, A.; Cox, M.; Neldon, D., 2009. Principios de Bioquímica. 5 ed. México: Omega, Capítulo 8. 190-210.
54. Pereto, J.; Sendra, R.; Pamblanco, M.; Baño, C., 2007. Fundamentos de bioquímica. 1 ed, Publicaciones Universidad Valencia, 97-129.
55. Velázquez, O., 2011. Estudio de la actividad biocatalítica en plantas. *Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica*. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 7-36
56. Sharma, M.; Nand, N.; Chand, T., 2005. Hydroxynitrilelyases: At the interface of biology and chemistry. *Enzyme Microb Tech*, 37, 279-294.
57. Fechter, M. H.; Griengl, H., 2004. Hydroxynitrilelyases: Biological sources and application as biocatalysts. *Food Technol Biotech*, 42(4), 287-294.
58. Holt, J.; Hanefeld, U., 2009. Enantioselective enzyme-catalysed synthesis of cyanohydrins. *Curr Org Synth*, 6, 15-37.
59. Solís, A.; Luna, H.; Pérez, H.I.; Manjarrez, N.; Sánchez, R., 1998. Preparación de (*R*)-cianohidrinas usando harinas de semillas de capulín y mamey como biocatalizadores. *Rev. Soc. Chem. Mex.*, 42(5), 214-216.
60. Nanda, S.; Kato, Y.; Asano, Y., 2005. A new (*R*)-hydroxynitrilelyase from *Prunus mume*: asymmetric synthesis of cyanohydrins. *Tetrahedron*, 61, 10908–10916.
61. Nixey, T.; Hulme, C., 2002. Rapid generation of cis-constrained norstatine analogs using a TMSN₃-modified Passerini MCC/N-capping strategy. *Tetrahedron Lett*, 43, 6833–6835.
62. Vázquez-Luna, A.; Pérez-Flores, L.; Díaz-Sobac, R., 2007. Biomoléculas con actividad insecticida: una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Rev. Soc. Mex de Nut Tec Alim.*, 5(4), 306-313.
63. McMurry, J., 2012. Química Orgánica. Cengage Learning Editores, S.A de C.V. Octava edición. México, 300-303, 570-574.
64. Camps, P.; Vázquez, S.; Escolano, C., 2010. Química Farmacéutica. Tomo 1. Textos docentes. Barcelona. 72-78.
65. Solís, A.; Luna, H.; Pérez, H. I.; Manjarrez, N.; Sánchez, R.; Albores-Velasco, M.; Castillo, R., 1998. New sources of *R*-oxynitrilase: capulín (*Prunus capuli*) and mamey (*Mammea americana*). *Biotechnol Lett*, 20(12), 1183-1185.

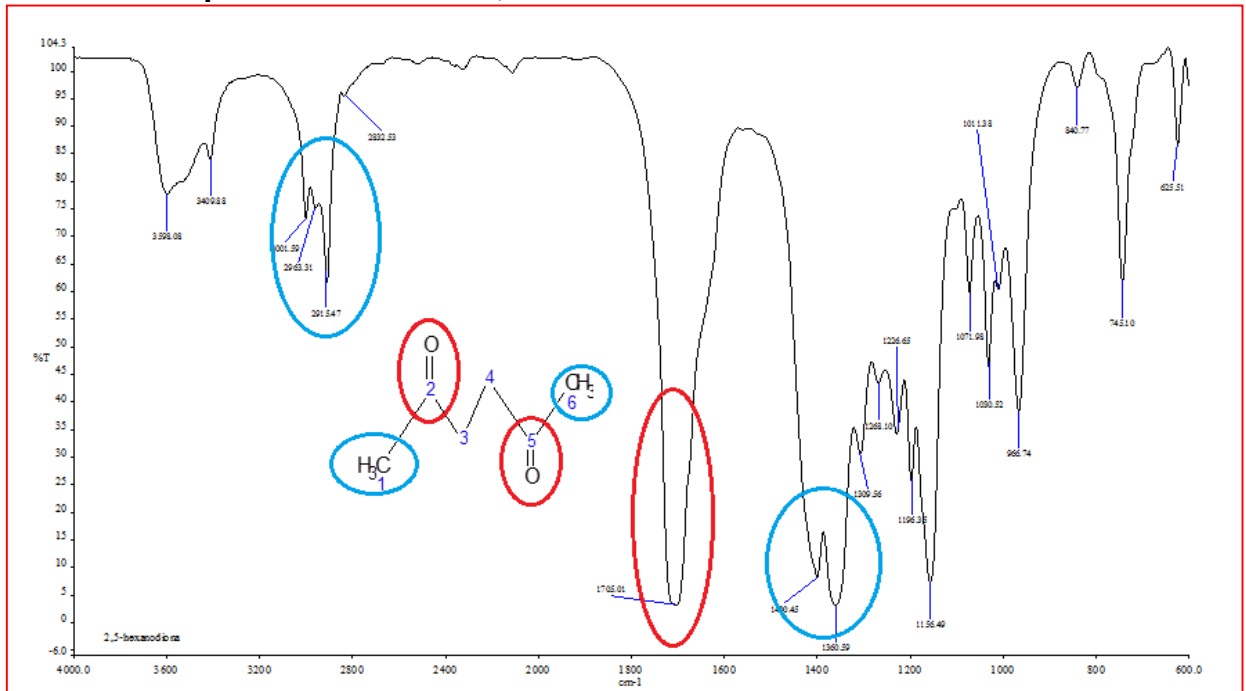
66. Solís, A.; Luna, H.; Pérez, H. I.; Manjarrez, N., 2003. Evaluation of guanábana (*Annonamuricata*) seed meal as a source of (S)-oxynitrilase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14, 2351–2353.
67. Townsend, A. P.; Roth, S.; Williams, L.; Stylianou, E.; Thomas, N. R., 2009. New S-adenosyl-L-methionine analogues: synthesis and reactivity studies. *Org Lett*, 11(14), 2976-2979.
68. Nowak, I.; Robins, M. J., 2003. Protection of the amino group of adenosine and guanosine derivatives by elaboration into a 2,5-Dimethylpyrrole Moiety. *Org Lett*, 5(18), 3345-3348.
69. Smaliy, R. V.; Chaykovskaya, A. A.; Yurchenko, A. A.; Lakhtadyr, A. I.; Yurchenko, S. A.; Shtil, N. A.; Kostuk, A. N., 2011. Simple method for the synthesis of 3-(pyrrolidin-1-yl)piperidine. *ChemHeterocycleCompd*, 47(9), 1427-1429.
70. Haidoune, M.;Mornet, R., 1994. Synthesis of 6-(pyrrol-1-yl)purine and of some of its 9-glycosides. *J Heterocyclic Chem*, 31(6), 1461-1464.
71. Frigerio, M.;Santagostino, M.;Sputore, S., 1999. A User-friendly entry to 2-iodoxybenzoic acid (IBX). *J. Org Chem*, 64, 4537-4538.
72. Satam, V.;Harad, A.;Rajule, R.; Pati, H., 2010. 2-Iodoxybenzoic acid (IBX): an efficient hypervalent iodine reagent. *Tetrahedron*, 66, 7659-7706.
73. Valencia, O., 2012. Obtención de derivados de nucleósidos de inosina por biocatálisis. *Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas*. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
74. Martínez, M., 2012. Preparación de nucleósidos de uridina por biocatálisis. *Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas*. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
75. Nicolaou, K. C.;Mathison, C. J. N.;Montagnon, T., 2004. O-Iodoxybenzoic acid (ibx) as a viable reagent in the manipulation of nitrogen- and sulfur-containing substrates: scope, generality, and mechanism of ibx-mediated amine oxidations and dithianedeprotections. *J Am ChemSoc*, 126, 5192-5201.
76. More, J. D.; Finney, N. S., 2002. A Simple and advantageous protocol o-iodoxybenzoic acid (IBX). *Org Lett*, 4(17), 3001-3003.
77. Wang, J-Qi.; Christopher, A.; Li, J.; G. Bott, S.; Wang, P. G., 1998. Thermophilic esterases/lipases as an effective tool for the resolution of nucleoside diastereoisomers: Convenient one-pot synthesis of α -L-taluronamide and α -D-alluronamide nucleosides. *J. Org Chem*, 63, 4850-4853.
78. Katritzky A. R.; Boguslaw P.; Laszlo Ur., 1989. Efficient conversion of nitriles to amides with basic hydrogen peroxide in dimethyl sulfoxide. *Synthesis*, 12, 949-950.
79. Richard, G.; Fechter, M. H.; Griengl, H., 2004. The first hydroxynitrilelyasecatalysed cyanohydrin formation in ionic liquids. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15, 2959–2963.
80. Brunel, J.-M.; Holmes, I. P., 2004. Chemically catalyzed asymmetric cyanohydrin syntheses. *AngewandteChemie*, 43, 2752 – 2778.

81. Roos, J.;Effenberger, F., 1999. Hydroxynitrilelyase catalyzed enantioselective HCN addition to *O*-protected α -hydroxyaldehydes. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, 2817–2828.
82. Griengl, H.; Schwab, H.;Fechter, M., 2000. The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. *Trends Biotechnol*, 18(6), 252–256.
83. Quian, Z.; Wan, J.; Zhang, Q.; Li, S., 2008. Simultaneous determination of nucleobases, nucleosides and saponins in Panaxnotoginseng using multiple columns high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed*, 48, 1361-1367.
84. Gao, J.L.; Leung, Kelvin, S.Y.; Wang, Y.T.; Lai, C.M.; Li, S.P.; Hu, L.F.; Lu, G.H.; Jiang, Z.H.; Yu, Z.L., 2007. Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganoderma* spp. by HPLC–DAD-MS. *J Pharm Biomed*, 44, 807-811.
85. Brown, S. D.; White, C.; Chu, C. K.; Bartlett, M. G., 2002. Determination of acyclovir in maternal plasma, amniotic fluid, fetal and placental tissues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 772, 327–334.
86. Ranogajec, A.;Beluhan, S.;Smit, Z., 2010. Analysis of nucleosides and monophosphate nucleotides from mushrooms with reversed phase HPLC. *J Sep Sci*, 33, 1024–1033.
87. Hua, J.; Huang, K.I., 2010. A reversed phase HPLC method for the analysis of nucleotides to determine 5'-pde enzyme activity. *Bull ChemSocEthiop*, 24(2),167-174.
88. Xue, F. X.; Zhou, H.J.; Wu, L.M.; Fu, L. H.; Zhao,J., 2009. HPLC determination of adenosine in royal jelly. *Food Chem*,115, 715-719.
89. Jandera, P., 2007. Selection of separation conditions for HPLC and HPLC/MS of aromatic sulphonic acids and acid azo dyes. *J LiqChromatogr R T*, 30, 2349–2367.
90. Ikegami, T.; Tomomatsu, K.; Takubo, H.; Horie, K.; Tanaka, N., 2008. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A*, 1184, 474-503.
91. Corinne, R.; Michaud, M.; Ravel, A.; Grosset, C., 2004. Streptavidin chiral stationary phase for the separation of adenosine enantiomers. *J Chromatogr A*, 1036, 155–160.
92. Goossens, J.F.; Roux, S.; D. Egronb, C.; Perigaudb, J.P.; Bontea, C.; VaccherA.;Foulona, C., 2008. Separation of nucleoside phosphoramidatediastereoisomers by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr B*, 875, 288-295.
93. Ting, R.;Lermer, L.; Perrin, D. M., 2004. Triggering DNA enzymes with light: A photoactive c8 thioether-linked adenosine. *J Am ChemSoc*, 126, 12720-12721.
94. Ah-Kow, C.; Terrier, F.; Pouet, M.J.;Simonnin, M.P., 1980. Meisenheimerspiropicryl complex of adenosine. An example of a stereoselectivedioxolane ring opening in an acidic medium.*J Am ChemSoc*, 45, 4399-4404.
95. Enomoto, K.; Nagasaki, T.; Yamauchi, A.; Onoda, J.; Sakai, K.; Yoshida, T.; Maekawa, K.; Kinoshita, Y.; Nishino, I.; Kikuoka, S.; Fukunaga, T.; Kawamoto, K.; Numata, Y.; Takemoto, H.; Nagata, K., 2006. Development of high-throughput

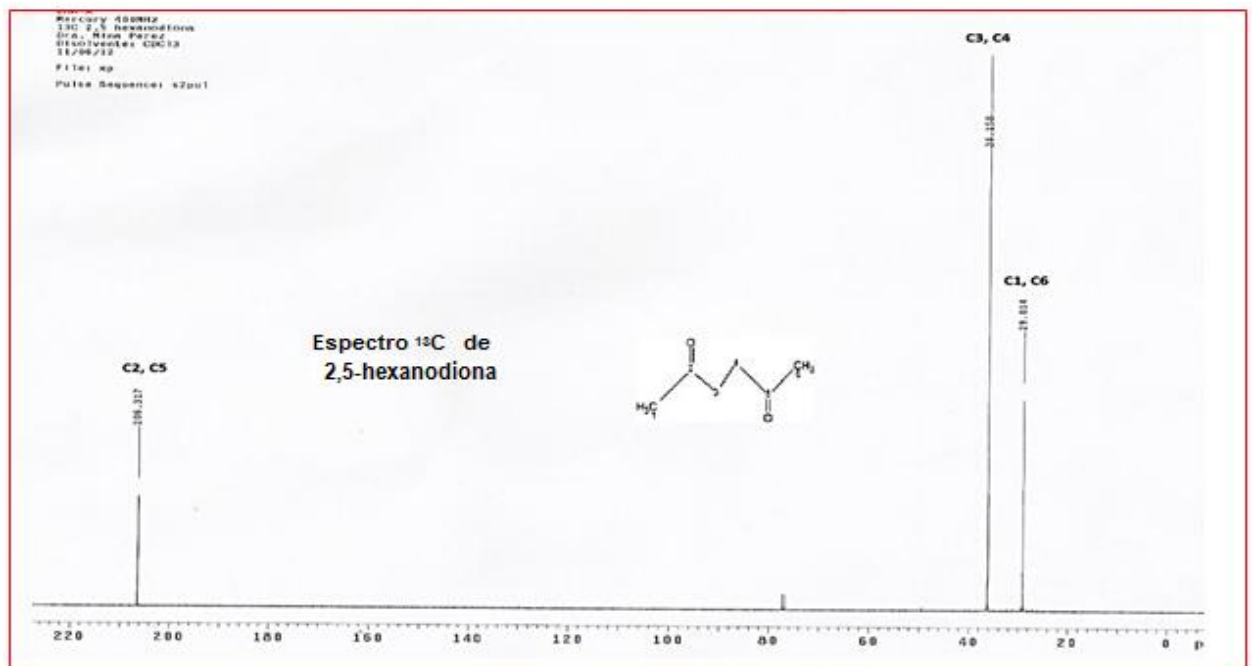
- spermidine synthase activity assay using homogeneous time-resolved fluorescence. *Anal Biochem*, 351, 229-240.
96. Debnath, J.; Dasgupta, S.; Pathak, T., 2010. Comparative inhibitory activity of 3'- and 5'-functionalized nucleosides on ribonuclease A. *Bioorgan Med Chem*, 18, 8257-8263.
 97. Saladino, R.; Neri, V.; Crestini, C.; Tagliatesta, P., 2004. Oxidation of adenine and adenosine derivatives by dimethyldioxirane (DMDO) using halogenated metalloporphyrins as catalysts. *J Mol Catal A- Chem*, 214, 219-225.
 98. Clark, J. H.; Cork, D. G., 1983. The synthesis of 1,4-diketones via fluoride-catalysed Michael addition and supported-permanganate-promoted Nef transformation. *J Am Chem Soc*, 1, 2253-2258.
 99. Nowak, I.; Cannon, J. F.; Robins, M. J., 2007. Addition of difluorocarbene to 3',4'-unsaturated nucleosides: synthesis of 2'-deoxy analogues with a 2-oxabicyclo[3.1.0]hexane framework. *J Am Chem Soc*, 72, 532-537.
 100. Fallis, A. G.; Tessier, P. E., 2003. 2-Iodoxybenzoic acid (IBX). *e-EROS*, 1-5.
 101. Jones, R. A., 1990. The chemistry of heterocyclic compounds. *John Wiley & Sons*, 500-520.
 102. Evan B.; Lewis I. K., 1963. Recent advances in the chemistry of pyrrole. *Chem Rev*, 63 (5), 511-556.
 103. Nkazono, M.; Uesaki, A.; Zaitsev, K., 2006. The chemiluminescence mechanism of 3,4-bis(3-indolyl)-1H-pyrrole-2,5-dione, and the characteristics of chemiluminescence developed in the reaction with CH₃CN-H₂O₂-NaOH. *Talanta*, 70, 128-132.
 104. Luna, H.; Manjarrez, N.; Pérez, H. I.; Solís, A., 1996. Nuevas fuentes potenciales de enzimas oxinitrilasas. *Rev. Soc. Quím. Mex.*, 41(3), 111-114.
 105. Solís, A.; Luna, H.; Manjarrez, N.; Pérez, H. I., 2004. Study on the (*R*)-oxynitrilase activity of *Pouteriasapota*. *Tetrahedron*, 60, 10427-10431.
 106. Hernández, L.; Luna, H.; Solís, A.; Vázquez, A., 2006. Application of crude preparations of leaves from food plants for the formation of cyanohydrins with high enantiomeric excesses. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17, 2813-2816.

12. ANEXOS

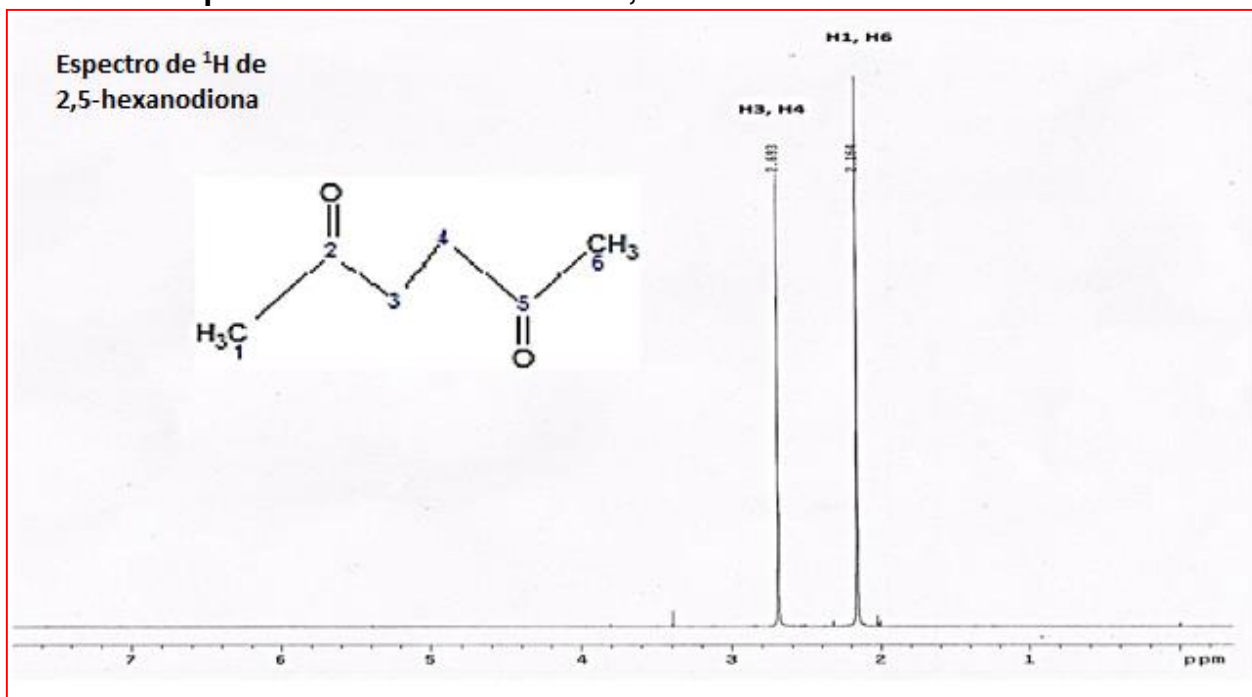
Anexo 1a. Espectro de IR de la 2,5-hexanodiona



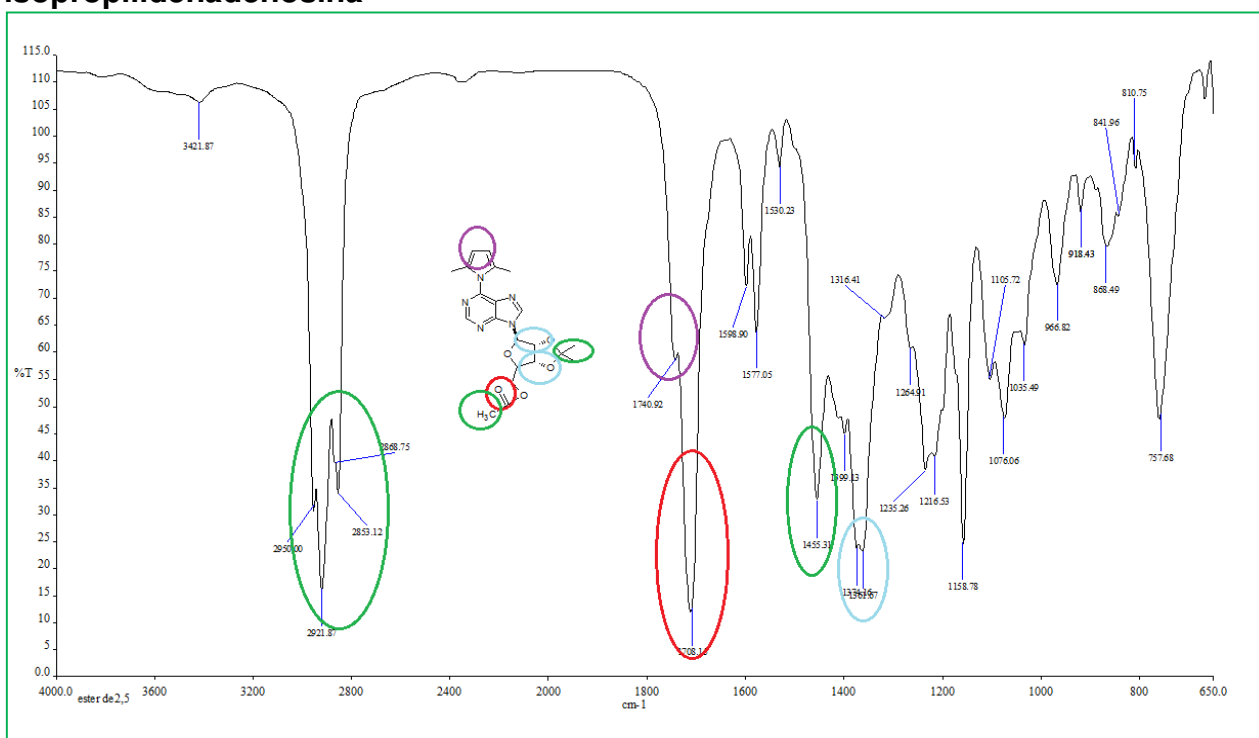
Anexo 2a. Espectro de RMN de ¹³C de la 2,5-hexanodiona



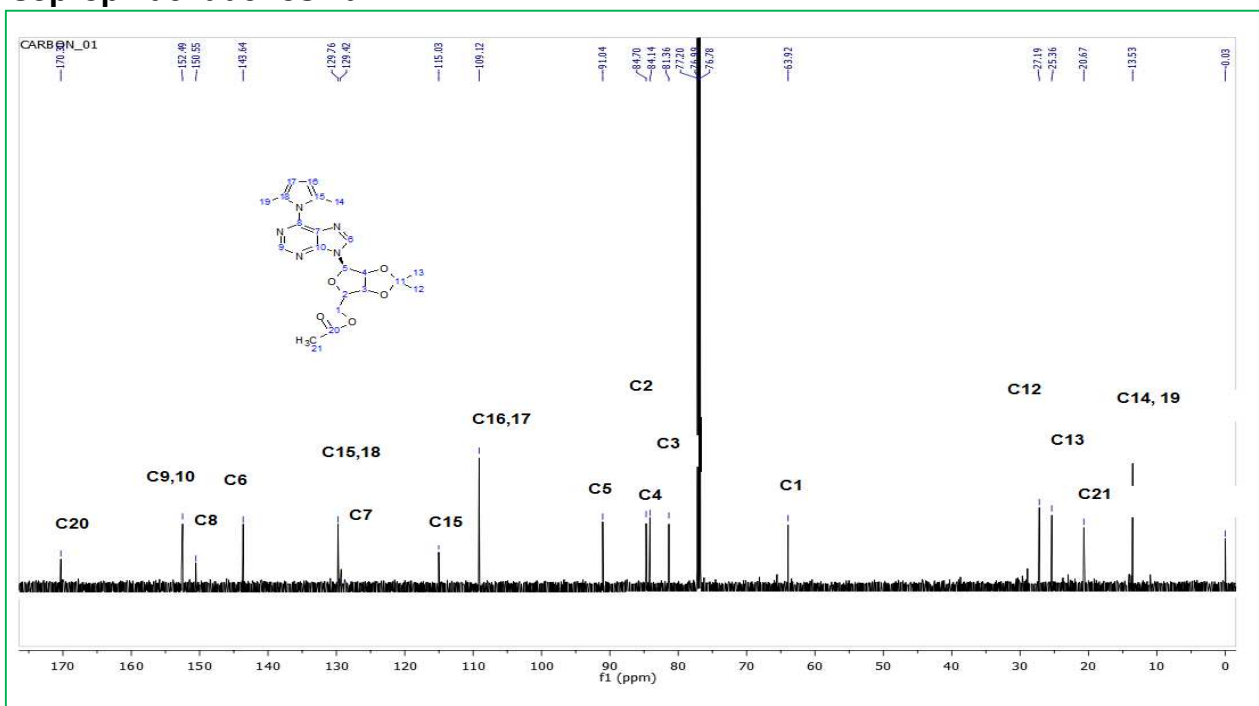
Anexo 3a. Espectro de RMN de ^1H de la 2,5-hexanodiona



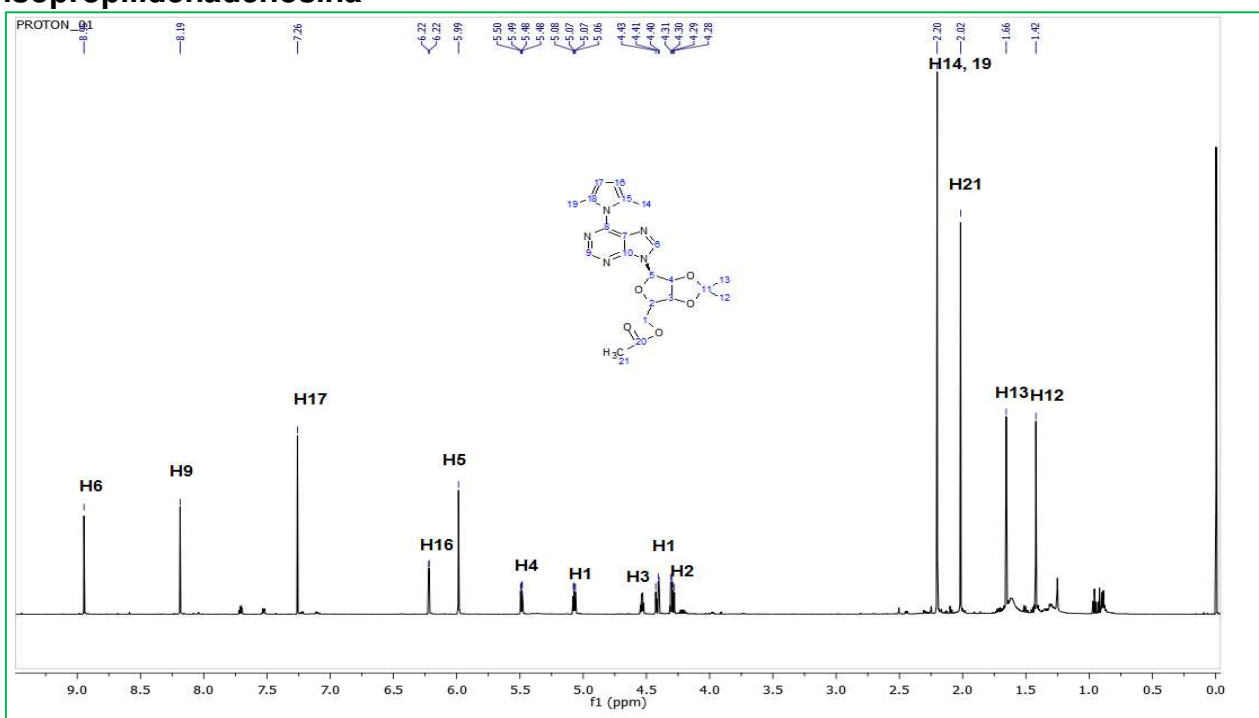
Anexo 1b. Espectro de IR del éster del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina



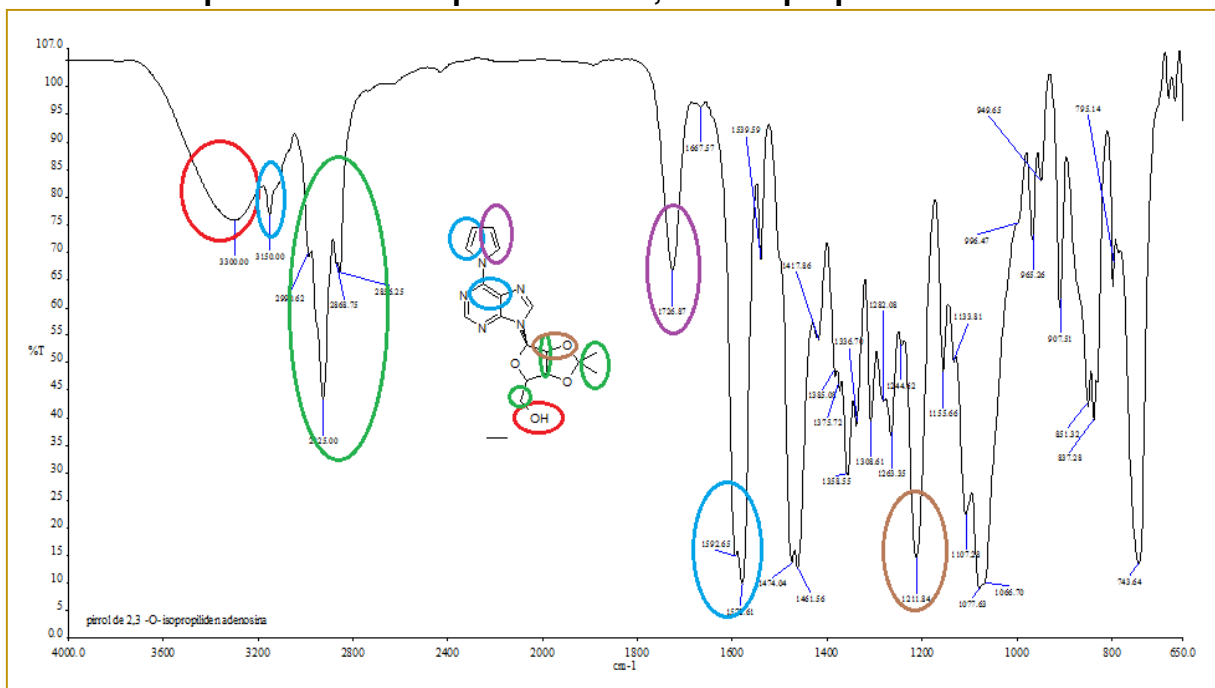
Anexo 2b. Espectro de RMN de ^{13}C del éster del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina



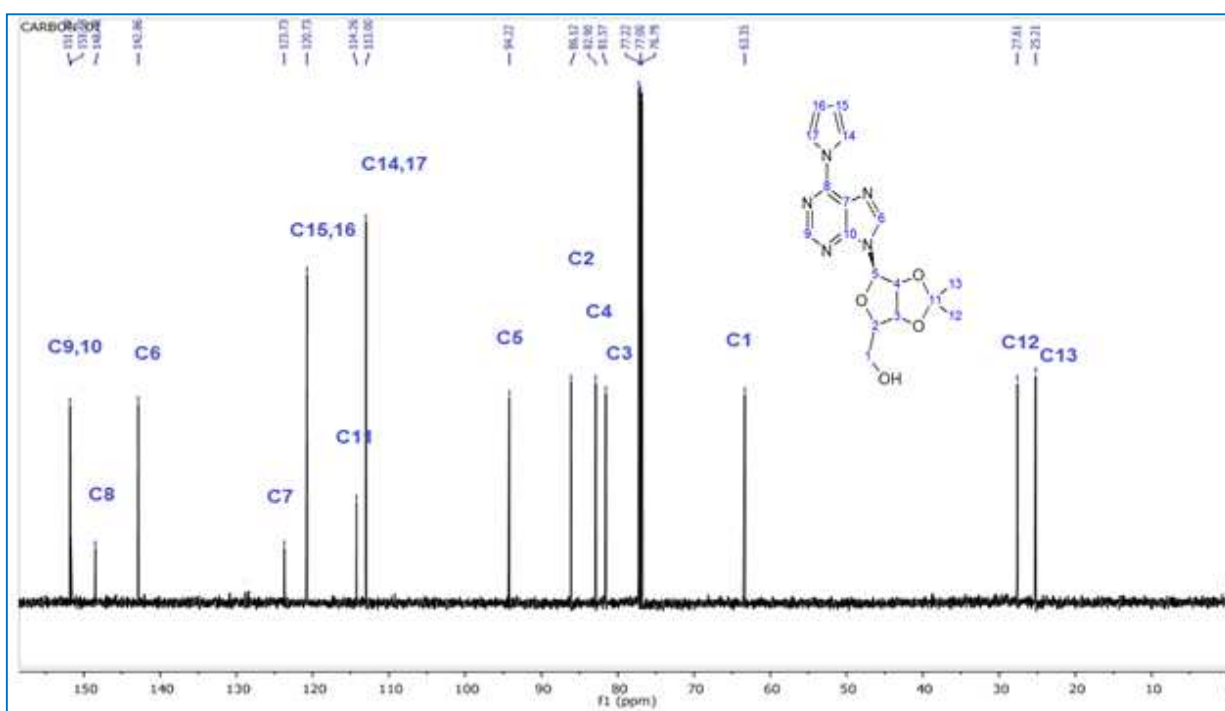
Anexo 3b. Espectro de RMN de ^1H del éster del 2,5-dimetilpirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina



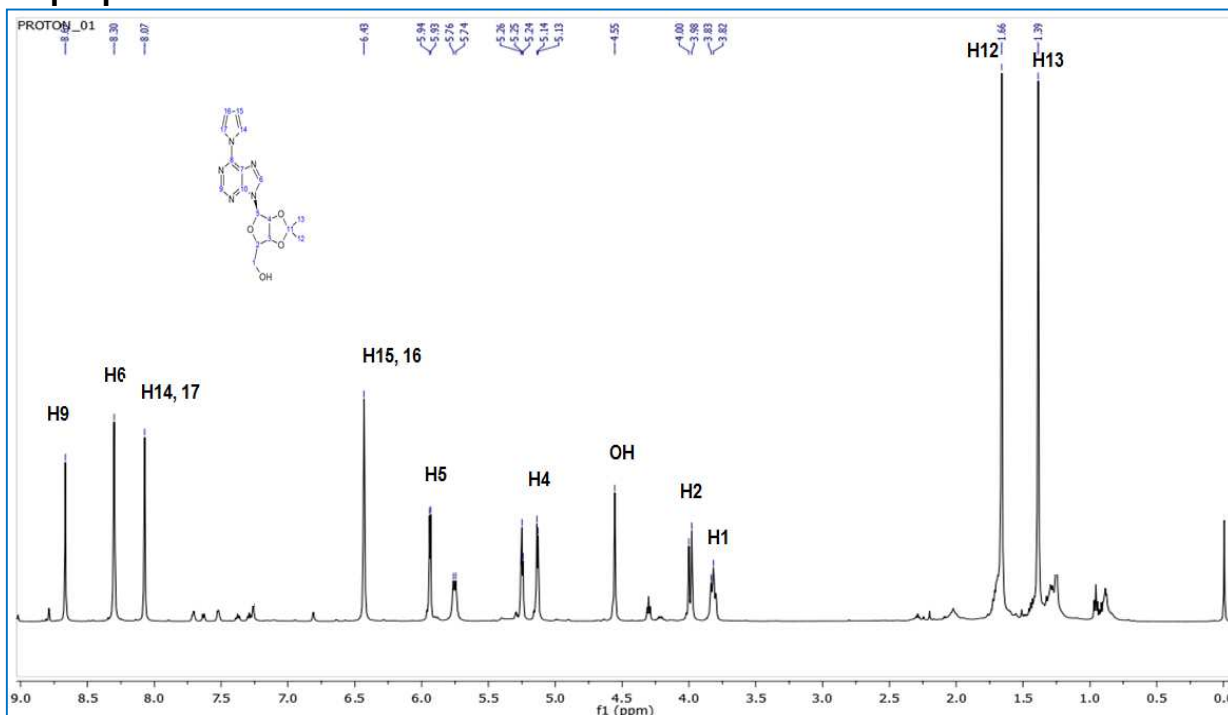
Anexo 1c. Espectro de IR del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina



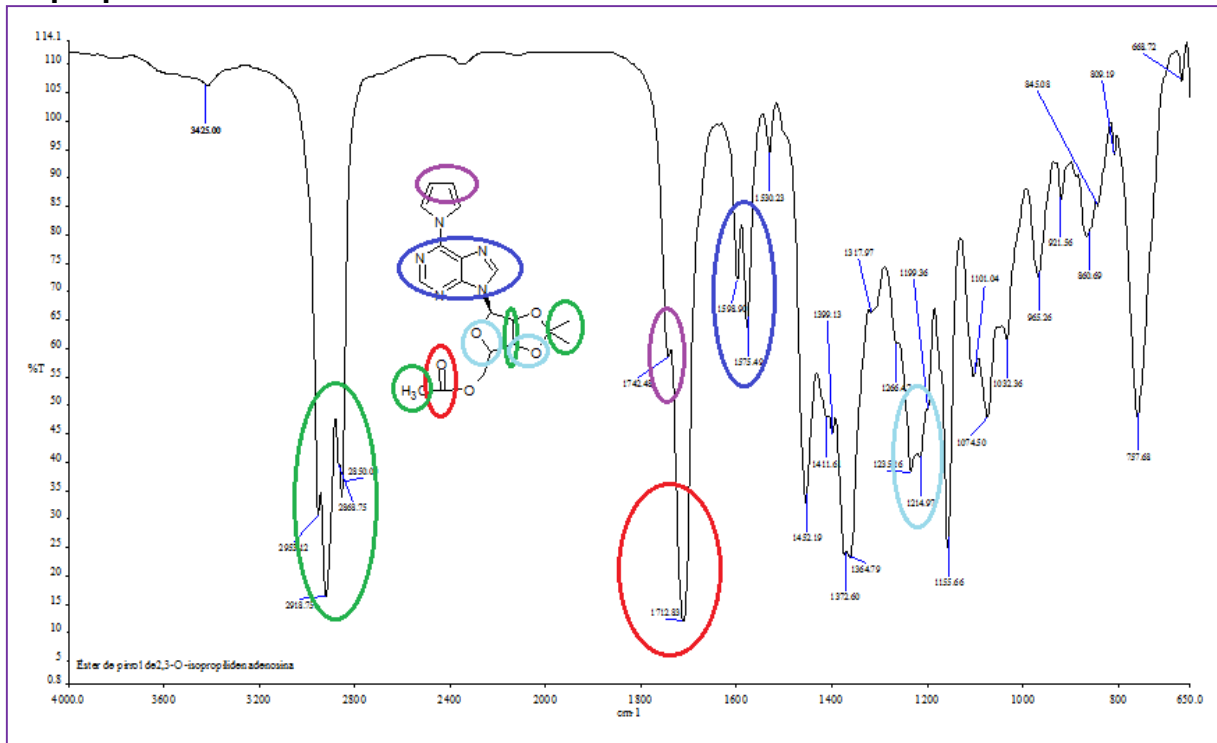
Anexo 2c. Espectro de RMN de ¹³C del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina



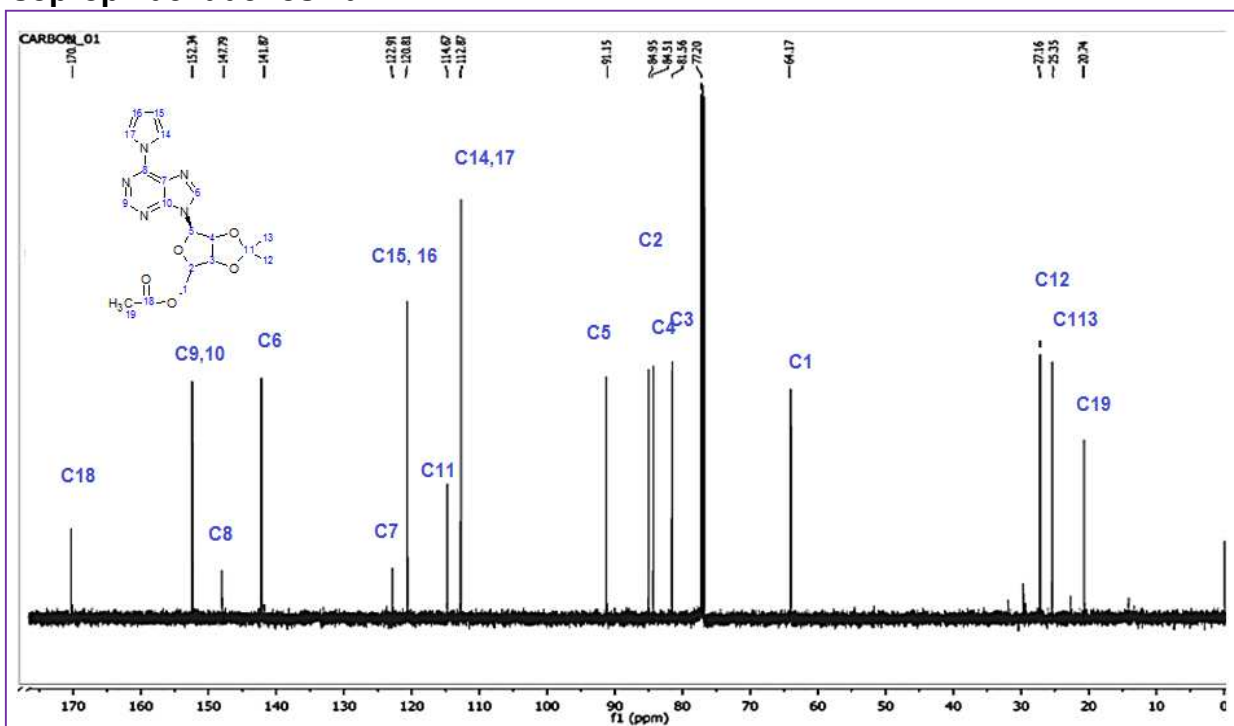
Anexo 3c. Espectro de RMN de ^1H del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina



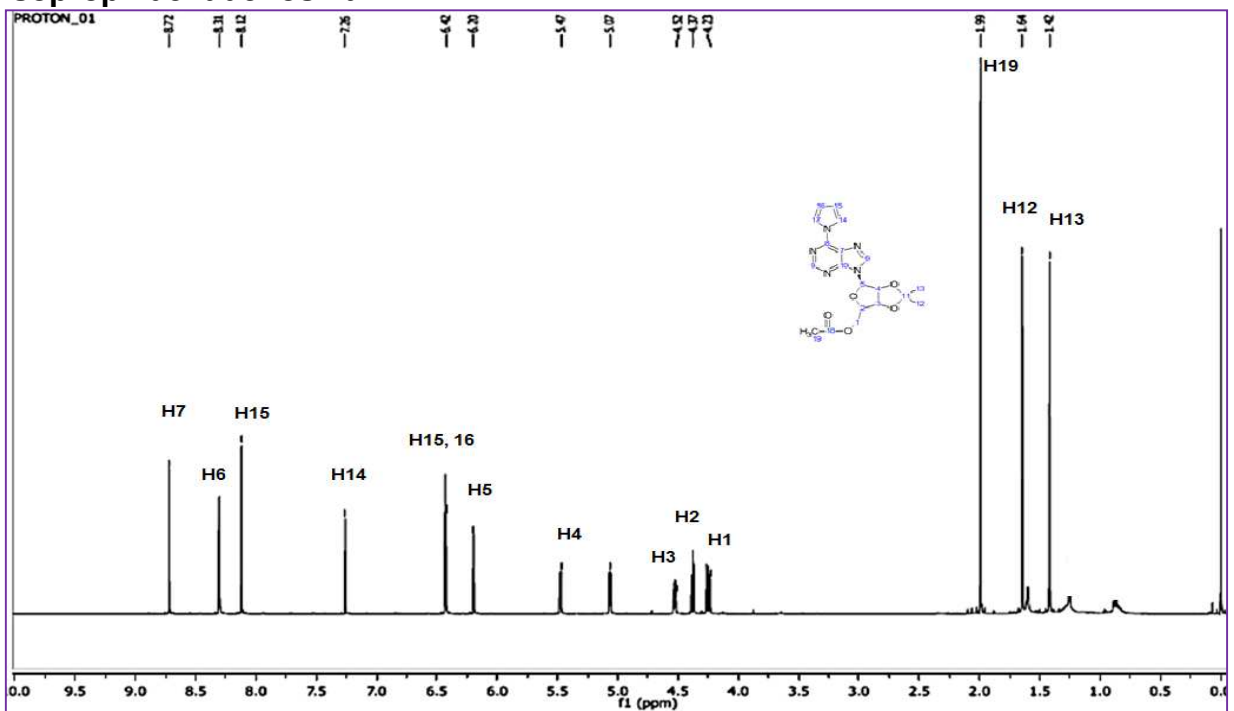
Anexo 1d. Espectro de IR del éster del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenadenosina



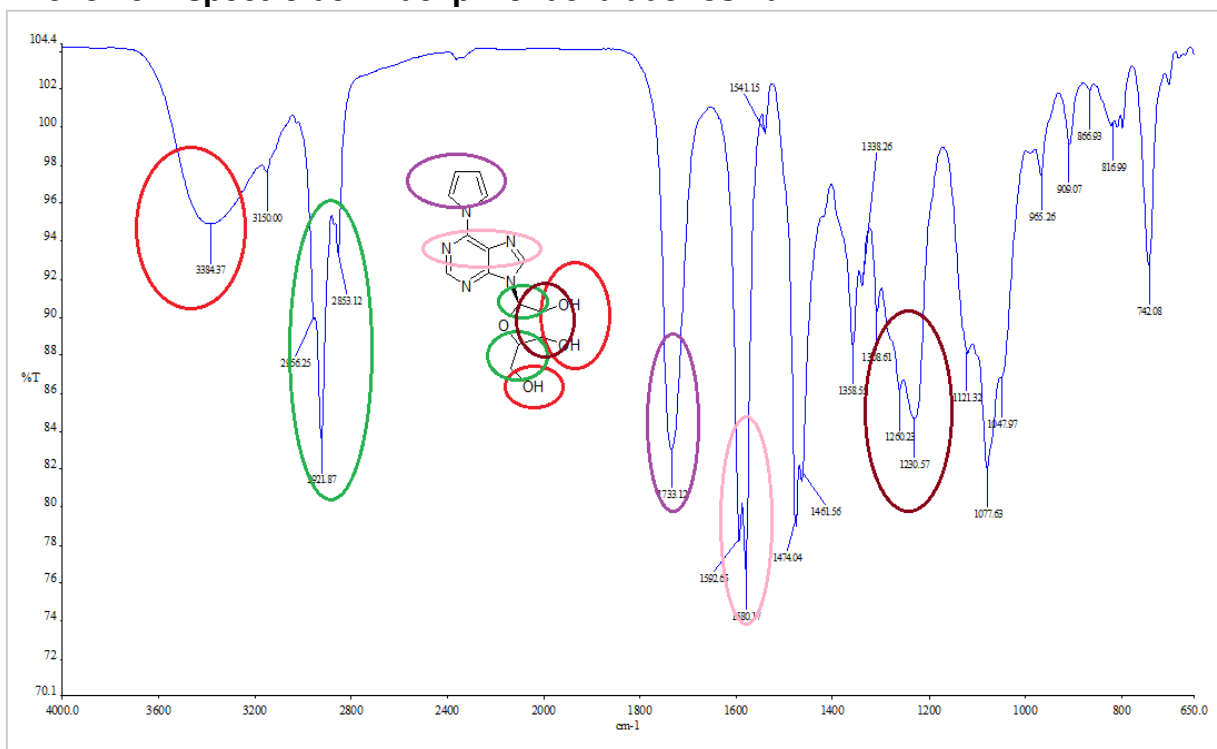
Anexo 2d. Espectro de RMN de ^{13}C del éster del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenaadenosina



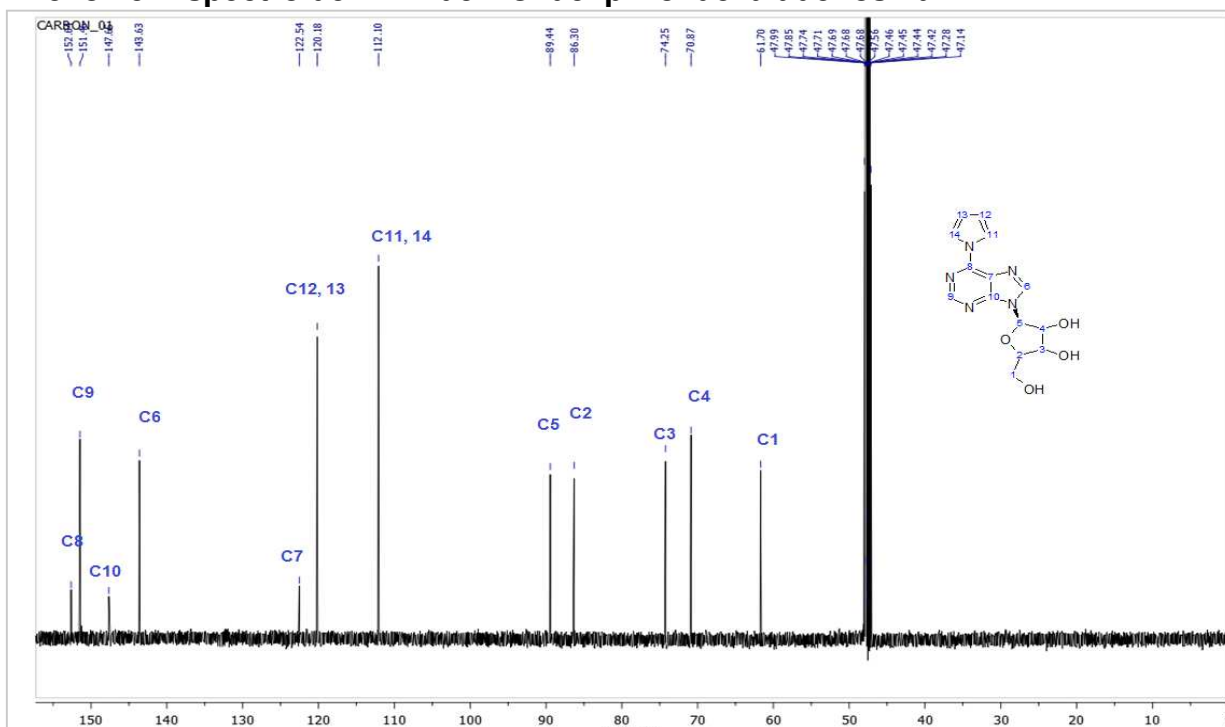
Anexo 3d. Espectro de RMN de ^1H del éster del pirrol de la 2',3'-O-isopropilidenaadenosina



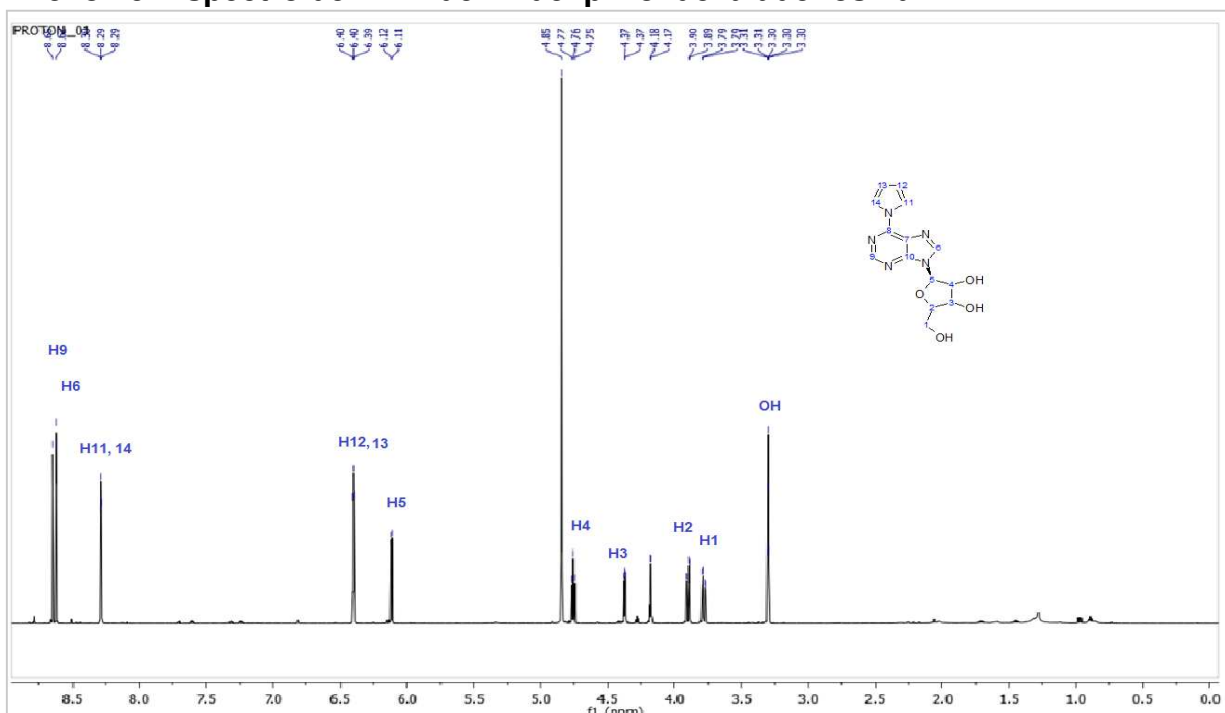
Anexo 1e. Espectro de IR del pirrol de la adenosina



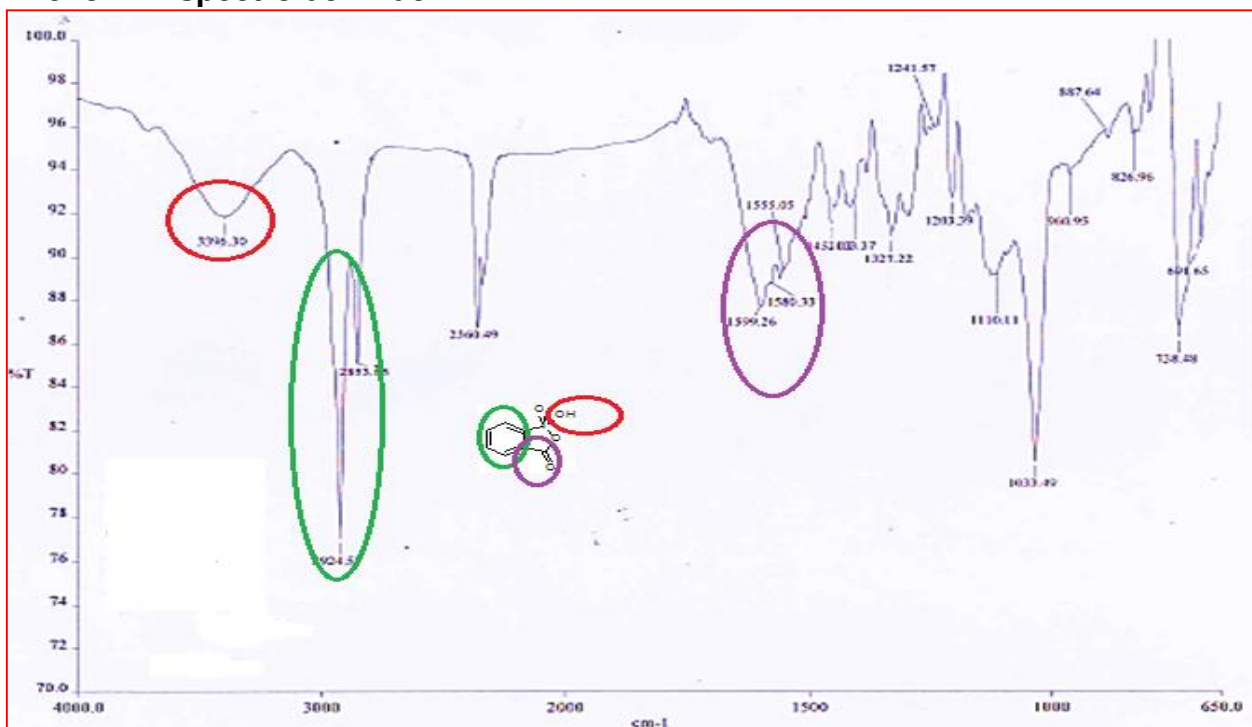
Anexo 2e. Espectro de RMN de ¹³C del pirrol de la adenosina



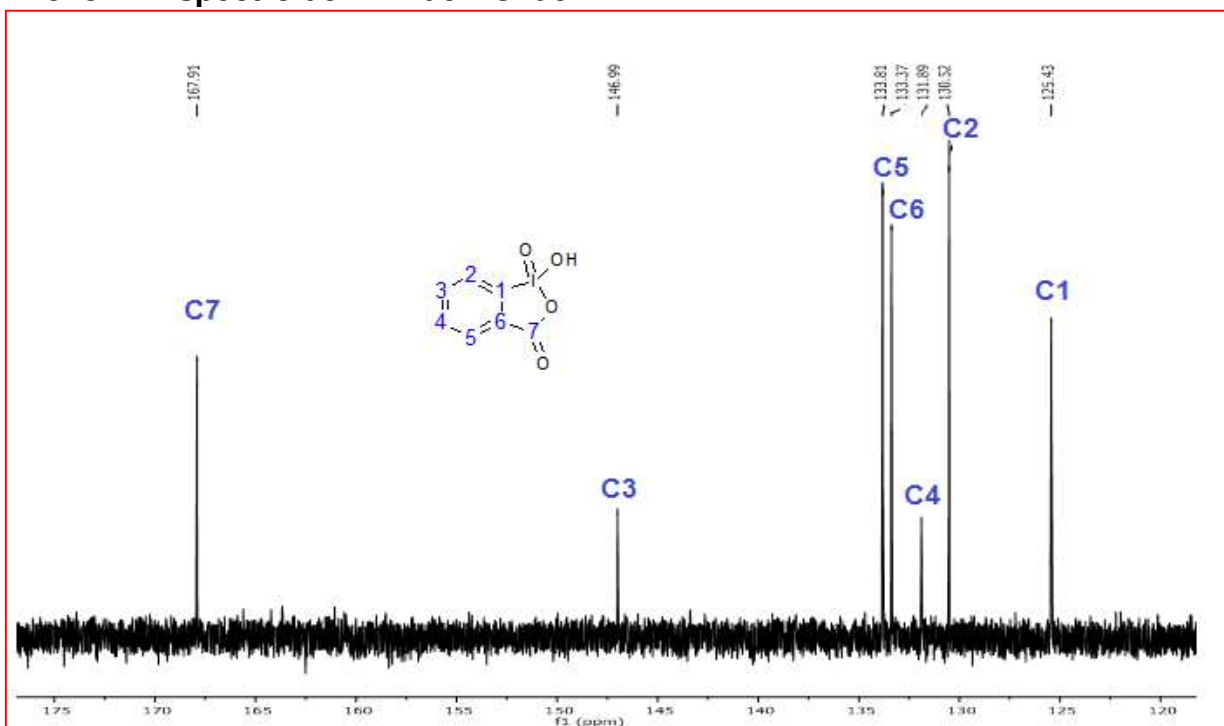
Anexo 2e. Espectro de RMN de ¹H del pirrol de la adenosina



Anexo 1f. Espectro de IR del IBX



Anexo 2f. Espectro de RMN de ^{13}C del IBX



Anexo 3f. Espectro de RMN de ^1H del IBX

